

**Nasale Potentialdifferenzmessung und intestinale
Kurzschlussstrommessung als Diagnoseverfahren
bei Mukoviszidose**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Vitzthum, Sebastian, geb. Nedwed
aus Bad Soden am Taunus

Gießen 2018

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin,
Abteilung Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie,
unter der Leitung von Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Michael Henrich

Tag der Disputation: 09.09.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Krankheitsbild Mukoviszidose	1
1.2 Diagnostik	3
1.3 Ionentransportstörung bei Mukoviszidose	6
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Untersuchungskollektiv	10
2.2 Die Iontophorese	11
2.3 Die nasale Potentialdifferenz	12
Der Versuchsaufbau	13
Die Versuchsdurchführung	15
2.4 Die intestinale Kurzschlussstrommessung	17
Die <i>voltage-clamp</i> Messmethode	18
Die Entnahme der Rektumbiopsien	19
Herstellung der Elektroden	19
Der Versuchsaufbau	20
Die Versuchsdurchführung	21
2.6 Datenverarbeitung und Statistik	23
3. Ergebnisse	25
3.1 Die Konzentration des Schweißchlorids als Trennung zwischen CF-Gruppe und Kontrollgruppe	25
3.2 Messergebnisse der nasalen Potentialdifferenz	26
3.3 Messergebnisse der intestinalen Kurzschlussstrommessung	31
3.4 Korrelation der verwendeten Diagnosemethoden	35
3.4.1 Schweißtest und nasale Potentialdifferenzmessung	35
3.4.2 Schweißtest und intestinale Kurzschlussstrommessung	37
3.4.3 Nasale Potentialdifferenzmessung und intestinale Kurzschlussstrommessung	40

3.4.4 Sensitivität und Spezifität der untersuchten Methoden	41
4. Diskussion	43
4.1 Die nasale Potentialdifferenz als Diagnoseverfahren der Mukoviszidose.....	43
4.2 Die intestinale Kurzschlussstrommessung als geeignetes Verfahren der Mukoviszidose-Diagnostik	45
4.3 Der diagnostische Vergleich zwischen nPD und ICM.....	47
4.4 Schlussfolgerung	49
5. Zusammenfassung	51
6. Summary	52
7. Verzeichnisse	53
7.1 Abbildungsverzeichnis	53
7.2 Tabellenverzeichnis	54
7.3 Verzeichnis der Abkürzungen	54
8. Literaturverzeichnis	57
9. Anhang	64
10. Publikationsverzeichnis.....	66
11. Ehrenwörtliche Erklärung.....	67
12. Danksagung	68

1. Einleitung

1.1 Krankheitsbild Mukoviszidose

Mukoviszidose (Zystische Fibrose) ist mit einer Inzidenz von 1:3.000 die häufigste autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung der kaukasischen Bevölkerung (Pedemonte & Galiotta, 2012). Ursache der Mukoviszidose ist eine Fehlfunktion des *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator proteins (CFTR)*, eines CF-Kanals, welche auf eine genetischen Veränderung des CFTR-Gens auf dem langen Arm des Chromosoms 7 beruht (Kerem *et al.*, 1989; Clunes & Boucher, 2011). Die Mutation bzw. Fehlfunktion des CFTR führt zu einem visköseren Sekret der exokrinen Drüsen der Bronchialschleimhaut, der Leber, des Pankreas, der Schweißdrüsen, des Samenleiters und der Tränendrüsen. Die höhere Morbidität und Mortalität der Mukoviszidose-Patienten ist insbesondere auf die CFTR-Funktionsstörung im Pankreas und in der Lunge zurückzuführen (Lubamba *et al.*, 2012). Im Pankreas kommt es durch eine Obstruktion der Ausführungsgänge durch zäheres Pankreassekret über eine Autodigestion zu einer Pankreasvernarbung mit Funktionsverlust. Dies führt bei einem Verlust der exokrinen Pankreasfunktion zu einer Maldigestion mit Fettstühlen und Dystrophie der Patienten. Die Fibrosierung des Pankreas führt im langfristigen Verlauf zu einer Verdrängung der Langerhans-Inseln und damit zu einer verminderten Insulinproduktion. In Kombination mit einer inflammationsassoziierten Insulinresistenz mündet dies oft in eine Mischform aus Diabetes mellitus Typ 1 und 2 (Hebestreit & Hebestreit, 2013).

Die Sekretretention in den oberen Atemwegen begünstigt das Auftreten von Schleimhautschwellungen und chronischer Sinusitiden. Im Respirationstrakt führt die Elektrolytverschiebung zu einer Viskositätszunahme der Mukusschicht und somit zu einer Verminderung der mukoziliären Clearance (Robinson & Bye, 2002). Dies führt zu einer chronischen Inflammation und begünstigt rezidivierende und chronische bronchopulmonale Infektionen mit Erregern wie *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* auf (Smith *et al.*, 1996). In der Folge kommt es zu einer progredienten Schädigung des Lungengewebes mit fibrosierenden und atelektatischen Arealen und endet typischerweise in einer respiratorischen Insuffizienz. Mit über 90% stellt die respiratorische Insuffizienz die häufigste Todesursache der Mukoviszidosepatienten dar.

Bei Neugeborenen kann es aufgrund der Pankreasinsuffizienz zu einem lebensbedrohlichen Mekoniumileus kommen. Das distale intestinale Obstruktionssyndrom, Koprostase sowie ein Rektumprolaps sind über die Neugeborenenperiode hinaus ebenfalls

mukoviszidoseassoziierte Symptomatiken. Die Entstehung von Gallesteinen, Gallengangs- und Gallenblasenentzündungen ist Folge einer zähflüssigen Gallengangsflüssigkeit. Ebenfalls kann die erhöhte Viskosität bereits in den hepatischen Gallengängen zu einer intrahepatischen Cholestase führen und sich im längerfristigen Verlauf eine Leberfibrose mit konsekutiver portalen Hypertension und Splenomegalie bilden.

Die Therapie der Mukoviszidose ist in eine kausale und eine symptomatische Therapie unterteilt. In der symptomatischen Therapie haben die Inhalations- und Physiotherapie als Grundlage zur Sekretmobilisation in der Lunge einen hohen Stellenwert (Donaldson *et al.*, 2006). Zur Verbesserung der Sekretolyse werden die Inhalation mit hypertoner Kochsalzlösung auch in Kombination mit antiobstruktiver Inhalation sowie Mukolytika eingesetzt. Die regelmäßige Durchführung moderaten Ausdauersports, Physiotherapie und im Säuglings- und Kleinkindalter die Anwendung von Vibrationsgeräten fördern ebenfalls die Sekretmobilisation (Sens & Stern, 2013). Zusammen mit der Antibiotikatherapie gegen die bei Mukoviszidose häufig vorkommenden Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae*) dient es der Kontrolle der Atemwegsinfektionen und -inflammationen (Döring *et al.*, 2012). Die Therapie sollte erregerspezifisch durchgeführt werden. Häufig wird eine verlängerte Anwendung und eine erhöhte Dosierung benötigt. Im fortgeschrittenem Stadium der Lungenerkrankung kommt eine Sauerstofftherapie zum Einsatz. Die beidseitige Lungentransplantation stellt die letzte Handlungsoption bei terminaler respiratorischer Insuffizienz da.

Für die exokrine Pankreasinsuffizienz stehen als symptomatische Therapieansätze die diätische Beratung mit der Empfehlung zur energiereichen Ernährung mit ausreichender Fettzufuhr und erhöhtem Bedarf an fettlöslichen Vitaminen sowie die Substitution der exokrinen Pankreasenzyme im Vordergrund. Bei zusätzlicher endokriner Pankreasinsuffizienz und Glukosestoffwechselstörung erfolgt eine Anpassung der diätischen Beratung und wenn nötig die Insulinsubstitution (Hebestreit & Hebestreit, 2013).

In den letzten Jahren stehen vermehrt mutationsspezifische, kausale Ansätze zur Verfügung. Dabei wird zwischen Korrektoren und Potentioren unterschieden. Korrektoren korrigieren fehlgefaltete CFTR-Proteine (CFTR-Strukturmutanten) und bringen diese an die Zelloberfläche (Boyle *et al.*, 2014). Potentioren werden für „Gating-Mutanten“ eingesetzt (z.B. G551D CFTR), denn durch diese Substanzen werden vorhandene, bereits eingebaute CFTR-Kanäle verstärkt aktiviert (Boyle *et al.*, 2014). Hierfür steht seit 2012 das Medikament Ivacaftor zu Verfügung. In einer 3-jährigen Beobachtung zeigte sich ein geringeres Absinken der Einsekundenkapazität der Lunge (FEV₁) sowie ein verbesserter Ernährungszustand der behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe (Sawicki *et al.*, 2015). Ein Kombinationspräparat aus dem Potentioren Ivacaftor und dem Korrektor Lumacaftor ist seit 2015 für Patienten ab einem Alter von 12 Jahren und homozygoter Mutation der Klasse-II-

F508del zugelassen. In einer placebokontrollierten Phase-3-Studie konnte eine Erhöhung der FEV₁ sowie eine Reduktion der pulmonaler Exazerbationen gezeigt werden (Wainwright 2015). Für eine Kombination aus Ivacaftor und dem Korrektor Tezacaftor wurde ebenfalls eine 4%ige Verbesserung der FEV₁ und eine um 35% geringere Exazerbationsrate nachgewiesen werden (Rowe *et al.*, 2017; Taylor-Cousar *et al.*, 2017). Das Kombinationspräparat ist seit November 2018 in Europa für Mukoviszidose-Patienten mit zwei F508del-Mutationen bzw. einer F508del Mutation und einer weiteren Mutation mit Restfunktion zugelassen.

Darüber hinaus versuchen experimentelle Behandlungsansätze den zugrunde liegenden Gendefekt mittels Gentransfer und -expression zu korrigieren und stellen somit einen kurativen Ansatz dar (Griesenbach *et al.*, 2015, Alton *et al.*, 2017).

Eine frühzeitige, altersgerechte sowie exakte Diagnostik der Mukoviszidose hat einen hohen Stellenwert für den zeitgerechten Beginn der symptomatischen und kausalen Therapie. Eine verbesserte Nahrungsaufnahme und -verwertung und damit einhergehend das Wachstum sowie Hirnentwicklung der Kinder, eine Verbesserung der Lungenfunktion sowie Reduktion von Exazerbationen und Hospitalisationen führen zu einer Steigerung der Lebenserwartung mit gleichzeitigem Erhalt einer hohen Lebensqualität der Mukoviszidose-Patienten (Cuthbert, 2011). Die Lebenserwartung wurde durch die symptomatische Therapie kontinuierlich verbessert (Elborn *et al.*, 2016) und liegt für 2012-2016 in Deutschland geborene Patienten bei 50 Jahren (Naehrlich *et al.*, 2018).

1.2 Diagnostik

Die große Anzahl (knapp über 2.000) und enorme Vielfalt an CFTR-verursachenden Mutationen tragen zu einer großen Variabilität der klinischen Ausprägungen des Krankheitsbildes Mukoviszidose bei. Zusätzlich zeigen Umweltfaktoren, spezifische Infektionen und stochastische Effekte, Einflüsse auf die individuelle klinische Präsenz einzelner Mutationsträger (Cutting, 2015). Dies macht den diagnostischen Prozess zur Bestätigung bzw. zum Ausschluss einer Mukoviszidose zu einer Herausforderung. Gleichzeitig ist eine exakte und schnelle Diagnostik aber wichtig, um die Zeit der Unsicherheit für den Patienten und dessen Familie so gering wie möglich zu halten und bei positiven Befunden frühzeitig mit der Therapie sowie den Präventionsmaßnahmen beginnen zu können.

Nach den aktuellen Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Zystische Fibrose (*European Cystic Fibrosis Society*: ECFS) erfolgt die Diagnosestellung der Mukoviszidose bei Vorliegen eines diagnostischen Hinweises und Nachweis einer CFTR-Funktionsstörung (AWMF 026-023, <http://www.awmf.org>, 06.11.2016). Diagnostische Hinweise können ein positives

Neugeborenenenscreening (NGB-Screening), Geschwister mit Zystischer Fibrose oder mindestens ein klinischer Hinweis auf eine Mukoviszidose-Erkrankung sein (Naehrlich *et al.*, 2013; Naehrlich & Zimmer, 2013). Ein flächendeckendes NGB-Screening auf Mukoviszidose hat das Ziel die Erkrankung frühzeitig zu erkennen, um so Komplikationen wie Gedeihstörungen und Lungenschädigungen zu reduzieren sowie Exazerbationen und Krankenhausaufenthalte zu vermeiden (Castellani *et al.*, 2009). Im Rahmen des Screenings werden biochemische Parameter der Pankreasschädigung (immunreaktives Trypsin, Pankreatitis-assoziiertes Protein) und CFTR-Mutationsuntersuchungen eingesetzt. Um eine höhere Genauigkeit zu erreichen werden diese je nach nationalen bzw. regionalen Protokoll entweder wiederholt oder miteinander kombiniert (Stopsack & Hammermann, 2009). In Deutschland wurde am 01.09.2016 ein landesweites Neugeborenenenscreening eingeführt.

Bei klinischen Hinweisen auf Mukoviszidose wird eine CFTR-Funktionsmessung zur Konfirmationsdiagnostik durchgeführt (Abb. 4). Eine CFTR-Funktionsstörung kann mittels Schweißtest, genetischer Analyse und/oder auffälliger Messungen in der nasalen Potentialmessung (nPD) sowie der intestinalen Kurzschlussstrommessung (ICM) nachgewiesen werden. Der Schweißtest ist hierbei durch seine hohe Sensitivität (96,5%) und Spezifität (99%) der erste diagnostische Schritt und muss in zwei unabhängigen Messungen ein Schweißchloridkonzentration von über 60 mmol/l für eine positive Mukoviszidose-Diagnostik aufweisen (Naehrlich, 2007). Zur Sicherung der Diagnose und zur genetischen Beratung sowie der Prüfung mutationsspezifischer Therapieoptionen folgt im Anschluss eine genetische Untersuchung zum Nachweis zweier krankheitsverursachender CFTR-Mutationen. Die Sensitivität und Spezifität der CFTR-Genetik ist abhängig vom Mutationspanel und der Herkunft der Patienten. Auch nach Sequenzierung und MLPA-Analyse (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) sind bei 2% der Patienten keine zwei krankheitsverursachenden Mutationen nachzuweisen. Bei fehlendem Nachweis zweier Mukoviszidose-verursachender CFTR-Mutationen und einer Schweißchloridkonzentration im Graubereich (30 - 59 mmol/l) werden elektro-physiologische Messmethoden wie nPD und ICM zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose eingesetzt. Bei der nPD-Messung wird *in vivo* eine Spannungsdifferenz zwischen einer Elektrode am respiratorischen Epithel der Nase und einer subkutanen Referenzelektrode gemessen (Schuler *et al.*, 2004). Bei gesunden Menschen führt eine Aktivierung über cAMP-getriggerte Kanäle zur Na⁺-Blockade bei gleichzeitiger Stimulation der Cl⁻-Sekretion. Dieser Effekt bleibt bei Mukoviszidose-Patienten typischerweise aus (Wilschanski *et al.*, 2001). Bei der ICM werden kleine Gewebeproben elektrophysiologisch (Ussing-Kammer) untersucht und der Ionentransport in Folge diverser Substanzen (Aktivatoren) charakterisiert (van Barneveld *et al.*, 2006). Bei gesunden Probanden kommt es zu einer Stromveränderung während dies bei CF-Patienten geringer ausfällt beziehungsweise nicht vorhanden ist (Derichs *et al.*, 2010).

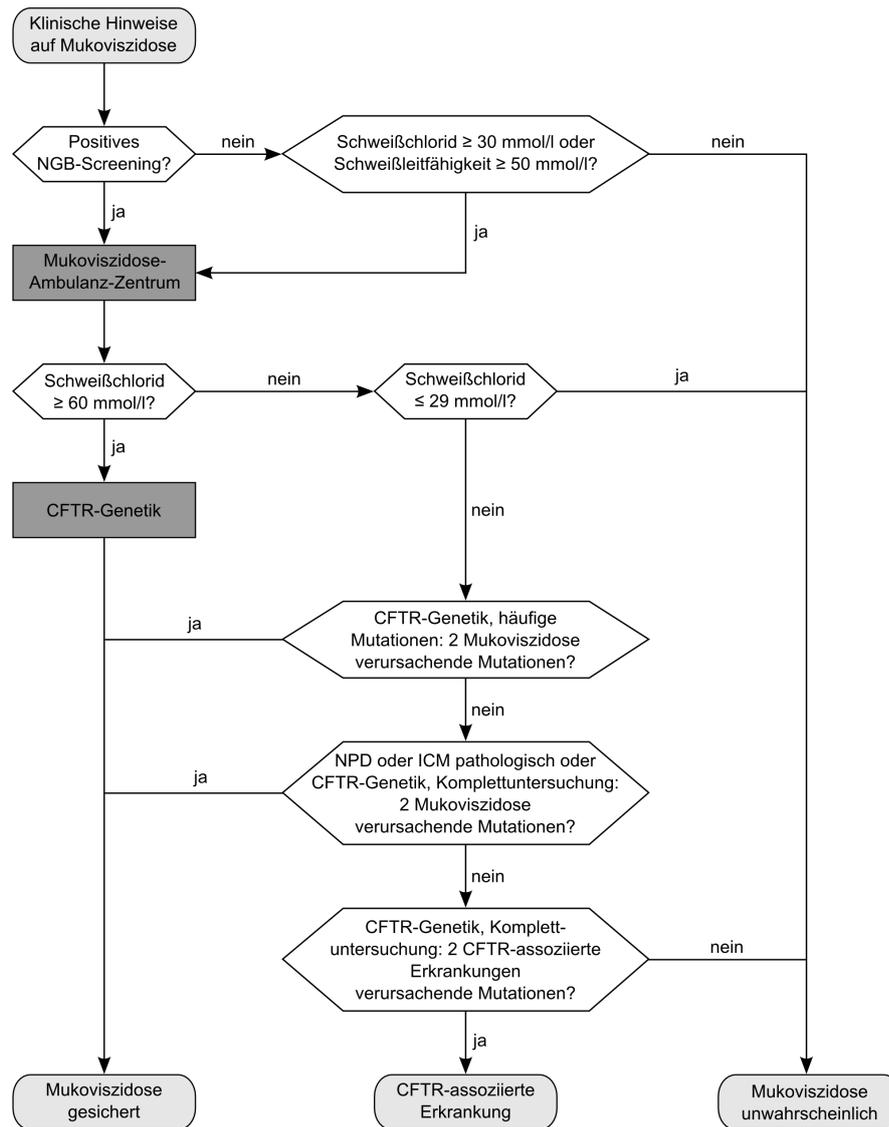


Abb. 1: Flowchart der Diagnostik bei klinischem Verdacht auf Mukoviszidose.

In einer Mukoviszidose-Ambulanz startet die Diagnostik mit der Messung der Schweißchloridkonzentration. Bei einer pathologisch auffälligen Genetik ist eine Mukoviszidose gesichert. Bei unklaren genetischen Befund können die nasale Potentialdifferenzmessung (nPD) oder die intestinale Kurzschlussstrommessung zwischen der Mukoviszidose und einer CFTR-assoziierten Erkrankung differenzieren (verändert nach der AWMF-Leitlinie 026/23: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/026-023.html>, Stand 18.12.2018).

Die elektrophysiologischen Methoden sind in Europa als diagnostischer Nachweis einer CFTR-Funktionsstörung anerkannt, in den entsprechenden amerikanischen Leitlinien wurden diese in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. In den aktuellen Leitlinien der *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF) aus dem Jahre 2017 werden die nPD und die ICM als direkte Messmethode der CFTR-Funktion bei positiven Neugeborenen-Screening, dem Vorliegen von Mukoviszidose-Symptomen, bei positiver Familienanamnese, bei intermediären Cl⁻-Werten im Schweißtest (30 – 59 mmol/l) sowie bei weniger als zwei Mukoviszidose-verursachenden Mutationen als weitere Diagnosemethoden empfohlen (Farrell et al. 2017b).

1.3 Ionentransportstörung bei Mukoviszidose

Der Ionentransport über die Zellmembran ist essentiell für die Zellhomöostase sowie das extrazelluläre Milieu. Diese wird sowohl durch den passiven Transport entlang eines elektrochemischen Gradienten (Ionenkanäle) als auch aktiv über energieverbrauchende Ionenpumpen gewährleistet (Hoffmann *et al.*, 2009). In einer gesunden Zelle exokriner Drüsen erfolgt die apikale Cl^- -Sekretion über cAMP-regulierte Cl^- -Kanäle (CFTR) und Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle (CaCC; Knowles *et al.*, 1983a; Abb. 2). Basolateral gelangen Cl^- -Ionen über den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC) in die Zelle (Boucher, 2004).

Die basolateral gelegene Na^+/K^+ -ATPase pumpt drei Na^+ -Ionen im Ausgleich mit zwei K^+ -Ionen aktiv aus der Zelle und erzeugt so einen elektrochemischen Gradienten über das Epithel (Abb. 2). Dieser ist der Antrieb für die passive Na^+ -Absorption über den apikal gelegenen epithelialen Na^+ -Kanal (*epithelial sodium channel*: ENaC; Boucher, 2004). Durch den epithelialen Na^+ -Transport wird ein osmotischer Gradient erzeugt, dem Wasser sowohl parazellulär als auch transzellulär folgt.

