

Aus der Klinik für Pädiatrie
mit Schwerpunkt Pneumologie, Immunologie und Intensivmedizin

Sektion Mukoviszidose – Christiane Herzog Zentrum
Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Präklinische ex vivo-Effekte von CFTR-Modulatoren an humanen Rektum-
biopsien zur Medikamentenentwicklung bei Mukoviszidose**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sheila Zink, geb. Scheinert
aus Potsdam

Datum der Promotion: 4. Juni 2021

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

- 1 Scheinert, S.; Pinders, L.; Derichs, N. (2013) Reliability of Intestinal Current Measurement as outcome biomarker for CFTR modulating therapies. European Cystic Fibrosis Society Diagnostic Network Working Group (ECFS DNWG), 10th Annual Meeting, 13th-15th February 2013, Jerusalem (Abstract und Vortrag).
- 2 Scheinert, S.; Pinders, L.; Derichs, N. (2013) Ex vivo effect of PTC124 on CFTR-mediated chloride secretion in rectal biopsies from CF patients with at least one nonsense mutation. 7th European CF Young Investigator Meeting, February 27th-March 1st 2013, Paris, (Abstract, Vortrag und Poster).
- 3 Scheinert, S.; Pinders-Kessler, L.; Klosinski, M.; Staab, D.; Derichs, N. (2013) Ex vivo effect of CFTR modulators VX770, VX809 and PTC124 on CFTR-mediated chloride secretion in rectal biopsies from CF patients. 36th European Cystic Fibrosis Conference, 12th-15th June 2013, Lisbon (Abstract und Vortrag).
- 4 Scheinert, S.; Pinders-Kessler, L.; Klosinski, M.; Derichs, N. (2013) Reliability of intestinal current measurement as CFTR biomarker and responsiveness to oral ivacaftor treatment. 36th European Cystic Fibrosis Conference, 12th-15th June 2013, Lisbon (Abstract und Poster).

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VII
TABELLENVERZEICHNIS.....	VIII
ABSTRACT DEUTSCH.....	IX
ABSTRACT ENGLISCH	XI
1 EINLEITUNG	13
1.1 DEFINITION UND EPIDEMIOLOGIE DER CF.....	13
1.2 GENETIK UND PATHOPHYSIOLOGIE DER CF	13
1.3 KLINISCHES BILD	16
1.4 DIAGNOSESTELLUNG.....	18
1.4.1 <i>Schweißtest</i>	18
1.4.2 <i>Genetische Untersuchung</i>	18
1.4.3 <i>Nasale Potentialdifferenz</i>	19
1.4.4 <i>Intestinale Kurzschlussstrommessung</i>	19
1.5 THERAPIE DER CF.....	20
1.5.1 <i>Symptomatische Therapie</i>	20
1.5.2 <i>Kausale Therapie</i>	22
2 FRAGESTELLUNG.....	26
3 MATERIAL UND METHODEN	30
3.1 STUDIENTEILNEHMENDE.....	30
3.2 INTESTINALE KURZSCHLUSSSTROMMESSUNG	31
3.3 INKUBATION MIT CFTR-MODULATOREN.....	41
3.4 CFTR-MODULATORWAHL.....	43
3.4.1 <i>Lumacaftor</i>	43
3.4.2 <i>Ivacaftor</i>	43
3.4.3 <i>Ataluren</i>	44
3.4.4 <i>Gentamicin</i>	44
3.4.5 <i>EPIX-Korrektoren</i>	45
3.4.6 <i>Hylout4</i>	45
3.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	45
4 ERGEBNISSE.....	48
4.1 CHARAKTERISIERUNG DER ICM ALS CFTR-BIOMARKER	48
4.1.1 <i>Variabilität</i>	48
4.1.2 <i>Reproduzierbarkeit und Reliabilität</i>	50
4.2 EX VIVO-MODULATOREFFEKTE	53
4.2.1 <i>Kontrollgruppe</i>	53
4.2.2 <i>Vertex-Modulatoren</i>	54
4.2.3 <i>Ataluren und Kombination Ataluren/Lumacaftor</i>	61
4.2.4 <i>Hylout4</i>	64
4.2.5 <i>EPIX-Korrektoren</i>	65
5 DISKUSSION.....	67

5.1 ICM ALS CFTR-BIOMARKER	67
5.2 EX VIVO-EFFEKT VON CFTR-MODULATOREN	68
5.2.1 <i>Definition der CFTR-Funktion</i>	68
5.2.2 <i>CFTR-Modulation bei F508del homozygoten Patienten</i>	69
5.2.3 <i>CFTR-Modulation bei F508del heterozygoten Patienten</i>	71
5.2.4 <i>CFTR-Modulation bei Klasse IV- und V-Mutationen</i>	71
5.2.5 <i>CFTR-Korrektion bei Klasse I-Mutationen</i>	73
5.3 NUTZEN DER ICM ZUR ENTWICKLUNG VON CFTR-MODULATOREN	74
5.3.1 <i>Erforderliche CFTR-Funktion für einen klinischen Nutzen</i>	74
5.3.2 <i>Klinische Bewertung der Wirksamkeit von CFTR-Modulatoren</i>	75
5.3.3 <i>Präklinische Evaluation von CFTR-Modulatoren</i>	77
5.3.4 <i>Mögliche Studiendesigns zur Untersuchung von CFTR-Modulatoren</i>	79
5.4 VORTEILE UND LIMITIERUNGEN DER STUDIE.....	81
ES WURDE EINE AKZEPTABLE ANZAHL GESUNDER PROBANDEN ALS KONTROLLGRUPPE EINGESCHLOSSEN. DIE MITTLERE CFTR-FUNKTION DER INKUBIERTEN BIOPSIEN ENTSPRACH DABEI DER MITTLEREN CFTR-FUNKTION ALLER BIOPSIEN DER KOHORTE. ALLERDINGS IST AUFGRUND DER DEUTLICHEN INTERINDIVIDUELLEN VARIABILITÄT DER CFTR-FUNKTION UND DER VIELEN SCHWEIßTESTERGEBNISSE IM GRAUBEREICH VON 30-59 MMOL/L NICHT AUSZUSCHLIEßEN, DASS AUCH HETEROZYGOTE TRÄGER EINER CFTR-MUTATION IN DIESE GRUPPE EINGESCHLOSSEN WURDEN. BEI DIESEN NIMMT MAN JE NACH MUTATION EINEN CFTR-FUNKTIONSVERLUST VON BIS ZU 50% AN. ENTSPRECHEND KÖNNTE DANN DER ERRECHNETE EFFEKT DER CFTR-MODULATOREN ZU HOCH KALKULIERT SEIN.	81
6 ZUSAMMENFASSUNG	83
LITERATURVERZEICHNIS	LXXXVI
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	CII
ANTEILSERKLÄRUNG AN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN	CIII
LEBENS LAUF	CVII
PUBLIKATIONS LISTE	CVIII
DANKSAGUNG.....	CX

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-binding-cassette
Amil	Amilorid
ASL	Airway surface liquid
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	body mass index
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaCC	Ca ²⁺ -abhängiger Chloridkanal
CCH	Carbamoylcholinchlorid, Carbachol
CF	Cystic Fibrosis (Mukoviszidose)
CFF	Cystic Fibrosis Foundation
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CTN	Clinical Trials Network
CV	Variationskoeffizient
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedischwefelsäure
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNWG	Diagnostic Network Working Group
DPBS	Transportpuffer Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung
ECFS	European Cystic Fibrosis Society
EW	Einwohner
EMA	European Medicines Agency (Europäische Arzneimittel-Agentur)
ENaC	epithelialer Natriumkanal
Engl.	Englisch
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FEV1	Einsekundenkapazität
FIS	Forskoline induced swelling
Forsk	Forskolin
FRT	Fisher rat thyroid
Geni	Genistein
HBE	human bronchial epithelial
HNE	human nasal epithelial
Hista	Histamin
HTS	high throughput screening

IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
ICM	intestinal current measurement (intestinale Kurzschlussstrommessung)
I_{sc}	Kurzschlussstrom
KCl	Kaliumchlorid
LCI	Lung Clearance Index
M	mukosal
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NBD	nukleotidbindende Domäne
NE	Granulozyten-Elastase
NPD	nasal potential difference (nasale Potentialdifferenzmessung)
ORCC	outwardly rectifying chloride channel
PD	Potentialdifferenz
PD basal	basale Potentialdifferenz
PI-CF	CF-Patienten mit exokriner Pankreasinsuffizienz
PS-CF	CF-Patienten mit exokriner Pankreassuffizienz
RCT	randomisierte kontrollierte Studie
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium (K) channel
R_t	Gewebewiderstand
S	serosal
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SOP	standard operating procedure
TMD	Transmembrandomäne

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Versuchsaufbau der ICM.....	33
Abbildung 3-2: Ussingkammern mit Elektroden und Gewebeslider	36
Abbildung 3-3: Rektumsaugbiopsiezange	36
Abbildung 3-4: Rektumschleimhautbiopsien und Gewebeslider (Collage).....	37
Abbildung 3-5: Beispiel-ICM eines PI-CF-Patienten (F508del homozygot) vor und nach Inkubation	40
Abbildung 4-1: Intraindividuelle Variabilität der ICM, Rt basal.....	48
Abbildung 4-2: Intraindividuelle Variabilität der ICM: PD basal.....	49
Abbildung 4-3: Intraindividuelle Variabilität der ICM: ΔI_{sc} Forsch/IBMX.....	50
Abbildung 4-4: Reproduzierbarkeit bei wiederholter ICM für ΔI_{sc} Forsch/IBMX.....	51
Abbildung 4-5: Reproduzierbarkeit bei wiederholter ICM: Bland-Altman-Diagramm	52
Abbildung 4-6: Originaltracing einer non-CF Biopsie nach Entnahme und nach Inkubation	53
Abbildung 4-7: Reproduzierbarkeit der ICM einer Biopsie nach Entnahme und nach 16h Inkubation.....	54
Abbildung 4-8: Ex vivo-Effekt von Lumacaftor bei F508del homozygoten Patienten	55
Abbildung 4-9: Ex vivo-Effekt von Lumacaftor 30 μ M bei F508del homozygoten Patienten	56
Abbildung 4-10: Ex vivo-Effekt von Lumacaftor/Ivacaftor bei F508del homozygoten Patienten	57
Abbildung 4-11: Ex vivo-Effekt von Lumacaftor/Ivacaftor 10 μ M bei F508del homozygoten Patienten.....	58
Abbildung 4-12: Ex vivo-Effekt von Lumacaftor/Ivacaftor 30 μ M bei F508del homozygoten Patienten.....	59
Abbildung 4-13: Ex vivo-Effekt von Lumacaftor bei F508del heterozygoten Patienten	60
Abbildung 4-14: Ex vivo-Effekt von Ivacaftor bei PS-CF-Patienten.....	61
Abbildung 4-15: Ex vivo-Effekt von Ataluren/Gentamicin bei PI-CF-Patienten mit Klasse I-Mutation.....	62
Abbildung 4-16: Ex vivo-Effekt von Ataluren bei PI-CF-Patienten mit Klasse I-Mutation.....	63
Abbildung 4-17: Ex vivo-Effekt von Ataluren/Lumacaftor bei PI-CF-Patienten mit Klasse I-Mutation.....	63
Abbildung 4-18: Ex vivo-Effekt von Hylout4 bei PS-CF-Patienten mit Klasse IV-/V-Mutation	64
Abbildung 4-19: Ex vivo-Effekt von EPIX4, EPIX5 und EPIX6 bei F508del homozygoten Patienten	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Symptome der CF	17
Tabelle 3-1: Übersicht der Studienteilnehmenden	30
Tabelle 3-2: Materialien zur Datenaufzeichnung	32
Tabelle 3-3: Bestandteile der Ussingkammern	32
Tabelle 3-4: Materialien für Entnahme, Transport und Präparation der Biopsien	33
Tabelle 3-5: Inhaltsstoffe des Meyler-Puffers	34
Tabelle 3-6: Aktive Substanzen nach ICM-Protokoll.....	34
Tabelle 3-7: Inkubationsübersicht	41
Tabelle 3-8: Zusammensetzung des Inkubationsmediums.....	42
Tabelle 3-9: Verwendete CFTR-Modulatoren	42

Abstract Deutsch

Mukoviszidose (CF) ist eine hereditäre Multiorganerkrankung, die durch einen Funktionsverlust eines Chlorid-Kanals (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) an der apikalen Membran sekretorischer Zellen entsteht. Hauptmanifestationen sind eine chronisch-entzündliche Lungenerkrankung und eine exokrine Pankreasinsuffizienz. CFTR-Modulatoren sollen die Funktion des CFTR-Proteins steigern. Die Bewertung neuer Modulatoren präklinisch und klinisch gestaltet sich bisweilen jedoch aufgrund unzureichender Modelle sowie Outcome-Parameter schwierig.

Die Intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM) als CFTR-Biomarker wurde bisher zur Untersuchung des Basisdefektes und bei schwieriger Diagnosestellung herangezogen. Zunächst sollten die Eigenschaften des Biomarkers hinsichtlich intraindividuelle Variabilität und Reproduzierbarkeit überprüft werden, um den Einsatz der ICM in klinischen Studien zu etablieren. Außerdem sollte der ex vivo-Effekt verschiedener CFTR-Modulatoren bestimmt werden, um die Möglichkeiten der präklinischen Modulatoruntersuchung mittels ICM zu überprüfen.

Zwischen Oktober 2011 und März 2013 wurden insgesamt 508 Rektumschleimhautbiopsien von 50 Probanden untersucht (14 gesunde Nichtraucher, 27 PI-CF, 9 PS-CF). Davon erhielten 8 Probanden (3 non-CF, 2 PI-CF, 3 PS-CF) wiederholte ICM-Messungen nach 0, 7 und 14 Tagen. Nach Etablierung der Reliabilität wurden alle Biopsien je nach Genotyp mit Ivacaftor (30 μ M), Lumacaftor (10/30 μ M), Ataluren (10 μ M), Gentamicin (400 mg/ml), Hylout4 (100 μ M), EPIX4 (10 μ M), EPIX5 (10 μ M), EPIX6 (10 μ M) oder Kombinationen sowie DMSO 0,1 % über 16h inkubiert (37°C, 96 % O₂, 5 % CO₂). Im Anschluss wurde erneut die CFTR-Funktion mittels ICM bestimmt.

Die intraindividuelle Variabilität der ICM fiel gering aus, 87 % der Messungen erfüllten das Kriterium für Reproduzierbarkeit. Lumacaftor zeigte einen Trend zur Verbesserung der CFTR-Funktion bei F508del homozygoten Patienten um 10,9 %, die Kombination aus Ivacaftor und Lumacaftor führte in dieser Patientengruppe zu keiner Steigerung der CFTR-Funktion. Ataluren sowie EPIX4, EPIX5 und EPIX6 bewirkten keine Verbesserung der CFTR-Funktion. In der Patientengruppe mit einer Klasse IV- oder V-Mutation zeigte sich die Mutation R347P responsiv für Ivacaftor, die Mutationen 3849+10kbC->T, A455E, 2789+5G->A oder L206W zeigten dagegen keine Responsivität. Hylout4 führte

bei CF-Patienten mit einer Klasse IV- oder V-Mutation zu einer nicht signifikanten Verbesserung der CFTR-Funktion um 26 %.

Diese Daten deuten den möglichen Nutzen der ICM an einerseits zum Einsatz in klinischen Studien insbesondere in frühen Phasen oder bei kleiner Studienpopulation, um die Wirksamkeit von CFTR-Modulatoren zu demonstrieren, sowie andererseits zur präklinischen Evaluation der mutationsspezifischen oder individuellen Wirksamkeit dieser vielversprechenden Medikamentengruppe. Es sind weitere Daten zur Korrelation von Verbesserung der CFTR-Funktion in der ICM und klinischem Outcome erforderlich, um den Einsatz der ICM in der Entwicklung neuer CFTR-Modulatoren voranzutreiben.

Abstract Englisch

Cystic fibrosis (CF) is a hereditary multi-organ disease caused by a loss of function in a chloride channel (CFTR) at the apical membrane of secretory cells. Main manifestations are chronic inflammatory lung disease and exocrine pancreatic insufficiency. CFTR modulators are developed to increase CFTR function. Still a lack of optimal models and outcome parameters complicates the preclinical and clinical evaluation of new modulators.

Intestinal current measurement (ICM) as CFTR biomarker has served to investigate the basic defect and as a diagnostic tool. We investigated the characteristics of ICM concerning intraindividual variability and reproducibility as a basis for the use of ICM in clinical studies. Then the ex vivo effect of various CFTR modulators was determined to estimate the possibilities of CFTR modulator testing at a preclinical stage.

Between October 2011 and March 2013 a total of 508 rectum suction biopsies from 50 probands were investigated (14 healthy non-smokers, 27 PI-CF, 9 PS-CF). 8 specimens (3 non-CF, 2 PI-CF, 3 PS-CF) underwent 3 repetitive ICM measurements every 7 days. After establishment of the reliability of the method, all biopsies were incubated according to their genotype for 16h (37°C, 96 % O₂, 5 % CO₂) with Ivacaftor (30 µM), Lumacaftor (10/30 µM), Ataluren (10 µM), Gentamicin (400 mg/ml), Hylout4 (100 µM), EPIX4 (10 µM), EPIX5 (10 µM), EPIX6 (10 µM) or combinations as well as DMSO 0,1%. Afterwards CFTR function was determined again by ICM.

Intraindividual variability of ICM was low, 87 % of measurements fulfilled the criteria for reproducibility. Lumacaftor increased CFTR function in F508del homozygous patients by 10.9 %, combination of Ivacaftor and Lumacaftor did not show an improvement of CFTR function. Ataluren, EPIX4, EPIX5 and EPIX6 did not increase CFTR function. In the group with a class IV or V mutation, the variant R347P appeared responsive to Ivacaftor, whereas the mutations 3849+10kbC->T, A455E, 2789+5G->A or L206W did not. Hylout4 increased CFTR function statistically not significant by 26 % in CF patients with a class IV or V mutation.

These data suggest the benefit of ICM for the use in clinical trials especially in early phases or with small study populations to determine the efficacy of CFTR modulators and for preclinical evaluation of mutation-specific or individual efficacy of this promising

group of drugs. More data are needed about correlation of improvement of CFTR function in ICM and clinical outcome to promote the use of ICM in CFTR modulator development.

1 Einleitung

1.1 Definition und Epidemiologie der CF

Mukoviszidose (auch: zystische Fibrose, engl.: cystic fibrosis, CF) ist eine autosomal-rezessive lebensverkürzende Multiorganerkrankung. CF entsteht durch eine mutationsbedingte Störung des CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)-Proteins, einem Anionenkanal exokriner Drüsen (Hebestreit und Hebestreit 2019). Durch den Kanaldefekt kommt es zu einer verminderten Sekretion von Chlorid-Ionen, die wiederum eine Hyperviskosität der Sekrete zur Folge hat und zur Inflammation führt. Betroffene Organsysteme sind insbesondere die Atemwege, der Verdauungstrakt und die Reproduktionsorgane. (Elborn 2016) CF ist die häufigste genetische Erkrankung in der kaukasischen Bevölkerung (O'Sullivan et al. 2009). In Europa sind derzeit etwa 45.000 Patienten in einem Register erfasst (Orenti et al. 2018). Daraus ergibt sich eine Prävalenz in Europa von durchschnittlich 8,4/100.000 Einwohner (EW) mit einer erheblichen geografischen Streuung von 1,0/100.000 EW in Lettland bis 29,8/100.000 EW in Irland (Farrell 2008). In Deutschland wird die Inzidenz derzeit auf 1:3300 bis 1:4800 Neugeborenen geschätzt (Naehrig et al. 2017). In den USA sind derzeit etwa 30.000 Patienten registriert, wobei 93,6 % der Patienten der weißen Bevölkerung zuzuordnen sind (Cystic Fibrosis Patient Registry 2018).

1.2 Genetik und Pathophysiologie der CF

Die Erstbeschreibung der CF und Namensgebung geht auf Dorothy Andersen im Jahr 1938 zurück. Sie beschrieb bei 49 Patienten eine zystische Fibrose des Pankreas, die außerdem mit pulmonalen Infektionen und Elektrolytverlust während einer Hitzewelle in New York assoziiert war (Andersen 1938). Charles Lowe erkannte 1949, dass es sich bei der CF um eine Erbkrankheit mit autosomal-rezessiver Vererbung handelt (Lowe et al. 1949).

Im Jahr 1989 wurde schließlich das CFTR-Gen auf Chromosom 7 identifiziert und sequenziert, zudem wurde die erste CFTR-Mutation beschrieben (Riordan et al. 1989, Rommens et al. 1989, Kerem et al. 1989). Die Anzahl der bekannten CFTR-Mutationen stieg im Folgenden stetig an. Bis heute wurden mehr als 2000 Mutationen des CFTR-Gens beschrieben (CFTR Mutation Database 2011). Davon werden derzeit 360 als CF-

verursachend eingestuft, bei weiteren wird ein variabler Phänotyp beschrieben (US CF Foundation et al. 2011). Ein Teil der Mutationen stellt vermutlich Polymorphismen ohne klinische Konsequenz dar.

Entsprechend der verschiedenen Mutationen können unterschiedliche Schritte der Proteinbiosynthese beeinträchtigt sein. Aus dieser Beobachtung heraus werden CFTR-Mutationen in 6 Mutationsklassen eingeteilt (Sheppard et al. 1993, Welsh und Smith 1993, Riordan 2008, Boyle und De Boeck 2013, Veit et al. 2016, Elborn 2016):

- Klasse I: Die Mutation (Nonsense, Frameshift oder Splicing-Defekt) führt zu einer fehlerhaften mRNA-Synthese, in der Folge wird kein CFTR-Protein produziert.
- Klasse II: Durch diese Mutationen entsteht eine fehlerhafte Proteinfaltung, welche wiederum zur Retention im endoplasmatischen Retikulum und zum konsekutiven frühzeitigen proteasomalen Abbau führt.
- Klasse III: Bei sog. Gating-Mutationen wird zwar ein CFTR-Kanal an der Zellmembran exprimiert, dieser weist jedoch eine Regulationsstörung mit deutlich verminderter Öffnungswahrscheinlichkeit auf.
- Klasse IV: Diese Mutationen führen zu einer deutlich reduzierten Ionenleitfähigkeit des an der apikalen Zellmembran exprimierten CFTR-Kanals.
- Klasse V: Diese Mutationen beeinträchtigen die Quantität von funktionellen CFTR-Kanälen.
- Klasse VI: Bei diesen Mutationen besteht eine deutlich eingeschränkte Membranstabilität des funktionellen CFTR-Proteins, sodass es zu einem vorzeitigen Abbau kommt.

Dabei ist anzumerken, dass einzelne Mutationen Eigenschaften mehrerer Mutationsklassen aufweisen können. So zählt die häufigste CF-Mutation F508del, die eine Allelhäufigkeit von etwa 90 % weltweit aufweist, zu den Klasse II-Mutationen mit gestörter Proteinfaltung (US CF Foundation et al. 2011). 3 % der F508del-CFTR-Proteine erreichen jedoch die Zellmembran und zeigen dann Eigenschaften einer Klasse III-Mutation (Sosnay et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wird gemäß bestehender Empfehlungen stets der traditionelle Name (*legacy name*) der Mutationen verwendet (Stuhrmann-Spangenberg et al. 1997, Dequeker et al. 2009). Viele Mutationen können aktuell keiner Mutationsklasse zugeordnet werden, da ihre funktionelle Bedeutung in der Proteinbiosynthese nicht ausreichend untersucht wurde (Dequeker et al. 2009).

Die CF folgt einem autosomal-rezessiven Erbgang. Träger einer Mutation sind gesund und werden als *carrier* bezeichnet. Erst bei Vorliegen von 2 Mutationen *in trans*, d.h. auf

2 Allelen, entsteht die Erkrankung. Patienten können homozygot für eine Mutation sein (z.B. F508del/F508del), können aber auch compound heterozygot für 2 verschiedene Mutationen auf jeweils einem Allel sein (z.B. F508del/G551D) (Gallati et al. 2014). Diese Klassifikation zeigt auch eine Korrelation mit der Symptomatik und der Schwere der Erkrankung: Mutationen der Klassen I-III sind in der Regel mit einem völligen Funktionsverlust der CFTR-Proteins und einer schweren CF-Erkrankung assoziiert, während Mutationen der Klassen IV – VI mit einer CFTR-Restfunktion und einem milderen Erkrankungsverlauf einhergehen (Wilschanski et al. 1995). So liegt bei Patienten mit einer Mutation der Klasse IV – VI häufig keine exokrine Pankreasinsuffizienz vor. Entsprechend fallen diese Patienten nicht durch Gedeihstörungen auf und werden auch nicht mittels Neugeborenenenscreening identifiziert, sondern werden zumeist erst später aufgrund der pulmonalen Symptomatik diagnostiziert (Hirtz et al. 2004, Naehrlich et al. 2013).

Das CFTR-Protein bildet einen Anionenkanal, der an der apikalen Membran zahlreicher sekretorischer Zellen zu finden ist. Er besteht aus 1480 Aminosäuren und wird den ATP-binding-cassette (ABC) -Transportern zugeordnet (Riordan et al. 1989). Der Kanal besteht aus 5 Domänen: 2 Transmembrandomänen (TMD1 und TMD2) mit jeweils 6 hydrophoben Segmenten (M1-6 und M7-12) formen die Kanalpore, eine regulatorische Domäne (R) initiiert die Öffnung und 2 nucleotidbindende Domänen (NBD1 und NBD2) induzieren schließlich die Kanalöffnung (Rommens et al. 1989, Riordan et al. 1989). Die Öffnung ist cAMP- (zyklisches Adenosinmonophosphat) abhängig (Smith und Welsh 1992): Die regulatorische Domäne wird durch eine Proteinkinase nach cAMP-Aktivierung phosphoryliert, daraufhin bindet ATP an die beiden NBD. NBD1 und NBD2 dimerisieren in der Folge, sodass sich die Kanalpore öffnet. Durch Hydrolyse des ATP wird der Kanal wieder geschlossen (Derichs 2013).

Das CFTR-Protein ist neben seiner Funktion als Ionenkanal auch in die Regulation anderer Kanäle involviert, wie etwa dem ENaC (epithelialer Natrium-Kanal), der ROMK1 und ROMK2 (Kaliumkanäle) oder den ORCCs (outwardly rectifying chloride channels), und interagiert mit anderen Proteinen. Die Expression des CFTR-Gens ist gewebespezifisch, man findet das Protein zu hohen Anteilen in der Darmschleimhaut und im biliären System, aber auch in Pankreas, Lunge, Schweißdrüsen und Geschlechtsorganen. (Gallati et al. 2014)

Eine verminderte Funktion des CFTR-Kanals führt zu einer Reduktion der apikalen Chlorid-Sekretion bzw. Resorption in der Schweißdrüse (Boucher et al. 1988). In einigen Geweben wie den Atemwegen kommt es außerdem zu einer Überaktivität des apikalen ENaC mit einer konsekutiven Hyperresorption von Natrium-Ionen aus dem Lumen (Mall et al. 1998¹). Resultierend wird der interstitielle Wassereinstrom in das Lumen der Drüsen begrenzt, woraus hypervisköse Sekrete resultieren. Diese wiederum verlegen das Lumen und die Ausführungsgänge exokriner Drüsen. In den Atemwegen führt die verminderte Hydratation der sog. Airway Surface Liquid (ASL) zu einer eingeschränkten mukoziliären Clearance (Boucher 2004).

Über den CFTR-Kanal wird auch Bicarbonat sezerniert. Eine verminderte CFTR-Funktion führt entsprechend zu einem Absinken des pH der Sekrete (Coakley et al. 2003). Tiermodelle zeigen, dass die Azidifizierung in den Atemwegen zu einer Hemmung der körpereigenen antimikrobiellen Peptide führt (Pezzulo et al. 2012). Die Funktionalität des Mukus der Atemwege hängt zudem stark von seiner Bicarbonat-Konzentration ab, ein Bicarbonat-Mangel trägt vermutlich ebenfalls zur Hyperviskosität bei (Quinton 2008, Hoegger et al. 2014).

Aufgrund des zähen Mukus und der damit eingeschränkten mukoziliären Clearance sowie der Hemmung antimikrobieller Peptide ist die Fähigkeit, die Atemwege von Mikroorganismen zu befreien, bei CF-Patienten deutlich herabgesetzt. Im Zuge einer bakteriellen Besiedlung entsteht eine chronische Inflammation. (Elborn 2016, Cohen und Prince 2012)

In anderen Geweben ist der Pathomechanismus ähnlich: durch die fehlende Chloridsekretion werden ebenfalls hypervisköse Sekrete gebildet, die die Ausführungsgänge der Drüsen verlegen und somit zu einem chronischen fibrotischen Umbau führen. Im Pankreas etwa führt die Mukus-Obstruktion bereits in utero zur chronischen obstruktiven Pankreatitis und Pankreasinsuffizienz bei Geburt. (Hebestreit und Hebestreit 2019)

1.3 Klinisches Bild

Da der CFTR-Kanal eine wichtige Rolle in allen sekretorischen Drüsen spielt, treten Symptome in vielen Organsystemen auf. In Tabelle 1-1 sind die häufigsten Symptome nach Organsystem zusammengefasst, therapiebedingte Komplikationen wie eine Niereninsuffizienz durch Aminoglykoside sind nicht aufgeführt (Schwarz und Staab 2015, Gallati et al. 2014):

Tabelle 1-1: Symptome der CF

Organ (-system)	Symptome
obere Atemwege	Nasenpolypen, chronische Sinusitis, Anosmie
untere Atemwege	rezidivierende bronchopulmonale Infekte, bronchiale Obstruktion, Atelektasen, Infektionen durch gramnegative Bakterien wie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , durch <i>Staph. aureus</i> und <i>Haemophilus influenzae</i> oder durch Pilze, Bronchiektasen, allergische bronchopulmonale Aspergillose, pulmonale Überblähung, Hämoptysen, Pneumothorax, respiratorisches Versagen, Dyspnoe
Herz	Cor pulmonale, Hypertonie
Pankreas	exokrine Pankreasinsuffizienz, rezidivierende oder chronische Pankreatitis, Diabetes mellitus Typ 3
Darm	Mekonium-Ileus, Gedeihstörung, Rektumprolaps, distales intestinales Obstruktionssyndrom
Leber	billiäre Zirrhose, Fibrose, primär sklerosierende Cholangitis, Cholelithiasis
Geschlechtsorgane	♂: Azoospermie mit Infertilität ♀: reduzierte Fertilität
Bewegungsapparat	Osteoporose, Arthropathie
Schweißdrüsen	Salzverlustsyndrom

Es besteht eine große Heterogenität bezüglich des klinischen Verlaufs und der Organbeteiligung bei CF. Bei nahezu allen Patienten treten im Verlauf pulmonale Symptome auf, 61 % der Patienten leiden unter einer chronischen Rhinosinusitis (Bock et al. 2017). Eine exokrine Pankreasinsuffizienz zeigt sich bei 84 % aller CF-Patienten (Burkhardt und Wiese 2017). 15 % der Patienten erleiden eine Cholezystolithiasis, 10 % der Patienten entwickeln eine Leberzirrhose (Debray et al. 2011). Unter den Neugeborenen mit CF zeigen 20 % einen Mekoniumileus (Dupuis et al. 2016). Grund für die Heterogenität der Erkrankung ist einerseits die Vielzahl möglicher zugrundeliegender Mutationen mit variierender funktioneller Beeinträchtigung der CFTR-Funktion, andererseits auch

krankheitsmodifizierende Gene (Cutting 2015) und der sozioökonomische Status (Schlechter et al. 2001).

1.4 Diagnosestellung

Die Diagnostik hinsichtlich einer möglichen CF wird bei Vorliegen mindestens eines Symptoms veranlasst. Weitere Indikationen sind ein positives Neugeborenencreening, welches in Deutschland und vielen anderen europäischen Ländern flächendeckend durchgeführt wird, oder die Diagnose einer CF bei Geschwistern. Zur Diagnosesicherung ist laut Leitlinie der Nachweis einer CFTR-Funktionsstörung gefordert. (Naehrlich et al. 2013)

1.4.1 Schweißtest

Den Goldstandard zum Nachweis einer CFTR-Funktionsstörung stellt der Schweißtest dar (Mall 2014), welcher bereits 1959 durch Gibson und Cooke entwickelt wurde (Gibson und Cooke 1959). Über Pilocarpin-Iontophorese wird die Schweißproduktion lokal am Unterarm angeregt, im Anschluss wird der Schweiß über 30 Minuten gesammelt (Mall 2014). Aufgrund fehlender CFTR-vermittelter Rückresorption von Chlorid-Ionen weist der Schweiß von CF-Patienten eine deutlich erhöhte Chlorid-Konzentration auf. Chloridkonzentrationen > 60 mmol/l bei zwei unabhängigen Tests bestätigen die Diagnose, Werte < 30 mmol/l schließen die Diagnose CF weitestgehend aus (Mall 2014, Gallati et al. 2014, Farrell et al. 2017). Falsch positive Werte können bei Dehydration, Ekzem, Unterernährung, Pseudohyperaldosteronismus, nephrotischem Syndrom und einigen anderen Erkrankungen auftreten (Hebestreit und Hebestreit 2019). Falsch negative Ergebnisse können hingegen durch eine unzureichende Schweißmenge, Überwässerung oder die Gabe von Glukokortikoiden entstehen (Mall 2014).

1.4.2 Genetische Untersuchung

Bei grenzwertigen Ergebnissen des Schweißtests (30 – 60 mmol/l) wird im nächsten Schritt eine genetische Untersuchung vorgenommen. Zunächst erfolgt meist eine Untersuchung auf die häufigste Mutation F508del, dann bei Nachweis von nur einer oder keiner Mutation ein Screening auf die häufigsten Mutationen mittels Standard-Kits (Stuhrmann-Spangenberg et al. 2009). Ein Nachweis von 2 CF-verursachenden Mutationen

sichert die Diagnose (Naehrlich et al. 2013). Wird initial nur eine oder keine CF-Mutation nachgewiesen, soll eine komplette Analyse des CFTR-Gens folgen, die eine Sequenzierung aller Exons mit flankierenden Introns, die Suche nach größeren Deletionen und Insertionen sowie die Suche nach bekannten und häufigen Intronmutationen beinhaltet. Auf diese Weise kann der Genotyp bei etwa 99 % der CF-Patienten bestimmt und die Diagnose entsprechend gesichert werden (Naehrlich et al. 2013). Ein fehlender Nachweis von 2 CFTR-Mutationen schließt insbesondere bei grenzwertigem Schweißtestergebnis eine CF jedoch nicht aus (Stuhrmann-Spangenberg et al. 2009, Dequeker et al. 2009). Außerdem ist die klinische Konsequenz nicht für alle beschriebenen CFTR-Mutationen gesichert (US CF Foundation et al. 2011, Dequeker et al. 2009). In solchen Fällen wird eine weitere Funktionsanalyse des CFTR-Kanals mittels Nasaler Potentialdifferenzmessung oder Intestinaler Kurzschlussstrommessung empfohlen (Naehrlich et al. 2013).

1.4.3 Nasale Potentialdifferenz

Die Nasale Potentialdifferenz (Nasal Potential Difference, NPD) wird zwischen einer dünnen Messsonde am Nasenepithel und einer subkutanen Referenzelektrode abgeleitet (Knowles et al. 1981). Die NPD ermöglicht eine sichere Unterscheidung zwischen CF ohne CFTR-Restfunktion und nicht-CF (Wilschanski et al. 2001, Sermet-Gaudelus et al. 2010²). Aufgrund der erforderlichen Kooperation ist die Untersuchung erst bei Kindern ab dem Schulalter möglich, Nasenpolypen und Rhinitis stellen eine Kontraindikation für die Untersuchung dar (Gallati et al. 2014). Das Protokoll wurde europaweit standardisiert. Entsprechende Referenzwerte werden aktuell in einer multizentrischen Studie erhoben.

1.4.4 Intestinale Kurzschlussstrommessung

Die Intestinale Kurzschlussstrommessung (Intestinal Current Measurement, ICM) wurde zur funktionellen Untersuchung des CF-Basisdefektes an nativem Gewebe entwickelt (Veeze et al. 1991). Dabei wird rektale Schleimhaut als Gewebe mit einer besonders hohen CFTR-Expression genutzt. Die CFTR-Funktion wird ex vivo durch Messung des Kurzschlussstroms unter einer Spannung von 0 mV als Äquivalent des Ionenflusses in Ussingkammern bestimmt, während verschiedene Ionenkanäle durch die Zugabe von

Agenzien stimuliert oder inhibiert werden (Hug et al. 2011). Im Verlauf wurde die Methode stetig weiterentwickelt (De Jonge et al. 2004, Mall et al. 2004). Die ICM zeigte sich sehr sensitiv, um eine residuelle CFTR-Funktion zu detektieren. Gleichzeitig zeigt die Methode eine bisher exzellente Unterscheidung zwischen pankreassuffizienten CF-Patienten (PS-CF) mit CFTR-Restfunktion und non-CF (Derichs et al. 2010, Pinderskeßler, bisher nicht veröffentlicht). Die ex vivo-Bedingungen reduzieren die möglichen Störfaktoren auf ein Minimum. Ein weiterer Vorteil der Methode ist ihre Anwendbarkeit auch bei Kleinkindern und Säuglingen. Einzig Gerinnungsstörungen und Hämorrhoiden stellen eine Kontraindikation dar. Auch für die ICM liegt ein standardisiertes Protokoll vor, die partizipierenden Zentren verfügen jeweils über eigene Referenzwerte (ECFS Diagnostik Network Working Group und ECFS Clinical Trials Network 2011, De Boeck et al. 2011).

Wird mittels NPD oder ICM eine CFTR-Dysfunktion nachgewiesen, gilt die Diagnose bei klinischem Hinweis auf eine CF als gesichert (Naehrlich et al. 2013).

1.5 Therapie der CF

1.5.1 Symptomatische Therapie

Die Lebenserwartung der Patienten mit CF konnte durch ein zunehmendes Verständnis der Pathophysiologie und damit stetiger Erweiterung der Therapiekonzepte von wenigen Monaten in den 1950er Jahren auf aktuell etwa 40 Jahre ausgedehnt werden (Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2018).

Wesentliche Therapiekonzepte bestehen in einer möglichst optimalen Reinigung der Atemwege, einer frühen und aggressiven Behandlung von Infektionen sowie der Vorbeugung und Korrektur von Ernährungsdefiziten (Elborn 2016, Bell et al. 2020).

