

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

## DISSERTATION

# **Therapieeffektbeurteilung und optimierte Diagnosestellung bei häufigen und seltenen *CFTR* Genotypen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Valerie Galffy-Mühlbacher  
geb. Mühlbacher  
aus Wien, Österreich

Datum der Promotion: 25. November 2022

## Vorwort

Teilergebnisse der folgenden Arbeit wurden bereits bei folgenden Kongressen als Abstracts, Posters oder als Vortrag veröffentlicht:

1. *„CFTR3 – personalised characterisation of rare CFTR mutations: How can CF centres and patients benefit?“*  
V.Mühlbacher, N.Derichs, CFTR3 Core Group<sup>1</sup>  
39. ECFS Conference, Juni 2016, Basel (CH), DNWG Meeting
2. *„CFTR3: Personalisierte Charakterisierung seltener CFTR Genotypen - Überblick“*  
V.Mühlbacher, N.Derichs, CFTR3 Core Group<sup>1</sup>  
19. Deutsche Mukoviszidose-Tagung, November 2016, Würzburg (DE)
3. *„CFTR - personalised characterisation of rare CFTR mutations: Examples from CFTR3“*  
V.Mühlbacher, N.Derichs, CFTR3 Core Group<sup>1</sup>  
ECFS DNWG Meeting, Februar 2017, Ljubljana (SL)
4. *„CFTR3: Personalisierte Charakterisierung seltener CFTR Genotypen“*  
V.Mühlbacher, N.Derichs, CFTR3 Core Group<sup>1</sup>  
39. Jahrestagung GPP, März 2017, Essen (DE)
5. *„CFTR3 – personalised characterisation of rare CFTR mutations“*  
V.Mühlbacher, N.Derichs, CFTR3 Core Group<sup>1</sup>  
North American CF Conference, November 2017, Indianapolis (US)
6. *„ICM-Responsiveness to oral Lumacaftor/Ivacaftor treatment“*  
V.Mühlbacher, J.Röhmel, C.Schwarz, D.Staab, N.Derichs  
15. ECFS DNWG Meeting, Februar 2018, St. Gallen (CH)

---

<sup>1</sup> CFTR3 Core Group: Margarida Amaral, Jeffrey Beekman, Inez Bronsveld, Carlo Castellani, Hugo De Jonge, Elke De Wachter, Nico Derichs, Lutz Nährlich, Isabelle Sermet, Michael Wilschanski

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
Abbildungsverzeichnis.....	7
Tabellenverzeichnis.....	8
Abstract Deutsch .....	10
Abstract Englisch.....	11
1 Einleitung.....	12
1.1 Definition und Ätiologie der CF .....	12
1.2 Epidemiologie und Demographie der CF.....	12
1.3 Pathophysiologie der CF .....	13
1.4 Genetik der CF .....	15
1.5 Diagnostik der CF.....	17
1.6 Klinik der CF.....	20
1.7 Therapie der CF .....	21
1.7.1 Basistherapie der CF .....	21
1.7.2 CFTR-Modulatoren als Therapie des CFTR-Basisdefekts.....	21
2 Forschungsfragen .....	23
3 Material und Methodik.....	24
3.1 Patientenkollektiv.....	24
3.1.1 Patientengruppe A .....	24
3.1.2 Patientengruppe B .....	26
3.2 Schweißtest.....	27
3.2.1 Methode.....	27
3.2.2 Material und Durchführung .....	27
3.2.3 Auswertung, Referenzbereich und Qualitätskriterien .....	28
3.3 Mutationsanalyse.....	30

3.3.1	Molekulargenetik.....	30
3.3.2	<i>CFTR</i> -Mutationsdatenbanken.....	30
3.4	Intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM) .....	31
3.4.1	Methode.....	31
3.4.2	Material und Durchführung .....	32
3.4.3	Auswertung, Interpretation und Qualitätskriterien .....	42
3.5	Nasale Potentialdifferenzmessung (NPD) .....	46
3.5.1	Methode.....	46
3.5.2	Material und Durchführung .....	47
3.5.3	Auswertung, Interpretation und Qualitätskriterien .....	53
3.6	Statistische Analyse .....	58
4	Ergebnisse .....	58
4.1	Patientengruppe A.....	58
4.2	Patientengruppe B.....	71
4.2.1	Diagnostische Klassifikation nach <i>CFTR</i> -Funktionsanalyse .....	76
5	Diskussion.....	84
5.1	Patientengruppe A.....	84
5.2	Patientengruppe B.....	89
5.3	Personalisierte Medizin .....	91
5.4	Limitationen .....	92
6	Zusammenfassung.....	93
7	Literaturverzeichnis .....	94
8	Eidesstattliche Versicherung .....	106
9	Anteilerklärung an erfolgten Publikationen .....	107
10	Lebenslauf .....	109
11	Publikationsliste .....	110
12	Danksagung.....	111

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amil	Amilorid
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Best.- Nr.	Bestellnummer
BMI	Body-Mass-Index
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaCC	kalziumabhängige Chloridkanäle
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CBAVD	kongentiale bilaterale Aplasie der Vas Deferens
CCH	Carbachol
CF	cystic fibrosis (engl.), Zystische Fibrose (dt.)
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (engl.)
CFTR-Kanal	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-Kanal
CFTR-RD	CFTR-related disorder
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedischwefelsäure
DNA	desoxyribonucleic acid (engl.), Desoxyribonukleinsäure (dt.)
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung
ECFS DNWG	ECFS Diagnostic Network Working Group (engl.)
ECFS	European Cystic Fibrosis Society (engl.)
ENaC	epithelialer Natriumkanal
FEV <sub>1</sub>	Einsekundenkapazität (Lungenfunktion)
Forsk	Forskolin
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bikarbonat
Hista	Histamin
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
ICM	intestinal current measurement (engl.) Intestinale Kurzschlussstrommessung (dt.)
I <sub>sc</sub>	transepithelialer Kurzschlussstrom
ΔI <sub>sc</sub>	Änderung des transepithelialen Kurzschlussstroms
Iso	Isoproterenol
i.v.	intravenös

K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
Lum/Iva	Kombinationspräparat Lumacaftor/Ivacaftor
μA	Mikroampère
MG	Molekulargewicht
mM	millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mosmol/L	Milliosmol/Liter
mRNA	messenger ribonucleic acid (engl.), Boten-Ribonukleinsäure (dt.)
MW	Mittelwert
n	Anzahl an Patienten
n.d.	nicht durchgeführt
Na <sup>+</sup>	Natrium
Non-CF	non cystic fibrosis (engl.) (sinngemäß dt.: nicht an CF erkrankt)
NPD	Nasale Potentialdifferenz
0Cl	chloridfreie Lösung
p	Signifikanzniveau
PA	Pseudomonas aeruginosa
PD	Potentialdifferenz
PI-CF	Zystische Fibrose mit exokriner Pankreasinsuffizienz
Pr.-Nr.	Produktnummer
PS-CF	Zystische Fibrose mit exokriner Pankreassuffizienz
QNS	quantity not sufficient (Schweiß nicht ausreichend f. Schweißtest)
r	Korrelationskoeffizient
R <sub>t</sub>	Epithelialer Gewebewiderstand
SOP	standard operating procedure (engl.), Durchführungsstandard (dt.)
ST	Schweißtest
Tab.	Tabelle
μA	Mikroampere
VUS	variant of unknown clinical significance
Z.n.	Zustand nach

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Intrazellulärer Ionentransportmechanismus bei CF-Patienten im Vergleich zu Gesunden am Beispiel des respiratorischen Epithels	14
Abb. 1.2: CF-Diagnose-Algorithmus bei klinischem Verdacht	19
Abb. 3.1: Flow Chart Patientengruppe A	25
Abb. 3.2: Flow-Chart Patientengruppe B	26
Abb. 3.3: Aufbau der ICM	36
Abb. 3.4: Elektrophysiologischer Aufbau einer Ussingkammer	36
Abb. 3.5: ICM-Slider für Saugbiopsien (P2407C)	36
Abb. 3.6: ICM-Slider mit eingelegter Biopsie (P2407C)	36
Abb. 3.7: ICM-Slider mit eingelegter Biopsie (P2407C)	36
Abb. 3.8: ICM-Messkurve bei normaler Chloridkanalfunktion	43
Abb. 3.9: ICM-Messkurve bei fehlender Chloridkanalfunktion	44
Abb. 3.10: ICM-Messkurve bei Restfunktion der Chloridkanalfunktion	45
Abb. 3.11: Schematische Darstellung des Aufbaus einer NPD-Messung.	51
Abb. 3.12: NPD-Messkurve bei normaler Chloridkanalfunktion – linkes Nasenloch	55
Abb. 3.13: NPD – Messkurve bei fehlender Chloridkanalfunktion – rechtes Nasenloch	56
Abb. 3.14: NPD - Messkurve bei Restfunktion der Chloridkanalfunktion – rechtes Nasenloch	57
Abb. 4.1: Änderung des Schweißchlorids vor und nach Lumacaftor/Ivacaftor-Therapie	61
Abb. 4.2: Änderung von $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$ in der ICM vor und nach Lumacaftor/Ivacaftor-Therapie	62
Abb. 4.3: Änderung von $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX+CCH+Hista})$ in der ICM vor und nach Lumacaftor/Ivacaftor-Therapie	63
Abb. 4.4: Absolute Änderungen von Schweißchlorid und BMI	65
Abb. 4.5: Absolute Änderungen von Schweißchlorid und $FEV_1$	65
Abb. 4.6: Absolute Änderungen von $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$ und BMI	66
Abb. 4.7: Absolute Änderungen von $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$ und $FEV_1$	67
Abb. 4.8: Absolute Änderungen von $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX+CCH+Hista})$ und $FEV_1$	68
Abb. 4.9: Absolute Änderungen von $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX+CCH+Hista})$ und BMI	68
Abb. 4.10: Absolute Änderungen von Schweißchlorid und $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$	69
Abb. 4.11: Absolute Änderungen $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$ und $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX+CCH+Hista})$	70

Abb. 4.12: Absolute Änderungen von Schweißchlorid und $\Delta I_{sc}$ (Forsk/IBMX+CCH+Hista)	70
Abb. 4.13: CF-Diagnose-Status vor (links) und nach (rechts) CFTR-Funktionsdiagnostik	77
Abb. 4.14: Exemplarische Kurvendarstellungen der ICM- und NPD-Messungen aus Patientengruppe B	83

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: CFTR-Mutationsklassen	16
Tab. 1.2: CF-Diagnosekriterien	17
Tab. 1.3: Übersicht zugelassener CFTR-Modulatoren nach der European Medicines Agency (EMA)	22
Tab. 3.1: Überblick Patientengruppe A und Patientengruppe B	24
Tab. 3.2: Benötigte Materialien zur Durchführung eines Schweißtests	28
Tab. 3.3: Ursachen falsch-positiver Ergebnisse im Schweißtest	29
Tab. 3.4: Ursachen falsch-negativer Ergebnisse im Schweißtest	29
Tab. 3.5: Entnahme, Transport der Rektumschleimhautbiopsien, Einspannen des Gewebes in Ussingkammern	33
Tab. 3.6: Substanzen und Reagenzien	33
Tab. 3.7: Ussingkammern und deren Inbetriebnahme	34
Tab. 3.8: Datenaufzeichnung	34
Tab. 3.9: Substanzen zur Herstellung des Meyler-Puffers	35
Tab. 3.10: Datenaufzeichnung	47
Tab. 3.11: Elektroden	47
Tab. 3.12: Hautbrücke (Referenzelektrode)	48
Tab. 3.13: Nasenbrücke (Messbrücke)	48
Tab. 3.14: Perfusionsmaterial	48
Tab. 3.15: Zusatzmaterial	49
Tab. 3.16: Substanzen zur Herstellung der Lösungen	49
Tab. 3.17: Lösungen	50
Tab. 3.18: Wilschanski-Index, Sermet-Score	54
Tab. 4.1.: Klinische Charakteristika der Patienten vor und nach Lumacaftor/Ivacaftor-Therapie	59



Tab. 4.2.: Absolute Änderung der klinischen Parameter und der CFTR-Biomarker (ST, ICM) zwischen Baseline und Follow-Up	60
Tab. 4.3: Korrelationen zwischen Änderungen der CFTR-Biomarker	71
Tab. 4.4: Klinischer Phänotyp Patientengruppe B	72
Tab. 4.5: Genotyp Patientengruppe B	73
Tab. 4.6: Listung der CFTR-Mutationskombinationen in der CFTR2-Datenbank	74
Tab. 4.7: ICM + NPD Untersuchungsergebnisse Patientengruppe B	75
Tab. 4.8: Zusammenschau der Ergebnisse der CFTR-Funktionsdiagnostik, diagnostische Interpretation Patientengruppe B	76
Tab. 4.9: Gruppe der PI-CF-Patienten (n=4)	78
Tab. 4.10: Genotyp Patient 2	78
Tab. 4.11: Genotyp Patient 5	78
Tab. 4.12: Genotyp Patient 6	79
Tab. 4.13: Genotyp Patient 9	79
Tab. 4.14: Gruppe der PS-CF-Patienten (n=3)	80
Tab. 4.15: Genotyp Patient 1	80
Tab. 4.16: Genotyp Patient 3	80
Tab. 4.17: Genotyp Patient 10	80
Tab. 4.18: Gruppe der Patienten mit CFTR-Dysfunktion (n=1)	81
Tab. 4.19: Genotyp Patient 4	81
Tab. 4.20: Gruppe der Patienten mit unwahrscheinlicher CF-Diagnose (n=2)	82
Tab. 4.21: Genotyp Patient 7	82
Tab. 4.22: Genotyp Patient 8	82
Tab. 5.1: Übersicht Krankheitswert der untersuchten seltenen CFTR-Mutationen	90

## Abstract Deutsch

**Zielsetzung:** Diese Arbeit befasst sich mit der Therapieeffektbeurteilung nach CFTR-Modulatoren-Therapie bei Zystische Fibrose (CF)-Patienten mit dem *CFTR*-Genotyp F508del/F508del und der optimierten Diagnosestellung bei unklarer Auswirkung eines seltenen *CFTR*-Genotyps auf den klinischen Phänotyp eines Patienten.

**Methodik:** Insgesamt wurden 19 Patienten in die Studie eingeschlossen. In Patientengruppe A wurden 9 CF-Patienten, die homozygot die *CFTR*-Mutation F508del aufweisen, zu zwei Zeitpunkten untersucht – vor (Baseline) und 4 Wochen nach Beginn (Follow-Up) der erstmaligen Therapie mit dem CFTR-Korrektor Lumacaftor in Kombination mit dem CFTR-Potentiator Ivacaftor. Der Effekt der Therapie wurde anhand von Biomarkern der CFTR-Funktion (Schweißtest, Intestinale Kurzschlussstrommessung, ICM) sowie klinischen Parametern (BMI, FEV<sub>1</sub>) evaluiert. In Patientengruppe B wurde bei 10 Patienten mit seltenem *CFTR*-Genotyp und unklarer Diagnose mittels Nasaler Potentialdifferenzmessung (NPD) und ICM die *in vivo/ex vivo* CFTR-Funktion bestimmt und die Diagnoseklassifikation präzisiert.

**Ergebnisse:** In Patientengruppe A zeigte sich nach 4-wöchiger Therapie eine signifikante Reduktion des Schweißchlorids (MW 28,00 mmol/L, p=0,008) sowie signifikante Besserungen in den ICM-Parametern  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  (MW +17,38  $\mu\text{A}$ , p=0,008) und  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX+CCH+Hista})$  (MW +39,11  $\mu\text{A}$ , p=0,011). Eine signifikante Besserung von BMI und FEV<sub>1</sub> wurde nicht beobachtet und eine Korrelation zwischen den Änderungen in den beiden CFTR-Biomarkern (Schweißchlorid, ICM) konnte nicht nachgewiesen werden. In Patientengruppe B gelang anhand der erweiterten CFTR-Funktionsanalyse eine optimierte Diagnosestellung. Es wurde bei 3 Patienten eine PI-CF und bei 4 Patienten eine PS-CF bestätigt, bei einem Patienten wurde eine CFTR-Dysfunktion diagnostiziert, während bei 2 Patienten eine CF weitgehend ausgeschlossen werden konnte.

**Schlussfolgerung:** Innerhalb von vier Wochen nach Beginn der CFTR-Modulator-Therapie kann mittels CFTR-Funktionsanalyse der akute Therapieeffekt beurteilt werden, ohne dass in diesem Zeitraum eine signifikante Verbesserung in BMI und FEV<sub>1</sub> auftrat. Bei unbekannter Auswirkung seltener *CFTR*-Mutationen kann eine erweiterte CFTR-Funktionsanalyse die Diagnosestellung optimieren.

## Abstract Englisch

**Objectives:** In this thesis, the effects of CFTR modulating therapy in cystic fibrosis patients with phe508del/phe508del *CFTR* genotype have been examined and phenotypic characterisation of rare cystic fibrosis mutations with unknown clinical consequence has been performed to optimise the diagnostic algorithm.

**Methods:** 19 patients were enrolled in this study. In cohort A, 9 phe508del homozygous patients were examined before therapy with CFTR corrector lumacaftor in combination with CFTR potentiator ivacaftor (baseline) and after 4 weeks of therapy (follow-up). To evaluate the effect of the therapy, an assessment of CFTR function biomarker, such as sweat chloride concentration and ICM, as well as clinical outcomes (body mass index, FEV<sub>1</sub>) was performed. In cohort B, *ex vivo/in vivo* CFTR function of 10 patients with rare CFTR genotypes with unknown clinical consequence or inconclusive diagnosis was characterised by NPD and ICM.

**Results:** In cohort A, a significant reduction of sweat chloride concentrations (mean 28,00 mmol/L, p=0,008) and significant improvement of  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  (mean +17,38  $\mu\text{A}$ , p=0,008) as well as  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX+CCH+Hista})$  (mean +39,11  $\mu\text{A}$ , p=0,011) in ICM could be observed after 4 weeks of therapy. No significance could be shown in the improvement of body mass index or FEV<sub>1</sub>. Neither any correlations between the two ICM parameter  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  and  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX+CCH+Hista})$  nor between the changes in the two CFTR biomarker (sweat chloride, ICM) were found. In cohort B, based on extended CFTR function analysis the diagnosis algorithm could be optimised. In 3 patients the PI-CF diagnosis and in 4 patients the PS-CF diagnosis could be confirmed. One patient was diagnosed with CFTR dysfunction, in 2 patients a CF diagnosis was considered unlikely.

**Conclusions:** After 4 weeks of CFTR-modulating therapy, the effects could be very well evaluated by electrophysiological CFTR testing while no significant effects in clinical parameters as BMI and FEV<sub>1</sub> could be observed in short term evaluation. With extended CFTR function analysis, CF diagnosis in patients with rare CFTR genotypes of unknown clinical relevance can be stated very precisely.

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition und Ätiologie der CF

Die Zystische Fibrose oder Mukoviszidose (engl. cystic fibrosis, CF) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung, die auf einem Defekt des *CFTR*-Gens beruht. Der Defekt resultiert in einer Funktionsstörung des CFTR-Kanals der Zellmembran und einer dadurch herabgesetzten Chloridionenleitfähigkeit (1), die eine Viskositätserhöhung des Sekrets diverser Drüsen im gesamten Körper bewirkt. So betrifft die Pathophysiologie der CF den gesamten Körper. Gegensätzlich dazu wird sie in der Gesellschaft häufig fälschlicherweise als Lungenerkrankung bezeichnet. Durch die erhöhte Viskosität des Sekrets kann das betroffene Organ oftmals sich ansammelnde Erreger nicht von selbst entfernen, die Ausführungsgänge sind verlegt und das betroffene Organ entzündet sich oder fibrosiert gar. Das klinische Krankheitsbild der CF ist durch ein diverses Erscheinungsbild geprägt, das von chronisch obstruktiver Lungenerkrankung über exokrine Pankreasinsuffizienz bis hin zu Gedeihstörungen reicht (1).

## 1.2 Epidemiologie und Demographie der CF

Die CF stellt im europäischen Raum die häufigste angeborenen autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung mit eingeschränkter Lebenserwartung bei einer Inzidenz von ca. 1:3500 in der kaukasischen Ethnie dar (2–4). In Europa werden aktuell um die 48500 CF-Patienten gezählt, das Verhältnis zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht ist hierbei nahezu ausgeglichen (2).

Das mittlere Alter zum Ablebenszeitpunkt von CF-Patienten hat sich im Laufe der letzten Jahrzehnte drastisch ins Positive verändert: wo um das Jahr 1940 das durchschnittliche Überleben eines mit CF geborenen Kindes bei ungefähr 6 Monaten lag (5), beträgt das Ablebensalter eines CF-Patienten heutzutage in Europa durchschnittlich 31,2 Jahre, das europäisch durchschnittliche Diagnosealter liegt im Median aktuell bei 4 Monaten, wobei sich beides im Vergleich einzelner europäischer Staaten als sehr variabel darstellt (2).

In Deutschland beträgt das mediane Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 0,2 Jahre und das mediane Alter bei Tod 33 Jahre, die prognostizierte durchschnittliche Lebenserwartung bei einem Neugeborenen mit CF beträgt aktuell 53 Jahre (6).

Die Verbesserung des Diagnosezeitpunktes sowie der Mortalität lassen sich einerseits aus verbesserten Frühdiagnosemethoden wie zum Beispiel dem Neugeborenencreening sowie andererseits aus dem Einsatz vielerlei verbesserter

Therapiemöglichkeiten, wie zum Beispiel wirksame antibiotische Therapien gegen mikrobielle Kolonisation, Pankreasenzymersatztherapie, Ernährungsberatung, physiotherapeutische Atemtherapie und mukolytische Arzneimittel sowie CFTR-Modulatoren ableiten (7).

Anhand durchgeführter Mutationsfrequenzanalysen lässt sich die Entstehung von Mutationen im *CFTR*-Gen auf mehr als 50.000 Jahre zurückführen. Die heutzutage immer noch häufigste *CFTR*-Mutation F508del findet ihre Ursprungspopulation im arabischen sowie südwestasiatischen Raum (8). Derzeit sind rund 2000 *CFTR*-Mutationen bekannt, viele von ihnen jedoch nicht in ihrer Auswirkung auf den klinischen Phänotyp des Patienten charakterisiert. 360 genetische Varianten sind hiervon als CF-verursachend eingestuft, 23 als nicht-CF-verursachend. 48 Varianten sind als Mutationen mit variierender klinischer Konsequenz und 11 Varianten als Mutationen mit unbekannter Konsequenz beschrieben (9). F508del ist außer Konkurrenz die häufigste Mutation mit einer Allel-Frequenz von 90% weltweit (10–12). In ihrer Vorkommenshäufigkeit zwar weit darunter liegend, aber als einzige neben F508del, zeigen die Mutationen G542X, G551D, N1303K und W1282X eine Allel-Frequenz von >0,1% auf (13).

Nicht zu vernachlässigen sind geographische wie auch ethnische Aspekte, unter welchen die Inzidenz sämtlicher *CFTR*-Mutationen stark variiert. Anhand der US-amerikanischen Bevölkerung wurden diese ethnischen Aspekte aufgezeigt, wonach beispielsweise in der schwarzafrikanisch-stämmigen Bevölkerungsgruppe die Inzidenz einer CF-Erkrankung von 1:15.000, allerdings in der asiatischen Ethnie eine Inzidenz von 1:35.000 beschrieben wurde (3,4). Bestimmte Mutationen weisen geographische Herdvorkommnisse auf, als gutes Beispiel hierfür eignet sich die Mutation G551D, die in der französischen Region Bretagne sowie im Vereinigten Königreich und in Irland eine untypisch hohe Prävalenz aufweist oder die Mutation W1282X, die vor allem im Mittleren Osten vorkommt (14,15).

### **1.3 Pathophysiologie der CF**

Bei Betrachtung der Pathophysiologie der CF am Beispiel des respiratorischen Epithels, lässt sich der CFTR-Basisdefekt und seine elektrophysiologische Auswirkung sehr gut erkennen. Physiologisch werden Chloridionen entweder mittels CFTR-Kanals (cAMP-vermittelt, Proteinkinase A) oder mittels alternativen calciumvermittelten Chloridkanälen (CaCC) (calciumvermittelt, Proteinkinase C) von apikal nach basolateral transportiert.

Von basolateral nach intrazellulär gelangen die Chloridionen über einen Na-K-2Cl-Kotransporter. Das Natrium gelangt von apikal nach intrazellulär über den epithelialen Natriumkanal (ENaC) und von basolateral nach extrazellulär über die Na-K-ATPase im Austausch gegen Kalium. Wichtig hierbei ist der physiologische, passive Wassernachstrom, welcher im Sinne der mukoziliären Clearance den Zilien den Abtransport von mukösem Sekret nach oral erlaubt (16).

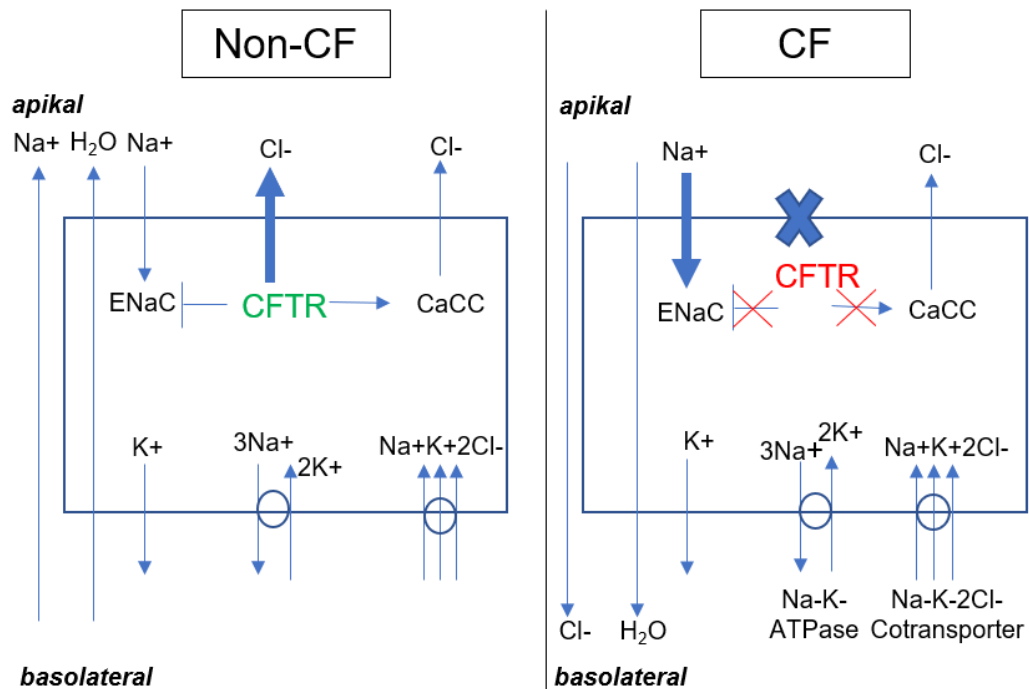


Abb. 1.1: Intrazellulärer Ionentransportmechanismus bei CF-Patienten im Vergleich zu Gesunden am Beispiel des respiratorischen Epithels

Frei modifiziert nach (16)

Legende:  $\text{Na}^+$ : Natrium,  $\text{Cl}^-$ : Chlorid,  $\text{K}^+$ : Kalium,  $\text{H}_2\text{O}$ : Wasser, CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Kanal, ENaC: epithelialer Natriumkanal, CaCC: calciumabhängiger Chloridkanal, Na-K-ATPase: Natrium-Kalium-ATPase, Na-K-2Cl-Cotransporter: Natrium-Kalium-2Chlorid-Cotransporter

Bei der Zystischen Fibrose ist der Ionentransport durch den pathologisch veränderten CFTR-Kanal gestört, die negative Rückkopplung zu den ENaC-Kanälen ist unterbunden, demnach liegt eine ENaC-Hyperaktivität vor und ein ausreichender passiver Wassernachstrom kann nicht gewährleistet werden. Die mukoziliäre Clearance kann nicht aufrechterhalten werden, der wasserarme, visköse Mukus kann folglich nicht abtransportiert werden und bietet optimalen Nährboden für mikrobiologisches Wachstum (16).

In den Schweißdrüsen werden physiologisch Natrium- und Chloridionen im duktalem Lumen reabsorbiert, der ausgeschiedene Schweiß ist hypoton. Bei CF-Erkrankten können die Ionen nur bedingt rückresorbiert werden, sie verbleiben in den Schweißdrüsen und werden ausgeschieden. Dies erklärt den pathologisch erhöhten Chloridgehalt im Schweiß, der beim Schweißtest gemessen wird (17,18).

#### **1.4 Genetik der CF**

Die Zystische Fibrose ist die häufigste angeborene Stoffwechselerkrankung und wird mit einem autosomal-rezessiven Erbgang vererbt. Dies bedeutet, dass ein Neugeborenes dann erkrankt, wenn es von jedem seiner beiden compound-heterozygoten Elternteile das mutierte Allel vererbt bekommt, wofür die Wahrscheinlichkeit bei 25% liegt. Das Risiko des Neugeborenen ein compound-heterozygoter Träger zu werden, liegt bei 50% und die Wahrscheinlichkeit, dass es kein mutiertes Allel trägt und demnach gesund ist, liegt bei 25% (19).

1989 gelang die Sequenzierung des *CFTR*-Gens auf Chromosom 7, womit der Grundstein für die heute gängige molekulargenetische Diagnostik gelegt wurde (10,11). Das *CFTR*-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 7 lokalisiert, wo es die Position 7q31.2 einnimmt. Es beinhaltet 2300 Kilobasenpaare und 27 Exons, wobei die Transkriptionslänge der mRNA 6,5 Kilobasen beträgt. Die Exons sind von 1 bis 24 nummeriert, da die Exons 6b, 14b und 17b erst nachträglich beschrieben wurden (20). Die Translation ergibt aus 1480 Aminosäuren ein Protein, das als cAMP-abhängiger membranständiger Chloridkanal am apikalen Epithel sekretorischer Drüsen fungiert. Der CFTR-Ionenkanal zählt zu den ABC-Transportern (engl. „ATP-binding cassette“), die durch ATP-Bindung am Ionentransport durch die Zellmembran beteiligt sind. Der Ionentransport erfolgt durch einen Öffnungsprozess (engl. „gating“), der mit Phosphorylierung der regulatorischen Domäne des CFTR-Proteins durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase A eingeleitet wird. ATP wird gebunden und eine Dimerisierung findet statt, die CFTR-Kanalpore öffnet sich (21).

Nicht alle Mutationen im *CFTR*-Gen haben einen Krankheitswert, denn der ist stark davon abhängig, wie sehr die Funktion oder die Synthese des CFTR-Kanals beeinträchtigt ist. Weiters führen Deletionen von Exons oder frühzeitig geschriebene Stoppcodons – wie es bei Deletionen, Insertionen oder Missense-Mutationen der Fall ist – zu einer CF-Erkrankung. 90% aller CF-Patienten tragen die Mutation F508del auf mindestens einem

Allel, wo die Kodierung von Phenylalanin an Position 508 im Exon 10 aufgrund einer Deletion eines ganzen Basentriplets fehlt (12,22,23). Weiters gilt der sichere Ausschluss einer CF-Diagnose mittels molekulargenetischer Untersuchungen heutzutage als nicht möglich, da sich bestimmte Mutationen – wie Promotormutationen oder intronische Spleißmutationen - bisher im *CFTR*-Gen nicht nachweisen lassen (24).

Die *CFTR*-Mutationen werden in 6 verschiedene Mutationsklassen eingeteilt. Hierbei lässt sich ein direkter Zusammenhang zwischen Mutationsklasse und Intensität des *CFTR*-vermittelten Chloridtransports in der Zelle herstellen, welcher von Mutationsklasse I bis V stetig zunimmt (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: *CFTR*-Mutationsklassen

(25)

Mutations- klasse	<i>CFTR</i> -Defekt	Mutationsbeispiele
I	Keine/gestörte <i>CFTR</i> -Proteinsynthese	Nonsense-Mutationen Große Deletionen oder Insertionen G542X, W1282X, R553X
II	Fehlerhafte <i>CFTR</i> -Proteinverarbeitung	F508del, N1303K, G85E
III	Dysregulation des <i>CFTR</i> -Kanals („Gating-Mutation“)	G551D, G551S, S1255P
IV	Defekte Ionenleitfähigkeit des <i>CFTR</i> -Kanals	R117H, R334W, R347P
V	Reduzierte Synthese von funktionierendem <i>CFTR</i> -Protein	A455E, 2789+5G>A
unklassifiziert		Alle anderen Mutationen, inkl. der unbekannt

In den Mutationsklassen I, II und V stehen der Proteindefekt und die daraus folgende fehlerhafte Expression des *CFTR*-Proteins an der Zelloberfläche im Vordergrund und es kommt zu einer geringeren Anzahl funktionierender *CFTR*-Kanäle an der Zellmembran. Die Mutationsklassen III und IV bedingen zwar keine fehlerhafte Expression, jedoch aber eine Funktionsunfähigkeit durch Dysregulation oder defekte Ionenleitfähigkeit (25). Der Einsatz von *CFTR*-Modulatoren lässt sich anhand der Mutationsklassen sehr gut erklären: Ein *CFTR*-Potentiator kommt bei den Mutationsklassen III und IV zum Einsatz, um die bestehende *CFTR*-Funktion zu verbessern und die Öffnungswahrscheinlichkeit



zu erhöhen, während ein CFTR-Korrektor bei den Mutationsklassen I, II, und V verwendet wird, um die CFTR-Expression an der Zelloberfläche zu korrigieren.

Die genetische Abklärung muss jedenfalls die ethnische Herkunft des Patienten berücksichtigen, da das Mutationsspektrum des *CFTR*-Gens geographische und ethnische Unterschiede aufweist (24–26) (siehe Kapitel 1.2.).

Die Krankheitsintensität und bestimmte Symptomkomplexe können ebenso in Zusammenhang mit den Mutationsklassen gebracht werden. Hierbei lässt sich eindeutig feststellen, dass beispielsweise schwere Mutationen der Klassen I-III mit einer exokrinen Pankreasinsuffizienz einhergehen (PI-CF), während Patienten mit mildereren Mutationen der anderen Klassen sich klinisch als pankreassuffizient präsentieren (PS-CF). Die durchschnittliche CFTR-Restfunktion bei PI-CF-Patienten beträgt < 1%, bei PS-CF-Patienten beträgt sie bis zu 10%. Ein pathologischer Schweißtest mit < 60 mmol/L ergibt sich ab einer CFTR-Restfunktion von ungefähr 20% und darunter (17).

## 1.5 Diagnostik der CF

Für eine CF-Diagnosestellung ist jeweils ein Kriterium pro Kategorie zu erfüllen (26–30):

Tab. 1.2: CF-Diagnosekriterien

Kategorie 1	Kategorie 2
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mind. ein klinischer Hinweis auf eine CF</li> <li>• Positive Familienanamnesen (z.B. Geschwister mit CF)</li> <li>• Positives Neugeborenencreening (NBS)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zwei CF-verursachende <i>CFTR</i>-Mutationen</li> <li>• CFTR-Dysfunktion im CF-typischen Bereich               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Schweißchlorid &gt; 60mmol/L (bei mind. 2 Messungen)</li> <li>○ Pathologische CFTR-Funktionsdiagnostik (NPD/ICM)</li> </ul> </li> </ul>

Folgende Erkrankungen werden als klinischer Hinweis auf eine CF gedeutet:

Chronische sinopulmonale Erkrankungen:

- Chronischer Husten, zähes Sputum, Pfeifen als Auskultationsbefund
- Klinische Zeichen einer chron. Hypoxie (Trommelschlägelfinger, Uhrglasnägel)
- Pathologische Befunde in der radiologischen Bildgebung: Obstruktion, Emphysem, Bronchiektasien, Atelektasen

- Erregernachweis im Atemsekret: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staph. aureus*, Häm. infl., *Burkholderia cepacia*
- Chron. Rhinosinusitis

#### Gastrointestinale Erkrankungen:

- Exokrine Pankreasinsuffizienz, chron. Pankreatitis
- Mekoniumileus, Rektumprolaps, DIOS, Mikrokolon
- Chron. Lebererkrankungen, Leberzirrhose, portale Hypertension, Cholelithiasis, prolongierter neonataler Ikterus
- Dystrophie, Minderwuchs, Untergewicht, Entwicklungsstörungen
- Salzverlustsyndrom

#### Genitale Erkrankungen:

- Obstruktive Azoospermie (CBAVD)

Ein positives Neugeborenenenscreening führt am häufigsten zu einer CF-Diagnosestellung im Säuglingsalter. International existieren verschiedene Durchführungsstandards, hierbei werden allerdings zumeist die Konzentrationen der bei CF erhöhten Pankreasproteine immunreaktives Trypsinogen (IRT) und Pankreatitis-assoziiertes Protein (PAP) aus dem Kapillarblut untersucht.

Den Diagnostik-Goldstandard bildet der Schweißtest, welcher in erster Instanz im Diagnostikalgorithmus durchgeführt wird. Schweißchloridwerte  $\leq 29$  mmol/L sprechen gegen eine CF-Diagnose, Werte  $\geq 60$  mmol/L für eine CF-Diagnose. Sollte der Schweißtest einen Schweißchloridwert zwischen 30-59 mmol/L ergeben, so spräche dies für eine atypische CF (26). Hierzu lässt sich Näheres im Methodik-Kapitel 3.2 nachlesen. Die molekulargenetische Analyse steht im Prozess der Diagnosestellung bei der Verdachtsdiagnose einer Zystischen Fibrose an zweiter Stelle und bildet einen wichtigen Bestandteil. Sie soll zur Diagnosesicherung, Therapieplanung sowie zur Untersuchung von Familienmitgliedern betroffener Personen erfolgen (siehe auch Kapitel 1.4).