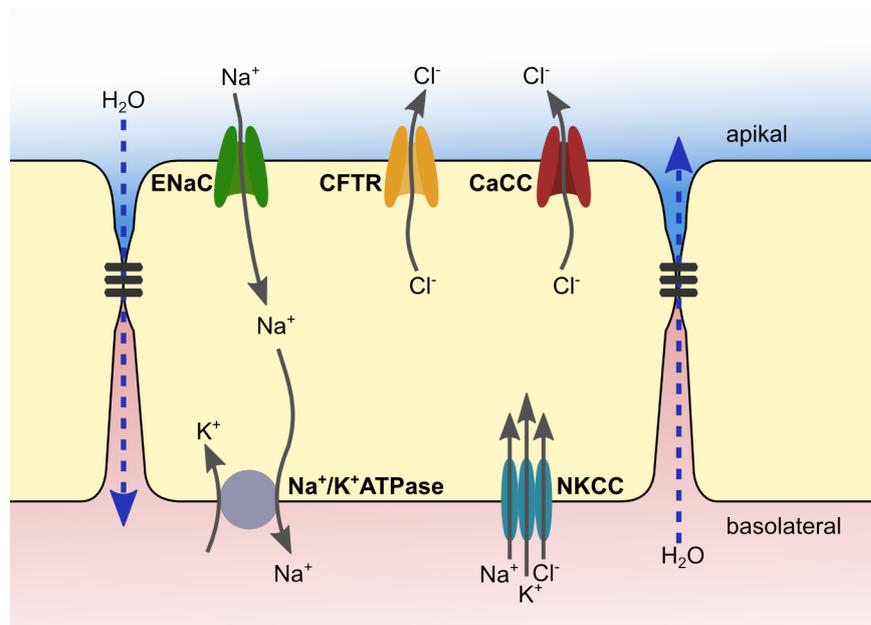


Abb. 2: Schematische Aufbau einer gesunden Epithelzelle.

Basolateral gelegen sind der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC) und die Na^+/K^+ -ATPase. Der epitheliale Na^+ -Kanal (ENaC), der Cl^- -Kanal (CFTR) sowie die Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanäle (CaCC) liegen apikal.

Bei der Mukoviszidose kommt es durch eine verminderte Anzahl oder eine verringerte Aktivität des CFTR zu einer Transportstörung von Cl^- -Ionen (Knowles *et al.*, 1983b). Dies führt zu einer vermehrten Wasserabsorption. Aufgrund des gestörten Cl^- - und Wassertransportes erhöht sich die Viskosität der Mukusschicht in der Lunge bzw. der Sekrete der Bauchspeicheldrüse und des Darms (Boucher, 2004). Neben der verringerten Cl^- -Sekretion kommt es zu einer erhöhten Na^+ -Resorption über den ENaC (Boucher *et al.*,

1988; Gentzsch *et al.*, 2010; Abb. 3). Aufgrund des entstehenden osmotischen Gradienten wird apikal verstärkt Wasser rückresorbiert. Dies führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Viskosität der Mukusschicht bzw. der Sekrete in exokrinen Epithelien (Mall *et al.*, 1998a).

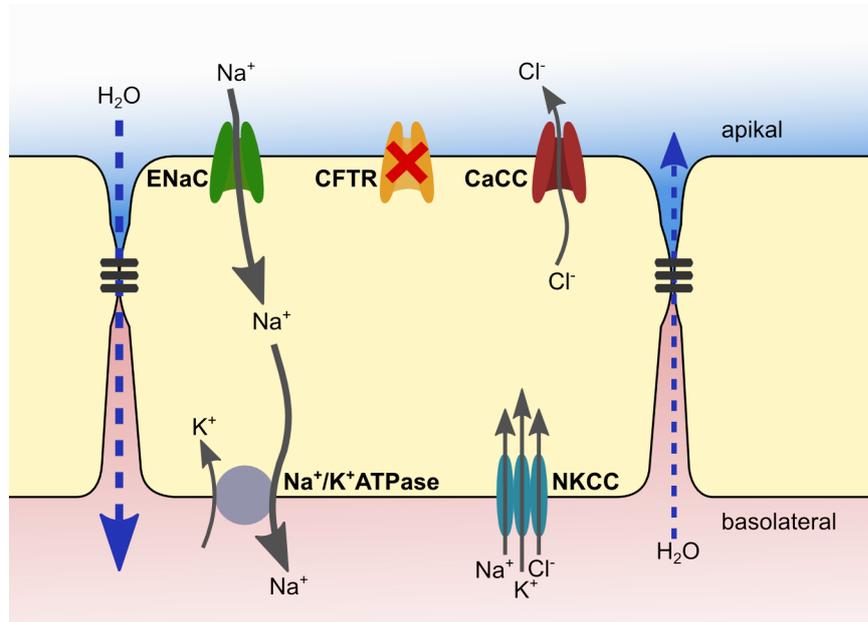


Abb. 3: Schematischer Aufbau einer Epithelzelle mit defektem CFTR.

Basal gelegen sind der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC) und die Na^+/K^+ -ATPase. Der epitheliale Na^+ -Kanal (ENaC) sowie die Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanäle (CaCC) liegen apikal. Abhängig von der CFTR-Mutation kommt es zu einer Minderung der Cl^- -Sekretion, einer kompletten Funktionsverlust bzw. einem verminderten Einbau bis zum vollständigen Fehlen des CFTR in der apikalen Membran.

Die Ionentransportstörungen können in Abhängigkeit der unterschiedlichen Mutationsklassen sehr heterogen ausgeprägt sein.

Bis heute wurden bereits knapp über 2.000 CFTR-Mutationen beschrieben (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>; Stand: 18.12.2018), von denen 312 als krankheitsverursachend charakterisiert sind (CFTR2.org; Stand: 18.12.2018). Die Mutationen werden nach ihren funktionellen Auswirkungen in sechs verschiedenen Klassen eingeteilt (Rowe *et al.*, 2005; Lubamba *et al.*, 2012; Abb. 1). In der Mutationsklasse I erfolgt eine defekte Proteinbiosynthese, so dass kein CFTR-Protein synthetisiert werden kann. Bei Mutationen der Klasse II kommt es zu Störung in der Proteinreifung und des -transports zur Zellmembran. Zu dieser Klasse gehört die F508del CFTR-Mutante, bei der die Aminosäure Phenylalanin an Position 508 deletiert ist. Diese Deletionsmutante liegt bei 66% aller Mukoviszidose-Patienten in Deutschland auf einem Allel und bei 47% auf beiden Allelen vor (Sens & Stern, 2013). Durch die CFTR-Mutationen der Klasse III bis VI kommt es zu Fehlregulationen (Klasse III), einer defekten Ionenleitfähigkeit (Klasse IV), einer verringerten Anzahl von CFTR-Proteinen in der Zellmembran (Klasse V) und zu einer verringerten CFTR-Stabilität (Klasse VI). All diese Mutationen beeinträchtigen die Funktion des CFTR als

Ionenkanal, woraufhin kein oder nur wenig Cl^- -Ionen sekretiert werden können. Die Mutationen der Klasse IV/V/VI gehen mit einer CFTR-Restfunktion einher. Liegt mindestens eine Mutationen aus den genannten Klassen vor, so resultiert hieraus eine exokrine Pankreasinsuffizienz.

Bei den Mutationsklassen IV und V findet eine normale Transkription und Translation des CFTR-Proteins statt, so dass aus diesen meist mildere Verlaufsformen der Mukoviszidose resultieren (Proesmans *et al.*, 2008; Lubamba *et al.*, 2012).

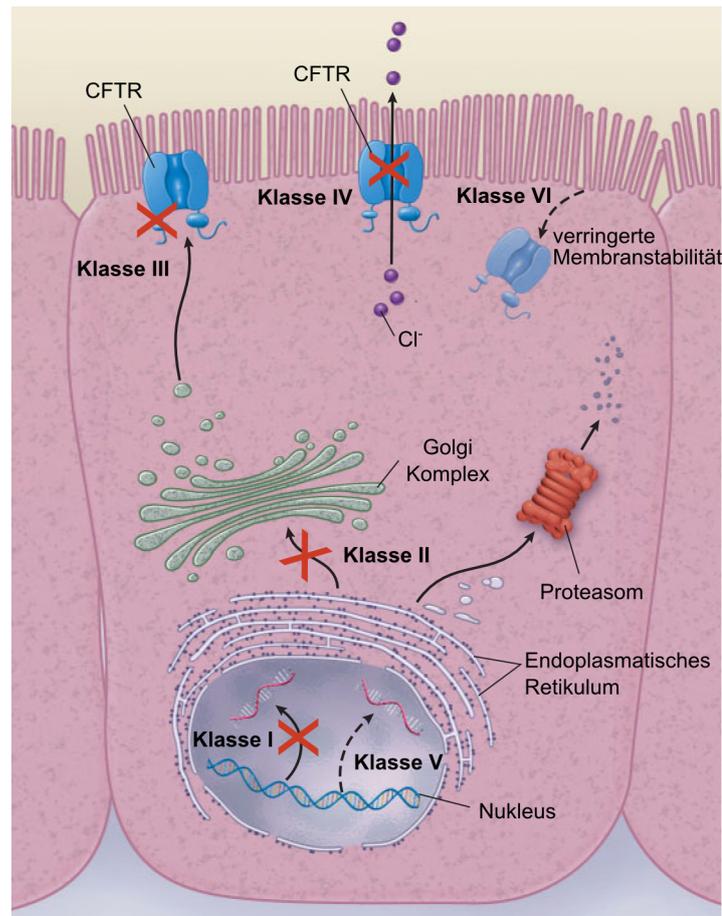


Abb. 4: Schematische Darstellung der CFTR Mutationsklassen.

In Klasse I besteht eine defekte Proteinsynthese, in der Klasse II herrscht eine Störung der Proteinreife und des Transports an die Zellmembran, die Klassen III und IV beschreiben eine Fehlregulierung und mangelnde Anzahl an apikalen Kanälen. Eine verringerte Expression wird durch die Klasse V und die mangelnde Membranstabilität durch Klasse VI charakterisiert (verändert nach Rowe *et al.*, 2005).

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die vergleichende Gegenüberstellung unterschiedlicher CFTR-Funktionsmessungen (Schweißtest, nPD und ICM) zur Diagnose einer Mukoviszidose-Erkrankung, um die ICM als geeignetes Verfahren in der Mukoviszidose-Diagnostik zu evaluieren. Hierbei lag der Fokus insbesondere auf dem Vergleich pankreassuffizienter und pankreasinsuffizienter Mukoviszidosepatienten mit gesunden Probanden.

Es erfolgte in dieser Arbeit die standardisierte Durchführung der ICM mit der konkreten Fragestellung nach der Praktikabilität des neuen *Standard Operating Procedure* der Europäischen Gesellschaft für Mukoviszidose (ECFS-TDN-SOP, V2.7, Oktober 2011) zur Durchführung einer ICM. Dabei wurde in dieser Arbeit besonders auf die standardisierte Durchführbarkeit der Biopsieentnahme und die anschließende Messung der Biopsien *ex vivo* mittels Ussing-Kammer und *voltage-clamp* Messmethode geachtet. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit zwei für die Mukoviszidose bereits etablierte Diagnoseverfahren, der Schweißtest und die nPD, standardisiert durchgeführt (Naehrlich, 2007; Rowe *et al.*, 2011), um eine hohe diagnostische Wertigkeit zu gewährleisten.

Bei der Auswertung wurde insbesondere auf die diagnostische Sensitivität und Spezifität der nPD und der ICM geachtet, um eine aussagekräftige Vorhersage in der Differenzierung zwischen gesunden und CF-erkrankten Probanden zu erreichen.

2. Material und Methoden

In der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene CFTR-Funktionstests zum Diagnosenachweis einer Mukoviszidose durchgeführt. In den nachfolgenden Abschnitten werden die verwendeten Methoden dargestellt sowie der Aufbau und die Durchführung der Iontophorese (Schweißtest), der nasale Potentialmessung (nPD) sowie der intestinalen Kurzschlussstrommessung (ICM) ausführlich beschrieben.

2.1 Untersuchungskollektiv

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Kollektiv von 31 Probanden im Alter von 13 bis 51 Jahren (Durchschnittsalter $26 \pm 9,5$ Jahre) untersucht. Die Geschlechterverteilung war dabei ausgewogen und umfasste 16 männliche und 15 weibliche Probanden. Das Gesamtkollektiv teilte sich in eine Kontrollgruppe ($n = 13$), eine Gruppe pankreas-insuffizienter Mukoviszidosepatienten (Pankreasinsuffiziente CF-Patienten, $n = 12$) und in eine Gruppe pankreassuffizienter Mukoviszidosepatienten (Pankreassuffiziente CF-Patienten, $n = 6$). Eine genetische Diagnostik lag bei allen Probanden der beiden CF-Gruppen vor und ist im Detail in der Tab. 1 beschrieben.

Tab. 1: Untersuchungskollektiv mit Anzahl, Durchschnittsalter und Genetik.

	Anzahl der Probanden	Durchschnittsalter in Jahren	CFTR-Genotyp
Kontrollgruppe	13	30 (22 – 51)	keine genetischen Untersuchungen
Pankreasinsuffiziente CF-Patienten	12	23,3 (18 – 38)	$\Delta F508/\Delta F508$ ($n = 6$) $\Delta F508/G551D$ ($n = 2$) $\Delta F508/N1303k$ ($n = 1$) $\Delta F508/1248+1G \rightarrow A$ ($n = 1$) $\Delta F508/G542x$ ($n = 1$) $\Delta F508/del\ 14a,15,16,17a,17b$ ($n = 1$)
Pankreassuffiziente CF-Patienten	6	22,7 (13 – 41)	$\Delta F508/R347P$ ($n = 2$) $\Delta F508/3849+10kb\ C \rightarrow T$ ($n = 2$) $\Delta F508/R334W$ ($n = 1$)

Die Unterscheidung innerhalb der beiden CF-Gruppen erfolgte durch die Elastasebestimmung im Stuhl. Eine fäkale Pankreaselastase von $<100 \mu\text{g/g}$ ist ein Diagnosekriterium für eine exokrine Pankreasinsuffizienz (Derichs et al., 2010).

Die gesunde Kontrollgruppe musste folgende Einschlusskriterien erfüllen:

1. Es dürfen keine klinische Hinweise auf eine Mukoviszidose vorliegen.
2. Die Schweißchloridkonzentration liegt unter 60 mmol/l .

Des Weiteren wurden für alle drei Untersuchungsgruppen Ausschlusskriterien für diese Studie formuliert:

1. Die Teilnahme an einer anderen klinischen Studie in den vergangenen 30 Tagen.
2. Eine akute Atemwegserkrankung.
3. Das Vorhandensein von Hämorrhoiden oder Blutgerinnungsstörungen.
4. Eine nasale Voroperation.
5. Die Einnahme des Medikaments Ivacaftor.

Die Durchführung der Untersuchungen wurden nach Zustimmung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen (AZ109/12) und unter Anwendung der Vereinbarung von Helsinki nach vorheriger Aufklärung und schriftlichem Einverständnis der Patienten bzw. -im Falle von Minderjährigen- deren Eltern durchgeführt.

2.2 Die Iontophorese

Bei einem klinischen Hinweis auf Mukoviszidose ist der Schweißtest der Goldstandard und stellt den ersten Schritt der Mukoviszidosedagnostik dar. Hierbei erfolgt eine quantitative Bestimmung der Cl^- -Konzentration im Schweiß mittels Pilocarpin-Iontophorese gemäß der Leitlinie des *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, CLSI-Guideline 2009). Die Durchführung des Schweißtests unterteilt sich in drei Phasen: 1) die Schweißstimulation, 2) das Sammeln des Schweißes sowie 3) die quantitative Cl^- -Bestimmung (Beauchamp & Lands, 2005).

Die Schweißstimulation erfolgt durch die Methode nach Gibson und Cook (Gibson & Cooke, 1959). Diese beinhaltet das Auftragen eines Pilocarpingels auf das zu stimulierende Hautareal. Pilocarpin regt als Parasympathomimetikum die ekkrine Schweißsekretion an. Mittels zweier Kupferelektroden wurde für wenige Minuten ein schwacher Strom ($<5 \text{ mA}$) an die zu stimulierende Hautstelle angelegt, um die Hautpenetration des Pilocarpins zu beschleunigen und dessen Wirkung zu verstärken (LeGrys, 1996). Nach einer circa 5-minütigen Stimulationsphase wird das Hautareal gereinigt und für 30 Minuten wird der Schweiß gesammelt. Dies geschieht durch das Auflegen eines Schweißsammlers (Wescor-

System) auf das zuvor stimulierte Hautareal. Nach der Auffangphase erfolgt die unverdünnte Bestimmung der Cl^- -Konzentration mittels Chloridmeter.

Laut der aktuellen Richtlinie des *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) gilt bei einer Cl^- -Konzentration über 60 mmol/l der Test als positiv und ist somit ein starker Hinweis auf eine CF-Erkrankung. Liegt die Cl^- -Konzentration des Schweißes unter 30 mmol/l ist eine CF-Erkrankung sehr unwahrscheinlich. Liegen die Ergebnisse zwischen 30 und 60 mmol/l wird der Test zunächst wiederholt und es folgen weitere Untersuchungen (LeGrys *et al.*, 2009).

2.3 Die nasale Potentialdifferenz

Die nPD-Messung wird in Fällen angewendet, bei denen die Ergebnisse der Iontophorese im Grenzbereich (Schweißchloridkonzentration 30 - 59 mmol/l) liegt und die Untersuchung auf die häufigsten Mukoviszidose verursachenden CFTR-Mutationen keinen Nachweis zweier krankheitsverursachender Mutationen ergeben hat. Sie dient als *in vivo* Messmethode nicht nur zur Erstdiagnose, sondern wird ebenso zu Studienzwecken eingesetzt sowie für die Bestimmung der CFTR-Restaktivität bei bekannter Mukoviszidose. Die Durchführung ist abhängig von der Compliance des Patienten und wird daher in der Regel erst ab dem 6. Lebensjahr durchgeführt. Daher eignet sich die nPD nicht als Bestätigungstest bei Säuglingen mit positiven Testergebnis im Neugeborenencreening.

Bei der nPD-Messung wird eine Spannungsdifferenz am respiratorischen Epithel der Nase gemessen, dessen Grundlage der epitheliale Ionentransport ist. Mittels Hochimpedanz-Voltmeter, einer Messsonde am Nasenepithel und einer Referenzelektrode in der Subkutis wird die Potentialdifferenz (PD) gemessen. Dieses Vorgehen ist möglich, da die Subkutis isoelektrisch zur Submukosa der Nasenschleimhaut ist (Knowles *et al.*, 1995). Gemessen werden hierbei die Ausgangswerte der Potentialdifferenz, die Spannungsänderungen nach Gabe des Na^+ -Kanalblockers Amilorid sowie nach Applikation einer Cl^- -freien Lösungen mit Isoproterenol und ATP an der Schleimhaut der *Concha nasalis inferior*, die mit ihrer Transmembraneigenschaft der des respiratorischen Epithels entspricht (Wilschanski *et al.*, 2001).

Bei gesunden Epithel wird die Potentialdifferenz zwischen luminaler Epithelseite und Subkutis hauptsächlich durch die Balance zwischen Na^+ -Absorption und Cl^- -Sekretion bestimmt (Knowles *et al.*, 1981; Vermeulen *et al.*, 2011). Die für die CF typischen Veränderungen des epithelialen Ionentransports, eine gesteigerte Na^+ -Absorption und eine gestörte Cl^- -Sekretion, lassen sich auch in der nPD-Messung nachweisen. Dies zeigt sich in den Messungen von CF-Patienten an negativeren Ausgangswerten, eine stärkere

Depolarisation nach Perfusion des Na⁺-Kanalblockers Amilorid sowie einen geringeren Wiederanstieg nach Perfusion mit Cl⁻-freien Lösungen (Rowe *et al.*, 2011).

Der Aufbau und die Durchführung der Messungen beruhten bei diesen Versuchen auf den Vorgaben des *Standard Operating Procedure (Standardization of Measurement of Nasal Membrane Transepithelial Potential Difference)* der *Cystic Fibrosis Foundation (CFF-TDN-SOP (Version: Januar 2009; Rowe et al., 2011))*.

Der Versuchsaufbau

Zur Vorbereitung der Versuche gehörte die Herstellung der als Elektroden fungierenden Agargelbrücken und der Perfusionslösungen (Tab. 2). Zur Herstellung der Agargelbrücken wurden 3 g Agar und 100 ml Ringerlösung unter ständigem Rühren auf einer Heizplatte aufgeköcht. Die fertige, noch warme Agarlösung wurde dann mittels steriler 10 ml Spritze in die vorher im Wasserbad erwärmten, dünnlumigen Kunststoffkatheter eingefüllt. Für die in der nPD Messung benötigte Hautbrücke diente eine 23 G Butterflynadel mit Luer-Lock-Schlauchadapter. Für die nasale Elektrode wurde eine doppelumige Nasensonde (Marquat Genie Biomedical, *Nasal probe for determination of potential difference sterile Lg 80 cm; REF I0202US*) verwendet. Nach 10-minütiger Abkühlung wurden die Gelbrücken bis zum Versuchstag einzeln in einer Ringerlösung im Kühlschrank für maximal einen Monat gelagert.