Die Haupttodesursache von CF-Patienten ist heutzutage das respiratorische Versagen (Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2018), weshalb das Hauptziel der Therapie darin besteht, die Progredienz der Lungenerkrankung abzumildern bzw. aufzuhalten (Smyth et al. 2014, Castellani et al. 2018).

Eine besondere Bedeutung kommt daher der Prävention und Therapie pulmonaler Exazerbationen zu, da diese häufig mit einem Abfall der Lungenfunktion einhergehen (Müller et al. 2015).

Zur Mukolyse hat sich die Inhalation mit Dornase alfa als wirkungsvoll erwiesen (Fuchs et al. 1994, Jones und Wallis 2010), in Studien konnte eine Verlangsamung des Abfalls der Einsekundenkapazität (FEV₁) gezeigt werden (Konstan et al. 2011). Supportiv kommen zur Rehydratation der Atemwege hypertone NaCl-Lösung (Wark und McDonald 2009, Smyth et al. 2014) und Mannitol (Aitken et al. 2012) zum Einsatz. Insbesondere der frühe Einsatz von hypertoner NaCl-Lösung erwies sich als positiv für Lungenfunktion und Gewichtszunahme (Stahl et al. 2019). Ein weiteres wichtiges Element der Therapie der CF-Lungenerkrankung ist eine regelmäßige Physiotherapie zur Optimierung der Inhalationstechnik und Sekretmobilisation, wobei ältere Patienten u.a. die modifizierte Autogene Drainage nutzen (Conway et al. 2014). Im Alltag wird in allen Altersklassen auch moderate sportliche Betätigung empfohlen (Smyth et al. 2014). Bereits die Kolonisation der Atemwege mit *Pseudomonas aeruginosa* sollte behandelt werden, zur Eradikation wird eine inhalative oder orale antibiotische Therapie empfohlen (Müller et al. 2015). Sollte eine Eradikation nicht erfolgreich sein, wird eine dauerhafte Inhalationstherapie mit Tobramycin empfohlen. Eine pulmonale Exazerbation sollte möglichst frühzeitig intravenös antibiotisch über mindestens 14 Tage behandelt werden, was zur häufigen Hospitalisierung von CF-Patienten führt (Smyth et al. 2014). Bei fortgeschrittener Lungenerkrankung wird eine dauerhafte Sauerstoffinsufflation oder nicht-invasive Beatmung erforderlich (Schwarz und Staab 2015). Ultima ratio der Therapie der CF-Lungenerkrankung stellt die Lungentransplantation dar (Gallati et al. 2014). Das 5-Jahres-Überleben für CF-Patienten nach Lungentransplantation liegt derzeit bei etwa 67 % (Stephenson et al. 2015).

Eine hohe Bedeutung kommt auch dem Erreichen eines guten Ernährungszustandes zu. Dieser weist eine starke Korrelation mit Lungenfunktion und Überleben auf. Das Therapieziel besteht bei Kindern in der altersgerechten Größen- und Gewichtsentwicklung, Erwachsene sollten einen body mass index (BMI) im Normbereich aufweisen. (Smyth et al. 2014)

Bei exokriner Pankreasinsuffizienz erfolgt eine Pankreas-Enzym-Ersatztherapie, essentiell ist eine bedarfsangepasste Ernährung mit höherem Fettanteil (Naehrig et al. 2017). Fettlösliche Vitamine werden substituiert, ggf. erfolgt auch eine NaCl-Substitution. Ein CF-assoziiertes Diabetes mellitus wird meist mit Insulinsubstitution therapiert (Smyth et al. 2014).

Ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung erfordert die umfangreiche CF-Basistherapie eine hohe Compliance der Patienten und Angehörigen und nimmt täglich bis zu vier Stunden in Anspruch (Elborn 2016).

Bei weiteren CF-assoziierten Komplikationen wird die Dauertherapie entsprechend erweitert, etwa bei Lebererkrankung, reduzierter Knochendichte, chronischer Sinusitis oder Arthropathie (Schwarz und Staab 2015).

1.5.2 Kausale Therapie

Im Zuge der stetigen Optimierung der symptomatischen Therapie der CF gelang es, die durchschnittliche Lebenserwartung auf über 40 Jahre anzuheben. Durch Behebung des Basisdefektes mit Verbesserung der CFTR-Funktion soll eine weitere Verbesserung der Lebenserwartung ermöglicht werden, insbesondere könnte dadurch bei frühzeitiger Diagnose und sofortigem Therapiebeginn eine CF-Lungenerkrankung verhindert werden (Elborn 2016, Bell et al. 2020). Sog. CFTR-Modulatoren sollen dabei einen funktionierenden CFTR-Kanal wiederherstellen.

Die Entwicklung von CFTR-Modulatoren, welche in den vergangenen Jahren rasant voranschritt, wurde durch das zunehmend detailliertere Wissen über Aufbau und Funktion des CFTR-Kanals ermöglicht (Bell et al. 2020). Potentioren sollen die Funktionsfähigkeit bereits an der apikalen Zellmembran exprimierten CFTRs verbessern, während Korrektoren den Einbau von CFTR-Protein in die Zellmembran ermöglichen sollen (Verkman und Galiotta 2009, Derichs 2013).

Die ersten CFTR-Modulatoren wurden durch ein funktionelles Hochdurchsatz-Screening (HTS) einer großen Anzahl chemischer Verbindungen an Zellkulturen mit unterschiedlichen CFTR-Mutationen identifiziert (Galiotta et al. 2001, Pedemonte et al. 2005, van Goor et al. 2006, van Goor et al. 2009).

Mit Ivacaftor (Kalydeco®, vormals VX-770) wurde der erste CFTR-Modulator durch die U.S. Food and Drug Administration (FDA) und die European Medicines Agency (EMA) zugelassen. Durch Ivacaftor wird bei der Gating-Mutation G551D die Öffnungswahrscheinlichkeit des CFTR deutlich erhöht und damit die CFTR-Funktion gesteigert.

Ivacaftor zeigte bei Patienten mit mindestens einer Kopie der Klasse III-Mutation G551D eine deutliche Steigerung der Lungenfunktion um etwa 10 % (gemessen an der FEV1) und der Lebensqualität sowie eine Reduktion der Anzahl pulmonaler Exazerbationen pro Jahr um 55 % und des Schweißchlorids in den oberen Normbereich (Ramsey et al.

2011, Davies et al. 2013²). Langzeitdaten zeigen einen langsameren Abfall der Lungenfunktion, weniger gehäufte Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* und eine verbesserte Überlebensrate (McKone et al. 2014, Sawicki et al. 2015). Die Entwicklung von Ivacaftor war ein Meilenstein in der Therapie des Basisdefekts der CF und zeigte gleichzeitig die Wirksamkeit des Prinzips. Allerdings findet sich die Mutation G551D nur bei etwa 1-4 % aller CF-Patienten. Daher wurde die Wirksamkeit von Ivacaftor auch für die Klasse III-Mutationen G178R, S549N, S549R, G551S, G1244E, S1251N, S1255P, G1349D und R117H untersucht mit ähnlichen Ergebnissen (De Boeck et al. 2014). Zuletzt wurden weitere Mutationen, die mit einer CFTR-Restfunktion assoziiert sind, auf der Basis von in vitro-Daten an FRT (Fisher rat thyroid) -Zellen zur CF-Therapie zugelassen (Yu et al. 2012, van Goor et al. 2014, Durmowicz et al. 2018). Damit könnten aktuell bis zu 15 % der Patienten von einer Ivacaftor-Monotherapie profitieren (Gentzsch und Mall 2018).

Die meisten CF-Patienten sind jedoch homozygot für die Mutation F508del. Bei diesen zeigte sich Ivacaftor wirkungslos (Flume et al. 2012). Daher unternahmen die Entwickler von Ivacaftor Bestrebungen, einen CFTR-Korrektor für diese Mutation zu entwickeln (van Goor et al. 2011). Die Korrektur des komplexen Defektes des F508del-CFTR stellte sich jedoch als sehr schwierig heraus (Mall und Hartl 2014). Als erster F508del-Korrektor wurde Lumacaftor (vormals VX-809) in klinischen Studien untersucht. Als Monotherapie konnte dabei in einer Phase IIa-Studie zwar eine Reduktion der Chloridkonzentration im Schweiß gezeigt werden, eine Verbesserung der Lungenfunktion oder der CFTR-Funktion in der NPD blieben aber aus (Clancy et al. 2012). In Kombination mit Ivacaftor zeigte Lumacaftor in klinischen Studien eine Verbesserung der Lungenfunktion gemessen an der FEV1 und eine Minderung der Anzahl pulmonaler Exazerbationen pro Jahr, der Effekt fiel allerdings deutlich geringer aus als der von Ivacaftor allein bei Patienten mit G551D (Wainwright et al. 2015). Dennoch erhielt das Kombinationspräparat Orkambi® (Lumacaftor/Ivacaftor) 2015 die Zulassung der FDA und der EMA zur Therapie von CF bei Patienten mit dem Genotyp F508del/F508del. In der Langzeitbeobachtung zeigte Orkambi® eine signifikante Verzögerung des Lungenfunktionsverlustes (Konstan et al. 2017). Bei Patienten mit nur einer Kopie von F508del zeigte Orkambi® keine Wirksamkeit (Rowe et al. 2017²). Als zweiter F508del-CFTR-Korrektor wurde Tezacaftor (vormals VX-661) in klinischen Studien untersucht. In Kombination mit Ivacaftor zeigte Tezacaftor bei F508del homozygoten Patienten einen ähnlichen Effekt auf die

Lungenfunktion und die Anzahl pulmonaler Exazerbationen pro Jahr bei insgesamt weniger unerwünschten Nebenwirkungen wie Bronchokonstriktion und Dyspnoe (Taylor-Cousar et al. 2017). Ähnliche Effekte konnten auch bei Patienten mit einer Kopie der Mutation F508del und einer Kopie einer Mutation, die mit einer CFTR-Restfunktion einhergeht, gezeigt werden (Rowe et al. 2017¹). Daher wurde das Kombinationspräparat Symdeko® (Tezacaftor/Ivacaftor, in Europa ist Tezacaftor als Symkevi® auf dem Markt) 2018 zur Therapie von CF für die entsprechenden Patientengruppen durch die FDA zugelassen. Einschränkend muss der Nutzen von Ivacaftor/Tezacaftor auf die nicht-F508del-Mutation anhand von in-vitro-Daten oder klinisch belegt sein. Langzeitdaten zum Nutzen der Therapie mit Tezacaftor liegen noch nicht vor. Möglicherweise aufgrund der geringeren Verbesserung in den Endpunkten ist die Verschreibungsrate von Lumacaftor und Tezacaftor deutlich geringer als von Ivacaftor (Sawicki et al. 2018). Auch andere Unternehmen der Arzneimittelindustrie arbeiteten an der Entwicklung von CFTR-Korrektoren für F508del-CFTR. EPIX Pharmaceuticals erarbeitete dazu zunächst ein digitales 3D-Modell des Proteins, um dann aus einer internen Datenbank geeignete Verbindungen zu filtern. Dies führte zur Detektion von verschiedenen CFTR-Korrektoren. (Kalid et al. 2010) Trotz finanzieller Unterstützung durch die Cystic Fibrosis Foundation (CFF) musste das Unternehmen jedoch Konkurs anmelden, bevor die CFTR-Korrektoren in klinischen Studien untersucht werden konnten.

Bei etwa 10 % der CF-Patienten liegt eine Mutation der Klasse I vor. Zur Therapie des Basisdefektes bei diesen Patienten wurde der CFTR-Korrektor Ataluren (PTC124) entwickelt (Welch et al. 2007). Obwohl Phase-II-Studien vielversprechende Ergebnisse mit einer elektrophysiologischen Verbesserung der CFTR-Funktion sowie einem Anstieg der Lungenfunktion lieferten (Sermet-Gaudelus et al. 2010¹), konnte der primäre Endpunkt einer Verbesserung der FEV1 nicht erreicht werden (Kerem et al. 2014). Eine nachträgliche Analyse zeigte zwar ein besseres Ansprechen bei Patienten, die keine inhalativen Aminoglykoside erhielten, jedoch konnte auch in einer erneuten Phase-III-Studie der primäre Endpunkt nicht erreicht werden (Konstan et al. 2020). Daher wurde die Arbeit an dem Klasse I –CFTR-Korrektor Ataluren beendet (PTC Therapeutics 2017). Weitere Bemühungen zielen darauf ab, die Wirksamkeit der bisher verfügbaren CFTR-Modulatoren Ivacaftor, Lumacaftor und Tezacaftor durch die Entwicklung weiterer Korrektoren sowie von Amplifiern zu steigern, um etwa auch für Patienten mit F508del und einer weiteren Klasse I oder II-Mutation eine Modulatortherapie zu ermöglichen (Gentsch und Mall 2018). So wurden etwa next-generation Korrektoren wie VX-659 und VX-

445 entwickelt und in klinischen Studien untersucht (Davies et al. 2018; Keating et al. 2018). Der Korrektor Elexacaftor (vormals VX-445) zeigte dabei in der Phase III-Studie in Kombination mit Tezacaftor und Lumacaftor bei Patienten mit einer Kopie von F508del und einer weiteren Mutation mit nur minimaler CFTR-Funktion eine Verbesserung der FEV1 um 13,8% im Vergleich zur Placebogruppe (Middleton et al. 2019), bei F508del homozygoten Patienten zeigte die Dreifachkombination mit Elexacaftor (Kaftrio®, in Nordamerika Trikafta®) im Vergleich zur Therapie mit Tezacaftor und Lumacaftor eine Verbesserung der FEV1 um 10,0% (Heijerman et al. 2019). Auch weitere Potentioren werden derzeit in klinischen Studien untersucht und mit Ivacaftor verglichen (Davies et al. 2019).

CFTR-Amplifier sollen die Translokationsleistung erhöhen, indem sie die defekte mRNA stabilisieren (Giuliano et al. 2018).

Die Wirksamkeit des Prinzips der CFTR-Modulation zeigt Ivacaftor mittlerweile auch in Langzeitstudien. Weitere CFTR-Korrektoren werden derzeit in klinischen Studien untersucht (Cystic Fibrosis Foundation 2020, Gentzsch und Mall 2018).

2 Fragestellung

Mit der Zulassung von Ivacaftor wurde bei vielen CF-Patienten und -Behandlern die Hoffnung auf eine zeitnah verfügbare Therapie des Basisdefektes geweckt. Auch wenn seit der Zulassung von Lumacaftor/Ivacaftor, Tezacaftor/Ivacaftor und zuletzt auch Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor bereits vielen CF-Patienten eine CFTR-Modulator-Therapie zur Verfügung steht, ist das Ziel noch längst nicht erreicht. Aufgrund der großen Anzahl möglicher CF-Genotypen steht dennoch nicht allen CF-Patienten eine Modulatortherapie zur Verfügung.

Nur 8 % aller CFTR-Mutationen erreichen eine Häufigkeit von mindestens 0,01 % (Sosney et al. 2013), nur eine absolute Anzahl von 20 der beschriebenen 2000 Mutationen erreichen eine Allelhäufigkeit von 0,1 % (Gentsch und Mall 2018). Hinzu kommt, dass viele Mutationen nicht ausreichend charakterisiert sind, sodass der Effekt eines bekannten Modulators auf die CFTR-Synthese unmöglich vorherzusagen ist. Aus der Vielzahl der CFTR-Mutationen ergeben sich wiederum unendlich viele mögliche Genotypen. Entsprechend kann abgeleitet werden, dass ausreichende Patientenkohorten für eine doppelblinde Placebo-kontrollierte Studie häufig nicht gegeben sind. Dies ist bereits daran zu erkennen, dass Ivacaftor für einige Mutationen aufgrund von in-vitro-Daten zugelassen wurde (Durmowicz et al. 2018). Zusätzlich besteht die Schwierigkeit, dass die individuelle Wirksamkeit von CFTR-Modulatoren möglicherweise nicht nur vom CFTR-Genotyp, sondern auch von anderen modifizierenden Genen abhängt (Strug et al. 2016). Die Therapie der CF am Basisdefekt ist also ein Beispiel für die Bedeutung personalisierter Medizin. Es sind individuelle Untersuchungen erforderlich, um herauszufinden, ob CFTR-Modulatoren auf bestimmte seltene Mutationen und beim einzelnen Patienten wirken (Elborn 2016).

Einen weiteren Fallstrick im Zulassungsprozess neuer CFTR-Modulatoren stellt die Auswahl geeigneter Endpunkte dar, um den Nutzen der Substanz zu demonstrieren. Dank optimierter symptomatischer Therapie konnte die Lebenserwartung von CF-Patienten deutlich erhöht werden, sodass die Überlebenszeit keinen geeigneten Outcome-Parameter darstellt (Bosch und De Boeck 2016). Stattdessen wurde in den bisherigen Studien zu CFTR-Modulatoren der Surrogatparameter FEV1 als Endpunkt genutzt (Remsey et al. 2012, Davies et al. 2013², Wainwright et al. 2015, Taylor-Cousar et al. 2017, Rowe et al. 2017^{1,2}, Kerem et al. 2014, Middleton et al. 2019, Heijerman et al. 2019). Dieser ist jedoch möglicherweise nicht sensitiv genug, um kurzzeitige Effekte

von CFTR-Modulatoren zu detektieren, insbesondere bei fortgeschrittener Lungenerkrankung (Elborn 2016).

Zudem liegen bei fortgeschrittener Erkrankung weitere Pathogenitätsfaktoren vor, die durch CFTR-Modulatoren nicht ausreichend beeinflusst werden können. So zeigte sich, dass die Granulozyten-Elastase (neutrophil elastase, NE) einen entscheidenden Risikofaktor für die Entstehung von Bronchiektasen bereits bei Säuglingen und Kleinkindern mit CF darstellt (Sly et al. 2013). Die NE ist u.a. in der Lage, durch proteolytische Abspaltung inhibierender Segmente den ENaC zu aktivieren, dessen Rolle im Pathomechanismus der CF-Lungenerkrankung bereits in Kapitel 1.2 beschrieben wurde (Caldwell et al. 2005). Wildtyp-CFTR zeigt eine anti-proteolytische Wirkung und kann daher der zusätzlichen ENaC-Aktivität entgegenwirken, F508del-CFTR dagegen weist diese Fähigkeit nicht auf (Gentsch et al. 2010). Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die ENaC-Überaktivität in der chronisch entzündeten CF-Lunge durch eine CFTR-Modulator-Therapie allenfalls geringfügig beeinflusst wird (Mall und Hartl 2014). Aktuelle Daten zeigen, dass bereits an CF erkrankte Säuglinge, die nun mittels Neugeborenencreening früher diagnostiziert werden, strukturelle Lungenschäden ohne erkennbare Symptome aufweisen (Sly et al. 2009, Sly et al. 2013). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass eine CFTR-Modulator-Therapie bereits frühestmöglich beginnen sollte, um der Entwicklung der lebenslimitierenden CF-Lungenerkrankung entgegenzuwirken. Um mögliche kurzfristige Effekte der CFTR-Modulatoren zu erfassen, wurden auch CFTR-Biomarker als Endpunkte ermittelt (Accurso et al. 2010, Clancy et al. 2012, Sermet-Gaudelus et al. 2010¹, Ramsey et al. 2011, Davies et al. 2013², Wainwright et al. 2015). Unter Ivacaftor zeigte sich in der Phase-III-Studie sowohl eine statistisch signifikante Verbesserung der FEV1 als auch der Schweißtestergebnisse (Ramsey et al. 2011). Unter Lumacaftor/Ivacaftor zeigte der Schweißtest bei den F508del homozygoten Patienten dagegen keine statistisch signifikante Verbesserung (Wainwright et al. 2015). Die Frage der Responsivität des Schweißtestes wurde wiederholt diskutiert. So scheint der Schweißtest eine gute Korrelation mit der Verbesserung der Lungenfunktion in einer Studienpopulation aufzuweisen, er ermöglicht jedoch keine Aussage über den individuellen Therapieeffekt (Durmowicz et al. 2013, Fidler et al. 2017, Graeber et al. 2018, Masson et al. 2018). Die NPD zeigte in der Phase-II-Studie zu Ataluren eine Verbesserung der CFTR-Funktion (Sermet-Gaudelus et al. 2010¹), der Korrektor konnte aber in der Phase-III-Studie keinen der Endpunkte erreichen (Kerem et al. 2014, Konstan et al. 2020), wohingegen unter Ivacaftor sowohl eine Verbesserung der nasalen

CFTR- als auch der Lungenfunktion beschrieben wurde (Accurso et al. 2010, Clancy et al. 2012). Entsprechend wurde auch die Responsivität der NPD auf CFTR-Modulatoren wiederholt diskutiert. Untersuchungen unter Therapie zeigen keine sichere Korrelation zwischen klinischem Ansprechen und Verbesserung der NPD (Mesbahi et al. 2017, Graeber et al. 2018, Masson et al. 2018).

Der CFTR-Biomarker ICM wurde bisher nicht in klinischen Studien eingesetzt. Allerdings konnte nach der Zulassung von CFTR-Modulatoren eine gute Responsivität der intestinalen CFTR-Funktion demonstriert werden, wobei auch hier nur eine mäßige Korrelation mit dem klinischen Outcome zu verzeichnen war (Graeber et al. 2015, Graeber et al. 2018). Bei gleichzeitiger Erfassung der 3 CFTR-Biomarker Schweißtest, NPD und ICM fiel auf, dass Therapieeffekte meist nur in 1 oder 2 Parametern gezeigt werden konnten. Es fehlen langfristige Untersuchungen mit Bestimmung der Biomarker Schweißtest, NPD und ICM in einer größeren Patientenkohorte und Evaluation des klinischen Outcomes über die Änderung der FEV1 hinaus. Für einen breiteren Einsatz der ICM als Endpunkt fehlt es bisher an Daten zu Variabilität und Reproduzierbarkeit des Biomarkers (De Boeck et al. 2013).

In der präklinischen Phase wird die Wirkung potentieller Verbindungen nach dem HTS an Zellkulturen untersucht. Bisher wurden dazu häufig etablierte Zellkulturen wie die FRT-Zellen genutzt. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf humanes natives Gewebe bleibt dabei aber fraglich (Pedemonte et al. 2010). Immer häufiger kommen auch Zellen von humanem Bronchialepithel (HBE) zum Einsatz. Die Materialgewinnung von Individuen ist jedoch invasiv und daher nur schlecht durchführbar. Seltene Mutationen sind entsprechend nicht verfügbar (Clancy et al. 2019).

Die ICM dient bereits seit längerem als diagnostische Methode bei fraglicher CF, wenn Schweißtest und Mutationsanalyse keine eindeutige Zuordnung erlauben (Naehrlich et al. 2013, Farrell et al. 2017). Dabei hat sich die ICM sehr sensitiv zur Bestimmung einer CFTR-Restfunktion gezeigt. Außerdem konnte demonstriert werden, dass eine Korrelation zwischen der CFTR-Funktion und dem Phänotyp der Patienten besteht (Hirtz et al. 2004). Untersuchungen zeigten, dass CFTR-Modulatoren ex vivo die rektale CFTR-Funktion beeinflussen können (Derichs et al. 2011, Roth et al. 2011).

Ex vivo-Untersuchungen von CFTR-Modulatoren bieten den Vorteil, dass die Wirksamkeit eines CFTR-Modulators vor der systemischen Einnahme kurzfristig abgeschätzt werden könnte. Außerdem könnten verschiedene Modulator-Kombinationen evaluiert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es daher sein, zunächst Variabilität und Reproduzierbarkeit der ICM nach dem standardisierten Protokoll der ECFS zu bestimmen, um eine Grundlage für den Einsatz der ICM in klinischen Studien zu schaffen. In einem zweiten Schritt sollte der ex vivo-Effekt der bereits klinisch untersuchten CFTR-Modulatoren Ivacaftor, Lumacaftor und Ataluren sowie von Hylout4 und experimentellen Korrektoren von EPIX Pharmaceuticals auf die CFTR-Funktion der Rektumschleimhaut von CF-Patienten überprüft werden, um die Möglichkeiten der präklinischen Evaluation von CFTR-Modulatoren zu eruieren.

3 Material und Methoden

3.1 Studienteilnehmende

Zwischen Oktober 2011 und April 2013 wurden insgesamt 50 Probanden untersucht. 14 gesunde Nichtraucher (medianes Alter 36,5 Jahre, 18-72 Jahre) dienten als Kontrollgruppe. Sie wurden zuvor einem Schweißtest unterzogen, das Ergebnis lag in der Kontrollgruppe stets unter den diagnostischen Cut-off von 60 mmol/l, bei 9 Kontrollprobanden lag das Schweißtestergebnis zwischen 30 und 60 mmol/l, lediglich bei einem davon lag der Schweißtest über 40 mmol/l. Zudem wurden insgesamt 36 CF-Patienten untersucht. Diese wurden ausnahmslos aus der Mukoviszidose-Ambulanz der Charité Universitätsmedizin Berlin rekrutiert. Bei allen Patienten wurde die Diagnose durch eine Chloridkonzentration im Schweiß > 60 mmol/l gesichert, zudem waren 2 CF-verursachende Mutationen in trans nachgewiesen. 27 der 36 CF-Patienten waren pankreasinsuffizient (PI-CF), die Gruppe wies ein medianes Alter von 25 Jahren auf (12-44 Jahre). Als Kriterium für das Vorliegen einer exokrinen Pankreasinsuffizienz wurde eine Pankreaselastase im Stuhl < 100 µg/g festgelegt. 9 der CF-Patienten waren pankreassuffizient (PS-CF), das mediane Alter in dieser Gruppe lag bei 41 Jahren (23-57 Jahre). Als Gruppenmerkmal wurden eine Pankreaselastase im Stuhl > 200 µg/g sowie das Vorliegen von 2 CF-verursachenden Mutationen in trans mit mindestens einer Mutation der Klasse IV oder V festgelegt. Eine Übersicht über die Genotypen der Studienteilnehmenden ist in Tabelle 3-1 dargestellt.

Tabelle 3-1: Übersicht der Studienteilnehmenden

Gruppe	Anzahl	Altersmedian (Bereich)	Genotyp
Non-CF	14	36,5 (18-72)	-
PI-CF	27	25 (12-44)	L732X/L732X F508del/R553X F508del/R1162X F508del/W1282X F508del/G551D (n=3) F508del/F508del (n=18) F508del/R347P (n=2)

PS-CF	9	41 (23-57)	F508del/3849+10kbC-T (n=5) F508del/2789+5G>A R553X/A455E 1078delT/R347P F508del/L206W
--------------	---	------------	---

Eine Untergruppe aus 8 Probanden, davon 2 PI-CF (F508del/F508del), 3 PS-CF (F508del/3849+10kbC->T) und 3 non-CF erhielt dreimalig eine ICM im Abstand von je einer Woche, um die Reproduzierbarkeit der Methode zu bestimmen.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin bewilligt. Vor Beginn der Untersuchung wurde die schriftliche Einwilligung aller Teilnehmenden sowie der Eltern bei minderjährigen Patienten eingeholt. Hämorrhoiden oder Blutungsneigungen galten als Ausschlusskriterium und wurden im Rahmen der Rekrutierung explizit abgefragt.

3.2 Intestinale Kurzschlussstrommessung

2011 wurde eine standardisierte Verfahrensanweisung von der ECFS Diagnostic Network Working Group (DNWG) und dem ECFS Clinical Trials Network (CTN) verabschiedet.

Alle Untersuchungen wurden gemäß dieser Standardverfahrensanweisung (ECFS ICM SOP) durchgeführt. Von jedem Teilnehmenden wurden 6-8 oberflächliche Rektumschleimhautproben mittels Saugbiopsie (Trewavis Surgical Instruments, Bayswater, Australien) entnommen. Im Anschluss wurden die Biopsien in mit Meyler-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 3-5) gefüllte rezirkulierende Mikro-Ussing-Kammern (P2400, Physiologic Instruments, San Diego, USA) bei 37°C eingespannt. Dem Puffer wurden zuvor Glukose 10 mM sowie Indometacin 10 µM zur Blockierung der endogenen cAMP-Produktion zugefügt. Die Biopsien wurden während der gesamten Messung mit 95 % O₂ und 5 % CO₂ begast. Zunächst wurden die basale Potentialdifferenz (PD basal) und der Gewebewiderstand (R_t) unter einem offenen Schaltkreis bestimmt, ebenso am Ende der Messung. Dann wurde der Kurzschlussstrom (I_{sc}) im Spannungs-klemmenmodus bestimmt. Es folgte zunächst eine 40-minütige Equilibrierungsperiode mit dreimaligem Austausch der Pufferlösung. Nach Erreichen eines stabilen Niveaus

wurde der basale Kurzschlussstrom registriert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe stimulierender und inhibierender Agenzien gemäß SOP auf mukosaler (M) oder serosaler (S) Seite: Amilorid 100 μM M zur Blockierung des ENaC, Forskolin/IBMX 10/100 μM M+S zur cAMP-abhängigen CFTR-Aktivierung, Genistein 10 μM M+S zur weiteren CFTR-Potenzenzierung, Carbachol 100 μM S zur weiteren CFTR-Stimulation durch cholinerge Koaktivierung, DIDS 200 μM M zur Hemmung alternativer kalziumabhängiger Chloridkanäle und Histamin 500 μM S zur cholinergen Aktivierung der Chloridsekretion durch kalziumabhängige, DIDS-insensitive Chloridkanäle. Es wurde jeweils die Änderung des Kurzschlussstroms registriert.

Die erforderlichen Materialien sind in den Tabellen 3-2 bis 3-6 aufgeführt, der Versuchsaufbau ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

Tabelle 3-2: Materialien zur Datenaufzeichnung

Material	Hersteller
PC mit Betriebssystem Windows XP	LG
PowerLab 8/30, Software Lab Chart 7.2 (Oktober 2010)	AD Instruments

Tabelle 3-3: Bestandteile der Ussingkammern

Material (Produktnummer)	Hersteller
EasyMount Low Volume Ussingkammersystem (EM-LVSY-8) Fundament, Temperatur-Anschlussstück für 8-Kammersystem <ul style="list-style-type: none"> - 8x Low Volume EasyMount Diffusionskammer (P2400) - 8x Ag/AgCl Elektrodenset für das EasyMount Kammersystem (P2020-S), (4x gesinterte Ag/AgCl Pellet-Elektroden zur Messung der Spannung, 4x Ag-Drahtelektroden zur Messung der Stromstärke, 8x Elektrodenspitzen) 	Physiologic Instruments
Slider für die Biopsien <ul style="list-style-type: none"> - 8x 1,5 mm Öffnungsdurchmesser Slider (Fläche= 0,018 cm^2) (P2407C) - 8x 1,2 mm Öffnungsdurchmesser Slider (Fläche= 0,011 cm^2) (P2407B) für kleinere Biopsien 	Physiologic Instruments
Reservespitzen für die Ag/AgCl-Elektroden (P2023-100)	Physiologic Instruments
Nadeln mit weicher Spitze zum Austauschen der Lösungen in den EasyMount Kammern 15G x 3" (FN15)	Physiologic Instruments

Mehrkanalige Spannungs- und Stromklemme (VCC MC8) - Klemmmodul (MC_601) - Eingangsmodul (DM_MC6)	Physiologic Instruments
Zirkulierendes, temperaturkontrolliertes Wasserbad	Julabo
Carbongas 50l (95 % O ₂ , 5 % CO ₂)	Linde

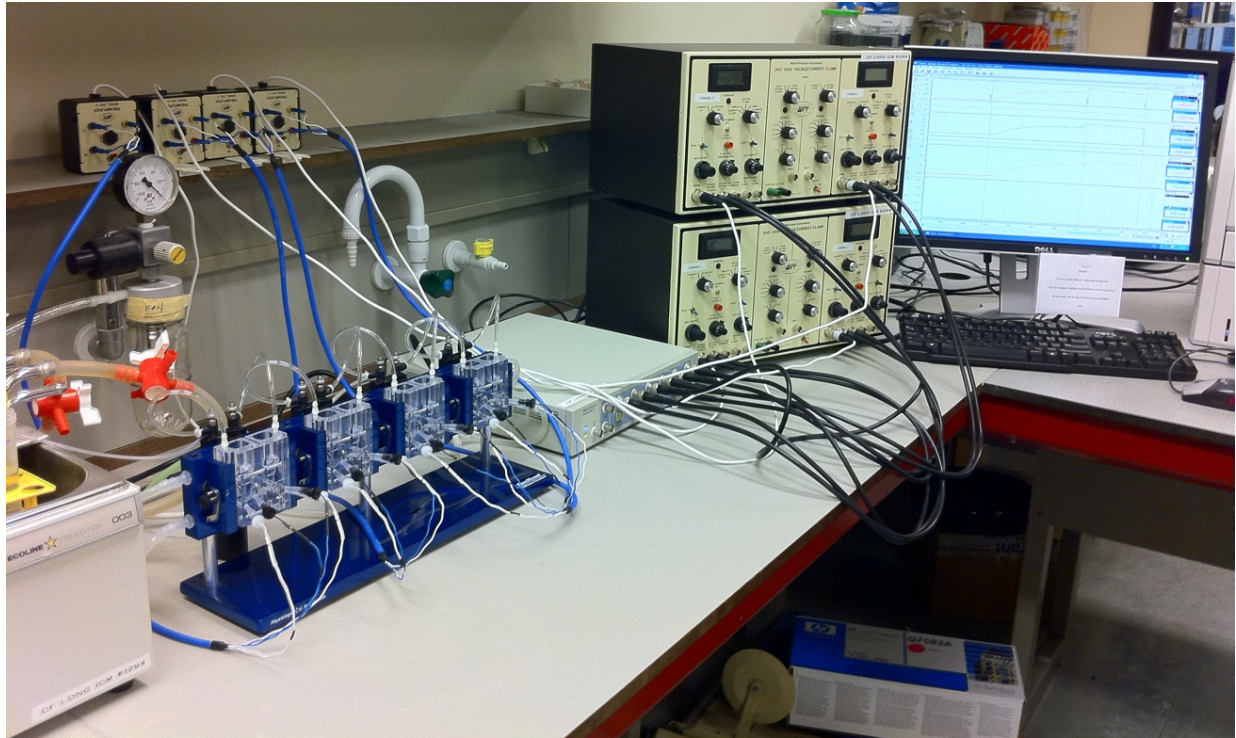


Abbildung 3-1: Versuchsaufbau der ICM

Wasserbad, Begasung, rezirkulierende Ussingkammern, Power-Lab, Spannungs- und Stromklemme, PC (von links nach rechts), Fotografie aus dem eigenen Labor.

Tabelle 3-4: Materialien für Entnahme, Transport und Präparation der Biopsien

Material/Substanz (Produktnummer)	Hersteller
Rektumsaugbiopsiezange (SBT-100, 100-010-01)	Trewavis Surgical Instruments
Transportpuffer Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung, steril gefiltert, (DPBS) (BE17-512F)	Lonza
Indometacin (I8280)	Sigma-Aldrich

Tabelle 3-5: Inhaltsstoffe des Meyler-Puffers

Substanz (Produktnummer)	Summenformel	Molmasse (g/mol)	Konzentration (mM)	Anbieter
Destilliertes Wasser als Stammlösung	H ₂ O	18		Roth
Hepes (H3375)	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	238	10	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (S9763)	Na ₂ HPO ₄	142	0,3	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat (S8282)	NaH ₂ PO ₄	120	0,4	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid (M9272)	MgCl ₂	95	1,0	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (C3881)	CaCl ₂	111	1,3	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (P4504)	KCl	75	4,7	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (71381)	NaCl	59	128	Sigma-Aldrich
Natriumbicarbonat (S5761)	NaHCO ₃	84	20,2	Sigma-Aldrich
D-Glukose (G7528)	C ₆ H ₁₂ O ₆	180	10	Sigma-Aldrich
Indometacin (I8280)	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	358	0,01	Sigma-Aldrich

Indometacin und Glukose sind keine primären Bestandteile des Meyler-Puffers, sondern werden erst vor Beginn der Messung hinzugefügt. Der pH des Meyler-Puffers beträgt 7,4, die Osmolarität 300 mOsm/l.