Ergibt die *CFTR*-Genanalyse keinen eindeutigen CF-Befund (d.h. 2 CF-verursachende Mutationen) oder der Schweißtest ein Ergebnis im diagnostischen Intermediärbereich (30-59 mmol/L), so wird eine elektrophysiologische Untersuchung mittels NPD oder ICM angeschlossen, um eine optimierte Diagnosestellung zu ermöglichen. Ergeben die Untersuchungen keine CF-typischen Ergebnisse, so kann eine CF als unwahrscheinlich angenommen werden. Ergeben die Untersuchungen den Befund einer eindeutigen

CFTR-Dysfunktion, so muss der Patient dennoch an ein CF-Zentrum angebunden werden und sollte sich regelmäßig zu Verlaufskontrollen vorstellen.

Folgend ist er Algorithmus der CF-Diagnosestellung zum Überblick vereinfacht graphisch dargestellt:

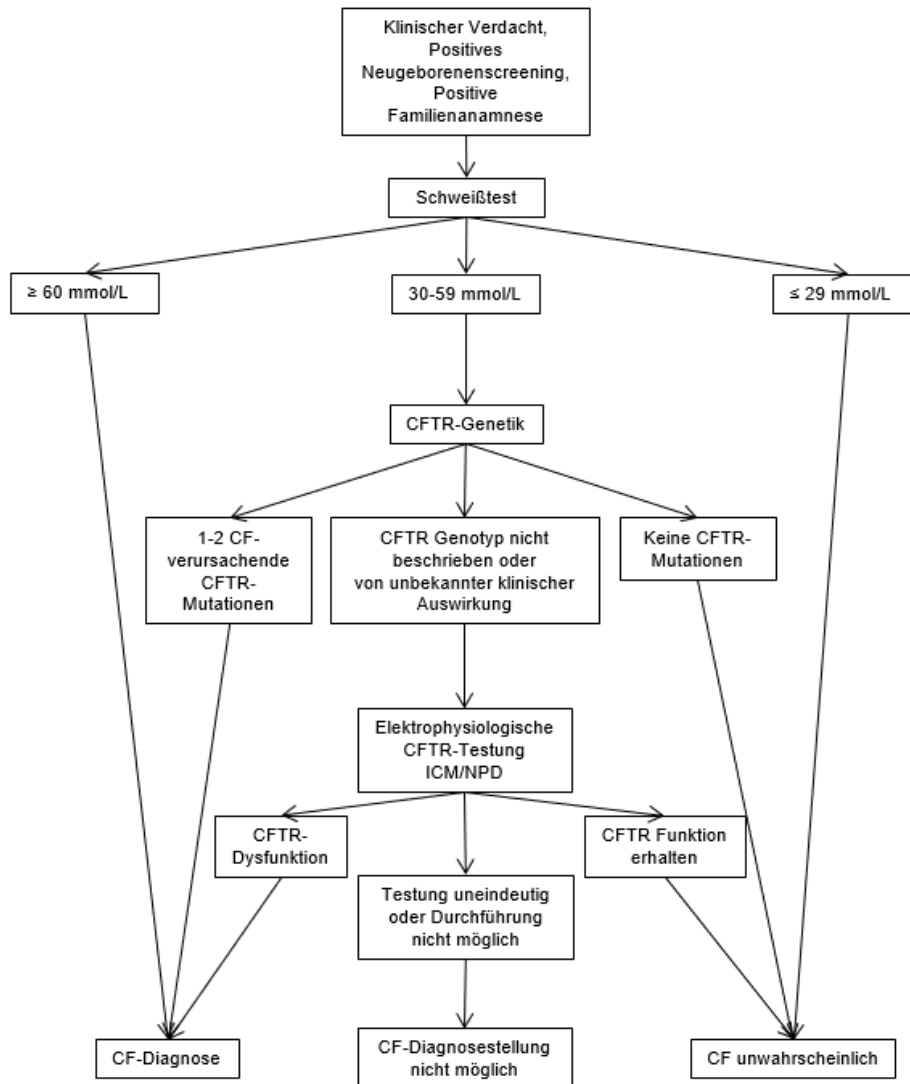


Abb. 1.2: CF-Diagnose-Algorithmus bei klinischem Verdacht

Frei modifiziert nach (29)

Zur Diagnostik und Therapie der CF bei Kindern in den ersten beiden Lebensjahren ist im Jahr 2020 eine neue S3-Leitlinie erschienen (31).

## 1.6 Klinik der CF

Die Klinik der CF ist sehr vielschichtig und betrifft verschiedene Organsysteme (1). Bei ungefähr 10% aller CF-Patienten setzt die Symptomatik unmittelbar nach der Geburt beispielsweise in Form eines Mekoniumileus ein. In frühen Kindheitsjahren dominieren in der Regel die pulmonalen und intestinalen Symptome. Zu den pulmonalen Manifestationen zählen anatomische Veränderungen und Destruktionen, die sich durch Bronchialobstruktion und chronische, infektbedingte Entzündungen (v.a. durch *Pseudomonas aeruginosa*, *Hämophilus Influenza*, *Staphylococcus aureus*) einstellen sowie die allergische bronchopulmonale Aspergillose (1). In radiologischer Bildgebung lassen sich teilweise schon in jungen Jahren Emphyseme, atelektatische Herde und Bronchiektasien darstellen (32). Die langjährige pulmonale Belastung führt von Lungenfibrose bis hin zu kardiovaskulären Manifestationen wie dem Cor pulmonale. Eine chronische Hypoxie führt zu körperlichen Manifestationen wie Trommelschlägelfinger oder Uhrglasnägel.

Im Bereich der intestinalen Symptomatik steht die Pankreasinsuffizienz sowie chronische Pankreatitiden im Vordergrund, eine daraus folgende Maldigestion und Malabsorption bildet oftmals die Grundlage für Untergewicht und Minderwuchs. Eine Organfibrose oder eine pathologische Glukosetoleranz im Sinne eines CF-assoziierten Diabetes mellitus kann im Laufe der Grunderkrankung auftreten. Viele Patienten leiden früh unter Rektumprolaps, Meteorismus, Invagination, Steatorrhoe oder dem distalen intestinalen Obstruktionssyndrom. Außerdem kann es durch Obstruktion der Gallenwege zu fokaler biliärer Fibrose und durch Rückstau der Gallenflüssigkeit zu Leberzirrhose kommen. Viele Patienten zeigen klinisch einen Pfortaderhochdruck, Ösophagusvarizen, eine Cholezystolithiasis, Gerinnungsstörungen durch Vitamin-K-Mangel, Fettverdauungsstörungen oder einen Mangel fettlöslicher Vitamine (E, D, A) (26).

Der HNO-Trakt ist ebenso betroffen, zumeist in Form von Polyposis nasi oder einer chronischen Pansinusitis (1).

Bei männlichen Patienten tritt zudem die CBAVD (kongenitale bilaterale Aplasie der Vas deferens) und die damit einhergehende Infertilität als Symptomkomplex auf. Die weibliche Fertilität ist deutlich weniger betroffen, Infertilität kommt seltener in Form von verdicktem Zervixschleim vor (33).

## **1.7 Therapie der CF**

### **1.7.1 Basistherapie der CF**

Sowie die CF als Erkrankung und in ihrer klinischen Präsentation sehr facettenreich ist, stellt sich auch die Therapie als multimodal und als Zusammenarbeit mehrerer Fachdisziplinen dar. So nehmen medikamentöse Therapieansätze einen wichtigen Stellenwert ein, doch auch die Physiotherapie und der Bewegungssport, sowie diätische Konzepte und Nahrungsergänzung stehen im Vordergrund (31,34).

Die Behandlung der Lungenbeteiligung hat zum Ziel, eine Verflüssigung des Mukus zu erreichen, in weiterer Folge Sekretstauungen zu vermeiden und zu beseitigen, sowie die Infektionen mit unterschiedlichen Erregerentitäten zu therapieren und nachhaltig die Abwehrkraft des Körpers gegen diese zu stärken. Eine Sekretolyse kann durch regelmäßige Inhalationen (hypertone Kochsalzlösung, 3-7%) zur Befeuchtung der Atemwege erreicht werden. Die Inhalation mit  $\beta_2$ -Sympathomimetika verringert die Obstruktion und wirkt einem Bronchospasmus entgegen. Eine antibiotische Therapie kann bei lokalen Infektionen inhalativ appliziert, bei systemischen Infektionen als intravenöse Infusionstherapie angewandt werden. Die intravenöse Infusionstherapie kann als Intervalltherapie bei banalen Infekten bei verschlechtertem Allgemeinzustand, als kontinuierliche Therapie bei Patienten mit anhaltend hoher Krankheitsintensität oder als Eradikationstherapie bei chronischer Besiedelung mit Problemkeimen wie beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa* eingesetzt werden (35).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Therapiekonzepts bei CF-Patienten bildet die Pankreasenzymsubstitution bei Pankreasinsuffizienz sowie eine diätische Einstellung der Nahrungszufuhr (Substitution der fettlöslichen Vitamine A, D, E, K; hochkalorische Nahrung). Die Physiotherapie und Atemtherapie spielen bei der selbstständigen Mobilisation der viskösen Sekrete und deren Ausscheidung durch den Patienten eine entscheidende Rolle (35).

### **1.7.2 CFTR-Modulatoren als Therapie des CFTR-Basisdefekts**

Seit einigen Jahren treten die CFTR-Modulatoren mit deren direkter Wirkung auf den CFTR-Protein-Basisdefekt in den Vordergrund. Hierbei wird zwischen sogenannten Potentiatoren (Ivacaftor) und Korrektoren (Lumacaftor, Tezacaftor, Elexacaftor) unterschieden. Potentiatoren verbessern die CFTR-Kanal-Öffnung und ermöglichen so einen vermehrten Ionenaustausch. Korrektoren verbessern hingegen die CFTR-Protein-

Faltung sowie den Proteintransport zur Zelloberfläche, weshalb ein vermehrter Einbau von intakten CFTR-Kanälen in die Zellmembran gewährleistet wird.

*Tab. 1.3: Übersicht zugelassener CFTR-Modulatoren nach der European Medicines Agency (EMA)*

(36)

<b>CFTR-Modulator</b>	<b>Wirkstoffe</b>	<b>Mutationen</b>
Kalydeco®	Ivacaftor	9 Klasse III-Mutationen: G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N, S549R, R117H
Orkambi®	Ivacaftor Lumacaftor	F508del homozygot
Symkevi®/ Symdeco®	Ivacaftor Tezacaftor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• F508del homozygot</li> <li>• F508del heterozygot in Kombination mit: P67L, R117C, L206W, R352Q, A455E, D579G, 711+3A&gt;G, S945L, S977F, R1070W, D1152H, 2789+5G&gt;A, 3272 26A&gt;G, 3849+10kbC&gt;T</li> </ul>
Trikafta®/ Kafrio®	Ivacaftor Tezacaftor Elexacaftor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• F508del homozygot</li> <li>• F508del heterozygot + Minimalfunktionsmutation</li> </ul>

Eine Vielzahl an CFTR-Modulatoren befinden sich gegenwärtig in Erprobung und in Zulassungsstudien (37).

## 2 Forschungsfragen

Die folgende Arbeit setzt sich die Therapieeffektbeurteilung unter CFTR-Modulatoren-Therapie bei Patienten mit häufigem *CFTR*-Genotyp einerseits und die optimierte Diagnosestellung bei Patienten mit seltenem *CFTR*-Genotyp andererseits zum Ziel.

Folgende Forschungsfragen sollen anhand der Untersuchungen in Patientengruppe A in vorliegender Arbeit beantwortet werden:

- Verbessern neuartige Therapieansätze zur Behandlung des CFTR-Basisdefekts die CFTR-Funktion und kann der kurzfristige Therapieeffekt anhand von intestinaler Kurzschlussstrommessung sowie Änderung von Schweißchlorid und klinischen Parametern beurteilt werden? Profitiert der Patient von einer Behandlung mit Lumacaftor/Ivacaftor schon innerhalb von vier Wochen?

Folgende Forschungsfragen sollen anhand der Untersuchungen in Patientengruppe B in vorliegender Arbeit beantwortet werden:

- Wie kann auf den Krankheitswert einer seltenen *CFTR*-Mutation mit unklarer klinischer Konsequenz geschlossen werden? Kann Patienten mit seltenen *CFTR*-Mutationen mit Hilfe von CFTR-Funktionsdiagnostik wie nasaler Potentialdifferenzmessung und intestinaler Kurzschlussstrommessung eine optimierte Diagnosestellung ermöglicht werden?

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Patientenkollektiv

Die Gesamtanzahl der Patienten in der untersuchten Population beträgt 19 Patienten. Die Gesamtpopulation teilt sich in zwei Gruppen (Patientengruppe A und Patientengruppe B) auf. Der Zeitraum der Untersuchungen sowie der Erhebung der klinischen Daten der genannten Population belief sich bei Gruppe A auf die Zeit von April 2016 bis Februar 2017 (= 11 Monate) und bei Gruppe B auf die Zeit von April 2016 bis September 2016 (= 6 Monate) (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Überblick Patientengruppe A und Patientengruppe B

	Patientengruppe A	Patientengruppe B
<b>Anzahl der Patienten</b>	n=9	n=10
<b>Alter [Jahre]</b>		
<b>Mittelwert</b>	28,0 (17-45)	16,9 (1-50)
<b>Geschlecht</b>		
<b>weiblich</b>	n=5 (55,6%)	n=3 (30%)
<b>männlich</b>	n=4 (44,4%)	n=7 (70%)
<b>Genotyp</b>		
<b>F508del auf einem Allel</b>	n=0 (0%)	n=4 (40%)
<b>F508del auf zwei Allelen</b>	n=9 (100%)	n=0 (0%)
<b>CFTR-Funktionsmessung</b>		
<b>NPD</b>	n=0 (0%)	n=7 (70%)
<b>ICM</b>	n=9 (100%) Baseline	n=10 (100%)

##### 3.1.1 Patientengruppe A

In Patientengruppe A willigten anfangs 12 Patienten zur Teilnahme an der Studie und der Baseline-Messung ein, bei 9 Patienten schlossen sich die Follow-Up-Messungen an, 3 Patienten beendeten die Therapie mit Lumacaftor/Ivacaftor vor Vollendung der vier Wochen (Abb. 3.1).

Die Forschungsfragen in folgender Arbeit wurden daher an 9 Patienten überprüft. 9 CF-Patienten, die homozygot die *CFTR*-Mutation F508del aufweisen, wurden zu zwei Zeitpunkten untersucht – vor (Baseline) und 4 Wochen nach Beginn (Follow-Up) der erstmaligen Therapie mit dem neuen CFTR-Korrektor Lumacaftor in Kombination mit dem CFTR-Potentiator Ivacaftor. Klinische Parameter (BMI, FEV1), CFTR-Biomarker (Schweißtest, ICM) und das subjektive Krankheitsgefühl der Patienten wurden zu Therapiebeginn und vier Wochen nach Therapiebeginn evaluiert.



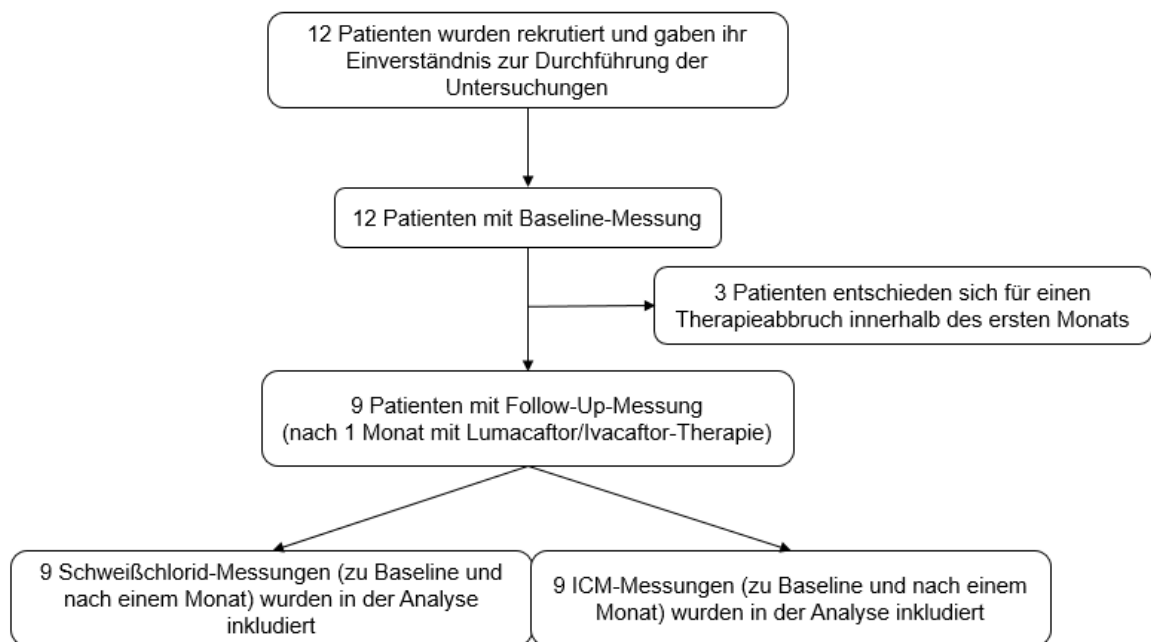


Abb. 3.1: Flow Chart Patientengruppe A

Als Voraussetzung zur Teilnahme galt die Vollendung des 12. Lebensjahres, die Unterzeichnung einer Zustimmungserklärung sowie keine vorausgehende Behandlung mit Lumacaftor/Ivacaftor. Im Falle einer Unmündigkeit wurde die Zustimmungserklärung von den Erziehungsberechtigten unterschrieben. Ausschlusskriterien zu oben genannten Untersuchungen sind detailliert in den Kapiteln 3.2.3, 3.4.3 und 3.5.3 beschrieben. Der Untersuchungszeitraum belief sich auf 6 Monate (April 2016 bis September 2016). Zur Durchführung des Projekts und der im Projekt verwendeten diagnostischen Standard-Methoden lag ein Ethikvotum der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin vor (EA2/107/11 - CFTR-Funktionsanalyse für Diagnose und präklinische Evaluation pharmakologischer Korrektoren des Basisdefekts bei Cystischer Fibrose). Die zugelassene therapeutische Medikationsdosis der Patienten betrug während des Untersuchungszeitraumes 400mg Lumacaftor in Kombination mit 250mg Ivacaftor zweimal pro 24 Stunden in einem Abstand von 12 Stunden.

Demographische sowie klinische Charakteristika zu Baseline und nach einem Monat sind in Tab. 4.1 zusammengefasst. Das mittlere Alter des Patientenkollektivs (n=9) betrug 28,0 Jahre, 55,6% (n=5) der Patienten waren weiblich.

### 3.1.2 Patientengruppe B

In Patientengruppe B wurde bei 10 Patienten mit seltenem *CFTR*-Genotyp und unklarer Diagnose mittels nasaler Potentialdifferenzmessung (NPD) und ICM die *in vivo/ex vivo* *CFTR*-Funktion bestimmt und die Diagnose-Klassifikation präzisiert. Die klinischen Merkmale der Patienten wurden erhoben, die *CFTR*-Funktion wurde anhand von Schweißtest, NPD und ICM (wie in Kapitel 3.2, 3.4 und 3.5 beschrieben) gemessen. Der genetische Befund wurde gesichtet und anhand von *CFTR*-Mutationsdatenbanken (Kapitel 3.3.2) evaluiert. Als Voraussetzung zur Teilnahme galt die Unterzeichnung einer Zustimmungserklärung sowie ein zur Untersuchung geeigneter Genotyp des Patienten, anhand dessen die Diagnose nicht ausreichend zu klären war. Im Falle einer Unmündigkeit wurde die Zustimmungserklärung von den Erziehungsberechtigten unterschrieben. Ausschlusskriterien zu oben genannten Untersuchungen stehen detailliert in den Kapiteln 3.2.3, 3.4.3 und 3.5.3 beschrieben. Der Untersuchungszeitraum belief sich auf 11 Monate (April 2016 bis Februar 2017). Zur Durchführung des Projekts und der darin verwendeten Methoden lag ein Ethikvotum der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin vor (EA2/107/11 - *CFTR*-Funktionsanalyse für Diagnose und präklinische Evaluation pharmakologischer Korrektoren des Basisdefekts bei Cystischer Fibrose).

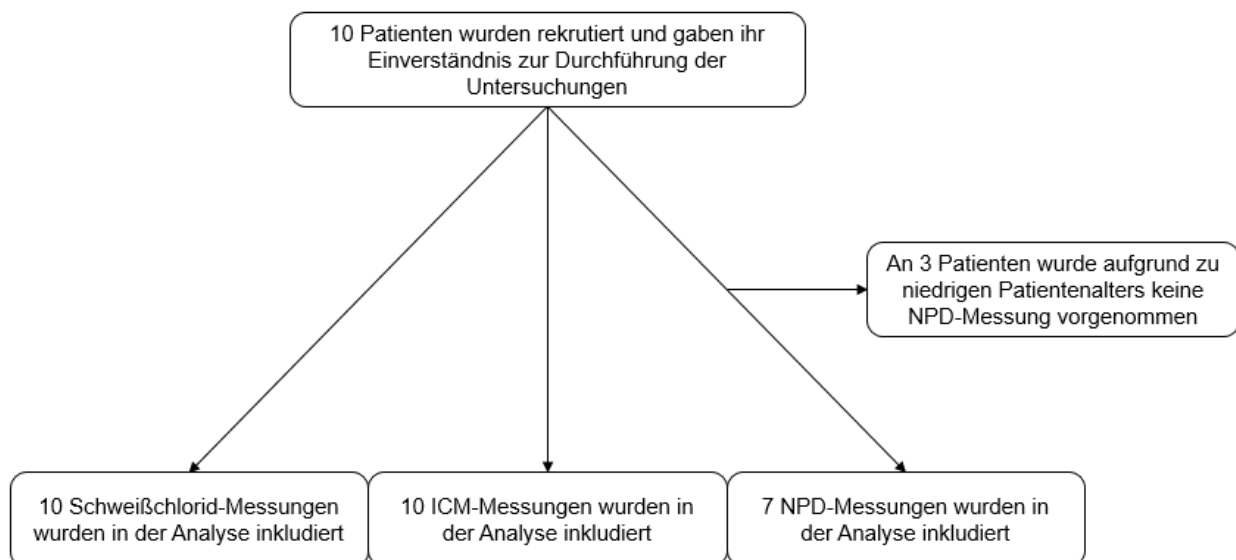


Abb. 3.2: Flow-Chart Patientengruppe B

Bei allen 10 Patienten der Patientengruppe B konnten eine Schweißchlorid Messung sowie ICM-Messung durchgeführt werden, bei 3 Patienten musste aufgrund des zu niedrigen Patientenalters auf die Durchführung einer NPD-Messung verzichtet werden

(Abb. 3.2). Demographische sowie klinische Charakteristika sind in Tab. 4.4, die genetischen Varianten in Tab. 4.5 zusammengefasst. Das mittlere Alter des Patientenkollektives betrug 16,9 Jahre und 30% (n=3) der Patienten waren weiblich.

## **3.2 Schweißtest**

### **3.2.1 Methode**

Der heutzutage praktizierte Schweißtest als Pilocarpin-Iontophorese geht auf die erstmalig beschriebene Methode nach Gibson und Cook (38) zurück, welche nach wie vor als etablierter Goldstandard zur Diagnostik der CF eingesetzt wird (26). Pilocarpin ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der direkten Parasympathomimetika zur lokalen Stimulation der  $\beta$ -adrenergen Schweißsekretion (38). Im Schweißtest können verschiedene Parameter, wie Chlorid- und Natriumionenkonzentration sowie Osmolarität oder Leitfähigkeit im menschlichen Schweiß gemessen werden. Hierbei steht die Messung der Chloridionenkonzentration als diagnostischer Parameter im Vordergrund, da er als einziger zur Diagnosesicherung der Mukoviszidose zulässig ist (26).

Um eine ausreichende Aussagekraft bei diagnostischer Anwendung eines Schweißtestes zu erzielen, sind genau definierte Voraussetzungen einzuhalten: Das Lebensalter des Patienten sollte sich auf mindestens zwei Tage (3. Lebenstag), im Idealfall auf 14 Lebenstage im Falle einer Frühgeburtlichkeit belaufen. Das Körpergewicht des Patienten sollte mindestens 3000g betragen, der Patient sollte gut hydriert sein, keine Ekzeme oder Ödeme an den zu untersuchenden Hautstellen aufweisen. Eine Durchführung auf dem rechten und dem linken Arm erhöht die Auswertbarkeit und die Praktikabilität vor allem im Hinblick auf das Neugeborenencreening (26).

Des Weiteren zeichnet sich der Schweißtest durch seine hohe Verfügbarkeit, sowie der altersunabhängigen Durchführbarkeit bei hoher Sensitivität (96,5%) und hoher Spezifität (99%) aus (26).

### **3.2.2 Material und Durchführung**

Der Schweißtest wurde als Pilocarpin-Iontophorese mit Hilfe des Macroduct®-Systems gemäß der Leitlinie des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) von 2009 (dritte Edition) durchgeführt. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach genannter Quelle umgesetzt und befinden sich ebendort zur Einsicht.

Die laborchemische Analyse zur Feststellung der Chloridionenkonzentration des Schweißes der in dieser Arbeit untersuchten Patientengruppen erfolgte durch das Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum.

Tab. 3.2: Benötigte Materialien zur Durchführung eines Schweißtests

Material/Technische Ausstattung	Hersteller/Anbieter
Macroduct® Iontophoresegerät, 3700-SYS, Best.-Nr. 72102598, Iontophoresestrom 1,5 mA (max.)	ELITechGroup (Wescor)
Elektrodensatz, Best.-Nr. 320566	ELITechGroup (Wescor)
Elektroden-Befestigungsbänder, Best.-Nr. RP-044 (rot), Best.-Nr. RP-045 (schwarz)	ELITechGroup (Wescor)
Macroduct® Klettbänder <ul style="list-style-type: none"> <li>• Klein (L.: 14 cm), Best.-Nr. SS-128</li> <li>• Mittel (L.: 18 cm), Best.-Nr. SS-129</li> <li>• Groß (L.: 25 cm), Best.-Nr. SS-130</li> <li>• Extra groß (L.: 39cm), Best.-Nr. SS-131</li> </ul> <i>Verwendung abhängig von Patientengröße/Armdicke</i>	ELITechGroup (Wescor)
Macroduct® Schweißsampler, Best.-Nr. SS-124	ELITechGroup (Wescor)
Pilogel®-Scheiben ( <i>gekühlt</i> ), Best.-Nr. SS-023	ELITechGroup (Wescor)
Schweiß-Dispenser, Best.-Nr. RP-065	ELITechGroup (Wescor)
Schneidzange, Best.-Nr. RP-066	ELITechGroup (Wescor)
Verschlusseprouvetten, Best.-Nr. SS-107	ELITechGroup (Wescor)
Aqua ad iniectabilia (10 ml)	Braun
Hautdesinfektionsmittel Hier: Softasept N Hautdesinfektionsmittel 74,1% Ethanol (250 ml)	Braun

### 3.2.3 Auswertung, Referenzbereich und Qualitätskriterien

Die Auswertung eines Schweißtestes bezieht sich auf die im Schweiß gemessene Chloridionenkonzentration und wird in mmol/L angegeben. Ergibt der Schweißtest eine Chloridionenkonzentration von  $\leq 29$  mmol/L kann eine CF-Diagnose weitgehend ausgeschlossen werden, ergibt sich jedoch ein Wert von  $\geq 60$  mmol/L ist eine CF-Diagnose sehr wahrscheinlich (26,29). Eine Limitation dieser Methode stellt der diagnostische Graubereich zwischen 30 mmol/L - 59 mmol/L dar. Weist ein Patient eine Chloridionenkonzentration in genanntem diagnostischen Graubereich auf, so sind weitere Diagnoseschritte erforderlich.

Es kann zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen im Schweißtest kommen, ein Auszug der Ursachen hierfür wird folgend dargestellt (Tab. 3.3 und Tab. 3.4).

*Tab. 3.3: Ursachen falsch-positiver Ergebnisse im Schweißtest*

(39,40)

- Malnutrition (Anorexia nervosa, Protein-Mangelernährung)
- Dehydratation
- Minderwuchs, psychosoziale Gedeihstörung
- Atopische Dermatitis
- Autonome Dysfunktion
- Ektodermale Dysplasie
- Speicherkrankheiten (Familiäre Cholestase-Fucosidose, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel, Glykogenose, Mauriac Syndrom, Mucopoly-saccharose Typ I)
- Familiäre Cholestase
- Unbehandelte Nebenniereninsuffizienz
- Pseudohypoaldosteronismus
- Unbehandelte Hypothyreose
- Diabetes insipidus renalis, Nephrose
- Langzeit-PGE1-Infusion
- Hypogammaglobulinämie
- Klinefelter-Syndrom
- Nikotin-Abusus
- Methodisch-technische Fehler

*Tab. 3.4: Ursachen falsch-negativer Ergebnisse im Schweißtest*

(39,40)

- Ödeme an der Teststelle (Unterarm)
- Methodische Fehler (z.B. „QNS“ = quantity not sufficient = zu geringe Schweißmenge)
- Technische Fehler

Um eine valide und aussagekräftige Schweißchloridtestung zu erreichen, müssen die Qualitätskriterien bei Durchführung und Auswertung beachtet werden: die erforderliche Mindestschweißmenge nach jeweils 30-minütiger Sammelzeit beträgt 15µL pro Arm. Aus den laborchemischen Einzelergebnissen beider Arme wurde in vorliegender Arbeit zur Interpretation der Mittelwert berechnet (41).

### **3.3 Mutationsanalyse**

#### **3.3.1 Molekulargenetik**

Die molekulargenetische Untersuchung der Patientengruppe erfolgte zum größten Teil durch das Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité – Universitätsmedizin Berlin. In Einzelfällen wurde die genetische Abklärung im Vorfeld außer Haus betrieben.

Der bei der untersuchten Patientengruppe in Anwendung getretene Untersuchungsalgorithmus umfasste in der Regel als ersten Schritt eine Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (Multiplex-PCR) in Kombination mit einem Oligonukleotid-Ligation-Assay (OLA), um hiermit die über 30 häufigsten *CFTR*-Mutationen (hierbei Häufigkeit >1%) zu detektieren. Dieser Schritt erlaubt eine CF-Diagnose-Sicherung bei etwa 81% der untersuchten Patienten in Deutschland (26).

Konnte im ersten Schritt kein Nachweis einer *CFTR*-Mutation erfolgen oder nur der Nachweis einer *CFTR*-Mutation auf einem Allel, so wurde als zweiter Schritt eine Sequenzierung sowie eine multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA) des *CFTR*-Gens durchgeführt. Eine direkte Sequenzierung aller kodierenden DNA-Abschnitte, wie Exons und Exon-Intron-Übergänge, birgt die höchste Testsensitivität unter den genannten molekulargenetischen Methoden. Eine Sequenzierung jedoch ermöglicht keinen Nachweis exonübergreifender Deletionen, Duplikationen oder DNA-Methylierungsstörungen, weshalb die MLPA-Analyse hinzugezogen wurde, da hierbei eine mengenmäßig veränderte genomische Zielsequenz, die durch eine Deletion oder Duplikation verursacht wurde, mit Hilfe einer Multiplex-PCR-Variante detektiert werden kann (42).

Die Sequenzierung sowie die MLPA-Analyse sind oftmals mit höheren Kosten und aufwendigerer Logistik und Apparatur verbunden, weshalb nicht jedes CF-Patienten betreuende Zentrum solch eine erweiterte Diagnostik bereitstellen kann. Eine Durchführung dieser Untersuchungen sollte dennoch angestrebt werden, da sie bei 98% der CF-Patienten zum Nachweis zweiter *CFTR*-Mutationen führen und somit eine CF-Diagnose und Therapieeinstellung auf schnellstmöglichem Wege erlauben (26,42).

#### **3.3.2 *CFTR*-Mutationsdatenbanken**

Die Bedeutung der *CFTR*-Mutationen im Hinblick auf ihre Auswirkung auf den klinischen Phänotyp der Patienten (CF-verursachend, nicht-CF-verursachend) wurden in der

vorliegenden Arbeit anhand dreier *CFTR*-Mutationsdatenbanken evaluiert: Cystic Fibrosis Mutation Database (43), CFTR2 (9) und CFTR-France (44). In diesen Datenbanken können Mutationen anhand ihres „coding“-Namens (cDNA name), Proteinnamens (protein name) oder Nennnamens (legacy name) herausgesucht werden (45). Die Cystic Fibrosis Mutation Database gilt als Nachschlagewerk aller Mutationen und stellt Einzelfallbeschreibungen (engl. „case reports“) und weiterführende Links zu beschreibenden Publikationen bereit (43). CFTR2 dient zur Klassifizierung häufiger *CFTR*-Genotypen und deren Bedeutung für den klinischen Phänotyp sowie die Krankheitsintensität der Mutation. CFTR2 teilt die Mutationen in CF-verursachend („CF-causing“), nicht-CF-verursachend („non-CF-causing“) oder in Mutationen mit variierender klinischer Konsequenz („varying clinical consequence“) ein (9). CFTR-France trifft folgende Einteilung für *CFTR*-Mutationen (44): nicht-krankheitsverursachend („non disease-causing“), *CFTR*-RD-verursachend („*CFTR*-RD causing“), variierende klinische Konsequenz („varying clinical consequence“ - resultiert in einer *CFTR*-RD oder CF), nicht-CF-verursachend („non disease-causing“) und Mutationsvarianten mit unbekannter klinischer Signifikanz („variants of unknown clinical significance“ – VUS). Als VUS sind Mutationen bezeichnet, deren Klassifizierung aufgrund zu weniger oder insuffizienter Daten nicht erfolgen kann.

In der vorliegenden Arbeit gelten *CFTR*-Genotyp-Kombinationen, die bei  $\leq 6$  Patienten weltweit in der Datenbank CFTR2 (9) beschrieben wurden, als selten. Betrachtet wurde die Kombination aus den beiden Mutationen, die sich einzeln auf jeweils einem Allel befinden.

### **3.4 Intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM)**

#### **3.4.1 Methode**

Die ICM als elektrophysiologische Messmethode der *CFTR*-Funktion rückte in den letzten 30 Jahren immer mehr in den Vordergrund, die Methode wurde stetig weiterentwickelt und adaptiert (46–50). Das Prinzip dieser Methode liegt in der ex vivo Messung des transepithelialen Kurzschlussstroms an in zirkulierenden Ussingkammern eingespannten Rektumschleimhautbiopsien. Anhand der sich daraus ergebenden Potentialdifferenzen und deren Änderung durch pharmakologische Stimulation wird die *CFTR*-Funktion bemessen (46,51).

In Kombination mit der NPD findet die ICM als Diagnosemethode bei Patienten mit Schweißchloridwerten im diagnostischen Graubereich (30-59 mmol/L), bei Patienten mit fehlendem molekulargenetischen Mutationsnachweis oder zur optimierten Diagnosestellung bei seltenen *CFTR*-Genotypen mit unbekannter Auswirkung auf den klinischen Phänotyp Anwendung (26). Eine Validierung sowie Referenzwertbeschreibung ist bereits erfolgt (48,49), die bei Kombination verschiedener Parameter eine Sensitivität und Spezifität von 100% zeigt (26). Darüber hinaus wurde die ICM-Methode in den, im internationalen Konsens entwickelten, diagnostischen Algorithmus eingepflegt (29).

Zudem gilt die Methode aufgrund ihrer Reproduzierbarkeit bei standardisierter Ausführung als besonders geeignet für die präklinische Testung von *CFTR*-Modulatoren im Rahmen klinischer Studien sowie zur ex-vivo-Effektbeurteilung derer (22,52,53).

Auch die ICM, ähnlich der NPD, ist mit einem hohen Zeitaufwand und einem intensiven Know-how verbunden, daher kann sie nur an Spezialzentren durchgeführt werden. Vorteilhaft an der ICM gegenüber der NPD ist das wesentlich weniger zeitintensive Prozedere am Patienten selbst, welches nur wenige Minuten beträgt. Einen weiteren großen Vorteil der ICM bildet die altersunabhängige Durchführbarkeit, womit die ICM eine sehr gute Alternative zur NPD für die Untersuchung von Säuglingen und Kleinkindern darstellt (26).

Vor der Untersuchung ist eine ausführliche Anamnese zu erheben. Dabei sollte besonderes Augenmerk auf Kontraindikationen wie zum Beispiel Hämorrhoiden, Gerinnungsstörungen oder wiederholt rektale Blutungen gelegt werden. Wichtig zu erfragen ist zudem die Medikamentenanamnese, genauer die Einnahme antiallergischer Medikation, da diese die zelluläre Reaktion der Schleimhautbiopsien während der Messung bei Stimulation mit Histamin beeinträchtigen kann.

Für die ICM existiert ein europäischer Durchführungsstandard (ECFS ICM SOP 2011 (54)), unter dessen Anwendung die *CFTR*-Funktion mit Genotyp und Phänotyp korreliert (55) und eine klare Unterscheidung zwischen der Diagnose „CF“, „CF mit Restfunktion“ sowie „non-CF“ getätigt werden kann (26,30,49,56).