Tab. 2: Überblick über die verwendeten Lösungen der nPD.

Name der Lösung	Inhalt
Lösung 1	Ringerlösung
Lösung 2	Ringerlösung + 100 µM Amilorid
Lösung 3	Cl ⁻ -freie Lösung + 100 µM Amilorid
Lösung 4	Cl ⁻ -freie Lösung + 100 µM Amilorid + 10 µM Isoproterenol
Lösung 5	Cl ⁻ -freie Lösung + 100 µM Amilorid + 10 µM Isoproterenol + 100 µM ATP

Die für die Messung benötigten Lösungen 1-5 (Tab. 3 und 4) wurden am Messtag jeweils in 50 ml Injektionsspritzen gefüllt und dann in Perfusorpumpen (Perfusor® Space, Braun) eingespannt. Die Perfusionslösungen wurden über 3-Wege-Hähne mit dem offenen Ende zur doppelumigen Nasensonde verbunden, um die Applikation der verschiedenen Lösungen während des Messvorgangs zu ermöglichen. Die Perfusionsleitungen wurden während der gesamten Messung in einem 40 °C warmen Wasserbad (Julabo) erwärmt (Zieltemperatur nach Durchfluss bei 37 °C).

Tab. 3: Zusammensetzung der Ringerlösung für die Messungen der nPD.

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	148
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	2,25
KCl	4,05
K ₂ HPO ₄	2,4
KH ₂ PO ₄	0,4
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	1,2

Der pH-Wert der Lösung wurde mittels NaOH (1 M) oder HCl (0,1 M) auf 7,4 eingestellt.

Tab. 4: Zusammensetzung der Cl⁻-freien Lösung für die nPD-Messungen.

Substanz	Konzentration (mM)
Na ⁺ -Gluconat	148
Ca ²⁺ -Gluconat	2,25
K ⁺ -Gluconat	4,05
K ₂ HPO ₄	2,4
KH ₂ PO ₄	0,4
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,2

Der pH-Wert dieser Lösung wurde mittels NaOH (1 M) oder HCl (0,1 M) auf 7,4 eingestellt.

Die mit Agar gefüllte Seite der Nasensonde wurde direkt vor den Versuchen in ein Becherglas mit 3 M KCl-Lösung überführt. In dem Becherglas befand sich zusätzlich eine Silberchloridelektrode (Fisher Scientific), die für die elektrische Weiterleitung verwendet wurde. Die selbe Vorgehensweise wurde für die subkutane Referenzelektrode gewählt. Die beiden Silberchloridelektroden waren mittels einer Headstage (ISO-Z Isolation Headstage für BMA-200, AD Instruments) über einen Vorverstärker (BMA-200 AC/DC portabler Bioamplifier, AD Instruments) an einem Analog-Digital-Wandler, ein sogenanntes Powerlab (Powerlab 4/30, AD Instruments), angeschlossen (Abb. 5). Die Messung wurde über LabChart (AD Instruments Software: GLP Client V6 (win)) an einem Windowsrechner (akkubetriebener Laptop) aufgezeichnet.

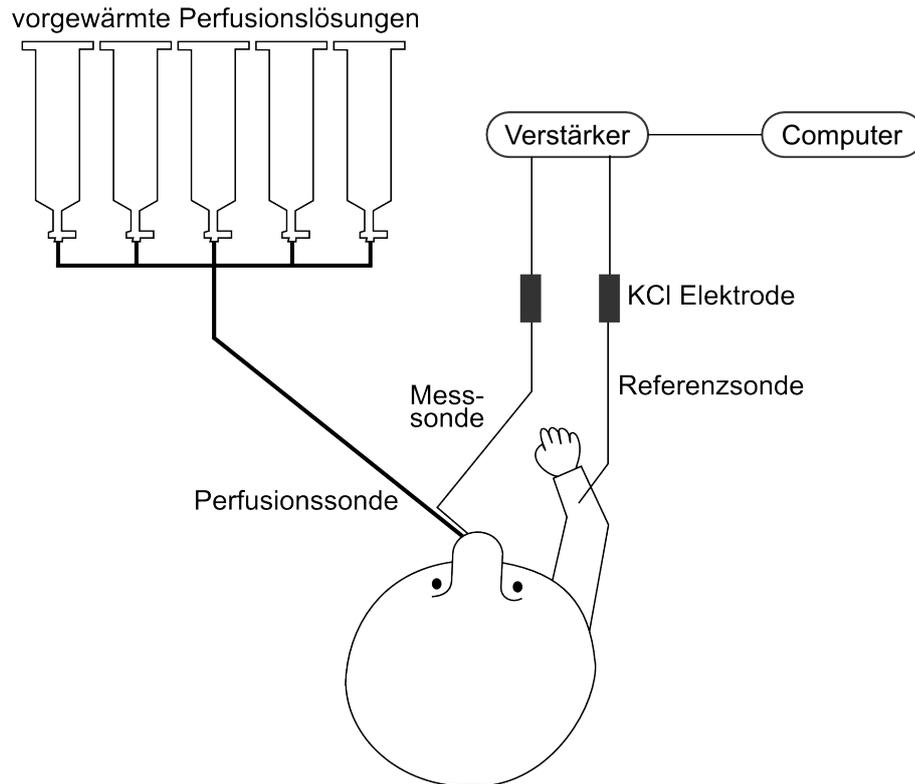


Abb. 5: Schematische Darstellung der nPD.

Die Perfusionssonde (mittels Wasserbad erwärmt auf 37°C) und die Messsonde wurden in der Nasenöffnung, die Referenzsonde am Oberarm des Probanden platziert. Mess- und Referenzsonde wurden über eine KCl-Elektrode an einen Verstärker angeschlossen. Die Messaufzeichnung erfolgte über einen Computer. Während der Messung erfolgte die kontinuierliche Perfusion mittels vorgewärmter Lösungen.

Die Versuchsdurchführung

Zu Beginn einer jeden Messung wurde das *closed-loop*-Offset bestimmt. Der *closed-loop*-Offset ist ein indirektes Maß für den vorhandenen Leitungswiderstand des Messsystems und sollte möglichst in einem Wertebereich zwischen $\pm 2,5$ mV liegen. Hierfür wurden der nasale Katheter und die subkutane Referenzelektrode zusammen in ein Becherglas mit Ringerlösung überführt. Der Spannungsunterschied wurde daraufhin gemessen. Bei eventuellen Abweichungen und Überschreitungen des Wertebereichs wurde mit Hilfe des Offset-Knopf der Headstage nachjustiert und die Potentialdifferenz der Elektroden genullt. Dies war nötig, um die vorhandenen Widerstände der Messelektroden auszugleichen und damit zu jeder Messung identische Ausgangswerte zu erhalten. Als Nächstes wurde die Referenzelektrode subkutan am Oberarm angebracht, mittels Leukosilk fixiert und die Spannungsdifferenz zwischen Fingerspitze des Patienten und Referenzelektrode bestimmt. Dieser Wert sollte zwischen -40 mV und -80 mV liegen und diente ebenfalls zur Validierung des Versuchsaufbaus. Danach wurde die Nasenschleimhaut mittels Nasenspekulum untersucht und anhand einer standardisierten Bewertung beurteilt. Mögliche Entzündungen

der Schleimhaut oder auch Schädigungen durch eventuelle Operationen wurden dokumentiert (beurteilt wurden: Mukosaschäden, Ödeme, Rötung, Polypen und Sekret: 0 = keine, 1 = mild, 2 = moderat, 3 = schwer). Da in der nPD der Ionentransport über die Nasenschleimhaut gemessen wird, können Entzündungen und Mukosaschädigungen zu einer deutlichen Veränderung der Ionentransportprozesse und somit zu veränderten nPD-Ergebnisse führen. Die Untersuchung der Nasenschleimhaut diente der Dokumentation sowie der Überprüfung, ob eine nPD an diesem Tag bei den jeweiligen Probanden durchführbar war. Eine weitere Auswertung dieser Schleimhautschäden fand in dieser Arbeit nicht statt. Die basale Potentialdifferenz im rechten Nasenloch wurde unterhalb der *Concha nasalis inferior* gemessen. Hierfür wurde die Ringerperfusionslösung (Lösung 1) auf eine Durchlaufrate von 12 ml/h eingestellt. Die Potentialdifferenz wurde hierbei an verschiedenen Stellen im unteren Nasengang (*Meatus nasi inferior*, unterhalb der unteren Nasenmuschel) gemessen, beginnend bei 3 cm, 2 cm, 1,5 cm, 1 cm sowie 0,5 cm. Die Position mit der negativsten Potentialdifferenz wurde als Messpunkt festgelegt und der Katheter mit einem Klebestreifen fixiert. Nun wurde die Durchflussgeschwindigkeit der Ringerlösung auf 300 ml/h erhöht und so lange gewartet bis sich ein Spannungsplateau (Spannungsänderung <1 mV/ 30 Sekunden) eingestellte. Nach der Plateauphase wurde die Perfusionslösung manuell am 3-Wege-Hahn von Ringerlösung (Lösung 1) auf Lösung 2 (Lösung 1 + Amilorid) zur Blockade des epithelialen Na⁺-Kanals (ENaC) umgestellt und so lange aufgezeichnet bis sich wieder ein stabiler Wert einstellte, mindestens 3 Minuten und maximal 5 Minuten. Anschließend folgte das gleiche Vorgehen mit Lösung 3 (Cl⁻-freie Lösung) und Lösung 4 (Cl⁻-freie Lösung + Isoproterenol) zur Stimulation der Cl⁻-Sekretion. Isoproterenol ist ein Noradrenalin-Derivat und wird in der Literatur als Aktivator der CFTR-vermittelten Cl⁻-Sekretion beschrieben. Durch seine Bindung an β 2-Rezeptoren wird die Adenylatzyklase aktiviert und nachfolgend wird die Synthese des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) in Gang gesetzt (Anderson *et al.*, 1991). Dies hat eine Stimulierung des CFTR mit einer Zunahme der Cl⁻-Sekretion im gesunden Epithel zur Folge. Aufgrund der verminderten CFTR-Aktivität bleibt diese bei Mukoviszidose-Patienten in den meisten Fällen allerdings aus (Li & Naren, 2005).

Wieder wurde für mindestens 3 Minuten aufgezeichnet und dann bis maximal 5 Minuten gewartet bis ein Spannungsplateau erreicht wurde. Schließlich wurde auf Lösung 5 (Cl⁻-freie Lösung + Isoproterenol + ATP) umgestellt und die Aufzeichnung der PD für mindestens eine Minute fortgeführt bis die Spannungskurven nach Erreichen eines Höchstwertes rückläufig war (transienter Peak). Adenosintriphosphat (ATP) wurde zur Aktivierung alternativer Cl⁻-Kanäle eingesetzt. Durch die Bindung von ATP an den in der Zellmembran befindlichen G-Protein-gekoppelten Purinrezeptor wird die intrazelluläre IP₃-Kaskade aktiviert und es folgt eine vermehrte Ca²⁺-Ausschüttung aus dem endoplasmatischen Retikulum. Die erhöhte

Ca²⁺-Konzentration führt nachfolgend zur Stimulation Ca²⁺-abhängiger Cl⁻-Kanäle (CaCC). Als letzte Lösung wurde zum Spülen des Katheters erneut Lösung 1 für 30 Sekunden appliziert. Kurz vor Ende der Aufzeichnung wurde zur Qualitätskontrolle die Spannungsdifferenz zwischen Nasenvorhof und Fingerspitze erneut gemessen und die Messung damit abgeschlossen. Die gesamte Messung wurde am linken Nasenloch wiederholt. Nach Beendigung der 2. Messung wurde für eine erneute Kontrolle noch einmal das *close-loop*-Offset bestimmt.

2.4 Die intestinale Kurzschlussstrommessung

Die ICM dient neben der nPD als weitere elektrophysiologische Messung des epithelialen Ionentransports. Während einer ICM wird der Ionenstrom an Biopsien der Rektumschleimhaut *ex vivo* gemessen. Somit können Rückschlüsse auf die CFTR-vermittelte Cl⁻-Sekretion gezogen werden. Die rektalen Gewebeproben können mittels oberflächlicher Saugbiopsie altersunabhängig entnommen werden. Im Gegensatz zur nPD kann die ICM z.B. auch als Bestätigungstest bei Neugeborenen mit positiven Screeningergebnis eingesetzt werden.

Bei der ICM erfolgt die Messung des transepithelialen Ionenstroms mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik (De Jonge *et al.*, 2004; SOP der European Cystic Fibrosis Society (ECFS), Version 2.7 / Oct 26, 2011). Das Messprinzip der Ussing-Kammer beruht auf zwei mit Lösungen befüllten Kammern, welche durch ein eingespanntes Gewebe (Rektumbiopsie) voneinander getrennt sind (Abb. 6). Damit ist es möglich die Ionentransportprozesse über ein Epithel zu charakterisieren. In beiden Kammern wird jeweils mit einer gewebe nahen Elektrode die Spannung und mit einer gewebsfernen Elektrode der Stromfluss gemessen. Ferner bietet die Ussing-Kammer als *ex vivo* Messmethode die Möglichkeit mittels verschiedener Pharmaka die Aktivierung bzw. Hemmung bestimmter Ionenkanäle zu provozieren und die daraus resultierenden Veränderungen zu dokumentieren. Darüber hinaus können mittels *voltage-clamp*-Messmethode die Ionenströme qualitativ und quantitativ bestimmt werden.

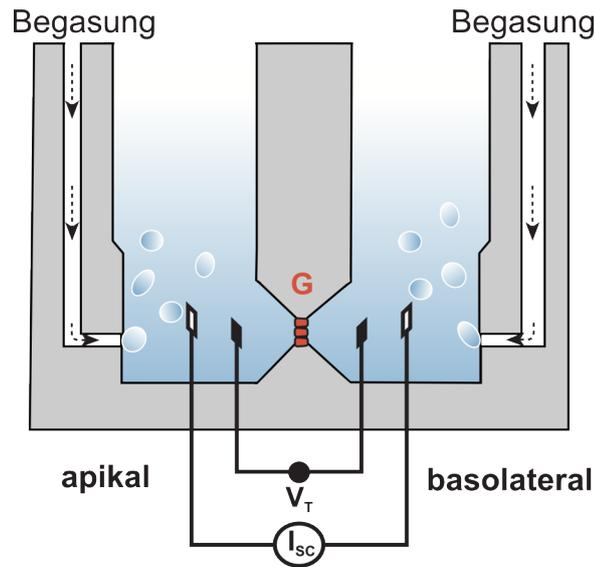


Abb. 6: Schematische Darstellung der Ussing-Kammer und *voltage-clamp* Messmethode.

Das Biopsiegewebe (G) trennte die Ussing-Kammer in eine apikale und eine basolaterale Hälfte. Für die *voltage-clamp* Messmethode wurden zwei gewebsnahe Spannungselektroden (V_T) und zwei gewebsferne Stromelektroden (I_{sc}) in die Kammerhälften eingeführt. Die kontinuierliche apikale und basolaterale Begasung erfolgte mit einem Gasgemisch (95% O_2 , 5% CO_2).

Die *voltage-clamp* Messmethode

Aus den aktiven epithelialen Ionentransportprozessen resultiert eine Ladungsverschiebung, die man als transepitheliale Spannung messen kann. Das gemessene Potential erlaubt eine qualitative Aussage über die Nettostromrichtung. Allerdings ist hierbei keine quantitative Aussage über die transportierten Ionen möglich. Hierfür wird das Prinzip der Spannungsklemme (*voltage-clamp*) benötigt, die eine Aussage über die Stromrichtung und die Strommenge ermöglicht. Durch die gewebsnahen Spannungselektroden in der Ussing-Kammer wird die Potentialdifferenz über dem Epithel gemessen. Mit Hilfe eines an die Elektroden angeschlossenen *voltage-clamp*-Verstärkers ist es möglich das transepitheliale Potential auf einen beliebigen Wert zu regulieren. Weicht die gemessene Spannungsdifferenz von dem vorgegebenen Sollwert (0 mV) ab, erfolgt ein automatischer Rückkopplungsmechanismus mit Hilfe der gewebsfernen Stromelektroden. In diesen Versuchen wurde der *short-circuit*-Modus (transepitheliale Spannung: 0 mV) angewandt. Den hierfür benötigten kompensatorischen Strom bezeichnet man als Kurzschlussstrom (*short circuit current*: I_{sc}) und dieser entspricht dem Ionenstrom über dem Epithel, nur mit umgekehrten Vorzeichen. Durch die veränderte Transportaktivität während eines Messvorgangs kommt es auch zu einer Veränderung des transepithelialen Potentials. Kompensatorisch erfolgte dann mittels der Stromapplikation die Gegenregulierung des *voltage-clamp*-Verstärkers. Dieser sich verändernde Kurzschlussstrom stellte die kontinuierliche protokollierte Messgröße dar.

Zusätzlich zur Kurzschlussstrommessung bietet die ICM gegenüber der nPD den Vorteil den transepithelialen Widerstand zu bestimmen. Dieser ermöglicht eine Aussage über die Gewebedurchlässigkeit und damit auch die Integrität der untersuchten Gewebeprobe. Zur Ermittlung des transepithelialen Gewebewiderstand wurde zu Beginn und Ende einer jeden Messung im *open-circuit*-Modus ein Strompuls (15 μ A) auf das Gewebe appliziert. Aus der so entstandenen Spannungsdifferenz wurde mittels des Ohm'schen Gesetz der Gewebewiderstand (R_i) errechnet.

Die Entnahme der Rektumbiopsien

Die Entnahme der rektalen Saugbiopsien erfolgte am Untersuchungstag nach der Willital Methode. Hierzu wurde eine Saugvorrichtung mit Manometer (Ulrich GmbH), eine Perfusorspritze zum Anlegen des Vakuumdrucks sowie Kompressen und Vaseline benötigt. Eine spezielle Vorbereitung seitens des Probanden wie z.B. die Darmreinigung wie bei einer Koloskopie üblich, war nicht nötig. Zur Durchführung lag der Patient mit angewinkelten Beinen in Seitenlage. Vor der Biopsieentnahme erfolgte eine digital-rektal Untersuchung, um eventuell vorhandene Hämorrhoiden auszuschließen. Danach wurde die Saugvorrichtung ca. 3 - 4 cm hinter den externen Analsphinkter eingeführt, unter manometrische Kontrolle ein Saugdruck von ≤ 20 cmH₂O angelegt und die Schneidevorrichtung in der Biopsiezange ausgelöst. Somit erhielt man pro Durchgang 1 - 2 Biopsien. Dies wurde wiederholt bis man 8 verwertbare Gewebeproben pro Proband erhielt. Die Biopsien wurden direkt nach der Entnahme zur kurzfristigen Aufbewahrung in eine eisgekühlte Pufferlösung (DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) und Indometacin (10 μ M) überführt. Indometacin ist ein nichtselektiver Cyclooxygenasehemmer (Cox1 und Cox2) und wird therapeutisch als Analgetikum eingesetzt. In den Ussing-Kammer-Experimenten dieser Dissertation wurde Indometacin eingesetzt, um eine Verringerung der intrazellulären cAMP-Konzentration zu erreichen (Sousa *et al.*, 2012). Indometacin wurde in einer Konzentration von 10 mM in Ethanol gelöst und als Stocklösung bei -20°C aufbewahrt.

Die Zeit zwischen Probeentnahme und Beginn der Ussing-Kammer-Messung wurde so gering wie möglich gehalten, um mögliche Schädigung des Gewebes zu verhindern.

Herstellung der Elektroden

Für die Ussing-Kammer-Versuche wurden Elektroden aus dem P2020 *EasyMount Electrode Set* von *Physiologic Instruments* verwendet. Die Spitze der Elektroden (10 μ l Kunststoffpipettenspitzen) wurde mit 3 M KCl-Agar befüllt und dann mit 3 M KCl-Lösung aufgefüllt. Danach wurde die Elektrodenspitze mit dem Ag/AgCl Elektrodenanschluss verschraubt und in einer 3 M KCl-Lösung bis zum Messtag aufbewahrt.

Der Versuchsaufbau

Der Aufbau der Messvorrichtung folgte der Standardvorgehensweise (*Standard Operating Procedure: SOP*) der Europäischen Mukoviszidose Gesellschaft aus dem Jahre 2011 (ECFS-TDN-SOP, V2.7, Oktober 2011). Für alle Versuche wurden zeitgleich vier Niedrigvolumen-Ussing-Kammern (EM-CSYS-4PI) von *Physiologic Instruments* verwendet. Diese boten den Vorteil der gleichzeitigen Messung von bis zu vier Biopsien und den direkten Anschluss einer Wasserpumpe (Julabo, Lauda Eco Silva), um die für die Messung wichtige konstante Kammertemperatur von 37°C aufrecht zu erhalten. Um den Einfluss elektro-magnetische Störungen auf die Messungen zu verringern, befand sich die Ussing-Kammer in einem Faraday-Käfig.