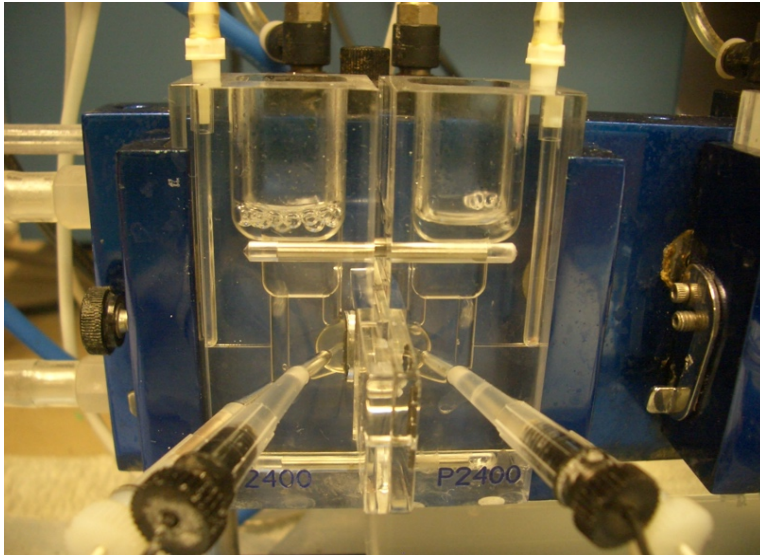
Tabelle 3-6: Aktive Substanzen nach ICM-Protokoll

Substanz (Produktnummer)	Summenformel	Molmasse (g/mol)	Anbieter
Amilorid HCl (A7410)	C ₆ H ₈ ClN ₇ O · HCl	266	Sigma-Aldrich
Forskolin (F6886)	C ₂₂ H ₃₄ O ₇	411	Sigma-Aldrich
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) (I5879)	C ₁₀ H ₁₄ N ₄ O ₂	222	Sigma-Aldrich
Genistein (G6649)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270	Sigma-Aldrich
Carbamoylcholinchlorid (Carbachol, CCH) (C4382)	C ₆ H ₁₅ ClN ₂ O ₂	183	Sigma-Aldrich
4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedischwefelsäure (DIDS) (D3514)	C ₁₆ H ₈ N ₂ Na ₂ O ₆ S ₄ · H ₂ O	499	Sigma-Aldrich
Histamin (H7250)	C ₅ H ₉ N ₃	184	Sigma-Aldrich

Der genaue Versuchsaufbau und –ablauf soll im Folgenden beschrieben werden:

Vorbereitung

1. Die Stammlösungen der Stimulanzen werden aufgetaut.
2. Indometacin und Glukose werden dem Meyler-Puffer zugefügt, der pH-Wert überprüft und ggf. auf 7,4 titriert.
3. Meyler-Puffer wird auf 37°C erwärmt.
4. Das Wasserbad wird eingeschaltet, die Temperatur auf 42°C eingestellt, damit in den Ussing-Kammern eine Temperatur von 37°C vorherrscht.
5. Die Gasleitung wird an das Ussingkammersystem angeschlossen, der Gasfluss gestartet.
6. Die leeren Gewebe-Slider werden in das Kammersystem eingesetzt und festgeschraubt (die Größe, die auch für die Messung verwendet werden soll).
7. Die Stromstärkeelektroden (weiß) werden in die äußere, die Spannungselektroden (schwarz) in die innere Öffnung des Kammersystems eingesetzt. Es wird überprüft, dass sich keine Luftblasen im KCl-Agar und der KCl-Lösung in den Plastikspitzen befinden. Gegebenenfalls werden die Plastikspitzen mit einem Skalpell diagonal neu zugeschnitten.
8. In jede Kammerhälfte werden 2 ml Meyler-Puffer gefüllt, Luftblasen werden entfernt. Letzte Feinjustierungen garantieren einen langsamen, gleichmäßigen Gasfluss in allen Kammern. Abbildung 3-2 zeigt eine Ussingkammer mit Slider und Puffer.
9. Spannungsklemmen und Vorverstärker werden eingeschaltet.
10. PowerLab und PC werden eingeschaltet, die Software „Lab Chart“ gestartet und die entsprechende Vorlage zur Datenaufzeichnung von 8 Kanälen (in 4 Kammern simultan Stromstärke und Spannung) geöffnet.
11. Während das System ohne Biopsien equilibriert, ist auf eine stabile offene PD zu achten (maximal $\pm 0,5$ mV), anderenfalls müssen die Elektroden und deren Plastikspitzen überprüft werden. Die bleibende Eingangsregelabweichung wird auf 0,0 mV kompensiert (input offset). Dann wird der Flüssigkeitswiderstand reguliert, indem ein Stromstoß von 15 μ A appliziert und gleichzeitig der Widerstands-Regler gedreht wird. Um eine Überkompensation im Verlauf der Messung zu vermeiden, sollte der Widerstand während der Equilibrierungsphase auf 1,0 gestellt werden. Unmittelbar vor dem Einspannen der Biopsien sollte der Vorgang wiederholt werden.
12. Das System equilibriert, während die Biopsien entnommen werden.



*Abbildung 3-2: Ussingkammern mit Elektroden, Gewebeslider und Puffer
Fotografie aus dem eigenen Labor.*

Probenentnahme

1. 10-20 ml DPBS werden in ein 50 ml-Transportröhrchen gefüllt und mit 10 μ M Indometacin versetzt. Die übrigen Materialien (siehe Tabelle 3-4) werden bereitgestellt.
2. Pro Patient werden 9 Rektumschleimhautbiopsien (inkl. 1 Reservebiopsie) schmerzfrei ohne Sedierung oder Darmvorbereitung als Saugbiopsien (Sog 5 mmHg/ 16 kPa) ca. 5 cm ab ano entnommen. Die Biopsien werden im Anschluss direkt in eisgekühlter Pufferlösung gelagert. Abbildung 3-3 zeigt die dazu verwendete Rektumsaugbiopsiezange.



*Abbildung 3-3: Rektumsaugbiopsiezange
Fotografie aus dem eigenen Labor.*

Einspannen der Proben in die Ussingkammern

1. Die Biopsien werden bis zur Verarbeitung weiterhin im eisgekühlten Puffer aufbewahrt.
2. Nach der Wiederholung der Offset-Prozedur wird die Pufferlösung mithilfe der Nadeln mit weicher Spitze und 5ml-Spritze angesaugt, der Slider aus der Ussingkammer entfernt.
3. Eine Biopsie wird mittels Transferpipette auf ein Papiertuch gegeben, der Mukus durch vorsichtiges Abstreifen entfernt. Die mukosale Seite wird identifiziert. Dann wird die Biopsie mit der serosalen Seite auf die untere Hälfte des Sliders („Bottom“) aufgebracht. Dabei wird sichergestellt, dass die Öffnung des Sliders vollständig bedeckt und die Biopsie nicht gefaltet ist. Im Anschluss wird der Slider mit der oberen Hälfte („Top“) verschlossen, der Slider wird in die Ussingkammer eingelegt und festgeschraubt, die Mukosa der Biopsie nach links weisend. (Abbildung 3-4)
4. Die Pufferlösung wird vorsichtig wieder in die Ussingkammer eingefüllt, etwaige Luftbläschen werden entfernt.
5. Die Größe des Sliders (P2407B oder P2407C) wird in der Lab Chart-Datei notiert.
6. Die o.g. Schritte werden für 3 weitere Biopsien wiederholt. Die Aufbewahrung der 4 übrigen Biopsien erfolgt nach wie vor in eisgekühlter Pufferlösung, bis sie nach Beendigung der Messung an den Proben 1-4 in gleicher Weise verarbeitet werden.



Abbildung 3-4: Rektumschleimhautbiopsien und Gewebeslider (Collage)

Fotografien aus dem eigenen Labor.

Gewebeequilibration und basale Parameter

1. Die Lab Chart-Aufzeichnung wird gestartet. Etwa 5 Minuten nach dem Einspannen der Biopsien wird die basale PD registriert (im Lab Chart wird „PD basal“ notiert). Diese liegt typischerweise zwischen $-0,3$ und $-1,5$ mV.
2. Der basale Widerstand wird indirekt gemessen, indem ein Teststrom von $15 \mu\text{A}$ auf das Gewebe appliziert wird (im Lab Chart wird „Rt basal“ notiert). Die somit resultierende Spannungsänderung wird im Lab Chart registriert, daraus kann dann mittels Ohm'schem

Gesetz der Widerstand berechnet werden. Dieser liegt durchschnittlich zwischen 15 und 30 Ω/cm^2 , Biopsien mit einem Widerstand $< 10 \Omega/\text{cm}^2$ ergeben keine verlässlichen Messwerte. Falls noch eine Reservebiopsie verfügbar ist, kann diese stattdessen genutzt werden.

3. Im Anschluss wird das System auf Spannungsklemmenmodus umgestellt (Lab Chart: „voltage clamp“), der Kurzschlussstrom wird registriert. Es werden zunächst die Rohdaten in μA aufgezeichnet, die später auf $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ normiert werden.
4. Es erfolgt eine insgesamt 40-minütige Phase der Gewebeequilibration. Indometacin hemmt die endogene cAMP-Produktion, so soll die CFTR-Aktivität vor Stimulation reduziert werden.

Messung des Kurzschlussstroms

1. 5 Minuten nach dem Wechsel in den Spannungsklemmenmodus wird CCH 100 μM S appliziert. Sollte das Gewebe nach 5 Minuten keine Änderung des Kurzschlussstroms zeigen, sollte die Biopsie gegen eine Reserveprobe ausgetauscht werden.
2. Nach 10, 20 und 30 Minuten wird der Meyler-Puffer jeweils ausgetauscht, um die cAMP-Vorstimulation auf ein Minimum zu reduzieren.
3. Nach weiteren 10-15 Minuten sollte ein stabiler Kurzschlussstrom erreicht sein. Hier kann der basale I_{sc} abgelesen werden (Lab Chart: „Isc basal“). Dieser liegt meist bei 10-50 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$.
4. Auf der mukosalen Seite werden 2 μl einer Amilorid-Stammlösung (100 mM) hinzugegeben, sodass eine Konzentration von 100 μM erreicht wird (Lab Chart: Amil 100 μM M). Amilorid blockiert den ENaC (Veeze et al. 1991). Dies führt zu einem Abfall des I_{sc} aufgrund des ausbleibenden Kationenflusses von mukosal in die Zellen. Bei CF-Patienten ist der I_{sc} -Abfall als Ausdruck der ENaC-Hyperaktivität mitunter stärker ausgeprägt. Im ICM-Protokoll dient die ENaC-Blockade in erster Linie dazu, einen konsekutiven Mitstrom von Natrium-Ionen nach mukosal bei CFTR-Stimulation zu verhindern, und somit eine bessere CFTR-Funktionsbestimmung zu ermöglichen.
5. Nach mindestens 5 Minuten und dem Erreichen eines stabilen I_{sc} erfolgt die CFTR-Stimulation durch Zugabe von 2 μl Forskolin- und 2 μl IBMX-Stammlösung (10 mM und 100 mM) auf der mukosalen und serosalen Seite (Lab Chart: Forsk/IBMX 10/100 μM M+S). Forskolin stimuliert die Adenylatzyklase (Seamon und Daly 1981), IBMX hemmt die Phosphodiesterase (Kalderon et al. 1980). Auf diese Weise wird die zelluläre cAMP-Konzentration erhöht und der CFTR-Kanal aktiviert. Daraus resultiert bei normaler CFTR-Funktion ein Ausstrom von Chlorid-Ionen auf der mukosalen Seite, welcher sich in einem schnellen und starken Anstieg des Kurzschlussstroms zeigt. Bei CF-Patienten

bleibt dieser Anstieg häufig aus oder ist nur gering ausgeprägt. Ein mitunter zu beobachtender Abfall des I_{sc} entsteht durch eine apikale Kalium-Sekretion, die bei normaler CFTR-Funktion durch den massiven Chloridausstrom maskiert wird.

6. Nach mindestens 10 Minuten und dem Erreichen eines stabilen I_{sc} werden 0,2 μ l der Genistein-Stammlösung (100 mM) auf der mukosalen und serosalen Seite hinzugefügt (Lab Chart: Genistein 10 μ M M+S). Genistein wirkt in geringen Konzentrationen als Potentialtor auf bereits aktivierten CFTR, in höheren Konzentrationen inhibiert Genistein dagegen die CFTR-Funktion (French et al. 1997, Moran und Zegarra-Moran 2005).
7. Nach mindestens 10 Minuten und dem Erreichen eines stabilen I_{sc} werden 2 μ l Carbachol-Stammlösung (100 mM) der serosalen Seite hinzugefügt (Lab Chart: CCH 100 μ M S). Carbachol erhöht mittels muskarinerges Stimulation die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Über diesen Signalweg wird einerseits der CFTR-Kanal stimuliert, andererseits auch Ca^{2+} -abhängige Chloridkanäle (Kunzelmann und Mall 2002). Die Aktivierung von alternativen Chloridkanälen scheint jedoch überwiegend an ein funktionierendes CFTR-Protein geknüpft zu sein (Mall et al. 1998², Mall et al. 2000), außerdem spielen diese funktionell im Colon eine untergeordnete Rolle (Kunzelmann und Mall 2002). Bei non-CF resultiert die Stimulation durch CCH in einem rasanten Anstieg des I_{sc} , der nach Erreichen eines Gipfels wieder abfällt. Bei CF-Patienten tritt dieser I_{sc} -Anstieg als Äquivalent des Chlorid-Ausstroms nicht auf, häufig kann hingegen ein Abfall des I_{sc} beobachtet werden. Dieser repräsentiert die Öffnung von Kalium-Kanälen durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.
8. Nach mindestens 10 Minuten und dem Erreichen eines stabilen I_{sc} werden 4 μ l der DIDS-Stammlösung (100 mM) der mukosalen Seite hinzugefügt (Lab Chart: DIDS 200 μ M M). DIDS blockiert nicht-CFTR-, DIDS-sensitive Chloridkanäle wie den Ca^{2+} -abhängigen Chloridkanal (CaCC) (De Jonge et al. 2004). Die Zugabe von DIDS löst keine Änderung des I_{sc} aus, sondern dient einer erneuten CFTR-spezifischen Stimulation durch Histamin im nächsten Schritt.
9. Nach 10 Minuten werden 10 μ l der Histamin-Stammlösung (100 mM) der serosalen Seite zugefügt (Lab Chart: Hista 500 μ M S). Histamin aktiviert nochmals die Ca^{2+} -vermittelte Chlorid-Sekretion, jetzt durch DIDS-insensitive Chloridkanäle (De Jonge et al. 2004). Es resultiert erneut ein rasanter Anstieg des I_{sc} bei gesunden Kontrollen. Bei CF-Patienten bleibt der I_{sc} -Anstieg zumeist aus, dies zeigt abermals die fehlende CFTR-Funktion. Ein I_{sc} -Abfall repräsentiert eine apikale Kalium-Sekretion, die bei gesunden Kontrollen zumeist durch den Chloridstrom maskiert wird.
10. Die Messung ist beendet, wenn der I_{sc} nach 10 bis 20 Minuten wieder ein stabiles Niveau erreicht. Nach Rückkehr in den offenen Stromkreis („open clamp“) wird die PD des Gewebes erneut registriert (Lab Chart: „PD end“).

11. Der Gewebewiderstand wird wie zu Beginn der Messung durch Applikation eines definierten Teststroms von 15 μA und Registrierung der daraus resultierenden Spannungsänderung bestimmt (Lab Chart: „Rt end“).
12. Der Meyler-Puffer wird aus den Ussing-Kammern entfernt. Die Biopsien verbleiben im Slider, werden aber in andere Kammern ohne Elektrode transferiert. Die Biopsien werden entsprechend der in Kapitel 3.3 beschriebenen Prozedur inkubiert.
13. Die 4 Messkammern werden erneut mit erwärmtem Meyler-Puffer gefüllt, der entsprechend beschriebene Elektroden-offset wird wiederholt.
14. Die Schritte „Einspannen der Proben in die Ussingkammern“, „Gewebeequilibration und basale Parameter“ sowie „Messung des Kurzschlussstroms“ werden mit den Biopsien 5-8 wiederholt. Nach Beendigung werden auch diese Biopsien entsprechend des in Kapitel 3.3 beschriebenen Protokolls inkubiert.
15. Die Aufzeichnung im Lab Chart Programm wird beendet, der PC heruntergefahren. Spannungsklemme und Vorverstärker werden ausgeschaltet. Das Warmwasserbad bleibt auch während der Inkubationszeit eingeschaltet, der Gasfluss wird aufrechterhalten.

Abbildung 3-5 zeigt eine repräsentative ICM eines PI-CF-Patienten vor und nach Inkubation.

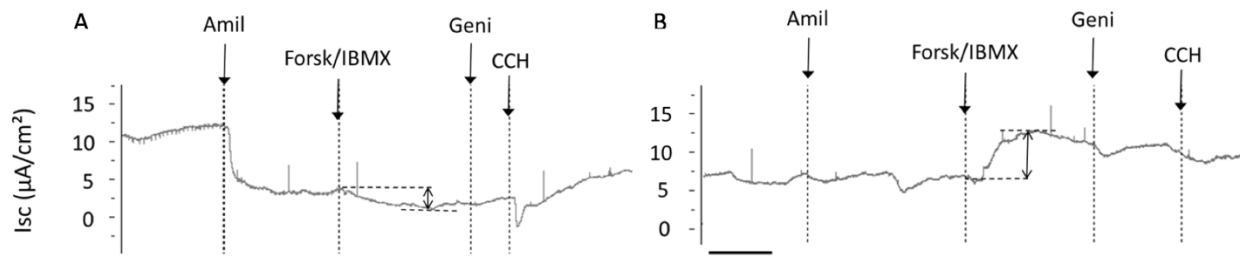


Abbildung 3-5: Beispiel-ICM eines PI-CF-Patienten (F508del homozygot) vor und nach Inkubation mit einem CFTR-Modulator

A) ICM-Messkurve vor Inkubation ohne cAMP-vermittelte CFTR-Funktion. B) ICM-Messkurve nach Inkubation mit Lumacaftor 10 μM für 16 Stunden mit daraus resultierender verstärkter cAMP-vermittelter

CFTR-Funktion. Amil: Amilorid 100 μ M, Forsk/IBMX: Forskolin 10 μ M + IBMX 100 μ M, Geni: Genistein 10 μ M, CCH: Carbachol 100 μ M, Histamin-Reaktion nicht dargestellt. Beidseitiger Pfeil: ΔI_{sc} Forsk/IBMX.

3.3 Inkubation mit CFTR-Modulatoren

Unter Nutzung älterer Protokolle konnte gezeigt werden, dass das Gewebe etwa 24 Stunden lang vital bleibt, und sich die Methode entsprechend zur ex vivo-Evaluation von CFTR-Modulatoren eignet (Roth et al. 2011, Derichs et al. 2011).

Nach Beendigung der ICM-Messung gemäß ECFS ICM SOP wurden die Biopsien über 16 Stunden in 5 ml RPMI-1640 Medium (Sigma Aldrich) pro Kammerseite bei 37°C unter Fortführung der Begasung inkubiert. Dem Inkubationsmedium wurden CFTR-Modulatoren in verschiedenen Konzentrationen mukosal und serosal hinzugefügt. Die CFTR-Modulatoren wurden zuvor in DMSO gelöst. Die Biopsien der Kontrollgruppe wurden mit 0,1 % DMSO inkubiert. Die Details der Inkubation mit CFTR-Modulatoren sind in Tabelle 3-7 dargestellt.

Tabelle 3-7: Inkubationsübersicht

Gruppe	n	Genotyp	CFTR-Modulatoren
non-CF	13	-	DMSO 0,1 %
CF	31	L732X/L732X	Lumacaftor 10 μ M
		F508del/R553X	Lumacaftor 30 μ M
		F508del/R1162X	Lumacaftor +Ivacaftor 10 μ M
		F508del/W1282X	Lumacaftor +Ivacaftor 30 μ M
		F508del/G551D (n=1)	Ataluren 10 μ M
		F508del/F508del (n=18)	Ataluren+ Lumacaftor 10 μ M
		F508del/3849+10kbC->T (n=3)	Gentamicin 400 μ g/ml
		F508del/R347P	EPIX4 10 μ M
		F508del/2789+5G>A	EPIX5 10 μ M
		R553X/A455E	EPIX6 10 μ M
		1078delT/R347P	Ivacaftor 30 μ M
		F508del/L206W	Hylout4 100 μ M

Die zur Inkubation erforderlichen Substanzen sind in Tabelle 3-8 aufgelistet, Tabelle 3-9 zeigt die Bezugsquellen der CFTR-Modulatoren:

Tabelle 3-8: Zusammensetzung des Inkubationsmediums

Substanz (Produktnummer)	Konzentration	Anbieter
RPMI-1640 Medium (R8758)		Sigma-Aldrich
Indometacin (I0200000)	10 μ M	Sigma-Aldrich
Penicillin (B0900000)	40 μ g/ml	Sigma-Aldrich
Streptomycin (85886)	90 μ g/ml	Sigma-Aldrich
Ciprofloxacin (Y0000198)	20 μ g/ml	Sigma-Aldrich
Metronidazol (M1850000)	200 μ g/ml	Sigma-Aldrich

Tabelle 3-9: Verwendete CFTR-Modulatoren

Substanz	Anbieter
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
Lumacaftor (VX-809)	Selleck Chemicals
Ivacaftor (VX-770)	Selleck Chemicals
Ataluren (PTC124)	Selleck Chemicals
Gentamicin	Selleck Chemicals
EPIX4	Bestellbar über die CFF
EPIX5	Bestellbar über die CFF
EPIX6	Bestellbar über die CFF
Hylout4	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Prehm, Universitätsklinikum Münster, Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie

Nach 16-stündiger Inkubation erfolgte erneut eine ICM an den Biopsien gemäß der ECFS ICM SOP. Auf den dreimaligen Austausch des Meyler-Puffers wurde nach der Inkubation allerdings verzichtet, es wurde dennoch eine Equilibrierungsperiode bis zum Erreichen eines stabilen basalen Kurzschlussstroms eingeräumt.

3.4 CFTR-Modulatorwahl

Im Folgenden soll die Funktionsweise und Dosiswahl der verwendeten CFTR-Modulatoren dargestellt werden.

3.4.1 Lumacaftor

Lumacaftor wurde durch Screening von 164.000 kleinen Molekülen als Korrektor für F508del CFTR entdeckt (van Goor et al. 2011). Lumacaftor erhöht die konformationelle Stabilität der TMD 1 und somit die Proteasomen-Resistenz von F508del CFTR, sodass dieser das endoplasmatische Retikulum verlassen und in die Zellmembran eingebaut werden kann (van Goor et al. 2011, Ren et al. 2013). An Zellkulturen zeigte eine Konzentration von 3 μM die höchste Wirkung, ab einer Konzentration von 10 μM ließ die Wirkung wieder nach (van Goor et al. 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde natives Gewebe verwendet, sodass die erforderliche Konzentration für einen Effekt als höher angenommen wurde. Es wurden Konzentrationen von 10 μM und 30 μM gewählt, auf eine Titration wurde aufgrund der geringen Probenzahl verzichtet. Im Rahmen der Phase IIa-Studie zu Lumacaftor wurde die maximale Plasmakonzentration für unterschiedliche Dosen bestimmt, diese lag je nach eingenommener Lumacaftor-Dosis zwischen 0,76 $\mu\text{g/ml}$ (bei 25 mg Lumacaftor pro Tag) und 10,3 $\mu\text{g/ml}$ (bei 200 mg Lumacaftor pro Tag) (Clancy et al. 2012). Bei einer Molmasse von 452,4 g/mol ergibt sich daraus eine Plasmakonzentration von 1,6 μM bis 22 μM . Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die gewählte Konzentration annähernd physiologische Verhältnisse widerspiegelt.

3.4.2 Ivacaftor

Als erster CFTR-Modulator wurde der Potentiator Ivacaftor den CF-Patienten zugänglich. Der Wirkstoff wurde durch weitere Modifikation nach positivem HTS entwickelt (van Goor et al. 2009). Ivacaftor erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit des CFTR an der apikalen Zellmembran (van Goor et al. 2009), indem Ivacaftor direkt an den CFTR bindet (Eckford et al. 2012). Zunächst wurde die Wirksamkeit für G551D-CFTR als häufigste Gating-Mutation gezeigt, seither konnte eine Verbesserung der CFTR-Funktion für viele weitere CFTR-Mutationen demonstriert werden. Im Rahmen dieser Studie wurde die Wirksamkeit von Ivacaftor auf weitere Klasse IV- und V-Mutationen untersucht. Ivacaftor

wird auch in Kombination mit CFTR-Korrektoren wie Lumacaftor eingesetzt, auch diese Kombination sollte ex vivo untersucht werden.

In Zellkulturen mit G551D-CFTR wurde die Wirksamkeit von Ivacaftor für eine Konzentration von 10 μM demonstriert (van Goor et al. 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls eine Ivacaftor-Konzentration von 10 μM gewählt, um eine CFTR-Inhibition durch zu hohe Konzentrationen zu vermeiden, wie es etwa bei dem Potentiator Genistein bekannt ist (Moran und Zegarra-Moran 2005). Zur Untersuchung einer dosisabhängigen Wirkung wurde zudem eine Ivacaftor-Konzentration von 30 μM untersucht. Die exemplarische Erhebung der Plasmakonzentration eines Patienten unter Ivacaftor-Monotherapie ergab Konzentrationen zwischen 0,0 $\mu\text{g/ml}$ (Talspiegel) und 1,7 $\mu\text{g/ml}$ (Spitzenspiegel) (Pinders-Keßler, bisher nicht veröffentlicht), bei einer Molmasse von 392,5 g/mol ergibt sich daraus eine Konzentration zwischen 1,5 μM und 4,3 μM .

3.4.3 Ataluren

Ataluren wurde entwickelt, um ein ribosomales Überlesen von präterminalen Stop-Codons zu erzielen und so eine Proteinbiosynthese bei Klasse-I-Mutationen zu ermöglichen (Welch et al. 2007). Präklinisch zeigte sich eine Wirkung ab Konzentrationen von 0,01 bis 0,1 μM , die höchste Durchleserate wurde bei einer Konzentration von 17 μM verzeichnet (Welch et al. 2007). Aus dem Mausmodell wurde wiederum eine erforderliche Plasmakonzentration von 5 bis 10 $\mu\text{g/ml}$, entsprechend 17 bis 34 μM ermittelt (Welch et al. 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Konzentration von 10 μM für Ataluren an Rektumschleimhautbiopsien gewählt, auf die Untersuchung einer weiteren Konzentration wurde aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Patientenzahl verzichtet.

3.4.4 Gentamicin

Es wurde bereits mehrfach die Steigerung der CFTR-Expression bei Klasse-I-Mutationen beschrieben (Wilschanski et al. 2003). Wilschanski et al. setzten dazu Gentamicin 3 mg/ml nasal ein, Clancy et al. (2001) behandelten Zellkulturen mit Gentamicin 0, 10 und 100 $\mu\text{g/ml}$. Unter der Annahme, dass natives Gewebe einer höheren Dosis bedarf als Zellkulturen, wurde im Rahmen dieser Arbeit für Gentamicin eine Konzentration von 400 $\mu\text{g/ml}$ gewählt.

3.4.5 EPIX-Korrektoren

Anhand von 3D-Modellen des CFTR-Proteins wurde nach kleinen Molekülen gesucht, die vornehmlich an die Zwischendomänenregionen des CFTR-Proteins binden, um so die Stabilität des F508del-CFTR zu verbessern, eine Auswahl aus 496 Molekülen wurde daraufhin in vitro mit einer Konzentration von 10 μM weiter analysiert, 15 dieser Moleküle zeigten eine Korrektoraktivität an FRT-Zellen, jedoch nicht an HBE-Zellen (Kalid et al. 2014). Leider fand keines dieser Moleküle den Weg in eine klinische Studie, sodass keine Daten bzgl. einer erforderlichen Plasmakonzentration vorliegen. Im Rahmen dieser Studie wurde daher zunächst analog zu den in vitro-Messungen eine Konzentration von 10 μM bei F508del homozygoten Patienten untersucht.

3.4.6 Hylout4

Hylout4, ein Hyaluron-Disaccharid-Analogon, verbessert die Funktion von F508del-CFTR. Aufgrund des schnellen Auftretens des Ionenstroms nach Applikation wurde jedoch gefolgert, dass Hylout4 als Potentiator wirkt. (Nowakowska et al. 2012) Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit der ex vivo-Effekt von Hylout4 auf Klasse IV- und V-Mutationen untersucht werden. Die Konzentration von 100 μM zeigte bei nasaler Applikation eine Verbesserung der CFTR-Funktion und wurde daher auch im Rahmen dieser Studie verwendet (Nowakowska et al. 2012).

3.5 Statistische Auswertung

Zu Beginn wurde bei der Auswertung der Messungen überprüft, ob diese die Qualitätskriterien gemäß der ECFS ICM SOP erfüllen: ein Gewebewiderstand $\geq 10 \Omega/\text{cm}^2$, eine stabile Messkurve vor Gabe von Amilorid sowie eine Reaktion mit Änderung des I_{sc} auf mindestens ein Agens. Alle Biopsien, die diese Qualitätskriterien erfüllten, gingen in die weitere Analyse mit ein. Die Gewebereaktionen zu allen Agenzien wurden als Nettoänderung des I_{sc} (ΔI_{sc}) bestimmt und auf 1cm^2 normiert.

Für jeden Parameter wurden pro Patient und Tag der Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (SD) bestimmt, um die Variabilität abschätzen zu können. Für den Gewebewiderstand R_t wurde zudem der Variationskoeffizient (CV) bestimmt.

Um die Reproduzierbarkeit der einzelnen ICM-Parameter zu bestimmen, wurden die wiederholten Messungen der aus 8 Probanden bestehenden Subgruppe betrachtet. Es wurde folgende Definition vorgenommen: Messungen eines Patienten wurden als reproduzierbar angenommen, wenn der Mittelwert der 2. ICM und der Mittelwert der 3. ICM innerhalb von $MW_{ICM1} \pm 1 SD_{ICM1}$ lagen. Ferner wurde die Reproduzierbarkeit auch mittels Bland-Altman-Diagramm (Bland und Altman 1986) überprüft: Dabei wurde die Differenz der Mittelwerte zweier Messungen ($d_{ICM1-ICM2}$ und $d_{ICM1-ICM3}$) berechnet und gegen den Mittelwert dieser Messungen als Punktediagramm aufgetragen. Außerdem wurde der Mittelwert aller Differenzen (MW_d) sowie dessen Standardabweichung (SD_d) berechnet. Als Übereinstimmungsgrenze der Differenzen wurde $MW_d \pm 1 SD_d$ definiert. Datenpunkte innerhalb der Übereinstimmungsgrenze wurden als Marker für eine gute Reproduzierbarkeit angenommen.

Um die Reliabilität der ICM zu überprüfen, wurde im Sinne einer Retest-Reliabilitätsprüfung die Korrelation zwischen den Mittelwerten relevanter Parameter getestet. Für den Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r) wurden dabei Werte von 0,5 bis 1,0 als gut korrelierend angenommen, statistische Signifikanz wird für $p < 0,05$ angenommen.

Die Antwort auf die Zugabe von Forskolin und IBMX (ΔI_{sc} Forsk/IBMX) als cAMP-induzierte CFTR-Funktion wurde als Zielgröße der Modulatorbehandlung festgelegt. Als 100%ige CFTR-Funktion wurde ΔI_{sc} Forsk/IBMX der non-CF-Gruppe vor und nach Inkubation definiert.

Im Falle eines negativen Netto-Kurzschlussstroms nach Stimulation durch Forskolin und IBMX wird eine CFTR-Funktion von 0 % angenommen. Daraus wurde die mittlere CFTR-Funktion für alle Biopsien von Patienten mit demselben Genotyp und der identischen Inkubationsbehandlung berechnet und verglichen. Es wurden zunächst Mittelwert und Standardfehler berechnet. Bei deutlichen Abweichungen der individuellen Antworten auf die ex vivo-Modulatorbehandlung wurden auch die Einzelmessungen gesondert betrachtet. Die Überprüfung hinsichtlich einer statistischen Signifikanz der Änderung der

CFTR-Funktion nach Inkubation erfolgte mittels Wilcoxon-Vorzeichenrangtest für gepaarte Stichproben. Zur Prüfung eines Unterschieds gegenüber dem DMSO-Effekt wurde ein Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben vorgenommen. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der ICM als CFTR-Biomarker

4.1.1 Variabilität

Insgesamt wurden 508 Rektumschleimhautbiopsien von 50 Probanden untersucht, davon erfüllten 84,8 % (431) am 1. Messtag die Qualitätskriterien nach ECFS ICM SOP und gingen damit in die weitere Analyse ein. In den beiden Patientengruppen sowie in der Kontrollgruppe zeigten sich die bereits aus früheren Studien bekannten Messkurven, zudem wurden vorbeschriebene Referenzwerte bestätigt. Für die wichtigsten Parameter wurde der MW jeder Gruppe sowie die SD berechnet. Erwartungsgemäß unterschied sich der R_t zwischen den Gruppen nicht (non-CF: MW \pm SD 21,2 \pm 8,0 Ω/cm^2 ; CV 0,38; PI-CF: 21,3 \pm 8,8 Ω/cm^2 ; 0,42; PS-CF: 21,1 \pm 7,2 Ω/cm^2 ; 0,34), die Messdaten sind in Abbildung 4-1 dargestellt.

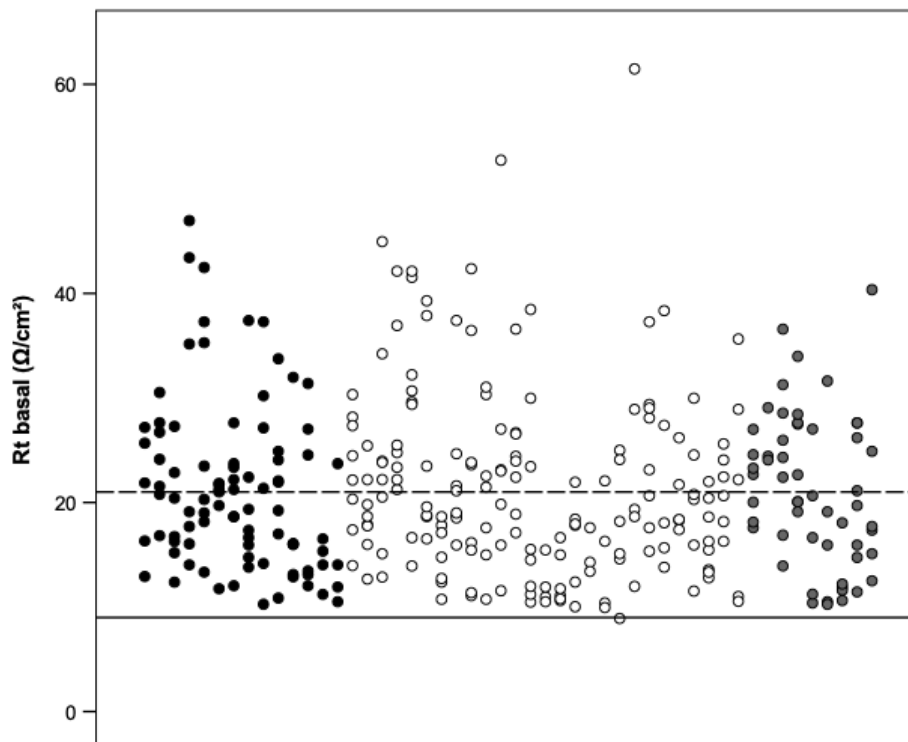


Abbildung 4-1: Intraindividuelle Variabilität der ICM, R_t basal

R_t basal (Ω/cm^2): Darstellung der Einzelmessungen aller 50 Probanden, jeder Punkt repräsentiert eine Biopsie, horizontal übereinanderliegende Punkte sind einem Probanden zuzuordnen. Schwarz=non-CF, weiß=PI-CF, grau=PS-CF. Durchgezogene Linie=Cut-off für ausreichende Qualität einer Biopsie (10 Ω/cm^2), gestrichelte Linie=MW aller Biopsien (21 Ω/cm^2).

Auch die PD basal unterschied sich nicht wesentlich zwischen den Gruppen (non-CF: MW \pm SD $-0,4 \pm 0,5$ mV; PI-CF: $0,0 \pm 0,3$ mV; PS-CF: $-0,1 \pm 0,2$ mV, Abbildung 4-2), allerdings war wie Variabilität der PD basal in der non-CF-Gruppe insgesamt größer. Die deutlich negativeren Werte sind ein indirekter Ausdruck der höheren CFTR-Funktion.

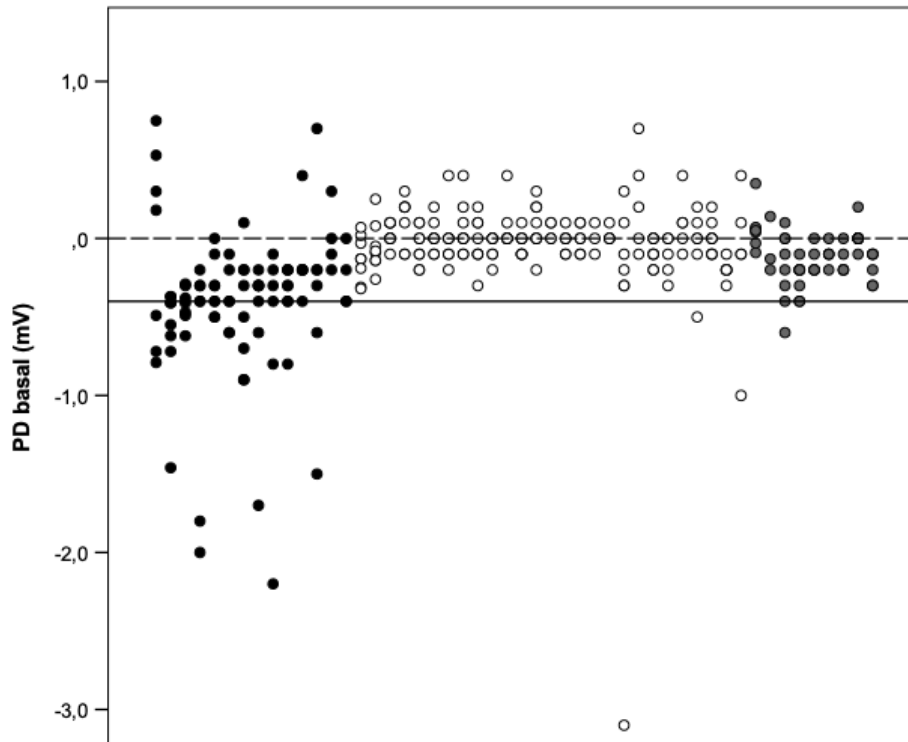


Abbildung 4-2: Intraindividuelle Variabilität der ICM: PD basal

PD basal (mV): Darstellung der Einzelmessungen aller 50 Probanden, jeder Punkt repräsentiert eine Biopsie, horizontal übereinanderliegende Punkte sind einem Probanden zuzuordnen. Schwarz=non-CF, weiß=PI-CF, grau=PS-CF. Durchgezogene Linie=MW bei non-CF ($-0,4$ mV), gestrichelte Linie=Mittelwert bei PI-CF ($0,0$ mV).

In der cAMP-vermittelten CFTR-Funktion ΔI_{sc} Forsk/IBMX zeigten sich dagegen deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen (non-CF: MW \pm SD $25,8 \pm 21,9$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$; PI-CF: $-1,2 \pm 8,9$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$; PS-CF: $4,8 \pm 9,2$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$; Abbildung 4-3). Um die intraindividuelle Variabilität darzustellen, wurden die Einzelmesswerte jedes Probanden (4-8 Einzelmessungen) für die jeweiligen Parameter dargestellt. Die Dichte der Messpunkte mit nur einzelnen Ausreißern unterstreicht die geringe intraindividuelle Variabilität insbesondere für den R_t basal und PD basal in der Gruppe PI-CF und PS-CF (Abbildung 4-1 und 4-2). Die cAMP-vermittelte CFTR-Funktion zeigte dagegen eine deutlich größere intraindividuelle Variabilität (Abbildung 4-3). Dies ist am ehesten auf unterschiedliche Biopsiequalitäten etwa bezüglich der Dicke zurückzuführen.