### **3.4.2 Material und Durchführung**

Die ICM wurde nach dem internationalen und multizentrisch standardisierten Durchführungsprotokoll der European Cystic Fibrosis Society (ECFS ICM SOP 2011 (54)) gemessen. Die folgenden Materialien wurden hierfür benötigt:



Tab. 3.5: Entnahme, Transport der Rektumschleimhautbiopsien, Einspannen des Gewebes in Ussingkammern

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

Tab. 3.6: Substanzen und Reagenzien

Substanz	Summenformel	Molekulargewicht [g/mol]	Hersteller/Anbieter
Amilorid HCl (5 g) Pr.-Nr.: A7410	$C_6H_8ClN_7O \times HCl$	266	Sigma-Aldrich
Forskolin (50 mg) Pr.-Nr.: F6886	$C_{22}H_{34}O_7$	410	Sigma-Aldrich
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) (1 g) Pr.-Nr.: I5879	$C_{10}H_{14}N_4O_2$	222	Sigma-Aldrich
Genistein (100 mg) Pr.-Nr.: G6649	$C_{15}H_{10}O_5$	270	Sigma-Aldrich
Carbamoylcholinchlorid (Carbachol, CCH) (10 g) Pr.-Nr.: C4382	$C_6H_{15}ClN_2O_2$	183	Sigma-Aldrich
4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedischwefelsäure (DIDS) (1 g) Pr.-Nr.: D3514	$C_{16}H_8N_2Na_2O_6S_4$	499	Sigma-Aldrich
Histamindihydrochlorid (Histamin) (10 g) Pr.-Nr.: H7250	$C_5H_9N_3 \times 2HCl$	184	Sigma-Aldrich

Tab. 3.7: Ussingkammern und deren Inbetriebnahme

Material/Technische Ausstattung	Hersteller/Anbieter
EasyMount Low Volume Ussingkammersystem, Pr.-Nr.: EM-LVSY8-8 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fundament, Temperatur-Anschlussstück für 8-Kammersystem</li> <li>• Low-Volume-EasyMount-Diffusionskammer (8 Stk.), Arbeitsvolumen: 2 ml/Kammerseite, Pr.-Nr.: P2400</li> <li>• Ag/AgCl-Elektroden set für EasyMount-Kammersystem (8 Stk.)                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ gesinterte Ag/AgCl-Pelletelektroden (4 Stk.) zur Messung der Spannung</li> <li>○ Ag-Drahtelektroden (4 Stk.) zur Messung der Stromstärke</li> <li>○ Elektrodenspitzen (16 Stk.), Pr.-Nr.: P2020-S</li> </ul> </li> </ul>	Physiological Instruments
Slider für Saugbiopsien (8 Stk.) Öffnungsdurchmesser: 1,5 mm (Fläche: 0,018 cm <sup>2</sup> ) Pr.-Nr.: P2047C	Physiological Instruments
Slider für kleine Saugbiopsien (8 Stk.), Öffnungsdurchmesser: 1,2 mm (Fläche: 0,011 cm <sup>2</sup> ) Pr.-Nr.: P2407B	Physiological Instruments
Reserveelektrodenspitzen (100 Stk.) für die Ag/AgCl-Elektroden Pr.-Nr.: P2023	Physiological Instruments
Noble Agar (250 g) für die Elektrodenspitzen, Pr.-Nr.: A5431	Sigma-Aldrich
Nadel mit weicher Spitze (20x), 15 G x 3", zum Lösungstausch in den EasyMount-Kammern, Pr.-Nr.: FN15	Physiological Instruments
Mehrkanalige Spannungs- und Stromklemme (Voltage Clamp) Pr.-Nr.: VCC MC8 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Klemmmodul, Pr.-Nr.: MC601</li> <li>• Eingangsmodul, Pr.-Nr.: DM MC6</li> </ul>	Physiological Instruments
Zirkulierendes, temperaturkontrolliertes Wasserbad	Julabo
Carbogengas (50 L) (95% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> )	Linde

Tab. 3.8: Datenaufzeichnung

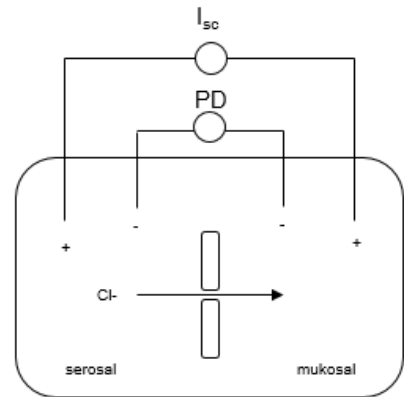
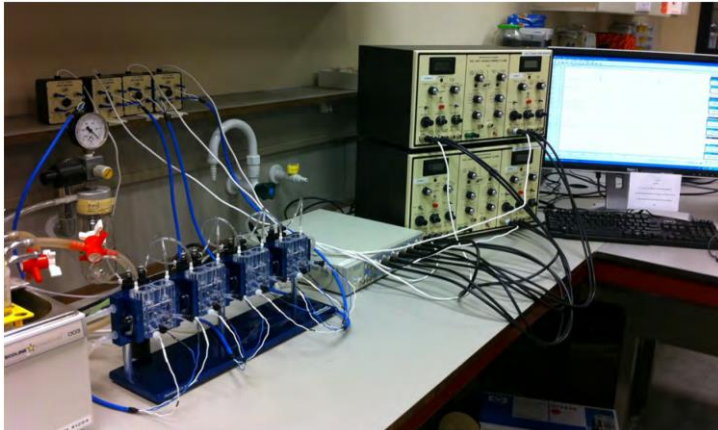
Material/Technische Ausstattung	Hersteller/Anbieter
PowerLab 8/30, LabChart Software (Version 7.2, Oktober 2010)	AD Instruments
Stand-PC, Software: Windows XP (2003)	LG

Tab. 3.9: Substanzen zur Herstellung des Meyler-Puffers

Substanz	Summenformel	Konzentration [mmol]	Molekulargewicht [g/mol]	Hersteller/Anbieter
Aqua destillata (30 l) als Stammlösung Pr.-Nr.: 3478.3	H <sub>2</sub> O		18	Roth
Hepes (250 g) Pr.-Nr.: H3375	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	10	238	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei (500 g) Pr.-Nr.: S9763	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3	142	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat, wasserfrei (500 g) Pr.-Nr.: S8282	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4	120	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid -Hexahydrat (1 kg) Pr.-Nr.: M9272	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	1	203	Sigma-Aldrich
Kalziumchlorid - Dihydrat (1 kg) Pr.-Nr.: C3881	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,3	147	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (5 kg) Pr.-Nr.: P4504	KCl	4,7	75	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (1 kg) Pr.-Nr.: 71381	NaCl	128	58	Sigma-Aldrich
Natriumbikarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	20,2	84	Sigma-Aldrich
D-Glukose (1 kg) <sup>1</sup> Pr.-Nr.: G7528	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	10	180	Sigma-Aldrich
Indomethacin (25 g) <sup>1,2</sup> Pr.-Nr.: I828	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>4</sub>	0,01	358	Sigma-Aldrich

Anmerkung: Die Osmolarität des Meyler-Puffers betrug 300 mosmol/l, der pH-Wert 7,4.

D-Glukose und Indomethacin dienen zur Anreicherung des Puffers und stellen keine Ursprungsbestandteil des Meylerpuffers dar.<sup>2</sup> Indomethacin ist ein NSAR und unterbindet als solches die endogene cAMP-Produktion durch Hemmung der Prostaglandinsynthese als Folge nichtselektiver Inhibition der Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX -1 und COX-2) (57).



Von links nach rechts aus: ECFS ICM SOP 2011, Version 2.7 (54)

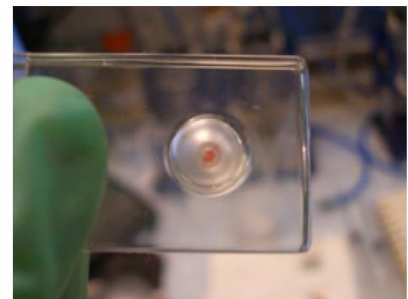
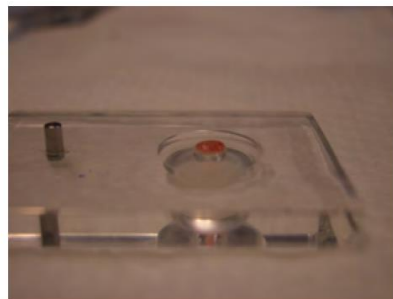
*Abb. 3.3: Aufbau der ICM*

(Erwärmtes Wasserbad, Gasauslass, Ussingkammersystem für 4 Biopsien, PowerLab, voltage clamp, Stand-PC)

*Abb. 3.4: Elektrophysiologischer Aufbau einer Ussingkammer*

Frei modifiziert nach (58)

Legende:  $I_{sc}$ = Intestinaler Kurzschlussstrom; PD= Potentialdifferenz; - = negative Ladung; + = positive Ladung;  $Cl^-$  = Chloridionen, serosal = serosale Gewebeseite; mukosal = mukosale Gewebeseite



Von links nach rechts aus: ECFS ICM SOP 2011, Version 2.7 (54)

*Abb. 3.5: ICM-Slider für Saugbiopsien (P2407C)*

*Abb. 3.6: ICM-Slider mit eingelegter Biopsie (P2407C)*

*Abb. 3.7: ICM-Slider mit eingelegter Biopsie (P2407C)*

### Funktionsweise der ICM

Für die Untersuchung eines Patienten wurden 4-8 Saugbiopsien (Durchmesser pro Biopsie 2-3 mm) mit Hilfe einer Rektumsaugbiopsiezange an der rektalen Mukosa entnommen. Die Lagerung nach Entnahme sowie der Transport der Gewebeproben in die Laborräumlichkeiten erfolgten in einer auf Eis gelagerten DPBS

Transportpufferlösung. Die DPBS wurde kurz vor Biopsieentnahme mit Indomethacin, zur Inhibierung der endogenen cAMP-vermittelten Chloridsekretion, versetzt. Die Biopsien wurden in die Ussingkammern eingespannt, es folgte eine Inkubation mit Meyler-Puffer (Tab. 3.9). Der Meyler-Puffer wurde vor Beginn der Inkubation mit Indomethacin und Glukose, als Zellenährstoff, angereichert. Um die Biopsien für den Messzeitraum in möglichst physiologischen Bedingungen zu erhalten, fand die Inkubation bei 37°C und unter stetiger Applikation eines Gasgemisches (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) statt.

Im Zuge der Messung wurde der transepitheliale Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) als direkter Marker des Ionentransports entlang des Epithels und die basale Potentialdifferenz jeder Biopsie (basal PD) und deren basaler Widerstand (basal Rt) detektiert. Die durch sukzessive Applikation verschiedener Substanzen auf die mukosale (M) oder serosale (S) Seite jeder Biopsie bewirkte Veränderung des  $I_{sc}$  wurde stetig aufgezeichnet.

Applizierte Substanzen:

1. Amilorid: kaliumsparendes Diuretikum; Inhibierung der ENaC-vermittelten Natriumabsorption (59).
2. Forskolin/3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX): Messung der cAMP-abhängigen CFTR-Leitfähigkeit:
  - Forskolin: Diterpen, das durch direkte Stimulation der Adenylatcyclase die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht → der CFTR-Kanal wird aktiviert (60,61).
  - IBMX: Verbindung aus der Gruppe der Xanthin-Derivate, welche die cAMP-abhängige Phosphodiesterase hemmt → Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration → der CFTR-Kanal wird aktiviert (62).
3. Genistein: Phytoöstrogen, Verstärkung der CFTR-Restfunktion als CFTR-Potentiator (63,64).
4. Carbachol (CCH): Parasympathomimetikum; Co-Stimulation der CFTR-vermittelten Chloridleitfähigkeit durch cholinerge Co-Aktivierung (65,66).
5. 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic-Säure (DIDS): Schwefelsäure; Inhibierung alternativer, Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Chloridkanäle (67).
6. Histamin: biogenes Amin, Hormon und Neurotransmitter; Ermittlung der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen, DIDS-insensiblen Chloridsekretion (68,69).

## Vorbereitung der ICM

### *Aufbau der Ussingkammern*

1. Einschalten des Wasserbads, Temperaturvoreinstellung des Durchlaufs auf ungefähr 45°C. Die erwärmte Metallfassung erhitzt die Rückseiten der Ussingkammern, so wird die angestrebte 37°C-Temperierung des Meyler-Puffers innerhalb der Ussingkammern erreicht.
2. Anschluss der Carbogengasleitungen an das Kammersystem und Öffnen der Gaszuleitung.
3. Einfügen und Fixieren der leeren Biopsieträger (Slider).
4. Anschluss der Strom- (weiß) und Spannungselektroden (schwarz) an die Kammern. Überprüfen der Luftblasenabwesenheit im KCl-Agar und der KCl-Lösung in den Plastikspitzen der Elektroden. Gegebenenfalls ist ein Entfernen der distalen Spitze der Elektrode mittels Skalpell möglich.
5. Pipettieren des vorgewärmten, mit D-Glukose und Indomethacin versetzten Meyler-Puffers in die Kammerhälften (2ml/Kammerhälfte) und Entfernung etwaig vorhandener Luftblasen.
6. Feinabstimmung der Gaszufuhr, um einen möglichst gleichmäßigen, physiologischen Gasfluss zu gewährleisten.

### *Einrichten der Datenaufzeichnung und Systemoffset*

1. Einschalten von Spannungsklemmen und Verstärkern.
2. Einschalten von Stand-PC, PowerLab sowie der LabChart-Software auf der Benutzeroberfläche des Stand-PCs.
3. Öffnen der ECFS ICM SOP Datenaufzeichnungsvorlage für eine 8-Kanal-Messung für Stromstärke und Stromspannung in jeder der vier Kammern. Einstellung der Aufzeichnungsrate von 10 Messungen pro Sekunde. Kalibrierung und Aufzeichnung (raw  $I_{sc}$  output in  $\mu A$ ) von Stromstärke und Stromspannungsausgängen.
4. Während der Kalibrierung des Systems ohne Biopsien muss auf eine stabile PD (open PD) geachtet werden (max.  $\pm 0,5$  mV). Sollte diese nicht erreicht werden, müssen alle Spannungselektroden/-spitzen überprüft werden. Die bleibende Eingangsregelabweichung (input offset) wird auf 0mV kalibriert. Zur Kompensation des systemischen Strömungswiderstandes, erfolgt eine Gabe eines Stromimpulses von 15  $\mu A$  und anschließende Erhöhung des

Kompensationswiderstandes. Um eine Überkompensation während der Messung zu vermeiden, sollte der Strömungswiderstand 1,0 mV betragen.

5. Systemäquilibrierung im Labor während der Biopsieentnahme am Patienten.

#### *Entnahme der Biopsien*

6. Eine detaillierte Anamnese bezüglich (Vor-)Erkrankungen (erhöhte Blutungsgefahr, Gerinnungsstörungen, Vitamin K-Mangel, Leberzirrhose) und Medikamenteneinnahme sowie ein ausführliches Aufklärungsgespräch samt Unterzeichnung der Einwilligungserklärung müssen erfolgen (siehe Kapitel 3.4.1).
7. Schmerzfremie Entnahme von vier oberflächlichen Rektumschleimhaut-Saugbiopsien der rektalen Mukosa (ca. 5 cm distal des Analrandes) mittels Rektumsaugbiopsiezange (Saugdruck: 5 mmHg/16 kPa) ohne Sedierung des Patienten. Die Biopsien sollten einen Durchmesser von ca. 5 mm aufweisen.
8. Lagerung und Transport der Biopsien in eisgekühlter Transportpufferlösung (DPBS + Indomethacin [10µM]) zur Inhibition der endogenen cAMP-vermittelten Chloridsekretion.

#### *Einspannen der Biopsien*

1. Optimierung der PD im Offset. Kompensation des Gewebewiderstandes kurz vor dem Einspannen der Biopsien auf 0,0 mV.
2. Aufsaugen des Meyler-Puffers aus der zu bestückenden Kammer (2ml/Kammerseite) mit einer FN-15-Nadelspritze
3. Sorgfältiges Herausnehmen einer Biopsie aus dem Transportpuffer und Platzierung der Gewebeprobe auf einem Objektträger mit Hilfe einer Pinzette. Identifizierung der mukosalen und serosalen Epitheloberfläche der Biopsie mittels Mikroskops. Sanfte Reinigung der Biopsie durch Abtupfen auf einem Papierhandtuch. Die Biopsie wird über der Öffnung des Sliders plziert, die serosale Biopsieoberfläche berührt die hintere Sliderhälfte („bottom“), die mukosale Biopsieoberfläche berührt die vordere Sliderhälfte („top“). Die richtige Platzierung ist für die Reaktion der Biopsien auf die später applizierten Substanzen unumgänglich.
4. Der Slider wird in die Ussingkammer, die serosale Gewebeseite linksseitig und die mukosale Gewebeseite rechtsseitig, eingespannt. Die Kammer wird wieder mit

Meyler-Puffer befüllt (2 ml / Kammerhälfte). Entfernen von etwaig vorhandenen Luftblasen.

5. Wiederholung der Schritte 1. – 4. mit den verbleibenden drei Biopsien.

#### *Äquilibration der Biopsien und basale Parameter*

1. Die verwendete Slidergröße muss in der LabChart-Datei der aktuellen Messung zu jeder Biopsie einzeln vermerkt sein („Bx 1/2/3/4 in P2407C/P2407B“).
2. Äquilibration (5 Minuten).
3. Dokumentation des basalen Gewebewiderstandes bei offenem Stromkreis (open circuit  $V_t$ ) vor Abklemmen der Spannung (voltage clamp) (LabChart-Kommentar: „Basal PD“). Der Wert sollte hierbei zwischen  $-0,3$  mV und
  - a.  $0,5$  mV liegen.
4. Dokumentation des basalen Gewebewiderstandes ( $R_t$  in  $[\text{Ohm}\times\text{cm}^2]$ ). Gabe eines kurzen Stromimpulses von  $15 \mu\text{A}$ . Die dadurch entstehende Spannungsänderung  $V_t$  [mV] wird registriert und es kann durch das Ohm'sche Gesetz der Widerstand  $R_t$  errechnet werden (LabChart-Kommentar: „Basal  $R_t$ “). Sollte  $R_t$  einen Wert  $>10$   $\text{Ohm}\times\text{cm}^2$  erreichen, muss von einer unzureichenden Biopsiegröße oder -qualität ausgegangen werden. Die Messung solch einer Biopsie erlaubt keinen validen Rückschluss auf die CFTR-Funktion und darf nicht in die Gesamtbewertung der ICM miteinbezogen werden.
5. Aufzeichnung des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) im Spannungsklemmenbetrieb (voltage clamp mode:  $0,0$  mV), Dokumentation der Rohdaten in  $\mu\text{A}$ . Der standardisierte Äquilibrationszeitraum nach Zugabe von Indomethacin beträgt 40 Minuten, um die Effekte der vorab entstehenden endogenen Gewebestimulation zu minimieren. Die Auswertung der Messung setzt die aufgezeichnete Stromstärke in Bezug zur Größe der Gewebefläche, an der der Kurzschlussstrom registriert wurde ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). Die Öffnungsflächen der Slider betragen  $0,018 \text{ cm}^2$  (Slider P2407C) und  $0,011 \text{ cm}^2$  (Slider P2407B), daraus ergeben sich folgende Stromstärken:  $1 \mu\text{A} = 56,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (P2407C) und  $1 \mu\text{A} = 88,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (P2407B).
6. Dokumentation des  $I_{sc}$  (LabChart-Kommentar: „Basal  $I_{sc}$ “) nach den 40 Minuten Äquilibrationszeit, jedoch vor Zugabe der ersten Substanz (Amilorid). Der Wert liegt hierbei typischerweise zwischen  $10$ - $50 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ .



### Durchführung der ICM für die Untersuchungen dieser Arbeit

Die angegebenen Konzentrationen stellen jeweils die finalen Konzentrationen pro Kammerabschnitt dar. Die Abkürzung „M“ bedeutet das Hinzufügen einer Substanz in den Kammerabschnitt, dem die mukosale Seite der Biopsie zugewandt ist. Die Abkürzung „S“ bedeutet das Hinzufügen einer Substanz in den Kammerabschnitt, dem die serosale Seite der Biopsie zugewandt ist. Die Anleitung bezieht sich jeweils auf die Durchführung der Messung an einer Biopsie, die einzelnen Schritte der Messung sind jeweils an allen vier Biopsien möglichst schnell aufeinanderfolgend durchzuführen.

1. Äquilibrierungsphase (40 Minuten) im Spannungsklemmenbetrieb (voltage clamp mode) nach dem Einfügen der mit Biopsien bestückten Slider in die Ussingkammern:
  - Nach kurzer Äquilibrierungsphase (5 Minuten) Gabe von 2  $\mu\text{l}$  Carbachol an die serosale Biopsieseite (LabChart-Kommentar: „CCH 100  $\mu\text{M}$  S“). Falls diese Probestimulation nach 5 Minuten keine Änderung des Kurzschlussstroms  $I_{sc}$  im Sinne einer eindeutigen Antwort hervorruft, sollte die Biopsie durch eine Reservebiopsie ersetzt werden.
  - Dreimaliger Austausch des vorgewärmten Meylerpuffers (versetzt mit Indomethacin 10  $\mu\text{M}$ ) in 10-minütigen Abständen (Zeitpunkte: 10, 20, 30 Min.) zur Erreichung optimaler geweblicher Voraussetzungen (LabChart-Kommentare: „Washout I, II, III“).
2. Nach insgesamt 40 Minuten im Spannungsklemmenbetrieb (voltage clamp mode) Dokumentation des basalen  $I_{sc}$  der Biopsien (vor Zugabe von Amilorid) (LabChart-Kommentar: „Basal  $I_{sc}$ “) und Gabe von 2  $\mu\text{l}$  Amilorid in den mukosalen Kammerabschnitt (LabChart-Kommentar: „Amil 100  $\mu\text{M}$  M“).
3. Nach Stabilisierung des  $I_{sc}$  (mindestens 5 Minuten) Gabe von je 2  $\mu\text{l}$  Forskolin und je 2  $\mu\text{l}$  IBMX in den mukosalen und den serosalen Kammerabschnitt (LabChart-Kommentar: „Forsk/IBMX 10/100  $\mu\text{M}$  M+S“).
4. Nach Stabilisierung des  $I_{sc}$  (mindestens 10 Minuten) Gabe von je 0,2  $\mu\text{l}$  Genistein in den mukosalen und serosalen Kammerabschnitt (LabChart-Kommentar: „Geni 10  $\mu\text{M}$  M+S“).
5. Nach Stabilisierung des  $I_{sc}$  (mindestens 5 Minuten) Gabe von 2  $\mu\text{l}$  Carbachol in den serosalen Kammerabschnitt (LabChart-Kommentar: „CCH 100  $\mu\text{M}$  S“).
6. Nach Stabilisierung des  $I_{sc}$  (mindestens 10 Minuten) Gabe von 4  $\mu\text{l}$  DIDS in den mukosalen Kammerabschnitt (LabChart-Kommentar: „DIDS 200  $\mu\text{M}$  M“).

7. Nach Stabilisierung des  $I_{sc}$  (mindestens 10 Minuten) Gabe von 10  $\mu$ l Histamin in den serosalen Kammerabschnitt (LabChart-Kommentar: „Hista 500  $\mu$ M S“).
8. Nach Stabilisierung des  $I_{sc}$  (mindestens 10 Minuten) ist die Messung beendet.
9. Rückkehr in den offenen Stromkreisbetrieb (open circuit mode) und Vermerk der finalen transepithelialen Spannung (PD in mV) (LabChart-Kommentar: „PD end“).
10. Dokumentation des finalen Gewebewiderstands ( $R_t$ ,  $\text{Ohm}\times\text{cm}^2$ ): Gabe eines kurzen Stromimpulses (desselben Ausmaßes wie zu Beginn der Messung (15  $\mu$ A)). Registrierung der entsprechenden Spannungsänderung ( $V_t$  in mV) und Berechnung des Widerstands  $R_t$  mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes (LabChart-Kommentar: „Rt end“).

### 3.4.3 Auswertung, Interpretation und Qualitätskriterien

Die Auswertung der ICM erfolgte anhand der digital aufgezeichneten Kurve, die die Veränderungen des Kurzschlussstroms während der Messung vermerkt hatte. Mittels der Software LabChart konnten die Zahlenwerte wichtiger Messpunkte, vor und nach Applikation der verschiedenen Reagenzien, abgelesen und die aussagekräftigsten Parameter berechnet werden. Hierzu diente der Mittelwert der aufgezeichneten Werte aus den einzelnen Messungen der vier Biopsien (ECFS ICM SOP 2011).

Als diagnostisch aussagekräftigster Parameter der ICM wird  $\Delta I_{sc}$ (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) als Kumulativantwort mit einem Cut-Off-Wert von 34  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (PS-CF < 34  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) beschrieben (49). Als prädiktiver diagnostischer ICM-Parameter dient  $\Delta I_{sc}$ (Carbacholprewashout) mit einem Cut-Off-Wert von 10  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (CF < 10  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). Für die ICM werden unizentrische, populationsabhängige Referenzwerte gemäß des multizentrischen internationalen Standardprotokoll (ECFS ICM SOP 2011) erarbeitet (26,70). Die Cut-Off-Werte unterscheiden sich im internationalen Vergleich, für die vorliegende Arbeit wurden die oben genannten Cut-Off-Werte sowie zentrumsinterne Referenzwerte verwendet.

Um eine valide Auswertbarkeit der Messung zu gewährleisten, sind etwaige Kontraindikationen (näher beschrieben in Kapitel 3.4.1) vor der Untersuchung unbedingt zu eruieren sowie die Qualitätskriterien einer ICM zu beachten: ein basaler Gewebewiderstand ( $R_{t\text{basal}}$ )  $\geq 10 \text{ Ohm}\times\text{cm}^2$ , keine kontinuierliche Zu- oder Abnahme des basalen Kurzschlussstroms vor der Gabe von Amilorid (engl. „drift“) sowie eine eindeutig sichtbare Gewebeantwort auf die Gabe einer Reagenz.

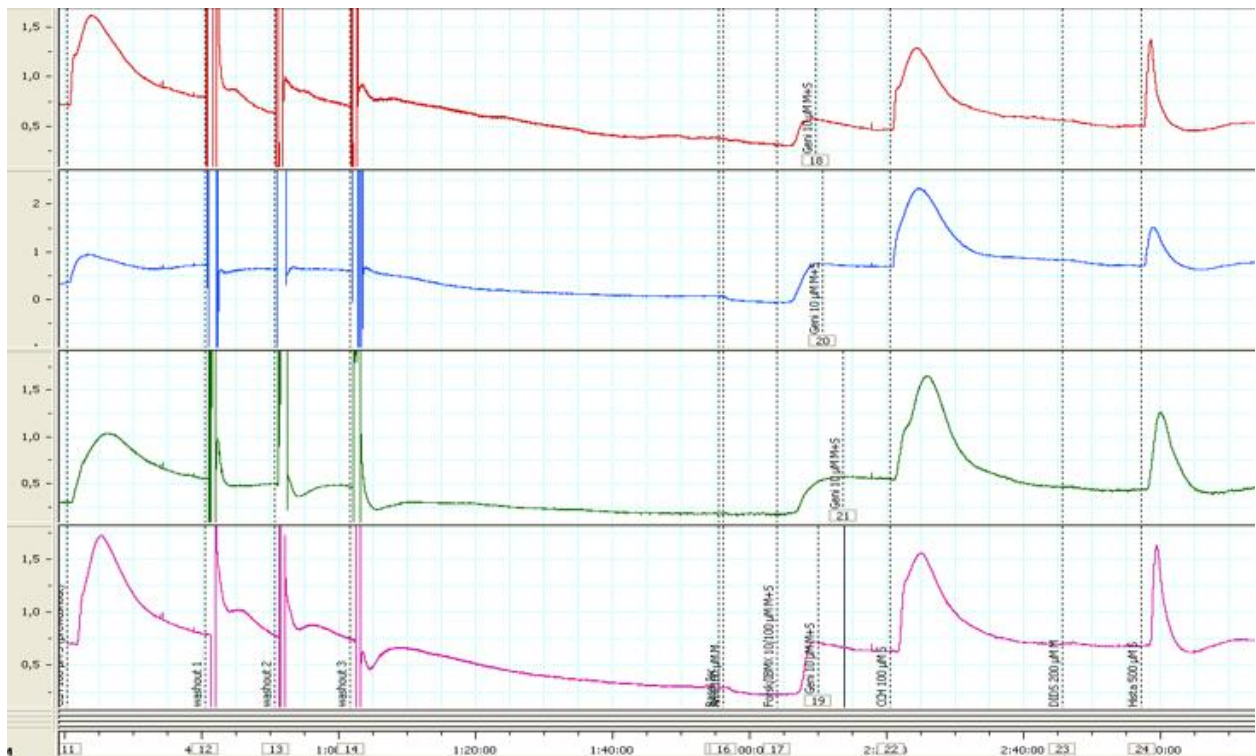


Abb. 3.8: ICM-Messkurve bei normaler Chloridkanalfunktion

(4 Biopsien) (aus der Patientengruppe B)

Legende zu Abb. 3.8: x-Achse: freistehende Zahlen: Zeit in Minuten (ein Strich entspricht 5 Minuten), Zahlen im Rahmen: LabChart-Kommentare (hier: Dokumentation von Spannung, Washouts, Zufuhr von Reagenzien); y-Achse: [µA]: Stromstärke in Mikroampere; CCH: Carbachol; µM: mikromolar; S: serosaler Kammerabschnitt; Washout: Pufferaustausch; Amil: Amilorid; M: mukosaler Kammerabschnitt; Forsk: Forskolin; IBMX: 3-Isobutyl-1-Methylxanthin; Geni: Genistein; DIDS: 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedischwefelsäure; Hista: Histamin; Rt end: elektrischer Widerstand bei Messende.

Eine normale CFTR-Funktion spiegelt sich in der ICM in hohen Mittelwerten bei  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  (Mittelwert hier:  $28,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ),  $\Delta I_{sc}(\text{CCHprewashout})$  (Mittelwert hier:  $45,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) und  $\Delta I_{sc}(\text{Hista})$  (Mittelwert hier:  $45,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) wider. Ein deutlicher Kurvenanstieg des  $I_{sc}$  auf die Gabe von Forsk/IBMX, bedingt durch eine cAMP-vermittelte CFTR-Aktivierung, sowie auf die Gabe von CCH durch cholinerge Kostimulation von CFTR und auf die Gabe von Histamin (kalziumabhängige, DIDS-insensible Chloridsekretion) ist zu erkennen (Abb. 3.8).

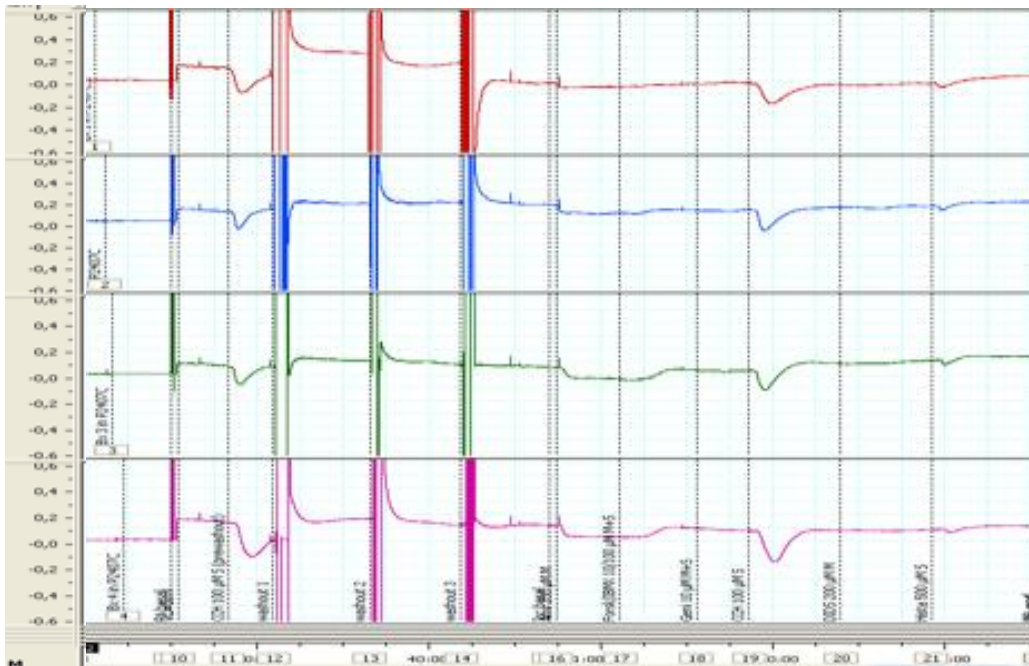


Abb. 3.9: ICM-Messkurve bei fehlender Chloridkanalfunktion

(4 Biopsien) (aus der Patientengruppe A)

Legende zu Abb. 3.9: x-Achse: freistehende Zahlen: Zeit in Minuten (ein Strich entspricht 5 Minuten), Zahlen im Rahmen: LabChart-Kommentare (hier: Dokumentation von Spannung, Washouts, Zufuhr von Reagenzien); y-Achse: [µA]: Stromstärke in Mikroampere; CCH: Carbachol; µM: mikromolar; S: serosaler Kammerabschnitt; Washout: Pufferaustausch; Amil: Amilorid; M: mukosaler Kammerabschnitt; Forsk: Forskolin; IBMX: 3-Isobutyl-1-Methylxanthin; Geni: Genistein; DIDS: 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedischwefelsäure; Hista: Histamin; Rt end: elektrischer Widerstand bei Messende.

Eine fehlende CFTR-Funktion zeigt sich in der ICM mit einem unveränderten oder kurz- oder langfristig absinkenden Kurvenverlauf nach dem Versuch die cAMP-abhängigen CFTR-Kanäle zu aktivieren ( $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$ , Mittelwert hier:  $2,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), cholinerg Co-Stimulation der CFTR-vermittelten Chloridsekretion ( $\Delta I_{sc}(\text{CCHprewashout})$ , Mittelwert hier:  $-11,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) und Stimulation  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger, DIDS-insensibler Chloridsekretion ( $\Delta I_{sc}(\text{Hista})$ : Mittelwert hier:  $-6,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). Das mögliche Absinken der Kurve kommt durch die Messung der Kaliumsekretion apikaler Kaliumkanäle aufgrund des ausbleibenden bzw. sehr geringen Chloridausstroms zustande (Abb. 3.9).

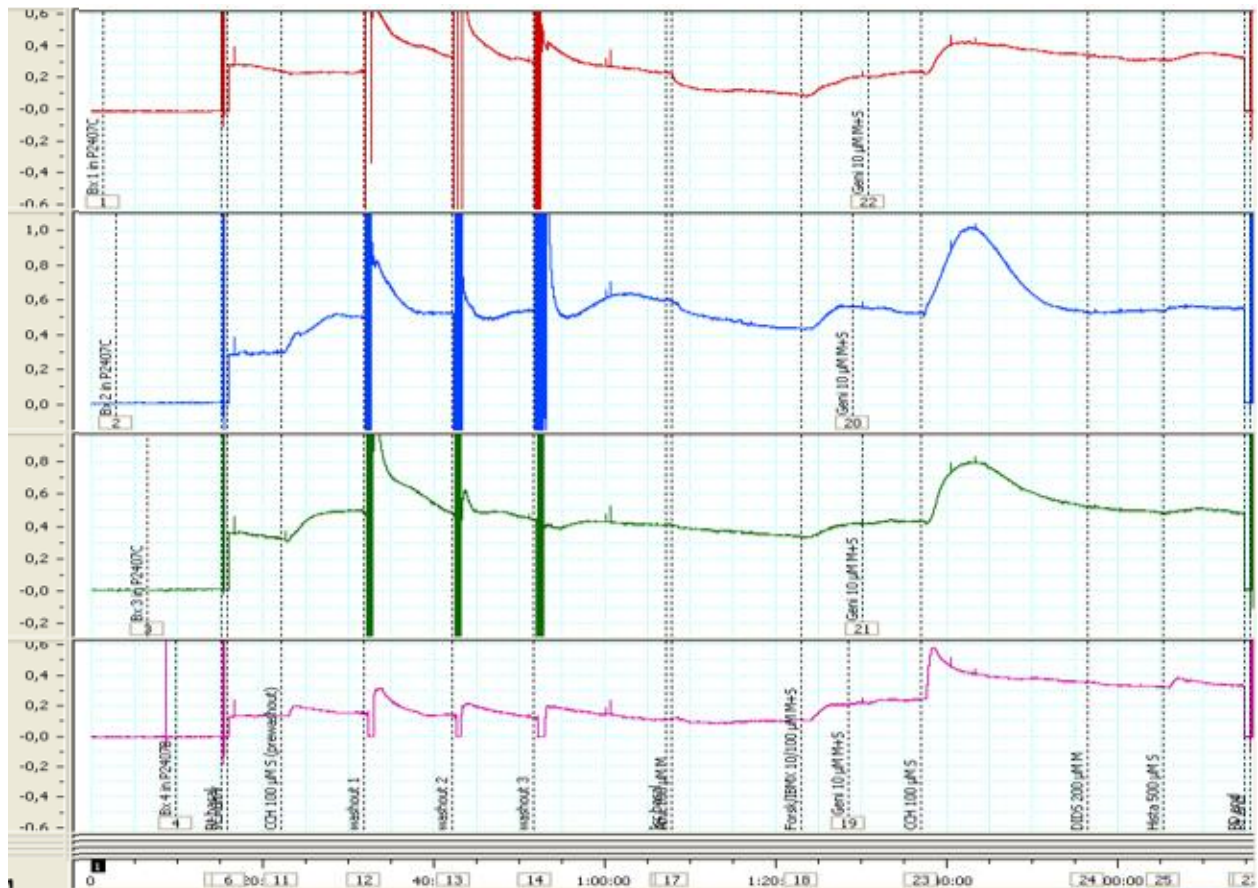


Abb. 3.10: ICM-Messkurve bei Restfunktion der Chloridkanalfunktion (4 Biopsien) (aus der Patientengruppe B)

Legende zu Abb. 3.10: x-Achse: freistehende Zahlen: Zeit in Minuten (ein Strich entspricht 5 Minuten), Zahlen im Rahmen: LabChart-Kommentare (hier: Dokumentation von Spannung, Washouts, Zufuhr von Reagenzien); y-Achse: [µA]: Stromstärke in Mikroampere; CCH: Carbachol; µM: mikromolar; S: serosaler Kammerabschnitt; Washout: Pufferaustausch; Amil: Amilorid; M: mukosaler Kammerabschnitt; Forsk: Forskolin; IBMX: 3-Isobutyl-1-Methylxanthin; Geni: Genistein; DIDS: 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedischwefelsäure; Hista: Histamin; Rt end: elektrischer Widerstand bei Messende.