Für das Einspannen der Biopsien in die Ussing-Kammer wurden je nach Größe der Biopsien wahlweise ein Schieber (*Slider*) mit 1,5 mm (P2407C) oder 1,2 mm (P2407B) Durchmesser eingesetzt. Nachdem die Gewebeproben in der Kammer platziert waren, wurden die Strom- und Spannungselektroden in die Kammer gesteckt. Jede Kammerhälfte wurde mit 2 ml Pufferlösung (Tab. 5) befüllt und mit einem Carbogengemisch (95% O₂, 5% CO₂) begast. Die Elektroden wurden über ein Input Modul (DM MC6 *Single Channel Electrode Input Module*) mit dem *voltage-clamp*-Verstärker (VCC MC4 *Multichannel Voltage/Current Clamp*) verbunden. Dieser wiederum wurde für die Aufzeichnung mit dem PowerLab 8/30 verbunden und registrierte die Messung mit dem Programm Labchart7.

Tab. 5: Zusammensetzung der Ringerlösung für die Untersuchungen der Rektumbiopsien mittels Ussing-Kammer-Technik.

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	128
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	1,3
KCl	4,07
HEPES	10
Na ₂ HPO ₃	0,3
NaH ₂ PO ₄	0,4
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1,0
NaHCO ₃	20,2

HEPES: N-(2- Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure); Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl (0,1 M) oder NaOH (1 M) auf 7,4 eingestellt. Am Untersuchungstag erfolgte die Hinzugabe von D-Glucose (10 mM) und Indomethacin (0,01 mM).

Die Versuchsdurchführung

Zu Beginn eines Messtages wurden die benötigte Aufbewahrungslösung und Pufferlösung fertiggestellt und für die Messung in einem Wasserbad vorgewärmt.

Es folgten der Aufbau der Ussing-Kammer und das Erwärmen durch die an den Kammern angeschlossene Wärmepumpe. Danach wurden die einzelnen Kammern mit der vorgewärmten Pufferlösung befüllt und mit dem *voltage-clamp*-Verstärker verbunden. Nun startete das Kalibrieren der Messeinheit mit dem Einschalten des Verstärkers im *open-circuit*-Modus, dem Nullabgleich der Elektroden sowie der Kompensation des Flüssigkeitswiderstandes (*compensate fluid resistance*). Nach der Kalibrierungsphase wurde die Pufferlösung wieder aus den Kammern entnommen, die Rektumbiopsien in die *Slider* gespannt und in die Ussing-Kammer montiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die apikale (Mukosa) Seite der Biopsie zur linken und die basolaterale (Serosa) Seite zur rechten Kammerhälfte zeigten.

Anschließend wurde mit dem vom SOP vorgegebenen Messprotokoll begonnen. Dabei wurde nach dem Start des Lab-Chart Programms, die basale Spannungsdifferenz (Basal PD) notiert und der Gewebewiderstand mittels applizierter Strompuls von 15 μA und Ohm'schen Gesetz errechnet. Die Rektumbiopsien sollten typischerweise einen Gewebewiderstand zwischen 15 und 30 Ohm aufweisen. Werte unter 10 Ohm sprachen für ein Leck in der Gewebeschicht. Somit war eine zuverlässige Messung nicht möglich und die Biopsie wurde demzufolge ersetzt.

Zur Funktionsüberprüfung des Epithels erfolgte die basolaterale Applikation von 100 μM Carbachol. Carbachol gilt als Struktur analogon des Neurotransmitters Acetylcholin und hat durch seine Bindung am Muskarinrezeptor eine direkte parasympatische Wirkung. Carbachol wurde in diesen Versuchen eingesetzt, um cholinerge Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle zu aktivieren (Mall *et al.*, 2000). Wurde nach einer 5-minütigen Inkubationszeit der Rektumbiopsie mit Carbachol keine Veränderung des gemessenen Kurzschlussstroms erreicht, wurde auch hier die Biopsie ersetzt.

Dann folgte eine 40-minütigen Äquilibrierungsphase im *voltage-clamp*-Modus, bei der die vorgewärmte Pufferlösung alle 10 Minuten gewechselt wurde. Nach dieser Äquilibrierungsphase wurde der basale Kurzschlussstrom registriert und anschließend erfolgte die apikale Applikation von 100 μM Amilorid. Das K^+ -sparende Diuretikum Amilorid blockiert den apikal lokalisierten ENaC. Amilorid wurde als Stocklösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 100 mM gelöst.

Nach 5 Minuten Amilorid-Inkubation wurde sowohl apikal als auch basolateral Forskolin (10 μM , 10 mM Ethanol-Stocklösung) und IBMX (100 μM) additiv hinzugegeben. Das Diterpen Forskolin erhöht durch Stimulierung der Adenylatzyklase den intrazellulären cAMP-

Spiegel. Dahingegen verringerte IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) die Aktivität der cAMP-Phosphodiesterase, wodurch ebenfalls die intrazelluläre cAMP-Konzentration gesteigert wurde (Sousa *et al.*, 2012). Die Applikation beider Substanzen resultieren in einer Aktivierung des CFTR und somit eine erhöhte Cl^- -Sekretion des Epithels (Sousa *et al.*, 2012).

Anschließend wurde nach weiteren 10 Minuten 10 μM Genistein ebenfalls in beide Kammerhälften pipettiert. Die Molekülstruktur des Isoflavonoid Genistein ähnelt der von Östrogenen. Eine frühere Arbeitsgruppe zeigte, dass Genistein in der Lage war den CFTR in der Darmschleimhaut zu aktivieren und damit verbunden die Cl^- -Sekretion zu erhöhen (Mall *et al.*, 2000).

Nach weiteren 5 Minuten wurde Carbachol (100 μM) in die basolaterale Kammerhälfte gegeben. Carbachol gilt als Struktur analogon des Neurotransmitters Acetylcholin und hat durch seine Bindung am Muskarinrezeptor eine direkte parasympatische Wirkung. Carbachol wurde in diesen Versuchen eingesetzt, um cholinerge Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle zu aktivieren (Mall *et al.*, 2000).

Nach einer 10-minütigen Wartezeit wurde 200 μM DIDS (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid) apikal appliziert, um den basolateral lokalisierten Anionenaustauschers 2 (AE2) zu inhibieren. Als Resultat dieser Hemmung werden apikale Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle ebenfalls inhibiert (Gillie *et al.*, 2001).

Im Anschluss erfolgte die basolaterale Applikation von 500 μM Histamin für weitere 10 Minuten. Der Neurotransmitter Histamin bewirkte in Epithelzellen eine Stimulierung der zellulären Adenylatzyklase über die Aktivierung des G-Protein gekoppelten H2-Rezeptors. Die Umwandlung von ATP zu cAMP führte zur Aktivierung der CFTR-vermittelten Cl^- -Sekretion (Kunzelmann *et al.*, 1994).

Nach dem erneuten Messen der basalen Potentialdifferenz im *open-circuit*-Modus und der Applikation des Strompulses zur Widerstands-Berechnung wurde die Messung beendet.

Folgende von der ECFS (ECFS-TDN-SOP, V2.7, Oktober 2011) vorgegebenen Qualitätskriterien mussten die Messungen für eine Auswertung erfüllen:

1. Ein Gewebewiderstand (R_i basal) zu Beginn und Ende der Messung von $\geq 10 \Omega/\text{cm}^2$,
2. eine Reaktion des gemessenen Stroms auf mindestens ein Pharmakon sowie
3. ein Stromplateau vor Amilorid-Gabe.

Wurde eines dieser Kriterien nicht erfüllt, so wurde diese Messung nicht in der Auswertung berücksichtigt.

2.6 Datenverarbeitung und Statistik

Die Datenaufzeichnung der nPD sowie der ICM erfolgte digital mit Hilfe des Computerprogramms LabChart (Version 7.3.4, ADInstruments).

Für die Auswertung der nPD wurden von 31 Probanden jeweils die Messungen an beiden Nasenlöchern herangezogen. Mit Hilfe dieser Potentialdifferenzen wurde die Höhe des Wiederanstiegs nach Hinzugabe von Cl^- -freier Isoproterenol-Lösung (im Ergebnisteil als Summe des Wiederanstiegs bezeichnet), die Potentialdifferenz nach Applikation der Cl^- -freien Isoproterenol-Lösung und der Wilschanski-Score ausgewertet. Der Wilschanski-Score beschreibt das Verhältnis des Wiederanstiegs durch Cl^- -freie Isoproterenol-Lösung zur Potentialänderung durch Amilorid-Applikation und wird mit dieser Formel errechnet:

$$\text{Wilschanski-Score} = e^{(\text{Cl}^- \text{-freie Isoproterenol-Lsg.} / \text{Amilorid})}$$

Damit berücksichtigt der Wilschanski-Score sowohl den Cl^- -Transport als auch den Na^+ -Transport über die nasale Epithelschicht und stellt somit einen der zuverlässigsten Unterscheidungshilfen zwischen CF und Nicht-CF-Diagnostik dar. Dabei gelten Werte über 0,7 als sehr wahrscheinlich für das Vorliegen einer Mukoviszidose (Wilschanski *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde für die Höhe der Potentialänderung durch die Cl^- -freie Isoproterenol-Lösung sowohl der beste Wert einer Messung des Probanden (*best-of* Wert) als auch der Mittelwert eines Probanden aus den beiden Messungen zur statistischen Auswertung herangezogen.

Für die Auswertung der ICM wurde von 31 Probanden insgesamt 248 Biopsien gemessen, von denen aber lediglich 189 auswertbar waren. Zu den Auswertungskriterien gehörte:

1. Der Gewebewiderstand (R_{t_basal}) zu Beginn und Ende der Messung von $\geq 10 \Omega/\text{cm}^2$ und
2. eine Veränderung der Stromkurve auf mindestens ein Pharmakon sowie ein Strom-Plateau vor Amilorid-Applikation.

Für die statistische Auswertung der ICM wurden die Änderungen im I_{SC} durch Applikation von Amilorid, Forskolin/IBMX, Genistein, Carbachol und Histamin ermittelt. Aufgrund der unterschiedlichen Biopsiegrößen (Slidergröße 1,2 bzw. 1,5 mm), erfolgte die Vereinheitlichung der Messgröße auf $\mu\text{A}/\text{cm}^2$.

Die Messdaten der nPD und ICM wurden zusammen mit den Ergebnissen aus der Iontophorese zur statistischen Auswertung manuell in eine SPSS-Datenbank eingegeben. Die vollständige statistische Auswertung erfolgte im Anschluss mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 21; IBM; Armonk, USA).

Für die Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit dient die deskriptive Statistik. Die Ergebnisse werden in absoluten und prozentualen Werten abgebildet. Hierbei gibt n den Stichprobenumfang an. Die Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests auf

Normalverteilung überprüft und als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Bei nicht-normalverteilten Variablen wurde der Medianwert mit der 25% und 75% Perzentile angegeben. Für den statistischen Vergleich von Messdaten innerhalb einer Messung wurde der gepaarte Students t-Test durchgeführt. Die Messdaten verschiedener Gruppen wurden in Abhängigkeit einer Normalverteilung mit dem ungepaarten t-Test und bei nicht normalverteilten, ungepaarten Variablen dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von unter 5% ($p \leq 0,05$) und wurde in den Abbildungen mit "*" gekennzeichnet. Bei p-Werten mit $p \leq 0,01$ wurde die Kennzeichnung "***" gewählt.

Zusätzlich erfolgte eine Überprüfung des Zusammenhangs zweier Variablen mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Spearman (Spearman's Rho). Bei Werten von +1 und -1 besteht ein vollständiger positiver bzw. negativer Zusammenhang. Ein Korrelationskoeffizient von 0 zeigt keinen Zusammenhang der Variablen.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die bereits im Material und Methodenteil beschriebenen verschiedenen elektrophysiologischen Messmethoden (Schweißtest, nasale Potentialdifferenzmessung (nPD), intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM)) standardisiert durchgeführt und auf ihre Eignung als Diagnoseverfahren bei Verdacht auf Mukoviszidose überprüft. Dabei erfolgte bei jeder Methode die Überprüfung verschiedener Parameter und deren Grenzwerte auf Spezifität und Sensitivität. Die Ergebnisse der einzelnen Messmethoden wurden anschließend miteinander auf ihre Korrelation hin überprüft.

3.1 Die Konzentration des Schweißchlorids als Trennung zwischen CF-Gruppe und Kontrollgruppe

In den einzelnen Untersuchungsgruppen waren die Schweißchloridwerte normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test: Kontrollgruppe: $p = 0,200$; CF-Gesamt: $p = 0,200$; CF-PI: $p = 0,193$; CF-PS: $p = 0,200$).

Die Chloridkonzentration im Schweißtest der Kontrollgruppe betrug im Mittel 19 ± 8 mmol/l. In der Literatur gelten Werte unter 30 mmol/l im Schweiß als physiologisch und machen daher eine CF-Erkrankung unwahrscheinlich (De Boeck *et al.*, 2006). Zwei Probanden innerhalb der Kontrollgruppe wiesen eine Schweißchloridkonzentration über 30 mmol/l (Proband 3: 36 mmol/l; Proband 8: 31 mmol/l) auf und lagen im Graubereich (Naehrlich, 2007). Nach den Leitlinien des *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) gilt eine Chloridkonzentration über 60 mmol/l als diagnostischer Marker für eine CF-Erkrankung (LeGrys *et al.*, 2009). Bei allen an Mukoviszidose erkrankten Probanden innerhalb dieser Untersuchung lagen die Werte des Schweißtests mit 102 ± 17 mmol/l deutlich über den Grenzwert von 60 mmol/l. Dies galt sowohl für die pankreassuffiziente als auch für die pankreasinsuffiziente CF-Gruppe. Demnach wurde ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) des Mittelwerts der Kontrollgruppe (19 ± 8 mmol/l) zu dem der gesamten CF-Gruppe festgestellt. Darüber hinaus kam es zu keiner Überschneidung der Teilnehmer aus der Kontrollgruppe mit den beiden CF-Gruppe (Abb. 7). Zwischen der pankreassuffizienten (86 ± 14 mmol/l) und der pankreasinsuffizienten CF-Gruppe (110 ± 13 mmol/l) gab es ebenfalls einen signifikanten Unterschied der Schweißchloridkonzentrationen ($p < 0,01$). Trotz der Signifikanz zeigten sich Überlappungen einzelner Teilnehmer beider Gruppen.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse des Schweißtests, dass kein Proband der

Kontrollgruppe falsch positiv und kein Proband der CF-Gruppe falsch negativ gemessen wurden.

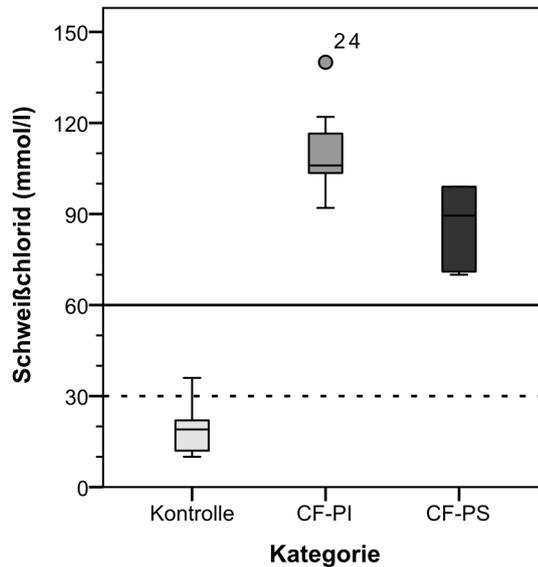


Abb. 7: Der Schweißtest zeigte eine deutliche Trennung zwischen den gesunden Probanden und den beiden Mukoviszidose-Gruppen.

Jede Box umfasste die Messwerte einschließlich der 25. - 75. Perzentile einer Gruppe. Die durchgezogene Linie innerhalb einer Box symbolisierte dabei den Median. Ausreißer (Werte die außerhalb der Whisker (+/-1,5 IQR)) wurden als Punkte im Diagramm dargestellt. Der Median der Kontrollgruppe lag im Normbereich (unter 30 mmol/l Schweißchloridkonzentration). Lediglich zwei Probanden der Kontrollgruppe befanden sich mit ihrer Schweißchloridkonzentration im Graubereich (zwischen 30 und 60 mmol/l). Die Werte beider CF-Gruppen, pankreasinsuffizient (CF-PI) und pankreassuffizient (CF-PS), lagen oberhalb des pathologischen Schwellenwerts von 60 mmol/l.

3.2 Messergebnisse der nasalen Potentialdifferenz

In den einzelnen Untersuchungsgruppen waren alle Werte normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test $p \geq 0,200$). Lediglich die Werte für die basale Potentialdifferenz der Kontrollgruppe wies keine Normalverteilung auf (Kolmogorov-Smirnov-Test $p = 0,038$).

Die basale Potentialdifferenz der Kontrollgruppe betrug $-13,16 \pm 7,29$ mV. Bei beiden CF-Patientengruppen, pankreasinsuffizient (CF-PI: $-28,22 \pm 8,04$ mV) und pankreassuffizient (CF-PS: $-35,15 \pm 16,27$ mV) war die basale Potentialdifferenz im Vergleich zum Ausgangspotential negativer und unterschied sich signifikant zur Kontrollgruppe ($p < 0,01$). Eine Unterscheidung der CF-Probanden in pankreasinsuffizient und pankreassuffizient war anhand der basale Potentialdifferenz nicht möglich ($p = 0,36$). Die Perfusion mit Amilorid verursachte bei allen drei Patientengruppen einen Spannungsabfall (Abb. 8). Dabei kam es in der Gruppe der gesunden Probanden im Mittel zu einem Abfall um $-3,38 \pm 3,95$ mV, in der CF-PI-Gruppe um $-7,89 \pm 4,47$ mV und in der CF-PS-Gruppe um

-11,98 ± 5,76 mV. Darauf erfolgte die Umstellung auf die Cl⁻-freien und anschließend auf die Isoproterenollösung. In Anwesenheit beider Lösungen kam es zu einer Negativierung des nasalen Potentials innerhalb der Kontrollgruppe (Abb. 8A). In der Gruppe der Mukoviszidosepatienten blieb diese Potentialänderung allerdings aus (Abb. 8B+C). Für die Auswertung der Ergebnisse der nPD wurde der Wiederanstieg nach der Perfusion der Cl⁻-freien Lösung und Isoproterenollösung errechnet und im Folgenden als Summe des Wiederanstiegs bezeichnet. Dabei wurde zwischen dem *best-of*-Wert (bester Messwert eines Probanden) und dem Mittelwert beider Messungen eines Probanden unterschieden. In der Kontrollgruppe lag der Mittelwert der Summe des Wiederanstiegs bei -12,61 ± 9,18 mV. Im Gegensatz dazu waren die Werte des Wiederanstiegs bei den Mukoviszidose-Erkrankten deutlich geringer (pankreasinsuffizienten CF-Patienten: 4,63 ± 3,89 mV und pankreassuffizienten CF-Patientengruppe: 1,46 ± 4,08 mV). Die statistische Auswertung der Summe für den Wiederanstieg zeigte einen signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zwischen der Kontrollgruppe und den beiden CF-Gruppen. Der *best-of*-Wert des Wiederanstiegs lag in der Kontrollgruppe bei -16,85 ± 11,55 mV, in der CF-PI-Gruppe bei 2,72 ± 4,31 mV und in der CF-PS-Gruppe bei -2,92 ± 8,23 mV. Auch hierbei unterscheiden sich die Werte der Kontrollgruppe und der CF-positiven Gruppe signifikant voneinander ($p < 0,01$). Darüber hinaus wurde für die drei Untersuchungsgruppen der Wilschanski-Score errechnet. Zusätzlich zur reinen CFTR-Antwort berücksichtigte der Wilschanski-Score auch die Spannungsänderungen während der Amiloridperfusion und stellt somit ein zusätzliches Auswertkriterium für die nPD-Messungen dar (Wilschanski *et al.*, 2001). Auch in dieser Auswertung zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen CF-positiver und CF-negativer Gruppe ($p < 0,01$), jedoch keine innerhalb der CF-Gruppen ($p = 0,1$). Abschließend erfolgt die Perfusion der ATP-Lösung. Hierbei wurde eine weitere Negativierung des Potentials in allen drei Untersuchungsgruppen beobachtet. Die Werte aller drei Gruppen wurden in Tab. 6 zusammengefasst.