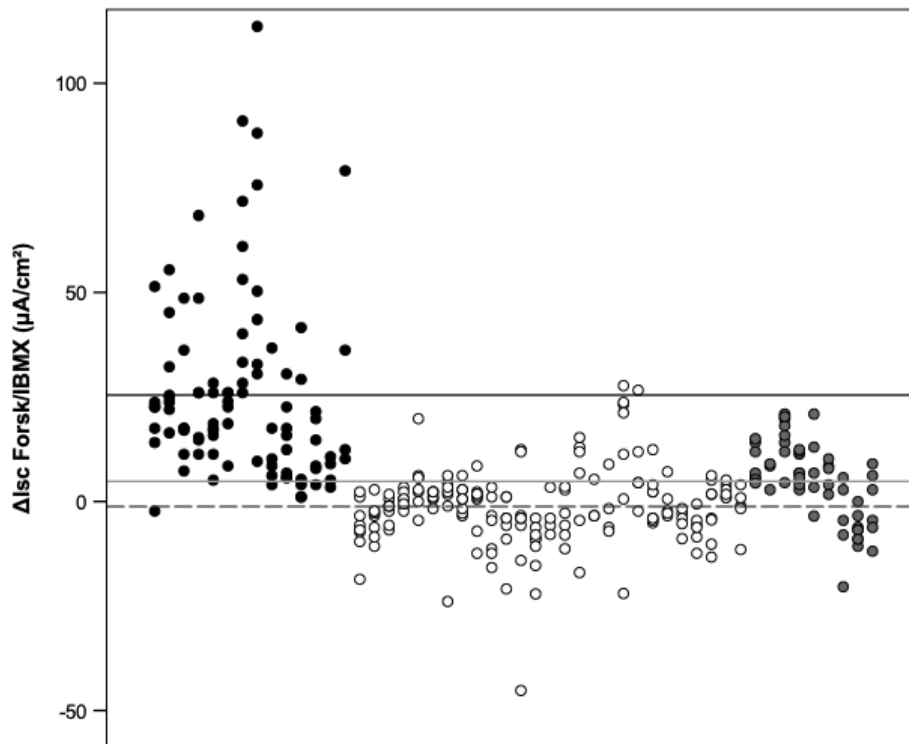


Abbildung 4-3: Intraindividuelle Variabilität der ICM: ΔI_{sc} Forsk/IBMX

ΔI_{sc} Forsk/IBMX ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$): Darstellung der Einzelmessungen aller 50 Probanden, jeder Punkt repräsentiert eine Biopsie, horizontal übereinanderliegende Punkte sind einem Probanden zuzuordnen. Schwarz=non-CF, weiß=PI-CF, grau=PS-CF. Durchgezogene schwarze Linie=MW bei non-CF ($25,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), gestrichelte Linie=Mittelwert bei PI-CF ($-1,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), durchgezogene graue Linie=MW bei PS-CF ($4,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$).

4.1.2 Reproduzierbarkeit und Reliabilität

Um die intraindividuelle Reproduzierbarkeit der ICM-Ergebnisse nach der verwendeten ECFS ICM SOP abzuschätzen, führten wir bei 8 Studienteilnehmenden (2 PI-CF, 3 PS-CF, 3 non-CF) repetitive Messungen an 3 Tagen in einem Abstand von jeweils einer Woche durch. Für jede Messung wurden 8 Biopsien entnommen. Die Messwerte der einzelnen Biopsien je Patient und Tag wurden für einzelne Parameter grafisch dargestellt. Dabei zeigt sich eine ähnliche Streuung für jeden Messzeitpunkt, sodass daraus abgeleitet werden kann, dass die intraindividuelle Variabilität auch bei wiederholten Messungen insbesondere für o.g. Patientengruppen und Parameter gering ist. MW und SD wurden auch für die Wiederholungsmessungen berechnet. Dabei zeigte sich, dass kein Studienteilnehmender unter wiederholter ICM die Diagnosegruppe wechselte (von

CF zu non-CF oder entgegengesetzt), woraus sich die ausgezeichnete Wiederholbarkeit der ICM ableiten lässt. Um die Reproduzierbarkeit zu prüfen, wurde die in Kapitel 3.4 beschriebene Definition angewendet. Dabei zeigte sich, dass diese in den meisten Fällen (81 %, d.h. 13 von 16 wiederholten Messungen) für ΔI_{sc} Forsch/IBMX erfüllt wurde (Abbildung 4-4).

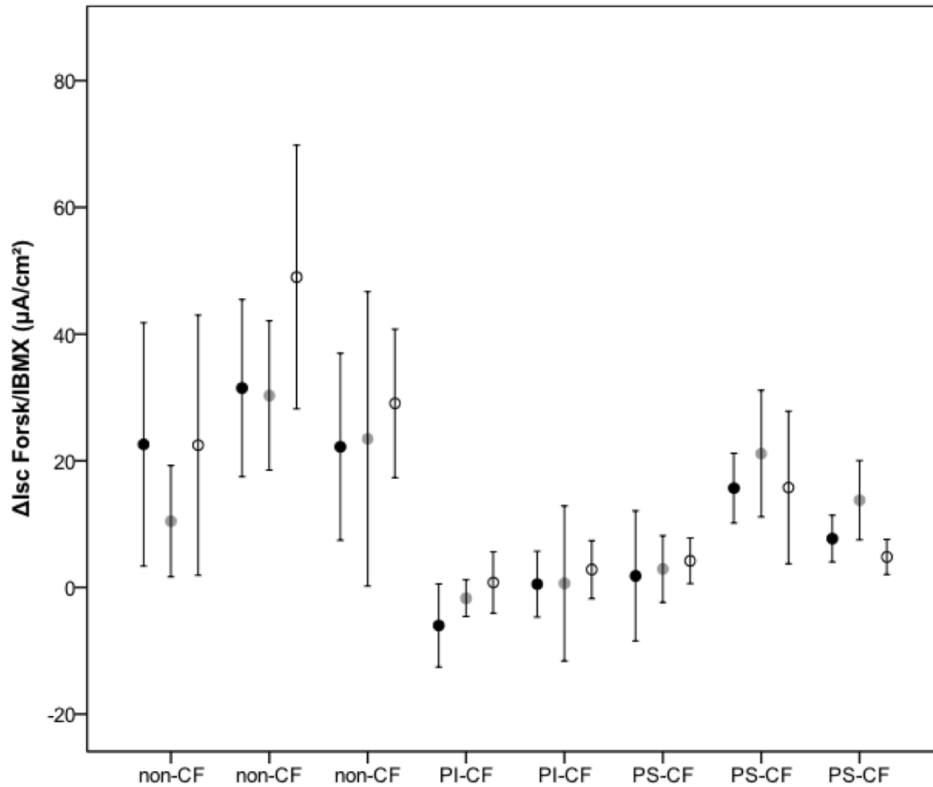


Abbildung 4-4: Reproduzierbarkeit bei wiederholter ICM für ΔI_{sc} Forsch/IBMX

ΔI_{sc} Forsch/IBMX bei wiederholter ICM nach 0, 1 und 2 Wochen bei 2 PI-CF, 3 PS-CF und 3 non-CF. MW \pm 1 SD. Schwarz=nach 0 Wochen, grau=nach 1 Woche, weiß=nach 2 Wochen.

Zudem wurde für den Parameter ΔI_{sc} Forsch/IBMX überprüft, ob die Differenzen zwischen 2 Messungen innerhalb der Übereinstimmungsgrenzen in einem Bland-Altman-Diagramm liegen. Das Bland-Altman-Diagramm zeigte, dass die Differenzen der Messungen des Parameters ΔI_{sc} Forsch/IBMX mit 2 Ausnahmen in der non-CF Gruppe innerhalb der Übereinstimmungsgrenzen lagen (Abbildung 4-5).

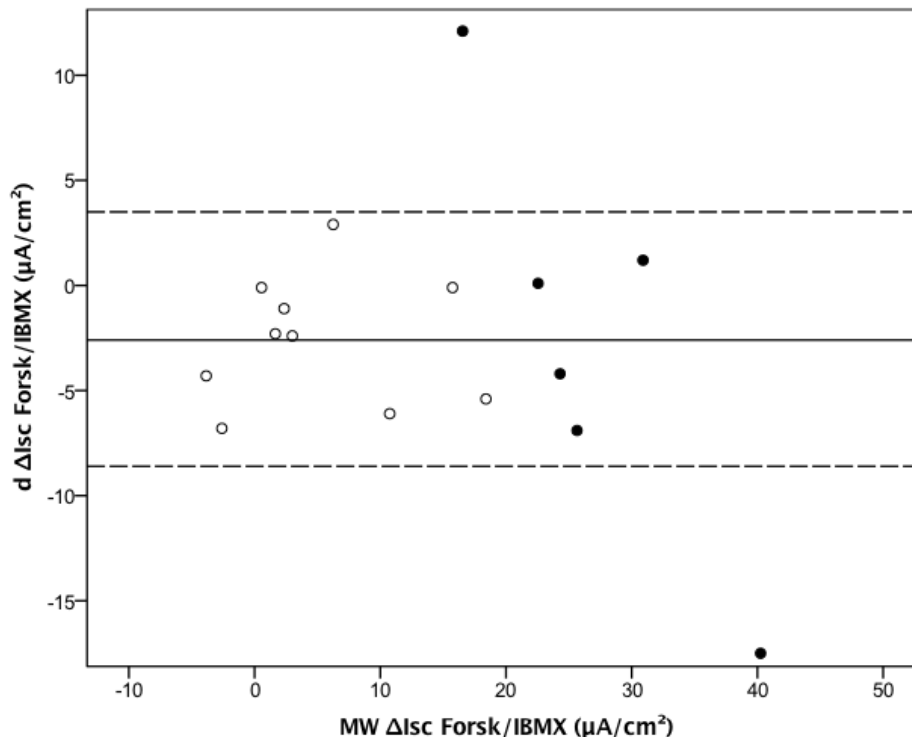


Abbildung 4-5: Reproduzierbarkeit bei wiederholter ICM: Bland-Altman-Diagramm

Bland-Altman-Diagramm für den ICM-Parameter ΔI_{sc} Forsch/IBMX und wiederholte Messungen. $d \Delta I_{sc}$ Forsch/IBMX = Differenz zwischen den Mittelwerten zweier ICM-Messungen je Patient, konkret wurden $d_{ICM1-ICM2}$ und $d_{ICM1-ICM3}$ berechnet, $MW \Delta I_{sc}$ Forsch/IBMX = Mittelwert zweier ICM-Messungen je Patient. Durchgezogene Linie: Mittelwert aller Differenzen ($-2,6 \mu A/cm^2$), gestrichelte Linie $MW \pm 1SD$ aller Differenzen ($3,5 \mu A/cm^2$; $-8,6 \mu A/cm^2$), diese werden als Übereinstimmungsgrenzen definiert. Schwarz=non-CF, weiß=CF.

Beide Ansätze zeigten die gute Reproduzierbarkeit der CFTR-Funktionsanalyse mittels ICM und heben damit die Nutzbarkeit des CFTR-Biomarkers ICM für die longitudinale Analyse von Modulator-Effekten hervor. Zudem lässt sich daraus schließen, dass die zu einem beliebigen Zeitpunkt erhobenen Ausgangswerte die tatsächliche CFTR-Funktion des Patienten widerspiegeln.

Um die Reliabilität der ICM zu beurteilen, wurde im Sinne einer Test-Retest-Reliabilitätsprüfung die Korrelation der Messwerte von ICM1, ICM2 und ICM3 für den Parameter ΔI_{sc} Forsch/IBMX berechnet. Es zeigte sich dabei stets eine signifikante Korrelation ($r_{ICM1+2} = 0,686$, $r_{ICM1+3} = 0,736$, $r_{ICM2+3} = 0,570$; p jeweils $< 0,05$), sodass auch die Reliabilität der ICM als hoch eingestuft werden kann, und damit bereits bei Messungen zu einem beliebigen Zeitpunkt verlässliche Aussagen zur CFTR-Funktion getroffen werden können.

4.2 Ex vivo-Modulatoreffekte

4.2.1 Kontrollgruppe

Als Referenzgruppe dienten 38 Biopsien von 13 gesunden Kontrollpersonen. Diese wurden mit DMSO 0,1 % ohne CFTR-Modulator inkubiert. Es zeigten sich sowohl vor als auch nach Inkubation repräsentative Messkurven, wenngleich die absolute Antwort auf die Zugabe der Stimulantien nach Inkubation als Ausdruck einer ebenfalls guten Reproduzierbarkeit bei wiederholter Untersuchung derselben Biopsie deutlich geringer ausfiel (siehe Abbildung 4-6). Die CFTR-Funktion an Tag 1 und Tag 2 wurde als ΔI_{sc} Forsk/IBMX für alle Biopsien bestimmt, der Mittelwert dieser Gruppe wurde als 100 % CFTR-Funktion vor und nach Inkubation definiert. Der Mittelwert von ΔI_{sc} Forsk/IBMX der 38 mit DMSO 0,1 % inkubierten Kontrollbiopsien entsprach dabei nahezu dem Mittelwert aller an Tag 1 untersuchten Biopsien der Kontrollgruppe (24,7 versus 25,8 $\mu A/cm^2$). Nach Inkubation lag der Mittelwert für ΔI_{sc} Forsk/IBMX bei 8,6 $\mu A/cm^2$ (Abbildung 4-7).

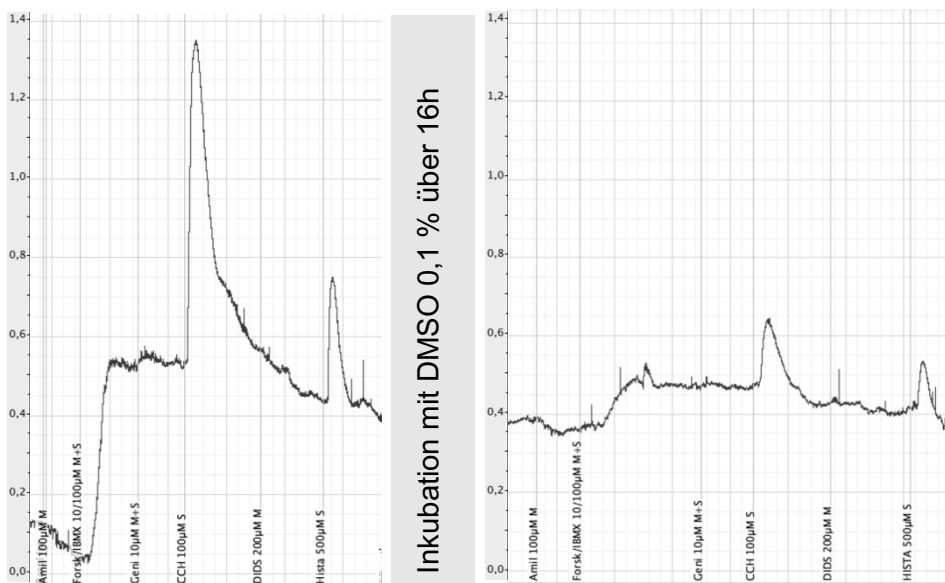


Abbildung 4-6: Originaltracing einer non-CF Biopsie nach Entnahme und nach Inkubation mit DMSO 0,1 % über 16h

X-Achse: I_{sc} in μA , die Skala stellt Rohwerte dar. 1 Messeinheit = 11,3 $\mu A/cm^2$. Y-Achse: Zeit, 1 Messeinheit = 10 min. ΔI_{sc} Forsk/IBMX vor Inkubation hier 28,3 $\mu A/cm^2$, nach Inkubation 9,6 $\mu A/cm^2$.

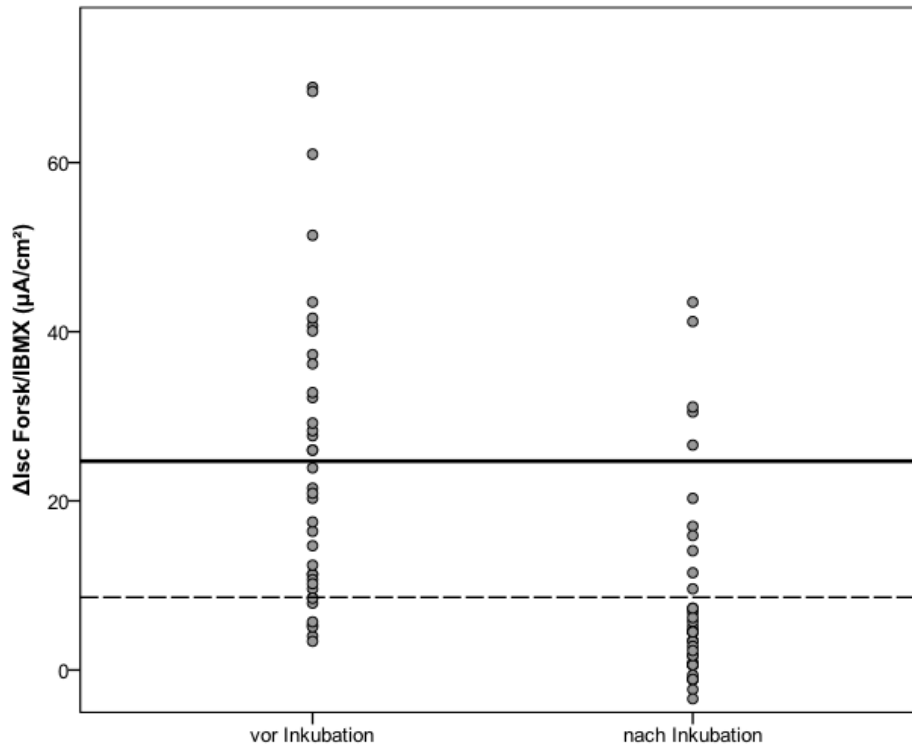


Abbildung 4-7: Reproduzierbarkeit der ICM einer Biopsie nach Entnahme und nach 16h Inkubation

ΔI_{sc} Forsk/IBMX am Biopsieentnahmetag (vor Inkubation) und nach 16h Inkubation in DMSO 0,1 % (nach Inkubation). Die Amplitude der Antworten fällt am 2. Tag geringer aus, eine CFTR-Funktion ist dennoch erkennbar. Durchgezogene Linie=MW vor Inkubation ($25,8 \mu A/cm^2$), gestrichelte Linie: MW nach Inkubation ($8,6 \mu A/cm^2$).

Zur Vergleichbarkeit des ex vivo-Effektes der CFTR-Modulatoren und zum Ausschluss einer CFTR-Korrektur durch DMSO wurden 12 Biopsien von 8 PI-CF-Patienten (5 F508del/F508del, 1 F508del/R553X, 1 F508del/R1162X, 1 L732X/L732X) mit DMSO 0,1 % inkubiert. Darunter zeigte sich ein Anstieg der CFTR-Funktion von $2,0 \pm 0,9$ % auf $17,6 \pm 6,5$ %. Eine Verbesserung der CFTR-Funktion um 15,6 % wird daher als DMSO-Effekt angenommen. Der Anstieg der CFTR-Funktion nach Inkubation mit DMSO war zudem statistisch signifikant ($p=0,027$).

4.2.2 Vertex-Modulatoren

Zunächst sollte der ex vivo-Effekt des F508del-Korrektors Lumacaftor bestimmt werden. Dazu wurden 16 Biopsien von 11 F508del homozygoten Patienten mit Lumacaftor 10 μM inkubiert. Darunter konnte ein Anstieg der CFTR-Funktion von einem Ausgangswert von $2,1 \pm 1,5$ % (Mittelwert \pm Standardfehler) auf $25,9 \pm 8,8$ % beobachtet werden, der statistisch signifikant ist ($p=0,011$). Unter Bereinigung des DMSO-Effektes ergibt sich eine Verbesserung der CFTR-Funktion um 8,2 %. Gegenüber den mit DMSO 0,1 % in-

kubierten Biopsien von PI-CF-Patienten ist der Effekt von Lumacaftor 10 μM nicht signifikant ($p=0,719$). Zur Überprüfung einer etwaigen dosisabhängigen Wirkung wurden 11 Biopsien von 9 Patienten zudem mit einer höheren Lumacaftor-Konzentration (30 μM) inkubiert. Dies verbesserte die CFTR-Funktion statistisch signifikant ($p=0,007$) von einem Ausgangswert von $5,4 \pm 2,3$ % auf $29,9 \pm 6,0$ %. Nach Abzug des DMSO-Effektes bleibt eine Verbesserung der CFTR-Funktion um 10,9 %. Statistische Signifikanz gegenüber den mit DMSO 0,1 % inkubierten Biopsien von CF-Patienten wurde jedoch nicht erreicht ($p=0,091$). Die Wirkung von Lumacaftor auf Biopsien von F508del homozygoten Patienten ist in Abbildung 4-8 dargestellt. Auch die individuellen Antworten auf die Korrektorthherapie wurden betrachtet (Abbildung 4-9). Unter der Lumacaftor-Konzentration von 30 μM zeigten 82 % der untersuchten Biopsien eine Verbesserung der CFTR-Funktion. Ein Patient zeigte weder vor noch nach Inkubation eine CFTR-Funktion im Sinne einer fallenden Kurve nach Stimulation durch Forsk/IBMX (Patient Nr. 6). Bei einem Patienten (Nr. 8) verschlechterte sich die CFTR-Funktion von 9,3 % vor Inkubation auf 7 % nach Inkubation.

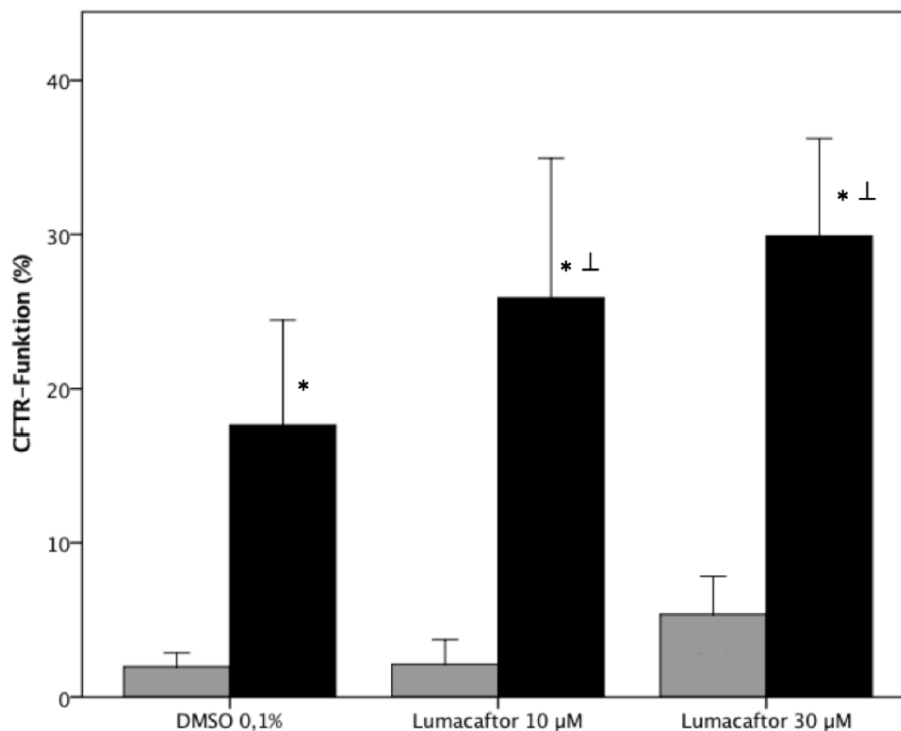


Abbildung 4-8: Ex vivo-Effekt von Lumacaftor bei F508del homozygoten Patienten

CFTR-Funktion vor (grau) und nach (schwarz) Inkubation über 16h mit DMSO 0,1 % ($n=12$ Biopsien von 8 PI-CF-Patienten), Lumacaftor 10 μM ($n=16$ Biopsien von 11 F508del homozygoten CF-Patienten) und Lumacaftor 30 μM ($n=11$ Biopsien von 9 F508del homozygoten CF-Patienten), Mittelwert + 1SEM, * = statistisch signifikanter Unterschied zum Ausgangswert vor Inkubation ($p < 0,05$), ⊥ = kein signifikanter Unterschied zu DMSO 0,1 % nach Inkubation.

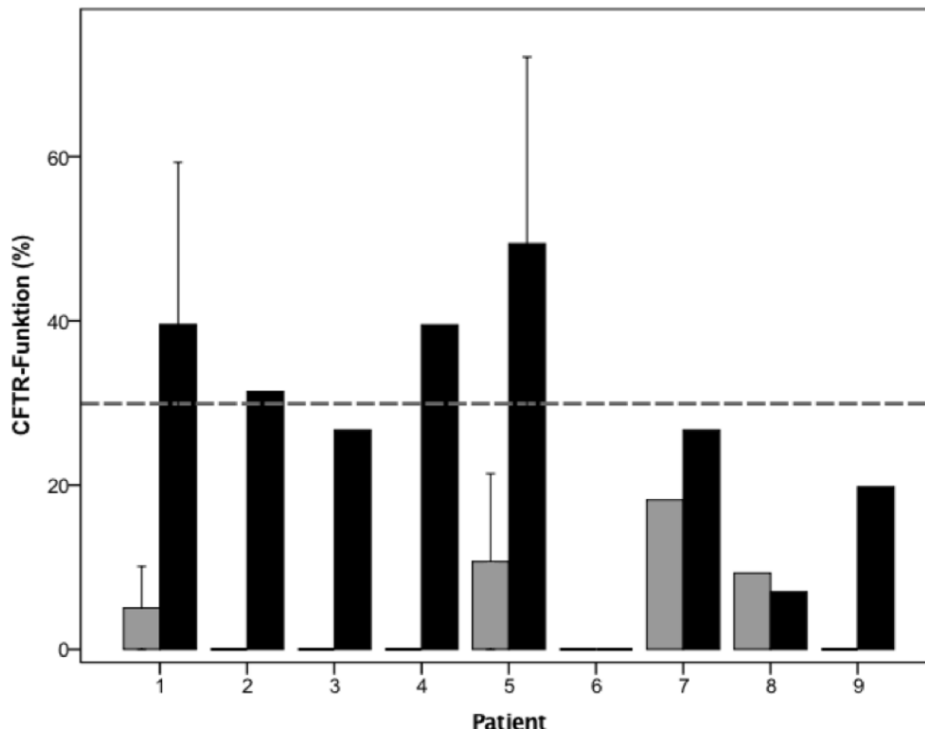


Abbildung 4-9: Ex vivo-Effekt von Lumacaftor 30 μM bei F508del homozygoten Patienten, individuelle Antworten

CFTR-Funktion vor (grau) und nach (schwarz) Inkubation mit Lumacaftor 30 μM ($n=11$ Biopsien von 9 F508del homozygoten Patienten), Darstellung der individuellen Antworten: 1-2 Biopsien je Patient, bei 2 Biopsien ist der Mittelwert + 1SEM dargestellt. Gestrichelte Linie: mittlere CFTR-Funktion in der Gruppe nach Inkubation (29,9 %).

Unter der Vorstellung, die Wirkung der Korrektur des F508del-CFTR funktionell weiter zu verstärken, wurden weitere Biopsien mit der Kombination aus Lumacaftor und dem CFTR-Potentiator Ivacaftor inkubiert. 10 Biopsien von 6 Patienten wurden mit Lumacaftor und Ivacaftor je 10 μM inkubiert, 10 Biopsien von 7 Patienten mit Lumacaftor und Ivacaftor je 30 μM . Infolge der Inkubation mit der geringeren Konzentration der Modulatoren war eine nicht signifikante Verbesserung der CFTR-Funktion zu verzeichnen von $7,9 \pm 5,0$ % auf $21,3 \pm 29,3$ % ($p=0,236$, Abbildung 4-10). In der Einzelbetrachtung zeigten 50 % der Biopsien eine Verbesserung der CFTR-Funktion (Abbildung 4-11). Nach Abzug des DMSO-Effektes bleibt keine Verbesserung der CFTR-Funktion übrig, entsprechend war diese auch gegenüber der DMSO-Gruppe statistisch nicht signifikant ($p=0,872$). Entgegen der Erwartung war bei der höheren Konzentration der Modulatoren von 30 μM ein Abfall der CFTR-Funktion von initial $8,0 \pm 4,8$ % auf $4,2 \pm 2,1$ % zu beobachten (Abbildung 4-10). In der Einzelbetrachtung zeigte sich eine Verbesserung der CFTR-Funktion nur bei 30 % der Biopsien (Abbildung 4-12). Die Biopsien der Patienten

Nr. 5, 6 und 7 zeigten jeweils vor Inkubation eine fallende Kurve als Ausdruck der gänzlich fehlenden CFTR-Funktion. Nach Inkubation mit Lumacaftor 10 μM und Ivacaftor 10 μM stieg die CFTR-Funktion bei den Patienten 5 und 6 an, bei Patient 7 zeigte sich auch nach Inkubation keinerlei CFTR-Funktion. Nach Inkubation mit Lumacaftor und Ivacaftor in der Dosis von jeweils 30 μM zeigte keine Biopsie der 3 Patienten eine CFTR-Funktion. Für diese Beobachtung sind verschiedene Erklärungsansätze denkbar. Möglicherweise kommt es zu pharmakokinetischen Interaktionen zwischen den beiden Substanzen im Inkubationsmedium, oder es ist ein hepatischer Metabolismus involviert, der im ex vivo-Modell nicht abgebildet werden kann. Denkbar sind auch unterschiedliche Halbwertszeiten von Lumacaftor und Ivacaftor oder eine glockenförmige Dosis-Wirkungskurve von Ivacaftor, wobei 30 μM über der maximalen Wirkung liegt.

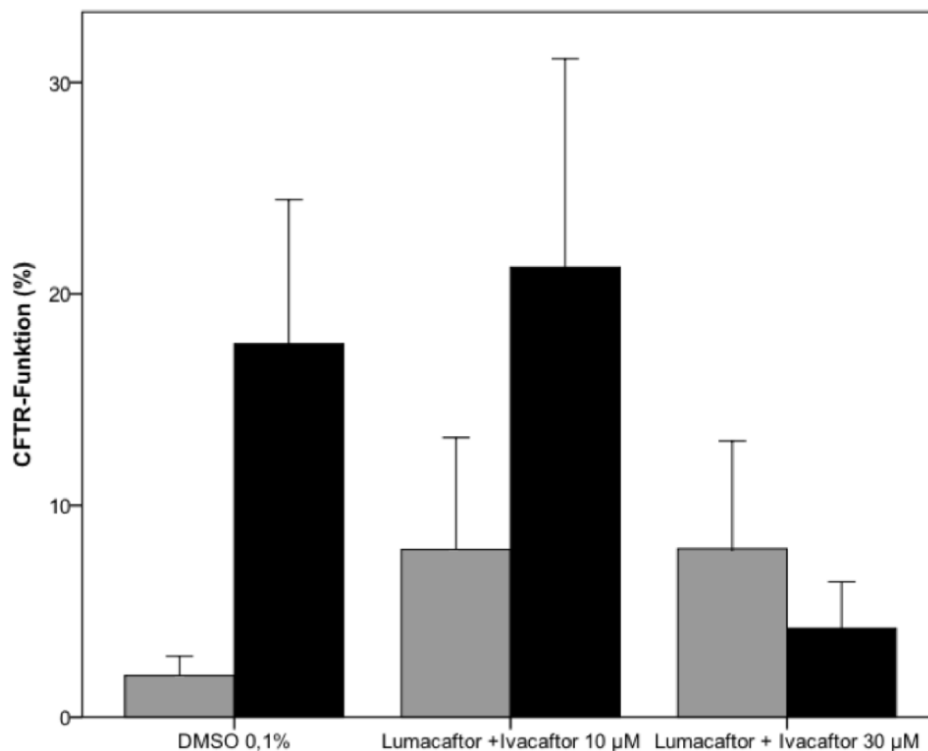


Abbildung 4-10: Ex vivo-Effekt von Lumacaftor/Ivacaftor bei F508del homozygoten Patienten

CFTR-Funktion vor (grau) und nach (schwarz) Inkubation über 16h mit DMSO 0,1 % ($n=12$ Biopsien von 8 PI-CF-Patienten), Lumacaftor + Ivacaftor 10 μM ($n=10$ Biopsien von 6 F508del homozygoten CF-Patienten) und Lumacaftor + Ivacaftor 30 μM ($n=10$ Biopsien von 7 F508del homozygoten CF-Patienten), Mittelwert + 1SEM.

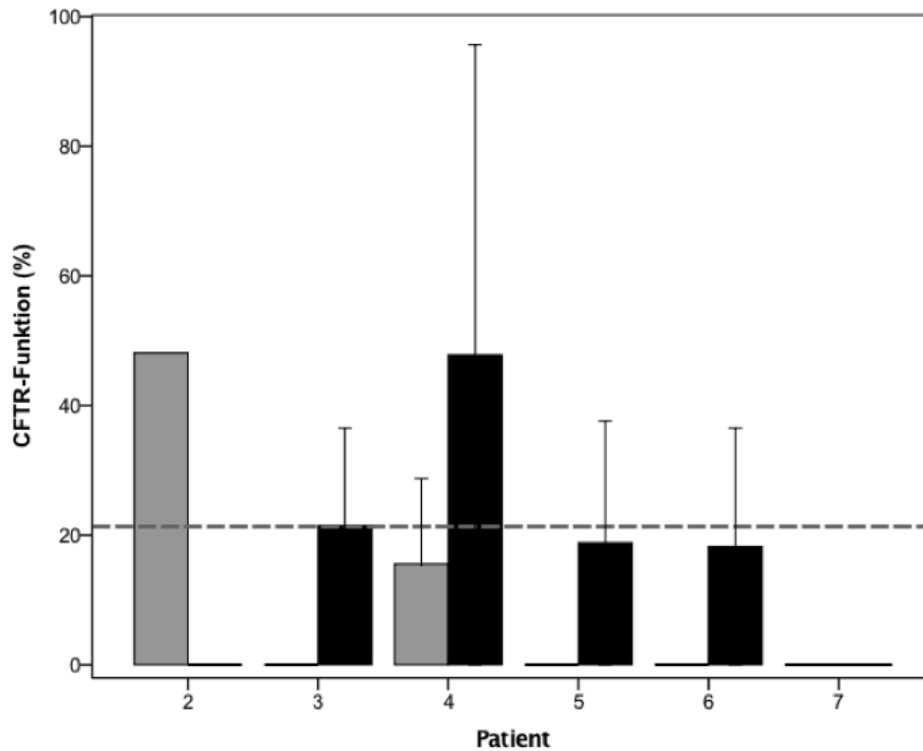


Abbildung 4-11: Ex vivo-Effekt von Lumacaftor 10 μ M in Kombination mit Ivacaftor 10 μ M bei F508del homozygoten Patienten, individuelle Antworten

CFTR-Funktion vor (grau) und nach (schwarz) Inkubation mit Lumacaftor + Ivacaftor 10 μ M ($n=10$ Biopsien von 6 F508del homozygoten Patienten, Darstellung der individuellen Antworten: 1-2 Biopsien je Patient, bei 2 Biopsien ist der Mittelwert dargestellt. Gestrichelte Linie: mittlere CFTR-Funktion in der Gruppe nach Inkubation (21,3 %).

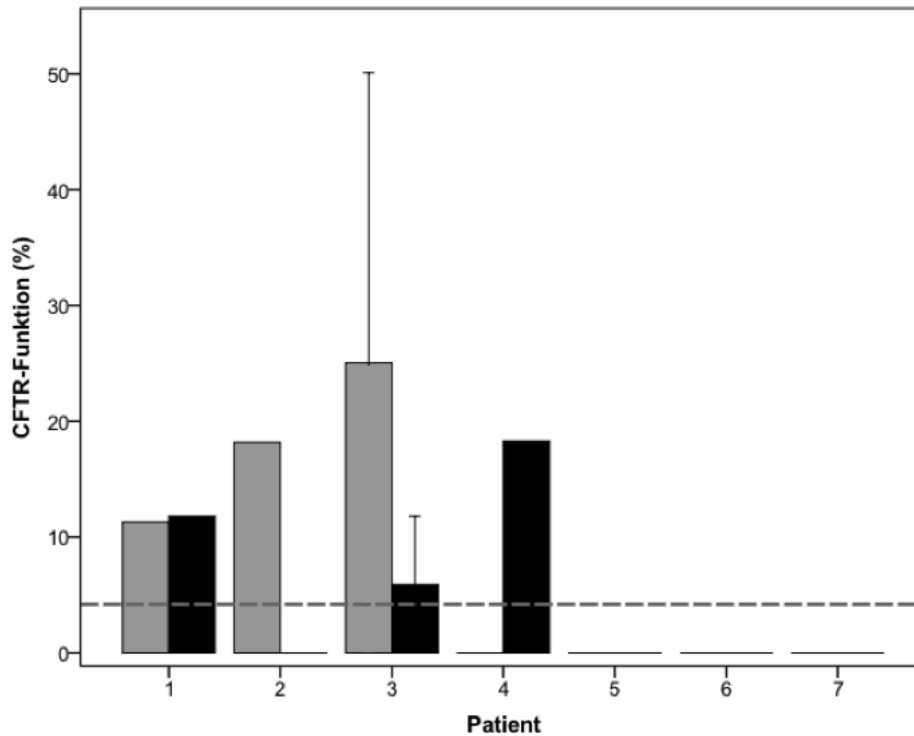


Abbildung 4-12: Ex vivo-Effekt von Lumacaftor 30 µM in Kombination mit Ivacaftor 30 µM bei F508del homozygoten Patienten, individuelle Antworten

CFTR-Funktion vor (grau) und nach (schwarz) Inkubation mit Lumacaftor + Ivacaftor 30 µM (n=10 Biopsien von 7 F508del homozygoten Patienten, Darstellung der individuellen Antworten: 1-2 Biopsien je Patient, bei 2 Biopsien ist der Mittelwert dargestellt. Gestrichelte Linie: mittlere CFTR-Funktion in der Gruppe nach Inkubation (4,2 %). Patientenummerierungen in Abbildung 4-11 und 4-12 kennzeichnen dieselben Patienten.

Die Wirksamkeit von Lumacaftor wurde auch in einer Gruppe von 4 PI-CF-Patienten untersucht, die heterozygot für F508del waren (zweite Mutation: R553X, R1162X, W1282X und G551D). Die durchschnittliche CFTR-Funktion stieg in dieser Gruppe nach Inkubation mit Lumacaftor 10 µM statistisch signifikant von $7,5 \pm 3,4$ % auf $35,3 \pm 16,2$ % an ($p=0,035$). Nach Bereinigung des DMSO-Effektes verbleibt eine mittlere Verbesserung der CFTR-Funktion von 12,2 %, welche sich gegenüber der DMSO-Gruppe als statistisch nicht signifikant erwies ($p=0,351$). Dabei konnte allerdings bei 3 der 4 untersuchten Patienten eine Verbesserung der CFTR-Funktion beobachtet werden, die bei dem F508del/G551D-Patienten sogar das Ausmaß von gesunden Kontrollpersonen erreichte und sich auch statistisch signifikant gegenüber der PI-CF DMSO-Gruppe zeigte ($p=0,026$) (Abbildung 4-13).