Bei Patienten mit einer PS-CF oder CFTR-RD mit vorhandener CFTR-Restfunktion kommt es in der ICM zu einem geringen Anstieg von  $I_{sc}$  oder zu biphasischen Kurvenverläufen. Die Mittelwerte von  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  (hier:  $6,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ),  $\Delta I_{sc}(\text{CCHprewashout})$  (hier:  $6,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) und  $\Delta I_{sc}(\text{Hista})$  (hier:  $3,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) liegen jeweils im Intermediärbereich der Werte bei fehlender („PI-CF“) und normaler („Non-CF“) CFTR-Funktion. Es gilt zu beachten, dass auch bei Patienten, die eine CFTR-Residualfunktion aufweisen, ein absinkender Kurvenverlauf mit negativem Gipfel zustande kommen kann, da der Chloridausstrom die überschießende Kaliumsekretion nicht vollständig ausgleichen kann und daher Strom in die gegensätzlich Richtung erzeugt wird (30,49,71) (Abb. 3.10).

## 3.5 Nasale Potentialdifferenzmessung (NPD)

### 3.5.1 Methode

Die Nasale Potentialdifferenzmessung (NPD) hat ihren Ursprung in den Erkenntnissen von der Arbeitsgruppe um Knowles (72), wo erstmalig die nasale transepitheliale elektrische Potentialdifferenz in vivo bei einer gesunden Population gemessen und als noninvasiver Index der Funktion von respiratorischem Epithel eingeordnet (72) und in der Methodik kontinuierlich weiterentwickelt wurde (73).

Die Messung erfolgt nacheinander in beiden Nasenlöchern, um die in-vivo-Potentialdifferenz zwischen einem Katheter im unteren Nasengang und einer Referenzelektrode, die kutan an der Unterarmbeugeseite angebracht ist, aufzuzeichnen. Die Messung beginnt mit der Aufzeichnung der Potentialdifferenz in Ruhe und wird fortgeführt mit Applikation verschiedenster Lösungen, die die Natrium- sowie Chloridkanäle am apikalen respiratorischen Epithel stimulieren oder blockieren und somit einen Rückschluss auf die CFTR-Funktion zulassen.

Die NPD kann als erweiterte Diagnostik bei Patienten mit unklarer CF Diagnose, einem fehlenden Nachweis von zwei *CFTR*-Mutationen oder einem Schweißtest im Graubereich (30-59 mmol/L) angewandt werden und in weiterer Folge eine Diagnosestellung bekräftigen oder als unwahrscheinlich eingestufen. Die NPD weist, unter der Annahme, dass die Untersuchung standardisiert und unizentrisch abläuft, eine gute Reproduzierbarkeit auf, sodass sie des Öfteren auch als klinischer Outcomeparameter zur Austestung neuer Therapieansätze und der Wirksamkeit neuer Medikamente genutzt wird (30,74–76).

Die Nasale Potentialdifferenzmessung stellt sich durch hohen Zeitaufwand und ihre komplexe Durchführung als aufwendige Diagnostik-Methode dar. Weiters beschränkt sich die Verfügbarkeit auf wenige CF-Zentren deutschland- sowie europaweit, wo die Ressourcen sowie das Know-how zur Durchführung der Methode vorhanden sind. Zudem gilt die NPD erst ab dem Grundschulalter als geeignet, da der Patient pro Nasenloch ein jeweils 30 Minuten anhaltendes Stillsitzen für eine fehlerfreie Messung gewährleisten muss. Vorweg muss eine detaillierte Anamnese sowie körperliche Untersuchung des Patienten erfolgen, sowie Gegebenheiten für falsch-positive Befunde abgeklärt und detailliert vermerkt werden. Falsch-positive Befunde können durch Veränderungen der nasalen Schleimhaut (Inflammation bei Rhinitis oder Läsionen), Pathologien in der unteren Nasenmuschel (Nasenpolypen) oder anatomische

Besonderheiten (Z.n. Septumdeviation) und Nikotin-/Drogenabusus entstehen (26,77,78). Die NPD-Messung birgt keine wesentlichen Risiken bei in-vivo-Anwendung an Patienten (26).

Anhand einer NPD-Messung kann eine CF ohne CFTR-Restfunktion sicher von einer Non-CF unterschieden werden, wobei eine Differenzierung zwischen CF mit CFTR-Restfunktion, CFTR-RD und Non-CF aufgrund der sich oftmals ähnelnder NPD-Ergebnisse nicht immer gelingt (26).

### 3.5.2 Material und Durchführung

Die Messung der nasalen Potentialdifferenz wurde nach der internationalen und standardisierten Leitlinie der European Cystic Fibrosis Society (ECFS DNWG CTN SOP NPD 2013 Version 1.8) durchgeführt (79). Die folgenden Materialien wurden benötigt:

Tab. 3.10: Datenaufzeichnung

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

Tab. 3.11: Elektroden

Material/Technische Ausstattung	Hersteller/Anbieter
Kalomelreferenzelektroden (2x), REF 401 11069 A07 (schwarz), 11069 A08 (rot)	Radiometer Analytical
EKG-Elektroden (DM: 30 mm), REF F 301	Asmuth
Erlenmeyerkolben (2 Stk. je 100 ml mit KCL gefüllt) für die Kalomelelektroden	Schott Duran

Tab. 3.12: Hautbrücke (Referenzelektrode)

Material/Technische Ausstattung	Hersteller/Anbieter
Butterfly-Kanüle Valu-Set, 23G x 0,75" x 12" (0,6 x 19 x 305 mm), REF 387435	Becton Dickinson
Einmalspritze (0,01-1 ml) Omnifix-F Tuberkulin, 27G x ¾" (0,4 x 20 mm), REF 9202145F	Braun
Einmalspritze (5 ml) Injekt, REF 4606051V	Braun
Transferpipette (1 ml), REF 86.1180	Sarstedt
Difco Noble Agar (100 g), REF 214220	Becton Dickinson
Cutisoft Vlieskompressen (5 x 5 cm), REF 45844-00 oder ein Äquivalent	BSN medical
Durapore Chirurgisches Rollenpflaster (2,5 cm x 9,1 m), Pr.-Nr.: 1530-1	3M
Leukoplast S hautfarbenes Fixierrollenpflaster (1,25 cm x 9,2 m), Pr.-Nr.: 4761900	BSN medical
Hautdesinfektionsmittel Hier: Softasept N Hautdesinfektionsmittel 74,1% Ethanol (250 ml)	Braun

Tab. 3.13: Nasenbrücke (Messbrücke)

Material/Technische Ausstattung	Hersteller/Anbieter
Doppellumiger Nasenkatheter zur Messung der Potentialdifferenz, DM: 2,5 mm, L.: 80 cm), REF I0202US	Marquat Genie Biomedical
Einmalspritze (0,01-1 ml) Omnifix-F Tuberkulin, 27 G x ¾" (0,4 x 20 mm), REF 9202145F	Braun
Einmalspritze (5 ml) Injekt, REF 4606051V	Braun
Transferpipette (1 ml), REF 86.1180	Sarstedt
Difco Noble Agar (100 g), REF 214220	Becton Dickinson

Tab. 3.14: Perfusionsmaterial

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



Tab. 3.15: Zusatzmaterial

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

Tab. 3.16: Substanzen zur Herstellung der Lösungen

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

Tab. 3.17: Lösungen

Lösung/Reagenzien		Abkürzung in der Protokollführung	Zusammensetzung
Ringerlösung	Lösung A	Ringers	8,58 g/l NaCl in A.dest. + Salz-Stamm-Lsg + KPI-Stamm-Lsg.
Ringerlösung + Amilorid	Lösung B	Amil	0,1 mM Amilorid HCl in Lösung A
Chloridfreie Lösung + Amilorid	Lösung C	0Cl	0,1 mM Amilorid HCl in 0Cl-Stammlösung
Chloridfreie Lösung + Amilorid + Isoproterenol	Lösung D	Iso	0,01 mM Isoproterenol HCl in Lösung C
Chloridfreie Lösung + Amilorid + Isoproterenol + ATP	Lösung E	ATP	0,1 mM ATP in Lösung D

#### Funktionsweise der NPD:

Für die Messung der elektrischen Potentialdifferenz (PD) dient einer an der Mukosa der unteren Nasenmuschel des Patienten anliegender zweilumigen Messkatheter und einer intrakutan am beugeseitigen, zumeist rechten Unterarm angebrachten Referenznadel. Eine Elektrode misst - verbunden mit dem in der Nasenmuschel liegenden Messkatheter - das apikal entstehende Potential. Zeitgleich misst eine zweite Elektrode, welche mit der Referenznadel verbunden ist, das interstitiell entstehende Potential. Zweiteres kann mit dem basolateralen Potential auf Zellebene gleichgesetzt werden.

Vor der Messung werden der nasale Messkatheter sowie die Referenznadel mit in 3%-Ringerlösung verflüssigten Agar gefüllt und mit Kalomelelektroden an einen hochohmigen Verstärker angeschlossen. Der anfangs gemessene, stabile Wert der sich daraus ergebenden Potentialdifferenz wird als basale PD definiert. Die CFTR-Funktion wird in der Folge durch Bepülung der Nasenmuschel mit verschiedenen Flüssigkeiten durch das zweite Lumen des Messkatheters gemessen. Es gilt, dass erst zur nächsten Lösung gewechselt werden darf, wenn die PD sich unter Perfusion einer Flüssigkeit stabilisiert hat ( $\pm 1$  mV für mind. 30 Sekunden). Die erste Flüssigkeit stellt die Ringerlösung (Lösung A) zur Bildung einer stabilen basalen PD dar, die Bepülung dauert mindestens eine Minute. Es folgt die Amiloridlösung (Lösung B) zur Hemmung der ENaC-vermittelten Natriumabsorption (59) mit einer Perfusion von drei Minuten. Die chloridfreie Lösung (Lösung C) lässt die basale, osmotisch induzierte Chloridpermeabilität ermitteln. Die Isoproterenollösung (Lösung D) dient zur Erfassung der cAMP-abhängigen CFTR-

Leitfähigkeit, da Isoproterenol eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt und in weiterer Folge die Chloridionen-Sekretion durch spezifische CFTR-Aktivierung erhöht (80). Als fünfte Lösung kommt die ATP-Lösung (Lösung E) zum Einsatz. Sie dient der Messung der Chloridsekretion mittels alternativer, calciumabhängiger Chloridkanäle (81). Nach der Messung mit Lösung E kommt nochmals Ringerlösung (Lösung A) zum Ausspülen des Katheters in Gebrauch.

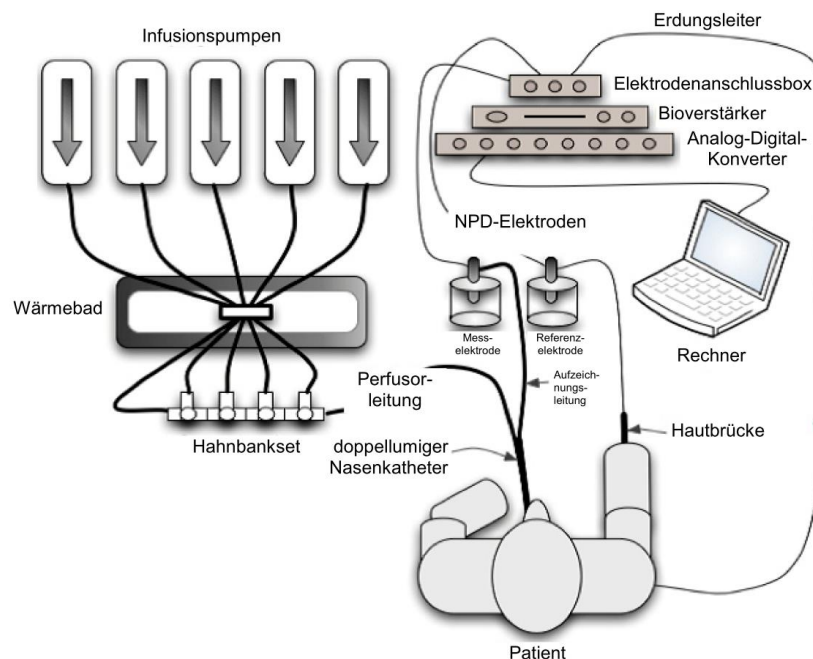


Abb. 3.11: Schematische Darstellung des Aufbaus einer NPD-Messung.

Übersetzt und modifiziert nach (82)

#### Vorbereitung der NPD Messung:

1. Ausführliche Anamnese zu etwaigen Ausschlusskriterien (genannt in Kapitel 3.4.1), sowie beidseitige Rhinoskopie zur Begutachtung der Nasenschleimhäute.

#### *Auffüllen der Perfusorspritzen mit in*

2. Tab. 3.17 genannten Lösungen (Lösung A bis Lösung E).
3. Überprüfung der Abweichung des geschlossenen Regelkreises (closed loop offset) vor Messungsbeginn: Platzierung des agargefüllten, patientenfernen Schlauchendes der Hautbrücke im KCl-Behälter gemeinsam mit der Kalomelreferenzelektrode. Platzierung der Nadelspitze der Hautbrücke im Behälter mit Ringerlösung (Lösung A). Platzierung des patientenfernen Endes des Nasenkatheters im KCl-Behälter gemeinsam mit der Kalomelreferenzelektrode. Platzierung der Spitze des

Nasenkatheters im Behälter mit Ringerlösung (Lösung A), um einen geschlossenen Regelkreis zu erreichen. Die PD des closed loop offset sollte  $\pm 2,5$  mV betragen. Sollte die Regelabweichung einen Wert  $> 2,5$  mV oder  $< -2,5$  mV betragen, muss eine Überprüfung jeglicher Stationen des Messungsaufbaus wie Anschlüsse, Geräte, Materialien und Agarbrücken sowie ein Ausschluss möglicher Luftblasen in Perfusorleitungen erfolgen.

4. Desinfektion der Einstichstelle der Referenzhautnadel am rechten, beugeseitigen Unterarm des Patienten.
5. Intrakutane Punktion des rechten, beugeseitigen Unterarmes des Patienten mit einer agargefüllten Butterfly-Kanüle und Fixierung dieser mit Fixierrollenpflaster.
6. Überprüfung des Regelkreises mittels PD-Messung am Patientenfinger: der Patient hält die Spitze des Nasenkatheters zwischen den Fingerspitzen von Daumen und Zeigefinger, während der Katheter langsam (30 ml/h) mit Ringerlösung perfundiert wird. Die PD sollte dabei einen Wert zwischen 35 mV und -75 mV einnehmen. Fehlerhafte Werte können hierbei durch defekten Agar der Referenzbrücke oder durch eine Fehllage der kutanen Referenznadel zustande kommen.
7. Beginn der Perfusion mit Lösung A (300 ml/h).
8. Beginn der Messung im rechten Nasenloch.
9. Einführung des Katheters in die untere Nasenmuschel, die Öffnung des Katheters sollte hierbei der Mukosa der lateralen Nasenscheidewand anliegen. Die Einführung des Katheters in die Nasenmuschel sollte in eine Tiefe von ca. 6 cm erfolgen.
10. Ein Rückziehen des Katheters ermöglicht eine Feststellung der Lokalisation an der Nasenschleimhaut, wo der negativste PD-Wert gemessen werden kann (basale PD).
11. An oben genannter Stelle kommt der Katheter zu liegen und wird für die weitere Messung mit Fixierrollenpflaster am Nasenrücken des Patienten befestigt.
12. Leichtes Beugen des Patientenkopfes nach kaudal, um ein Herausfließen der applizierten Flüssigkeiten zu ermöglichen.
13. Der Patient wird angewiesen, jegliche Bewegungen zu vermeiden, nicht zu sprechen und durch den Mund zu atmen, um eine möglichst störarme Messung zu gewährleisten.

### Durchführung der NPD Messung bei den Untersuchungen in dieser Arbeit:

Die Messung wurde nacheinander an beiden Nasenlöchern durchgeführt, es wurde bei allen Patienten am rechten Nasenloch begonnen. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug 300ml/h. Vor dem Wechsel zur nächsten Flüssigkeit sollte sich die Aufzeichnungskurve für mindestens 30 Sekunden stabilisiert und die Abweichung nicht mehr als  $\pm 1$  mV betragen haben.

1. Perfusion mit Lösung A, für mindestens eine Minute.
2. Wechsel zu Lösung B, Perfusion für mindestens drei Minuten.
3. Wechsel zu Lösung C, Perfusion für mindestens drei Minuten.
4. Wechsel zu Lösung D, Perfusion für mindestens drei Minuten.
5. Wechsel zu Lösung E, Perfusion bis zum Erreichen des negativen Höchstwertes.
6. Wechsel zu Lösung A zur Ausspülung der Lösungen B-E aus dem Katheter, für mindestens 30 Sekunden.
7. Die Perfusionsgeschwindigkeit von Lösung A wurde von 300 ml/h auf 30 ml/h gewechselt.
8. Überprüfung des Regelkreises wie anfangs mittels Messung der PD am Finger (siehe „Vorbereitung der NPD Messung“ Schritt 6.)
9. Perfusionsstopp. Auswaschen der Perfusionsleitungen in verkehrter Reihenfolge zur Applikation: Lösung E  $\rightarrow$  Lösung D  $\rightarrow$  Lösung C  $\rightarrow$  Lösung B  $\rightarrow$  Lösung A
10. Wiederauffüllen der Perfusorspritzen.
11. Fortführung der Messung am linken Nasenloch und exakte Wiederholung der folgenden Arbeitsschritte: „Vorbereitung der NPD Messung“ Schritte 6 - 13 sowie „Durchführung der NPD Messung“ Schritte 1. – 8.
12. Überprüfung der bleibenden Regelabweichung (closed loop offset) zum Ende der Messung (siehe „Vorbereitung der NPD Messung“ Schritt 3.)

### **3.5.3 Auswertung, Interpretation und Qualitätskriterien**

Die Auswertung der NPD-Messungen erfolgte anhand der digital aufgezeichneten Kurve, die die Änderung der Potentialdifferenz während der Messung vermerkt hatte. Mittels der Software LabChart konnten die Zahlenwerte wichtiger Messpunkte, vor und nach Applikation der verschiedenen Lösungen, abgelesen werden und somit Scores erstellt werden.

Als die wichtigsten diagnostischen Parameter der NPD werden die basale PD,  $\Delta$ PD(Amilorid) und  $\Delta$ PD(0Cl+Iso) beschrieben (siehe Kapitel 3.2.2 und 3.5.2). Geeignete

und bereits etablierte Grenzwertberechnungen zur Unterscheidung zwischen der Diagnose CF und der Diagnose „CF unwahrscheinlich“ bilden der Wilschanski-Index und der Sermet-Score (Tab 3.18).

Tab. 3.18: Wilschanski-Index, Sermet-Score

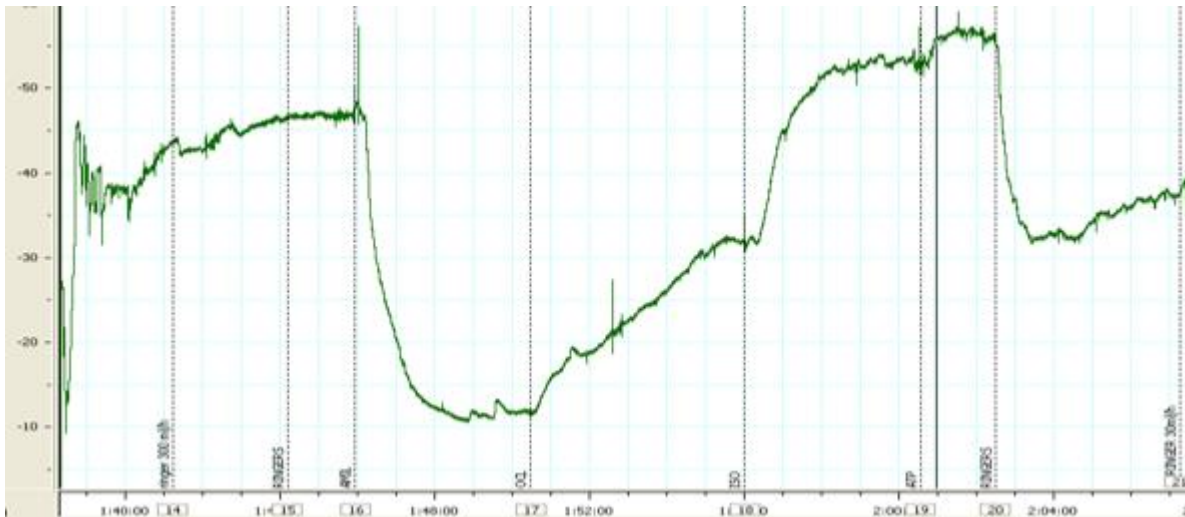
(83,84)

	Formel	Cut-Off-Wert
<b>Wilschanski-Index</b>	$\frac{\Delta PD(OCl+Iso)}{e^{\Delta PD(Amilorid)}}$	0,7, CF > 0,7
<b>Sermet-Score</b>	$-0,11 \times \Delta PD(OCl + Iso) - 0,05 \times \Delta PD Amilorid$	0,27, CF < 0,27

Zur einheitlichen Durchführung der NPD wurde ein internationales, standardisiertes Protokoll von der European Cystic Fibrosis Society (ECFS) gemeinsam mit dem Clinical Trial Network (CTN) und der Diagnostic Network Working Group (DNWG) der ECFS (ECFS CTN) entwickelt (ECFS DNWG CTN NPD SOP).

Ein NPD-durchführendes Zentrum sollte eigene Referenzwerte auf Basis einer ausreichenden Anzahl von Kontrollen, heterozygoten und bekannten CF-Patienten eines Zentrums mit einem Schweißchloridwert von  $\geq 60$  mmol/L und  $\leq 59$  mmol/L erheben und für die diagnostische Beurteilung nutzen (26). Die Etablierung zentrumsunabhängiger Referenzwerte bedarf vorerst einer Wertedefinition mehrfacher multizentrischer Validierungsstudien (85). Für die NPD-Diagnostik im hiesigen CF-Zentrum zeichnet sich für den Wilschanski-Index ein Cut-Off-Wert von 0,5 (CF > 0,5) ab (86,87), der auch in der vorliegenden Arbeit zur Ergebnisevaluierung und folglich zur diagnostischen Interpretation eingesetzt wurde. Zu diagnostischen Berechnungen wurden stets die Mittelwerte der Antworten beider Nasenlöcher herangezogen.

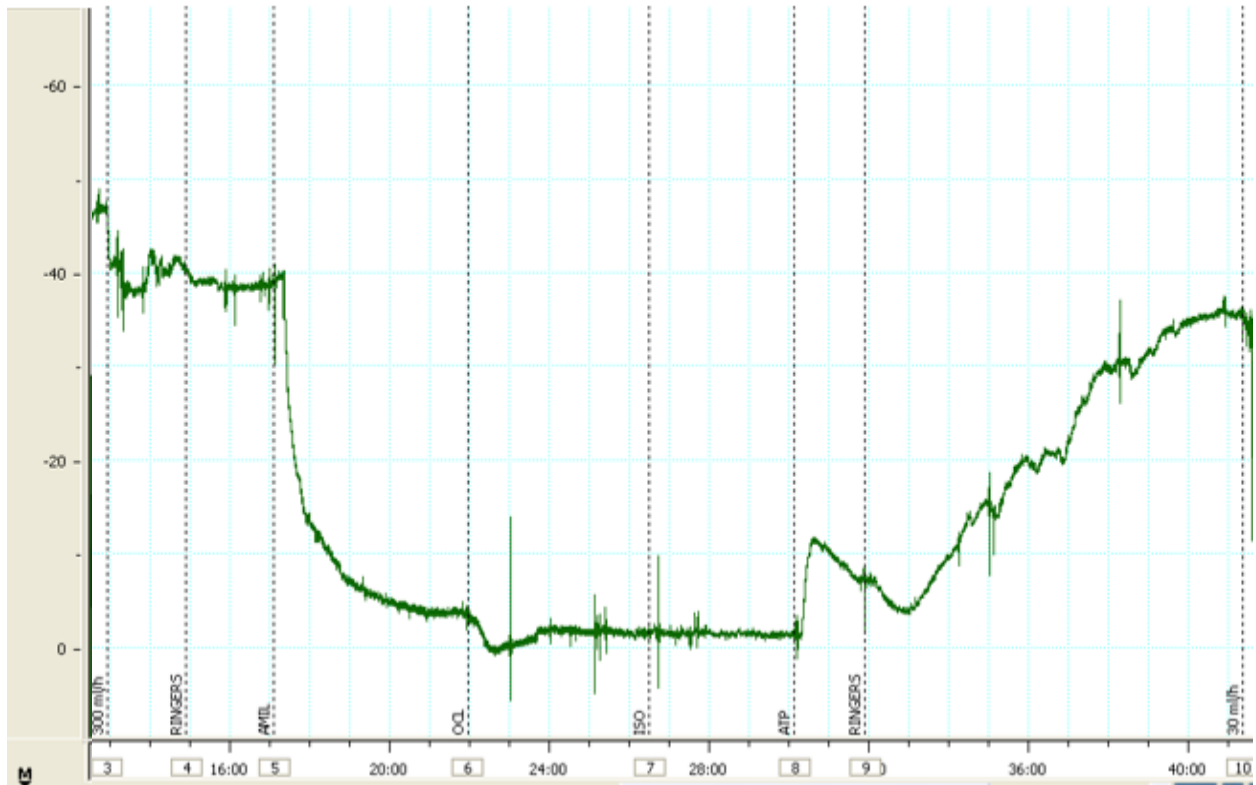
Um eine valide Auswertbarkeit der NPD-Messung zu gewährleisten, ist das Nichtvorhandensein von Kontraindikationen (siehe Kapitel 3.5.1) vor der Untersuchung unbedingt zu eruieren sowie die Qualitätskriterien einer NPD zu beachten: Vor der Spülung mit Amiloridlösung muss eine stabile basale PD erreicht werden, die für mindestens 30 Sekunden anhält (maximale Abweichung  $\pm 1$  mV), sowie eine deutliche Amiloridantwort (abnehmende Negativität der gemessenen Potentialdifferenz) erkennbar sein. Weiters muss am Ende der Messung – insbesondere bei ausbleibender Antwort nach Gabe von chloridfreier Lösung und Isoproterenollösung – eine eindeutige Antwort auf die ATP-Lösung (zunehmende Negativität der gemessenen Potentialdifferenz) vorhanden sein.



*Abb. 3.12: NPD-Messkurve bei normaler Chloridkanalfunktion – linkes Nasenloch (nicht aus den hier untersuchten Patientengruppen, Patient wurde untersucht im Rahmen der CF-Diagnostik-Spezialsprechstunde der Charité)*

Legende zu Abb. 3.12: x-Achse: freistehende Zahlen: Zeit in Minuten (ein Strich entspricht einer Minute), Zahlen im Rahmen: LabChart-Kommentare (hier: Wechsel zur nächsten Lösung); y-Achse: [mV]: Potentialdifferenz in Millivolt; 300ml/h: Perfusionsgeschwindigkeit; Ringers: Ringerlösung; Amil: Amiloridlösung; OCl: Chloridfreie Lösung; Iso: Isoproterenollösung; ATP: ATP-Lösung; 30ml/h: Perfusionsgeschwindigkeit.

Diese NPD-Messung zeigt eine basale PD, eine ENaC-Hyperaktivität bei normaler CFTR-Chloridkanalfunktion. Diese Messung kann somit als nicht-CF-typisch gewertet werden. Die basale PD liegt hier bei: -47,0 mV,  $\Delta$ PDAmilorid (hier: 35,5 mV) und  $\Delta$ PD(OCl+Iso) (hier: -41,5 mV) (Abb. 3.12).



**Abb. 3.13: NPD – Messkurve bei fehlender Chloridkanalfunktion – rechtes Nasenloch (aus der Patientengruppe B)**

Legende zu Abb. 3.13: x-Achse: freistehende Zahlen: Zeit in Minuten (ein Strich entspricht einer Minute), Zahlen im Rahmen: LabChart-Kommentare (hier: Wechsel zur nächsten Lösung); y-Achse: [mV]: Potentialdifferenz in Millivolt; 300ml/h: Perfusionsgeschwindigkeit; Ringers: Ringerlösung; Amil: Amiloridlösung; OCl: Chloridfreie Lösung; Iso: Isoproterenollösung; ATP: ATP-Lösung; 30ml/h: Perfusionsgeschwindigkeit; closed loop offset: Überprüfung der bleibenden Regelabweichung im geschlossenen Regelkreis.

Bei fehlender CFTR-abhängiger Chloridleitfähigkeit sind folgende Parameter bezeichnend: Eine hochnegative basale PD (hier: -39 mV) (durch eine ENaC-Hyperaktivität), ein darauffolgender Anstieg des Potentials bei Amiloridapplikation ( $\Delta PD(\text{Amilorid})$  hier: 35,3 mV) sowie ein kleines  $\Delta PD(\text{OCl}+\text{Iso})$  (hier: 2,3 mV), das die geringe Chloridsekretion darstellt (72,83). ATP führt wiederum zu einer größeren Stimulation, da kalziumabhängige, alternative Chloridkanäle hierbei aktiviert werden. Der lang andauernde Anstieg der Kurve nach der letzten Perfusion von Ringerlösung (zu Minute 32) bis zum Wiedererreichen des basalen PD-Wertes vom Anfang der Messung lässt sich durch das Ausspülen der zuvor applizierten Lösungen aus dem Nasenkatheter erklären (Abb. 3.13).



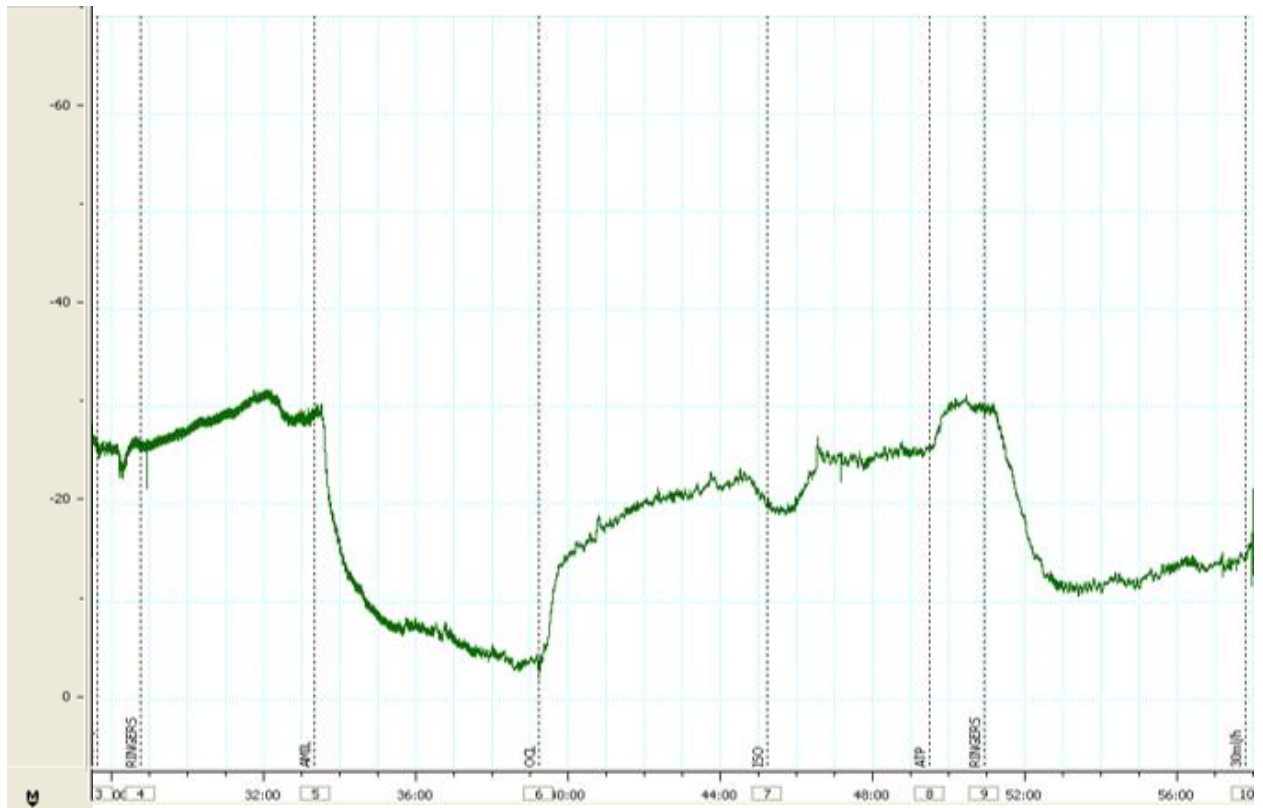


Abb. 3.14: NPD - Messkurve bei Restfunktion der Chloridkanalfunktion – rechtes Nasenloch

(aus der Patientengruppe B)

Legende zu Abb. 3.14: x-Achse: freistehende Zahlen: Zeit in Minuten (ein Strich entspricht einer Minute), Zahlen im Rahmen: LabChart-Kommentare (hier: Wechsel zur nächsten Lösung); y-Achse: [mV]: Potentialdifferenz in Millivolt; 300ml/h: Perfusionsgeschwindigkeit; Ringers: Ringerlösung; Amil: Amiloridlösung; 0Cl: Chloridfreie Lösung; Iso: Isoproterenollösung; ATP: ATP-Lösung; 30ml/h: Perfusionsgeschwindigkeit.

Bei einer CF oder CFTR-RD mit CFTR-Residualfunktion nimmt die basale PD einen Mittelwert zwischen den Werten von CF und Non-CF Patienten ein (hier: -29,2 mV). Auch  $\Delta PD_{\text{Amilorid}}$  (hier: 25,4 mV) und  $\Delta PD_{(0Cl+Iso)}$  (hier: -21,8 mV) finden sich im Mittelfeld ein, fallen jedoch niedriger aus als bei einer CF ohne Chloridleitfähigkeit (83) (Abb. 3.14).

### **3.6 Statistische Analyse**

Die statistische Analyse wurde mittels dem Analyseprogramm IBM SPSS Statistics 25™ durchgeführt. Die Darstellung statistischer Diagramme erfolgte mittels Microsoft Office 365 Powerpoint. Gepaarte Mittelwerte, absolute Änderungen zwischen gepaarten Parametern sowie Standardabweichung wurden mittels IBM SPSS Statistics 25™ berechnet. Eine Prüfung auf Korrelation erfolgte, aufgrund der kleinen Patientenkohorte unter der Annahme eine Normalverteilung könne nicht eingehalten werden, mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test und mittels Ermittlung des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten.  $P < 0,05$  wurde als Indikator für statistische Signifikanz festgelegt. Eine Beratung zur statistischen Datenanalyse erfolgte durch das Institut für Biometrie und Epidemiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

## **4 Ergebnisse**

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit für jede der beiden Patientengruppen einzeln dargestellt. Um eine gute Aussagekraft der Untersuchung und Vergleichbarkeit der CFTR-Biomarker zu erreichen, wurden zusammengehörige Untersuchungen von einem Patienten am selben Tag erhoben.

### **4.1 Patientengruppe A**

Folgend werden die Ergebnisse der Untersuchungen von Patienten der Patientengruppe A, die eine Baseline- und Follow-Up-Messung erhalten haben, erläutert (Abb. 3.1).

In untenstehenden Tabellen und Graphiken werden klinische Charakteristika vor und nach Lumacaftor/Ivacaftor-Therapie sowie Änderungen von klinischen Parametern und CFTR-Biomarkern sowie deren Korrelationen dargestellt.