Tab. 6: Zusammenfassung der nPD-Ergebnisse.

	basale Potential- differenz (mV)	Iso + Cl⁻-freie Lösung <i>best-of</i>-Wert (mV)	Iso + Cl⁻-freie Lösung Mittelwert (mV)	Wilschanski -Score
Kontrolle	-13,16 ± 7,29	-16,85 ± 11,55	-12,61 ± 9,18	0,38 ± 0,28
CF-PI	-28,22 ± 8,04	2,72 ± 4,31	4,63 ± 3,89	1,35 ± 0,34
CF-PS	-35,15 ± 16,27	-2,92 ± 8,23	1,46 ± 4,08	1,1 ± 0,26

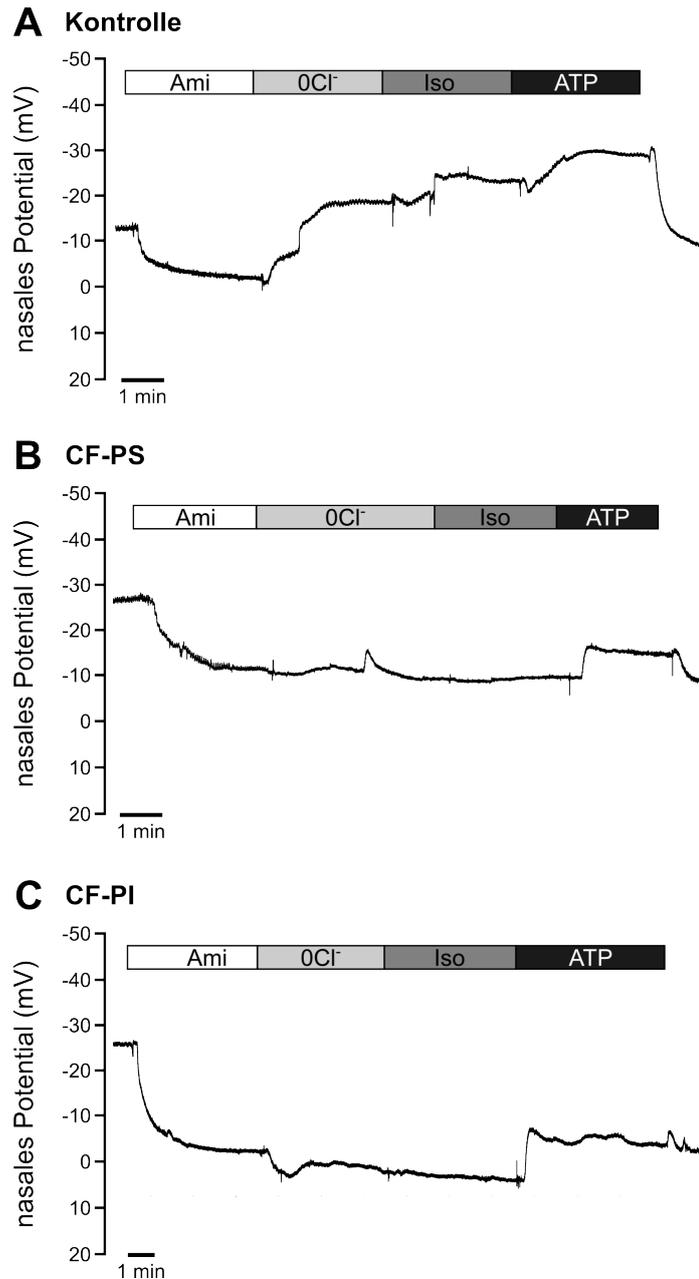


Abb. 8: Exemplarischer Kurvenverlauf der durchgeführten nPD-Messungen.

A Abbildung A zeigte den Kurvenverlauf der Spannungsänderung während einer nPD eines gesunden Probanden. Nach Gabe des Pharmakons Amilorid kam es zu einem Absinken der Spannungskurve, welches definitionsgemäß einem Spannungsanstieg entspricht. Durch die darauffolgende Perfusion einer Cl⁻-freien und anschließend einer Isoproterenollösung folgte ein Anstieg der Kurve und somit ein Spannungsabfall. Während der abschließenden ATP-Perfusion erfolgte ein erneuter Kurvenanstieg. **B** Die nPD eines pankreassuffizienten CF-Patienten. Anhand der Spannungskurve war ein Kurvenabfall (Spannungsanstieg) nach der Amiloridperfusion zu beobachten. Die Perfusion mit der Cl⁻-freien und der Isoproterenollösung zeigte keine Änderungen des nasalen Potentials. Die Applikation von ATP führte zu einem Spannungsabfall. **C** Bei dem pankreasinsuffizienten CF-Patienten war ebenfalls ein Spannungsanstieg in Folge der Perfusion mit Amilorid und Cl⁻-freier Lösung zu beobachten. Zudem blieb der Kurvenanstieg (Spannungsabfall) nach Perfusion mit Isoproterenol aus. ATP führte zu einem Abfall des nasalen Potentials.

Zurzeit sind noch keine definitiven Auswertparameter für die nPD formuliert. Auch die Wahl zwischen dem jeweiligen besten Messwert der Summe des Wiederanstiegs eines Probanden gegenüber der Bildung des Mittelwertes aus den beiden Messungen für eine Mukoviszidose-Diagnose ist in der Literatur umstritten (Naehrlich *et al.*, 2014). Anhand einer Vergleichsgrafik (Abb. 9), die sowohl den *best-of*-Wert als auch den Mittelwert der Summe des Wiederanstiegs beinhaltet, sollte die Trennung der einzelnen Versuchsgruppen in „gesund“ und „pathologisch“ erfolgen. Der Schwellenwert für eine Mukoviszidose-Diagnose wurde hierbei auf -7,7 mV festgelegt (Ooi *et al.*, 2012). In der Kontrollgruppe lagen vier Probanden mit dem *best-of*-Wert des Wiederanstiegs über dem Grenzwert und damit im pathologischen Bereich. Die selben vier Probanden lagen auch in der Betrachtung des Mittelwertes im pathologischen Bereich. Zusätzlich dazu fanden sich jedoch drei Probanden der Kontrollgruppe mit ihrem Mittelwert der Summe des Wiederanstiegs im Graubereich zwischen -12 mV und -7,7 mV. Die übrigen Probanden der Kontrollgruppe hatten *best-of*-Werte und Mittelwerte, die durchweg unter der Verdachtsschwelle von -12 mV lagen.

In der Gruppe der pankreasinsuffizienten CF-Patienten ergab die Wahl des Wertes keinen Unterschied. Alle Probanden dieser Gruppe lagen jeweils mit dem *best-of*-Wert und dem Mittelwert im pathologischen Bereich. Im Kollektiv der pankreassuffizienten CF-Patienten lagen alle Probanden mit dem Mittelwert im pathologischen Bereich. Betrachtet man hingegen die *best-of*-Werte dieser Gruppe, so liegt lediglich ein Teilnehmer (*best-of*-Wert: -11,17 mV) im Graubereich. Darüber hinaus wurde ein weiterer Proband mit einem *best-of*-Wert von -14,55 mV dem Normalbereich zugeordnet. Somit wurden mit dem Auswertekriterium des *best-of*-Wertes zwei Probanden falsch negativ gemessen.

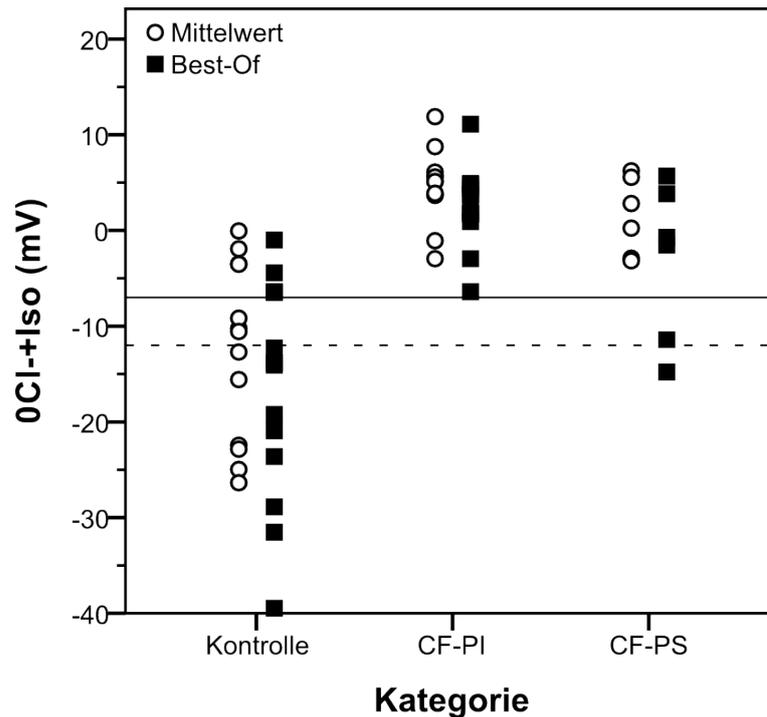


Abb. 9: Vergleich der Mittelwerte und der *best-of*-Werte der Spannungsänderung durch Cl^- -freie und Isoproterenol-Lösung zur Diagnosestellung der Mukoviszidose.

Sowohl bei den Mittelwerten (weißer Kreis) als auch bei den *best-of*-Werten (schwarzes Quadrat) zeigten vier Probanden der Kontrollgruppe Werte im pathologischen Bereich ($> -7,7$ mV). Bei zwei Probanden der pakreassuffizienten CF-Gruppe (CF-PS) lagen die *best-of*-Werte im Graubereich (Bereich zw. durchgezogener und gestrichelter Linie) bzw. nicht pathologischen Normalbereich. Anhand dieser Grafik ließ sich erkennen, dass die *best-of*-Werte in allen drei Probandengruppen, aber besonders bei den Kontrollen, eine größere Streuung aufwiesen.

Für die Auswertung der Ergebnisse der nPD-Messung wurde neben der Unterscheidung in *best-of*-Wert und Mittelwert ebenso der Wilschanski-Score errechnet. Für den Wilschanski-Score wurde sowohl der Spannungsunterschied durch die Cl^- -freie und Isoproterenol-haltige Lösung als auch die Effekt von Amilorid betrachtet. Demzufolge wurde sowohl der Cl^- - als auch der Na^+ -Transport in die Berechnung mit einbezogen. Der Wilschanski-Score von zwei Probanden der Kontrollgruppe überschritt einen Wert von 0,7 und lag somit im pathologischen Bereich (Abb. 10). Bei beiden CF-Gruppen lag der Wilschanski-Score aller Teilnehmer im pathologischen Bereich.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass anhand des Wilschanski-Scores zwei gesunde Probanden als CF-positiv eingestuft wurden.

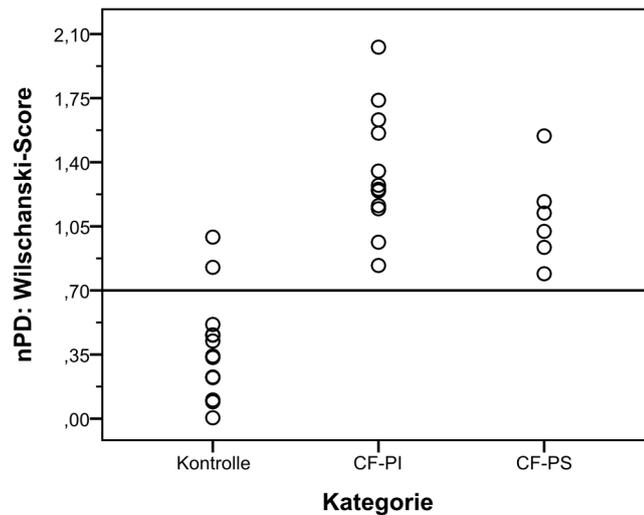


Abb. 10: Der Wilschanski-Score zeigte in dieser Studie eine gute Trennung zwischen gesunden und CF-erkrankten Probanden.

Zwei Probanden der Kontrollgruppe lagen außerhalb des Normalbereichs ($< 0,7$) und wurden somit falsch positiv gemessen. Alle Probanden der pankreassuffizienten (CF-PS) und pankreasinsuffizienten Gruppe (CF-PI) lagen mit ihrem Wilschanski-Score im pathologischen Bereich.

3.3 Messergebnisse der intestinalen Kurzschlussstrommessung

Bei der ICM wurde an insgesamt 248 Rektumbiopsien der 31 Probanden nach dem oben beschriebenen Protokoll (siehe Material und Methoden 2.4) der Europäischen Gesellschaft für Zystische Fibrose (ECFS) Untersuchungen durchgeführt. Von allen gemessenen Biopsien erfüllten insgesamt 189 Biopsien, die im Abschnitt 2.4 unter Versuchsdurchführung beschriebenen Auswertkriterien. Der Mittelwert der ausgewerteten Biopsien lag somit bei 6 ± 2 Biopsien (Minimum 4) pro Proband.

In den einzelnen Untersuchungsgruppen waren alle Werte normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test $p \geq 0,200$). Lediglich die Werte des Gewebewiderstands des gesamten CF-Kollektivs (Kolmogorov-Smirnov-Test $p = 0,021$), der pankreasinsuffizienten Gruppe (Kolmogorov-Smirnov-Test $p = 0,013$) sowie der Histamin-vermittelte Stromanstieg der gesamten CF-Gruppe (Kolmogorov-Smirnov-Test $p = 0,000$) und der pankreasinsuffizienten Gruppe (Kolmogorov-Smirnov-Test $p = 0,000$) wiesen keine Normalverteilung auf.

Der Gewebewiderstand ist ein Maß für die Integrität von Epithelien und diente auch in dieser Studie zur Überprüfung der Intaktheit der untersuchten Biopsien. Im Mittel lag der Widerstand der Gewebeproben in der Kontrollgruppe bei $31,83 \pm 7,51 \Omega/\text{cm}^2$ und in der CF-Gruppe bei $33,15 \pm 8,14 \Omega/\text{cm}^2$. Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p = 0,64$).

Nach der durchgeführten Gewebewiderstandsmessung erfolgte zur Funktionsprüfung des Epithels die basolaterale Applikation von 100 μM Carbachol. Hierbei zeigte sich in der Kontrollgruppe im Mittel ein Stromanstieg ($24,86 \pm 25,79 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) während es in beiden CF-positiven Gruppen zu einem Stromabfall kam ($-9,95 \pm 11,85 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Insgesamt unterschieden sich die Messwerte der Kontrollgruppe im Vergleich zu der CF-positiven Gruppe signifikant ($p < 0,01$). Innerhalb beider CF-Gruppen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied der Stromwerte ($p = 0,16$). Bei der Kontrollgruppe führte die Applikation des Na^+ -Kanalblockers Amilorid zu einem Stromabfall von $-1,22 \pm 3,19 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abb. 11A). Bei den Probanden der beiden CF-Gruppen (pankreassuffizient und pankreasinsuffizient) fiel der Amilorid-vermittelte Stromabfall nahezu identisch aus ($-1,88 \pm 2,72 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, Abb. 11B+C) und unterschied sich nicht signifikant zur Kontrollgruppe ($p = 0,56$).

Nachfolgend wurde durch die Gabe von Forskolin und IBMX der CFTR in den Rektumbiopsien aktiviert. Dadurch erhöhte sich der gemessene Kurzschlussstrom in der Kontroll- ($26,24 \pm 15,59 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) und der CF-Gruppe ($3,06 \pm 6,14 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Auffällig war jedoch, dass der Stromanstieg abhängig von der Untersuchungsgruppe unterschiedlich stark ausgeprägt war. Nach statistischer Analyse wurde ein signifikanter Unterschied des Forskolin/IBMX-vermittelten Stromanstiegs zwischen der Kontrollgruppe und der CF-Gruppe festgestellt ($p < 0,01$). Es bestand allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen der pankreassuffizienten und pankreasinsuffizienten CF-Gruppe ($p = 0,75$).

Die basolaterale Applikation von Genistein, ein weiterer CFTR-Aktivator (Mall *et al.*, 2000), bewirkte in der Kontrollgruppe einen Stromanstieg von $1,01 \pm 2,47 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Betrachtete man das Gesamtkollektiv der CF-Probanden führte Genistein zu einer Stromänderung von $-0,97 \pm 1,28 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und dieser Effekt war signifikant verschieden im Vergleich zu Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Ein Blick auf den Genistein-vermittelten Effekt der pankreassuffizienten ($0,03 \pm 0,77 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) und pankreasinsuffizienten CF-Gruppe ($-1,47 \pm 1,21 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) führte zu einer statistischen Signifikanz ($p < 0,05$).

Die anschließende Gabe von Carbachol resultierte bei der Kontrollgruppe in einem Stromanstieg ($27,70 \pm 12,04 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) und bei der Gesamt-CF-Gruppe zu einem leichten Stromabfall ($-1,88 \pm 3,45 \mu\text{A}/\text{cm}^2$).

Die Applikation von DIDS, ein Blocker des basolateralen Anionenaustauschers 2, führte zu keiner Änderung des I_{SC} bei allen drei Untersuchungsgruppen (Abb. 11).

Nachfolgend wurde Histamin zur basolateralen Seite der Biopsien hinzugegeben und dies resultierte bei der Kontrollgruppe in einer signifikant größeren Stromstimulation ($23,86 \pm 12,66 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) im Vergleich zu der CF-Gruppe ($0,38 \pm 3,20 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; $p < 0,01$). Anhand der Stromkurven (Abb. 11) und der Effekte, welche die applizierten Pharmaka

bewirkten, lies sich bereits eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen vornehmen.

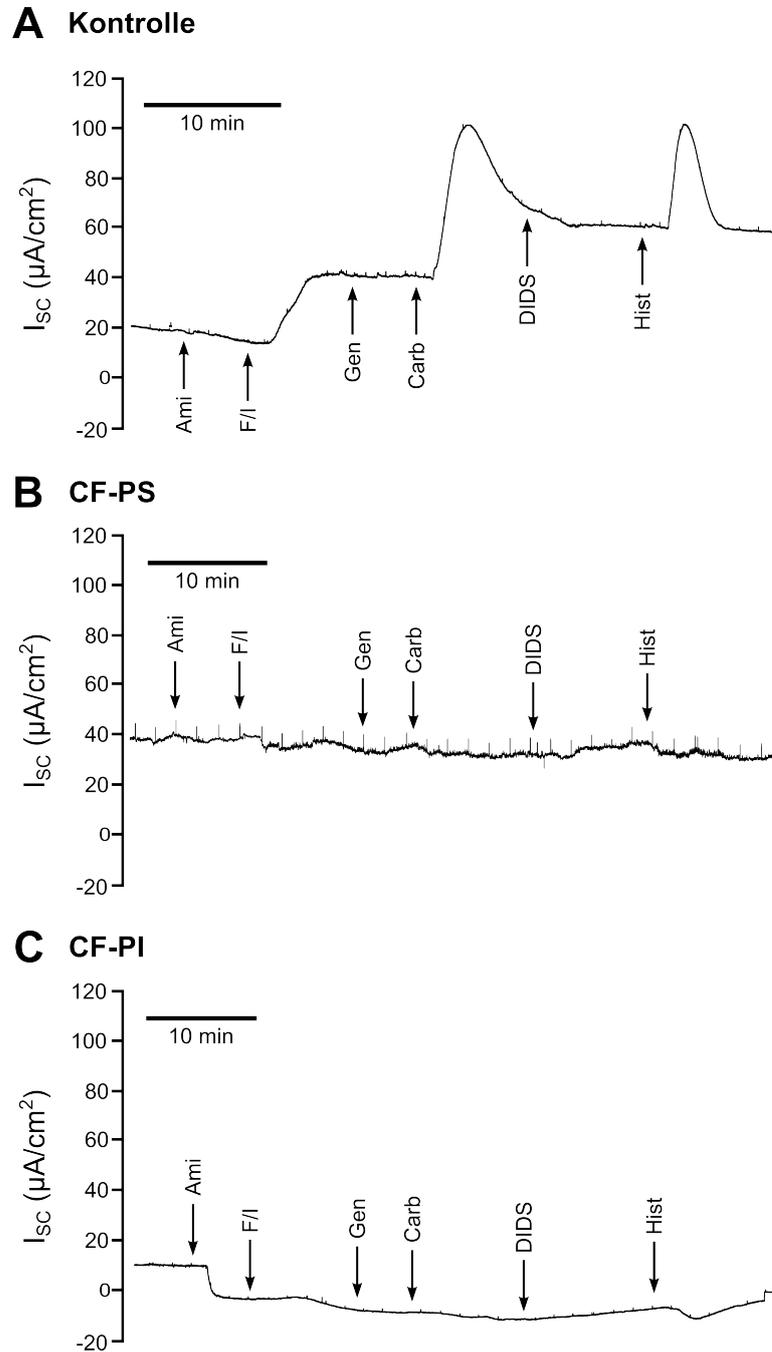


Abb. 11: Exemplarischer Kurvenverlauf der durchgeführten intestinalen Kurzschlussstrommessung der Rektumbiopsie.

A Die Stromkurve eines Patienten der Kontrollgruppe zeigt nach Applikation von Forskolin/IBMX (F/I), Carbachol (Carb) und Histamin (Hist) einen stufenförmigen Anstieg des gemessenen Kurzschlussstroms (I_{sc}). **B** Eine exemplarische Messkurve eines pankreassuffizienten CF-Patienten (CF-PS) zeigte hingegen einen flachen Kurvenverlauf mit lediglich moderater Stromerhöhung in Folge der Applikation der Pharmaka. Im Vergleich zur Kontrollgruppe fehlte der stufenförmige Stromanstieg. **C** In der pankreasinsuffizienten CF-Gruppe zeigt die exemplarische Kurve einen Abfall nach Applikation von Amilorid (Ami). Ähnlich der Messkurve eines pankreassuffizienten CF-Patienten (CF-PS) bleibt auch hier im Vergleich zur Kontrollgruppe ein stufenförmiger Stromanstieg nach Applikation der Pharmaka aus.

Tab. 7: Zusammenfassung der ICM-Ergebnisse.