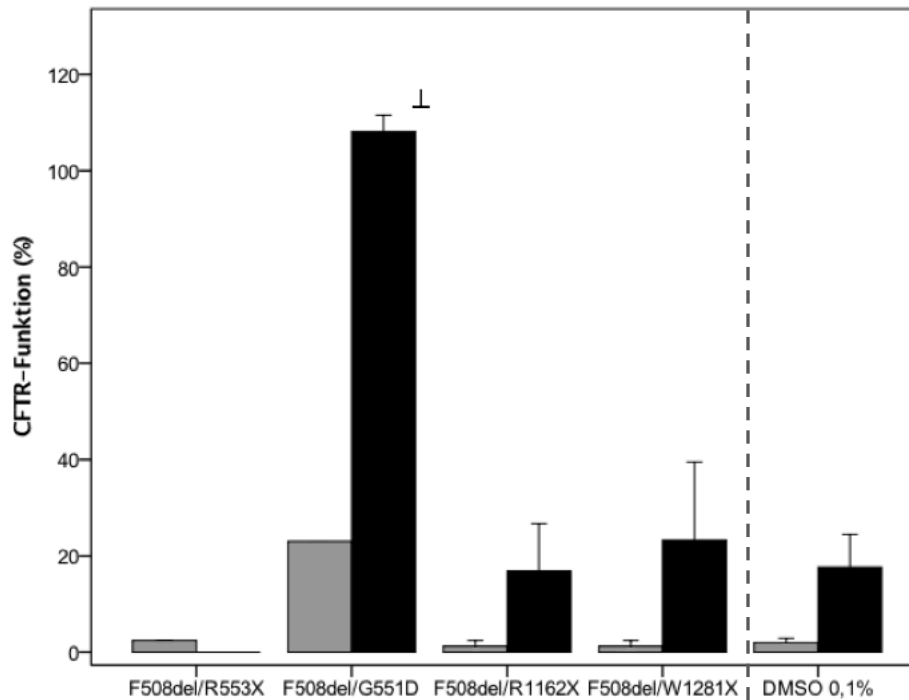


Abbildung 4-13: Ex vivo-Effekt von Lumacaftor bei F508del heterozygoten Patienten

CFTR-Funktion vor (grau) und nach (schwarz) Inkubation über 16h mit Lumacaftor 10 µM (n=8 Biopsien von 4 F508del heterozygoten CF-Patienten, Genotyp siehe X-Achse), Darstellung der individuellen Antworten, jeweils Mittelwert + 1SEM. Im Vergleich dazu mittlere CFTR-Funktion vor und nach Inkubation über 16h mit DMSO 0,1 % (n=12 Biopsien von 8 PI-CF-Patienten). ⊥=statistisch signifikanter Unterschied zu DMSO 0,1 % nach Inkubation ($p < 0,05$).

Ferner wurden Rektumschleimhautbiopsien von CF-Patienten mit einer Klasse IV- oder V-Mutation untersucht, um den Effekt von Ivacaftor auf diese Mutationen zu bestimmen. Dazu wurden 9 Biopsien von 6 Patienten mit Ivacaftor 30 µM inkubiert. Unter Ivacaftor 30 µM zeigten die Biopsien von Patienten, die die Mutation R347P auf einem Allel trugen, eine Verbesserung der CFTR-Funktion. Biopsien von Patienten mit den Mutationen 3849+10kbC->T, A455E, 2789+5G->A oder L206W zeigten dagegen keine Verbesserung der CFTR-Funktion unter ex vivo-Ivacaftor-Therapie. (Abbildung 4-14) Es fiel auf, dass die Biopsien des Patienten mit der Mutation L206W eine sehr hohe CFTR-Funktion aufwiesen, welche jeweils nach Inkubation sank, möglicherweise aufgrund der geringen Stabilität des veränderten CFTR-Proteins.

Aufgrund der geringen Fallzahlen wird an dieser Stelle auf eine statistische Betrachtung verzichtet.

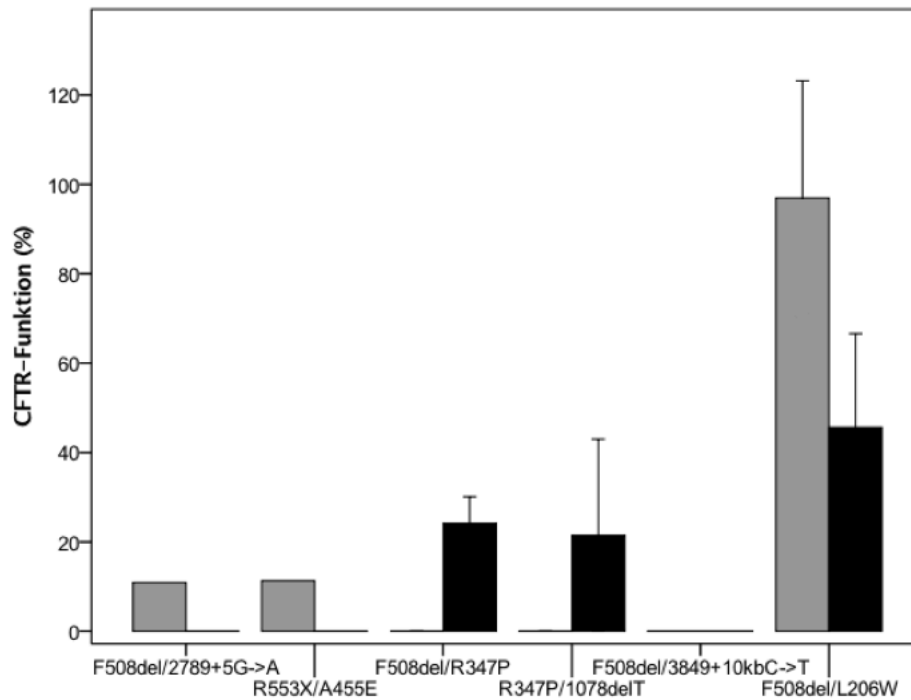


Abbildung 4-14: Ex vivo-Effekt von Ivacaftor bei CF-Patienten mit einer Klasse IV/V-Mutation

CFTR-Funktion vor (grau) und nach (schwarz) Inkubation über 16h mit Ivacaftor 30 µM (n=9 Biopsien von 6 PS-CF-Patienten, Genotyp siehe X-Achse), Darstellung der individuellen Antworten: 1-2 Biopsien je Patient, bei 2 Biopsien ist der Mittelwert + 1SEM dargestellt.

4.2.3 Ataluren und Kombination Ataluren/Lumacaftor

Es sollte außerdem die ex vivo-Wirksamkeit des Korrektors Ataluren auf CF-Patienten mit einer Klasse I-Mutation bestimmt werden. Dazu wurden Rektumschleimhautbiopsien von 3 Patienten mit einer Nonsense-Mutation auf einem Allel (Genotyp: F508del/R553X, F508del/R1162X, F508del/W1282X) sowie einem L732X homozygoten Patienten untersucht. Die Biopsien wurden mit Ataluren 10 µM inkubiert, darunter zeigte sich bei den heterozygoten Patienten eine nicht signifikante Verbesserung der CFTR-Funktion von $9,2 \pm 4,4$ % auf $18,6 \pm 8,1$ % ($p=0,465$), welche gegenüber der DMSO-Gruppe statistisch ebenfalls nicht signifikant war ($p= 1,000$) (Abbildung 4-15). Die individuelle Wirkung fiel jedoch sehr unterschiedlich aus, es zeigte sich ein non-responder sowie 2 Patienten mit uneindeutigen Ergebnissen. Die Biopsien des L732X homozygoten Patienten zeigten keine Verbesserung der CFTR-Funktion nach Inkubation mit Ataluren. (Abbildung 4-16)

Schließlich wurde bei allen 4 Patienten mit einer Nonsense-Mutation eine Kombinationstherapie mit Ataluren und Lumacaftor je 10 μM untersucht, um einen möglichen additiven Effekt verschiedener Korrektoren zu evaluieren (Abbildung 4-17). Unser ex vivo-Modell zeigte dabei einen responder sowie einen non-responder auf die Kombinationstherapie aus Ataluren und Lumacaftor. Die Biopsien des dritten heterozygoten Patienten waren nicht auswertbar. Die Biopsien des L732X homozygoten Patienten zeigten keine eindeutige Reaktion, im Mittel aber eine Verbesserung der CFTR-Funktion. Hier wird die Bedeutung einer Evaluation von Modulatoreffekten auf Patientenebene deutlich. Die Inkubation je einer Biopsie der Patienten mit Klasse I-Mutation mit Gentamicin 400 $\mu\text{g/ml}$ zeigte keine Erhöhung der rektalen CFTR-Funktion (Abbildung 4-15).

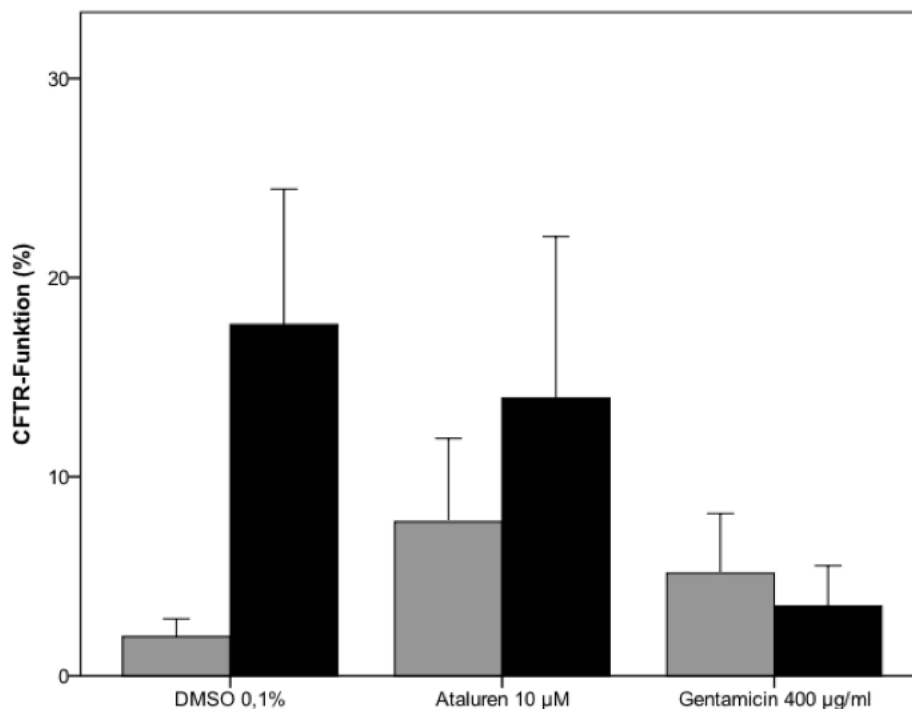


Abbildung 4-15: Ex vivo-Effekt von Ataluren und Gentamicin bei PI-CF-Patienten mit mindestens einer Klasse I-Mutation

CFTR-Funktion vor (grau) und nach (schwarz) Inkubation über 16h mit DMSO 0,1 % ($n=12$ Biopsien von 8 PI-CF-Patienten), Ataluren 10 μM ($n=8$ Biopsien von 4 PI-CF-Patienten, Genotyp: F508del/R553X, F508del/R1162X, F508del/W1282X, L732X/L732X) und Gentamicin ($n=4$ Biopsien vom identischen Patientenkollektiv), Mittelwert + 1SEM.

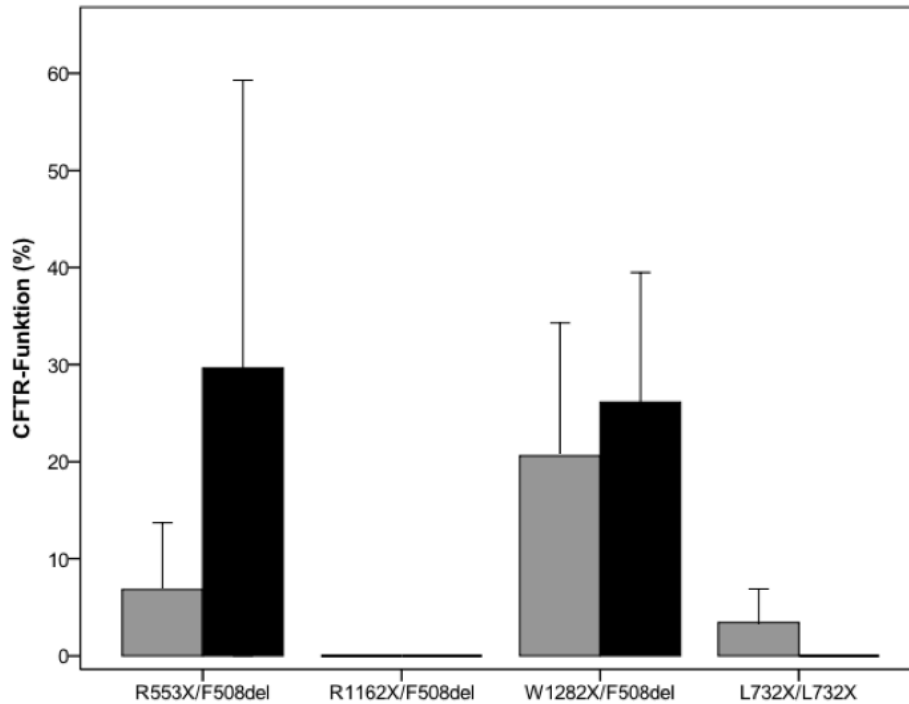


Abbildung 4-16: Ex vivo-Effekt von Ataluren bei PI-CF-Patienten mit mindestens einer Klasse I-Mutation

CFTR-Funktion vor (grau) und nach (schwarz) Inkubation über 16h mit Ataluren 10 μM ($n=8$ Biopsien von 4 PI-CF-Patienten, Genotyp siehe X-Achse), Darstellung der individuellen Antworten, jeweils Mittelwert + 1SEM.

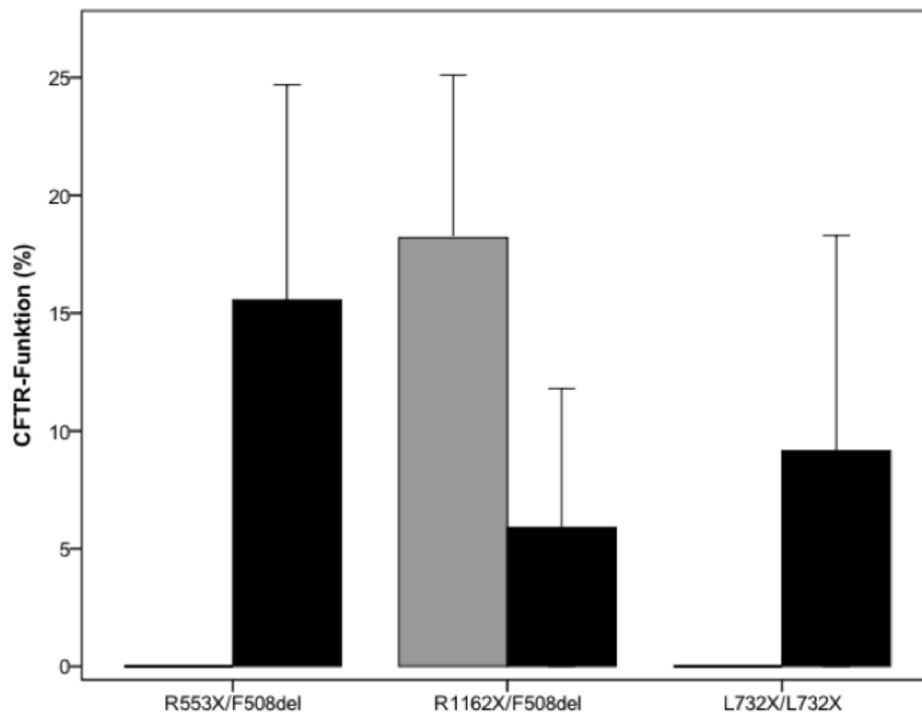


Abbildung 4-17: Ex vivo-Effekt von Ataluren in Kombination mit Lumacaftor bei PI-CF-Patienten mit mindestens einer Klasse I-Mutation

CFTR-Funktion vor (grau) und nach (schwarz) Inkubation über 16h mit Ataluren + Lumacaftor 10 μM ($n=6$ Biopsien von 3 PI-CF-Patienten, Genotyp siehe X-Achse), Darstellung der individuellen Antworten, jeweils Mittelwert + 1SEM.

4.2.4 Hylout4

Wir untersuchten den ex vivo-Effekt von Hylout4 bei Klasse IV- und V-Mutationen. Dazu wurden 13 Biopsien von 6 Patienten mit einer Klasse IV- oder V-Mutation mit 100 μ M Hylout4 inkubiert. Darunter verbesserte sich die mittlere CFTR-Funktion in dieser Gruppe mit sehr unterschiedlichen Genotypen von $23,2 \pm 7,9$ % auf $64,8 \pm 20,7$ % ($p=0,06$). Nach Korrektur des DMSO-Effektes verbleibt eine mittlere Verbesserung der CFTR-Funktion von 26,0 %. In der Einzelbetrachtung imponiert eine Verbesserung der CFTR-Funktion bei 8 der 13 Biopsien, bzw. im Mittel bei 5 der 6 untersuchten Patienten. Dabei war die 2. Mutation nur in 3 der 6 Fälle F508del, sodass gefolgert werden kann, dass Hylout4 tatsächlich auch bei anderen Mutationen als F508del eine CFTR-Funktionsverbesserung hervorruft. Die CFTR-Funktion vor und nach Inkubation mit Hylout4 ist in Abbildung 4-18 dargestellt.

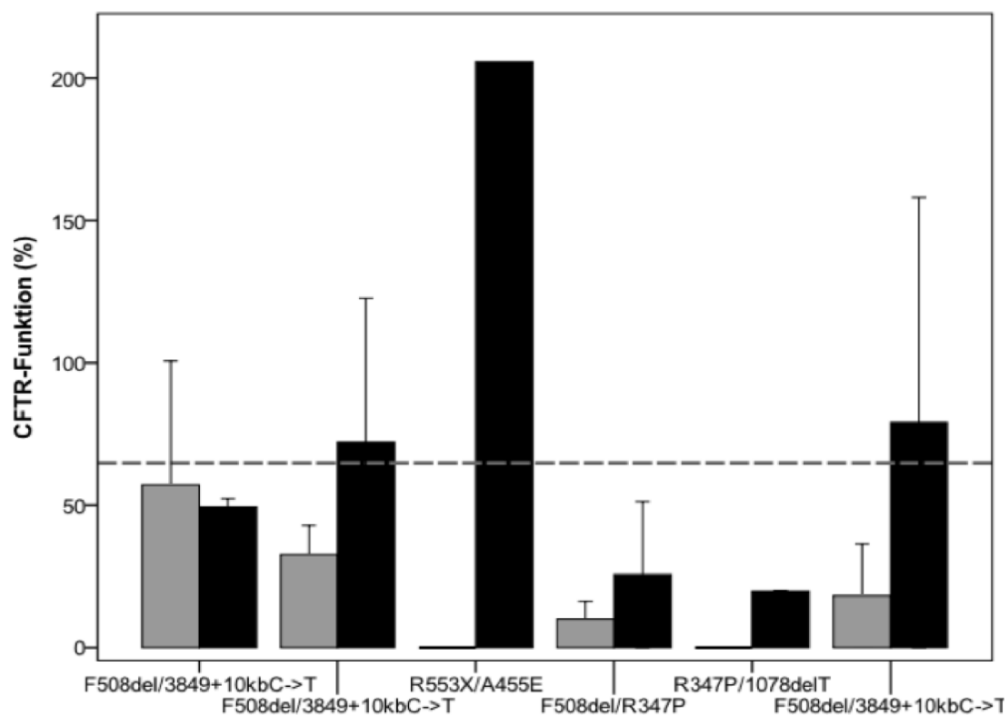


Abbildung 4-18: Ex vivo-Effekt von Hylout4 bei CF-Patienten mit mindestens einer Klasse IV-/V-Mutation

CFTR-Funktion vor (grau) und nach (schwarz) Inkubation mit Hylout4 100 μ M ($n=13$ Biopsien von 6 PS-CF-Patienten, Genotyp siehe X-Achse), Darstellung der individuellen Antworten: 1-4 Biopsien je Patient, bei 2-4 Biopsien ist der Mittelwert + 1SEM dargestellt. Gestrichelte Linie: mittlere CFTR-Funktion in der Gruppe nach Inkubation (64,8 %).

4.2.5 EPIX-Korrektoren

Um die Wirksamkeit der experimentellen Korrektoren EPIX4, EPIX5 und EPIX6 zu evaluieren, wurden Biopsien von 6 F508del homozygoten Patienten untersucht. 10 Biopsien wurden mit EPIX4 10 μ M, 7 mit EPIX5 10 μ M und 8 mit EPIX6 10 μ M inkubiert. Nach 16-stündiger Inkubation mit EPIX4 verbesserte sich die CFTR-Funktion im Verhältnis zu gesunden Kontrollen von $11,0 \pm 6,1$ % auf $19,4 \pm 4,4$ % statistisch nicht signifikant ($p=0,093$), nach Abzug des DMSO-Effektes verbleibt keine Verbesserung der CFTR-Funktion (entsprechend $p=0,381$ gegenüber der PI-CF DMSO-Gruppe). In der Einzelbetrachtung zeigten dabei lediglich 2 Biopsien vom gleichen Patienten keine Verbesserung der CFTR-Funktion. Durch Inkubation mit EPIX5 verbesserte sich die ex vivo-CFTR-Funktion statistisch signifikant von $4,9 \pm 1,4$ % auf $19,8 \pm 6,0$ % ($p=0,043$), allerdings nicht signifikant gegenüber der PI-CF DMSO-Gruppe ($p=0,592$). Die Einzelbetrachtung zeigt bei zwei Biopsien von unterschiedlichen Patienten keine Verbesserung der CFTR-Funktion. Die Verbesserung der CFTR-Funktion fiel durch Inkubation mit EPIX6 ähnlich aus, von $2,6 \pm 1,3$ % auf $18,3 \pm 7,2$ % und ebenfalls statistisch signifikant ($p=0,0423$). Nach Abzug des DMSO-Effektes verbleibt jedoch keine Verbesserung der CFTR-Funktion ($p=0,917$ gegenüber DMSO). In der Einzelbetrachtung zeigten sich 2 responder, 1 non-responder und 2 Patienten mit uneindeutigen Ergebnissen. Bei einem dieser Patienten hatten sowohl EPIX4 als auch EPIX5 keine Besserung der CFTR-Funktion erzielt. Biopsien des 6. Patienten waren nicht auswertbar. Die Effekte der EPIX-Korrektoren sind in Abbildung 4-19 nebeneinander dargestellt.

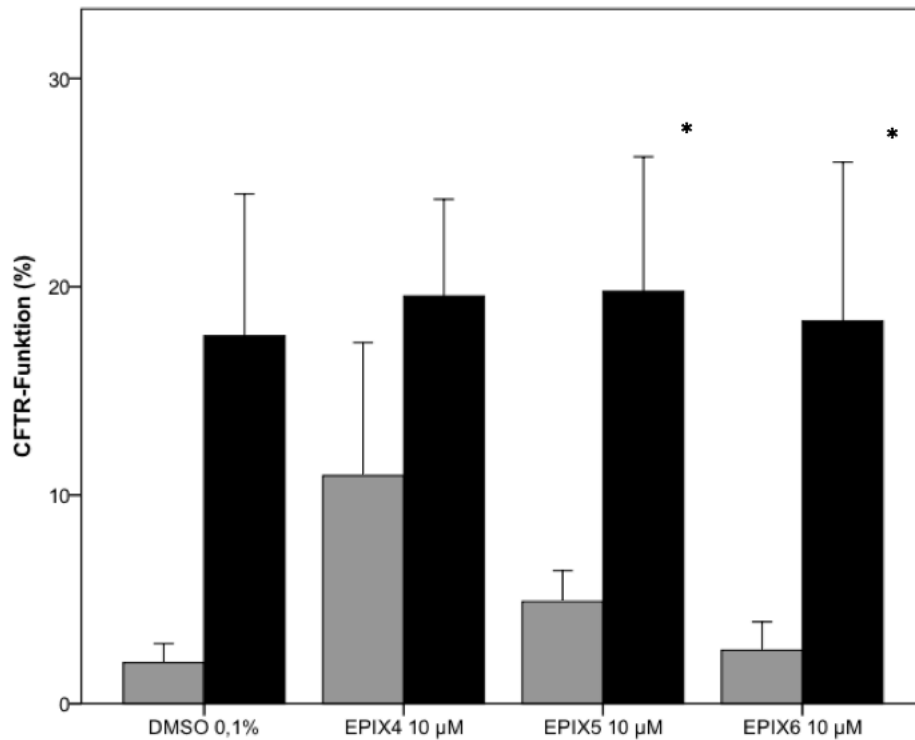


Abbildung 4-19: Ex vivo-Effekt von EPIX4, EPIX5 und EPIX6 bei F508del homozygoten Patienten

CFTR-Funktion vor (grau) und nach (schwarz) Inkubation über 16h mit DMSO 0,1 % (n=12 Biopsien von 8 PI-CF-Patienten), EPIX4 10 µM (n=10 Biopsien von 6 F508del homozygoten CF-Patienten), EPIX5 10 µM (n=7 Biopsien von 5 F508del homozygoten Patienten) und EPIX6 10 µM (n=9 Biopsien von 5 F508del homozygoten CF-Patienten), Mittelwert + 1SEM, *=statistisch signifikanter Unterschied zum Ausgangswert vor Inkubation ($p < 0,05$), kein signifikanter Unterschied zu DMSO 0,1 % nach Inkubation.

5 Diskussion

CF ist eine lebensverkürzende Multiorganerkrankung, die durch Mutationen im CFTR-Gen verursacht wird. Durch verschiedene Mutationen und den daraus resultierenden Beeinträchtigungen der Proteinbiosynthese des Genproduktes entsteht eine große Heterogenität der CFTR-Funktion und schließlich auch des Verlaufs der Erkrankung.

Mit zunehmendem Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung wurden verschiedene Biomarker zur Quantifizierung des Basisdefektes entwickelt. Der Schweißtest wurde zum Goldstandard der Diagnostik. Später wurde die NPD zur Untersuchung der CFTR-Funktion im respiratorischen Gewebe entwickelt. Als gut zugängliches und geeignetes Gewebe zur CFTR-Funktionsanalyse zeigte sich auch das intestinale Gewebe, als ex vivo-Methode wurde die ICM etabliert. Sowohl NPD als auch ICM wurden stetig weiterentwickelt, die Protokolle wurden standardisiert. Beide Methoden fanden zunächst Eingang in Diagnosealgorithmen, wenn Schweißtest und genetische Untersuchung keine klare Zuordnung zu CF oder non-CF erlaubten. Später wurden Schweißtest und NPD auch in klinischen Studien zur Bestimmung der Wirksamkeit von CFTR-Modulatoren eingesetzt (Sermet-Gaudelus et al. 2010¹, Ramsey et al. 2011, Clancy et al. 2012, Davies et al. 2013²).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die detaillierte Untersuchung der ICM nach der ECFS ICM SOP zur Eignung der Evaluation von CFTR-Modulatoren.

5.1 ICM als CFTR-Biomarker

Zunächst wurde die intraindividuelle Variabilität der ICM anhand der Untersuchung mehrerer Biopsate eines Patienten zu einem Zeitpunkt untersucht. Diese zeigte sich für die basalen Gewebekonditionen R_t basal und PD basal sowie den Parameter zur Evaluation der CFTR-Funktion ΔI_{sc} Forsk/IBMX insbesondere in der Patientengruppe recht gering, sodass auch bei einer geringen Anzahl untersuchter Biopsien eines Patienten eine Aussage bezüglich der CFTR-Funktion getroffen werden kann. Dann wurde die Reproduzierbarkeit der ICM durch wiederholte Messungen nach 0, 7 und 14 Tagen an jeweils frisch entnommenen Biopsien untersucht. Wir definierten, dass der Mittelwert aller wiederholten Messungen innerhalb einer Standardabweichung des Mittelwertes der

ersten Messung liegen sollte. Unter Anwendung dieser Definition konnte für den Parameter ΔI_{sc} Forsk/IBMX eine sehr gute Reproduzierbarkeit gezeigt werden. Daraus lässt sich auch ein Maß für die Therapieresponsivität bei Einsatz der ICM in klinischen Studien ableiten. Abweichungen von mehr als 1 SD unter Modulatortherapie können folglich als Therapieeffekt angenommen werden. Diese Annahme resultiert jedoch allein aus den Daten zur Reproduzierbarkeit der Methode, eine Aussage zur erforderlichen Änderung der CFTR-Funktion mittels ICM für ein verbessertes klinisches Outcome ist daraus nicht ableitbar. Die klinische Relevanz der ICM für die orale Therapie mit CFTR-Modulatoren wurde bereits mehrfach demonstriert (Graeber et al. 2015, Graeber et al. 2018, Pinders-Keßler, bisher nicht veröffentlicht). In der Zusammenschau ergibt sich, dass die ICM ein robuster Biomarker mit einer insbesondere in der Patientengruppe geringen Variabilität sowie einer guten Reproduzierbarkeit und Therapieresponsivität ist. Entsprechend erfüllt die ICM alle Voraussetzungen für den Einsatz in klinischen Studien zur Evaluation von CFTR-Modulatoren. Dabei zeichnet sich die ICM insbesondere dadurch aus, dass sie in allen Altersgruppen anwendbar ist und Kontraindikationen selten vorliegen (Hämorrhoiden und Blutungsneigung). Die Rektumschleimhaut weist eine hohe CFTR-Expression auf, außerdem gibt es einen raschen Zellumsatz. Daher ist zu erwarten, dass die Wirkung von CFTR-Modulatoren im rektalen Gewebe besonders schnell zu beobachten ist, insbesondere vor Eintreten klinisch messbarer Effekte. Zudem ist die Rektumschleimhaut wenig von der chronischen Inflammation betroffen, so dass auch bei fortgeschrittener Lungenerkrankung die individuelle Wirksamkeit der Modulatoren auf Zellebene nachweisbar sein dürfte. Aufgrund des relativ hohen Zeitaufwands für eine Messung sowie des erforderlichen Trainings für die Durchführung eignet sich die Methode jedoch eher für den Einsatz in frühen Studienphasen mit einer geringeren Patientenzahl.

5.2 Ex vivo-Effekt von CFTR-Modulatoren

5.2.1 Definition der CFTR-Funktion

In einem nächsten Schritt wurde die ex vivo-Wirksamkeit von zum Zeitpunkt der Messungen 2011 bis 2013 in klinischen Studien untersuchten sowie experimentellen CFTR-Modulatoren auf die Rektumschleimhaut mittels ICM evaluiert. Dazu wurde zunächst

die Reproduzierbarkeit der Messung einer Biopsie nach Entnahme sowie nach 16 Stunden betrachtet. Untersuchungen an Biopsien einer non-CF Kontrollgruppe zeigten nach 16-stündiger Inkubation mit DMSO 0,1 % eine persistierende Stimulierbarkeit der CFTR-Aktivität, wenngleich das absolute Niveau des registrierten Kurzschlussstroms deutlich geringer ausfiel. Als Parameter der CFTR-Funktion wurde ΔI_{sc} Forsk/IBMX festgelegt. Wir definierten den MW der non-CF Biopsien jeweils vor und nach Inkubation mit DMSO 0,1 % als 100% CFTR-Funktion. Zur Evaluation des ex vivo-Effektes von CFTR-Modulatoren wurden Biopsien von PI-CF und PS-CF-Patienten mit verschiedenen CFTR-Modulatoren in DMSO gelöst über 16 Stunden in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Vor und nach Inkubation wurde eine ICM nach der ECFS ICM SOP durchgeführt. Um eine Verbesserung der CFTR-Funktion allein durch DMSO 0,1 % auszuschließen, wurden auch Biopsien der PI-CF-Patienten mit DMSO 0,1 % inkubiert. Darunter zeigte sich eine signifikante Verbesserung der CFTR-Funktion um 15,6 %. DMSO wirkt in höheren Konzentrationen als Chaperon und verbessert die Proteinreifung von F508del-CFTR (Kirk und Dawson 2003, S. 190). Entsprechend wurde für die CFTR-Modulatoren jeweils geprüft, ob nach Inkubation eine statistisch signifikante Verbesserung der CFTR-Funktion einerseits gegenüber der Ausgangsfunktion (vor Inkubation), andererseits aber auch gegenüber den mit DMSO 0,1 % inkubierten Biopsien erreicht wurde.

5.2.2 CFTR-Modulation bei F508del homozygoten Patienten

Biopsien von F508del homozygoten Patienten erfuhren unter Lumacaftor eine gegenüber dem Ausgangswert signifikante dosisabhängige Verbesserung der CFTR-Funktion. Abzüglich des ermittelten DMSO-Effektes stieg die CFTR-Funktion unter Lumacaftor 30 μ M um 10,9 % an. Allerdings war der Unterschied der CFTR-Funktion gegenüber den mit DMSO 0,1 % inkubierten Biopsien statistisch nicht signifikant. In der Phase II-Studie zur Monotherapie mit Lumacaftor bei F508del homozygoten Patienten konnte keine Verbesserung der Lungenfunktion gemessen an der FEV1 erzielt werden (Flume et al. 2012). Daher ist davon auszugehen, dass dieses Ausmaß der CFTR-Funktionsverbesserung tatsächlich nicht ausreichend für eine klinische Besserung ist. Die Funktionseinschränkung von F508del-CFTR beruht auf verschiedenen Mechanismen, neben der fehlerhaften Proteinfaltung mit frühzeitigem proteasomalem Abbau zeigt das Protein zudem ein abnormales Gating sowie eine verkürzte Halbwertszeit. Die

beiden letztgenannten Eigenschaften werden durch Lumacaftor allein unzureichend beeinflusst. (Bell et al. 2020)

Unter Inkubation mit den F508del-Korrektoren von EPIX Pharmaceuticals, für die keine klinischen Daten vorliegen, konnte keine Verbesserung der CFTR-Funktion über den DMSO-Effekt hinaus erreicht werden.

Unter Kombination von Lumacaftor und Ivacaftor konnte in klinischen Studien eine Verbesserung der Lungenfunktion um etwa 3 % bei F508del homozygoten Patienten gezeigt werden (Wainwright et al. 2015). Die Kombinationstherapie aus Lumacaftor und Ivacaftor in dieser Patientengruppe zeigte in unserem ex vivo-Modell bei einer Konzentration von je 10 μM jedoch eine nicht signifikante Verbesserung der CFTR-Funktion, die zudem sowohl unterhalb der Verbesserung der CFTR-Funktion durch Lumacaftor 10 μM allein als auch unterhalb des beobachteten Vehikel-Effektes durch DMSO 0,1 % blieb. Bei Dosissteigerung auf je 30 μM war sogar ein Abfall der CFTR-Funktion zu beobachten. Dies bestätigt die mehrfach beschriebene Beobachtung, dass eine längere Exposition mit Ivacaftor in höheren Dosierungen die funktionelle Korrektur von F508del CFTR durch Lumacaftor inhibiert (Cholon et al. 2014, Veit et al. 2014). In vivo führt die hohe Proteinbindung von Ivacaftor insbesondere an Albumin zu niedrigeren Plasmaspiegeln und verhindert somit möglicherweise die Inhibition der Korrektur durch Lumacaftor (Matthes et al. 2016). Eine Proteinbindung von Ivacaftor findet in unserem ex vivo-Modell durch Inkubation in einem Medium ohne Proteine nicht statt, sodass tatsächlich zu hohe Konzentrationen von Ivacaftor vorliegen konnten und so der Effekt von Lumacaftor inhibiert wurde. Daraus ergibt sich einerseits, dass die ICM als ex vivo-Modell intrazelluläre Prozesse und Interaktionen sehr repräsentativ abbilden kann. Andererseits wird jedoch deutlich, dass die pharmakokinetischen Eigenschaften der CFTR-Modulatoren mit einbezogen werden müssen, um adäquate Konzentrationen einzusetzen, die auch die in vivo-Situation widerspiegeln. Konkret sollten für die Kombinationstherapie aus Lumacaftor und Ivacaftor bei F508del homozygoten Patienten also Konzentrationen von 30 μM (Lumacaftor) und 1-5 μM (Ivacaftor) untersucht werden. Eine solche Versuchsreihe wäre erforderlich, um eindeutig zu zeigen, dass die Kombination von Korrektoren und Potentioren ex vivo untersucht werden kann.

5.2.3 CFTR-Modulation bei F508del heterozygoten Patienten

Auch bei F508del heterozygoten Patienten zeigte Lumacaftor in unserem ex vivo-Modell eine gegenüber dem DMSO-Effekt nicht statistisch signifikante Verbesserung der CFTR-Funktion. Allein die Biopsien von einem Patienten mit dem Genotyp F508del/G551D zeigten gegenüber dem DMSO-Effekt eine signifikante Verbesserung der CFTR-Funktion bis auf das Level von gesunden Kontrollen. (Anmerkung: Die Mutation G551D wurde bei diesem Patienten erst im Rahmen einer erneuten genetischen Untersuchung nach Zulassung von Ivacaftor und Teilnahme an dieser Studie identifiziert.) Anhand dieser Daten zeigt sich, dass eine individuelle präklinische Evaluation von CFTR-Modulatoren immens wichtig sein kann, um respondern eine wirksame Therapie möglicherweise im Sinne eines Off-Label-Use zugänglich zu machen. Lumacaftor ist für die Therapie von F508del heterozygoten Patienten weder als Monotherapie noch in Kombination mit Ivacaftor zugelassen (Vertex Pharmaceuticals Incorporated 2015), da in klinischen Studien keine Verbesserung der FEV1 gezeigt werden konnte (Rowe et al. 2017²). Entsprechend spiegelt das ex vivo-Modell auch in dieser Patientengruppe die klinische Situation adäquat wider.