Tab. 4.1.: Klinische Charakteristika der Patienten vor und nach Lumacaftor/Ivacaftor-Therapie

	Baseline	Nach einem Monat Lumacaftor/Ivacaftor Therapie	Veränderung zwischen Baseline + Lumacaftor/Ivacaftor Therapie [mean]	Korrelationskoeffizient (p)	Signifikanz
Anzahl an Patienten	9	9			
Geschlecht, weiblich, n [%]	5 (55,6%)				
Alter, [y]	28,00 ± 11,38 (14-45)				
Genotyp F508del/F508del	9 (100%)	9 (100%)			
Exokrine Pankreasinsuffizienz	9 (100%)	9 (100%)			
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	19,80 ± 1,85 (17,13 bis 22,26)	19,62 ± 2,09 (16,96 bis 22,54)	-0,18 ± 0,50 (-1,08 bis 0,40)	0,400	Nicht signifikant
FEV <sub>1</sub> predicted [%]	52,20 ± 14,55 (33,6 bis 75,0)	53,16 ± 16,87 (30,7 bis 73,0)	0,96 ± 3,73 (-2,9 bis 9,4)	0,776	Nicht signifikant
Schweißchlorid [mmol/L]	102,00 ± 10,43 (89 bis 121)	74,00 ± 24,06 (39 bis 105)	-28,00 ± 16,51 (-55 bis -6)	0,008	Signifikant
Δ <sub>sec</sub> (Forsk/IBMX) [μA/cm <sup>2</sup> ]	3,44 ± 5,79 (-3,4 bis 14,1)	20,82 ± 10,58 (8,9 bis 43,5)	17,38 ± 12,23 (1,6 bis 45,2)	0,008	Signifikant
Δ <sub>sec</sub> (Forsk/IBMX+CCH+Hista) [μA/cm <sup>2</sup> ]	-14,04 ± 17,51 (-42,6 bis 9,9)	25,07 ± 24,84 (-25,1 bis 52,5)	39,11 ± 21,73 (-4,5 bis 67,8)	0,011	Signifikant

Legende: BMI = body mass index, FEV<sub>1</sub> = forcierte Einsekundenkapazität (Lungenfunktion), die Daten sind angezeigt im MW ± SD (Spannweite)

Tab. 4.2.: Absolute Änderung der klinischen Parameter und der CFTR-Biomarker (ST, ICM) zwischen Baseline und Follow-Up

	Alter [y]	Ge-schlecht [w,m]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	FEV <sub>1</sub> predicted [%]	Schweiß-chlorid [mmol/L]	ΔI <sub>sc</sub> (Forsk/IBMX) [μA/cm <sup>2</sup> ]	ΔI <sub>sc</sub> (Forsk/IBMX+CCH+Hista) [μA/cm <sup>2</sup> ]	Subjektive Patientenperspektive nach 4-wöchiger CFTR-Modulatortherapie
Patient 1	23	w	-0,14	2,3	-40,5	14,7	45,1	Trockener Husten, Sputum flüssiger, weniger Dyspnoe, weniger Kopfschmerz und weniger Schwindel
Patient 2	19	w	0,28	0	-50	1,6	67,8	Mehr Husten, Sputum unverändert, keine Dyspnoe, Bauchschmerzen, Kreon Dosis erhöht
Patient 3	23	m	0,28	-0,7	-21,5	15,1	41,7	Weniger Husten, weniger Sputum, keine Dyspnoe, kein Bauchschmerz
Patient 4	41	w	-0,69	-0,9	-18,5	24,0	-4,5	Weniger Husten, weniger Sputum, keine Dyspnoe, keine Bauchschmerzen, körperlich widerstandsfähiger
Patient 5	19	m	0,40	9,4	-6	45,2	34,8	Weniger Husten, weniger Sputum, mehr Dyspnoe, mehr Bauchschmerz
Patient 6	45	w	-1,08	-2,9	-55	18,7	55,8	Husten unverändert, Sputum unverändert, mehr Dyspnoe, mehr Bauchschmerzen, mehr Übelkeit und Diarrhoe
Patient 7	41	m	-0,14	3,5	-22	7,6	27,1	Weniger Husten, weniger Sputum, keine Dyspnoe, kein Bauchschmerz
Patient 8	14	w	-0,54	-0,1	-21	16,5	58,7	Husten unverändert, Sputum unverändert, weniger Dyspnoe, kein Bauchschmerz, körperlich widerstandsfähiger
Patient 9	27	m	0,00	-2,0	-17,5	13,0	25,5	Weniger Husten, mehr Sputum (aber flüssiger), Dyspnoe besser 5d nach Therapiebeginn, kein Bauchschmerz, Diarrhoe an ersten 4 Therapietagen, in den ersten Tagen körperlich weniger widerstandsfähig
Patient 10	17	w						Abbruch der Lum/iva-Therapie vor Vollendung der 4 Wochen
Patient 11	41	w						Abbruch der Lum/iva-Therapie vor Vollendung der 4 Wochen
Patient 12	28	w						Abbruch der Lum/iva-Therapie vor Vollendung der 4 Wochen

Legende: BMI = body mass index, FEV<sub>1</sub> = forcierte Einsekundenkapazität (Lungenfunktion), die Daten sind angezeigt im MW ± SD (Spannweite)

In dieser Untersuchung konnte eine minimale Verbesserung der FEV<sub>1</sub> gezeigt werden, die absolute Änderung lag im Durchschnitt bei 0,69% ± 3,73 (p = 0.776). Die absolute Änderung des BMI zeigte eine Verschlechterung nach Lumacaftor/Ivacaftor-Therapie um durchschnittlich 0,18 kg/m<sup>2</sup> ± 0,50 (p = 0.400) (Tab. 4.1).

Um die Effekte von Lumacaftor/Ivacaftor auf die CFTR-Funktion auch in vivo zu messen, erhielt jeder Patient einen Schweißtest sowie eine ICM vor (Baseline) sowie vier Wochen nach der Therapie (Follow-Up). Die Baseline-Schweißchlorid-Konzentrationen befanden sich bei 100% (n=9) der Patienten im erwarteten CF-typischen Bereich von > 60 mmol/L (Abb. 4.1). Die Schweißchlorid-Konzentration zum Baseline-Zeitpunkt lag bei den Patienten im Durchschnitt bei 102,00 mmol/L ± 10,43 (Spannweite 89 – 121).

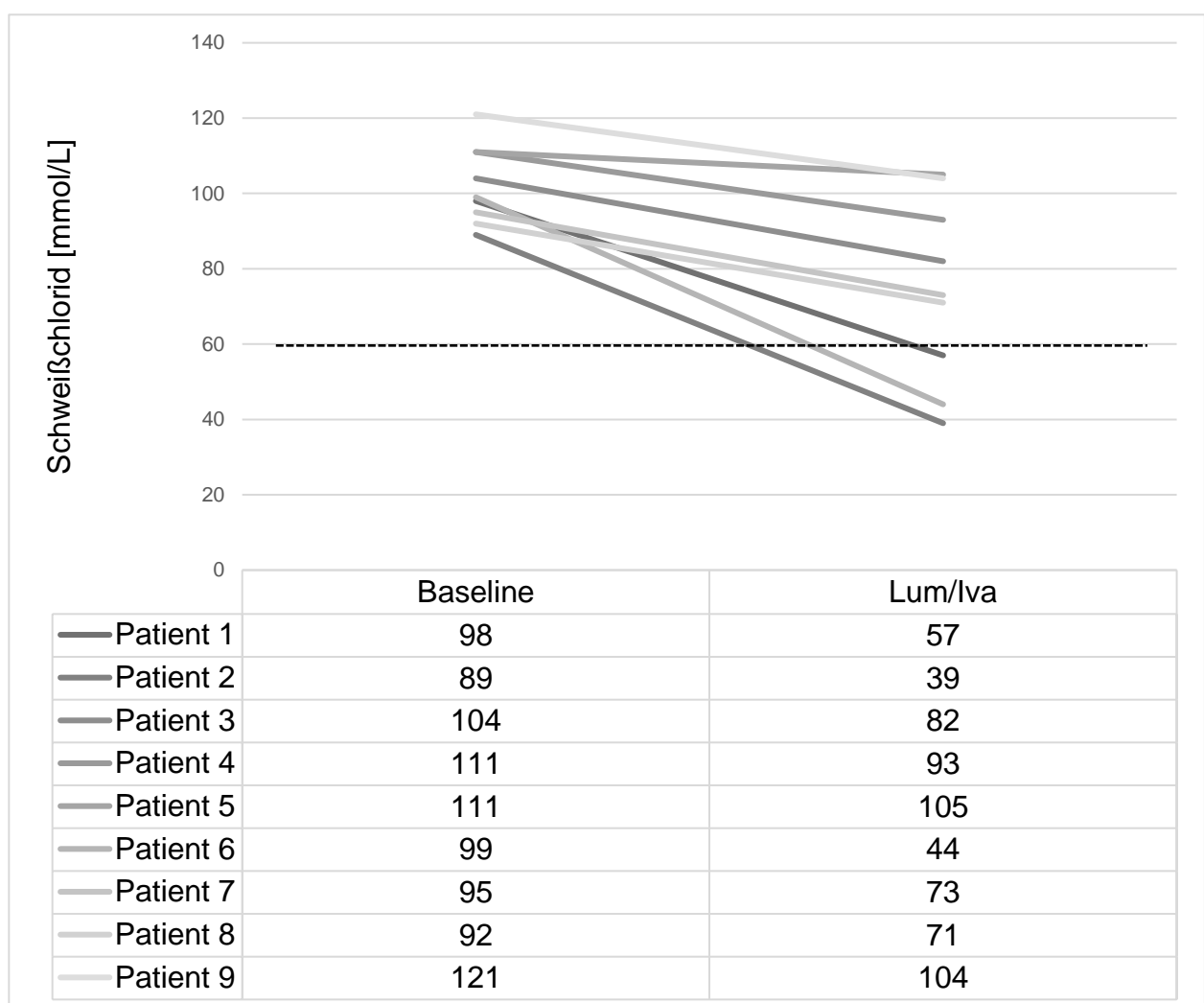


Abb. 4.1: Änderung des Schweißchlorids vor und nach Lumacaftor/Ivacaftor-Therapie

Nach einem Monat Therapie mit Lumacaftor/Ivacaftor zeigte sich die Schweißchlorid-Konzentration der Patienten im Durchschnitt um  $28,00 \text{ mmol/L} \pm 16,51$  ( $p = 0.008$ ) signifikant reduziert. Die Schweißchlorid-Konzentration befand sich nach Therapie im Durchschnitt bei  $74,00 \text{ mmol/L} \pm 24,06$  (Spannweite 39 – 105) (Abb. 4.1).

In den ICM-Untersuchungen zeigten sich in der Baseline-Untersuchung bei Forskolin-Applikation divergierende Ausschläge der Stromkurve. Es konnten negative Stromausschläge im Sinne eines kurzzeitigen Kaliumausstroms (46,53,88,89), wie auch stagnierende Stromkurven und leicht positive Ausschläge der Stromkurve als Ausdruck einer residualen Chloridsekretion beobachtet werden. Festzustellen ist, dass nach der Therapie mit Lumacaftor/Ivacaftor ein mittlerer Anstieg der Forskolinantwort ( $I_{sc}(\text{Forsk}/\text{IBMX})$ ) um  $17,38 \mu\text{A}/\text{cm}^2 \pm 12,23$  dargestellt werden konnte.

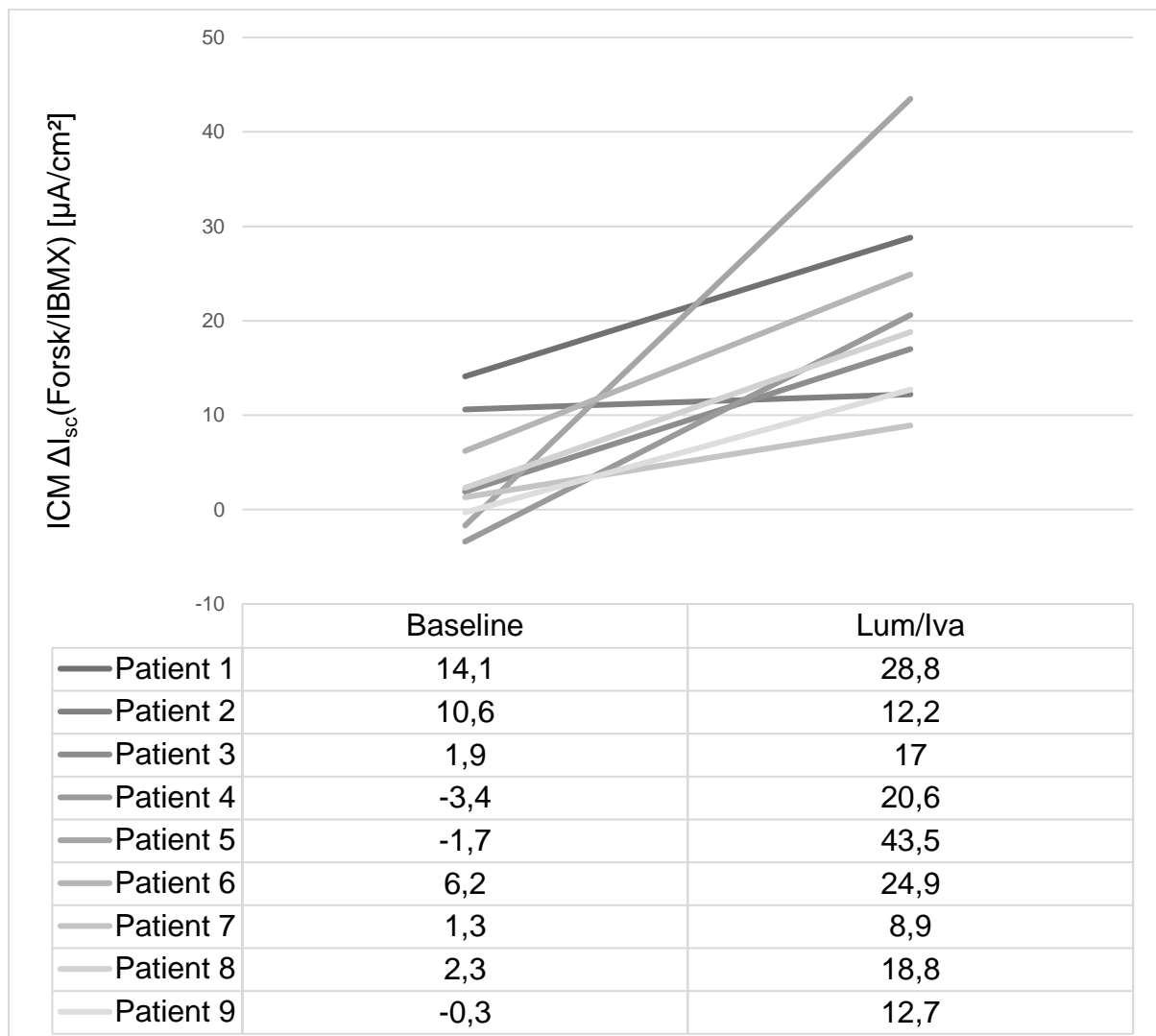


Abb. 4.2: Änderung von  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk}/\text{IBMX})$  in der ICM vor und nach Lumacaftor/Ivacaftor-Therapie

Es konnte signifikant ( $p = 0.008$ ) eine Verbesserung von  $I_{sc}Forsk/IBMX$  zwischen der Baseline-ICM und der ICM nach einem Monat Therapie beschrieben werden (Abb. 4.2, Tab. 4.1). Somit änderte sich der durchschnittliche Wert von  $I_{sc}Forsk/IBMX$  von  $3,44 \pm 5,79$  vor Therapie auf durchschnittlich  $20,82 \pm 10,58$  nach Therapie.

Ähnliches fällt bei Betrachtung des ICM-Parameters  $I_{sc}Forsk/IBMX+CCH+Hista$  auf, der im Mittel um  $39,11 \mu A/cm^2 \pm 21,73$  anstieg, eine statistische Signifikanz in der Verbesserung dieses Parameters konnte nachgewiesen werden ( $p = 0.011$ ) (Abb. 4.3).

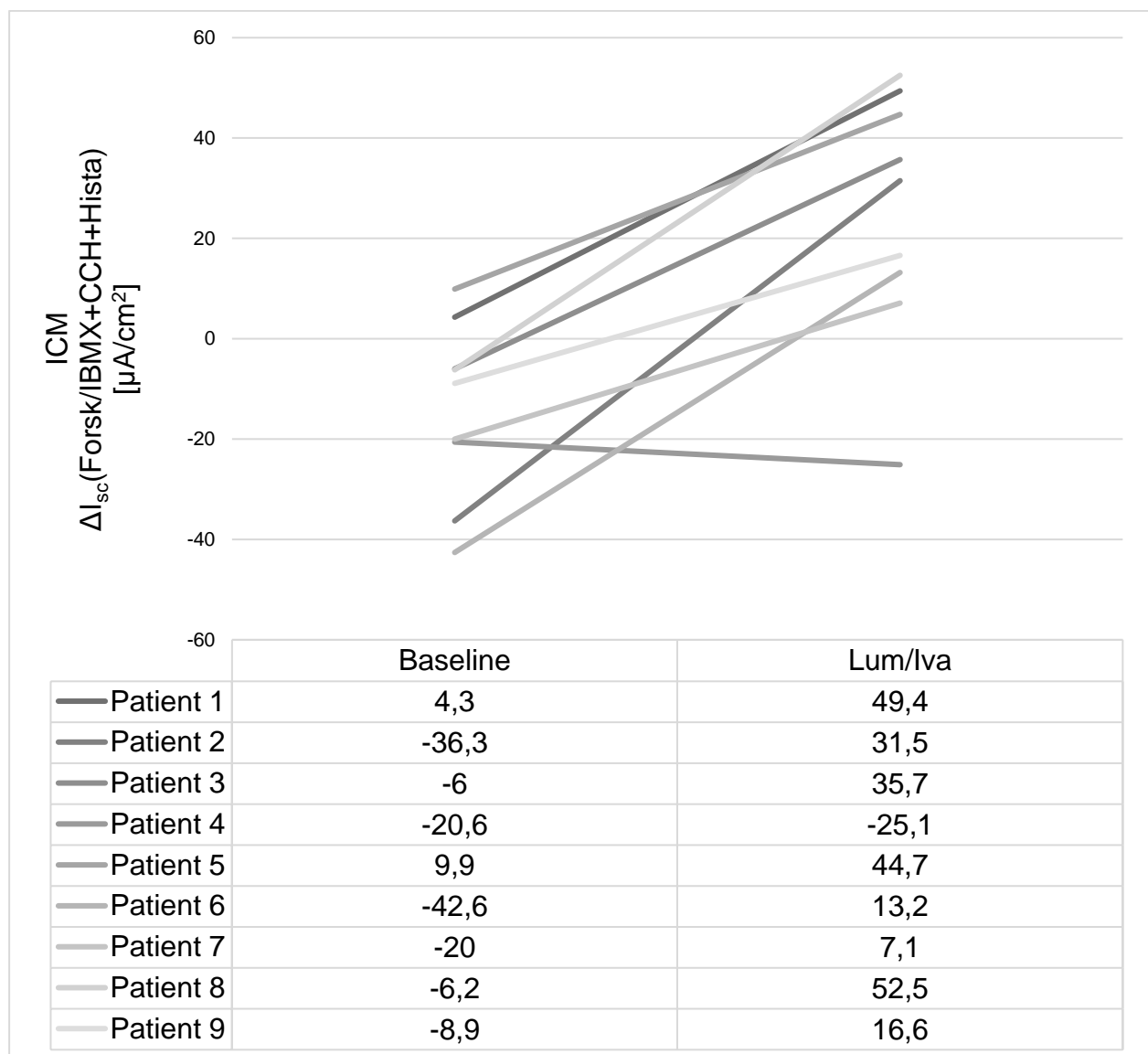


Abb. 4.3: Änderung von  $\Delta I_{sc}(Forsk/IBMX+CCH+Hista)$  in der ICM vor und nach Lumacaftor/Ivacaftor-Therapie

In Tab. 4.2 stehen zusätzlich detailliert die subjektiven Patientenperspektiven dokumentiert. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf pulmonale Komplikationen wie Husten, Dyspnoe und Zu- oder Abnahme des Sputums sowie auf körperliche Beschwerden wie Kopf- und Bauchschmerz, allgemeine Schwäche und Unwohlsein, Diarrhoe und Übelkeit gelegt. Eine große Variabilität hinsichtlich der Therapietoleranz ist an den vereinzelt subjektiven Patientenperspektiven zu erkennen. Beispielsweise gaben 5 von 9 Patienten einen verminderten Husten an, 4 von ihnen in Kombination mit einem reduzierten Vorhandensein von Sputum. 3 von 12 Patienten brachen die Therapie innerhalb der ersten vier Wochen unter der Angabe, sie würden das Medikament nicht tolerieren, ab. Die Einschränkung der Lebensqualität oder die Auswirkung auf psychosoziale Belastungsfaktoren wurden nicht standardisiert erhoben.

In der Gegenüberstellung der absoluten Änderungen von CFTR-Biomarker (Schweißchlorid, ICM) und die der klinischen Outcomes (BMI, FEV<sub>1</sub>) ließen sich keine statistisch signifikanten Korrelationen errechnen. In dieser Untersuchung konnte kein Zusammenhang zwischen absoluter Änderung von Schweißchlorid mit absoluter Änderung von BMI und FEV<sub>1</sub> festgestellt werden. Demnach erzielten nur jeweils 33% der Patienten (n=3) bei verbessertem Schweißtest ebenso einen verbesserten BMI oder eine verbesserte FEV<sub>1</sub> (Abb. 4.4, Abb. 4.5). Änderungen des Schweißchlorids korrelierten weder mit Änderungen des BMI ( $r = 0,377$ ,  $p = 0,318$ ) noch mit Änderungen der FEV<sub>1</sub> ( $r = 0,150$ ,  $p = 0,700$ ) statistisch signifikant (Abb. 4.4, Abb. 4.5).



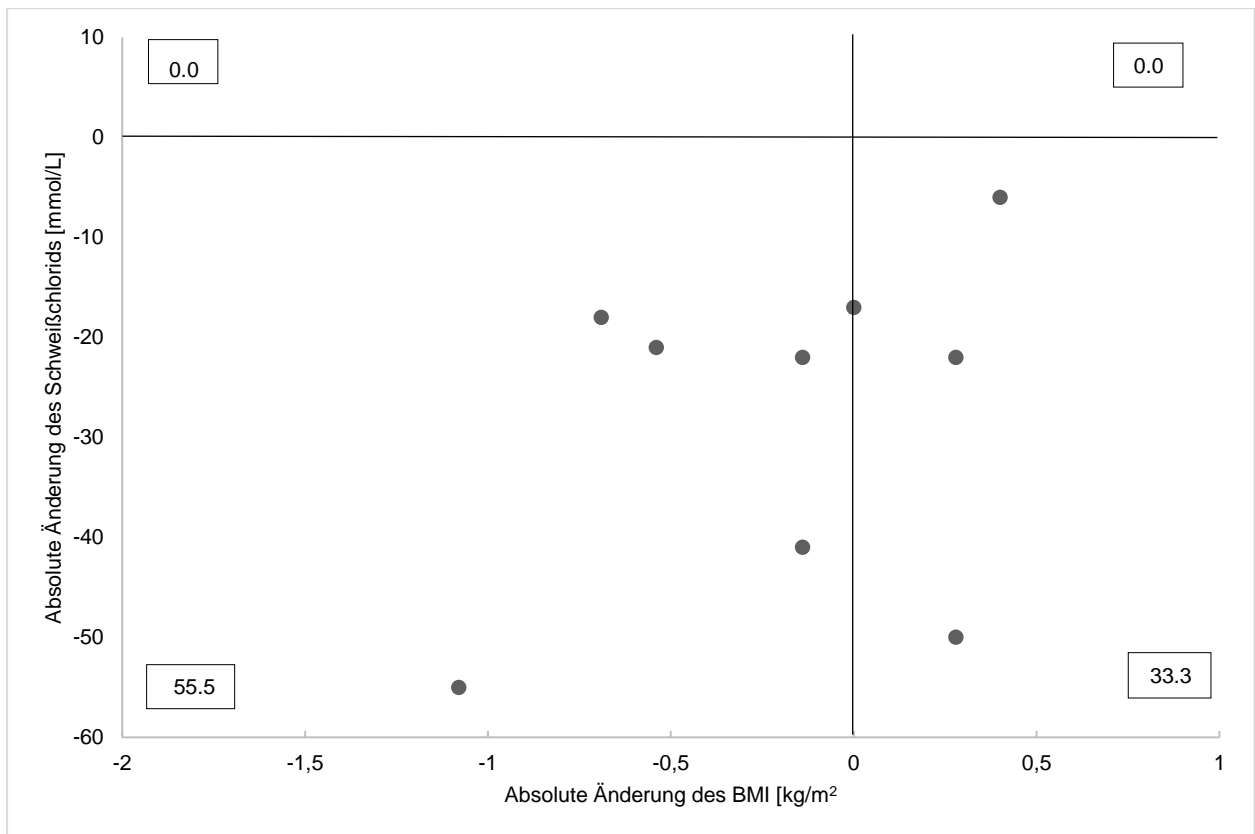


Abb. 4.4: Absolute Änderungen von Schweißchlorid und BMI

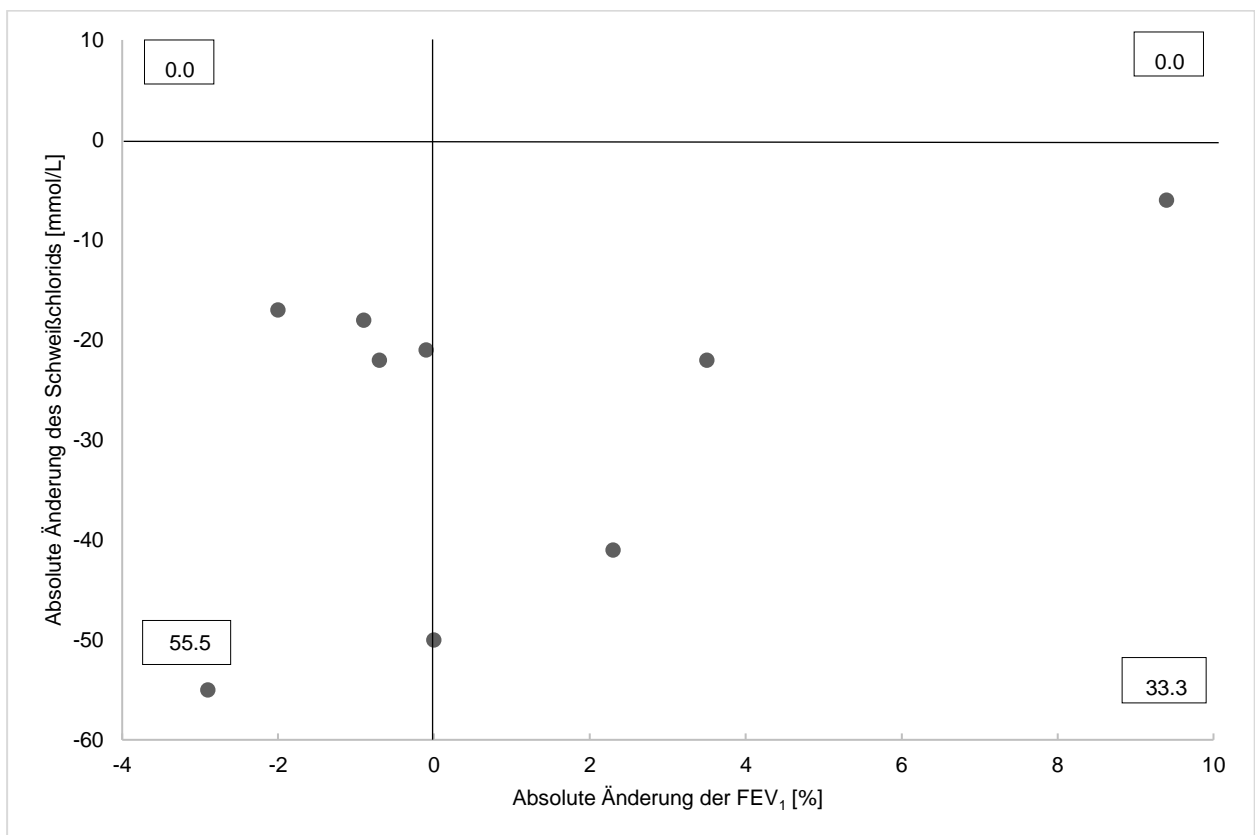


Abb. 4.5: Absolute Änderungen von Schweißchlorid und FEV<sub>1</sub>

Die Änderungen von  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  korrelierten weder mit absoluten Änderungen des BMI ( $r = -0,184$ ,  $p = 0,635$ ) noch mit absoluten Änderungen der  $FEV_1$  ( $r = -0,117$ ,  $p = 0,765$ ) statistisch signifikant. Festzustellen ist auch, dass nur 33% der Patienten mit verbesserter Forskolin-Antwort in der ICM auch eine Verbesserung im BMI oder der  $FEV_1$  zeigen (Abb. 4.6, Abb. 4.7).

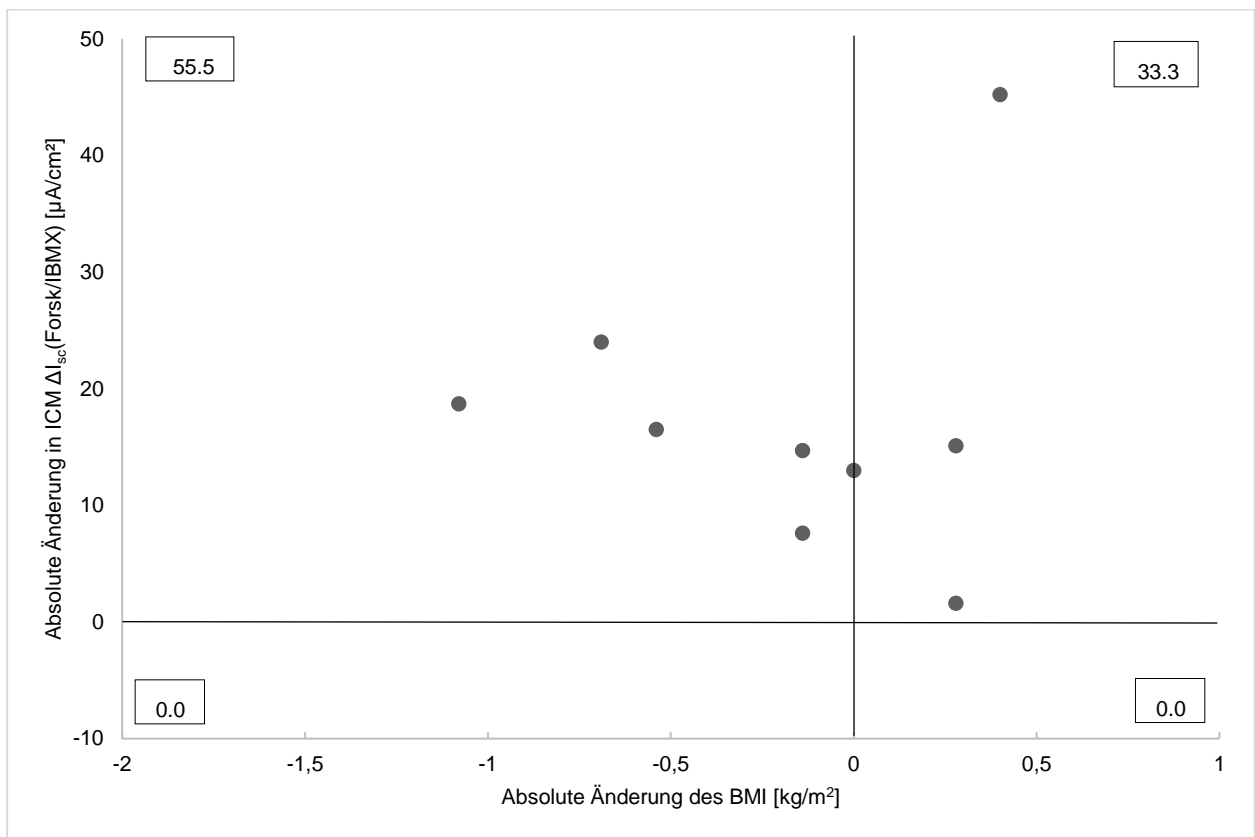


Abb. 4.6: Absolute Änderungen von  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  und BMI

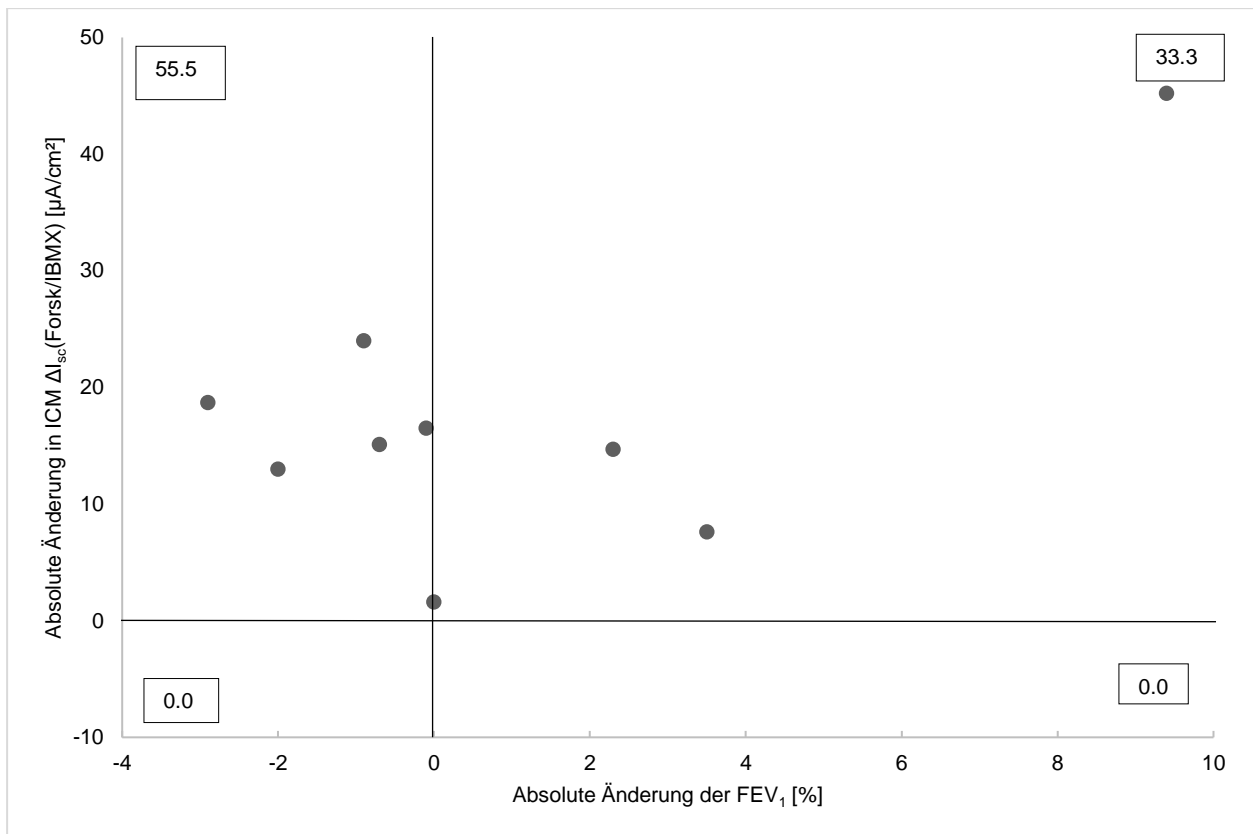


Abb. 4.7: Absolute Änderungen von  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  und  $FEV_1$

Bei Betrachtung der Änderung von  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX+CCH+Hista})$  in der ICM mit Änderung des BMI ( $r = -0,008$ ,  $p = 0,983$ ) oder Änderung der  $FEV_1$  ( $r = 0,083$ ,  $p = 0,831$ ) konnten keine statistisch signifikanten Korrelationen nachgewiesen werden (Abb. 4.8, Abb. 4.9).