	Kontrollen n = 13	CF-alle n = 18	CF-PI n = 12	CF-PS n = 6
R _T basal	31,83 ± 7,51	33,15 ± 8,14	35,72 ± 8,71	28,00 ± 3,25
ΔI _{SC_Amilorid}	-1,22 ± 3,19	-1,88 ± 2,72	-2,01 ± 3,24	-1,62 ± 1,41
ΔI _{SC_Forskolin/IBMX}	26,24 ± 15,59	3,06 ± 6,14	2,65 ± 5,06	3,87 ± 8,40
ΔI _{SC_Genistein}	1,01 ± 2,47	-0,97 ± 1,28	-1,47 ± 1,21	0,03 ± 0,77
ΔI _{SC_Carbachol}	27,70 ± 12,04	-1,88 ± 3,45	-2,87 ± 3,02	0,10 ± 3,64
ΔI _{SC_Histamin}	23,86 ± 12,66	0,38 ± 3,20	-0,06 ± 2,93	1,24 ± 3,83
ΔI _{SC_Forskolin/IBMX+ Carbachol+Histamin}	77,78 ± 34,75	1,57 ± 9,22	-0,28 ± 8,15	5,28 ± 10,87

In der Literatur wurde von der Arbeitsgruppe Derichs ein Auswertekriterium formuliert, welches die Gesamtstromänderung durch Forskolin/IBMX, Carbachol und Histamin umfasste (Derichs *et al.*, 2010). Mit Hilfe dieses Wertes wurde in deren Studie die beste Unterscheidung zwischen der Kontroll- und den beiden CF-Gruppen (CF-PI und CF-PS) getroffen und ein *cut-off*-Wert von 34 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ wurde demzufolge als besonders geeignet formuliert. Daher wurde auch in dieser Arbeit der Effekt von Forskolin/IBMX, Carbachol und Histamin errechnet (Abb. 12). Die Summe der Stromänderung lag in der Kontrollgruppe bei $77,78 \pm 34,75 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und damit signifikant höher ($p < 0,01$) als die Summe beider CF-Gruppen ($1,57 \pm 9,22 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Ein signifikanter Unterschied zwischen der pankreasinsuffizienten ($-0,28 \pm 8,15 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) und pankreassuffizienten CF-Gruppe ($5,28 \pm 10,87 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) wurde nicht festgestellt ($p = 0,3$). Der von Derichs *et al.* festgelegte *cut-off*-Wert von 34 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ zur Diagnostentrennung „gesund“ und „CF-positiv“ zeigte auch in dieser Studie eine 100%ige Trennung des Untersuchungskollektivs: alle Probanden der Kontrollgruppe lagen demzufolge mit ihrem Werten im Normalbereich ($> 34 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) und alle CF-Patienten im pathologischen Bereich ($< 34 \mu\text{A}/\text{cm}^2$).

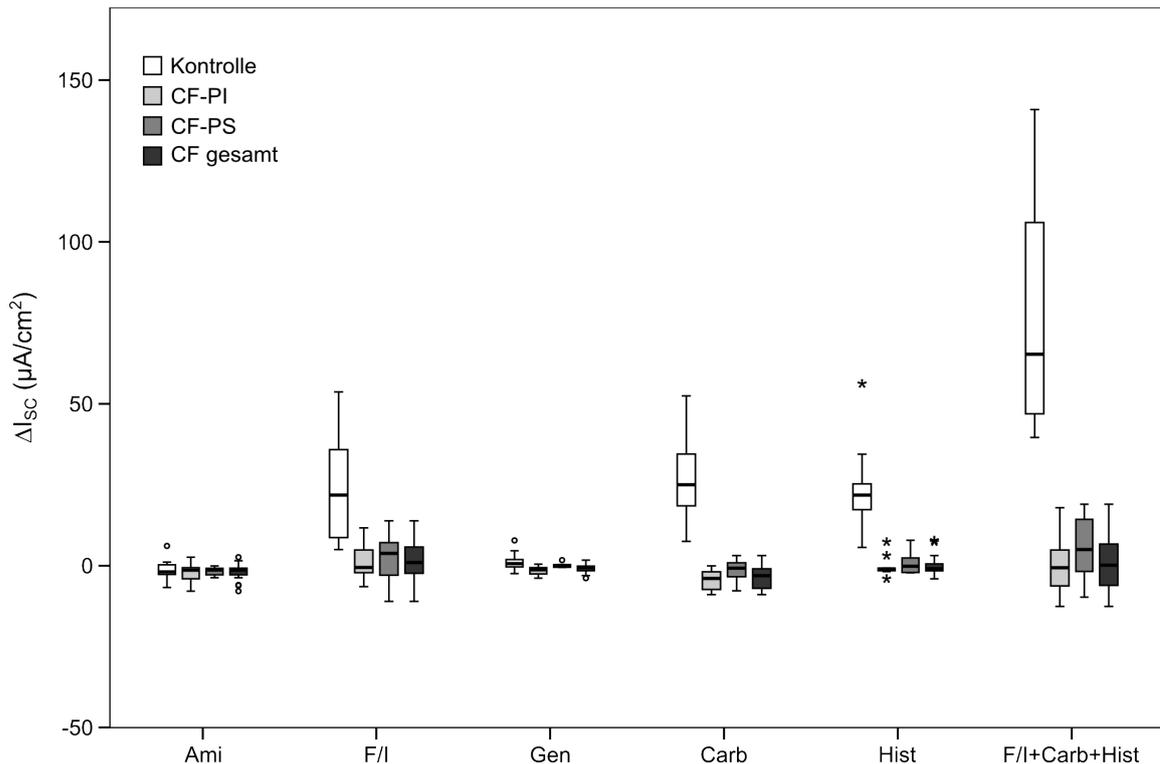


Abb. 12: Zusammenfassende Darstellung der Pharmaka-vermittelten Stromänderungen der intestinalen Kurzschlussstrommessungen.

Darstellung der Pharmaka-Effekte der Kontrollgruppe (weiß), der pankreasinsuffizienten CF-Gruppe (CF-PI, hellgrau), der pankreasuffizienten CF-Gruppe (CF-PS, dunkelgrau) und des gesamten CF-Kollektivs (CF gesamt, schwarz). Die zuverlässigste Trennung der Mukoviszidose-Diagnose wurde mit Carbachol (Carb) und der Summe aus Forskolin/IBMX (F/I), Carbachol und Histamin (Hist) erreicht. Eine Box umfasste dabei 50% der Messwerte einer Gruppe. Während die Länge der Box dem ersten Interquartilitätsabstand (IQR) entsprach, symbolisierte die durchgezogene Linie innerhalb einer Box den Median. Werte die außerhalb der Whisker ($\pm 1,5 \cdot \text{IQR}$) aber innerhalb des 3. IQR wurden als Punkte im Diagramm dargestellt. Werte oberhalb und unterhalb des 3. IQRs wurden als Sterne symbolisiert.

3.4 Korrelation der verwendeten Diagnosemethoden

Die Aussagekraft der vorgestellten Ergebnisse bei der Trennung zwischen den gesunden und den CF-erkrankten Probanden variierte zwischen den einzelnen in der vorliegenden Dissertation verwendeten Messmethoden. Im folgenden Abschnitt wurden die Ergebnisse der verschiedenen Messmethoden miteinander auf ihre Sensitivität und Spezifität für eine Mukoviszidose-Diagnose verglichen.

3.4.1 Schweißtest und nasale Potentialdifferenzmessung

Für den Vergleich der Ergebnisse des Schweißtests und der nPD-Messung wurden unterschiedliche Messwerte in einem Korrelationsdiagramm aufgetragen. Da noch keine einheitliche Festlegung der Auswertestrategie in den verschiedenen Mukoviszidose-Zentren

existieren, wurden mehrere Messwerte für die Korrelationsanalyse herangezogen. Dabei wurden die drei bereits beschriebenen Auswertkriterien der nPD (Mittelwert der Summe des Wiederanstiegs durch Cl⁻-freie und Isoproterenol-Lösung, *best-of*-Werte der Summe des Wiederanstiegs und Mittelwert des Wilschanski-Score) verwendet. Bei dem Schweißtest wurde lediglich ein Parameter, die Schweißchloridkonzentration, ermittelt, der im Folgenden als fester Bezugspunkt in den Korrelationsdiagrammen diente (Abb. 13).

Bei allen drei Korrelationsdiagrammen fiel eine unterschiedliche Streuung der Messergebnisse auf. Besonders bei der pankreassuffizienten und pankreasinsuffizienten CF-Gruppe wurde eine große Streuung aller drei nPD-Kriterien beobachtet. Dennoch zeigten diese Diagramme eine deutliche Trennung zwischen der Kontrollgruppe und den beiden CF-Gruppen. Der Mittelwert der Summe des Wiederanstiegs durch Cl⁻-freie und Isoproterenol-Lösung zeigte mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,78 einen großen Zusammenhang mit der Schweißchloridkonzentration (Abb. 13A). Bei dem *best-of*-Werten der Summe des Wiederanstiegs innerhalb der Kontrollgruppe und dem CF-positiven Kollektiv fiel eine geringere Korrelation zwischen den Parametern der nPD und des Schweißtests auf (Korrelationskoeffizient: 0,67; Abb. 13B). Mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,82 zeigte der Vergleich zwischen dem Wilschanski-Score und dem Schweißchloridkonzentration die größte Korrelation der Ergebnisse aus nPD und Schweißtest (Abb. 13C). Zusammenfassend zeigte demzufolge die Korrelation Wilschanski-Score und Schweißchloridkonzentration die bessere Trennung zwischen den gesunden und den CF-erkrankten Probanden. Darüber hinaus fiel bei allen drei Korrelationsdiagrammen auf, dass hohe und damit pathologische Schweißchloridwerte mit höheren Werten der nPD-Messung einhergingen.

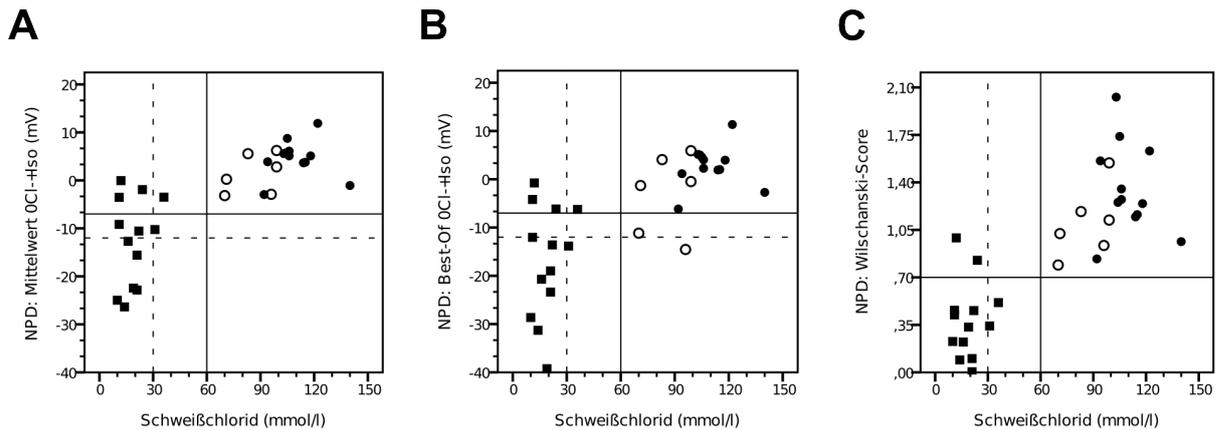


Abb. 13: Korrelation der nPD-Messungen (Mittelwert und *best-of*-Wert der Summe des Wiederanstiegs Cl^- -freie und Isoproterenol-Lösung) mit der Schweißchloridkonzentration.

Die Korrelation der Schweißchloridkonzentration mit den Mittelwerten der Summe des Wiederanstiegs der nPD (**A**) zeigte eine eindeutigere Trennung zwischen der Kontrollgruppe (schwarze Quadrate) und dem CF-Kollektiv (pankreassuffizient: weiße Kreise; pankreasinsuffizient: schwarze Kreise) im Vergleich zur Korrelation mit dem *best-of*-Werten der Summe des Wiederanstiegs (**B**). **C** Die Analyse des Wilschanski-Score mit der Schweißchloridkonzentration zeigte eine eindeutige Korrelation. In den Abbildungen verdeutlichte die vertikale, durchgezogene Linie (60 mmol/l) den pathologischen Schwellenwert des Schweißtest. Werte zwischen der vertikalen, durchgezogenen und gestrichelte Linie (30 mmol/l) lagen im Graubereich. Die horizontalen Linien (durchgezogen bei -8 mV, gestrichelt bei -12 mV) in **A** und **B** zeigten die Grenzwerte des Wiederanstiegs. Die horizontale, durchgezogene Linie bei 0,7 in **C** symbolisierte den Schwellenwert des Wilschanski-Scores.

3.4.2 Schweißtest und intestinale Kurzschlussstrommessung

Aufgrund der aktuell fehlenden Auswertkriterien und eines Standardparameters der ICM, die eine klare Auswertung der Messungen ermöglichen, wurden in dieser Arbeit die folgenden Messwerte für die Korrelationsanalyse mit der Schweißchloridkonzentration herangezogen:

- der Forskolin/IBMX-vermittelte Stromanstieg,
- der Carbachol-vermittelte Effekt,
- die Stromänderung durch die Gabe von Histamin
- sowie die Summe der Stromänderung verursacht durch die Applikation von Forskolin/IBMX, Carbachol und Histamin.

Diese Parameter wurden basierend auf ihrer Signifikanz zwischen der Kontroll- und CF-Gruppe gewählt (siehe Ergebnisse 3.3).

Bei dem Vergleich zwischen ICM und Schweißtest korrelierten hohe Messwerte der ICM mit niedrigen Schweißchloridwerten. Damit entstand ein negativer Korrelationskoeffizient und der Wert -1 symbolisierte hierbei die höchste Korrelation.

Die Korrelationsanalyse des Forskolin/IBMX-vermittelten Stromanstiegs mit der Schweißchloridkonzentration ergab einen Koeffizient von -0,73. Demzufolge gingen hohe und damit pathologische Werte der Schweißchloridkonzentration mit niedrigen

Forskolin/IBMX-Effekten einher (Abb. 14A). Auffallend war, dass eine Trennung in Kontroll- und CF-Gruppe anhand des Forskolin/IBMX-vermittelten Stromanstiegs nicht möglich war. Dies galt ebenso für die Messwerte nach Histamingabe (Abb. 14C). Auch hier gab es zahlreiche Überschneidung der Kontrollgruppe mit dem CF-Kollektiv. Der Korrelationskoeffizient des Vergleichs der Histamin-vermittelten Stromänderung und der Schweißchloridkonzentration betrug $-0,77$. Bei dem Vergleich der Carbachol-Effekte der ICM mit der Schweißchloridkonzentration wurde ein Korrelationskoeffizient von $-0,84$ errechnet, der eine verlässliche Trennung zwischen CF-positiven Probanden und der Kontrollgruppe lieferte (Abb. 14B). Der Koeffizient der Korrelationsanalyse der Schweißchloridkonzentration mit der Summe der Forskolin/IBMX, Carbachol und Histamin-vermittelten Stromanstiege ($-0,82$) ließ ebenso eine aussagekräftige Mukoviszidose-Diagnose zu (Abb. 14D). Dennoch wurde bei der Summe der Stromanstiege ein großer Streuungsbereich innerhalb der Kontrollgruppe sichtbar. Bei der Auswertung der ICM-Ergebnisse ermöglichte die Aufsummierung der Stromanstiege (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) die deutlichste Unterscheidung zwischen dem gesunden Kollektiv und der CF-Gruppe (siehe Ergebnisse 3.3). Bei der Korrelationsanalyse lieferte allerdings der Vergleich des Carbachol-Effekts mit der Schweißchloridkonzentration die beste und verlässlichste Trennung zwischen gesund und CF-erkrankt. Eine Differenzierung in pankreassuffiziente und pankreasinsuffiziente CF-Probanden war jedoch bei allen hier vorgestellten Korrelationsanalysen nicht möglich.

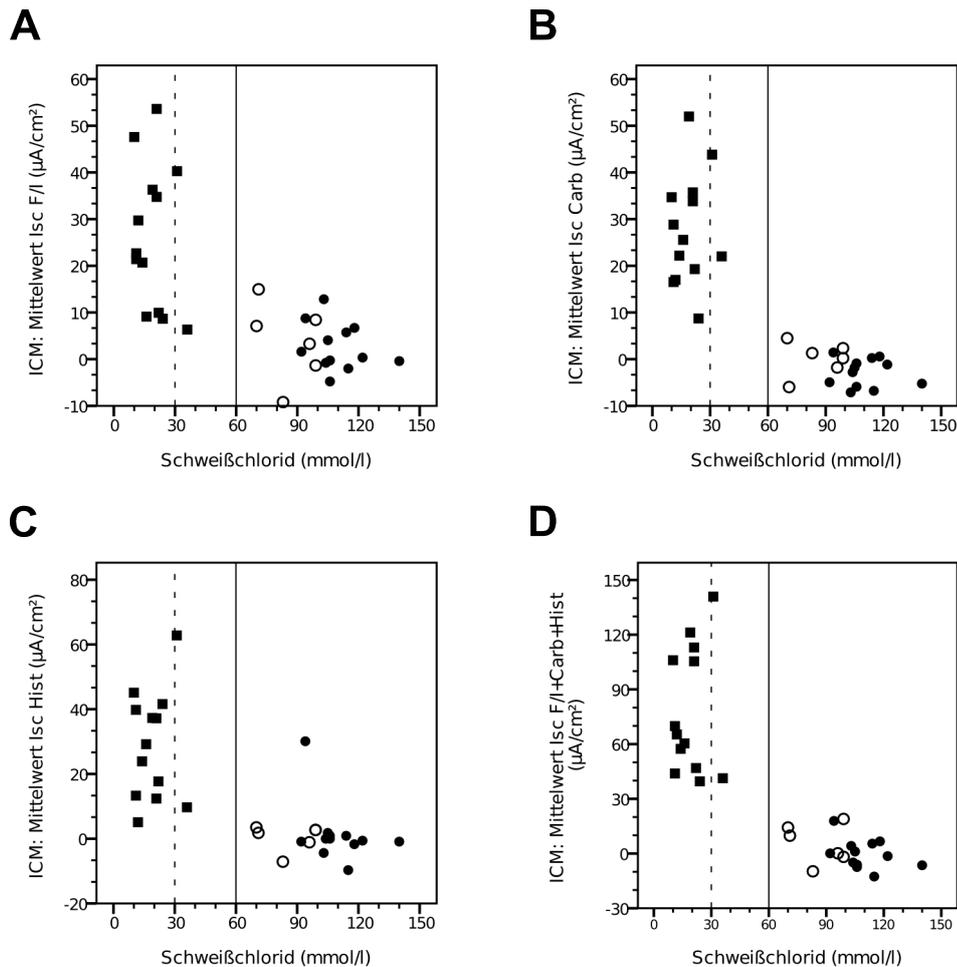


Abb. 14: Korrelation der Schweißchloridkonzentration mit dem Werten der ICM.

In allen Diagrammen zeigt die vertikale, durchgezogene Linie (60 mmol/l) den Grenzwert der Schweißchloridkonzentration. Werte rechts der Linie liegen im pathologischen Bereich. Zwischen der gestrichelten, vertikalen Linie (30 mmol/l) und der durchgezogenen liegt der diagnostische Graubereich. Werte links der gestrichelten Linie liegen im Normalbereich. Aufgrund fehlender definitiven Auswertkriterien in der ICM mit festen Grenzwerten wurden auf horizontale Grenzlinien verzichtet. **A** Die Korrelation des Forskolin und IBMX-vermittelten Stromanstieges (F/I) mit der Schweißchloridkonzentration zeigte keine gute Trennung zwischen der Kontrollgruppe (schwarze Quadrate), den pankreassuffizienten (weiße Kreise) und den pankreasinsuffizienten Probanden (schwarze Kreise). **B** Der Vergleich der Carbacholwerte (Carb) mit der Schweißchloridkonzentration ermöglichte eine verlässliche Trennung zwischen Kontrollgruppe und CF-Gruppe ohne Überschneidungen. **C** Die Korrelation des Histamin (Hist)-vermittelten Effekts mit der Schweißchloridkonzentration führte zu zahlreichen Überschneidungen zwischen CF-positiver- und Kontrollgruppe. **D** Die Korrelation der Summe des Stromanstieg nach F/I+Carb+Hist mit der Schweißchloridkonzentration zeigte bei beiden Parametern eine klare Trennung zwischen gesunden und CF-Probanden.

3.4.3 Nasale Potentialdifferenzmessung und intestinale Kurzschlussstrommessung

Bei der bereits beschriebenen Korrelationsanalyse der nPD zeigten der Mittelwert der Summe des Wiederanstiegs durch Cl^- -freie und Isoproterenollösung sowie der Wilschanski-Score die deutlichste Trennung zwischen gesund und CF-erkrankt. Diese beiden Werte wurden im Folgenden mit den zwei aussagekräftigsten Werten der ICM (Carbachol-Effekt und Summe des Stromanstiegs durch Forskolin/IBMX, Carbachol und Histamin) verglichen. Bei dieser Analyse korrelierten hohe Werte der Stromänderung (ICM) mit niedrigen Spannungswerten (nPD). Diese Analyse führte zu einem negativen Korrelationskoeffizienten. Der Vergleich der Ergebnisse der Carbachol-induzierten Stromänderung mit dem Spannungsanstieg durch Cl^- -freie Isoproterenollösung ergab einen Korrelationskoeffizienten von -0,83 (Abb.15A). Die Korrelation der Carbachol-Werte mit dem Wilschanski-Score (Abb. 15B) führte zu einem Koeffizienten von -0,81 und damit zu einer leicht geringeren Wechselbeziehung beider Werte. Die verminderte Korrelation beruhte auf der großen Streuung des Wilschanski-Scores innerhalb der CF-positiven Gruppen. Die geringste Korrelation zeigte der Vergleich des Wilschanski-Score mit der Summe des Stromanstiegs durch Forskolin/IBMX, Carbachol und Histamin mit einem Korrelationskoeffizienten von -0,77 (Abb. 15D). Dies war zum einen der großen Streuung des Wilschanski-Scores geschuldet, aber zum anderen auch der hohen Streuung innerhalb der Kontrollgruppe der ICM-Werte. Ein größerer Zusammenhang mit einem Koeffizienten von -0,82 bestand zwischen der Summe der Stromänderung und den Mittelwerten des Wiederanstiegs nach Cl^- -freier Isoproterenollösung (Abb. 15C).