5.2.4 CFTR-Modulation bei Klasse IV- und V-Mutationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch der ex vivo-Effekt von Ivacaftor bei CF-Patienten mit verschiedenen Klasse IV- und V-Mutationen untersucht. Dabei zeigte sich nur bei Patienten mit der Mutation R347P eine Verbesserung der CFTR-Funktion. Allerdings ist Ivacaftor für die Therapie bei Patienten mit der Mutation R347P nicht zugelassen, da in der in vitro-Analyse keine Verbesserung der CFTR-Funktion von mindestens 10 % erreicht wurde (van Goor et al. 2014). In den in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen zeigten 3 der 4 Biopsien mit R347P auf einem Allel eine Verbesserung der CFTR-Funktion, für alle 4 Biopsien ergab sich eine mittlere Verbesserung von 22,1 %. Dabei fiel insbesondere auf, dass die Biopsien mit R347P auf einem Allel analog zu in vitro-Untersuchungen (van Goor et al. 2014) keine oder nur eine minimale CFTR-Restfunktion aufwiesen. Denkbar wäre, dass die Diskrepanz bezüglich der Wirksamkeit von Ivacaftor auf R347P-CFTR zwischen den hier erhobenen ex vivo-Daten und den bekannten in vitro-Daten auf individuelle Unterschiede beispielsweise durch modifizierende Gene zurückzuführen ist.

Auf die Mutationen 3849+10kbC->T, 2789+5G->A, A455E und L206W schien Ivacaftor ex vivo nicht potenzierend zu wirken. Für diese Mutationen wurde Ivacaftor allerdings aufgrund klinischer Daten zur Therapie zugelassen (Vertex Pharmaceuticals Incorporated 2012). Bei Patienten mit der Splicing-Mutation 3849+10kbC->T konnte in der klinischen Studie unter Einschluss von 40 Patienten eine Verbesserung der Lungenfunktion gemessen an der FEV1 um durchschnittlich 5,1 % ermittelt werden, dabei zeigten sich jedoch große individuelle Unterschiede mit einer Streubreite von -6,8 bis 16,2 %. Die Verbesserung der CFTR-Funktion in der Schweißdrüse fiel nur moderat aus (-4,6 %), wobei sich mit Veränderungen von -80,5 bis 23,0 mmol/l auch hier deutliche individuelle Unterschiede zeigen (Vertex Pharmaceuticals Incorporated 2012). Entsprechend ist es durchaus denkbar, dass unser ex vivo-Modell hier die sehr variable Responsivität der 3849+10kbC->T Patienten auf Ivacaftor demonstriert und die Teilnehmenden unserer Studie als non-responder angesehen werden müssen. Für die Mutation 2789+5G->A ergab die klinische Studie bezüglich der Lungenfunktion gemessen an der FEV1 ein ähnliches Bild, unter Ivacaftor zeigte sich eine mittlere Verbesserung um 5,1 % mit einer Streuung von -7,1 bis 17,0 %. Eine Verminderung des durchschnittlichen Schweißchlorids konnte in der klinischen Studie nicht ermittelt werden, individuell war eine geringe Verminderung von bis zu 7,5 mmol/l erkennbar (Vertex Pharmaceuticals Incorporated 2012). Entsprechend lassen sich die Messergebnisse auch hier in Einklang mit den klinischen Daten bringen. Es kann gefolgert werden, dass unser Studienteilnehmer mit der Mutation 2789+5G->A zur Gruppe der non-responder gehört. Für 24 Patienten mit der Mutation A455E liegen Daten aus einer klinischen Studie vor mit einer insgesamt sehr variablen Wirkung von Ivacaftor. Die Veränderung der Lungenfunktion reichte von -6,6 bis 19,7 %, die Veränderung im Schweißtest reichte von -16,8 bis 16,0 mmol/l, im Mittel kam es sogar zu einem Anstieg des Schweißchlorids um 7,5 mmol/l (Vertex Pharmaceuticals Incorporated 2012). Auch McGarry et al. (2017) beobachteten einen Anstieg des Schweißchlorids bei Patienten mit der Mutation A455E. An HNE-Zellen konnte die Gruppe ebenda in vitro nur einen sehr geringen Anstieg der CFTR-Funktion zeigen. FRT-Zellen zeigten im Gegensatz zu den klinischen Daten in vitro unter Ivacaftor einen signifikanten Anstieg des Chloridtransports (van Goor et al. 2014). Damit widersprechen die Ergebnisse der klinischen Studie den im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten nicht, wenngleich bloß eine Biopsie von einem A455E-Patienten mit Ivacaftor inkubiert wurde. Auch die Mutation L206W konnte nur anhand eines Patienten untersucht werden. Aus der klinischen Studie liegen Daten von lediglich 2 Patienten vor. Diese zeigten

beide eine moderate Verbesserung der Lungenfunktion um durchschnittlich 4,2 %, im Schweißtest zeigte ein Patient einen Abfall um 8,3 mmol/l, der andere Patient hingegen zeigte einen Anstieg um 16 mmol/l (Vertex Pharmaceuticals Incorporated 2012). Auch diese Daten deuten auf eine große individuelle Variabilität hinsichtlich der Wirksamkeit von Ivacaftor hin. Entsprechend können unsere Daten dahingehend interpretiert werden, dass es sich bei dem Patienten um einen non-responder handelt. Die hier erhobenen Daten in Kombination mit den vorliegenden klinischen Falldaten demonstrieren die große Bedeutung einer präklinischen Evaluationsmöglichkeit von CFTR-Modulatoren an nativem humanem Gewebe und damit die erweiterten Möglichkeiten gegenüber einer in vitro-Untersuchung an definierten Zellreihen.

Hylout4, ein Hyaluronsäure-Analogon, zeigte in einer Studie eine Verbesserung der Funktion von F508del-CFTR, wobei eine Wirkung als Potentiator vermutet wurde (Nowakowska et al. 2012). Wir untersuchten die Wirksamkeit von Hylout4 auf die CFTR-Funktion einer Gruppe von CF-Patienten mit einer Klasse IV- oder V-Mutation, wobei nur 50 % der untersuchten Patienten F508del auf einem Allel trugen. Hylout4 bewirkte in unserem ex vivo-Modell eine durchschnittliche Verbesserung der CFTR-Funktion in dieser Gruppe um 26 % korrigiert um den DMSO-Effekt. Von den in unserer Arbeitsgruppe untersuchten CFTR-Modulatoren bewirkte Hylout4 damit die größte Verbesserung der CFTR-Funktion. Aufgrund fehlender klinischer Daten kann jedoch aktuell keine Aussage über die Relevanz einer solchen präklinischen Verbesserung der CFTR-Funktion getroffen werden. Es wird dennoch deutlich, dass mittels ICM eine Untersuchung bereits bekannter CFTR-Modulatoren für weitere CFTR-Mutationen möglich ist und sinnvoll sein kann.

5.2.5 CFTR-Korrektion bei Klasse I-Mutationen

Zur Therapie der CF-Patienten mit mindestens einer Klasse I-Mutation wurde der CFTR-Korrektor Ataluren entwickelt (Welch et al. 2007). Dieser wurde auch in klinischen Studien bis Phase III untersucht (Kerem et al. 2014, Konstan et al. 2020). Aufgrund nicht erreichter Endpunkte wurde die Arbeit an Ataluren jedoch schließlich beendet (PTC Therapeutics 2017). Wir untersuchten die Wirksamkeit von Ataluren ex vivo auf die CFTR-Funktion der Rektumschleimhaut. Dabei zeigte sich eine nur geringe, nicht signifikante Verbesserung der CFTR-Funktion, die unter dem DMSO-Effekt lag.

Trotz geringer Patientenzahl (n=4 mit je 2 Biopsien) spiegeln unsere Daten die Ergebnisse der klinischen Studien wider. Eine mögliche dosisabhängige Wirksamkeit wurde in unserem ex vivo-Modell aufgrund der geringen Anzahl verfügbarer Patienten mit einem entsprechenden Genotyp nicht untersucht. Ein additiver Effekt von Lumacaftor und Ataluren konnte bei den Biopsien der beiden Patienten mit dem Genotyp F508del/Klasse I-Mutation entgegen theoretischer Überlegungen nicht gezeigt werden. Daten aus klinischen Studien als Referenz existieren nicht. Die geringe Fallzahl ermöglicht an dieser Stelle kein repräsentatives Ergebnis. Mögliche Ursachen für den ausbleibenden additiven Effekt der zwei CFTR-Korrektoren könnten Interaktionen der beiden Substanzen im Inkubationsmedium oder eine gegenseitige intrazelluläre Wirkungsabschwächung sein. Entgegen vorliegenden Daten (Wilschanski et al. 2003, Clancy et al. (2001)) konnte durch Gentamicin keine Verbesserung der rektalen CFTR-Funktion erreicht werden. Ein möglicher Erklärungsansatz dazu könnte eine Bindung von Gentamicin an im Medium zirkulierende Darmbakterien sein, sodass nicht mehr ausreichend Wirkstoff für die CFTR-Modulation zur Verfügung stand.

5.3 Nutzen der ICM zur Entwicklung von CFTR-Modulatoren

5.3.1 Erforderliche CFTR-Funktion für einen klinischen Nutzen

Bei der präklinischen Untersuchung von CFTR-Modulatoren besteht stets die Schwierigkeit, dass das erforderliche Maß an CFTR-Funktion für eine klinische Besserung unklar ist (Becq et al. 2011). Sousa et al. (2012) gehen davon aus, dass bei 10 % CFTR-Funktion in der ICM im Vergleich zu gesunden Kontrollen mit einer besseren Prognose bzw. einem atypischen Verlauf gerechnet werden kann, bei 30 % einer normalen ICM-CFTR-Funktion wird eine Vermeidung von CF-Symptomen postuliert. In unserer Patientenkohorte wies die Gruppe der PS-CF-Patienten stellvertretend für einen milderen Erkrankungsverlauf eine ICM-CFTR-Funktion von etwa 20 % im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf (Pinders-Keßler, bisher nicht veröffentlicht). Eine Verbesserung der CFTR-Funktion dieses Ausmaßes konnte nur in wenigen Fällen durch die in unserer Arbeitsgruppe untersuchten CFTR-Modulatoren erreicht werden. Beide Biopsien eines Patienten mit dem Genotyp F508del/G551D verbesserten sich unter ex vivo-Therapie mit Lumacaftor 10 μ M auf 100%, während die übrigen Biopsien von Patienten mit der Mutation F508del keine Verbesserung der CFTR-Funktion durch Lumacaftor über 20%

(korrigiert um den Vehikel-Effekt) erfuhren. Bei Patienten mit Klasse IV- und V-Mutationen konnte durch Hylout4 eine CFTR-Funktionsverbesserung von 26 % (bereits um den Vehikel-Effekt korrigiert) beobachtet werden. Aufgrund der bereits hohen Restfunktion in dieser Gruppe war dieser Anstieg jedoch statistisch nicht signifikant. Durch Lumacaftor 30 μ M konnte bei F508del homozygoten Patienten eine statistisch nicht signifikante Verbesserung der CFTR-Funktion um 10,9 % (korrigiert um den Vehikel-Effekt) erreicht werden. Die Wirksamkeit von Lumacaftor in dieser Patientengruppe wurde auch in klinischen Studien untersucht, dabei konnte der Endpunkt einer Verbesserung der Lungenfunktion nicht erreicht werden (Clancy et al. 2012). Daraus könnte möglicherweise abgeleitet werden, dass eine Verbesserung der CFTR-Funktion um 10,9 % nicht ausreichend für einen klinischen Nutzen ist. Zur Beantwortung der essentiellen Frage, wie viel ex vivo-CFTR-Funktion für ein verbessertes Outcome erforderlich ist, sind weitere Untersuchungen mit CFTR-Modulatoren notwendig, für die bereits ein klinischer Nutzen gezeigt werden konnte. Von Interesse ist dabei nicht nur der Anstieg der FEV1 während der Zulassungsstudien, sondern insbesondere Langzeitdaten zur Entwicklung der Lungenfunktion, pulmonalen Exazerbationen und Überlebenszeit. Bisher liegen dazu sehr wenige Daten vor. Es konnte jedoch eine deutliche Verlangsamung des Abfalls der Lungenfunktion für Ivacaftor gezeigt werden (Sawicki et al. 2015, Konstan et al. 2017). Aus den Daten der klinischen Studien sowie Patientenregistern wurden Simulationen für mit Lumacaftor/Ivacaftor behandelte Patienten erstellt, die einen deutlichen Anstieg der Lebenserwartung von bis zu 23 Jahren voraussagen (Rubin et al. 2019).

5.3.2 Klinische Bewertung der Wirksamkeit von CFTR-Modulatoren

In der Zukunft werden verschiedene Modulatoren für die häufigsten Mutationen zur Verfügung stehen, für einige Mutationen wird es sogar mehr als einen Modulator geben (Cystic Fibrosis Foundation 2019). Dabei zeigen klinische Studien wiederholt, dass es große Unterschiede hinsichtlich der individuellen Responsivität für CFTR-Modulatoren gibt (Wainwright et al. 2015, Taylor-Cousar et al. 2017). Als Ursache werden insbesondere CFTR modifizierende Gene diskutiert, deren Existenz zwar angenommen wird, deren Charakterisierung und Sequenzierung jedoch noch am Anfang stehen (Cutting 2015). Folglich liegen dazu bisher keine Daten vor, die eine Vorhersage der individuellen Wirksamkeit eines CFTR-Modulators ermöglichen. Der Effekt kann erst nach Therapiebeginn evaluiert werden. Hier entstehen weitere Fallstricke, so fehlt es an optimalen

klinischen Outcome-Parametern (De Boeck et al. 2013). Als Surrogatparameter wurde die FEV1 folglich als Endpunkt in klinischen Studien genutzt (Ramsey et al. 2011, Davies et al. 2013², Wainwright et al. 2015, Taylor-Cousar et al. 2017, Middleton et al. 2019). Für die FEV1 wird ein ausreichender Zusammenhang mit dem Langzeitüberleben angenommen (De Boeck et al. 2013). Allerdings zeigt sich dieser Parameter möglicherweise für kurzzeitige Therapieeffekte nicht sensitiv genug. Die FEV1 zeigte in den Phase III-Studien zu Ivacaftor und Lumacaftor eine signifikante Verbesserung unter CFTR-Modulatortherapie (Wainwright et al. 2015, Taylor-Cousar et al. 2017). Dennoch wird die Eignung dieses Surrogatparameters als Endpunkt in klinischen Studien aus verschiedenen Gründen diskutiert. So kennzeichnet ein Abfall der FEV1 oftmals eine bereits fortgeschrittene Destruktion des Lungengewebes, die auch unter Korrektur des Basisdefektes nicht zu beeinflussen wäre. Daraus ergibt sich, dass die Wirksamkeit von CFTR-Modulatoren bei Studienteilnehmenden mit sehr guter oder sehr eingeschränkter Lungenfunktion eher unterschätzt wird (De Boeck und Davies 2017). Langzeitwirkungen wie ein langsamerer Abfall der FEV1 können wiederum nicht in klinischen Studien berücksichtigt werden (De Boeck und Davies 2017). So wurden weitere Lungenfunktionsprüfungen wie der Lung Clearance Index (LCI) in klinischen Studien als zusätzliche Endpunkte eingesetzt, um eine Verbesserung der Lungenfunktion zu demonstrieren (Ratjen et al. 2017, Davies et al. 2013¹).

Bisher ist die FEV1 der einzige durch die FDA akzeptierte Surrogatparameter zur Demonstration der Wirksamkeit einer Therapie der CF (U.S. Food & Drug Administration 2020). Es gibt viele wissenschaftliche Bestrebungen zur Implementation weiterer Surrogatparameter (De Boeck et al. 2013). Dabei stehen insbesondere die CFTR-Biomarker Schweißtest, NPD und ICM im Fokus. Zur Etablierung als Surrogatparameter müssen ausreichende Daten zu Variabilität, Reproduzierbarkeit und Therapieresponsivität vorliegen. Die Therapieresponsivität der ICM wurde seit Zulassung des ersten CFTR-Modulators Ivacaftor bereits mehrfach untersucht (Scheinert et al. 2013, Graeber et al. 2015, Graeber et al. 2018). Daten zur Variabilität und Reproduzierbarkeit der ICM nach der ECFS ICM SOP wurden im Rahmen dieser Arbeit erhoben und dargestellt. Um die Transformation der ICM in einen Surrogatparameter voranzutreiben, sind weitere Untersuchungen dieser Art erforderlich. Unabhängig von der Akzeptanz der FDA könnte die ICM in frühen Phase II-Studien zur kurzfristigen Bestimmung der Wirksamkeit eines CFTR-Modulators eingesetzt werden.

5.3.3 Präklinische Evaluation von CFTR-Modulatoren

Die präklinische Evaluation von potentiellen CFTR-Modulatoren nach dem HTS erfolgt zumeist an HBE-Zellen. Wenngleich ihr Nutzen außerordentlich groß ist, so ist die Materialgewinnung äußerst aufwendig und die Kulturbedingungen sind sehr speziell. Entsprechend sind die Einsatzmöglichkeiten der HBE-Zellen sehr eingeschränkt. Zudem steht nur Material von einer sehr geringen Anzahl an Patienten zur Verfügung (Beekman et al. 2014). Modifizierende Gene könnten also die Ergebnisse beeinflussen. Entsprechend besteht ein großes Interesse daran, auch andere Zellen von CF-Patienten zu kultivieren, etwa aus Nasenepithel. Außerdem werden pluripotente Stammzellen aus Blut- oder Hautzellen genutzt, um Atemwegsepithelien zu generieren (Clancy et al. 2019).

Ein weiteres *in vitro*-Modell wurde im Jahr 2013 entwickelt. Intestinale Organoiden werden aus den Krypten der Rektumschleimhaut gewonnen. Diese formen eine dreidimensionale Struktur mit einer Epithelschicht und einem zentralen Lumen. Die CFTR-Funktion wird indirekt mittels Forskolin-induziertem Anschwellen (Forskoline induced swelling, FIS) bestimmt: Unter cAMP-vermittelter CFTR-Stimulation strömen Chlorid-Ionen und sekundär Wasser in das Lumen, wodurch sich der Durchmesser der Organoiden vergrößert (Dekkers et al. 2013). Neben der Bestimmung der individuellen CFTR-Funktion lassen sich auch CFTR-Modulatoren mittels Organoiden *in vitro* analysieren (Dekkers et al. 2016). Ein Vorteil von Organoiden ist, dass die Rektumschleimhaut wesentlich besser zugänglich ist als etwa das Bronchialepithel für HBE-Zellkulturen. Rektumschleimhautbiopsien können nach erfolgter ICM zur Herstellung von entsprechenden Organoiden verwendet werden (Beekman 2016). So können CFTR-Modulatoren auch bei seltenen Mutationen untersucht werden. Außerdem besteht die Möglichkeit des Biobankings von Organoiden, um nach einmaliger Probenentnahme wiederholte Untersuchungen mit verschiedenen CFTR-Modulatoren vornehmen zu können. Die Methode ist bisher jedoch nur in wenigen Zentren verfügbar, sodass der Aufbau einer Biobank noch am Anfang steht. Die Kultivierung der Organoiden dauert nach der Probengewinnung etwa 4 Wochen. Dementsprechend lassen sich *in vivo*-Effekte einer Modulatortherapie mit Organoiden nicht erfassen, genauso wenig eine additive Wirkung zur bestehenden Therapie. Basierend auf kultivierten Zellen bleibt die Übertragbarkeit auf *in vivo*-Bedingungen als *in vitro*-Methode stets etwas unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass

der CFTR-Genotyp und die Antworten auf eine in vitro-Modulatortherapie über viele Monate konstant bleiben. (Beekman 2016)

Die ICM kann in der präklinischen Evaluation von CFTR-Modulatoren einen wichtigen Beitrag leisten. Wie im Rahmen dieser Arbeit dargestellt werden konnte, können Effekte von CFTR-Korrektoren ex vivo mittels ICM quantifiziert werden. So kann die Wirksamkeit von CFTR-Modulatoren an nativem Gewebe bei unterschiedlichsten Genotypen analysiert werden. Vielversprechende Substanzen könnten so vorselektiert werden, bevor die klinische Überprüfung vorangetrieben wird. Im Anschluss an die ICM könnten die Gewebeproben zu Organoiden kultiviert werden, um ggf. die Wirksamkeit neuerer Modulatoren zu überprüfen.

Auch vor Therapiebeginn mit einem CFTR-Modulator kann die ICM dabei helfen, im Sinne einer Stratifizierung der Therapie die geeignete Substanz auszuwählen. So könnten mittels ICM non-responder bei variablem klinischem Ansprechen auf eine Modulatortherapie identifiziert werden. Voraussetzung für dieses Vorgehen sind weitere Untersuchungen, die belegen, dass ein Nicht-Ansprechen ex vivo in der ICM auch einem klinischen Nicht-Ansprechen auf eine Modulatortherapie entspricht.

Es ist davon auszugehen, dass für manche Mutationen wie F508del in Zukunft mehrere Korrektoren zur Verfügung stehen werden. Entsprechend stellt die Auswahl des individuell wirksamsten Modulators den behandelnden Arzt vor ein großes Problem. Mittels ICM kann unmittelbar am nativen Gewebe die Wirksamkeit verschiedener Modulatoren verglichen werden. Die Ergebnisse können so direkt in die Therapieentscheidung einfließen. Auch bei Patienten mit sehr seltenen Mutationen könnte mittels ICM ex vivo ein mögliches Ansprechen auf vorhandene CFTR-Modulatoren überprüft werden.

Etwa die Hälfte aller CF-Patienten weist 2 verschiedene Mutationen auf. Diese Patienten werden vermutlich von Kombinationstherapien profitieren, die beide Mutationen ansprechen (De Boeck und Davies 2017). Die Umsetzung eines entsprechenden Studiendesigns dürfte sich allerdings schwierig gestalten, insbesondere, wenn die in Frage kommenden CFTR-Modulatoren von verschiedenen Herstellern stammen. Mittels ICM können Korrektorkombinationen für jeden Genotyp individuell ex vivo untersucht werden, um so eine für den einzelnen Patienten geeignete Therapie im Sinne der personalisierten Medizin auszumachen. Dabei ist erneut hervorzuheben, dass die Methode aufgrund ihrer geringen Kontraindikationen prinzipiell für nahezu alle CF-Patienten geeignet ist und im Gegensatz zur NPD auch bei Säuglingen problemlos durchgeführt werden kann.

5.3.4 Mögliche Studiendesigns zur Untersuchung von CFTR-Modulatoren

Bevor ein CFTR-Modulator durch die FDA bzw. die EMA zur Therapie der CF zugelassen werden kann, muss die Wirksamkeit in klinischen Studien demonstriert werden. Die Wahl eines geeigneten Studiendesigns ist hier essentiell. Dazu muss eine ausreichend große Patientenkohorte rekrutiert werden. Es besteht zunächst wie bei allen seltenen Erkrankungen die Herausforderung, dass weltweit nur eine begrenzte Anzahl an Probanden zur Verfügung steht. Entsprechend muss ein hoher Anteil des gesamten Patientenkollektivs an einer Studie teilnehmen. Die Patientenrekrutierung für die Ivacaftor- und Lumacaftor-Studien gestaltete sich noch sehr einfach, da der neue Therapieansatz Hoffnung und Euphorie auslöste (VanDevanter et al. 2017). Zudem wurden die CFTR-Modulatoren während der Studienteilnahme zusätzlich zur Basistherapie eingenommen, sodass auf keinen Bestandteil der Basistherapie verzichtet werden musste und den Patienten durch die Teilnahme folglich kein Nachteil entstand. Nach der Zulassung der ersten CFTR-Modulatoren begannen immer mehr Patienten eine darauf basierende Dauertherapie. Für weitere klinische Studien mit neuen CFTR-Modulatoren resultiert die Schwierigkeit, dass die meisten Patienten bei guter Wirksamkeit der Modulatortherapie nicht bereit sind, diese für den Zeitraum einer Studienteilnahme zu pausieren (Lommatzsch und Taylor-Cousar 2019). Insbesondere für die Teilnahme an randomisierten placebokontrollierten Studien (RCT) ist die Bereitschaft eher gering (VanDevanter et al. 2017). Eine Alternative zu RCT stellt die aktive Vergleichsstudie dar, allerdings wird bei diesem Studiendesign bereits zur alleinigen Demonstration einer Nicht-Unterlegenheit eine wesentlich größere Probandenzahl benötigt (VanDevanter und Mayer-Hamblett 2017). Immer weniger Patienten weisen außerdem eine Lungenfunktion in dem üblicherweise für Studien definierten Bereich auf, mit höherer FEV1 muss jedoch wiederum eine größere Verbesserung in Studien gezeigt werden, um eine statistische Signifikanz zu erreichen (Stanojevic und Ratjen 2016). Eine ausreichend hohe Teilnehmerzahl zu erreichen wird auch dadurch zunehmend schwieriger, dass viele Studien parallel durchgeführt werden. Diesem Problem lässt sich nur damit begegnen, indem Studiendesigns mit einer kurzen Dauer angewendet werden. Dazu wiederum müssen Endpunkte festgelegt werden, die schnell auf eine Therapie ansprechen. Biomarker könnten hier vermehrt zum Einsatz kommen. Die ICM stellt dabei eine mögliche Option dar. Die geringe

Variabilität insbesondere der CFTR-Funktion bei CF-Patienten und gute Reproduzierbarkeit konnten im Rahmen dieser Arbeit veranschaulicht werden. Die gute und rasche Therapieresponsivität wurde bereits mehrfach demonstriert (Graeber et al 2015, Graeber et al 2018, Pinders-Keßler, bisher nicht veröffentlicht). Ein weiterer Vorteil der ICM ist, dass aufgrund des raschen Zellumsatzes der Rektumschleimhaut keine langen Washout-Perioden eingehalten werden müssen. Aufgrund des relativen Zeitaufwandes der ICM und der Verfügbarkeit an wenigen Zentren eignet sich die ICM insbesondere in frühen Studienphasen (Phase II), um so die Wirksamkeit eines CFTR-Modulators zu zeigen.

Eine weitere Herausforderung in der Entwicklung von CFTR-Modulatoren für alle CF-Patienten stellt die große Anzahl möglicher Genotypen dar. Schätzungsweise existieren mehr als 1200 Mutationen, die nur 5 Patienten oder weniger weltweit tragen. Dieser Tatbestand hatte zur Folge, dass die FDA in vitro-Daten von FRT- und HBE-Zellen als Zulassungsgrundlage für seltene Mutationen akzeptierte (Durmowicz et al. 2018). Problematisch ist jedoch, dass bereits für Lumacaftor und Ivacaftor große Unterschiede in der Therapieresponsivität in vitro und in vivo beobachtet werden konnten (Matthes et al. 2018, Boyle et al. 2014, Hanrahan et al. 2017). Hier bietet die ICM als ex vivo-Untersuchung möglicherweise eine sinnvolle Ergänzung. Für seltene Mutationen stellen Einzelstudien einen praktikablen Ansatz dar, dabei dient jeder Patient gleichzeitig als Proband und Kontrolle. Voraussetzung ist ein schnell ansprechender Outcome-Parameter. (McGarry et al. 2017) An dieser Stelle könnte dann die ICM angewendet werden. Um den Einsatz der ICM in klinischen Studien zu etablieren, sind jedoch weitere Daten erforderlich, die eine Korrelation zwischen der (kurzfristigen) Verbesserung der CFTR-Funktion und dem (Langzeit-) Outcome der Patienten gemessen an der Lungenfunktion, Lebensqualität und Überlebenszeit zeigen.

5.4 Vorteile und Limitierungen der Studie

Es wurde eine akzeptable Anzahl gesunder Probanden als Kontrollgruppe eingeschlossen. Die mittlere CFTR-Funktion der inkubierten Biopsien entsprach dabei der mittleren CFTR-Funktion aller Biopsien der Kohorte. Allerdings ist aufgrund der deutlichen interindividuellen Variabilität der CFTR-Funktion und der vielen Schweißtestergebnisse im Graubereich von 30-59 mmol/l nicht auszuschließen, dass auch heterozygote Träger einer CFTR-Mutation in diese Gruppe eingeschlossen wurden. Bei diesen nimmt man je nach Mutation einen CFTR-Funktionsverlust von bis zu 50% an. Entsprechend könnte dann der errechnete Effekt der CFTR-Modulatoren zu hoch kalkuliert sein.

Auch in der Gruppe der F508del homozygoten Patienten wurde eine akzeptable Anzahl an Probanden und Biopsien eingeschlossen. In einigen Patientengruppen (etwa mit Klasse I- oder Klasse IV/V-Mutation) konnte dagegen eine nur sehr kleine Patientenzahl mit wenigen Biopsien untersucht werden. Die Ursache liegt darin, dass diese Mutationen eher selten auftreten. Da die Patienten lediglich aus dem lokalen CF-Zentrum rekrutiert wurden, standen entsprechend wenige Probanden zur Verfügung. Von diesen wenigen Probanden konnten nicht immer alle Untersuchungsergebnisse in die finale Auswertung einfließen, da die Biopsien insbesondere von CF-Patienten mitunter im Sinne eines zu geringen Gewebewiderstandes keine ausreichende Qualität aufwiesen. Unser Studienprotokoll sah die Entnahme von Saugbiopsien vor. Alternativ könnten Zangenbiopsien entnommen werden, die in der Regel etwas größer ausfallen. Dazu ist allerdings eine retrograde Darmreinigung sowie eine Kooperation mit einer Abteilung für Gastroenterologie erforderlich, welche die Logistik der Probenentnahme häufig erschwert. Zangenbiopsien weisen tendenziell einen etwas größeren Gewebewiderstand auf (Clancy et al. 2013), sodass die Anzahl der auswertbaren Messungen gesteigert werden könnte.

Bei der Inkubation der Rektumschleimhautbiopsien mit CFTR-Modulatoren wurde eine Inkubationsdauer von 16 Stunden gewählt, da die Biopsien für insgesamt ca. 24 Stunden vital bleiben. Die Inkubation der Biopsien der Kontrollgruppe zeigte eine bereits nachlassende, aber noch reproduzierbare Stimulierbarkeit des Gewebes nach Inkubation. Der Korrektoreffekt erreicht aufgrund der erforderlichen Proteinbiosynthese jedoch erst nach etwa 24 Stunden sein volles Ausmaß, sodass dieses mithilfe der Methode aufgrund der zeitlichen Begrenzung nicht erfasst werden kann.

Durch die Untersuchung verschiedener Korrektoren in unterschiedlichen Konzentrationen konnte die Wirksamkeit von Korrektoren dennoch recht differenziert gezeigt werden, die Ergebnisse spiegeln weitestgehend die erzielten Effekte in klinischen Studien wider. Ivacaftor wurde als einziger Potentiator untersucht. Die Monotherapie wurde nur bei einer kleinen Anzahl von Biopsien mit einer Klasse IV- oder V-Mutation betrachtet. Daher kann noch keine abschließende Aussage über die Möglichkeit der ex vivo-Evaluation von CFTR-Potentiators mittels ICM getroffen werden. In der Kombinationstherapie mit Lumacaftor wurden vermutlich zu hohe Konzentrationen von Ivacaftor genutzt, sodass anhand unserer Ergebnisse aktuell auch keine Aussage über die Evaluationsmöglichkeit von Kombinationen aus Korrektoren und Potentiators mittels ICM getroffen werden kann. Dazu sind weitere Untersuchungen erforderlich. Gleiches gilt, um die Eignung der ICM zur Evaluation von Amplifiern zu beurteilen.

Um die Eignung der ICM für den Einsatz in klinischen Studien sowie die präklinische Untersuchung der individuellen Modulatorwirksamkeit bestimmen zu können, sind weitere Daten erforderlich, die den klinischen Langzeiteffekt sowie die ex vivo-Wirkung individuell miteinander korrelieren.

6 Zusammenfassung

Die ICM ist eine sehr sensitive Methode, um eine CFTR-Restfunktion zu detektieren. Aufgrund der ausgezeichneten diskriminativen Validität zur Unterscheidung von CF und non-CF fand die Methode insbesondere bei schwieriger Diagnosestellung Eingang in den Diagnosealgorithmus der internationalen Fachgesellschaften (Farrell et al. 2017). Auch die direkte Korrelation zwischen der intestinalen CFTR-Funktion und dem CF-Genotyp sowie -Phänotyp konnte bereits gezeigt werden (Hirtz et al. 2004). Daraus leitet sich ab, dass mittels ICM eine klinisch bedeutsame Verbesserung der CFTR-Funktion durch Modulatoren gezeigt werden kann. Bisher wurde die ICM im Gegensatz zu den anderen CFTR-Biomarkern Schweißtest und NPD jedoch nicht als Endpunkt in klinischen Studien untersucht. Ein Grund dafür kann die unzureichende Datenlage bezüglich Variabilität und Reproduzierbarkeit sein.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine repräsentative Gruppe von CF-Patienten (n = 36) und gesunden Kontrollprobanden (n = 14) mit einer überzeugenden Gesamtmenge an Rektumschleimhautbiopsien untersucht (n = 431), um die geringe intra-individuelle Variabilität insbesondere bei CF-Patienten und die hohe Reproduzierbarkeit der ICM nach der ECFS ICM SOP zu demonstrieren. Daraus folgt, dass die ICM als Biomarker geeignet ist, um die CFTR-Funktion im Rahmen klinischer Studien nachzuvollziehen und so die Wirksamkeit von CFTR-Modulatoren aufzuzeigen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um eine Korrelation zwischen der Wirkung auf die intestinale CFTR-Funktion und dem klinischen Outcome nachzuweisen, welche an etablierten Surrogatparametern und dem Langzeitüberleben gemessen werden.

Obwohl bereits mehrfach experimentelle CFTR-Modulatoren mittels ICM untersucht wurden (Roth et al. 2011, Derichs et al. 2011), fand die Methode bisher keine Anwendung in einem präklinischen Stadium. Stattdessen kamen bisher andere Modelle wie Zellkulturen aus FRT- und HBE-Zellen sowie Organoide mit unterschiedlichen Mutationen zum Einsatz, um den Medikamenteneffekt präklinisch zu untersuchen. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Zellkulturen auf natives humanes Gewebe bleibt jedoch immer in letzten Zügen fraglich. Die ICM dagegen wird an nativem humanem Gewebe durchgeführt. Die Rektumschleimhautbiopsien werden direkt von CF-Patienten entnommen. Daraus folgt, dass die Ergebnisse der ICM möglicherweise besser das klinische

Outcome widerspiegeln. Außerdem können mittels ICM relativ einfach mehrere Patienten mit der gleichen Mutation betrachtet werden. Auf diese Weise könnte das Phänomen möglicher responder und non-responder bereits in einem frühen Stadium der Medikamentenentwicklung erkannt werden. Zudem können auch Rektumschleimhautbiopsien von Patienten mit unterschiedlichen Mutationen ohne großen Mehraufwand untersucht werden, wodurch die ICM als Methode zur Entwicklung einer mutationsspezifischen bzw. personalisierten CF-Therapie dienen kann.

Ein Nachteil der ICM besteht darin, dass die Zellen nicht kultiviert werden und entsprechend sofort untersucht werden müssen. Die Methode ist jedoch sehr sicher. Kontraindikation bestehen lediglich in Hämorrhoiden und Blutungsstörungen, welche nur selten vorliegen. Entsprechend sind die meisten CF-Patienten für eine ICM geeignet, insbesondere Altersbeschränkungen bestehen nicht.

Im Rahmen dieser Studie wurde zunächst eine angemessene Anzahl gesunder Kontrollen untersucht, um Referenzwerte für die CFTR-Funktion vor und nach Inkubation zu erheben. Zudem wurden Patienten mit verschiedenen CFTR-Mutationen passend zu den untersuchten CFTR-Modulatoren eingeschlossen. In der Gruppe der F508del homozygoten Patienten wurde eine repräsentative Anzahl an Patienten und Biopsien erreicht. Die Gruppe der Patienten mit einer Klasse I-Mutation war verhältnismäßig klein, dennoch scheinen die Ergebnisse der ex vivo-Untersuchungen die der in vivo-Behandlung zu reflektieren. Schlussendlich wurde die Entwicklung von Ataluren abgebrochen, weil die Endpunkte in den klinischen Studien nicht erreicht wurden. In der Gruppe der Patienten mit einer Klasse IV- oder V-Mutation ist es sehr schwierig, eine ausreichende Patientenzahl zu erreichen, da diese Mutationen allesamt selten auftreten. Dennoch könnte die ICM hilfreich sein, um weitere Mutationsträger als mögliche Zielgruppen für CFTR-Modulatoren zu identifizieren.

In dem in dieser Arbeit genutzten ex vivo-Modell verbesserte keiner der untersuchten CFTR-Modulatoren die intestinale CFTR-Funktion statistisch signifikant. Zur Untersuchung der Kombination aus Lumacaftor und Ivacaftor bei F508del homozygoten Patienten, die in der klinischen Studie eine geringe, jedoch signifikante Verbesserung der Lungenfunktion erreichte, wurde allerdings vermutlich eine zu hohe Ivacaftor-Dosis genutzt, die Lumacaftor inhibierte. Lumacaftor allein verbesserte die CFTR-Funktion um 10,9 %. Deshalb kann angenommen werden, dass die für einen klinischen Nutzen erforderliche Verbesserung der CFTR-Funktion darüber liegen muss.

Um die Frage zu beantworten, wie viel Verbesserung der intestinalen CFTR-Funktion für einen klinischen Vorteil notwendig ist, sind weitere Untersuchungen erforderlich, die ex vivo-Effekte von CFTR-Modulatoren und klinisches Outcome vergleichen.

Die ICM ist eine nützliche Methode, um die Wirksamkeit eines CFTR-Modulators in der präklinischen Phase vorherzusagen. Da natives Gewebe von CF-Patienten als Untersuchungsmaterial verwendet wird, könnten responder- und non-responder bereits präklinisch identifiziert werden. Auf diese Weise könnte die ICM als wichtige Methode der individualisierten Medizin dienen. Natürlich sind weitere Untersuchungen zur Korrelation von präklinischem ex vivo-Effekt und in vivo-Medikamentenwirkung erforderlich, um schließlich den Einsatz der ICM in der präklinischen Medikamentenentwicklung zu etablieren.