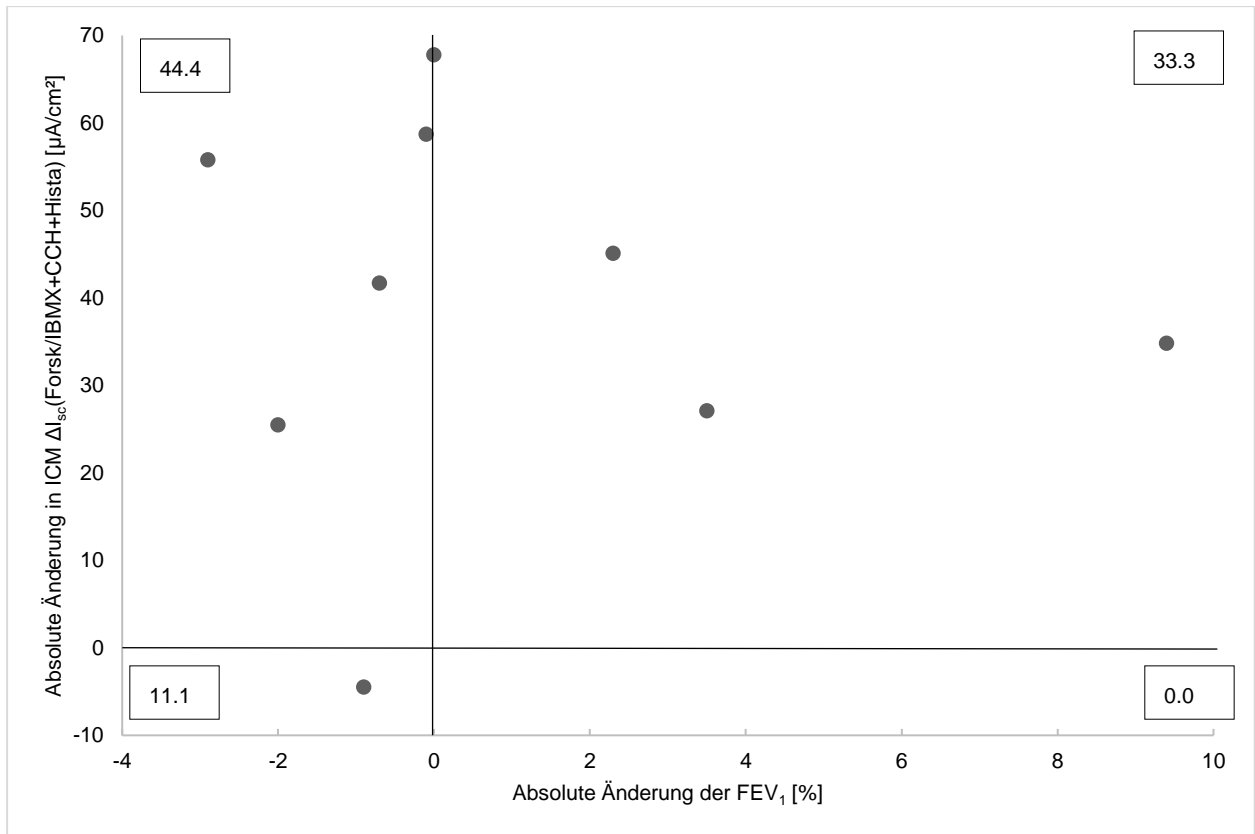


Abb. 4.8: Absolute Änderungen von  $\Delta I_{sc}$ (Forsk/IBMX+CCH+Hista) und FEV<sub>1</sub>

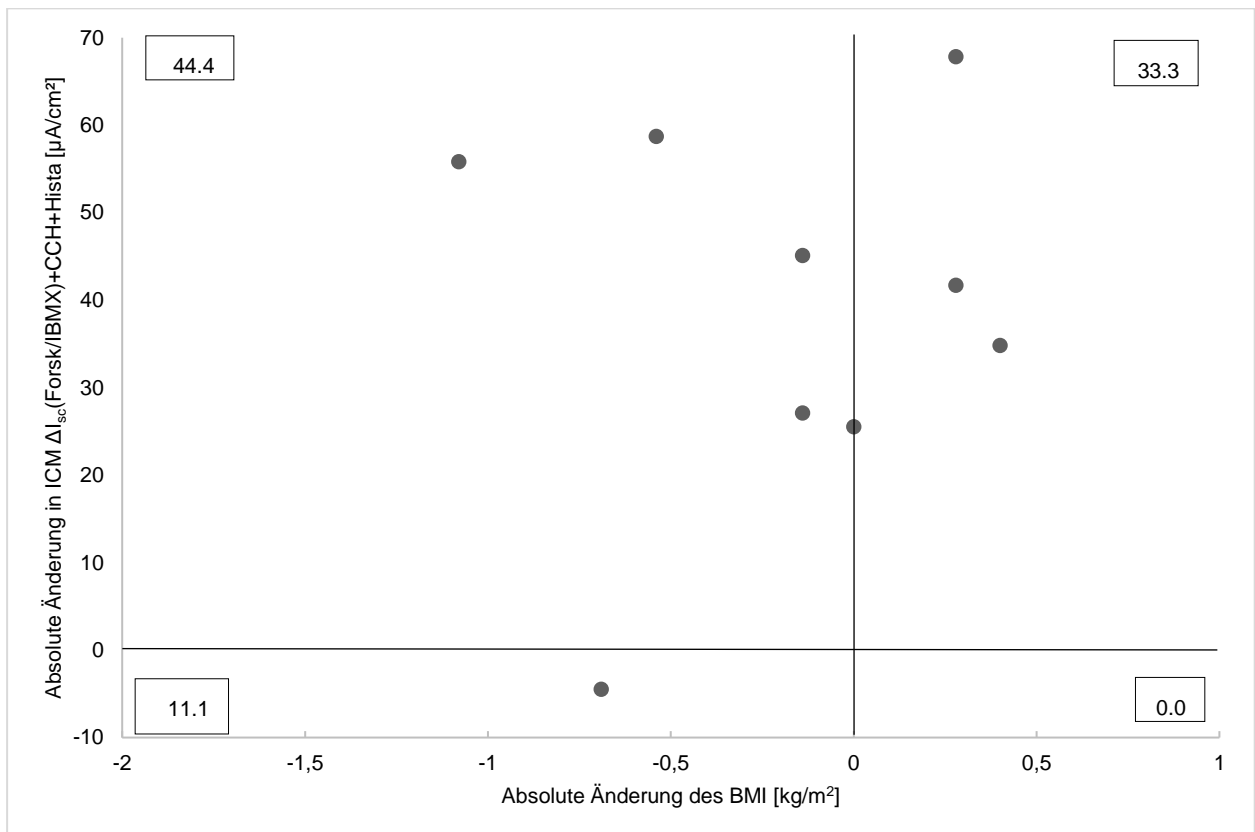


Abb. 4.9: Absolute Änderungen von  $\Delta I_{sc}$ (Forsk/IBMX+CCH+Hista) und BMI

Bei Betrachtung der CFTR-Biomarker untereinander zeigte sich die höchste Konkordanz von 100% (9 von 9 Patienten) zwischen der absoluten Änderung des Schweißchlorids gegenüber  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  in der ICM (Abb. 4.10). Alle F508del-homozygoten Patienten von Patientengruppe A wiesen in dieser Untersuchung nach Therapie mit Lumacaftor/Ivacaftor eine Verbesserung des Schweißchlorids sowie eine Verbesserung des ICM-Parameters  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  vor. Eine gegenseitige Korrelation konnte jedoch nicht statistisch nachgewiesen werden ( $r = 0,433$ ,  $p = 0,244$ ) (Tab. 4.3).

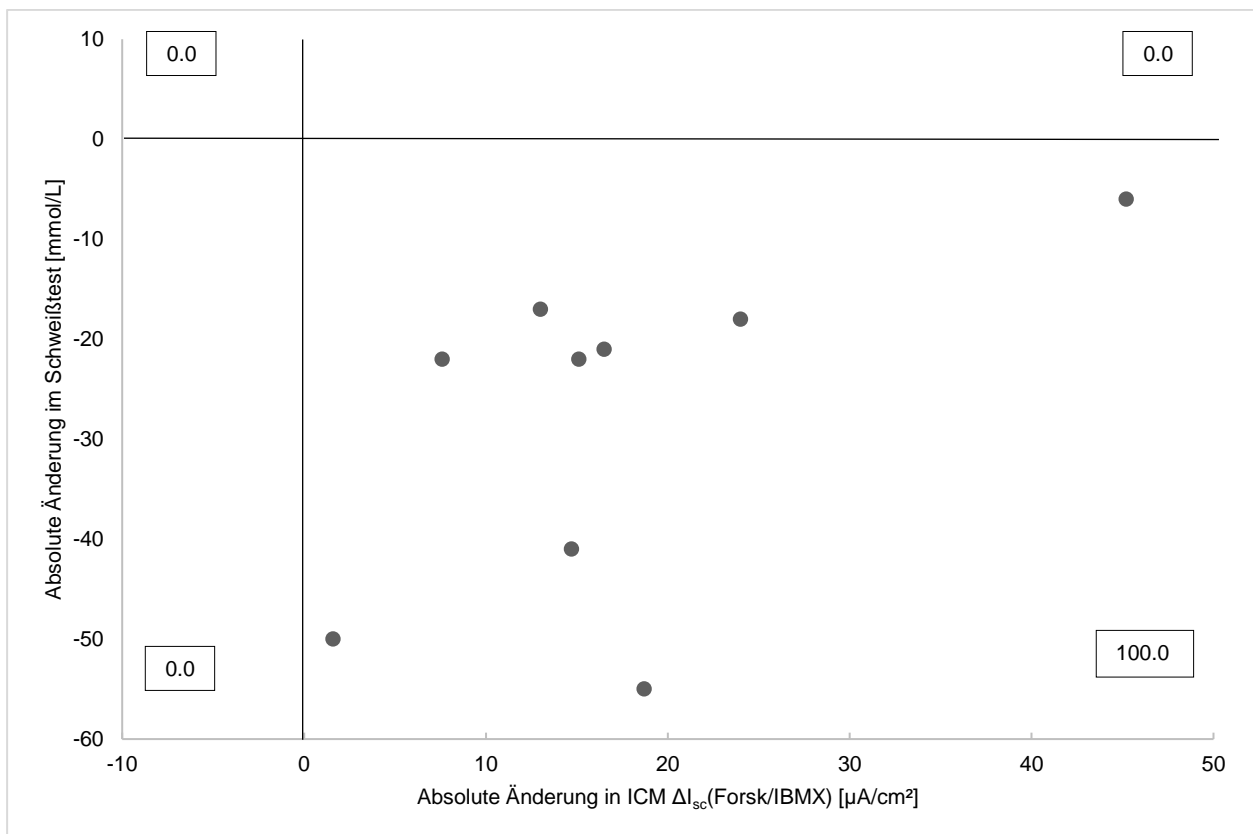


Abb. 4.10: Absolute Änderungen von Schweißchlorid und  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$

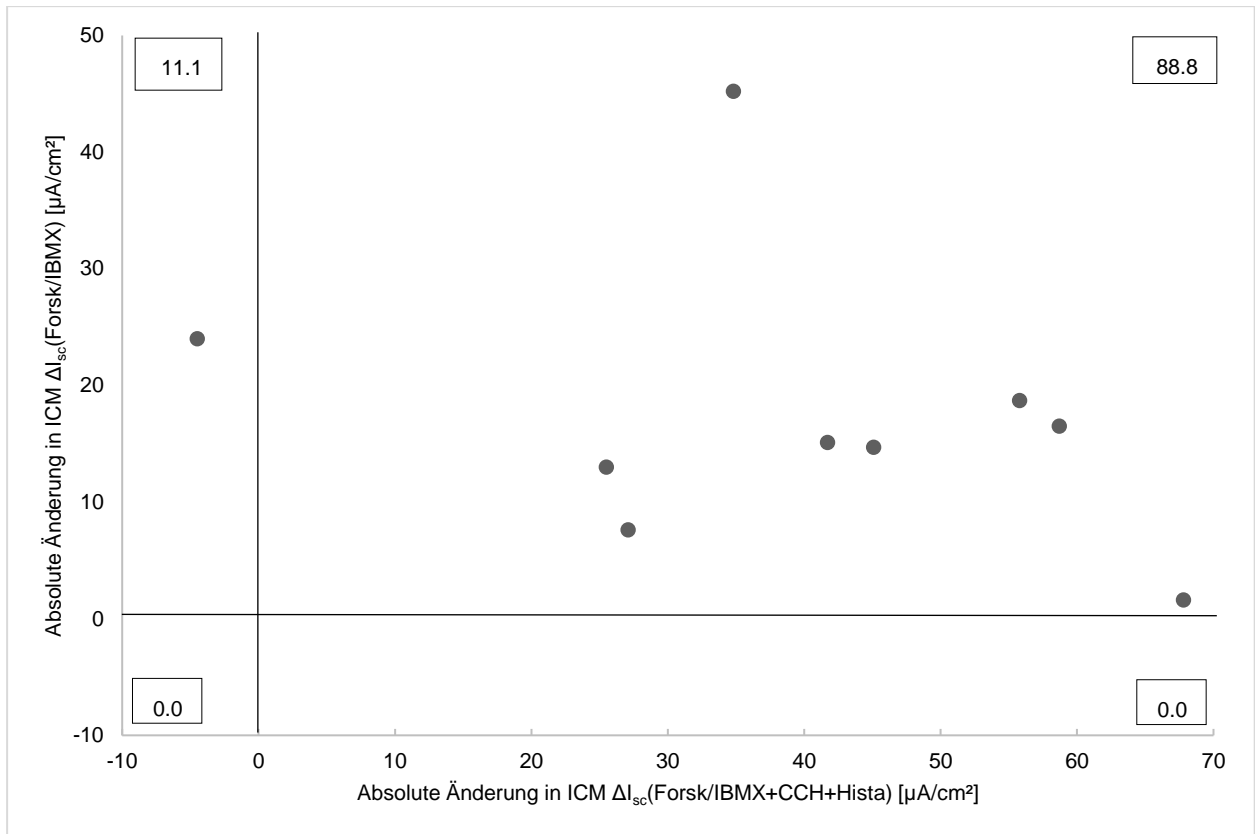


Abb. 4.11: Absolute Änderungen  $\Delta I_{sc}$ (Forsk/IBMX) und  $\Delta I_{sc}$ (Forsk/IBMX+CCH+Hista)

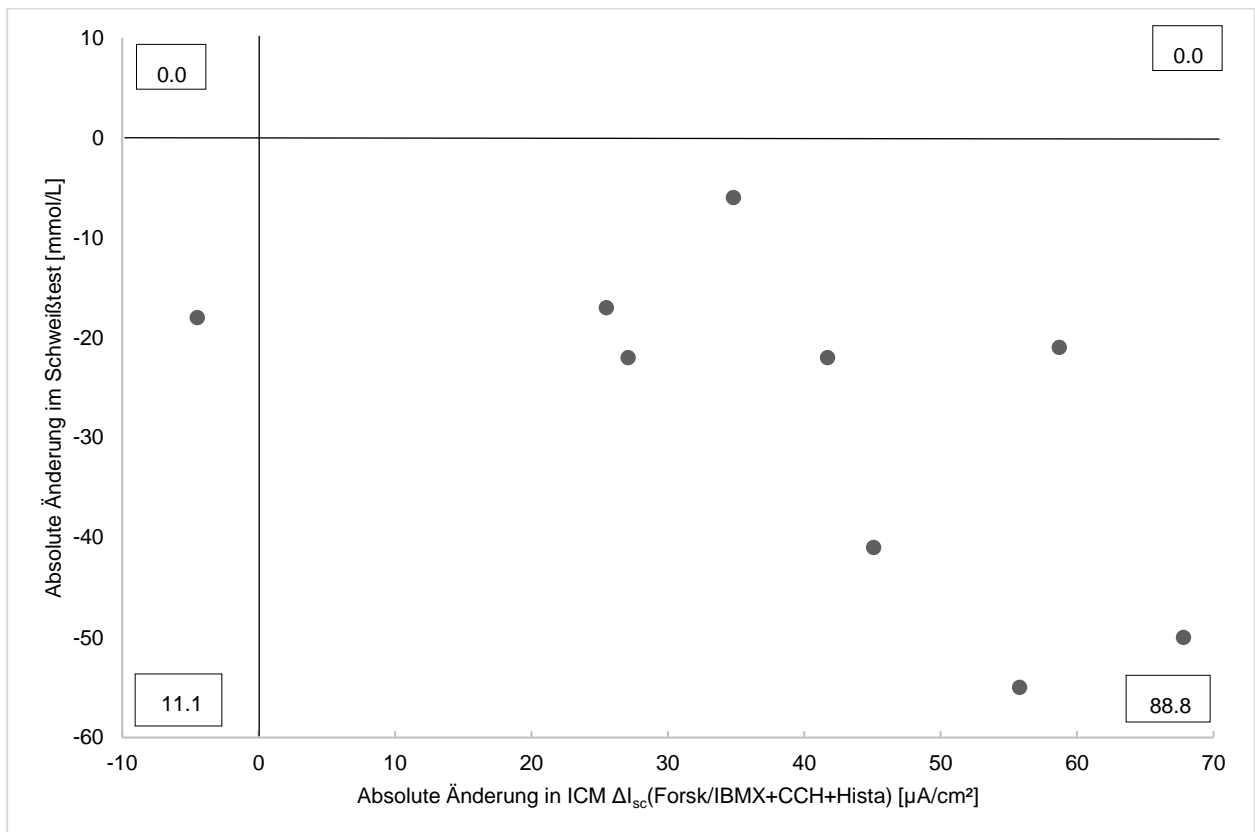


Abb. 4.12: Absolute Änderungen von Schweißchlorid und  $\Delta I_{sc}$ (Forsk/IBMX+CCH+Hista)

Ebenso nicht statistisch signifikant zeigten sich die Korrelationen zwischen den absoluten Änderungen der beiden ICM-Parametern  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  und  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX+CCH+Hista})$  ( $r = 0,233$ ,  $p = 0,546$ ) sowie zwischen den absoluten Änderungen des ICM Parameters  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX+CCH+Hista})$  und der des Schweißchlorids ( $r = 0,633$ ,  $p = 0,067$ ) (Tab. 4.3).

*Tab. 4.3: Korrelationen zwischen Änderungen der CFTR-Biomarker*

<b>Biomarker</b>	<b>Korrelationskoeffizient</b>	<b>Signifikanz</b>
ICM $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$ x Schweißchlorid	0,433	0,244 Nicht signifikant
ICM $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$ x $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX+CCH+Hista})$	0,233	0,546 Nicht signifikant
Schweißchlorid x $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX+CCH+Hista})$	0,633	0,067 Nicht signifikant

Hervorzuheben ist, dass in dieser Untersuchung bei allen F508del-homozygoten Patienten eine Verbesserung von mindestens zwei untersuchten Biomarkern festzustellen war.

## **4.2 Patientengruppe B**

Folgend werden die Ergebnisse der Untersuchungen von Patienten der Patientengruppe B erläutert. In untenstehenden Tabellen werden der klinische Phänotyp sowie der Genotyp der Patienten mit seltenen *CFTR*-Mutationen mit unklarer klinischer Relevanz dargestellt und anschließend findet eine diagnostische Klassifikation nach *CFTR*-Funktionsdiagnostik statt.

Tab. 4.4: Klinischer Phänotyp Patientengruppe B

	Patientenalter bei Untersuchung [y]	Geschlecht [w, m]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	LuFu [FEV1 %]	Schweißchlorid [mmol/L]	Bronchiektasien	Lungen-Tx	Chron. Bakter. Kolonisation	Exokrine PS/PI	Chron. Sinusitis	Nasale Polypen	Intestinale Beteiligung	Sonstige Begleiterkrankungen
Patient 1	50	m	32,24	60,7 (2016)	70	+	-	PA	PS	+	+	Steatosis hepatitis Sigma-divertikulose	OSAS
Patient 2	17	m	19,4	98,6 (06/2016)	110	-	-	PA Staph.aureus	PI	-	-	Hepathopathie Splénomegalie	Patholog. Glukosetoleranz
Patient 3	26	w	20,89	48,0 (10/2016)	75	+	-	Staph.aureus	PS	+	+	-	Asthma bronchiale
Patient 4	25	m	26,57	n.d.	46,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Patient 5	29	m	25,11 (2019)	78 (10/2017)	99	+	-	PA Staph.aureus	PI	-	+	Rez. DIOS Leberzirrhose Splénomegalie	CF-Arthropathie
Patient 6	7	m	16,28 (2016)	105,9 (08/2016)	98	-	-	-	PI	Allerg. Rhinitis	+	St.p. Mekoniumileus Steatosis hepatitis	Briden? DIOS?
Patient 7	1	w	n.d.	n.d.	QNS	-	-	-	-	-	-	-	-
Patient 8	7	m	n.d.	n.d.	38	-	-	-	-	-	-	-	Rez. respir. Infekte
Patient 9	5	m	16,5 (10/2019)	83 (10/2019)	109,5	+	-	Staph.aureus Häm. infl. PA im RA 2019	PI	-	-	+	Kleinwuchs
Patient 10	2	w	13,6 (01/2017) 4. P.c.	n.d.	73	-	-	-	-	-	-	St.p. Mekoniumileus	Intrauterine Wachstumsverzögerung, Frühgeburt Dystrophie

Legende: n.d.= nicht durchgeführt, ST = der Wert in mmol/L ergibt sich als Durchschnitt aus den Messergebnissen an linkem und rechtem Arm, QNS = quantity not sufficient;

+ = vorhanden, - = nicht vorhanden, PS = Pankreassuffizienz, PI = Pankreasinsuffizienz



Tab. 4.5: Genotyp Patientengruppe B

Patient	Molekulargen. CFTR-Diagnostik	Mutation 1. Allel	CF Mutation Database	CFTR2	CFTR France	Mutation 2. Allel	CF Mutation Database	CFTR2	CFTR France
Patient 1	Kompl. Seq.	R75Q c.224G>A p.Arg75Gln	+	+ Nicht-CF- verursachend	+ Nicht-CF- verursachend	c.1221delA p.Glu407AsnfsX35	-	-	-
Patient 2	Inkompl. Seq.	c.1894G>T p.Glu587Sto	-	-	-	c.1894G>T p.Glu587Sto	-	-	-
Patient 3	MLPA/kompl. Seq.	c.3259G>C p.Ala1087Pro	+	-	-	CFTRdelet13,14a c.(1766+1_1767-1)_ 2619+1_2620-1)del	-	+ (8 Patienten) CF-verursachend, PI	-
Patient 4	MLPA/ inkompl. Seq.	N1303K c.3909C>G p.Asn1303Lys	+	+ CF- verursachend, PI	+ CF-verursachend	c.241T>C p.Phe81Leu	-	-	-
Patient 5	Kompl. Seq.	F508del c.1521_1523delCTT p.Phe508del	+	+ CF- verursachend, PI	+ CF-verursachend	3600+2dupT c.3468+2dupT	+	+ 12 Patienten CF-verursachend, PI	-
Patient 6	Kompl. Seq.	G542X c.1624G>T p.Gly542X	+	+ CF- verursachend, PI	+ CF-verursachend	c.748C>T p.Q250X	-	-	-
Patient 7	MLPA/kompl. Seq.	F508del c.1521_1523delCTT p.Phe508del	+	+ CF- verursachend, PI	+ CF-verursachend	Q1352H(G>C) c.4056G>C p.Gln1352His	+	-	+ CFRD causing
Patient 8	Kompl. Seq.	F508del c.1521_1523delCTT p.Phe508del	+	+ CF- verursachend, PI	+ CF-verursachend	M952T c.2855T>C p.Met952Thr	+	+ 5 Patienten	+ 3 Patienten VUS5
Patient 9	Kompl. Seq.	Del Exon 17a-17b-18 c.2988+1173_3468+ 2102_del c.2989-2593del8899	-	-	Del Exon 17a-17b-18 c.2989-?_3468+?del 1 Patient CF-verursachend	Del Exon 17a-17b-18 c.2988+1173_3468+ 2102_del c.2989-2593del8899	-	-	Del Exon 17a-17b-18 c.2989-?_3468+?del 1 Patient CF-verursachend
Patient 10	Inkompl. Seq.	F508del c.1521_1523delCTT p.Phe508del	+	+ CF- verursachend, PI	+ CF-verursachend	11366N c.4097T>A p.Ile1366Asn	-	+ 5 Patienten	-

Legende: erstangeführte Mutationsbezeichnung = legacy name, c. = cDNA name, p. = protein name, + = in Datenbank gelistet, - = in Datenbank nicht gelistet, Seq = CFTR-Gen-Sequenzierung komplett/inkomplett, MLPA = multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation, ? = Phänotyp nicht näher beschrieben,

In Tabelle 4.4 erfolgte eine klinische Charakterisierung der Patientengruppe. Sie beinhaltet biometrische Daten wie BMI und Alter, Ergebnisse zu Schweißtest und Lungenfunktion, sowie CF-typische klinische Symptome und Erkrankungsmerkmale, die für eine CF-Diagnosestellung relevant sind.

Die Tabelle 4.5 gibt eine Übersicht aller *CFTR*-Mutationen der Patientengruppe B. Es werden die Listung in den *CFTR*-Mutationsdatenbanken (wie in Kapitel 1.4 beschrieben), sowie Informationen über Häufigkeit und Pathogenität - soweit bekannt - dargestellt.

*Tab. 4.6: Listung der CFTR-Mutationskombinationen in der CFTR2-Datenbank*

<b>CFTR-Mutationskombination in CFTR2</b>	
Patient 1	
Patient 2	
Patient 3	
Patient 4	
Patient 5	6 Patienten, CF-verursachend, Pankreasinsuffizienz
Patient 6	
Patient 7	
Patient 8	
Patient 9	
Patient 10	4 Patienten, CF-verursachend, Pankreassuffizienz

Legende: - = in dieser Kombination nicht gelistet

Die Tabelle 4.6 zeigt auf, welche der Mutationskombinationen der 10 untersuchten Patienten schon in der CFTR2-Datenbank in selbiger Kombination und mit welchem Krankheitswert erwähnt sind. Hierbei sind nur die Mutationskombinationen von Patient 5 und Patient 10 in der Datenbank verzeichnet, beide Kombinationen als CF-verursachend beschrieben. Mit der genetischen Kombination von Patient 5 sind nur 6 Patienten, mit der Kombination von Patient 10 lediglich 4 Patienten beschrieben.

Tab. 4.7: ICM + NPD Untersuchungsergebnisse Patientengruppe B

	ICM				NPD				
	$\Delta I_{sc}$ (CCH-pre-washout) [ $\mu A/cm^2$ ]	$\Delta I_{sc}$ (Forsk/IBMX) [ $\mu A/cm^2$ ]	$\Delta I_{sc}$ (CCH) [ $\mu A/cm^2$ ]	$\Delta I_{sc}$ (Forsk/IBMX+CCH+Hista) [ $\mu A/cm^2$ ]	Basale PD [mV]	$\Delta PD$ (Amilorid) [mV]	$\Delta PD$ (0Cl+Iso) [mV]	Wilschanski-Index	Sermet-Score
Patient 1	-17,5	0,4	-11,9	-11,3	-46,85	39,55	-6,7	0,84	-1,2405
Patient 2	-5,1	1,0	-6,7	-2,7	-31,65	25,1	-2,3	0,81	-0,672
Patient 3	-6,2	3,8	-6,1	1,3	-39	35,3	2,29	1,07	-2,0169
Patient 4	6,5	6,9	21,6	31,7	-32,75	24,9	-21,3	0,43	1,098
Patient 5	-5,7	0,3	-8,2	-5,1	-44,9	30,24	-5,99	0,82	-0,8531
Patient 6	-9,0	1,7	-15,4	-14,1	-34,55	26,975	-2,545	0,91	-1,0688
Patient 7	15,4	52,6	61,9	134,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Patient 8	45,2	28,0	62,0	135,5	-56,35	49,75	-31,75	0,53	1,005
Patient 9	-4,2	0,3	-15,8	-12,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Patient 10	-6,3	1,3	1,2	4,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Legende: n.d. = nicht durchgeführt, ICM = Intestinale Kurzschlussstrommessung, NPD = Nasale Potentialdifferenzmessung,  $I_{sc}$  = Intestinaler Kurzschlussstrom

In Tabelle 4.7 wird die CFTR-Funktionsdiagnostik nähergehend erläutert, die ICM- und NPD-Untersuchungsergebnisse von Patientengruppe B werden zusammengefasst. Bei Auflistung der Ergebnisse wurde das Hauptaugenmerk auf die für die Fragestellung aussagekräftigsten funktionsdiagnostischen Parameter gelegt, eine diagnostische Interpretation findet sich in Tabelle 4.8.

## 4.2.1 Diagnostische Klassifikation nach CFTR-Funktionsanalyse

Tab. 4.8: Zusammenschau der Ergebnisse der CFTR-Funktionsdiagnostik, diagnostische Interpretation Patientengruppe B

	Schwefelchlorid [mmol/L]	ICM $\Delta I_{sc}$ (CCH prewashout) [ $\mu A/cm^2$ ]	ICM $\Delta I_{sc}$ (Forsk/IBM)+ CCH+Hista) [ $\mu A/cm^2$ ]	NPD Wilschanski- Index	NPD Sermet-Score	CF-Diagnose- Status vor Funktions- diagnostik	CF-Diagnose	CF-Diagnose-Status nach Funktionsdiagnostik
Patient 1	70 <b>CF</b>	-17,5 <b>CF</b>	-11,3 <b>CF</b>	0,84 <b>CF</b>	-1,2405 <b>CF</b>	PS-CF	<b>Bestätigt</b>	<b>PS-CF</b>
Patient 2	110 <b>CF</b>	-5,1 <b>CF</b>	-2,7 <b>CF</b>	0,81 <b>CF</b>	-0,672 <b>CF</b>	PI-CF	<b>Bestätigt</b>	<b>PI-CF</b>
Patient 3	75 <b>CF</b>	-6,2 <b>CF</b>	1,3 <b>CF</b>	1,07 <b>CF</b>	-2,0169 <b>CF</b>	PS-CF	<b>Bestätigt</b>	<b>PS-CF</b>
Patient 4	46,5 Intermediärbereich	6,5 <b>CF</b>	31,7 <b>CF</b>	0,43 non-CF	1,088 non-CF	Fragliche CF	Nicht bestätigt	<b>CFTR-Dysfunktion</b>
Patient 5	99 <b>CF</b>	-5,7 <b>CF</b>	-5,1 <b>CF</b>	0,82 <b>CF</b>	-0,8531 <b>CF</b>	PI-CF	<b>Bestätigt</b>	<b>PI-CF</b>
Patient 6	98 <b>CF</b>	-9,0 <b>CF</b>	-14,1 <b>CF</b>	0,91 <b>CF</b>	-1,0688 <b>CF</b>	PI-CF	<b>Bestätigt</b>	<b>PI-CF</b>
Patient 7	QNS	15,4 non-CF	134,2 non-CF	n.d.	n.d.	Fragliche CF	Nicht bestätigt	<b>CF unwahrscheinlich</b>
Patient 8	38 Intermediärbereich	45,2 non-CF	135,5 non-CF	0,53 <b>CF</b> <sup>1</sup> non-CF <sup>1</sup>	1,005 non-CF	Fragliche CF	Nicht bestätigt	<b>CF unwahrscheinlich</b>
Patient 9	109,5 <b>CF</b>	-4,2 <b>CF</b>	-12,7 <b>CF</b>	n.d.	n.d.	PI-CF	<b>Bestätigt</b>	<b>PI-CF</b>
Patient 10	73 <b>CF</b>	-6,3 <b>CF</b>	4,3 <b>CF</b>	n.d.	n.d.	PS-CF	<b>Bestätigt</b>	<b>PS-CF</b>

Legende: n.d. = nicht durchgeführt, ICM = Intestinale Kurzschlussstrommessung, NPD = Nasale Potentialdifferenzmessung, QNS = quantity not sufficient, ST = der Wert in mmol/L ergibt sich als Durchschnitt aus den Messergebnissen an linkem und rechtem Arm, PI-CF= CF mit Pankreasinsuffizienz, PS-CF = CF mit Pankreassuffizienz, <sup>1</sup> = CF bei zentrumsinternem Referenzbereich, non-CF bei internationalem Referenzbereich,

Zusätzlich wurde in Tabelle 4.8 anhand von gängigen cut-off-Werten in „CF“ oder „non-CF“ klassifiziert. Bei der NPD passierte die Einteilung anhand des Wilschanski-Index und des Sermet-Scores (Kapitel 3.5.3). Bei der ICM wurde anhand von den beiden diskriminationsfähigsten Parametern  $\Delta I_{sc}$ (CCH-prewashout) und  $\Delta I_{sc}$ (Forsk/IBMX+CCH+Hista) zwischen CF und non-CF klassifiziert (Kapitel 3.4.3).

Das Patientenkollektiv konnte anhand der Messungsergebnisse und in Zusammenschau des klinischen Phänotyps in 4 Gruppen eingeteilt werden: PI-CF (n=4), PS-CF (n=3), CFTR-Dysfunktion (n=1) und CF unwahrscheinlich (n=2) (Abb. 4.13). Im Vergleich zum CF-Diagnose-Status vor der CFTR-Funktionsmessung ergaben sich in den Gruppen PI-CF (n=4) und PS-CF (n=3) keine Unterschiede, die Patientengruppe mit fraglicher CF (n=3) konnte jedoch anhand der Funktionsdiagnostik in 2 Gruppen unterteilt werden: CFTR-Dysfunktion (n=1; Patient 4) und CF unwahrscheinlich (n=2; Patient 7 und Patient 8) (Abb. 4.13).

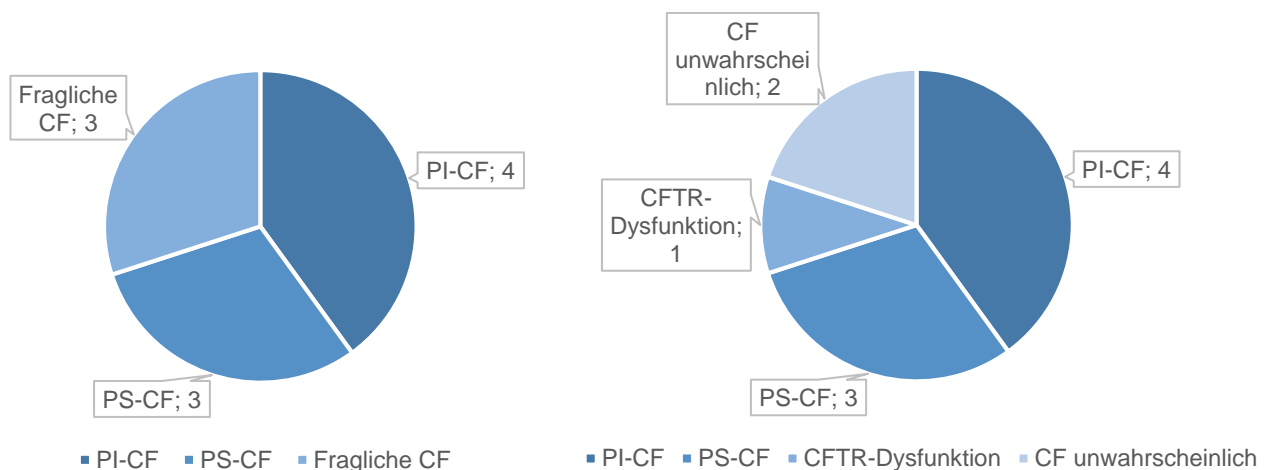


Abb. 4.13: CF-Diagnose-Status vor (links) und nach (rechts) CFTR-Funktionsdiagnostik

Jeder Patient der Gruppe wird folgend anhand der Befunde der CFTR-Funktionsdiagnostik und der klinischen Befunde einzeln betrachtet, die Diagnose bestätigt, widerlegt oder weitgehend ausgeschlossen.

#### 4.2.1.1 Gruppe PI-CF

Tab. 4.9: Gruppe der PI-CF-Patienten (n=4)

	Schweißtest [mmol/L]	ICM $\Delta I_{sc}$ (CCH- prewashout) [ $\mu A/cm^2$ ]	ICM $\Delta I_{sc}$ (Forsk/ IBMX+CCH+ Hista) [ $\mu A/cm^2$ ]	NPD Wilschanski- Index	NPD Sermet- Score	CF- Diagnose- Status vor Funktions- diagnostik	CF- Diagnose	CF- Diagnose- Status nach Funktions- diagnostik
Patient 2	110 CF	-5,1 CF	-2,7 CF	0,81 CF	-0,672 CF	PI-CF	<b>Bestätigt</b>	<b>PI-CF</b>
Patient 5	99 CF	-5,7 CF	-5,1 CF	0,82 CF	-0,8531 CF	PI-CF	<b>Bestätigt</b>	<b>PI-CF</b>
Patient 6	98 CF	-9,0 CF	-14,1 CF	0,91 CF	-1,0688 CF	PI-CF	<b>Bestätigt</b>	<b>PI-CF</b>
Patient 9	109,5 CF	-4,2 CF	-12,7 CF	n.d.	n.d.	PI-CF	<b>Bestätigt</b>	<b>PI-CF</b>

#### Patient 2

Tab. 4.10: Genotyp Patient 2

Patient 2	1. Allel	2. Allel
legacy name		
cDNA name	c.1894G>T	c.1894G>T
protein name	p.Glu587Stop	p.Glu587Stop

In Zusammenschau aller Befunde der Untersuchungen von Patient 2 ließ sich eine CF-Diagnose bestätigen. Die klinischen Daten des Patienten, die Pankreasinsuffizienz sowie der hochpositive Schweißtest des Patienten sprechen für eine CF-Diagnose (PI-CF). Die bei diesem Patienten homozygot auftretende Mutation c.1894G>T ist bisher in keiner *CFTR*-Mutations-Datenbank beschrieben und ihre pathophysiologische, phänotypische Auswirkung gänzlich unbekannt. Nach Ablauf der elektrophysiologischen *CFTR*-Testung konnte die Mutation c.1894G>T als CF-verursachend eingestuft werden.

#### Patient 5

Tab. 4.11: Genotyp Patient 5

Patient 5	1. Allel	2. Allel
legacy name	F508del	IVS18+2dupT
cDNA name	c.1521_1523delCTT	c.3468+2dupT
protein name	p.Phe508del	

Die hier vorliegende Mutation c.3468+2dupT konnte in Kombination mit der Mutation F508del und im Zusammenhang mit dem pathologischen Schweißtest und einem CF-typischen klinischen Erscheinungsbild als CF-verursachend eingestuft werden. Anhand von 6 Einzelfällen trifft die *CFTR*-Mutationsdatenbank CFTR2 die Annahme, ein Patient mit oben beschriebener Mutationskombination sei an CF und einer Pankreasinsuffizienz erkrankt. Dies konnte anhand der vorliegenden Untersuchung von Patient 5 bestätigt werden.

Bei Patient 5 könnte eine Indikationsstellung zur Therapie mit dem CFTR-Modulator Trikafta® angedacht werden, das Kombinationspräparat wäre auf beschriebenen Genotyp zugelassen und könnte in diesem Falle eventuell einem schweren Krankheitsverlauf vorbeugen und die CFTR-Funktion verbessern.

## Patient 6

Tab. 4.12: Genotyp Patient 6

Patient 6	1. Allel	2. Allel
legacy name	G542X	
cDNA name	c.1756G>T	c.748C>T
protein name	p.Gly542X	p.Q250X

Bei diesem Patienten konnte ebenfalls die CF-Diagnose bestätigt werden. Der Schweißtest sowie die elektrophysiologische CFTR-Funktionsdiagnostik zeigten eindeutig pathologische Ergebnisse und verifizierten somit in Kombination mit dem klinischen Erscheinungsbild des Patienten die Diagnose. Die bislang unbekannte Mutation c.748C>T und die als CF-verursachend eingestufte Mutation c.1756G>T bieten eine Grundlage für die phänotypische Ausprägung einer CF-Erkrankung.

Die Mutation c.748C>T konnte somit als CF-verursachend eingestuft werden, wenn sie in Kombination mit einer CF-verursachenden Mutation vorkommt.

## Patient 9

Tab. 4.13: Genotyp Patient 9

Patient 9	1. Allel	2. Allel
legacy name	Del Exon 17a-17b-18	Del Exon 17a-17b-18
cDNA name	c.2988+1173_3468+2102_del c.2989-2593del8899	c.2988+1173_3468+2102_del c.2989-2593del8899
protein name		

Die Mutation c.2989-2593del8899, welche bei Patient 9 homozygot vorliegt, konnte im Zusammenhang mit dem hochpositiven Schweißtest, der Pankreasinsuffizienz sowie dem klinischen Phänotyp und der pathologischen CFTR-Funktion in NPD und ICM als CF-verursachend eingestuft werden.