Anhand der vier beschriebenen Korrelationsanalysen der Ergebnisse aus den Messungen der nPD und der ICM wurde eine starke Wechselbeziehung zwischen den Mittelwerten der Cl^- -freien Isoproterenollösung-vermittelten Spannungsänderung und den Carbachol-induzierten Stromanstieg ermittelt.

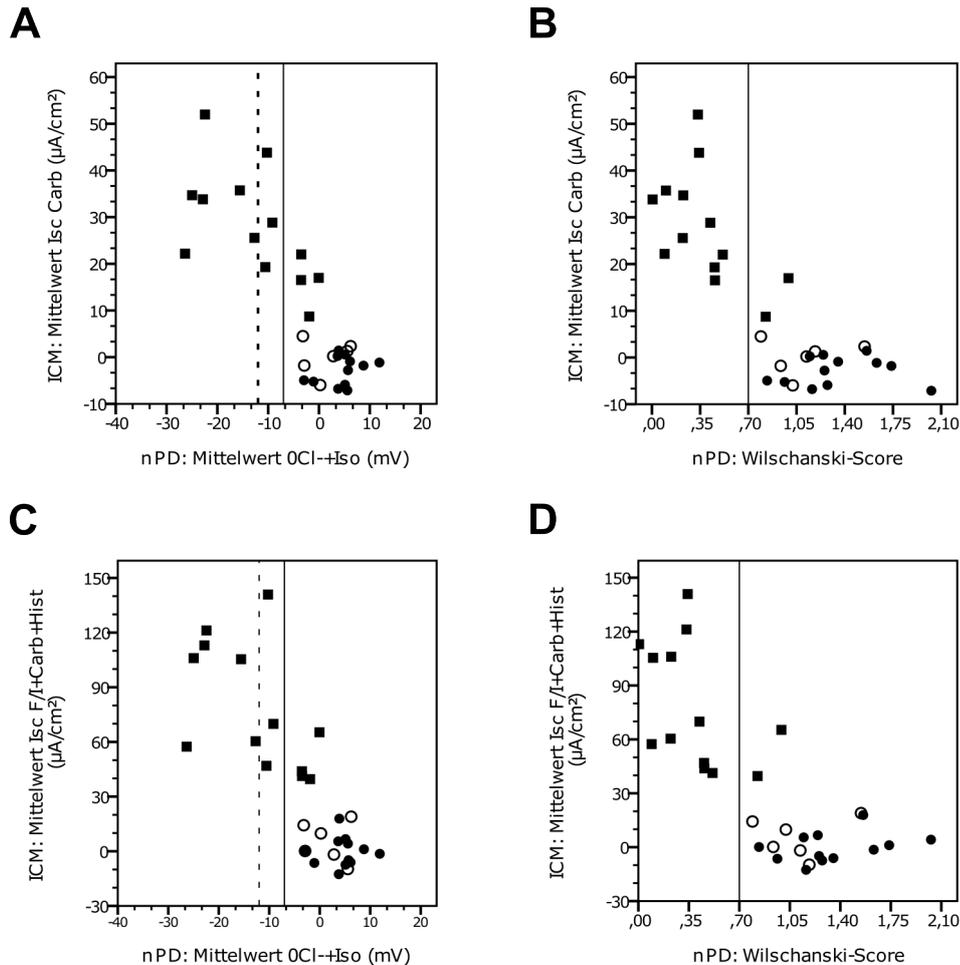


Abb. 15: Korrelation der Messergebnisse der nPD mit der ICM.

A Der Vergleich der Mittelwerte des Stromanstiegs nach Carbachol (Carb) mit den Mittelwerten des Wiederanstiegs nach Cl^- -freier Isoproterenollösung (0Cl-Iso) zeigte eine starke Korrelation. Vier Probanden der Kontrollgruppe (schwarze Quadrate) lagen im pathologischen Bereich (durchgezogene Linie bei -7.7 mV). **B** Die Korrelation der Mittelwerte des Stromanstiegs nach Carbachol mit dem Wilschanski-Score. Werte rechts der vertikalen, durchgezogene Linie (0,7) liegen im pathologischen Bereich. **C** Korrelation der Summe des Stromanstiegs durch Forskolin/IBMX, Carbachol und Histamin (F/I+Carb+Hist) mit den Mittelwerten des Wiederanstiegs nach Cl^- -freier Isoproterenollösung. **D** Der Vergleich der F/I+Carb-Hist-Summe mit dem Wilschanski-Score der nPD.

3.4.4 Sensitivität und Spezifität der untersuchten Methoden

Nachdem die Ergebnisse der drei durchgeführten Messmethoden auf ihre Korrelation zueinander untersucht wurden, wird im folgenden Abschnitt die Sensitivität und Spezifität beleuchtet.

Die Sensitivität und Spezifität der nPD war abhängig vom Auswertkriterium. Die Testsensitivität der nPD lag in der Betrachtung des *best-of*-Wertes der Summe des Wiederanstiegs bei 90%, da zwei Probanden der CF-positiven, pankreassuffizienten Gruppe falsch positiv gemessen wurden. Für den Mittelwert der Summe des Wiederanstiegs lag die Sensitivität jedoch bei 100%. Die Testspezifität lag unabhängig vom *best-of*-Wert oder

Mittelwert für die Summe des Wiederanstiegs aufgrund vier falsch positiver Messergebnisse bei 76,5%. Der Wilschanski-Score zeigte bereits in der Einzelauswertung der Messergebnisse der nPD die beste Trennung zwischen der Kontroll- und der CF-Gruppe. Lediglich zwei Probanden aus der Kontrollgruppe hatten einen Wilschanski-Score über dem Grenzwert von 0,7 und wurden damit falsch positiv gemessen. Aufgrund einer geringeren Anzahl falsch positiver und falsch negativer Messergebnisse erwies sich der Wilschanski-Score mit einer Testspezifität von 87% und einer Testsensitivität von 100% als bestes Auswertkriterium der nPD in dieser Arbeit.

Eine Aussage über die Spezifität und Sensitivität der ICM fiel schwer, da zurzeit keine standardisierten Grenzwerte vorhanden sind. In einer Studie von Derichs wurden *cut-of*-Werte für den Carbachol-induzierten Stromanstieg ($10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) und die Summe der Stromänderungen von Forskolin/IBMX, Carbachol und Histamin ($34 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) formuliert (Derichs *et al.*, 2010). Werte kleiner $10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ nach Carbacholgabe bzw. $34 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ für die Summe der Stromänderung definierten den CF-positiven Bereich, Werte darüber definierten den Kontrollbereich. Diese Werte wurden in der hier vorliegenden Studie für die Errechnung der Spezifität und Sensitivität verwendet. Anhand der Grenzwerte des Carbachol-Effekts und der Stromänderungen von Forskolin/IBMX, Carbachol und Histamin ergab sich eine deutliche Trennung zwischen dem gesunden Kollektiv und der CF-positiven Gruppe. Mit einer Sensitivität und Spezifität von 100% zeigte die Summe aller Stromveränderungen der ICM die deutlichste Trennung der untersuchten Gruppen. Betrachtete man die Carbachol-induzierte Stromänderung wurde mit den hier ermittelten Ergebnissen eine Spezifität von 92% erreicht. Der Carbachol-Effekt lag im Mittel bei $8,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und daher wurde ein Proband des CF-Kollektivs falsch positive gemessen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit eine Trennung des gesamten Untersuchungskollektivs in gesunde und CF-erkrankte Probanden vorgenommen werden. Sowohl bei der nPD-Messung als auch bei der ICM war es nicht möglich, pankreassuffiziente von pankreas-insuffizienten Probanden zu unterscheiden. Jedoch zeigte die ICM eine bessere und aussagekräftigere Trennung von CF-Probanden zur Kontrollgruppe im Vergleich zu den Ergebnissen der nPD.

4. Diskussion

Eine exakte und schnelle Diagnostik ist für einen frühen Beginn der Therapiemaßnahmen sowie im Hinblick auf die Lebensqualität und Lebenserwartung der Mukoviszidosepatienten von hohem Stellenwert. Zugleich macht die enorme Vielfalt an CFTR-verursachenden Mutationen und deren Spektrum an CFTR-Funktionseinschränkungen eine genaue Diagnostik im klinischen Alltag zur Herausforderung. Deshalb lag der Fokus dieser Arbeit insbesondere auf dem Vergleich pankreassuffizienter und pankreasinsuffizienter Mukoviszidosepatienten mit gesunden Probanden mittels Gegenüberstellung der Ergebnisse des Schweißtest, der nPD und der ICM.

Im Folgenden werden die Ergebnisse diskutiert und die Limitationen dieser Arbeit beschrieben.

4.1 Die nasale Potentialdifferenz als Diagnoseverfahren der Mukoviszidose

Seit über 40 Jahren dient die nPD als elektrophysiologische CFTR-Funktionsüberprüfung in der Diagnostik der Mukoviszidose (Farrell *et al.*, 2017a). Frühere Studien des Mukoviszidose-Zentrums des Universitätsklinikums Gießen sowie die vorliegende Arbeit bestätigten die nPD als eine geeignete Methode für die Überprüfung der CFTR-Aktivität des nasalen Epithels. Dabei lag für die Unterscheidung zwischen den gesunden und den CF-positiven, pankreasinsuffizienten Probanden die Spezifität zwischen 96,5% bis 100% und es wurde eine Sensitivität zwischen 94,8% bis 100% erreicht (Naehrlich *et al.*, 2014). Der Aufbau und die Durchführung der nPD verlaufen in den meisten Mukoviszidose-Zentren weltweit standardisiert. Als Basis hierfür gibt es zum jetzigen Zeitpunkt zwei Standardvorgehensweisen, ein Protokoll der amerikanischen Mukoviszidose-Gesellschaft *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF-TDN-SOP) und ein weiteres von der *European Cystic Fibrosis Society* (ECFS-NPD-SOP). Trotz dieser standardisierten Durchführung gibt es in der Wahl der Auswerteparameter große Unterschiede. Die Arbeitsgruppe um Knowles definierte 1995 die größte Spannungsänderung nach CF-freier- und Isoproterenollösung (*best-of*-Wert) als bestes Unterscheidungskriterium zwischen CF-positiver- und Kontrollgruppe (Knowles *et al.*, 1995). Um die große Variabilität der *best-of*-Werte zu verringern, benutzten manche Zentren den Mittelwert der Summe des Wiederanstiegs als Auswertekriterium (Ahrens *et al.*, 2002; Ooi *et al.*, 2012). Eine neuere Studie aus dem Jahre 2014 zeigte jedoch, dass der Mittelwert der Summe des Wiederanstiegs nur von weniger als einem Drittel der CF-Zentren zur Auswertung herangezogen wurde (Naehrlich *et al.*, 2014). In der vorliegenden Studie

wurden die geringste Sensitivität (90%) und die größte Streuung der Ergebnisse in der Auswertung des *best-of*-Wertes der nPD erzielt. Eine deutlichere Trennung zwischen CF-positiver und CF-negativer Gruppe zeigte die Wahl des Mittelwertes des Spannungsanstiegs. Denn hierbei wurden eine höhere Sensitivität (100%) und eine geringere Streuung der Messwerte erreicht. In Studien mit größeren Untersuchungskollektiven zeigte sich bei der Differenzierung der Summe des Wiederanstieg nach Cl⁻-freier- und Isoproterenollösung eine Überlappung zwischen der CF-positiven und der gesunden Gruppe. Dies geschah besonders bei Patienten mit einer milden klinischen Ausprägung der Mukoviszidose, jedoch auch bei Patienten mit homozygoter $\Delta F508$ CFTR-Mutation (Knowles *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2010; van Meegen *et al.*, 2013). Eine Unterscheidung zwischen pankreassuffizienter und -insuffizienter CF-Gruppe durch die nPD konnte nicht gezeigt werden. Die Spezifität lag bei der Betrachtung der Summe des Wiederanstiegs unabhängig von *best-of* oder Mittelwert bei maximal 76%. Auch in dieser Arbeit wurden unabhängig von der Betrachtung des *best-of*-Wert oder Mittelwertes Überschneidungen der einzelnen Gruppen beobachtet. Diese Überschneidung war beim *best-of*-Wert der Summe des Wiederanstiegs nach Cl⁻-freier- und Isoproterenollösung am größten. Denn dabei lagen die gemessenen Werte von drei gesunden Probanden im pathologischen Bereich und zusätzlich wurden zwei Probanden der CF-positiven, pankreassuffizienten Gruppe unterhalb der pathologischen Schwelle von -7 mV eingeordnet. Die gleichen Probanden der gesunden Gruppe lagen auch bei der Betrachtung des Mittelwertes der Summe des Spannungsanstiegs über der pathologischen Schwelle von -7 mV. Jedoch lagen die Werte aller CF-Probanden im pathologischen Bereich. Eine geringere Streuung und die Reduzierung der individuellen Variabilität der Probanden konnte bei der Verwendung der Mittelwerte im Vergleich zu den *best-of*-Werten in dieser Studie gezeigt werden. Der Wert der Summe des Wiederanstiegs lag bei vier Probanden der Kontrollgruppe bei der ersten Messung im pathologischen Bereich. Eine Wiederholung der Messung der nPD dieser Probanden führte bei einem Probanden zu Werten im Normalbereich. Durch dieses Vorgehen wurde die Anzahl der falsch-positiven Messungen innerhalb des Untersuchungskollektivs reduziert. Die Wiederholung der nPD galt bereits als Standardvorgehen und wurde durch die hier erbrachten Ergebnisse bekräftigt.

Darüber hinaus wurde in der Literatur eine weitere Möglichkeit für die Auswertung und Interpretation der nPD-Ergebnisse beschrieben. Dieses Auswertverfahren bezieht zusätzlich zur Cl⁻-Sekretion (Effekt von Cl⁻-freier- und Isoproterenollösung) auch die Spannungsänderungen nach Amiloridperfusion mit ein. Für diese kombinierte Auswertung entstanden der Wilschanski-Score und der Sermet-Score (Wilschanski *et al.*, 2001; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2010). Diese Auswertestrategie wurde bisher jedoch nur von einer Minderheit der Mukoviszidose-Zentren genutzt (Naehrlich *et al.*, 2014). Die Kombination aus der

Spannungsänderung nach Amiloridperfusion und der CFTR-Antwort nach Cl^- -freier- und Isoproterenollösung zeigte in dieser Arbeit die beste Trennung der Gruppen mit höchster Spezifität (87%) und Sensitivität (100%). Jedoch kam es auch hier zu Überschneidungen der Messwerte. So wurden zwei gesunde Probanden falsch-positiv gemessen. Eine Nachmessung zeigte auch hier die Reduzierung der falsch-positiven Messungen auf einen Probanden und damit eine Steigerung der Spezifität auf 93%. Eine Trennung zwischen pankreassuffizienter und pankreasinsuffizienter CF-Gruppe war auch anhand des Wilschanski-Scores nicht möglich.

Die nPD ist neben dem Schweißtest ein etabliertes Verfahren in der Mukoviszidose-Diagnostik. Wie bereits erwähnt werden auf Grundlage der gleichen Standardvorgehensweise und der gleichen diagnostischen Kriterien unterschiedliche Parameter definiert und ausgewertet. Darüber hinaus existieren zentrumsspezifische Referenz- und Schwellenwerte. All diese angeführten Punkte führen dazu, dass die Vergleichbarkeit und Verlässlichkeit der nPD als diagnostische Methode erschwert wird. Zudem fehlen momentan große, repräsentative Studien mit zentrumsunabhängigen Referenzwerten, die eine bessere Aussagekraft der nPD ermöglichen würden. Aufgrund dieser Unsicherheit in der Wahl des Parameters zur Auswertung der Messungen der nPD wurde in dieser Arbeit die Aussagekraft sowohl der *best-of*-Werte sowie der Mittelwerte der CFTR-Antwort als auch der Wilschanski-Score untersucht. Unabhängig von den diagnostischen Kriterien zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Studie eine klinisch relevante Überlappung zwischen Patienten mit Mukoviszidose und gesunden Probanden.

4.2 Die intestinale Kurzschlussstrommessung als geeignetes Verfahren der Mukoviszidose-Diagnostik

Die ICM wird bereits seit über 20 Jahren zur CFTR-Funktionsüberprüfung zunächst primär für Forschungszwecke eingesetzt (De Jonge *et al.*, 2004). 10 Jahre später erfolgte die Überprüfung der ICM als diagnostisches Verfahren bei Mukoviszidose. Dabei entstanden zwei verschiedene Ausführungsprotokolle (das Freiburger und das Rotterdam-Protokoll) zum Aufbau und zur Durchführung einer elektrophysiologischen *ex vivo* Messungen des Darmepithels (Hug *et al.*, 2011; Veeze *et al.*, 1991). Für diese Arbeit wurde das standardisierte Protokoll der Europäischen Gesellschaft für Mukoviszidose angewendet, welches eine abgewandelte Form des Rotterdam-Protokolls zur Durchführung einer ICM darstellt (ECFS-TDN-SOP, V2.7, Oktober 2011). Ähnlich der nPD bezieht sich diese Standardisierung des ICM-Protokolls lediglich auf den Aufbau und die Durchführung der Messungen. Eine standardisierte Auswertung mit festgelegten Kriterien und Schwellenwerten bestand zur Zeit der Fertigstellung dieser Arbeit (Stand Dezember 2018)

noch nicht. Demzufolge wurde für die Auswertung der in dieser Studie generierten Ergebnisse auf die Auswertestrategien anderer Mukoviszidose-Zentren zurückgegriffen. Bereits bekannt ist, dass die CFTR-Aktivität über die cAMP-aktivierte Proteinkinase A reguliert wird. Darüber hinaus wurde eine sekundär Ca^{2+} -vermittelt Aktivierung des CFTR beschrieben (Berschneider *et al.*, 1988; Dalemans *et al.*, 1991). Auf dieser Grundlage entstand in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl an Auswertparametern und unterschiedlichen Grenzwerten für die ICM von Rektumbiopsien. Anfänglich wurde lediglich die durch Carbachol und Histamin induzierte Ca^{2+} -vermittelte Cl^- -Sekretion bei der Auswertung berücksichtigt (Berschneider *et al.*, 1988; Boucher *et al.*, 1989). Eine Studie aus dem Jahr 2004 zeigte jedoch, dass mit der alleinigen Berücksichtigung der Carbachol und Histamin-vermittelten Stromänderungen keine klare Trennung zwischen Kontroll- und Mukoviszidosegruppe erreicht wurde (Mall *et al.*, 1998b). Die Arbeitsgruppe um Mall kam zu dem Schluss, dass ein fehlender Stromanstieg oder gar ein Stromabfall bei der reinen Betrachtung der Stromänderung nach Applikation von Carbachol nicht als Beweis für das vollständige Fehlen des CFTR dienen kann. Dabei bezogen sie sich auf die ebenfalls Ca^{2+} -vermittelte, Lumen-positive K^+ -Sekretion (Mall *et al.*, 1998b). Aufgrund unzureichender Blockade der K^+ -Kanäle während einer ICM-Messung kann durch die cholinerge Stimulation mittels Carbachol insbesondere bei nicht-CF-Probanden die Lumen-positive K^+ -Sekretion die Lumen-negative Cl^- -Sekretion übertreffen und so zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Neuere Studien verwenden daher für die Funktionsüberprüfung des CFTR die cAMP-vermittelte Cl^- -Sekretion (Stromveränderung nach Stimulation durch Forskolin/IBMX; Graeber *et al.*, 2015) bzw. eine Kombination der Stromänderung aus cAMP und Carbachol (Clancy *et al.*, 2013). Derichs *et al.* veröffentlichten 2010 eine Studie zur ICM, in der die deutlichste Trennung zwischen den untersuchten Gruppen (gesund und CF-erkrankt) in der Auswertung der Summe der Stromänderung nach Applikation von Forskolin/IBMX, Carbachol sowie Histamin erfolgte (Derichs *et al.*, 2010). Daraus ergab sich ein *cut-of*-Wert von $34 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Auf Grundlage dieses Auswertparameters war es möglich eine Trennung zwischen Kontrollgruppe und CF-Gruppe zu erreichen, jedoch keine Unterscheidung in pankreassuffizient und pankreasinsuffizient innerhalb der CF-Gruppe (Derichs *et al.*, 2010). Basierend auf den *cut-of*-Wert von $34 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ für die Summe der Stromänderung wurde eine deutliche Differenzierung zwischen der CF-Gruppe und der Kontrollgruppe in der vorliegenden Studie erzielt. Weiterhin wurde gezeigt, dass es zu keiner Überschneidung zwischen der Kontrollgruppe und den beiden CF-Gruppen bei der Betrachtung des Carbachol-Effekts sowie bei der Summe der Stromänderungen von Forskolin/IBMX, Carbachol und Histamin kam. Einzelne Überschneidungen gab es allerdings bei den Auswertparametern Histamin und Forskolin/IBMX dieser Gruppen. Wichtig ist an dieser Stelle anzumerken, dass innerhalb dieser Arbeit bei keinem der Auswertparameter für die

ICM ein signifikanter Unterschied zwischen der pankreassuffizienten und der pankreasinsuffizienten CF-Gruppe erzielt werden konnte.