Literaturverzeichnis

Accurso, Frank J.; Rowe, Steven M.; Clancy, J. P.; Boyle, Michael P.; Dunitz, Jordan M.; Durie, Peter R.; Sagel, Scott D.; Hornick, Douglas B.; Konstan, Michael W.; Donaldson, Scott H.; Moss, Richard B.; Pilewski, Joseph M.; Rubenstein, Ronald C.; Uluer, Ahmet Z.; Aitken, Moira L.; Freedman, Steven D.; Rose, Lynn M.; Mayer-Hamblett, Nicole; Dong, Qunming; Zha, JiuHong; Stone, Anne J.; Olson, Eric R.; Ordoñez, Claudia L.; Campbell, Preston W.; Ashlock, Melissa A.; Ramsey, Bonnie W. (2010): Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation, in: *The New England journal of medicine*, Jg. 363, Nr. 21, Seite 1991–2003.

Aitken, Moira L.; Bellon, Gabriel; De Boeck, Kris; Flume, Patrick A.; Fox, Howard G.; Geller, David E.; Haarman, Eric G.; Hebestreit, Helge U.; Lapey, Allen; Schou, I. Manjula; Zuckerman, Jonathan B.; Charlton, Brett (2012): Long-term inhaled dry powder mannitol in cystic fibrosis: an international randomized study, in: *American journal of respiratory and critical care medicine*, Jg. 185, Nr. 6, Seite 645–652.

Andersen, Dorothy H. (1938): Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease, in: *American Journal of Diseases of Children*, Jg. 56, Nr. 2, Seite 344.

Becq, Frédéric; Mall, Marcus A.; Sheppard, David N.; Conese, Massimo; Zegarra-Moran, Olga (2011): Pharmacological therapy for cystic fibrosis: From bench to bedside, in: *Journal of Cystic Fibrosis*, Jg. 10, Seite S129–S145.

Beekman, Jeffrey M.; Sermet-Gaudelus, Isabelle; De Boeck, Kris; Gonska, Tanja; Derichs, Nico; Mall, Marcus A.; Mehta, Anil; Martin, Ulrich; Drumm, Mitch; Amaral, Margarida D. (2014): CFTR functional measurements in human models for diagnosis, prognosis and personalized therapy: Report on the pre-conference meeting to the 11th ECFS Basic Science Conference, Malta, 26-29 March 2014, in: *Journal of cystic fibrosis*, Jg. 13, Nr. 4, Seite 363–372.

Beekman, Jeffrey M. (2016): Individualized medicine using intestinal responses to CFTR potentiators and correctors, in: *Pediatric Pulmonology*, Jg. 51, Nr. S44, Seite S23–S34.

Bell, S.; Mall, M. A.; Gutierrez, H.; Macek, M.; Madge, S.; Davies, J. C.; Burgel, P. R.; Tullis, E.; Castañós, C.; Castellani, C.; Byrnes, C. A.; Cathcart, F.; Chotirmall, S. H.; Cosgriff, R.; Eichler, I.; Fajac, I.; Goss, C. H.; Drevinek, P.; Farrell, P. M.; Gravelle, A. M.; Havermans, T.; Mayer-Hamblett, N.; Kashirskaya, N.; Kerem, E.; Mathew, J. L.; McKone, E. F.; Naehrlich, L.; Nasr, S. Z.; Oates, G. R.; O'Neill, C.; Pypops, U.; Raraigh, K. S.; Rowe, S. M.; Southern, K. W.; Sivam, S.; Stephenson, A. L.; Zampoli, M.; Ratjen, F. (2020): The future of cystic fibrosis care: a global perspective, in: *The Lancet Respiratory Medicine Commission*, Jg. 8, Nr. 1, Seite 65–124.

Bland, J. M.; Altman, D. G. (1986): Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, in: *Lancet (London, England)*, Jg. 1, Nr. 8476, Seite 307–310.c

Bock, J. M.; Schien, M.; Fischer, C.; Naehrlich, L.; Kaeding, M.; Guntinas-Lichius, O.; Gerber, A.; Arnold, C.; Mainz, J. G. (2017): Importance to question sinonasal symptoms and to perform rhinoscopy and rhinomanometry in cystic fibrosis patients, in: *Pediatric pulmonology*, Jg. 52, Nr. 2, Seite 167–174.

Bosch, Barbara; De Boeck, Kris (2016): Searching for a cure for cystic fibrosis. A 25-year quest in a nutshell, in: *European journal of pediatrics*, Jg. 175, Nr. 1, Seite 1–8.

Boucher, R. C.; Cotton, C. U.; Gatzky, J. T.; Knowles, M. R.; Yankaskas, J. R. (1988): Evidence for reduced Cl⁻ and increased Na⁺ permeability in cystic fibrosis human primary cell cultures, in: *The Journal of physiology*, Jg. 405, Seite 77–103.

Boucher, R. C. (2004): New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease, in: *The European respiratory journal*, Jg. 23, Nr. 1, Seite 146–158.

Boyle, Michael P.; de Boeck, Kris (2013): A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect, in: *The Lancet. Respiratory medicine*, Jg. 1, Nr. 2, Seite 158–163.

Boyle, Michael P.; Bell, Scott C.; Konstan, Michael W.; McColley, Susanna A.; Rowe, Steven M.; Rietschel, Ernst; Huang, Xiaohong; Waltz, David; Patel, Naimish R.; Rodman, David (2014): A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial, in: *The Lancet Respiratory Medicine*, Jg. 2, Nr. 7, Seite 527–538.

Burkhardt, M.; Wiese, B. (2017): Deutsches Mukoviszidose-Register, in: [online] https://www.muko.info/fileadmin/user_upload/angebote/qualitaetsmanagement/register/berichtsbaende/berichtsband_2016.pdf [01.06.2019].

Caldwell, Ray A.; Boucher, Richard C.; Stutts, M. Jackson (2005): Neutrophil elastase activates near-silent epithelial Na⁺ channels and increases airway epithelial Na⁺ transport, in: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, Jg. 288, Nr. 5, Seite L813–L819.

Castellani, Carlo; Duff, Alistair J. A.; Bell, Scott C.; Heijerman, Harry G. M.; Munck, Anne; Ratjen, Felix; Sermet-Gaudelus, Isabelle; Southern, Kevin W.; Barben, Jurg; Flume, Patrick A.; Hodková, Pavla; Kashirskaya, Nataliya; Kirszenbaum, Maya N.; Madge, Sue; Oxley, Helen; Plant, Barry; Schwarzenberg, Sarah Jane; Smyth, Alan R.; Taccetti, Giovanni; Wagner, Thomas O. F.; Wolfe, Susan P.; Drevinek, Pavel (2018): ECFS best practice guidelines: the 2018 revision, in: *Journal of cystic fibrosis*, Jg. 17, Nr. 2, Seite 153–178.

CFTR Mutation Database, in: [online] <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html> [21.04.2020].

Cholon, Deborah M.; Quinney, Nancy L.; Fulcher, M. Leslie; Esther, Charles R.; Das, Jhuma; Dokholyan, Nikolay V.; Randell, Scott H.; Boucher, Richard C.; Gentsch, Martina (2014): Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of $\Delta F508$ CFTR in cystic fibrosis, in: *Science translational medicine*, Jg. 6, Nr. 246, Seite 246ra96.

Clancy, J. P.; Bebök, Z.; Ruiz, F.; King, C.; Jones, J.; Walker, L.; Greer, H.; Hong, J.; Wing, L.; Macaluso, M.; Lyrene, R.; Sorscher, E. J.; Bedwell, D. M. (2001): Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis, in: *American journal of respiratory and critical care medicine*, Jg. 163, Nr. 7, Seite 1683–1692.

Clancy, J. P.; Rowe, Steven M.; Accurso, Frank J.; Aitken, Moira L.; Amin, Raouf S.; Ashlock, Melissa A.; Ballmann, Manfred; Boyle, Michael P.; Bronsveld, Inez; Campbell, Preston W.; De Boeck, Kris; Donaldson, Scott H.; Dorkin, Henry L.; Dunitz, Jordan M.; Durie, Peter R.; Jain, Manu; Leonard, Anissa; McCoy, Karen S.; Moss, Richard B.; Pilewski, Joseph M.; Rosenbluth, Daniel B.; Rubenstein, Ronald C.; Schechter, Michael S.; Botfield, Martyn; Ordoñez, Claudia L.; Spencer-Green, George T.; Vernillet, Laurent; Wisseh, Steve; Yen, Karl; Konstan, Michael W. (2012): Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation, in: *Thorax*, Jg. 67, Nr. 1, Seite 12–18.

Clancy, John P.; Szczesniak, Rhonda D.; Ashlock, Melissa A.; Ernst, Sarah E.; Fan, Lijuan; Hornick, Douglas B.; Karp, Philip H.; Khan, Umer; Lymp, James; Ostmann, Alicia J.; Rezayat, Amir; Starner, Timothy D.; Sugandha, Shajan P.; Sun, Hongtao; Quinney, Nancy; Donaldson, Scott H.; Rowe, Steven M.; Gabriel, Sherif E. (2013): Multicenter intestinal current measurements in rectal biopsies from CF and non-CF subjects to monitor CFTR function, in: *PLoS one*, Jg. 8, Nr. 9, Seite e73905.

Clancy, John Paul; Cotton, Calvin U.; Donaldson, Scott H.; Solomon, George M.; VanDevanter, Donald R.; Boyle, Michael P.; Gentsch, Martina; Nick, Jerry A.; Illek, Beate; Wallenburg, John C.; Sorscher, Eric J.; Amaral, Margarida D.; Beekman, Jeffrey M.; Naren, Anjaparavanda P.; Bridges, Robert J.; Thomas, Philip J.; Cutting, Garry; Rowe, Steven; Durmowicz, Anthony G.; Mense, Martin; De Boeck, Kris; Skach, William; Penland, Christopher; Joseloff, Elizabeth; Bihler, Hermann; Mahoney, John; Borowitz, Drucy; Tuggle, Katherine L. (2019): CFTR modulator therotyping: Current status, gaps and future directions, in: *Journal of cystic fibrosis*, Jg. 18, Nr. 1, Seite 22–34.

Coakley, Raymond D.; Grubb, Barbara R.; Paradiso, Anthony M.; Gatzky, John T.; Johnson, Larry G.; Kreda, Sylvia M.; O'Neal, Wanda K.; Boucher, Richard C. (2003): Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 100, Nr. 26, Seite 16083–16088.

Cohen, Taylor Sitarik; Prince, Alice (2012): Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome, in: *Nature medicine*, Jg. 18, Nr. 4, Seite 509–519.

Conway, Steven; Balfour-Lynn, Ian M.; Rijcke, Karleen de; Drevinek, Pavel; Foweraker, Juliet; Havermans, Trudy; Heijerman, Harry; Lannefors, Louise; Lindblad, Anders; Macek, Milan; Madge, Sue; Moran, Maeve; Morrison, Lisa; Morton, Alison; Noordhoek, Jacqueliën; Sands, Dorota; Vertommen, Anneke; Peckham, Daniel (2014): European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Framework for the Cystic Fibrosis Centre, in: *Journal of cystic fibrosis*, Jg. 13 Suppl 1, Seite S3-22.

Cutting, Garry R. (2015): Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application, in: *Nature reviews. Genetics*, Jg. 16, Nr. 1, Seite 45–56.

Cystic Fibrosis Foundation: Drug Development Pipeline, in: [online] <https://www.cff.org/Trials/Pipeline> [16.04.2020].

Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry (2018): 2017 Annual Data Report, in: [online] <https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/2017-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf> [01.06.2019].

Davies, Jane; Sheridan, Helen; Bell, Nicholas; Cunningham, Steve; Davis, Stephanie D.; Elborn, J. Stuart; Milla, Carlos E.; Starner, Timothy D.; Weiner, Daniel J.; Lee, Po-Shun; Ratjen, Felix (2013)¹: Assessment of clinical response to ivacaftor with lung clearance index in cystic fibrosis patients with a G551D- CFTR mutation and preserved spirometry: a randomised controlled trial, in: *The Lancet Respiratory Medicine*, Jg. 1, Nr. 8, Seite 630–638.

Davies, Jane C.; Wainwright, Claire E.; Canny, Gerard J.; Chilvers, Mark A.; Howenstine, Michelle S.; Munck, Anne; Mainz, Jochen G.; Rodriguez, Sally; Li, Haihong; Yen, Karl; Ordoñez, Claudia L.; Ahrens, Richard (2013)²: Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation, in: *American journal of respiratory and critical care medicine*, Jg. 187, Nr. 11, Seite 1219–1225.

Davies, Jane C.; Moskowitz, Samuel M.; Brown, Cynthia; Horsley, Alexander; Mall, Marcus A.; McKone, Edward F.; Plant, Barry J.; Prais, Dario; Ramsey, Bonnie W.; Taylor-Cousar, Jennifer L.; Tullis, Elizabeth; Uluer, Ahmet; McKee, Charlotte M.; Robertson, Sarah; Shilling, Rebecca A.; Simard, Christopher; van Goor, Fredrick; Waltz, David; Xuan, Fengjuan; Young, Tim; Rowe, Steven M. (2018): VX-659-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles, in: *The New England journal of medicine*, Jg. 379, Nr. 17, Seite 1599–1611.

Davies, J.C.; Van de Steen, O.; van Koningsbruggen-Rietschel, S.; Drevinek, P.; Derichs, N.; McKone, E.F.; Kanters, D.; Allamassey, L.; Namour, F.; de Kock, H.; Conrath, K. (2019): GLPG1837, a CFTR potentiator, in p.Gly551Asp (G551D)-CF patients: an open-label, single-arm, phase 2a study (SAPHIRA1), in: *Journal of Cystic Fibrosis*, Jg. 18, Nr. 5, Seite 693–699.

De Boeck, K.; Derichs, N.; Fajac, I.; De Jonge, H. R.; Bronsveld, I.; Sermet, I.; Vermeulen, F.; Sheppard, D. N.; Cuppens, H.; Hug, M.; Melotti, P.; Middleton, P. G.; Wilschanski, M. (2011): New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe, in: *Journal of Cystic Fibrosis*, Jg. 10, Seite S53-S66.

De Boeck, K.; Kent, L.; Davies, J.; Derichs, N.; Amaral, M.; Rowe, S. M.; Middleton, P.; De Jonge, H.; Bronsveld, I.; Wilschanski, M.; Melotti, P.; Danner-Boucher, I.; Boerner, S.; Fajac, I.; Southern, K.; Nooijer, R. A. de; Bot, A.; Rijke, Y. de; Wachter, E. de; Leal, T.; Vermeulen, F.; Hug, M. J.; Rault, G.; Nguyen-Khoa, T.; Barreto, C.; Proesmans, M.; Sermet-Gaudelus, I. (2013): CFTR biomarkers: time for promotion to surrogate end-point, in: *The European respiratory journal*, Jg. 41, Nr. 1, Seite 203–216.

De Boeck, Kris; Munck, Anne; Walker, Seth; Faro, Albert; Hiatt, Peter; Gilmartin, Geoffrey; Higgins, Mark (2014): Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation, in: *Journal of cystic fibrosis*, Jg. 13, Nr. 6, Seite 674–680.

De Boeck, Kris; Davies, Jane C. (2017): Where are we with transformational therapies for patients with cystic fibrosis?, in: *Current opinion in pharmacology*, Jg. 34, Seite 70–75.

Debray, Dominique; Kelly, Deirdre; Houwen, Roderick; Strandvik, Birgitta; Colombo, Carla (2011): Best practice guidance for the diagnosis and management of cystic fibrosis-associated liver disease, in: *Journal of Cystic Fibrosis*, Jg. 10, Seite S29–S36.

De Jonge, Hugo R.; Ballmann, Manfred; Veeze, Henk; Bronsveld, Inez; Stanke, Frauke; Tümmler, Burkhard; Sinaasappel, Maarten (2004): Ex vivo CF diagnosis by intestinal current measurements (ICM) in small aperture, circulating Ussing chambers, in: *Journal of cystic fibrosis*, Jg. 3 Suppl 2, Seite 159–163.

Dekkers, Johanna F.; Wiegerinck, Caroline L.; De Jonge, Hugo R.; Bronsveld, Inez; Janssens, Hettie M.; Winter-de Groot, Karin M. de; Brandsma, Arianne M.; Jong, Nienke W. M. de; Bijvelds, Marcel J. C.; Scholte, Bob J.; Nieuwenhuis, Edward E. S.; van den Brink, Stieneke; Clevers, Hans; van der Ent, Cornelis K.; Middendorp, Sabine; Beekman, Jeffrey M. (2013): A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids, in: *Nature medicine*, Jg. 19, Nr. 7, Seite 939–945.

Dekkers, Johanna F.; Berkers, Gitte; Kruisselbrink, Evelien; Vonk, Annelotte; De Jonge, Hugo R.; Janssens, Hettie M.; Bronsveld, Inez; van de Graaf, Eduard A.; Nieuwenhuis, Edward E. S.; Houwen, Roderick H. J.; Vleggaar, Frank P.; Escher, Johanna C.; Rijke, Yolanda B. de; Majoor, Christof J.; Heijerman, Harry G. M.; Winter-de Groot, Karin M. de; Clevers, Hans; van der Ent, Cornelis K.; Beekman, Jeffrey M. (2016): Characterizing responses to CFTR-modulating drugs

using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis, in: *Science translational medicine*, Jg. 8, Nr. 344, Seite 344ra84.

Derichs, Nico; Sanz, Javier; Kanel, Thomas von; Stolpe, Cornelia; Zapf, Antonia; Tümmler, Burkhard; Gallati, Sabina; Ballmann, Manfred (2010): Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data, in: *Thorax*, Jg. 65, Nr. 7, Seite 594–599.

Derichs, N.; d. Tran; Namkung, W.; Finkbeiner, W. E.; Kurth, M. J.; Nielson, D. W.; Verkman, A. S. (2011): Correction of $\Delta F508$ -CFTR in human airway epithelia and ex vivo rectal biopsies by s-cis-locked bithiazole corrector-29 (Abstract), in: *Journal of Cystic Fibrosis*, Jg. 10, Seite S17.

Derichs, Nico (2013): Targeting a genetic defect: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis, in: *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, Jg. 22, Nr. 127, Seite 58–65.

Dequeker, Els; Stuhmann, Manfred; Morris, Michael A.; Casals, Teresa; Castellani, Carlo; Claustres, Mireille; Cuppens, Harry; Des Georges, Marie; Ferec, Claude; Macek, Milan; Pignatti, Pier-Franco; Scheffer, Hans; Schwartz, Marianne; Witt, Michal; Schwarz, Martin; Girodon, Emmanuelle (2009): Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations, in: *European journal of human genetics: EJHG*, Jg. 17, Nr. 1, Seite 51–65.

Dupuis, Annie; Keenan, Katherine; Ooi, Chee Y.; Dorfman, Ruslan; Sontag, Marci K.; Naehrlich, Lutz; Castellani, Carlo; Strug, Lisa J.; Rommens, Johanna M.; Gonska, Tanja (2016): Prevalence of meconium ileus marks the severity of mutations of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene, in: *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, Jg. 18, Nr. 4, Seite 333–340.

Durmowicz, Anthony G.; Witzmann, Kimberly A.; Rosebraugh, Curtis J.; Chowdhury, Badrul A. (2013): Change in sweat chloride as a clinical end point in cystic fibrosis clinical trials: the ivacaftor experience, in: *Chest*, Jg. 143, Nr. 1, Seite 14–18.

Durmowicz, Anthony G.; Lim, Robert; Rogers, Hobart; Rosebraugh, Curtis J.; Chowdhury, Badrul A. (2018): The U.S. Food and Drug Administration's Experience with Ivacaftor in Cystic Fibrosis. Establishing Efficacy Using In Vitro Data in Lieu of a Clinical Trial, in: *Annals of the American Thoracic Society*, Jg. 15, Nr. 1, Seite 1–2.

Eckford, P. D.; Li, C.; Ramjeesingh, M.; Bear, C. E. (2012): Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) potentiator VX-770 (ivacaftor) opens the defective channel gate of mutant CFTR in a phosphorylation-dependent but ATP-independent manner, in: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 44, Nr. 287, Seite 36639–36649.

Elborn, Stuart J. (2016): Cystic fibrosis, in: *Lancet (London, England)*, Jg. 388, Nr. 10059, Seite 2519–2531.

European Cystic Fibrosis Society (ECFS) Diagnostic Network Working Group, ECFS Clinical Trials Network: Ion Transport in Rectal Biopsies for Diagnosis and Clinical Trials in Cystic Fibrosis (Intestinal Current Measurement, ICM), Version 2.7 vom 26.10.2011, per E-Mail anfragbar.

Farrell, Philip M. (2008): The prevalence of cystic fibrosis in the European Union, in: *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, Jg. 7, Nr. 5, Seite 450–453.

Farrell, Philip M.; White, Terry B.; Ren, Clement L.; Hempstead, Sarah E.; Accurso, Frank; Derichs, Nico; Howenstine, Michelle; McColley, Susanna A.; Rock, Michael; Rosenfeld, Margaret; Sermet-Gaudelus, Isabelle; Southern, Kevin W.; Marshall, Bruce C.; Sosnay, Patrick R. (2017): Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation, in: *The Journal of pediatrics*, Jg. 181S, Seite S4–S15.e1.

Fidler, Meredith C.; Beusmans, Jack; Panorchan, Paul; van Goor, Fredrick (2017): Correlation of sweat chloride and percent predicted FEV1 in cystic fibrosis patients treated with ivacaftor, in: *Journal of cystic fibrosis*, Jg. 16, Nr. 1, Seite 41–44.

Flume, Patrick A.; Liou, Theodore G.; Borowitz, Drucy S.; Li, Haihong; Yen, Karl; Ordoñez, Claudia L.; Geller, David E. (2012): Ivacaftor in subjects with cystic fibrosis who are homozygous for the F508del-CFTR mutation, in: *Chest*, Jg. 142, Nr. 3, Seite 718–724.

French, P. J.; Bijman, J.; Bot, A. G.; Boomaars, W. E.; Scholte, B. J.; De Jonge, H. R. (1997): Genistein activates CFTR Cl⁻ channels via a tyrosine kinase- and protein phosphatase-independent mechanism, in: *The American journal of physiology*, Jg. 273, Nr. 2 Pt 1, Seite C747–C753.

Fuchs, H. J.; Borowitz, D. S.; Christiansen, D. H.; Morris, E. M.; Nash, M. L.; Ramsey, B. W.; Rosenstein, B. J.; Smith, A. L.; Wohl, M. E. (1994): Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group, in: *The New England journal of medicine*, Jg. 331, Nr. 10, Seite 637–642.

Gallati, S.; Hartl, D.; Derichs, N.; Schöni, M.H.; Tümmeler, B.; Staab, D.; Junge, S.; Nährlich, L.; Gruber, W.; Mehl, A.; Rolinck-Werninghaus, C.; Kaiser, H.; Ballmann, M.; Mehls, M. (2014): Zystische Fibrose, in: Erika von Mutius, Monika Gappa, Ernst Eber, Urs Frey (Hrsg), *Pädiatrische Pneumologie*, Berlin und Heidelberg: Springer-Verlag, Seite 587–632.

Galiotta, L. V.; Jayaraman, S.; Verkman, A. S. (2001): Cell-based assay for high-throughput quantitative screening of CFTR chloride transport agonists, in: *American journal of physiology. Cell physiology*, Jg. 281, Nr. 5, Seite C1734–C1742.

Gentzsch, Martina; Dang, Hong; Dang, Yan; Garcia-Caballero, Agustin; Suchindran, Hamsa; Boucher, Richard C.; Stutts, M. Jackson (2010): The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator impedes proteolytic stimulation of the epithelial Na⁺ channel, in: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 285, Nr. 42, Seite 32227–32232.

Gentzsch, Martina; Mall, Marcus A. (2018): Ion Channel Modulators in Cystic Fibrosis, in: *Chest*, Jg. 154, Nr. 2, Seite 383–393.

Gibson, L. E.; Cooke, R. E. (1959): A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis, in: *Pediatrics*, Jg. 23, Nr. 3, Seite 545–549.

Giuliano, Kenneth A.; Wachi, Shinichiro; Drew, Lawrence; Dukovski, Danijela; Green, Olivia; Bastos, Cecilia; Cullen, Matthew D.; Hauck, Sheila; Tait, Bradley D.; Munoz, Benito; Lee, Po-Shun; Miller, John Preston (2018): Use of a High-Throughput Phenotypic Screening Strategy to Identify Amplifiers, a Novel Pharmacological Class of Small Molecules That Exhibit Functional Synergy with Potentiators and Correctors, in: *SLAS discovery: advancing life sciences R & D*, Jg. 23, Nr. 2, Seite 111–121.

Graeber, Simon Y.; Hug, Martin J.; Sommerburg, Olaf; Hirtz, Stephanie; Hentschel, Julia; Heinzmann, Andrea; Dopfer, Christian; Schulz, Angela; Mainz, Jochen G.; Tümmler, Burkhard; Mall, Marcus A. (2015): Intestinal Current Measurements Detect Activation of Mutant CFTR in Patients with Cystic Fibrosis with the G551D Mutation Treated with Ivacaftor, in: *American journal of respiratory and critical care medicine*, Jg. 192, Nr. 10, Seite 1252–1255.

Graeber, Simon Y.; Dopfer, Christian; Naehrlich, Lutz; Gyulumyan, Lena; Scheuermann, Heike; Hirtz, Stephanie; Wege, Sabine; Mairbäurl, Heimo; Dorda, Marie; Hyde, Rebecca; Bagheri-Hanson, Azadeh; Rueckes-Nilges, Claudia; Fischer, Sebastian; Mall, Marcus A.; Tümmler, Burkhard (2018): Effects of Lumacaftor-Ivacaftor Therapy on Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function in Phe508del Homozygous Patients with Cystic Fibrosis, in: *American journal of respiratory and critical care medicine*, Jg. 197, Nr. 11, Seite 1433–1442.

Hanrahan, John W.; Matthes, Elizabeth; Carlile, Graeme; Thomas, David Y. (2017): Corrector combination therapies for F508del-CFTR, in: *Current opinion in pharmacology*, Jg. 34, Seite 105–111.

Hebestreit, H., Hebestreit, A. (2019): Zystische Fibrose, in: Christian P. Speer, Manfred Gahr, Jörg Dötsch (Hrsg.), *Pädiatrie*, Springer-Verlag, Seite 445–450.

Heijerman, HGM; McKone, EF; Downey, DG; Van Braeckel, E; Rowe, SM; Tullis, E; Mall, MA; Welter, JJ; Ramsey, BW; McKee, CM; Marigowda, G; Moskowitz, SM; Waltz, D; Sosnay, PR; Simard, C; Ahluwalia, N; Xuan, F; Zhang, Y; Taylor-Cousar, JL; McCoy, KS; VX17-445-103 Trial Group (2019): Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial, in: *Lancet*, Jg. 394, Nr. 10212, Seite 1940–1948.

Hirtz, Stephanie; Gonska, Tanja; Seydewitz, Hans H.; Thomas, Jörg; Greiner, Peter; Kuehr, Joachim; Brandis, Matthias; Eichler, Irmgard; Rocha, Herculano; Lopes, Ana-Isabel; Barreto, Celeste; Ramalho, Anabela; Amaral, Margarida D.; Kunzelmann, Karl; Mall, Marcus (2004): CFTR Cl⁻ channel function in native human colon correlates with the genotype and phenotype in cystic fibrosis, in: *Gastroenterology*, Jg. 127, Nr. 4, Seite 1085–1095.

Hoegger, Mark J.; Fischer, Anthony J.; McMenimen, James D.; Ostedgaard, Lynda S.; Tucker, Alex J.; Awadalla, Maged A.; Moninger, Thomas O.; Michalski, Andrew S.; Hoffman, Eric A.; Zabner, Joseph; Stoltz, David A.; Welsh, Michael J. (2014): Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis, in: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 345, Nr. 6198, Seite 818–822.

Hug, Martin J.; Derichs, Nico; Bronsveld, Inez; Clancy, Jean Paul (2011): Measurement of ion transport function in rectal biopsies, in: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, Jg. 741, Seite 87–107.

Jones, Ashley P.; Wallis, Colin (2010): Dornase alfa for cystic fibrosis, in: *The Cochrane database of systematic reviews*, Nr. 3, Seite CD001127.

Kalderon, A. E.; Dobbs, J. W.; Greenberg, M. L. (1980): Localization of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase (cAMP-PDEase) activity in isolated bovine thyroid plasma membranes, in: *Histochemistry*, Jg. 65, Nr. 3, Seite 277–289.

Kalid, Ori; Mense, Martin; Fischman, Sharon; Shitrit, Alina; Bihler, Hermann; Ben-Zeev, Efrat; Schutz, Nili; Pedemonte, Nicoletta; Thomas, Philip J.; Bridges, Robert J.; Wetmore, Diana R.;

Marantz, Yael; Senderowitz, Hanoch (2010): Small molecule correctors of F508del-CFTR discovered by structure-based virtual screening, in: *Journal of computer-aided molecular design*, Jg. 24, Nr. 12, Seite 971–991.

Keating, Dominic; Marigowda, Gautham; Burr, Lucy; Daines, Cori; Mall, Marcus A.; McKone, Edward F.; Ramsey, Bonnie W.; Rowe, Steven M.; Sass, Laura A.; Tullis, Elizabeth; McKee, Charlotte M.; Moskowitz, Samuel M.; Robertson, Sarah; Savage, Jessica; Simard, Christopher; van Goor, Fredrick; Waltz, David; Xuan, Fengjuan; Young, Tim; Taylor-Cousar, Jennifer L. (2018): VX-445-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles, in: *The New England journal of medicine*, Jg. 379, Nr. 17, Seite 1612–1620.

Kerem, B.; Rommens, J. M.; Buchanan, J. A.; Markiewicz, D.; Cox, T. K.; Chakravarti, A.; Buchwald, M.; Tsui, L. C. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis, in: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 245, Nr. 4922, Seite 1073–1080.

Kerem, Eitan; Konstan, Michael W.; De Boeck, Kris; Accurso, Frank J.; Sermet-Gaudelus, Isabelle; Wilschanski, Michael; Elborn, J. Stuart; Melotti, Paola; Bronsveld, Inez; Fajac, Isabelle; Malfroot, Anne; Rosenbluth, Daniel B.; Walker, Patricia A.; McColley, Susanna A.; Knoop, Christiane; Quattrucci, Serena; Rietschel, Ernst; Zeitlin, Pamela L.; Barth, Jay; Elfring, Gary L.; Welch, Ellen M.; Branstrom, Arthur; Spiegel, Robert J.; Peltz, Stuart W.; Ajayi, Temitayo; Rowe, Steven M. (2014): Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial, in: *The Lancet Respiratory Medicine*, Jg. 2, Nr. 7, Seite 539–547.

Kirk, Kevin L.; Dawson, David C. (2003): *The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, Springer-Verlag.

Knowles, M.; Gatzky, J.; Boucher, R. (1981): Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis, in: *The New England journal of medicine*, Jg. 305, Nr. 25, Seite 1489–1495.

Konstan, Michael W.; Wagener, Jeffrey S.; Pasta, David J.; Millar, Stefanie J.; Jacobs, Joan R.; Yegin, Ashley; Morgan, Wayne J. (2011): Clinical use of dornase alpha is associated with a slower rate of FEV1 decline in cystic fibrosis, in: *Pediatric pulmonology*, Jg. 46, Nr. 6, Seite 545–553.

Konstan, Michael W.; McKone, Edward F.; Moss, Richard B.; Marigowda, Gautham; Tian, Simon; Waltz, David; Huang, Xiaohong; Lubarsky, Barry; Rubin, Jaime; Millar, Stefanie J.; Pasta, David J.; Mayer-Hamblett, Nicole; Goss, Christopher H.; Morgan, Wayne; Sawicki, Gregory S. (2017): Assessment of safety and efficacy of long-term treatment with combination lumacaftor and ivacaftor therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation (PROGRESS): a phase 3, extension study, in: *The Lancet Respiratory Medicine*, Jg. 5, Nr. 2, Seite 107–118.

Konstan, M. W.; VanDevanter, D. R.; Rowe, S. M.; Wilschanski, M.; Kerem, E.; Sermet-Gaudelus, I.; DiMango, E.; Melotti, P; McIntosh J.; De Boeck, K; ACT CF Study Group (2020): Efficacy and safety of ataluren in patients with nonsense-mutation cystic fibrosis not receiving chronic inhaled aminoglycosides: The international, randomized, double-blind, placebo-controlled Ataluren Confirmatory Trial in Cystic Fibrosis (ACT CF), in: *Journal of Cystic Fibrosis*, Jg. 19, Nr. 4, Seite 595–601.

Kunzelmann, Karl; Mall, Marcus (2002): Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease, in: *Physiological reviews*, Jg. 82, Nr. 1, Seite 245–289.

Lommatzsch, Sherstin T.; Taylor-Cousar, Jennifer L. (2019): The combination of tezacaftor and ivacaftor in the treatment of patients with cystic fibrosis: clinical evidence and future prospects in cystic fibrosis therapy, in: *Therapeutic advances in respiratory disease*, Jg. 13, Seite 1753466619844424.

Lowe, C. U.; May, C. D.; Reed, S. C. (1949): Fibrosis of the pancreas in infants and children; a statistical study of clinical and hereditary features, in: *American Journal of Diseases of Children*, Jg. 78, Nr. 3, Seite 349–374.

Mall, M.; Bleich, M.; Greger, R.; Schreiber, R.; Kunzelmann, K. (1998)¹: The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways, in: *The Journal of clinical investigation*, Jg. 102, Nr. 1, Seite 15–21.

Mall, M.; Bleich, M.; Schürlein, M.; Kühr, J.; Seydewitz, H. H.; Brandis, M.; Greger, R.; Kunzelmann, K. (1998)²: Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivation by cAMP, in: *The American journal of physiology*, Jg. 275, Nr. 6, Seite G1274–G1281.

Mall, M.; Wissner, A.; Seydewitz, H. H.; Kuehr, J.; Brandis, M.; Greger, R.; Kunzelmann, K. (2000): Defective cholinergic Cl⁻ secretion and detection of K⁺ secretion in rectal biopsies from cystic fibrosis patients, in: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, Jg. 278, Nr. 4, Seite G617–G624.

Mall, Marcus; Hirtz, Stephanie; Gonska, Tanja; Kunzelmann, Karl (2004): Assessment of CFTR function in rectal biopsies for the diagnosis of cystic fibrosis, in: *Journal of cystic fibrosis*, Jg. 3 Suppl 2, Seite 165–169.

Mall, M.A. (2014): CFTR-Funktionsdiagnostik, in: Erika von Mutius, Monika Gappa, Ernst Eber, Urs Frey (Hrsg), *Pädiatrische Pneumologie*, Berlin und Heidelberg: Springer-Verlag, Seite 307–312.

Mall, Marcus A.; Hartl, Dominik (2014): CFTR: cystic fibrosis and beyond, in: *The European respiratory journal*, Jg. 44, Nr. 4, Seite 1042–1054.

Masson, Alexandra; Schneider-Futschik, Elena K.; Baatallah, Nesrine; Nguyen-Khoa, Thao; Girodon, Emmanuelle; Hatton, Aurélie; Flament, Thomas; Le Bourgeois, Muriel; Chedevergne, Frederique; Bailly, Céline; Kyrilli, Sylvia; Achimastos, Diane; Hinzpeter, Alexandre; Edelman, Aleksander; Sermet-Gaudelus, Isabelle (2018): Predictive factors for lumacaftor/ivacaftor clinical response, in: *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, Jg. 18, Nr. 3, Seite 368–374.

Matthes, Elizabeth; Goepf, Julie; Carlile, Graeme W.; Luo, Yishan; Dejgaard, Kurt; Billet, Arnaud; Robert, Renaud; Thomas, David Y.; Hanrahan, John W. (2016): Low free drug concentration prevents inhibition of F508del CFTR functional expression by the potentiator VX-770 (ivacaftor), in: *British journal of pharmacology*, Jg. 173, Nr. 3, Seite 459–470.

Matthes, Elizabeth; Goepf, Julie; Martini, Carolina; Shan, Jiajie; Liao, Jie; Thomas, David Y.; Hanrahan, John W. (2018): Variable Responses to CFTR Correctors in vitro: Estimating the Design Effect in Precision Medicine, in: *Frontiers in pharmacology*, Jg. 9, Seite 1490.

McGarry, Meghan E.; Illek, Beate; Ly, Ngoc P.; Zlock, Lorna; Olshansky, Sabrina; Moreno, Courtney; Finkbeiner, Walter E.; Nielson, Dennis W. (2017): In vivo and in vitro ivacaftor response in cystic fibrosis patients with residual CFTR function: N-of-1 studies, in: *Pediatric Pulmonology*, Jg. 52, Nr. 4, Seite 472–479.

McKone, Edward F.; Borowitz, Drucy; Drevinek, Pavel; Griese, Matthias; Konstan, Michael W.; Wainwright, Claire; Ratjen, Felix; Sermet-Gaudelus, Isabelle; Plant, Barry; Munck, Anne; Jiang, Ying; Gilmartin, Geoffrey; Davies, Jane C. (2014): Long-term safety and efficacy of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have the Gly551Asp- CFTR mutation: a phase 3, open-label extension study (PERSIST), in: *The Lancet Respiratory Medicine*, Jg. 2, Nr. 11, Seite 902–910.

Mesbahi, Myriam; Shteinberg, Michal; Wilschanski, Michael; Hatton, Aurelie; Nguyen-Khoa, Thao; Friedman, Hannah; Cohen, Michael; Escabasse, Virginie; Le Bourgeois, Muriel; Lucidi, Vicenzina; Sermet-Gaudelus, Isabelle; Bassinet, Laurence; Livnat, Galit (2017): Changes of CFTR functional measurements and clinical improvements in cystic fibrosis patients with non p.Gly551Asp gating mutations treated with ivacaftor, in: *Journal of cystic fibrosis*, Jg. 16, Nr. 1, Seite 45–48.

Middleton, PG; Mall, MA; Dřevínek, P; Lands, LC; McKone, EF; Polineni, D; Ramsey, BW; Taylor-Cousar, JL; Tullis, E; Vermeulen, F; Marigowda, G; McKee, CM; Moskowitz, SM; Nair, N; Savage, J; Simard, C; Tian, S; Waltz, D; Xuan, F; Rowe, SM; Jain, R; VX17-445-102 Study Group (2019): Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele, in: *New England Journal of Medicine*, Jg. 381, Nr. 19, Seite 1809–1819.

Moran, Oscar; Zegarra-Moran, Olga (2005): A quantitative description of the activation and inhibition of CFTR by potentiators: Genistein, in: *FEBS letters*, Jg. 579, Nr. 18, Seite 3979–3983.