#### 4.2.1.2 Gruppe PS-CF

Tab. 4.14: Gruppe der PS-CF-Patienten (n=3)

	Schweißtest [mmol/L]	ICM $\Delta I_{sc}$ (CCH- prewashout) [ $\mu A/cm^2$ ]	ICM $\Delta I_{sc}$ (Forsk/ IBMX+CCH+ Hista) [ $\mu A/cm^2$ ]	NPD Wilschanski- Index	NPD Sermet- Score	CF- Diagnose- Status vor Funktions- diagnostik	CF- Diagnose	CF- Diagnose- Status nach Funktions- diagnostik
Patient 1	70 <b>CF</b>	-17,5 <b>CF</b>	-11,3 <b>CF</b>	0,84 <b>CF</b>	-1,2405 <b>CF</b>	PS-CF	<b>Bestätigt</b>	<b>PS-CF</b>
Patient 3	75 <b>CF</b>	-6,2 <b>CF</b>	1,3 <b>CF</b>	1,07 <b>CF</b>	-2,0169 <b>CF</b>	PS-CF	<b>Bestätigt</b>	<b>PS-CF</b>
Patient 10	73 <b>CF</b>	-6,3 <b>CF</b>	4,3 <b>CF</b>	n.d.	n.d.	PS-CF	<b>Bestätigt</b>	<b>PS-CF</b>

#### Patient 1

Tab. 4.15: Genotyp Patient 1

Patient 1	1. Allel	2. Allel
legacy name	R75Q	
cDNA name	c.224G>A	c.1221delA
protein name	p.Arg75Gln	p.Glu407AsnfsX35

In vorliegendem Einzelfall ist eine nicht-CF-verursachende Mutation mit einer Mutation unklarer Pathogenität im Genotyp des Patienten kombiniert. Mit eindeutig pathologischem Schweißtest, einer CF-typischen Klinik und einer eindeutig pathologischen CFTR-Funktion in NPD und ICM konnte die CF-Diagnose bestätigt werden. Die unbekannte Mutation c.1221delA ist somit auch in Kombination mit einer nicht-CF-verursachenden Mutation (hier R75Q), als CF-verursachend einzustufen.

#### Patient 3

Tab. 4.16: Genotyp Patient 3

Patient 3	1. Allel	2. Allel
legacy name		CFTRdele13,14a
cDNA name	c.3259G>C	c.(1766+1_1767-1)_ (2619 +1_2620-1)del
protein name		

Die hier vorliegende Mutation c.3259G>C konnte in Kombination mit der Mutation CFTRdele13,14a und in Anbetracht der CF-typischen Klinik der Patientin, dem pathologischen Schweißtest und der pathologischen Ergebnisse in NPD und ICM als Zeichen einer pathologischen CFTR-Funktion als CF-verursachend eingestuft werden.

#### Patient 10

Tab. 4.17: Genotyp Patient 10

Patient 10	1. Allel	2. Allel
legacy name	F508del	I1366N
cDNA name	c.1521_1523delCTT	c.4097T>A
protein name	p.Phe508del	p.Ile1366Asn



Die hier vorliegende seltene *CFTR*-Mutation I1366N konnte bei eindeutig pathologischem Schweißtest und pathologischer *CFTR*-Funktionsdiagnostik in Kombination mit F508del als CF-verursachend eingestuft werden.

Anhand von 4 Einzelfällen trifft die *CFTR*-Mutationsdatenbank CFTR2 die Annahme, ein Patient mit oben beschriebener Mutationskombination sei pankreassuffizient. Dies kann anhand der vorliegenden Untersuchung von Patient 10 bestätigt werden.

Bei Patient 10 kann eine Indikationsstellung zur Therapie mit dem *CFTR*-Modulator Trikafta® angedacht werden, das Kombinationspräparat wäre auf beschriebenen Genotyp zugelassen und könnte in diesem Falle möglicherweise einen schweren Krankheitsverlauf oder eine gröbere Ausprägung der Symptomatik im fortschreitenden Alter verhindern und die *CFTR*-Funktion verbessern.

#### 4.2.1.3 Gruppe *CFTR*-Dysfunktion

Tab. 4.18: Gruppe der Patienten mit *CFTR*-Dysfunktion (n=1)

	Schweißtest [mmol/L]	ICM $\Delta I_{sc}$ (CCH- prewashout) [ $\mu A/cm^2$ ]	ICM $\Delta I_{sc}$ (Forsk/ IBMX+CCH+ Hista) [ $\mu A/cm^2$ ]	NPD Wilschanski- Index	NPD Sermet- Score	CF- Diagnose- Status vor Funktions- diagnostik	CF- Diagnose	CF-Diagnose- Status nach Funktions- diagnostik
Patient 4	46,5 Inter- mediärbereich	6,5 CF	31,7 CF	0,43 non-CF	1,098 non-CF	Fragliche CF	Nicht bestätigt	CFTR-Dysfunktion

#### Patient 4

Tab. 4.19: Genotyp Patient 4

Patient 4	1. Allel	2. Allel
legacy name	N1303K	
cDNA name	c.3909C>G	c.241T>C
protein name	p.Asn1303Lys	p.Phe81Leu

Die Mutation N1303K gilt laut *CFTR2*-Datenbank als CF-verursachend, wenn sie mit einer anderen CF-verursachenden Mutation kombiniert vorliegt. Die seltene Mutation c.241T>C wurde bisher in keiner *CFTR*-Mutationsdatenbank beschrieben, deren Pathogenität ist somit ungeklärt. Der Schweißtest befand sich mit 46,5 mmol/L im diagnostischen Intermediärbereich, der Patient zeigt sich allgemein klinisch und pulmonal beschwerdefrei. Die NPD ergibt ein nicht-CF-typisches Bild, wobei die ICM eine etwas geringere cAMP-getriggerte *CFTR*-Aktivität anzeigt. Diese Befunde lassen sich mit der Diagnose einer *CFTR*-Dysfunktion vereinbaren.

Die Mutation c.241T>C kann als *CFTR*-Dysfunktion-verursachend eingestuft werden.

#### 4.2.1.4 Gruppe CF unwahrscheinlich

Tab. 4.20: Gruppe der Patienten mit unwahrscheinlicher CF-Diagnose (n=2)

	Schweißtest [mmol/L]	ICM $\Delta I_{sc}$ (CCH-prewashout) [ $\mu A/cm^2$ ]	ICM $\Delta I_{sc}$ (Forsk/IBMX+CCH+Hista) [ $\mu A/cm^2$ ]	NPD Wilschanski-Index	NPD Sermet-Score	CF-Diagnose-Status vor Funktionsdiagnostik	CF-Diagnose	CF-Diagnose-Status nach Funktionsdiagnostik
Patient 7	QNS	15,4 non-CF	134,2 non-CF	n.d.	n.d.	Fragliche CF	Nicht bestätigt	<b>CF unwahrscheinlich</b>
Patient 8	38 Intermediärbereich	45,2 non-CF	135,5 non-CF	0,53 CF (zentrumsintern) non-CF (international)	1,005 non-CF	Fragliche CF	Nicht bestätigt	<b>CF unwahrscheinlich</b>

#### Patient 7

Tab. 4.21: Genotyp Patient 7

Patient 7	1. Allel	2. Allel
legacy name	F508del	Q1352H(G>C)
cDNA name	c.1521_1523delCTT	c.4056G>C
protein name	p.Phe508del	p.Gln1352His

Eine klinische Einschätzung der Pathogenität der hier vorliegenden seltenen *CFTR*-Mutation Q1352H konnte aufgrund eines wiederholt nicht durchführbaren Schweißtestes im Vorfeld nicht gegeben werden. Die durchgeführte *CFTR*-Funktionsdiagnostik ergab eine uneingeschränkte *CFTR*-Funktion, somit konnte eine CF-Diagnose bei Patient 7 nicht bestätigt werden. Die seltene Mutation Q1352H konnte daher als nicht-CF-verursachend eingestuft werden. Es sei zu erwähnen, dass eine Therapie mit Trikafta® auf genannten Genotyp zugelassen wäre, bei nicht CF-typischer erweiterter *CFTR*-Funktionsdiagnostik und fehlender Klinik lässt sich jedoch bei Patient 7 keine Indikation zur Behandlung mit einem *CFTR*-Modulator setzen.

#### Patient 8

Tab. 4.22: Genotyp Patient 8

Patient 8	1. Allel	2. Allel
legacy name	F508del	M952T
cDNA name	c.1521_1523delCTT	c.2855T>C
protein name	p.Phe508del	p.Met952Thr

Die seltene *CFTR*-Mutation M952T konnte bei einem Schweißtest im Intermediärbereich, bei milder pulmonaler Klinik und exokriner Pankreassuffizienz sowie einer nicht-CF-typischen NPD, wenn auch mit EnaC-Hyperaktivität, und nicht-CF-typischer ICM als nicht

CF-verursachend eingestuft werden. Somit konnte eine CF-Diagnose bei Patient 8 insgesamt nicht bestätigt werden.

Es sei zu erwähnen, dass eine Therapie mit Trikafta® auf genannten Genotyp zugelassen wäre, bei nicht CF-typischer CFTR-Funktionsmessung und fehlender Klinik lässt sich jedoch bei Patient 8 keine Indikation zur Behandlung mit einem CFTR-Modulator setzen.

Um die Messungen beispielhaft zu verbildlichen, sind in Abbildung 4.14 exemplarische ICM- und NPD-Kurven abgebildet. Um die CFTR-Dysfunktion zu verbildlichen, wird hier auf Abbildung 3.10 und Abbildung 3.14 referenziert, da dort die ICM- und NPD-Messkurven von Patient 4 als Beispielkurven angeführt sind.

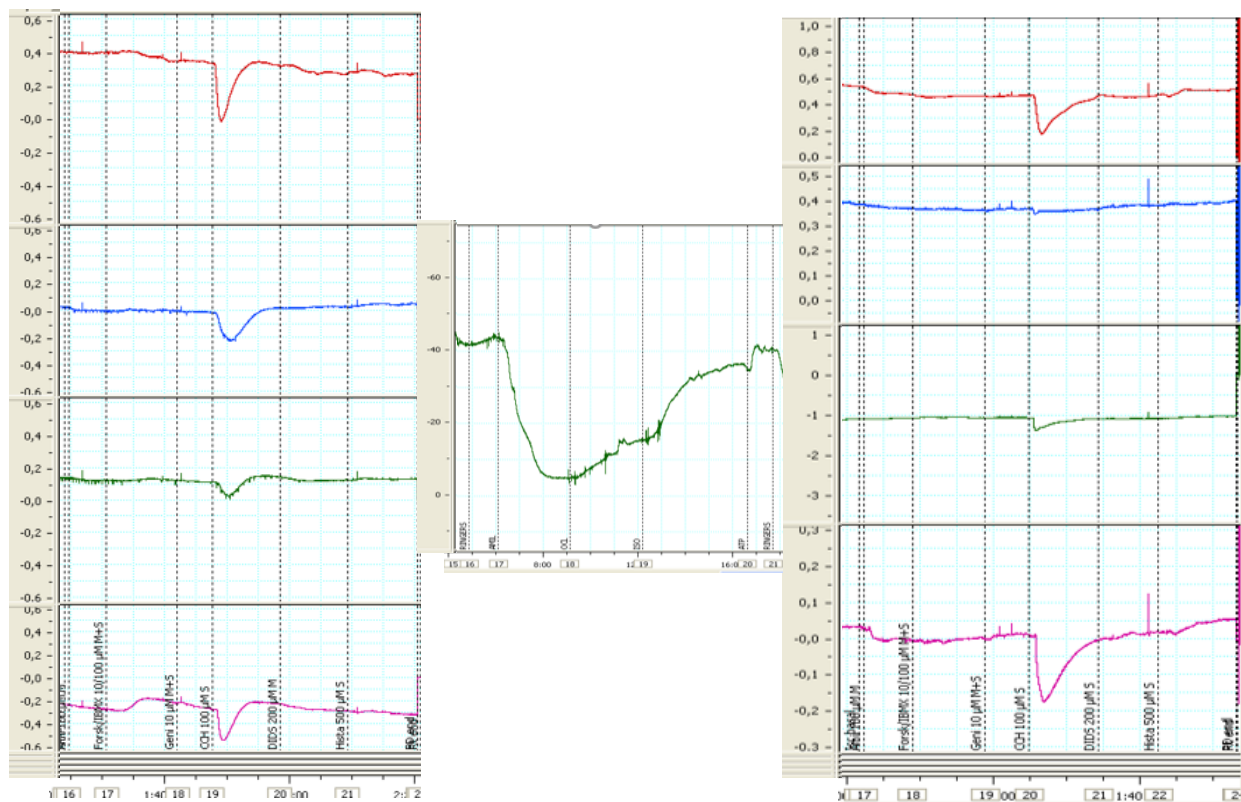


Abb. 4.14: Exemplarische Kurvendarstellungen der ICM- und NPD-Messungen aus Patientengruppe B

links: ICM-Kurve von Patient 1 (PS-CF); rechts: ICM-Kurve von Patient 9 (PI-CF);

mittig: NPD-Kurve Patient 8 (CF unwahrscheinlich)

**Legende** zu Abb. 4.14 links + rechts (ICM): x-Achse: freistehende Zahlen: Zeit in Minuten (ein Strich entspricht 5 Minuten), ICM: Zahlen im Rahmen: LabChart-Kommentare (hier: Dokumentation von Spannung, Washouts, Zufuhr von Reagenzien); y-Achse: [ $\mu$ A]: Stromstärke in Mikroampere  
Mittig (NPD): x-Achse: freistehende Zahlen: Zeit in Minuten (ein Strich entspricht einer Minute), Zahlen im Rahmen: LabChart-Kommentare (hier: Wechsel zur nächsten Lösung); y-Achse: [mV]: Potentialdifferenz in Millivolt; 300ml/h: Perfusionsgeschwindigkeit;  
Applizierte Substanzen genau wie in Methodenbeschreibung in Kapitel 3.4 und 3.5 vermerkt.

## 5 Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse für jede der beiden Patientengruppen in Kapitel 5.1 und Kapitel 5.2 diskutiert.

### 5.1 Patientengruppe A

Das Kombinationspräparat Lumacaftor/Ivacaftor ist der erste CFTR-Modulator, der für F508del-homozygote CF-Patienten zugelassen wurde (86,87). Die Phase-III-Studien zeigten Anwendungssicherheit sowie einen zuverlässigen klinischen Therapieeffekt (92). In der vorliegenden Untersuchung wurde der Effekt der Therapie mit Lumacaftor/Ivacaftor auf die CFTR-Funktion von Patienten mit einer F508del-Mutation auf beiden Allelen des *CFTR*-Gens untersucht. Die Evaluation der CFTR-Funktion erfolgte unter Verwendung von CFTR-Biomarkern wie Schweißchlorid und ICM um einen *in-vivo/ex-vivo*-Therapieeffekt in mehreren Organsystemen und die Beziehung der Biomarker-Veränderungen zur Veränderung von klinischen Parametern feststellen zu können.

In Übereinstimmung mit Ergebnissen von klinischen Studien mit Lumacaftor/Ivacaftor zeigte sich der Therapieeffekt auf klinische Parameter wie FEV<sub>1</sub> und BMI sehr variabel. Konsistent zu vorangegangenen Untersuchungen (53,92,93) konnte in dieser Untersuchung eine minimale Verbesserung der FEV<sub>1</sub> gezeigt werden, die absolute Änderung liegt im Durchschnitt bei  $0,69 \pm 3,73\%$  ( $p = 0.776$ ). Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Untersuchungen (53,92,93) hingegen zeigte sich bei der absoluten Änderung des BMI eine Verschlechterung nach Lumacaftor/Ivacaftor-Therapie um durchschnittlich  $0,18 \pm 0,50 \text{ kg/m}^2$  ( $p = 0.400$ ) (Tab. 4.1).

Nach den CFTR-Biomarkern Schweißchlorid und ICM in dieser Arbeit zu urteilen, kann nach Therapie mit Lumacaftor/Ivacaftor eine partielle Wiederherstellung der CFTR-Funktion in Schweißdrüsen und intestinalem Epithel von CF-Patienten mit F508del-homozygoten Genotyp angenommen werden. Die durchschnittliche Reduktion der Schweißchlorid-Konzentration vor und nach Therapie betrug in dieser Studie 28 mmol/L und zeigte sich somit höher als in großen Phase-II-Studien bei Erwachsenen mit 8-10 mmol/L (94) und Phase-III-Studien bei Kindern zwischen 6 und 12 Jahren mit einem Abfall von 24,8 mmol/L bei einem Betrachtungszeitraum von 24 Wochen (95) sowie in deutschen Studien nach der Medikament-Zulassung mit einem durchschnittlichen Abfall der Schweißchlorid-Konzentration von 18 mmol/L (53).

Wo der durchschnittliche Wert von  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  in der Patientengruppe A vor Therapie (Baseline) bei  $3,44 \pm 5,79$  (-3,4 bis 14,1)  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  lag, konnte nach der Therapie (Follow-Up) ein durchschnittlicher Anstieg der Forskolin-Antwort von  $17,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  und der Gruppen-Durchschnitt bei  $20,82 \pm 10,58$  (8,9 bis 43,5)  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  beobachtet werden. Interessant zu betrachten sind hierbei die zentrumsinternen Referenzwerte (Charité – Universitätsmedizin Berlin) bei gesunden Kontrollen, die ein  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  von durchschnittlich  $24,7 \pm 14,3$  (7,1 bis 55,5)  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  belegen (87). Bei Betrachtung des ICM-Parameters  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX+CCH+Hista})$  zeigte sich in der Patientengruppe A vor Therapie ein durchschnittlicher Wert von  $-14,04 \pm 17,51$  (-42,6 bis 9,9)  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Nach einem Anstieg von  $39,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  befand sich das Patientenkollektiv bei einem durchschnittlichen Wert von  $25,07 \pm 24,84$  (-25,1 bis 52,5)  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , wobei sich bei der zentrumsinternen Vergleichsgruppe gesunder Kontrollen ein Durchschnittswert von  $89,2 \pm 59,5$  (36,7 – 228,0)  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  messen ließ (87).

Es ist vorbekannt, dass CF-Patienten mit CFTR-Residualfunktions-Mutationen oftmals eine verbleibende CFTR-Funktion von 10-50% der CFTR-Normalfunktion vorweisen und dass bei Patienten mit Restfunktions-Mutationen, die mehr als 10% der CFTR-Normalfunktion als Restfunktion bewirken, eine Assoziation zu Pankreassuffizienz im klinischen Langzeit-Outcome hergestellt werden kann (49,55,96,97). Eine schon in früher Kindheit, verbunden mit einer raschen Diagnosestellung, begonnene Therapie mit Lumacaftor/Ivacaftor von CF-erkrankten Kindern und die hiermit verbundene Wiederherstellung von CFTR-Funktion lässt eine Verbesserung des klinischen Langzeit-Outcomes bei F508del-homozygoten Patienten vermuten (95,98,99). Ein sicherer Nachweis des Eintretens von verbessertem Langzeit-Outcome mit CFTR-modulierender Therapie bei einer Teilwiederherstellung der CFTR-Funktion bei F508del-homozygoten Patienten ließe sich jedoch nur durch Longitudinalstudien erreichen.

Interessant an der hier vorliegenden Untersuchung ist die Variabilität der Veränderungen der untersuchten Parameter. Während in Zulassungsstudien klinische Parameter wie BMI und  $FEV_1$  als primärer Outcomeparameter genutzt wurden (92–94,98), zeigte sich in dieser Untersuchung, dass der BMI und die  $FEV_1$  eine Zunahme der *in-vivo*-CFTR-Funktion nach vier Wochen Therapie nur unzuverlässig widerspiegeln. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass in der vorliegenden Arbeit der Untersuchungszeitraum lediglich 4 Wochen betrug, während sich der Beobachtungszeitraum in Zulassungsstudien über mindestens 6 Monate erstreckte und daher in jenen Studien auch die Möglichkeit gegeben war, klinische Veränderungen anhand von Parametern wie

des BMI oder der Lungenfunktion zu entdecken. In der hier vorliegenden Kurzzeitbetrachtung von 4 Wochen konnten die Änderungen des Schweißchlorids oder der Forskolin-Antwort in der ICM die partielle Wiederherstellung der CFTR-Funktion durch CFTR-Modulator-Therapie gut aufzeigen. Sie stellen somit in der Kurzzeitbetrachtung des Therapieeffekts einen zuverlässigeren und sensibleren Outcomeparameter als klinische Endpunkte wie BMI und FEV<sub>1</sub> dar. Dem gegenüber steht der Langzeiteffekt der Therapie, der eine mögliche Reversibilität von chronischen Organveränderungen bewirken könnte. Im Falle eines solchen Effekts würden klinische Outcome-Parameter zur Therapieeffektbeurteilung folglich wieder in den Vordergrund treten.

Alle Patienten, die in dieser Untersuchung aufgezeigt wurden, verbesserten sich im Schweißtest sowie in der Forskolin-Antwort in der ICM (n=9), wobei sich nur 3 Patienten im BMI und 3 Patienten in der FEV<sub>1</sub> verbesserten. Interessanterweise konnte man bei Patient 5 die innerhalb der Patientengruppe A größte absolute Verbesserung in BMI, FEV<sub>1</sub> und  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  beobachten (BMI +0,40 kg/m<sup>2</sup>, FEV<sub>1</sub> +9,4%, ICM  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  +45,2  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), jedoch gleichzeitig die geringste Verbesserung im Schweißtest (+6 mmol/L). Umgekehrt, wenn man Patient 6 betrachtet, kann hier die innerhalb der Gruppe geringste Verbesserung in BMI und FEV<sub>1</sub> beschrieben werden (BMI -1,08 kg/m<sup>2</sup>, FEV<sub>1</sub> -2,9%), bei der gleichzeitig jedoch größten absoluten Verbesserung im Schweißtest (+ 55 mmol/L). Diese Daten indizieren, dass eine Verbesserung der CFTR-Funktion durch Lumacaftor/Ivacaftor-Therapie auch in der Abwesenheit von messbaren, kurzfristigen Effekten auf klinische Outcome-Parameter eintreten kann. Hierzu konsistent zeigt sich auch keine nachweisbare Korrelation zwischen der Verbesserung der CFTR-Funktion, wie angezeigt durch Schweißchlorid und ICM, und den klinischen Outcome-Parametern BMI und FEV<sub>1</sub> (Tab. 4.3). Es ist anzunehmen, dass zahlreiche Einflussfaktoren (verringerte Energiezufuhr, hohe körperliche Aktivität, strukturelle Lungenparenchymschädigungen), die unabhängig von der CFTR-Funktion einwirken, die Verbesserung von BMI und FEV<sub>1</sub>, vor allem im Hinblick auf die eher mäßig starke Wirkung auf die CFTR-Funktionswiederherstellung von Lumacaftor/Ivacaftor, verundeutlichen. Hierzu vergleichbar, wurde eine nicht nachweisbare Korrelation zwischen Änderung der FEV<sub>1</sub> und Änderung des Schweißchlorids bei einzelnen Patienten nach Therapie mit Ivacaftor schon zuvor beschrieben (100).

Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Änderungen der beiden Biomarker Schweißchlorid und ICM untereinander konnte bei den 9 untersuchten Patienten nicht nachgewiesen werden (Tab. 4.3), wobei die Signifikanz bei Korrelationsprüfung von  $\Delta I_{sc}$ (Forsk/IBMX+CCH+Hista) und Schweißchlorid bei  $p = 0,067$  und hiermit nur knapp oberhalb des festgelegten Signifikanzniveaus von  $p = 0,05$  lag. Dass keine signifikante Korrelation bei Vergleich der CFTR-Biomarker untereinander festgestellt werden konnte, lag womöglich an der geringen Anzahl an untersuchten Patienten. Zudem suggeriert dieses Ergebnis, dass die Art und Weise, wie die unterschiedlichen Biomarker (hier Schweißchlorid und ICM) die CFTR-Funktion erfassen, deutlich divergiert. Zum einen könnte ein Grund für die fehlende Korrelation an den unterschiedlichen Organsystemen, an welchen die CFTR-Testung vorgenommen wurde, liegen. Das Schweißchlorid ist ein indirektes Maß für die Elektrolytabsorption in den Schweißdrüsen, die ICM zeigt mehr auf direktem Wege den CFTR-vermittelten Ionenstrom an. Zum anderen könnte es an der divergierenden Bioverfügbarkeit von Lumacaftor/Ivacaftor in verschiedenen Körperepithelien liegen, die den Therapieeffekt maßgeblich beeinflussen kann. Zu bedenken ist auch die Pharmakinetik, die Unterschiede im Therapieeffekt in einzelnen Patienten bedingen könnte. Lumacaftor und Ivacaftor gelten als Cytochrom P450 3A4-Induktoren und bewirken somit einen schnelleren Metabolismus und einen womöglich daraus resultierenden geringeren Therapieeffekt (101). Aus diesen Überlegungen kann geschlossen werden, dass die CFTR-Biomarker nicht direkt miteinander vergleichbar und nicht variabel untereinander austauschbar sind, da sie unterschiedliche Informationen über die CFTR-Funktion in den jeweiligen Organsystemen liefern. Vor allem bezieht sich dies auf die Therapieeffektbeurteilung in klinischen Studien, hierbei sollten im besten Falle mehrere CFTR-Biomarker untersucht werden, um den Therapieeffekt in mehreren Organsystemen erkennen zu können. In dieser Untersuchung imponiert die ICM als solide Methode zur Beurteilung der kurzfristigen Therapiewirksamkeit nach 4-wöchiger Therapie, in vorangegangenen Studien kristallisiert sich die ICM sogar im Vergleich zu der NPD als präferiertes diagnostisches Mittel zur Therapieeffektbeurteilung heraus (53). Die ICM wird *ex vivo* durchgeführt, der kontrollierte und standardisierte Ablauf ermöglicht eine gleichmäßige Messung. Zudem sind in der Rektumschleimhaut zahlreiche CFTR-Kanäle exprimiert, welche dem Risiko einer akuten Entzündung oder chronischen Infektion weniger ausgesetzt sind als es beispielsweise bei *in vivo*-Methoden wie der NPD der Fall wäre (88,89,102,103).

Die ICM wäre auch als Testmethode in frühen Phase-II-Studien denkbar, wo verschiedene CFTR-Modulatoren in einem frühen Stadium ihrer Entwicklung auf Therapieeffekt getestet und verglichen werden könnten. Eine Limitation der ICM als Methode stellt die wenig ausgeprägte Verfügbarkeit in nur manchen CF-Zentren und das obligatorische Know-How zur Durchführung sowie die Laborausstattung dar. Hier wäre der Schweißtest eine breiter verfügbare und gut bekannte Alternative zur Beurteilung der CFTR-Funktion.

Gegenstand aktueller Forschung ist die Therapieeffektbeurteilung durch Anwendung von Organoiden (104–107). Dies auch im Vergleich zur Detektion des Therapieansprechens durch *in vivo*-Biomarker der CFTR-Funktion, wo kürzlich keine signifikante Korrelation zwischen Forskolin-induzierter Organoidschwellung und der Verbesserung der mit Schweißtest, ICM und NPD gemessenen *in vivo*-CFTR-Funktion nach Lumacaftor/Ivacaftor-Therapie erwiesen werden konnte (108). Mittlerweile wird die Anwendung von intestinalen Organoiden zur Beurteilung des Krankheitsschweregrades erforscht (109), eine Standardisierung der Vorgehensweise ist noch nicht erfolgt.

Schlussendlich können die zu Beginn der Arbeit gestellten Forschungsfragen nach Untersuchung der Patientengruppe A beantwortet werden. Es kann festgestellt werden, dass eine signifikante Verbesserung der CFTR-Funktion nach Therapie mit dem neuartigen CFTR-Modulator-Kombinationspräparat Lumacaftor/Ivacaftor anhand von Änderungen des Schweißchlorids und der intestinalen Kurzschlussstrommessung nachgewiesen werden können. Zudem profitierten alle untersuchten Patienten im kurzen Therapiezeitraum von 4 Wochen von der Behandlung mit Lumacaftor/Ivacaftor und ein Therapieeffekt war nicht nur an den CFTR-Biomarkern, sondern auch im subjektiven Empfinden der Patienten zu erkennen (siehe Tab. 4.2).

Diese Arbeit ergänzt die wissenschaftlichen Erkenntnisse in Bezug auf CFTR-Modulatoren-Therapieeffektbeurteilung und stellt dar, dass diese durch Anwendung von CFTR-Biomarkern sehr gut erreicht werden kann. Neben dem Schweißtest, eignet sich die ICM hervorragend als Outcome-Parameter nach CFTR-modulierender Therapie und kann Therapieansprechen schon nach kurzer, 4-wöchiger Therapiedauer prägnant darstellen.



## 5.2 Patientengruppe B

Das diagnostische Vorgehen, um die Diagnose einer Zystischen Fibrose zu bestätigen oder zu widerlegen, bedeutet für den Patienten und dessen Familie sowie für die behandelnden Kliniker eine große Herausforderung. Das Krankheitsbild der CF divergiert in Phänotyp und Genotyp und lässt eine klinische Einschätzung bei Erstkonfrontation im Vorfeld oft nicht zu. Immer wieder gibt es Patienten, die mit keiner oder milder Symptomatik, womöglich einem Schweißtest im diagnostischen Graubereich, jedoch mit Mutationsnachweis im *CFTR*-Gen einer CF-Diagnose unterliegen. Dies bewirkt oft Unsicherheit beim Patienten und dessen Angehörigen und kann auch trotz korrektem Vorgehen nach internationalen Diagnoseleitlinien und SOP zu einer fehlerhaften Diagnose führen. Gerade wenn der Genotyp eines Patienten Mutationen beinhaltet, die bisher unbekannt sind oder so selten, dass sie noch nicht in ihrer Pathogenität charakterisiert werden konnten, ist der zusätzliche Schritt der *CFTR*-Funktionsanalyse im diagnostischen Prozess der Diagnosefindung sicherlich von hoher Relevanz (84).

Wie schon in vorangegangenen Studien die erweiterte *CFTR*-Funktionsdiagnostik zur Einschätzung einer CF-Diagnose genutzt wurde (110), erlaubte die *CFTR*-Funktionsanalyse auch in dieser Arbeit einen Rückschluss auf die Pathogenität der seltenen Mutation, deren Tendenz CF zu verursachen sowie deren Konsequenz auf den *CFTR*-Basisdefekt und die klinische Erkrankung der CF der Patienten aus Patientengruppe B. Demnach konnte bei 4 Patienten eine PI-CF-Diagnose und bei 3 Patienten eine PS-CF-Diagnose bestätigt werden, bei einem Patienten konnte eine CF nicht bestätigt werden, er wurde mit einer *CFTR*-Dysfunktion anhand der *CFTR*-Funktionsdiagnostik diagnostiziert. Bei 2 Patienten konnte eine CF weitgehend ausgeschlossen werden, da trotz Nachweis von 2 *CFTR*-Mutationen die Befunde von Schweißchloridtestung und *CFTR*-Funktionsdiagnostik gegen eine CF-Diagnose sprachen.

Die Mutationsdatenbank *CFTR2* (9) dient hauptsächlich als Nachschlagewerk für die Pathogenität häufiger *CFTR*-Mutationen, 2 von den in dieser Arbeit untersuchten *CFTR*-Genotypen (Patient 5 und Patient 10) sind dennoch in *CFTR2* vermerkt. Anhand der Untersuchungen dieser Arbeit konnte die Einschätzung der *CFTR2*-Datenbank bestätigt werden: kongruent mit den Pathogenitätseinschätzungen von der Datenbank *CFTR2* gegenüber der Mutationskombinationen von Patient 5 und Patient 10, wie in Tabelle 4.6 dargestellt, konnte bei Patient 5 eine PI-CF bestätigt und bei Patient 10 eine PS-CF bestätigt werden.

Folgende seltene *CFTR*-Mutationen konnten anhand der Untersuchungen in dieser Arbeit in ihrer Pathogenität charakterisiert werden (siehe auch 4.2.1) und sind zum Überblick folgend zusammengefasst:

Tab. 5.1: Übersicht Krankheitswert der untersuchten seltenen *CFTR*-Mutationen

<b>Patient 2</b>	c.1894G>T, p.Glu587Stop	<b>CF-verursachend (PI-CF)</b>
<b>Patient 5</b>	IVS18+2dupT, c.3468+2dupT	
<b>Patient 6</b>	c.748C>T, p.Q250X	
<b>Patient 9</b>	Del Exon 17a-17b-18, c.2989-2593del8899 c.2988+1173_3468+2102_del	
<b>Patient 1</b>	c.1221delA, p.Glu407AsnfsX35	<b>CF-verursachend (PS-CF)</b>
<b>Patient 3</b>	<i>CFTR</i> dele13,14a c.(1766+1_1767-1) _ (2619 +1_2620-1)del	
<b>Patient 10</b>	I1366N, c.4097T>A, p.Ile1366Asn	
<b>Patient 4</b>	c.241T>C, p.Phe81Leu	<b>CFTR-Dysfunktion verursachend</b>
<b>Patient 7</b>	Q1352H(G>C), c.4056G>C, p.Gln1352His	<b>Nicht-CF- verursachend</b>
<b>Patient 8</b>	M952T, c.2855T>C, p.Met952Thr	

Schlussendlich können die zu Beginn der Arbeit gestellten Forschungsfragen mit den Untersuchungsergebnissen aus der Patientengruppe B wie folgt beantwortet werden: In dieser Arbeit wurde bei Patienten mit nicht oder unzureichend beschriebenen, seltenen *CFTR*-Mutationen eine *CFTR*-Funktionsanalyse zusätzlich zu detaillierter genetischer Charakterisierung und Deskription der klinischen Symptomatik durchgeführt. Angelehnt an die Neuerung des internationalen Diagnosestandards, der elektrophysiologischen *CFTR*-Funktionsmessungen im Diagnose-Algorithmus vorsieht, konnte anhand der Ergebnisse der *CFTR*-Funktionsanalyse eine CF-Diagnose bestätigt oder weitgehend ausgeschlossen werden und somit der Diagnoseprozess maßgeblich optimiert werden. Diese Arbeit zeigt eine Erweiterung des gängigen Diagnosestandards im Hinblick auf die Einschätzung des Krankheitswertes seltener *CFTR*-Mutationen mit unbekannter klinischer Auswirkung auf und geht hiermit auf zuvor noch nicht beschriebene *CFTR*-Mutationen ein. Anhand der hier durchgeführten *CFTR*-Funktionsdiagnostik konnte eine CF-Diagnose bestätigt oder widerlegt werden, eine psychosoziale Entlastung für die gesamte Patientenfamilie erreicht sowie eine Perspektive für den Patienten geschaffen

werden, in der er in einem adäquaten Rahmen in ein Vorsorgeprogramm eingegliedert wird oder von der vielschichtigen Last einer CF-Diagnose Abstand nehmen kann.

Diese Arbeit erweitert die bisherigen wissenschaftlichen Kenntnisse über Phänotypisierung seltener CFTR-Genotypen und ermöglicht eine Diagnosestellung bei Patienten mit einem Genotyp von unklarer klinischer Relevanz.

### **5.3 Personalisierte Medizin**

Personalisierte Medizin gerät in der klinischen Betreuung von CF-Patienten immer mehr in den Vordergrund und ist Gegenstand aktueller Forschung. Auch in dieser Arbeit tangiert das Thema Personalisierte Medizin die beiden untersuchten Patientengruppen. Eine Anwendung der ICM zur Therapieeffektbeurteilung von bereits zugelassenen CFTR-Modulatoren, wie bei Patientengruppe A in dieser Arbeit, kann zudem für Patienten mit seltenen Genotypen, wie beispielsweise in Patientengruppe B in dieser Arbeit, überlegt werden. Jene Patienten hätten dadurch die Chance eine Therapie mit einem CFTR-Modulator auch mit seltenem, nicht in großen Studien ausgetestetem Genotyp zu erhalten: Kann bei einem Patienten als Einzelfall mittels einer ICM und der damit einhergehenden CFTR-Funktionsanalyse ein Krankheitswert der seltenen Mutation definiert werden, so kann man in diesem Kontext von personalisierter Medizin sprechen. Der wohl ausschlaggebendste Antrieb, personalisierte Medizin für CF-Patienten mit seltenen *CFTR*-Mutationen zu realisieren, ist, jenen Patienten hiermit eine Perspektive auf Therapie zu ermöglichen. Dies wäre denkbar anhand von n=1 Studien, wo Patienten nach klinischer Phänotypisierung eine elektrophysiologische CFTR-Funktionsmessung erhalten, der Krankheitswert festgestellt wird und im Anschluss bei pathologischer CFTR-Funktion eine Testung mit verschiedenen Wirkstoffen und deren Wirksamkeit im Einzelfall stattfindet. Dies würde insbesondere Patienten zutreffen, auf deren Genotyp bisher kein CFTR-Modulator zugelassen ist (111). Beispielsweise betrifft dies Patienten, die in ihrem Genotyp weder heterozygot noch homozygot für die häufigste *CFTR*-Mutation F508del sind oder eine Gating- oder Restfunktionsmutation als Zweitmutation haben und somit keinen Zugang zur Triple-Therapie Ivacaftor/Tezacaftor/Elexacaftor (Trikafta®/Kaftrio®) bekommen (112).

Ebenso gilt dies für Präparate wie Ivacaftor (Kalydeco®), Ivacaftor/Lumacaftor (Orkambi®) und Ivacaftor/Tezacaftor (Symkevi®/Symdeco®), die auch nur auf speziell definierte Genotypen zugelassen sind (92,113,114). In dieser Untersuchung würde dies

6 von 10 Patienten der Patientengruppe B betreffen (Patient 1-4, Patient 6, Patient 9), die aktuell keinen Zugang zu auf ihren Genotyp zugelassene Modulatoren hätten.

Es kann überlegt werden, ob eine personalisierte *CFTR*-Genotyp-Charakterisierung als Teil von frühen Phase-II-Studien in die Modulatorenforschung integriert werden kann mit dem Sinn, zielgerichtete Therapien mit Zulassung von erfolgversprechenden Modulatoren für seltene Genotypen zu ermöglichen. Hier wäre auch die Anwendung rektaler Organoide denkbar, mit Hilfe derer das Ansprechen eines Patienten mit seltenem Genotyp auf bereits zugelassene *CFTR*-Modulatoren im Einzelfall geprüft werden könnte (115).

#### **5.4 Limitationen**

Limitationen dieser Arbeit stellen die geringe Anzahl an untersuchten Patienten und der geringe Zeitraum zwischen Baseline-Untersuchung und Follow-Up-Untersuchung in Patientengruppe A, der einen Rückschluss auf ein Langzeit-Outcome nicht zulässt, dar. Eine Langzeitstudie über den Effekt mit Lumacaftor/Ivacaftor an einer größeren Patientengruppe könnte mehr Klarheit über die wiederhergestellte *CFTR*-Funktion, über krankheitsmodulierende Effekte oder Langzeitüberleben der Patienten schaffen. Dabei könnte eine Darstellung der Änderung klinischer Parameter in der Langzeittherapiebetrachtung erfolgen und eine bessere Einschätzung der Langzeitwirkung wäre gegeben.

Zudem wurde in dieser Arbeit keine Placebo-Patientengruppe bei Evaluation des Therapieeffekts von Lumacaftor/Ivacaftor untersucht. Eine Bestimmung der *CFTR*-Expression im Individualpatienten könnte bei Therapieeffektbeurteilung noch ergänzt werden, da so optimalerweise das zu erreichende *CFTR*-Funktionsniveau ermittelt werden könnte. Bei Patientengruppe B konnte nicht bei jedem Patienten ICM und NPD aufgrund zu geringen Patientenalters durchgeführt werden. In Patientengruppe B ist zu beachten, dass die diagnostische Klassifizierung aufgrund unterschiedlicher, zentrumsinterner Referenzwerte der *CFTR*-Funktionsdiagnostik von den Ergebnissen anderer Zentren abweichen kann.

## 6 Zusammenfassung

Die Diagnostik und Behandlung der CF als Multiorganerkrankung stellt im klinischen Alltag eine große Herausforderung dar. Der Erkrankung liegen Mutationen im *CFTR*-Gen zugrunde, dadurch kommt es zu zähflüssigem Schleim und verlegten Drüsengängen in verschiedenen Organsystemen. Neue Therapieansätze revolutionieren die Behandlungsstandards der Erkrankung, deren Therapieeffekte können sowohl durch klinische Parameter als auch durch *CFTR*-Biomarker, wie Schweißchlorid und ICM, beurteilt werden. Diese Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, den Therapieeffekt einer Therapie mit Lumacaftor/Ivacaftor nach 4 Wochen bei Patienten mit F508del-homozygotem Genotyp zu eruieren und die ICM in ihrer Funktionsfähigkeit als Parameter zur Therapieeffektbeurteilung eines *CFTR*-Modulators zu evaluieren. Es konnte dargestellt werden, dass die therapeutische Wirksamkeit der *CFTR*-Modulatoren-Kombination Ivacaftor/Lumacaftor durch *CFTR*-Biomarker wie Schweißtest und ICM in einer kurzfristigen Betrachtung von vier Therapiewochen gut beurteilt werden kann, während anhand klinischer Outcomeparameter wie BMI und FEV<sub>1</sub> eine verlässliche Einschätzung im selben Zeitraum nicht gelang. In den ICM-Parametern  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  und  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX+CCH+Hista})$  sowie im Schweißchlorid konnte statistische Signifikanz in der Verbesserung innerhalb des Patientenkollektivs nachgewiesen werden. Anhand den Untersuchungen konnte mit statistischer Signifikanz festgestellt werden, dass der Therapieeffekt der beiden ICM Parameter  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX})$  und  $\Delta I_{sc}(\text{Forsk/IBMX+CCH+Hista})$  sowie durch die Änderung des Schweißchlorids beurteilt werden konnte.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit seltene *CFTR*-Mutationen mit unklarer klinischer Bedeutung untersucht und auf deren Krankheitswert anhand von *CFTR*-Funktionsdiagnostik geprüft. Innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs konnten sowohl CF-Verdachtsdiagnosen bestätigt als auch widerlegt werden. Die untersuchten Mutationen konnten in ihrer Pathogenität näher beschrieben und zugeordnet werden.

Insgesamt erweitert diese Dissertation bisherige Erkenntnisse zur Beurteilung des Therapieeffekts von *CFTR*-Modulatoren und schafft eine neue Herangehensweise an die diagnostische Herausforderung, die CF-Patienten mit seltenen *CFTR*-Genotypen unbekannter klinischer Auswirkung mit sich bringen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Muntau AC. Erkrankungen des Respirationstrakts - Zystische Fibrose. In: Pädiatrie hoch2. 1. Auflage. Elsevier GmbH Deutschland; 2018. S. 384–90.
2. Zolin A, Orenti A, Naehrlich L, van Rens J. ECFSPR Annual Report 2017. ECFS. 2019;
3. Sanders DB, Fink AK. Background and Physiology. *Pediatr Clin North Am.* 2016;63(64)(1):567–84.
4. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2009;373(9678):1891–904.
5. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(5):475–82.
6. Naehrlich L, Burkhart M, Wosniok J. Deutsches Mukoviszidose-Register Berichtsband 2018. Mukoviszidose eV Mukoviszidose Inst gGmbH. 2019;1–45.
7. Proesmans M, Vermeulen F, De Boeck K. What's new in cystic fibrosis? from treating symptoms to correction of the basic defect. *Eur J Pediatr.* 2008;167(8):839–49.
8. Saleheen D, Frossard PM. The cradle of the deltaF508 mutation. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2008;20(4):157–60.
9. CFTR2 Database [Internet]. Verfügbar auf: <http://www.cftr2.org/welcome>; letzter Zugang: 31.03.2021
10. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon NOA, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok SI, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science (80- ).* 1989;245(4922):1066–73.
11. Kerem BS. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Trends Genet.* 1989;5(C):363.
12. Population variation of common cystic fibrosis mutations. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Hum Mutat.* 1994;4(3):167–77.
13. Clancy JP, Jain M. Personalized medicine in cystic fibrosis: dawning of a new era. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Oct;186(7):593–7.
14. Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations - Correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002;19(6):575–606.

15. Scotet V, Audrézet MP, Roussey M, Rault G, Blayau M, De Braekeleer M, Férec C. Impact of public health strategies on the birth prevalence of cystic fibrosis in Brittany, France. *Hum Genet.* 2003;113(3):280–5.
16. Mall MA, Reinhardt D. Erkrankungen der Atemwegsorgane - Zystische Fibrose. In: *Kinder- und Jugendmedizin.* 14. Auflage. Springer Verlag; 2012. p. 385–91.
17. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 2005 May;352(19):1992–2001.
18. Quinton PM. Cystic fibrosis: Lessons from the sweat gland. *Physiology.* 2007;22(3):212–25.
19. Buselmaier W, Tariverdian G. Wiederholungsrisiko bei autosomal-rezessiven Erkrankungen. In: *Humangenetik.* 4. Auflage. Springer Medizin Verlag; 2007. p. 432.
20. Fanen P, Wohlhuter-Haddad A, Hinzpeter A. Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;52:94–102.
21. Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:701–26.
22. Derichs N. Targeting a genetic defect: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. *Eur Respir Rev.* 2013;22(127):58–65.
23. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Worldwide survey of the delta F508 mutation--report from the cystic fibrosis genetic analysis consortium. *Am J Hum Genet.* 1990;47(2):354–9.
24. Stuhmann-Spangenberg M, Aulehla-Scholz C, Dworniczak B, Reiss J. Leitlinie zur Molekulargenetischen Diagnostik der Zystischen Fibrose. *Medizinische Genet.* 2009;21(2):268–75.
25. De Boeck K, Zolin A, Cuppens H, Olesen H V., Viviani L. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2014;13(4):403–9.
26. Naehrlich L, Stuhmann-Spangenberg M, Barben J, Bargon J, Blankenstein O, Bremer W, Brunsmann F, Buchholz T, Ellemunter H, Fusch C, Gembruch U, Hammermann J, Jacobeit J, Jung A, Keim V, Loff S, Mayr S, Pfeiffer-Auler S, Rossi R, Sitter H, Stern M, Straßburg C, Derichs N. S2-Konsensus-Leitlinie: Diagnose der Mukoviszidose. *AWMF-Reg-Nr 026/023 Klasse S2k.* 2013;(026):1–28.

27. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, Sermet I, Schwarz M, Tzetis M, Wilschanski M, Bareil C, Bilton D, Castellani C, Cuppens H, Cutting GR, Drevínek P, Farrell P, Elborn JS, Jarvi K, Kerem B, Kerem E, Knowles M, Macek M, Munck A, Radojkovic D, Seia M, Sheppard DN, Southern KW, Stuhmann M, Tullis E, Zielenski J, Pignatti PF, Ferec C. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros.* 2011;10(SUPPL. 2):86–102.
28. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M. Cystic fibrosis: Terminology and diagnostic algorithms. *Thorax.* 2006;61(7):627–35.
29. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, Howenstine M, McColley SA, Rock M, Rosenfeld M, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Marshall BC, Sosnay PR. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr.* 2017;181:S4-S15.e1.
30. De Boeck K, Derichs N, Fajac I, de Jonge HR, Bronsveld I, Sermet I, Vermeulen F, Sheppard DN, Cuppens H, Hug M, Melotti P, Middleton PG, Wilschanski M. New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros.* 2011;10(SUPPL. 2):S53–66.
31. Hammermann AJ, Claßen M, Schmidt S, Bend J, Ballmann M, Baumann I, Bremer W, Ellemunter H, Felbor U, Hahn G, Heuer H-E, Hogardt M, Junge S, Kahl C, Koitschev A, Laaß M, Loff S, Mentzel H-J, Palm B, Pfannenstiel C, Regamey N, Renner S, Rietschel E, Schmitt-Grohe S, Sitter H, Smrekar U, Sommerburg O, Staab D, Weber A-K, Weigand C, Zerlik J, L N. S3-Leitlinie : Mukoviszidose bei Kindern in den ersten beiden Lebensjahren , Diagnostik und Therapie Inhaltsverzeichnis. 2020;
32. Sly PD, Brennan S, Gangell C, De Klerk N, Murray C, Mott L, Stick SM, Robinson PJ, Robertson CF, Ranganathan SC. Lung disease at diagnosis in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(2):146–52.
33. Lau EMT, Moriarty C, Ogle R, Bye PT. Pregnancy and cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev.* 2010 Jun;11(2):90–4.
34. Schwarz C. Arzneimitteltherapie der zystischen Fibrose (Mukoviszidose). *Arzneimitteltherapie.* 2013;31:80–8.



35. Schwarz C, Staab D. Zystische Fibrose und ihre Komplikationen. *Internist*. 2015;(03/2015):263–74.
36. European Medicines Agency (EMA) [Internet]. [zitiert 31.01.2021]. Verfügbar auf: [www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kalydeco](http://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kalydeco)  
[www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/orkambi](http://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/orkambi)  
[www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/symkevi](http://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/symkevi)  
[www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kaftrio](http://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kaftrio)
37. Cuyx S, De Boeck K. Treating the Underlying Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Defect in Patients with Cystic Fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2019;40(6):762–74.
38. Gibson L, Cooke R. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*. 1959;(March 1959).
39. LeGrys VA. Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: Practical considerations. *J Pediatr*. 1996;129(6):892–7.
40. Ballmann M, Smaczny C. *CF Manual*. 2. Auflage. Bremen: UNI-MED; 2008. 187 p.
41. CLSI. Sweat Testing: Sample Collection and Quantitative Chloride Analysis; Approved Guideline -Third Edition. CLSI document C34-A3. CLSI. Sweat Testing: Sample Collection and Quantitative Chloride Analysis; Approved Guideline -Third Edition. CLSI document C34-A3. 2009;(December).
42. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(12):e57.
43. Cystic Fibrosis Mutation Database [Internet]. Verfügbar auf: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/SearchPage.html>; letzter Zugang: 31.03.2021
44. CFTR France Database [Internet]. Verfügbar auf: <https://cftr.iurc.montp.inserm.fr/cftr/>; letzter Zugang: 31.03.2021
45. Ogino S, Gulley ML, den Dunnen JT, Wilson RB, Payne D, Lowery Nordberg MC, Gong JZ, Krafft AE, Uphoff TS, Donahue P, Hunt J, Garrison G. Standard mutation nomenclature in molecular diagnostics: Practical and educational challenges. *J Mol Diagnostics*. 2007;9(1):1–6.
46. Veeze HJ, Sinaasappel M, Bijman J, Bouquet J, de Jonge HR. Ion transport abnormalities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 1991 Aug;101(2):398–403.

47. Mall M, Bleich M, Schürlein M, Kühr J, Seydewitz HH, Brandis M, Greger R, Kunzelmann K. Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivation by cAMP. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 1998;275(6 38-6).
48. De Jonge HR, Ballmann M, Veeze H, Bronsveld I, Stanke F, Tümmler B, Sinaasappel M. Ex vivo CF diagnosis by intestinal current measurements (ICM) in small aperture, circulating Ussing chambers. *J Cyst Fibros.* 2004;3(SUPPL. 2):159–63.
49. Derichs N, Sanz J, Von Kanel T, Stolpe C, Zapf A, Tümmler B, Gallati S, Ballmann M. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: Validation and reference data. *Thorax.* 2010;65(7):594–9.
50. Hug MJ, Derichs N, Bronsveld I, Clancy JP. Measurement of ion transport function in rectal biopsies. *Methods Mol Biol.* 2011;741:87–107.
51. Veeze HJ. Diagnosis of cystic fibrosis. *Neth J Med.* 1995 Jun;46(6):271–4.
52. Derichs N, Knoll J, Hyde R. Preclinical evaluation of CFTR modulators in ex vivo human rectal tissue. *Pediatr Pulmonol.* 2009 Jan 1;44.
53. Graeber SY, Dopfer C, Naehrlich L, Gyulumyan L, Scheuermann H, Hirtz S, Wege S, Mairbäurl H, Dorda M, Hyde R, Bagheri-Hanson A, Rueckes-Nilges C, Fischer S, Mall MA, Tümmler B. Effects of lumacaftor-ivacaftor therapy on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in Phe508del homozygous patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;197(11):1433–42.
54. ECFS ICM SOP 2011, Version 2.7. 2011.
55. Hirtz S, Gonska T, Seydewitz HH, Thomas J, Greiner P, Kuehr J, Brandis M, Eichler I, Rocha H, Lopes AI, Barreto C, Ramalho A, Amaral MD, Kunzelmann K, Mall M. CFTR Cl<sup>-</sup> channel function in native human colon correlates with the genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Gastroenterology.* 2004;127(4):1085–95.
56. De Boeck K, Kent L, Davies J, Derichs N, Amaral M, Rowe SM, Middleton P, De Jonge H, Bronsveld I, Wilschanski M, Melotti P, Danner-Boucher I, Boerner S, Fajac I, Southern K, De Nooijer RA, Bot A, De Rijke Y, De Wachter E, Leal T, Vermeulen F, Hug MJ, Rault G, Nguyen-Khoa T, Barreto C, Proesmans M, Sermet-Gaudelus I. CFTR biomarkers: Time for promotion to surrogate end-point? *Eur Respir J.* 2013;41(1):203–16.
57. Nalamachu S, Wortmann R. Role of indomethacin in acute pain and inflammation management: A review of the literature. *Postgrad Med.* 2014;126(4):92–7.

58. Veeze H. Pathophysiological aspects of cystic fibrosis: genotypes, phenotypes and intestinal current measurements. Rotterdam; 1995.
59. Burrows EF, Southern KW, Noone PG. Sodium channel blockers for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;2014(4).
60. Kavitha C, Rajamani K, Vadivel E. *Coleus forskohlii*: A comprehensive review on morphology, phytochemistry and pharmacological aspects. *J Med Plants Res.* 2010;4(4):278–85.
61. Mitra M, Gantait S, Mandal N. *Coleus forskohlii*: advancements and prospects of in vitro biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(6):2359–71.
62. Kalderon AE, Dobbs JW, Greenberg ML. Localization of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase (cAMP-PDEase) activity in isolated bovine thyroid plasma membranes. *Histochemistry.* 1980;65(3):277–89.
63. Becq F, Mall MA, Sheppard DN, Conese M, Zegarra-Moran O. Pharmacological therapy for cystic fibrosis: From bench to bedside. *J Cyst Fibros.* 2011;10(SUPPL. 2):S129–45.
64. Moran O, Zegarra-Moran O. A quantitative description of the activation and inhibition of CFTR by potentiators: Genistein. *FEBS Lett.* 2005;579(18):3979–83.
65. Gustafsson JK, Lindén SK, Alwan AH, Scholte BJ, Hansson GC, Sjövall H. Carbachol-induced colonic mucus formation requires transport via NKCC1, K<sup>+</sup> channels and CFTR. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2015;467(7):1403–15.
66. Gustafsson JK, Ermund A, Ambort D, Johansson MEV, Nilsson HE, Thorell K, Hebert H, Sjövall H, Hansson GC. Bicarbonate and functional CFTR channel are required for proper mucin secretion and link cystic fibrosis with its mucus phenotype. *J Exp Med.* 2012;209(7):1263–72.
67. Jessen F, Sjøholm C, Hoffmann EK. Identification of the anion exchange protein of Ehrlich cells: a kinetic analysis of the inhibitory effects of 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbene-disulfonic acid (DIDS) and labeling of membrane proteins with 3H-DIDS. *J Membr Biol.* 1986;92(3):195–205.
68. Chough SP, Goldenring JR, Hurst RD, Ballantyne GH, Modlin IM. Calcium modulation of the effects of serotonin, carbachol, and histamine on rabbit ileal ion transport. *Yale J Biol Med.* 1993;66(6):525–40.
69. Clarke LL, Paradiso AM, Boucher RC. Histamine-induced Cl<sup>-</sup> secretion in human nasal epithelium: Responses of apical and basolateral membranes. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 1992;263(6 32-6).

70. Cohen-Cyberknoh M, Yaakov Y, Shoseyov D, Shteyer E, Schachar E, Rivlin J, Bentur L, Picard E, Aviram M, Israeli E, Kerem E, Wilschanski M. Evaluation of the intestinal current measurement method as a diagnostic test for cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2013;48(3):229–35.
71. Mall M, Wissner A, Seydewitz HH, Kuehr J, Brandis M, Greger R, Kunzelmann K. Defective cholinergic Cl<sup>-</sup> secretion and detection of K<sup>+</sup> secretion in rectal biopsies from cystic fibrosis patients. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2000;278(4 41-4):617–24.
72. Knowles MR, Carson JL, Collier AM, Gatzky JT, Boucher RC. Measurements of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo. *Am Rev Respir Dis*. 1981 Oct;124(4):484–90.
73. Middleton PG, Geddes DM, Alton EFW. Protocols for in vivo measurement of the ion transport defects in cystic fibrosis nasal epithelium. 1994;2050–6.
74. Yaakov Y, Kerem E, Yahav Y, Rivlin J, Blau H, Bentur L, Aviram M, Picard E, Bdolah-Abram T, Wilschanski M. Reproducibility of nasal potential difference measurements in cystic fibrosis. *Chest*. 2007/09/21. 2007 Oct;132(4):1219–26.
75. Kerem E, Hirawat S, Armoni S, Yaakov Y, Shoseyov D, Cohen M, Nissim-Rafinia M, Blau H, Rivlin J, Aviram M, Elfring GL, Northcutt VJ, Miller LL, Kerem B, Wilschanski M. Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet (London, England)*. 2008/08/20. 2008 Aug 30;372(9640):719–27.
76. Vermeulen F, Proesmans M, Boon M, De Boeck K. Improved repeatability of nasal potential difference with a larger surface catheter. *J Cyst Fibros*. 2015;
77. Rasmussen JE, Sheridan JT, Polk W, Davies CM, Tarran R. Cigarette smoke-induced Ca<sup>2+</sup> release leads to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) dysfunction. *J Biol Chem*. 2014/01/21. 2014 Mar 14;289(11):7671–81.
78. Sands D. Transepithelial nasal potential difference (NPD) measurements in cystic fibrosis (CF). *Med Wieku Rozwoj*. 2013;17(1):13–7.
79. ECFS DNWG CTN SOP NPD. 2013;1.8.
80. Grubb B, Lazarowski E, Knowles M, Boucher R. Isobutylmethylxanthine fails to stimulate chloride secretion in cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;8(4):454–60.

81. Zsembery Á, Fortenberry JA, Liang L, Bebok Z, Tucker TA, Boyce AT, Braunstein GM, Welty E, Bell PD, Sorscher EJ, Clancy JP, Schwiebert EM. Extracellular Zinc and ATP Restore Chloride Secretion across Cystic Fibrosis Airway Epithelia by Triggering Calcium Entry. *J Biol Chem*. 2004;279(11):10720–9.
82. Solomon GM, Sermet I, Rowe S, Fajac I. CFFT ECFS CTN NPD SOP. 2014.
83. Wilschanski M, Famini H, Strauss-Liviatan N, Rivlin J, Blau H, Bibi H, Bentur L, Yahav Y, Springer H, Kramer MR, Klar A, LLani A, Kerem B, Kerem E. Nasal potential difference measurements in patients with atypical cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2001;17(6):1208–15.
84. Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Sands D, Stremmler N, Vavrova V, Deneuille E, Reix P, Bui S, Huet F, Lebourgeois M, Munck A, Iron A, Skalicka V, Bienvenu T, Roussel D, Lenoir G, Bellon G, Sarles J, Macek M, Roussey M, Fajac I, Edelman A. Clinical phenotype and genotype of children with borderline sweat test and abnormal nasal epithelial chloride transport. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(7):929–36.
85. Naehrlich L, Ballmann M, Davies J, Derichs N, Gonska T, Hjelte L, van Konigsbruggen-Rietschel S, Leal T, Melotti P, Middleton P, Tümmler B, Vermeulen F, Wilschanski M. Nasal potential difference measurements in diagnosis of cystic fibrosis: An international survey. *J Cyst Fibros*. 2014;
86. Pinders-Kessler L, Scheinert S, Klosinski M, Staab D, Derichs N. WS10.6 Organ-specific CFTR dysfunction: Comparison of biomarkers for CF diagnosis and CFTR modulator effects. *J Cyst Fibros*. 2013 Jun 1;12:S21.
87. Pinders-Kessler L. CFTR-Funktionsanalyse zur Diagnosestellung und kausalen Therapie bei Zystischer Fibrose - ein Vergleich von Biomarkern. 2021.
88. Bronsveld I, Mekus F, Bijman J, Ballmann M, Greipel J, Hundrieser J, Halley DJJ, Laabs U, Busche R, De Jonge HR, Tümmler B, Veeze HJ. Residual chloride secretion in intestinal tissue of  $\Delta F508$  homozygous twins and siblings with cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 2000;119(1):32–40.
89. Mall M, Kreda SM, Mengos A, Jensen TJ, Hirtz S, Seydewitz HH, Yankaskas J, Kunzelmann K, Riordan JR, Boucher RC. The  $\Delta F508$  Mutation Results in Loss of CFTR Function and Mature Protein in Native Human Colon. *Gastroenterology*. 2004;126(1 SUPPL. 1):32–41.

90. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PDJ, Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu PA. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(46):18843–8.
91. Ramsey B, Welsh M. AJRCCM: 100-Year Anniversary. Progress along the Pathway of Discovery Leading to Treatment and Cure of Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195(9):1092–9.
92. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, Colombo C, Davies JC, De Boeck K, Flume PA, Konstan MW, McColley SA, McCoy K, McKone EF, Munck A, Ratjen F, Rowe SM, Waltz D, Boyle MP. Lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for phe508del CFTR. *N Engl J Med*. 2015;373(3):220–31.
93. Konstan MW, McKone EF, Moss RB, Marigowda G, Tian S, Waltz D, Huang X, Lubarsky B, Rubin J, Millar SJ, Pasta DJ, Mayer-Hamblett N, Goss CH, Morgan W, Sawicki GS. Assessment of safety and efficacy of long-term treatment with combination lumacaftor and ivacaftor therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation (PROGRESS): a phase 3, extension study. *Lancet Respir Med*. 2017;5(2):107–18.
94. Boyle MP, Bell SC, Konstan MW, McColley SA, Rowe SM, Rietschel E, Huang X, Waltz D, Patel NR, Rodman D. A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: A phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2014;2(7):527–38.
95. Milla CE, Ratjen F, Marigowda G, Liu F, Waltz D, Rosenfeld M. Lumacaftor/ivacaftor in patients aged 6-11 years with cystic fibrosis and homozygous for F508del-CFTR. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195(7):912–20.
96. Stanke F, Ballmann M, Bronsveld I, Dörk T, Gallati S, Laabs U, Derichs N, Ritzka M, Posselt HG, Harms HK, Griese M, Blau H, Mastella G, Bijman J, Veeze H, Tümmler B. Diversity of the basic defect of homozygous CFTR mutation genotypes in humans. *J Med Genet*. 2008;45(1):47–54.
97. Wilschanski M, Dupuis A, Ellis L, Jarvi K, Zielenski J, Tullis E, Martin S, Corey M, Tsui LC, Durie P. Mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator gene and in vivo transepithelial potentials. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(7):787–94.

98. Ratjen F, Hug C, Marigowda G, Tian S, Huang X, Stanojevic S, Milla CE, Robinson PD, Waltz D, Davies JC. Efficacy and safety of lumacaftor and ivacaftor in patients aged 6–11 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med*. 2017 Jul 1;5(7):557–67.
99. Ranganathan SC, Hall GL, Sly PD, Stick SM, Douglas TA. Early lung disease in infants and preschool children with cystic fibrosis: What have we learned and what should we do about it? *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195(12):1567–75.
100. Fidler MC, Beusmans J, Panorchan P, Van Goor F. Correlation of sweat chloride and percent predicted FEV1 in cystic fibrosis patients treated with ivacaftor. *J Cyst Fibros*. 2017;16(1):41–4.
101. Schneider EK. Cytochrome P450 3A4 Induction: Lumacaftor versus Ivacaftor Potentially Resulting in Significantly Reduced Plasma Concentration of Ivacaftor. *Drug Metab Lett*. 2018;12(1):71–4.
102. Veeze HJ, Sinaasappel M, Bijman J, Bouquet J, De Jonge HR. Ion transport abnormalities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 1991;101(2):398–403.
103. van Barneveld A, Stanke F, Tamm S, Siebert B, Brandes G, Derichs N, Ballmann M, Junge S, Tümmler B. Functional analysis of F508del CFTR in native human colon. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2010;1802(11):1062–9.
104. Boj SF, Vonk AM, Statia M, Su J, Vries RRG, Beekman JM, Clevers H. Forskolin-induced swelling in intestinal organoids: An in vitro assay for assessing drug response in cystic fibrosis patients. *J Vis Exp*. 2017;2017(120):1–12.
105. Dekkers JF, Berkers G, Kruisselbrink E, Vonk A, De Jonge HR, Janssens HM, Bronsveld I, Van De Graaf EA, Nieuwenhuis EES, Houwen RHJ, Vleggaar FP, Escher JC, De Rijke YB, Majoor CJ, Heijerman HGM, De Winter-De Groot KM, Clevers H, Van Der Ent CK, Beekman JM. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci Transl Med*. 2016;8(344).
106. Berkers G, van Mourik P, Vonk AM, Kruisselbrink E, Dekkers JF, de Winter-de Groot KM, Arets HGM, Marck-van der Wilt REP, Dijkema JS, Vanderschuren MM, Houwen RHJ, Heijerman HGM, van de Graaf EA, Elias SG, Majoor CJ, Koppelman GH, Roukema J, Bakker M, Janssens HM, van der Meer R, Vries RGJ, Clevers HC, de Jonge HR, Beekman JM, van der Ent CK. Rectal Organoids Enable Personalized Treatment of Cystic Fibrosis. *Cell Rep*. 2019;26(7):1701-1708.e3.

107. Noordhoek J, Gulmans V, Van Der Ent K, Beekman JM. Intestinal organoids and personalized medicine in cystic fibrosis: A successful patient-oriented research collaboration. *Curr Opin Pulm Med*. 2016;22(6):610–6.
108. Graeber SY, van Mourik P, Vonk AM, Kruisselbrink E, Hirtz S, van der Ent CK, Mall MA, Beekman JM. Comparison of organoid swelling and in vivo biomarkers of cftr function to determine effects of lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for the f508del mutation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;202(11):1589–92.
109. de Winter-De Groot KM, Janssens HM, van Uum RT, Dekkers JF, Berkers G, Vonk A, Kruisselbrink E, Oppelaar H, Vries R, Clevers H, Houwen RHJ, Escher JC, Elias SG, De Jonge HR, de Rijke YB, Tiddens HAWM, van der Ent CK, Beekman JM. Stratifying infants with cystic fibrosis for disease severity using intestinal organoid swelling as a biomarker of CFTR function. *Eur Respir J*. 2018;52(3).
110. Goubau C, Wilschanski M, Skalická V, Lebecque P, Southern KW, Sermet I, Munck A, Derichs N, Middleton PG, Hjelte L, Padoan R, Vasar M, De Boeck K. Phenotypic characterisation of patients with intermediate sweat chloride values: Towards validation of the European diagnostic algorithm for cystic fibrosis. *Thorax*. 2009;64(8):683–91.
111. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2020;109(5):893–9.
112. 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. Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N Engl J Med*. 2019;381(19):1809–19.
113. Flume PA, Liou TG, Borowitz DS, Li H, Yen K, Ordoñez CL, Geller DE. Ivacaftor in subjects with cystic fibrosis who are homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Chest*. 2012;142(3):718–24.
114. Taylor-Cousar JL, Munck A, McKone EF, van der Ent CK, Moeller A, Simard C, Wang LT, Ingenito EP, McKee C, Lu Y, Lekstrom-Himes J, Elborn JS. Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N Engl J Med*. 2017;377(21):2013–23.



115. Silva IAL, Doušová T, Ramalho S, Centeio R, Clarke LA, Railean V, Botelho HM, Holubová A, Valášková I, Yeh J-T, Hwang T-C, Farinha CM, Kunzelmann K, Amaral MD. Organoids as a personalized medicine tool for ultra-rare mutations in cystic fibrosis: The case of S955P and 1717-2A>G. *Biochim Biophys acta Mol basis Dis.* 2020 Nov;1866(11):165905.

## 8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Valerie Galffy-Mühlbacher (geb. Mühlbacher), versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Therapieeffektbeurteilung und optimierte Diagnosestellung bei häufigen und seltenen *CFTR* Genotypen“ / „Therapy effect evaluation and optimised diagnosis in common and rare *CFTR* genotypes“ 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/innen 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.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

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

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

## 9 Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Valerie Galfy-Mühlbacher (geb. Mühlbacher) hatte folgenden Anteil an den untenstehenden veröffentlichten Kongressbeiträgen und Abstracts, die im Rahmen dieser Dissertation entstanden sind:

1. Vortrag: *„CFTR3 – personalised characterisation of rare CFTR mutations: How can CF centres and patients benefit?“*  
V.Mühlbacher, N.Derichs, CFTR3 Core Group<sup>2</sup>  
39. ECFS Conference, Juni 2016, Basel (CH), DNWG Meeting
  - Beitrag durch V.Mühlbacher: Erstellung des Vortrages, Durchführung von Vortrag und Diskussion im Rahmen des Meetings, Datenerhebung und Datenauswertung, Durchführung von Schweißtests, NPD, ICM, April 2016-Februar 2017
2. Poster: *„CFTR3: Personalisierte Charakterisierung seltener CFTR Genotypen - Überblick“*  
V.Mühlbacher, N.Derichs, CFTR3 Core Group<sup>1</sup>  
19. Deutsche Mukoviszidose-Tagung, November 2016, Würzburg (DE)
  - Beitrag durch V.Mühlbacher: Erstellung des Posters, Präsenz bei Posterwalks, Datenerhebung und Datenauswertung, Durchführung von Schweißtests, NPD, ICM, April 2016-Februar 2017
3. Vortrag: *„CFTR - personalised characterisation of rare CFTR mutations: Examples from CFTR3“*  
V.Mühlbacher, N.Derichs, CFTR3 Core Group<sup>1</sup>  
14. ECFS DNWG Meeting, Februar 2017, Ljubljana (SL)
  - Beitrag durch V.Mühlbacher: Erstellung des Vortrages, Durchführung von Vortrag und Diskussion im Rahmen des Meetings, Datenerhebung und Datenauswertung, Durchführung von Schweißtests, NPD, ICM, April 2016-Februar 2017
4. Poster/Kurzvortrag: *„CFTR3: Personalisierte Charakterisierung seltener CFTR Genotypen“*

---

<sup>2</sup> CFTR3 Core Group: Margarida Amaral, Jeffrey Beekman, Inez Bronsveld, Carlo Castellani, Hugo De Jonge, Elke De Wachter, Nico Derichs, Lutz Nährlich, Isabelle Sermet, Michael Wilschanski

V.Mühlbacher, N.Derichs, CFTR3 Core Group<sup>1</sup>

39. Jahrestagung GPP, März 2017, Essen (DE)

- Beitrag durch V.Mühlbacher: Erstellung des Kurzvortrages/Posters, Durchführung von Vortrag und Diskussion im Rahmen der Tagung, Präsenz bei Posterwalks, Datenerhebung und Datenauswertung, Durchführung von Schweißtests, NPD, ICM, April 2016-Februar 2017

5. Poster: „*CFTR3 – personalised characterisation of rare CFTR mutations*”

V.Mühlbacher, N.Derichs, CFTR3 Core Group<sup>1</sup>

North American CF Conference, November 2017, Indianapolis (US)

- Beitrag durch V.Mühlbacher: Erstellung des Posters, Präsenz bei Posterwalks, Datenerhebung und Datenauswertung, Durchführung von Schweißtests, NPD, ICM, April 2016-Februar 2017

6. Vortrag: “*ICM-Responsiveness to oral Lumacaftor/Ivacaftor treatment*”

V.Mühlbacher, J.Röhmel, C.Schwarz, D.Staab, N.Derichs

15. ECFS DNWG Meeting, Februar 2018, St. Gallen (CH)

- Beitrag durch V.Mühlbacher: Erstellung des Vortrages, Durchführung von Vortrag und Diskussion im Rahmen des Meetings, Datenerhebung und Datenauswertung, Durchführung von Schweißtests, ICM, April 2016-Februar 2017

## **10 Lebenslauf**

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

## 11 Publikationsliste

### Veröffentlichte Kongressbeiträge:

1. Vortrag: „*CFTR3 – personalised characterisation of rare CFTR mutations: How can CF centres and patients benefit?*“  
V.Mühlbacher, N.Derichs, CFTR3 Core Group<sup>3</sup>  
39. ECFS Conference, Juni 2016, Basel (CH), DNWG Meeting
2. Poster: „*CFTR3: Personalisierte Charakterisierung seltener CFTR Genotypen - Überblick*“  
V.Mühlbacher, N.Derichs, CFTR3 Core Group<sup>1</sup>  
19. Deutsche Mukoviszidose-Tagung, November 2016, Würzburg (DE)
3. Vortrag: „*CFTR - personalised characterisation of rare CFTR mutations: Examples from CFTR3*“  
V.Mühlbacher, N.Derichs, CFTR3 Core Group<sup>1</sup>  
ECFS DNWG Meeting, Februar 2017, Ljubljana (SL)
4. Poster: „*CFTR3: Personalisierte Charakterisierung seltener CFTR Genotypen*“  
V.Mühlbacher, N.Derichs, CFTR3 Core Group<sup>1</sup>  
39. Jahrestagung GPP, März 2017, Essen (DE)
5. Poster: „*CFTR3 – personalised characterisation of rare CFTR mutations*“  
V.Mühlbacher, N.Derichs, CFTR3 Core Group<sup>1</sup>  
North American CF Conference, November 2017, Indianapolis (US)
6. Vortrag: „*ICM-Responsiveness to oral Lumacaftor/Ivacaftor treatment*“  
V.Mühlbacher, J.Röhmel, C.Schwarz, D.Staab, N.Derichs  
15. ECFS DNWG Meeting, Februar 2018, St. Gallen (CH)

---

<sup>3</sup> CFTR3 Core Group: Margarida Amaral, Jeffrey Beekman, Inez Bronsveld, Carlo Castellani, Hugo De Jonge, Elke De Wachter, Nico Derichs, Lutz Nährlich, Isabelle Sermet, Michael Wilschanski

## 12 Danksagung

Meiner Erstbetreuerin PD Dr. med. Doris Staab danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz, ihre stetige Erreichbarkeit und Unterstützung.

Meinem Zweitbetreuer Dr. med. Nico Derichs danke ich für die Bereitstellung des Themas, für seine geduldige Einarbeitung in der Durchführung von NPD- und ICM-Methodik und dass er mir die Chance gegeben hat, an Konferenzen und Meetings teilnehmen zu dürfen.

Dr. med. Simon Gräber danke ich für seine guten Ratschläge und sein Engagement.

Dank gebührt Frau Mareen Pigorsch, MSc und dem Institut für Biometrie und Epidemiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin für die Beratung bezüglich der statistischen Datenanalyse.

Ich danke allen CF-Patienten, die ich kennenlernen durfte, die trotz Ihrer Krankheit nicht den Mut verlieren und weitermachen.

Meinen Freunden in Wien und in Berlin möchte ich danken, dass sie trotz zeitweiser großer Entfernung immer für mich da sind.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Mag. Elisabeth Mühlbacher und Dr. Robert Mühlbacher, sowie meiner Schwester Marielen De Bettignies, MSc und meinem Mann DI András Gálffy für die gute Zurede, die positiven Worte und die Motivation, die Arbeit zu vollenden, danken. Ohne sie wäre ich nicht dort, wo ich jetzt bin und mein Dank ist unermesslich.