Müller, F.-M.; Bend, J.; Huttegger, I.; Möller, A.; Schwarz, C.; Abele-Horn, M.; Ballmann, M.; Bargon, J.; Baumann, I.; Bremer, W.; Bruns, R.; Brunsmann, F.; Fischer, R.; Geidel, C.; Hebestreit, H.; Hirche, T. O.; Hogardt, M.; Illing, S.; Koitschev, A.; Kohlhäufl, M.; Mahlberg, R.; Mainz, J. G.; Pfeiffer-Auler, S.; Puderbach, M.; Riedler, J.; Schulte-Hubbert, B.; Sedlacek, L.; Sitter, H.; Smaczny, C.; Staab, D.; Tümmeler, B.; Vonberg, R.-P.; Wagner, T.O.F.; Zerlik, J.; Rietschel, E. (2015): S3-Leitlinie „Lungenerkrankung bei Mukoviszidose“, in: *Monatsschrift Kinderheilkunde*, Jg. 163, Nr. 6, Seite 590–599.

Naehrig, Susanne; Chao, Cho-Ming; Naehrlich, Lutz (2017): Cystic Fibrosis, in: *Deutsches Arzteblatt international*, Jg. 114, Nr. 33-34, Seite 564–574.

Naehrlich, Lutz; Stuhmann-Spangenberg, Manfred; Barben, Jürg; 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. (2013): S2-Konsensus-Leitlinie „Diagnose der Mukoviszidose“ (AWMF 026-023) unter Federführung der Gesellschaft für Pädiatrischen Pneumologie, in: [online] https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/026-023IS_2k_Diagnose_der_Mukoviszidose_2013-07-abgelaufen.pdf [01.06.2019]. (Anmerkung: Die Leitlinie ist abgelaufen und wird derzeit überarbeitet)

Nowakowska, Ewa; Schulz, Tobias; Molenda, Natalia; Schillers, Hermann; Prehm, Peter (2012): Recovery of $\Delta F508$ -CFTR function by analogs of hyaluronan disaccharide, in: *Journal of cellular biochemistry*, Jg. 113, Nr. 1, Seite 156–164.

Orenti, Annalisa; Zolin, Anna; van Rens; Jacqui; Fox, Alice; Iansa, Patrizia; Jung, Andreas; Mei-Zahav, Meir; Cosgriff, Rebecca; Lammertyn, Elisa; Naehrlich, Lutz (2018): ECFSPR Annual Report 2016, in: [online] https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-images/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSPR_Report2016_06062018.pdf [01.06.2019].

O'Sullivan, Brian P.; Freedman, Steven D. (2009): Cystic fibrosis, in: *Lancet* (London, England), Jg. 373, Nr. 9678, Seite 1891–1904.

- Pedemonte**, Nicoletta; Lukacs, Gergely L.; Du, Kai; Caci, Emanuela; Zegarra-Moran, Olga; Galiotta, Luis J. V.; Verkman, A. S. (2005): Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening, in: *The Journal of clinical investigation*, Jg. 115, Nr. 9, Seite 2564–2571.
- Pedemonte**, Nicoletta; Tomati, Valeria; Sondo, Elvira; Galiotta, Luis J. V. (2010): Influence of cell background on pharmacological rescue of mutant CFTR, in: *American journal of physiology. Cell physiology*, Jg. 298, Nr. 4, Seite C866-74.
- Pezzulo**, Alejandro A.; Tang, Xiao Xiao; Hoegger, Mark J.; Abou Alaiwa, Mahmoud H.; Ramachandran, Shyam; Moninger, Thomas O.; Karp, Phillip H.; Wohlford-Lenane, Christine L.; Haagsman, Henk P.; van Eijk, Martin; Bánfi, Botond; Horswill, Alexander R.; Stoltz, David A.; McCray, Paul B.; Welsh, Michael J.; Zabner, Joseph (2012): Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung, in: *Nature*, Jg. 487, Nr. 7405, Seite 109–113.
- Pinders-Keßler**, Lea: CFTR-Funktionsanalyse zur Diagnosestellung und kausalen Therapie bei Zystischer Fibrose - ein Vergleich von Biomarkern, in: Berlin (bisher nicht veröffentlicht).
- PTC Therapeutics** (2017): PTC Therapeutics Announces Results from Pivotal Phase 3 Clinical Trial of Ataluren in Patients Living with Nonsense Mutation Cystic Fibrosis, in: [online] <http://ir.ptcbio.com/static-files/d0251f8e-39f8-4195-b8a0-6eb115c4f108> [11.06.2019].
- Quinton**, Paul M. (2008): Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis, in: *The Lancet*, Jg. 372, Nr. 9636, Seite 415–417.
- Ramsey**, Bonnie W.; Davies, Jane; McElvaney, N. Gerard; Tullis, Elizabeth; Bell, Scott C.; Dřevínek, Pavel; Griese, Matthias; McKone, Edward F.; Wainwright, Claire E.; Konstan, Michael W.; Moss, Richard; Ratjen, Felix; Sermet-Gaudelus, Isabelle; Rowe, Steven M.; Dong, Qunming; Rodriguez, Sally; Yen, Karl; Ordoñez, Claudia; Elborn, J. Stuart (2011): A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation, in: *The New England journal of medicine*, Jg. 365, Nr. 18, Seite 1663–1672.
- Ratjen**, Felix; Hug, Christopher; Marigowda, Gautham; Tian, Simon; Huang, Xiaohong; Stanovevic, Sanja; Milla, Carlos E.; Robinson, Paul D.; Waltz, David; Davies, Jane C.; Rosenfeld, Margaret; Starnes, Timothy; Retsch-Bogart, George; Chmiel, James; Orenstein, David; Milla, Carlos; Rubenstein, Ronald; Walker, Seth; Cornell, Alexandra; Asfour, Fadi; Black, Philip; Colombo, John; Froh, Deborah; McColley, Susanna; Ruiz, Fadel; Quintero, Diana; Casey, Alicia; Mueller, Gary; Flume, Patrick; Livingston, Floyd; Rock, Michael; O'Sullivan, Brian; Schmidt, Howard; Lahiri, Thomas; McNamara, John; Chidekel, Aaron; Sass, Laura; Keens, Thomas; Schaeffer, David; Solomon, Melinda; Chilvers, Mark; Lands, Larry; Junge, Sibylle; Griese, Matthias; Staab, Doris; Pressler, Tacjana; van Koningsburggen-Rietschel, Silke; Naehrlich, Lutz; Reid, Alastair; Balfour-Lynn, Ian; Urquhart, Don; Lee, Timothy; Munck, Anne; Gaudelus, Isabelle Sermet; De Boeck, Christiane; Reix, Philippe; Malfroot, Anne; Bui, Stéphanie; Selvadurai, Hiranjan; Robinson, Philip; Wainwright, Claire; Clements, Barry; Hilton, Jodi; Hjelte, Lena (2017): Efficacy and safety of lumacaftor and ivacaftor in patients aged 6–11 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR : a randomised, placebo-controlled phase 3 trial, in: *The Lancet Respiratory Medicine*, Jg. 5, Nr. 7, Seite 557–567.
- Ren**, H.Y.; Grove, D.E.; De La Rosa, O.; Houck, S.A.; Sopha, P.; Van Goor, F.; Hoffman, B.J.; Cyr, D.M. (2013): VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance

regulator protein through action on membrane-spanning domain 1, in: *Molecular Biology of the Cell*, Jg. 24, Nr. 19, Seite 316–324.

Riordan, J. R.; Rommens, J. M.; Kerem, B.; Alon, N.; Rozmahel, R.; Grzelczak, Z.; Zielenski, J.; Lok, S.; Plavsic, N.; Chou, J. L. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA, in: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 245, Nr. 4922, Seite 1066–1073.

Riordan, John R. (2008): CFTR function and prospects for therapy, in: *Annual review of biochemistry*, Jg. 77, Seite 701–726.

Rommens, J. M.; Iannuzzi, M. C.; Kerem, B.; Drumm, M. L.; Melmer, G.; Dean, M.; Rozmahel, R.; Cole, J. L.; Kennedy, D.; Hidaka, N. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping, in: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 245, Nr. 4922, Seite 1059–1065.

Roth, Eva K.; Hirtz, Stephanie; Duerr, Julia; Wenning, Daniel; Eichler, Irmgard; Seydewitz, Hans H.; Amaral, Margarida D.; Mall, Marcus A. (2011): The K⁺ channel opener 1-EBIO potentiates residual function of mutant CFTR in rectal biopsies from cystic fibrosis patients, in: *PLoS one*, Jg. 6, Nr. 8, Seite e24445.

Rowe, Steven M.; Daines, Cori; Ringshausen, Felix C.; Kerem, Eitan; Wilson, John; Tullis, Elizabeth; Nair, Nitin; Simard, Christopher; Han, Linda; Ingenito, Edward P.; McKee, Charlotte; Lekstrom-Himes, Julie; Davies, Jane C. (2017)¹: Tezacaftor-Ivacaftor in Residual-Function Heterozygotes with Cystic Fibrosis, in: *The New England journal of medicine*, Jg. 377, Nr. 21, Seite 2024–2035.

Rowe, Steven M.; McColley, Susanna A.; Rietschel, Ernst; Li, Xiaolei; Bell, Scott C.; Konstan, Michael W.; Marigowda, Gautham; Waltz, David; Boyle, Michael P. (2017)²: Lumacaftor/Ivacaftor Treatment of Patients with Cystic Fibrosis Heterozygous for F508del-CFTR, in: *Annals of the American Thoracic Society*, Jg. 14, Nr. 2, Seite 213–219.

Rubin, Jaime L.; O'Callaghan, Lasair; Pelligra, Christopher; Konstan, Michael W.; Ward, Alexandra; Ishak, Jack K.; Chandler, Conor; Liou, Theodore G. (2019): Modeling long-term health outcomes of patients with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR treated with lumacaftor/ivacaftor, in: *Therapeutic advances in respiratory disease*, Jg. 13, Seite 1753466618820186.

Sawicki, Gregory S.; McKone, Edward F.; Pasta, David J.; Millar, Stefanie J.; Wagener, Jeffrey S.; Johnson, Charles A.; Konstan, Michael W. (2015): Sustained Benefit from ivacaftor demonstrated by combining clinical trial and cystic fibrosis patient registry data, in: *American journal of respiratory and critical care medicine*, Jg. 192, Nr. 7, Seite 836–842.

Sawicki, Gregory S.; Fink, Aliza K.; Schechter, Michael S.; Loeffler, Deena R.; Mayer-Hamblett, Nicole (2018): Rate and predictors of prescription of lumacaftor - Ivacaftor in the 18 months following approval in the United States, in: *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, Jg. 17, Nr. 6, Seite 742–746.

Schechter, M. S.; Shelton, B. J.; Margolis, P. A.; Fitzsimmons, S. C. (2001): The association of socioeconomic status with outcomes in cystic fibrosis patients in the United States, in: *American journal of respiratory and critical care medicine*, Jg. 163, Nr. 6, Seite 1331–1337.

Schwarz, C.; Staab, D. (2015): Zystische Fibrose und ihre Komplikationen, in: *Der Internist*, Jg. 56, Nr. 3, Seite 263–274.

Seamon, K. B.; Daly, J. W. (1981): Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems, in: *Journal of cyclic nucleotide research*, Jg. 7, Nr. 4, Seite 201–224.

Sermet-Gaudelus, Isabelle; De Boeck, Kris; Casimir, Georges J.; Vermeulen, François; Leal, Teresinha; Mogenet, Agnès; Roussel, Delphine; Fritsch, Janine; Hanssens, Laurence; Hirawat, Samit; Miller, Nilsen L.; Constantine, Scott; Reha, Allen; Ajayi, Temitayo; Elfring, Gary L.; Miller, Langdon L. (2010)¹: Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis, in: *American journal of respiratory and critical care medicine*, Jg. 182, Nr. 10, Seite 1262–1272.

Sermet-Gaudelus, Isabelle; Girodon, Emanuelle; Sands, Dorota; Stremmler, Nathalie; Vavrova, Vera; Deneuville, Eric; Reix, Philippe; Bui, Stéphanie; Huet, Frédéric; Lebourgeois, Muriel; Munck, Anne; Iron, Albert; Skalicka, Veronika; Bienvenu, Thierry; Roussel, Delphine; Lenoir, Gérard; Bellon, Gabriel; Sarles, Jacques; Macek, Milan; Roussey, Michel; Fajac, Isabelle; Edelman, Aleksander (2010)²: Clinical phenotype and genotype of children with borderline sweat test and abnormal nasal epithelial chloride transport, in: *American journal of respiratory and critical care medicine*, Jg. 182, Nr. 7, Seite 929–936.

Sheppard, D. N.; Rich, D. P.; Ostedgaard, L. S.; Gregory, R. J.; Smith, A. E.; Welsh, M. J. (1993): Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties, in: *Nature*, Jg. 362, Nr. 6416, Seite 160–164.

Sly, Peter D.; Brennan, Siobhain; Gangell, Catherine; Klerk, Nicholas de; Murray, Conor; Mott, Lauren; Stick, Stephen M.; Robinson, Philip J.; Robertson, Colin F.; Ranganathan, Sarath C. (2009): Lung disease at diagnosis in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening, in: *American journal of respiratory and critical care medicine*, Jg. 180, Nr. 2, Seite 146–152.

Sly, Peter D.; Gangell, Catherine L.; Chen, Linping; Ware, Robert S.; Ranganathan, Sarath; Mott, Lauren S.; Murray, Conor P.; Stick, Stephen M. (2013): Risk factors for bronchiectasis in children with cystic fibrosis, in: *The New England journal of medicine*, Jg. 368, Nr. 21, Seite 1963–1970.

Smith, J. J.; Welsh, M. J. (1992): cAMP stimulates bicarbonate secretion across normal, but not cystic fibrosis airway epithelia, in: *The Journal of clinical investigation*, Jg. 89, Nr. 4, Seite 1148–1153.

Smyth, Alan R.; Bell, Scott C.; Bojcin, Snezana; Bryon, Mandy; Duff, Alistair; Flume, Patrick; Kashirskaya, Nataliya; Munck, Anne; Ratjen, Felix; Schwarzenberg, Sarah Jane; Sermet-Gaudelus, Isabelle; Southern, Kevin W.; Taccetti, Giovanni; Ullrich, Gerald; Wolfe, Sue (2014): European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines, in: *Journal of cystic fibrosis*, Jg. 13 Suppl 1, Seite S23–S42.

Sosnay, Patrick R.; Siklosi, Karen R.; van Goor, Fredrick; Kaniecki, Kyle; Yu, Haihui; Sharma, Neeraj; Ramalho, Anabela S.; Amaral, Margarida D.; Dorfman, Ruslan; Zielenski, Julian; Masisa, David L.; Karchin, Rachel; Millen, Linda; Thomas, Philip J.; Patrinos, George P.; Corey, Mary; Lewis, Michelle H.; Rommens, Johanna M.; Castellani, Carlo; Penland, Christopher M.; Cutting, Garry R. (2013): Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, in: *Nature genetics*, Jg. 45, Nr. 10, Seite 1160–1167.

Sousa, Marisa; Servidoni, Maria F.; Vinagre, Adriana M.; Ramalho, Anabela S.; Bonadia, Luciana C.; Felício, Verónica; Ribeiro, Maria A.; Uliyakina, Inna; Marson, Fernando A.; Kmit, Arthur; Cardoso, Silvia R.; Ribeiro, José D.; Bertuzzo, Carmen S.; Sousa, Lisete; Kunzelmann, Karl; Ribeiro, Antônio F.; Amaral, Margarida D. (2012): Measurements of CFTR-mediated Cl⁻ secretion

in human rectal biopsies constitute a robust biomarker for Cystic Fibrosis diagnosis and prognosis, in: *PloS one*, Jg. 7, Nr. 10, Seite e47708.

Stahl, M.; Wielpütz, M. O.; Ricklefs, I.; Dopfer, C.; Barth, S.; Schlegtendal, A.; Graeber, S. Y.; Sommerburg, O.; Diekmann, G.; Hüsing, J.; Koerner-Rettberg, C.; Nährlich, L.; Dittrich, A. M.; Kopp, M. V.; Mall, M. A. (2019): Preventive Inhalation of Hypertonic Saline in Infants with Cystic Fibrosis (PRESIS). A Randomized, Double-Blind, Controlled Study, in: *American journal of respiratory and critical care medicine*, Jg. 199, Nr. 10, Seite 1238–1248.

Stanojevic, Sanja; Ratjen, Felix (2016): Physiologic endpoints for clinical studies for cystic fibrosis, in: *Journal of cystic fibrosis*, Jg. 15, Nr. 4, Seite 416–423.

Stephenson, Anne L.; Sykes, Jenna; Berthiaume, Yves; Singer, Lianne G.; Aaron, Shawn D.; Whitmore, George A.; Stanojevic, Sanja (2015): Clinical and demographic factors associated with post-lung transplantation survival in individuals with cystic fibrosis, in: *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, Jg. 34, Nr. 9, Seite 1139–1145.

Strug, Lisa J.; Gonska, Tanja; He, Gengming; Keenan, Katherine; Ip, Wan; Boëlle, Pierre-Yves; Lin, Fan; Panjwani, Naim; Gong, Jiafen; Li, Weili; Soave, David; Xiao, Bowei; Tullis, Elizabeth; Rabin, Harvey; Parkins, Michael D.; Price, April; Zuberbuhler, Peter C.; Corvol, Harriet; Ratjen, Felix; Sun, Lei; Bear, Christine E.; Rommens, Johanna M. (2016): Cystic fibrosis gene modifier SLC26A9 modulates airway response to CFTR-directed therapeutics, in: *Human molecular genetics*, Jg. 25, Nr. 20, Seite 4590–4600.

Stuhrmann-Spangenberg, Manfred; Aulehla-Scholz, Christa; Dworniczak, Bernd; Reiss, Jochen (1997): Molekulargenetische Diagnostik der Cystischen Fibrose, in: [online] https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/078-005l_S1_Cystische_Fibrose_molekulargenetische_Diagnostik_2011-09.pdf [01.06.2019].

Taylor-Cousar, Jennifer L.; Munck, Anne; McKone, Edward F.; van der Ent, Cornelis K.; Moeller, Alexander; Simard, Christopher; Wang, Linda T.; Ingenito, Edward P.; McKee, Charlotte; Lu, Yimeng; Lekstrom-Himes, Julie; Elborn, J. Stuart (2017): Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del, in: *The New England journal of medicine*, Jg. 377, Nr. 21, Seite 2013–2023.

US CF Foundation; Johns Hopkins University; The Hospital for Sick Children (2011): The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2), in: [online] <https://www.cftr2.org/> [23.09.2020].

U.S. Food & Drug Administration (2020): Table of Surrogate Endpoints That Were the Basis of Drug Approval or Licensure, in: [online] <https://www.fda.gov/drugs/development-resources/table-surrogate-endpoints-were-basis-drug-approval-or-licensure> [21.04.2020].

VanDevanter, Donald R.; Mayer-Hamblett, Nicole (2017): Innovating cystic fibrosis clinical trial designs in an era of successful standard of care therapies, in: *Current opinion in pulmonary medicine*, Jg. 23, Nr. 6, Seite 530–535.

VanDevanter, Donald R.; Mayer-Hamblett, Nicole; Boyle, Michael (2017): Feasibility of placebo-controlled trial designs for new CFTR modulator evaluation, in: *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, Jg. 16, Nr. 4, Seite 496–498.

van Goor, Fredrick; Straley, Kimberly S.; Cao, Dong; González, Jesús; Hadida, Sabine; Hazlewood, Anna; Joubran, John; Knapp, Tom; Makings, Lewis R.; Miller, Mark; Neuberger, Timothy;

Olson, Eric; Panchenko, Victor; Rader, James; Singh, Ashvani; Stack, Jeffrey H.; Tung, Roger; Grootenhuis, Peter D. J.; Negulescu, Paul (2006): Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules, in: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, Jg. 290, Nr. 6, Seite L1117–L1130.

van Goor, Fredrick; Hadida, Sabine; Grootenhuis, Peter D. J.; Burton, Bill; Cao, Dong; Neuberger, Tim; Turnbull, Amanda; Singh, Ashvani; Joubran, John; Hazlewood, Anna; Zhou, Jinglan; McCartney, Jason; Arumugam, Vijayalaksmi; Decker, Caroline; Yang, Jennifer; Young, Chris; Olson, Eric R.; Wine, Jeffery J.; Frizzell, Raymond A.; Ashlock, Melissa; Negulescu, Paul (2009): Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 106, Nr. 44, Seite 18825–18830.

van Goor, Fredrick; Hadida, Sabine; Grootenhuis, Peter D. J.; Burton, Bill; Stack, Jeffrey H.; Straley, Kimberly S.; Decker, Caroline J.; Miller, Mark; McCartney, Jason; Olson, Eric R.; Wine, Jeffrey J.; Frizzell, Ray A.; Ashlock, Melissa; Negulescu, Paul A. (2011): Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 108, Nr. 46, Seite 18843–18848.

van Goor, Fredrick; Yu, Haihui; Burton, Bill; Hoffman, Beth J. (2014): Effect of ivacaftor on CFTR forms with missense mutations associated with defects in protein processing or function, in: *Journal of cystic fibrosis*, Jg. 13, Nr. 1, Seite 29–36.

Veeze, H. J.; Sinaasappel, M.; Bijman, J.; Bouquet, J.; De Jonge, H. R. (1991): Ion transport abnormalities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis, in: *Gastroenterology*, Jg. 101, Nr. 2, Seite 398–403.

Veit, Guido; Avramescu, Radu G.; Perdomo, Doranda; Phuan, Puay-Wah; Bagdany, Miklos; Apaja, Pirjo M.; Borot, Florence; Szollosi, Daniel; Wu, Yu-Sheng; Finkbeiner, Walter E.; Hegeudus, Tamas; Verkman, Alan S.; Lukacs, Gergely L. (2014): Some gating potentiators, including VX-770, diminish Δ F508-CFTR functional expression, in: *Science translational medicine*, Jg. 6, Nr. 246, Seite 246ra97.

Veit, Gudio; Avramescu, Radu G.; Chiang, Annette N.; Houck, Scott A.; Cai, Zhiwei; Peters, Kathryn W.; Hong, Jeong S.; Pollard, Harvey B.; Guggino, William B.; Balch, William E.; Skach, William R.; Cutting, Garry R.; Frizzell, Raymond A.; Sheppard, David N.; Cyr, Douglas M.; Sorscher, Eric J.; Brodsky, Jeffrey L.; Lukacs, Gergely L. (2016): From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations, in: *Molecular Biology of the Cell*, Jg. 27, Nr. 3, Seite 424–433.

Verkman, Alan S.; Galiotta, Luis J. V. (2009): Chloride channels as drug targets, in: *Nature reviews. Drug discovery*, Jg. 8, Nr. 2, Seite 153–171.

Vertex Pharmaceuticals Incorporated (2012): Highlights of prescribing information, in: [online] https://pi.vrtx.com/files/uspi_ivacaftor.pdf [11.06.2019].

Vertex Pharmaceuticals Incorporated (2015): Highlights of prescribing information, in: [online] https://pi.vrtx.com/files/uspi_lumacaftor_ivacaftor.pdf [11.06.2019].

Wainwright, Claire E.; Elborn, J. Stuart; Ramsey, Bonnie W.; Marigowda, Gautham; Huang, Xiaohong; Cipolli, Marco; Colombo, Carla; Davies, Jane C.; De Boeck, Kris; Flume, Patrick A.; Konstan, Michael W.; McColley, Susanna A.; McCoy, Karen; McKone, Edward F.; Munck, Anne; Ratjen, Felix; Rowe, Steven M.; Waltz, David; Boyle, Michael P. (2015): Lumacaftor-Ivacaftor in

Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR, in: *The New England journal of medicine*, Jg. 373, Nr. 3, Seite 220–231.

Wark, Peter; McDonald, Vanessa M. (2009): Nebulised hypertonic saline for cystic fibrosis, in: *The Cochrane database of systematic reviews*, Nr. 2, Seite CD001506.

Welch, Ellen M.; Barton, Elisabeth R.; Zhuo, Jin; Tomizawa, Yuki; Friesen, Westley J.; Trifillis, Panayiota; Paushkin, Sergey; Patel, Meenal; Trotta, Christopher R.; Hwang, Seongwoo; Wilde, Richard G.; Karp, Gary; Takasugi, James; Chen, Guangming; Jones, Stephen; Ren, Hongyu; Moon, Young-Choon; Corson, Donald; Turpoff, Anthony A.; Campbell, Jeffrey A.; Conn, M. Morgan; Khan, Atiyya; Almstead, Neil G.; Hedrick, Jean; Mollin, Anna; Risher, Nicole; Weetall, Marla; Yeh, Shirley; Branstrom, Arthur A.; Colacino, Joseph M.; Babiak, John; Ju, William D.; Hirawat, Samit; Northcutt, Valerie J.; Miller, Langdon L.; Spatrick, Phyllis; He, Feng; Kawana, Masataka; Feng, Huisheng; Jacobson, Allan; Peltz, Stuart W.; Sweeney, H. Lee (2007): PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations, in: *Nature*, Jg. 447, Nr. 7140, Seite 87–91.

Welsh, M. J.; Smith, A. E. (1993): Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis, in: *Cell*, Jg. 73, Nr. 7, Seite 1251–1254.

Wilschanski, M.; Zielenski, J.; Markiewicz, D.; Tsui, L. C.; Corey, M.; Levison, H.; Durie, P. R. (1995): Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, in: *The Journal of pediatrics*, Jg. 127, Nr. 5, Seite 705–710.

Wilschanski, M.; Famini, H.; Strauss-Liviatan, N.; Rivlin, J.; Blau, H.; Bibi, H.; Bentur, L.; Yahav, Y.; Springer, H.; Kramer, M. R.; Klar, A.; Ilani, A.; Kerem, B.; Kerem, E. (2001): Nasal potential difference measurements in patients with atypical cystic fibrosis, in: *The European respiratory journal*, Jg. 17, Nr. 6, Seite 1208–1215.

Wilschanski, Michael; Yahav, Yaacov; Yaacov, Yasmin; Blau, Hannah; Bentur, Lea; Rivlin, Joseph; Aviram, Micha; Bdolah-Abram, Tali; Bebok, Zsuzsa; Shushi, Liat; Kerem, Batsheva; Kerem, Eitan (2003): Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations, in: *The New England journal of medicine*, Jg. 349, Nr. 15, Seite 1433–1441.

Yu, Haihui; Burton, Bill; Huang, Chien-Jung; Worley, Jennings; Cao, Dong; Johnson, James P.; Urrutia, Art; Joubran, John; Seepersaud, Sheila; Sussky, Katherine; Hoffman, Beth J.; van Goor, Fredrick (2012): Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations, in: *Journal of cystic fibrosis*, Jg. 11, Nr. 3, Seite 237–245.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sheila Zink, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Präklinische ex vivo-Effekte von CFTR-Modulatoren an humanen Rektumbiopsien zur Medikamentenentwicklung bei Mukoviszidose“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

22. Oktober 2020

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Sheila Zink (geb. Scheinert) hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen und Arbeiten:

1. Scheinert S, Pinders L, Derichs N. Reliability of Intestinal Current Measurement as outcome biomarker for CFTR modulating therapies. European Cystic Fibrosis Society Diagnostic Network Working Group (ECFS DNWG), 10th Annual Meeting, 13th-15th February 2013, Jerusalem (Abstract und Vortrag).

Beitrag im Einzelnen: Verfassen des Abstracts, Vortrag und Diskussion, Auszeichnung mit dem Young Investigator Award der ECFS DNWG, Datenerhebung und Datenauswertung: Durchführung und Auswertung von Schweißtest, NPD und ICM von 04/2012 - 04/2013. (Zeitaufwand pro Patient: 1. Tag: Schweißtest, NPD und ICM, 2. und 3. Tag: ICM)

2. Scheinert S, Pinders L, Derichs N. Ex vivo effect of PTC124 on CFTR-mediated chloride secretion in rectal biopsies from CF patients with at least one nonsense mutation. 7th European CF Young Investigator Meeting, February 27th-March 1st 2013, Paris, (Abstract, Vortrag und Poster).

Beitrag im Einzelnen: Verfassen des Abstracts, Vortrag und Diskussion, Erstellen eines Posters und Präsentation, Datenerhebung und -auswertung: Durchführung und Auswertung von Schweißtest, NPD und ICM von 04/2012 – 04/2013. (Zeitaufwand pro Patient: 1. Tag: Schweißtest, NPD und ICM, 2. Tag: ICM nach nächtlicher Inkubation)

3. 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. 36th European Cystic Fibrosis Conference, 12th-15th June 2013, Lisbon (Abstract und Vortrag).

Beitrag im Einzelnen: Verfassen des Abstracts, Vortrag und Diskussion im Rahmen der ECFC 2013, Auszeichnung mit dem Young Investigator Award der ECFS, Datenerhebung und Datenauswertung: Durchführung und Auswertung der ICM von 04/2012 - 04/2013. (Zeitaufwand pro Patient: 1. Tag: Schweißtest, NPD und ICM, 2. Tag: ICM nach nächtlicher Inkubation der Biopsien mit diversen CFTR-Modulatoren)

4. Scheinert S, Pinders-Kessler L, Klosinski M, Derichs N. Reliability of intestinal current measurement as CFTR biomarker and responsiveness to oral ivacaftor treatment. 36th European Cystic Fibrosis Conference, 12th-15th June 2013, Lisbon (Abstract und Poster).

Beitrag im Einzelnen: Verfassen des Abstracts, Erstellen des Posters und Präsentation im Rahmen der ECFC 2013, Datenerhebung und Datenauswertung: Durchführung und Auswertung von Schweißtest, NPD und ICM von 04/2012 - 04/2013.

(Zeitaufwand pro Patient: 1. Tag: Schweißtest, NPD und ICM, 2. Tag: Schweißtest, NPD und ICM, 3. Tag: Schweißtest, NPD und ICM)

5. 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 04/2012 - 04/2013.

(Zeitaufwand pro Patient: Schweißtest, NPD und ICM)

6. Norek A, Scheinert S, Kusmierek E, Chrzescijanska E, Nowakowska A, Sapiejka E, Swierczynska B, Sands D, Derichs N (20123). ENaC-related disorder as a new CF-like clinical entity. J Cyst Fibros. 12. S54. 10.1016/S1569-1993(13)60167-8 (Abstract).

Beitrag im Einzelnen: Datenerhebung und Datenauswertung: Durchführung und Auswertung der NPD-Messungen von 06/2012 – 08/2012.

7. Derichs N, Pinders-Kessler L, Bronsveld I, Scheinert S, Rueckes-Nilges C, de Jonge H, Nährlich L. (2013). Multicenter European Standardization and reference values for intestinal current measurement in rectal biopsies. Pediatric Pulmonology. 48. 300-300 (Abstract).

Beitrag im Einzelnen: Mitwirkung an der Datenerhebung und Datenauswertung: Durchführung und Auswertung von Schweißtest, NPD und ICM von 04/2012 - 04/2013.

(Zeitaufwand pro Patient: Schweißtest, NPD und ICM)

8. Pinders-Kessler L, Derichs N, Bronsveld I, Scheinert S, Rückes-Nilges C, De Rijke Y, de Jonge H, Nährlich L. ECFS ICM SOP multicentre validation: Reference data for CF

diagnosis. 11th Annual ECFS DNWG (European Cystic Fibrosis Society Diagnostic Network Working Group) Meeting, 13th-15th February 2014, Berlin (Abstract).

Beitrag im Einzelnen: Mitwirkung an Datenerhebung und -auswertung: Durchführung und Auswertung von Schweißtest, NPD und ICM von 04/2012 - 04/2013.

9. Pinders-Kessler L, Scheinert S, Klosinski M, Staab D, Derichs N. Organspezifische CFTR-Dysfunktion: Vergleich von Biomarkern zur CF-Diagnosestellung und Effekte von CFTR-Modulatoren. 36. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie e.V., 26.-29. März 2014, Bremen (Abstract).

Beitrag im Einzelnen: Mitwirkung an Datenerhebung und -auswertung: Durchführung und Auswertung von Schweißtest, NPD und ICM von 04/2012 - 04/2013.

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

Beitrag im Einzelnen: Datenerhebung und -auswertung: Durchführung und Auswertung von Schweißtest, NPD und ICM von 11/2011 - 09/2014.

11. 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), 13th Annual Meeting, 11th-13th February 2016, London (Abstract).

Beitrag im Einzelnen: Mitwirkung an Datenerhebung und Datenauswertung: Durchführung und Auswertung von Schweißtest, NPD und ICM von 04/2012 - 04/2013. (Zeitaufwand pro Patient: Schweißtest, NPD und ICM)

12. Scheinert S, de Jonge H, Bronsveld I, Nährlich L, Melotti P, van Koningsbruggen S, Sermet-Gaudelus I, Hayes K, Derichs N. (2016). WS18.4 Intestinal current measurement as outcome marker for clinical trials: the ECFS CTN certification process and central reading core facility. Journal of Cystic Fibrosis. 15. S30. 10.1016/S1569-1993(16)30166-7 (Abstract).

Beitrag im Einzelnen: Mitwirkung an der Konzeption der Zertifizierung, Auswertung und zentrale Bewertung der Messungen mehrerer Zentren, Durchführung von ICM-Schulungen von 04/2013 – 04/2015.

Unterschrift der Doktorandin

Unterschrift der Betreuerin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Derichs, N.; Pinders-Kessler, L.; Bronsveld, I.; Scheinert, S.; Rueckes-Nilges, C.; de Jonge, H.; Nährlich, L. (2013). Multicenter European Standardization and reference values for intestinal current measurement in rectal biopsies. *Pediatric Pulmonology*. 48. 300-300 (Abstract).

Klosinski, M.; Pinders-Kessler, L.; Scheinert, S.; Staab, D.; Derichs, N. (2016) 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), 13th Annual Meeting, 11th-13th February 2016, London (Abstract).

Norek, A.; Scheinert, S.; Kusmierek, E.; Chrzescijanska, E.; Nowakowska, A.; Sapiejka, E.; Swierczynska, B.; Sands, D.; Derichs, N. (20123). ENaC-related disorder as a new CF-like clinical entity. *J Cyst Fibros*. 12. S54. 10.1016/S1569-1993(13)60167-8 (Abstract).

Pinders-Kessler, L.; Scheinert, S.; Klosinski, M.; Staab, D.; Derichs, N. (2013) Organ-specific CFTR dysfunction: Comparison of biomarkers for CF diagnosis and CFTR modulator effects. *J Cyst Fibros* 2013; 12:21 (Abstract).

Pinders-Kessler, L.; Derichs, N.; Bronsveld, I.; Scheinert, S.; Rückes-Nilges, C.; De Rijke; Y., de Jonge, H.; Nährlich, L. (2014) ECFS ICM SOP multicentre validation: Reference data for CF diagnosis. 11th Annual ECFS DNWG (European Cystic Fibrosis Society Diagnostic Network Working Group) Meeting, 13th-15th February 2014, Berlin (Abstract).

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

Pinders-Kessler, L.; Scheinert, S.; Klosinski, M.; Staab, D.; Derichs, N. (2014) Organ-spezifische CFTR-Dysfunktion: Vergleich von Biomarkern zur CF-Diagnosestellung und Effekte von CFTR-Modulatoren. 36. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie e.V., 26.-29. März 2014, Bremen (Abstract).

Scheinert, S.; Pinders, L.; Derichs, N. (2013) Reliability of Intestinal Current Measurement as outcome biomarker for CFTR modulating therapies. European Cystic Fibrosis Society Diagnostic Network Working Group (ECFS DNWG), 10th Annual Meeting, 13th-15th February 2013, Jerusalem (Abstract und Vortrag).

Scheinert, S.; Pinders, L.; Derichs, N. (2013) Ex vivo effect of PTC124 on CFTR-mediated chloride secretion in rectal biopsies from CF patients with at least one nonsense mutation. 7th European CF Young Investigator Meeting, February 27th-March 1st 2013, Paris, (Abstract, Vortrag und Poster).

Scheinert, S.; Pinders-Kessler, L.; Klosinski, M.; Staab, D.; Derichs, N. (2013) Ex vivo effect of CFTR modulators VX770, VX809 and PTC124 on CFTR-mediated chloride secretion in rectal biopsies from CF patients. 36th European Cystic Fibrosis Conference, 12th-15th June 2013, Lisbon (Abstract und Vortrag).

Scheinert, S.; Pinders-Kessler, L.; Klosinski, M.; Derichs, N. (2013) Reliability of intestinal current measurement as CFTR biomarker and responsiveness to oral ivacaftor treatment. 36th European Cystic Fibrosis Conference, 12th-15th June 2013, Lisbon (Abstract und Poster).

Scheinert, S.; de Jonge, H.; Bronsveld, I.; Nährlich, L.; Melotti, P.; van Koningsbruggen, S.; Sermet-Gaudelus, I.; Hayes, K.; Derichs, N. (2016). WS18.4 Intestinal current measurement as outcome marker for clinical trials: the ECFS CTN certification process and central reading core facility. *Journal of Cystic Fibrosis*. 15. S30. 10.1016/S1569-1993(16)30166-7 (Abstract).

Danksagung

Ich bedanke mich zunächst bei meiner Betreuerin, Frau PD. Dr. Doris Staab für ihre Unterstützung und ihre hilfreichen Ratschläge. Meinem ursprünglichen Betreuer Herrn Dr. Nico Derichs danke ich für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Messungen. Ein herzliches Dankeschön gilt auch meinen Mit-Doktoranden Frau Lea Pinders-Keßler und Herrn Dr. Michael Klosinski für die tolle Zusammenarbeit. Natürlich möchte ich mich auch beim Team der Mukoviszidose Ambulanz für ihre Unterstützung bedanken. Insbesondere den CF-Patienten und Kontrollprobanden gilt mein Dank für ihre Bereitschaft, an der Studie teilzunehmen.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Martin Köhler und Frau Dr. Jutta Köhler, ohne deren Anstoß diese Arbeit wohl nie fertiggestellt worden wäre.

Zuguterletzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden für ihren moralischen Beistand und ihre Unterstützung bedanken. Insbesondere meinem Ehemann Benjamin danke ich für seine Geduld, sein Verständnis, seine Aufmunterung, seine Hilfe bei allen technischen Fallstricken und sein offenes Ohr aus tiefstem Herzen.