Mit der ICM ist es unabhängig von dem verwendeten Protokoll nicht möglich bei CF-Patienten einen CFTR-Funktionsverlust von weniger als 50% festzustellen (Hirtz *et al.*, 2004; De Jonge *et al.*, 2004). Für das von der Arbeitsgruppe um de Jonge angewendete Rotterdam-Protokoll wurde angenommen, dass die CFTR-Restfunktion bei CF-Patienten in der apikalen Membran des distalen Kolons nicht proportional zur Anzahl der CFTR-Kanäle sei (De Jonge *et al.*, 2004). Erst ab einer CFTR-Protein-Expression von weniger als 10 bis 15% gegenüber dem Normalwert sei die in der ICM gemessene Restfunktion proportional zur CFTR-Expression (De Jonge *et al.*, 2004). Bei einem geringeren Funktionsverlust war die Leitfähigkeit des CFTR nicht mehr limitierend für den transepithelialen Cl^- -Transport (Högenauer *et al.*, 2000). Daher würde erst ein CFTR-Funktionsverlust von mehr als 80 bis 85% in der ICM auffällig (De Jonge *et al.*, 2004) und milde CFTR-Mutationen mit CFTR-Restfunktion können in einem falsch-negativen Ergebnis der ICM resultieren. Dies legt auch die Untersuchung von Derichs *et al. nahe* (Derichs *et al.*, 2010). Dort lagen 8 Patienten ohne zwei Mukoviszidose-verursachenden CFTR-Mutationen mit ihren ICM-Ergebnissen im Normalbereich, trotz einer Schweißchloridkonzentration von über 60 mmol/l (Derichs *et al.*, 2010). Die vorliegende Untersuchung zeigte jedoch, dass alle Teilnehmer mit einer Schweißchloridkonzentration über 60 mmol/l auch pathologische Messwerte in der ICM erzielten. Dies galt sowohl für die Auswertung des Stromanstiegs nach Carbachol als auch für die Summe des Stromanstiegs nach Forskolin/IBMX, Carbachol sowie Histamin. Auf der Grundlage dieser Auswertparameter zeigte die ICM in dieser Studie eine Sensitivität und Spezifität von 100%. Damit konnten die hohen Vorhersagewert und die Durchführbarkeit des zugrunde liegenden SOP der Europäischen Gesellschaft für Mukoviszidose bestätigt werden.

4.3 Der diagnostische Vergleich zwischen nPD und ICM

Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass die ICM die höchste Sensitivität und Spezifität auch gegenüber dem Wilschanski-Score der nPD hat. Messungen der nPD waren bereits bei einer höheren CFTR-Restfunktion auffällig im Vergleich zu den Messungen der ICM. Mögliche Erklärungen hierfür könnten spezifische Unterschiede der gemessenen Gewebe (nasales und intestinales Epithel) mit unterschiedlich starker CFTR-Expression, der Cl^- -Transport über alternative Cl^- -Kanäle oder extrinsische Faktoren sein. Bereits die CFTR-Pionierarbeit von Riordan und Kollegen zeigte eine hohe Variabilität in der CFTR-Expression sowohl im Respirationsepithel als auch im Verdauungstrakt bei der ΔF508 CFTR-Mutation (Kerem *et al.*, 1989). Zugleich wurde aber auch eine vergleichbare CFTR-Expression im

respiratorischen und intestinalen Epithel bei homozygoten $\Delta F508$ CF-Patienten und gesunden Kontrollprobanden gezeigt (Kälin *et al.*, 1999). Die Expressionsrate bei einem $\Delta F508$ homozygoten CF-Patienten kann zwischen 0 und 100% schwanken (Van Meegen *et al.*, 2011). Anhand dieses Aspekts wird deutlich, dass individuelle Schwankungen der CFTR-Expression einen größeren Einfluss auf die gemessene CFTR-Restaktivität haben im Vergleich zu gewebespezifischen Unterschieden bei nasaler und rektaler Schleimhaut. Um etwaige vorhandene intraindividuelle Schwankungen der CFTR-Expression an den rektalen Biopsien zu verringern, wurden in dieser Studie die Messwerte aller Biopsien eines Probanden innerhalb der ICM gemittelt. Betrachtete man die Ergebnisse der nPD-Messung fiel auf, dass es eine deutlichere Trennung zwischen gesunder Kontroll- und CF-Gruppe in der Betrachtung des Mittelwertes der Summe der Spannungsänderung gab im Vergleich zu der Berücksichtigung von nur einer Messung eines Probanden. Um die Variabilität der CFTR-Expression zu minimieren ist es daher ratsam, alle Messungen, unabhängig ob nPD oder ICM, eines Probanden zu mitteln und damit die statistische Analyse durchzuführen.

Neben der gewebespezifischen CFTR-Expression für die Untersuchung der CFTR-Restaktivität spielen auch alternative epitheliale Cl^- -Kanäle eine wichtige Rolle. Denn durch diese Kanäle wird der transzellulären Cl^- -Transport, der aufgrund von CFTR-Mutationen bei CF-Patienten eingeschränkt ist, unterstützt. Ein wichtiger Kandidat ist in diesem Zusammenhang der Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanal (CaCC). Im Vergleich zum respiratorischen Epithel wurde dieser CaCC-vermittelte Transportweg für das rektale Epithel jedoch nicht beschrieben (Mall *et al.*, 2004).

Darüber hinaus sind extrinsische Faktoren wie stattgefunden Entzündungen, kleine Traumata, verringerte CFTR-Expression und Funktion zu nennen. Es konnte von mehreren Arbeitsgruppen bereits gezeigt werden, dass diese Faktoren eine wesentlich höhere Relevanz in der nPD haben als in der ICM (Brezillon *et al.*, 1995; Knowles *et al.*, 1995; Chilvers *et al.*, 2001). Das Rauchen, ob aktiv oder passiv, als weiterer extrinsischer Faktor, beeinflusst aufgrund des systemisch wirkenden Tabakrauch-Komponente Acrolein sowohl die CFTR-Funktion in der respiratorischen als auch in der rektalen Schleimhaut (Raju *et al.*, 2013). So zeigte Raju und Kollegen in ICM-Messungen eine bis zu 65% reduzierte CFTR-Aktivität bei Rauchern im Vergleich zu einer nichtrauchenden Kontrollgruppe (Raju *et al.*, 2013). Bezogen auf die hier generierten Daten konnte lediglich ein Trend, jedoch kein signifikanter Unterschied der CFTR-Funktion in den ICM-Messungen zwischen Rauchern und Nichtrauchern unabhängig ob Kontrollgruppe oder CF-Gruppe festgestellt werden (Bagheri-Hanson, Nedwed *et al.*, 2014). Aufgrund des geringeren Einflusses von extrinsischen Faktoren und dem Fehlen alternativer Cl^- -Kanäle im intestinalen Gewebe ist die ICM als *ex vivo* Testmethode ein robusteres Messverfahren im Vergleich zur nPD. Die höhere Anfälligkeit der nPD gegenüber äußeren Faktoren zeigte sich auch in dieser Studie

anhand der Notwendigkeit von Nachmessungen der nPD bei drei Probanden. Ein weiterer Vorteil der ICM gegenüber der nPD ist die Durchführbarkeit der Methode auch bei Kindern unter sechs Jahren. Somit kann die ICM im Gegensatz zur nPD auch als Bestätigungstest bei positiven Neugeborenencreening eingesetzt werden (Derichs *et al.*, 2010). Die direkt am Patienten aufgewendete Zeit der Untersuchung und die erforderliche Compliance des Patienten während der Untersuchung sind innerhalb der ICM wesentlich geringer als bei der nPD. Die durchschnittliche Dauer einer nPD an beiden Nasenlöchern beträgt ungefähr 90 Minuten. Während dieser Zeit muss der Teilnehmer nahezu bewegungslos sitzen um ein Verrutschen des nasalen Katheters zu verhindern. Für die ICM beträgt die vollständige Biopsieentnahme inklusiver Voruntersuchung des Patienten in der Regel nicht mehr als 30 Minuten. Besondere Vorbereitung des Patienten, wie etwa die Darmreinigung mittels Lavage-Lösung, sind bei der in diesen Versuchen verwendeten Saugbiopsie nicht notwendig. Darüber hinaus sind die verwendeten Geräte für die Saugbiopsie im Vergleich zu einer endoskopisch gestützten Zangenbiopsie kleiner. Dies führt vor allem zu einer gesteigerten Patiententoleranz und höheren Durchführbarkeit in einem pädiatrisch dominierten Patientenkollektiv der Mukoviszidose.

4.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zeigen, dass anhand der Messwerte im Normbereich eine CFTR-Funktionsstörung mit den beiden hier vorgestellten Untersuchungsmethoden, der nPD und der ICM, ausgeschlossen werden kann. Messwerte im Graubereich oder im pathologischen Bereich bei einer nPD-Messung konnten auch bei einem sehr geringen Anteil der Probanden innerhalb der Kontrollgruppe festgestellt werden. Besonders bei Patienten mit chronischer Sinusitis, aktiven oder passiven Rauchern sollten die nPD-Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden, da extrinsische Faktoren in der Kontrollgruppe zu falsch-positiven Ergebnissen führen können. Für die ICM hat sich die Auswertung der Summe der Stromänderung nach Forskolin/IBMX, Carbachol und Histamin am aussagekräftigsten bei der Mukoviszidose-Diagnose erwiesen. Im direkten Vergleich zur nPD zeigte sich dabei eine höhere Spezifität der ICM.

Die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Dissertation ist limitiert durch die geringe Fallzahl der Probanden, die fehlende Genotypisierung der Kontrollgruppe sowie die Beschränkung der CF-Patienten mit einem Schweißchlorid ≥ 60 mmol/l. Einschränkend muss erwähnt werden, dass nur CF-Patienten mit einem Schweißchlorid > 60 mmol/l untersucht wurden und CF-Patienten mit einer Restfunktion nicht in die Studie aufgenommen wurden. Es handelt sich dabei um eine Limitationen der Studie.

Die Ergebnisse werden im Rahmen einer multizentrischen Studie eingebracht, um die Aussagen durch eine höhere Fallzahl zu verifizieren.

Zusammenfassend stellte sich die ICM als eine verlässliche Methode in der Diagnostik von Mukoviszidose-Patienten aller Altersgruppen mit unterschiedlichen CF-Phänotypen dar. Trotz dessen müssen zukünftige multizentrische Studien mit größeren Untersuchungskollektiven die hier erzielten Ergebnisse bestätigen, um eine Etablierung der ICM als Diagnoseverfahren bei Mukoviszidose zu ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Die Mukoviszidose (= Zystische Fibrose) ist mit einer Inzidenz von 1:3.000 die häufigste angeborene Stoffwechselerkrankung der kaukasischen Bevölkerung. Als krankheitsverursachend gilt eine autosomal-rezessiv vererbte Fehlfunktion des Cl⁻-leitenden Ionenkanals *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR). Dabei kommt es zur Sekretproduktionsstörung der exokrinen Drüsen im Körper. Durch konsequente symptomatische Therapien konnte in den vergangenen 10 Jahren die durchschnittliche Lebenserwartung eines an Mukoviszidose Erkrankten erhöht werden. Die Vielzahl an krankheitsverursachenden CFTR-Genmutationen und die Multiorgansymptomatik machen eine sichere Diagnostik der Mukoviszidose im klinischen Alltag zu einer Herausforderung.

In dieser Arbeit erfolgte die Überprüfung der intestinalen Kurzschlussstrommessung (ICM) als geeignetes Verfahren in der Mukoviszidose-Diagnostik, die Durchführbarkeit und die klinische Anwendung eines standardisierten Protokolls zur Durchführung sowie die Veranschaulichung der diagnostischen Wertigkeit im Vergleich zur nasalen Potentialdifferenzmessung (nPD) mit besonderer Betrachtung auf die Auswertkriterien und deren Grenzwerte.

Das Kollektiv der vorliegenden Studie umfasste 31 Probanden, die sich in eine Kontrollgruppe, eine CF-positive pankreassuffiziente und eine CF-positive pankreasinsuffiziente Gruppe gliederte. Es erfolgte die Durchführung des Schweißtests, der nPD sowie der ICM nach standardisierten Protokollen, um die Fähigkeit der Messungen zu bestimmen, inwieweit zwischen CF-Erkrankten und gesunden Probanden unterschieden werden kann.

Anhand der Ergebnisse dieser Studie erwies sich der Wilschanski-Score bei der Auswertung der nPD als sicherstes Unterscheidungskriterium. In der ICM war die Auswertung der Summe der Stromänderung nach Forskolin/IBMX, Carbachol und Histamin-Applikation das sicherste Kriterium einer Mukoviszidose-Erkrankung. Zudem konnte gezeigt werden, dass die ICM in der Differenzierung zwischen CF-positiver und Kontrollgruppe der nPD überlegen war. Eine Unterteilung zwischen pankreasinsuffizienter und pankreassuffizienter CF-positiver Gruppe war weder mit der ICM noch mit der nPD möglich. Weiterhin zeigte diese Studie eine geringere Abhängigkeit der ICM-Messergebnisse von extrinsischen Faktoren im Vergleich zur nPD. Jedoch wird die ICM erst durch eine standardisierte Auswertung mit festgelegten Grenzwerten zu einer verlässlichen und praktikable Methode mit hoher Vorhersagekraft in der Mukoviszidose-Diagnostik, insbesondere bei CF-Patienten mit milder Symptomatik und einer Schweißchloridkonzentration im Graubereich (30 – 60 mmol/l).

6. Summary

Cystic fibrosis is the most common congenital metabolic disease of the Caucasian population, with an incidence of 1:3,000. The disease is caused by an autosomal recessive malfunction of a Cl⁻-transporting ion channel named cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). That leads to disorders of secretion production of exocrine glands in the body. Symptomatic therapies have continuously increased the average life expectancy of people with CF in the last 10 years. Due to the large number of pathogenic CFTR mutations and the multi-organ symptoms the reliable diagnosis of cystic fibrosis in clinical practice is a major challenge. The present study focused on the examination of the intestinal short circuit current measurement (ICM) as a suitable method in the cystic fibrosis diagnostics, the feasibility and the clinical use of a standardized protocol for the execution as well as the diagnostic value compared to the nasal potential difference measurement (nPD) with special attention on the evaluation criteria and their limits. The study included 31 subjects, grouped into healthy controls, a CF-positive pancreatic-deficient group, and a CF-positive pancreatic insufficiency group. The sweat test, nPD and ICM were performed according to standardized protocols to determine the ability of the measurements to differentiate between CF patients and healthy volunteers. Based on the results of this study, the Wilschanski score proved to be the safest value for the evaluation of nPD. In the ICM the evaluation of the sum of the current changes after forskolin/IBMX, carbachol and histamine application was the safest criterion of a cystic fibrosis disease. In addition, it could be shown that the ICM was superior to the nPD in the differentiation between CF-positive and control group. A subdivision between pancreatic insufficiency and pancreatic sufficiency CF-positive group was not possible with either ICM or nPD. Furthermore, this study showed less dependence of ICM results on extrinsic factors compared to nPD. Only by a standardized evaluation with consistent and unitary evaluation criteria the ICM becomes a reliable and practicable method with high predictive value in cystic fibrosis diagnostics, especially in CF patients with mild symptoms and a sweat chloride concentration in the gray area (30 – 60 mmol / l).

7. Verzeichnisse

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Flowchart der Diagnostik bei klinischem Verdacht auf Mukoviszidose.	5
Abb. 2:	Schematische Aufbau einer gesunden Epithelzelle.	6
Abb. 3:	Schematischer Aufbau eine Epithelzelle mit defekten CFTR.	7
Abb. 4:	Schematische Darstellung der CFTR Mutationsklassen.	8
Abb. 5:	Schematische Darstellung der nPD.	15
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Ussing-Kammer und <i>voltage-clamp</i> Messmethode.	18
Abb. 7:	Der Schweißtest zeigte eine deutliche Trennung zwischen den gesunden Probanden und den beiden Mukoviszidose-Gruppen.	26
Abb. 8:	Exemplarischer Kurvenverlauf der durchgeführten nPD-Messungen.	28
Abb. 9:	Vergleich der Mittelwerte und der <i>best-of</i> -Werte der Spannungsänderung durch Cl ⁻ -freie und Isoproterenol-Lösung zur Diagnosestellung der Mukoviszidose.	30
Abb. 10:	Der Wilschanski-Score zeigte in dieser Studie eine gute Trennung zwischen gesunden und CF-erkrankten Probanden.	31
Abb. 11:	Exemplarischer Kurvenverlauf der durchgeführten intestinalen Kurzschluss- strommessung der Rektumbiopsie.	33
Abb. 12:	Zusammenfassende Darstellung der Pharmaka-vermittelten Stromänderungen der intestinalen Kurzschlussstrommessungen.	35
Abb. 13:	Korrelation der nPD-Messungen (Mittelwert und <i>best-of</i> -Wert der Summe des Wiederanstiegs Cl ⁻ -freie und Isoproterenol-Lösung) mit der Schweißchlorid- konzentration.	37
Abb. 14:	Korrelation der Schweißchloridkonzentration mit dem Werten der ICM.	39
Abb. 15:	Korrelation der Messergebnisse der nPD mit der ICM.	41

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Untersuchungskollektiv mit Anzahl, Durchschnittsalter und Genetik.	10
Tab. 2:	Überblick über die verwendeten Lösungen der nPD.	13
Tab. 3:	Zusammensetzung der Ringerlösung für die Messungen der nPD.	14
Tab. 4:	Zusammensetzung der Cl ⁻ -freien Lösung für die nPD-Messungen.	14
Tab. 5:	Zusammensetzung der Ringerlösung für die Untersuchungen der Rektum- biopsien mittels Ussing-Kammer-Technik.	20
Tab. 6:	Zusammenfassung der nPD-Ergebnisse.	27
Tab. 7:	Zusammenfassung der ICM-Ergebnisse.	34
Tab. 8:	Verwendete Geräte und Materialien.	64
Tab. 9:	Verwendete Chemikalien, deren Molekulargewicht sowie die Bezugsquelle.	65

7.3 Verzeichnis der Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
0Cl-	Cl ⁻ -freie Lösung
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ami	Amilorid
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Ca ²⁺ -Ion
CaCC	Ca ²⁺ -abhängige Cl ⁻ -Kanäle
cAMP	zyklische Adenosinmonophosphat
Carb	Carbachol
CF	Zystische Fibrose
CFF-TDN-SOP	<i>Standard Operating Procedure der Cystic Fibrosis Foundation</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
Cl ⁻	Cl ⁻ -ion
CO ₂	Kohlendstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
DIDS	<i>4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

ECFS	Europäische Gesellschaft für Mukoviszidose
ECFS-ICM-SOP	<i>Standard Operating Procedure</i> der ICM der ECFS
ENaC	Epithelialer Na ⁺ -Kanal
et al	<i>et alteri</i> (und andere)
F/I	Forskolin/IBMX
F/I + Carb + Hist	Summe aus Forskolin/IBMX, Carbachol und Histamin
G	Gewebe
Gen	Genistein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
Hist	Histamin
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICM	Intestinale Kurzschlussstrommessung
IQR	Interquartilsabstand
Isc	Kurzschlussstrom
Iso	Isoproterenol
K ⁺	K ⁺ -Ion
KCl	Kaliumchlorid
Lsg	Lösung
m	Meter
min	Minuten
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
Mol	Stoffmenge
n	Anzahl
Na ²⁺	Na ⁺ -Ion
Na ²⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-Pumpe
NaOH	Natriumhydroxid
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NGB-Screening	Neugeborenenenscreening
NKCC	Na ²⁺ /K ⁺ /Cl ⁻ Co-Transporter

nPD	Nasale Potentialdifferenz
O ₂	Sauerstoff
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PD	Potentialdifferenz
ph	<i>potentia hydrogenii</i> , Wert für die Konzentration von Protonen
PI	pankreasinsuffizient
PS	pankreassuffizient
R _t	transepithelialer Widerstand
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
Tab.	Tabelle
V	Volt
V _t	transepitheliales Potential
ΔF508	CFTR Mutante, mit Deletion von Phenylalanin (F) an Position 508 des CFTR-Proteins
ΔI _{sc}	vermittelter Kurzschlussstrom
Ω	Ohm

8. Literaturverzeichnis

Ahrens R.C., Standaert T.A., Launspach J., Han S.H., Teresi M.E., Aitken M.L., Kelley T.J., Hilliard K.A., Milgram L.J., Konstan M.W., Weatherly M.R. & McCarty N.A. (2002): Use of nasal potential difference and sweat chloride as outcome measures in multicenter clinical trials in subjects with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*; 33: 142-150.

Alton E.W., Beekman J.M., Boyd A.C., Brand J., Carlon M.S., Connolly M.M., Chan M., Conlon S., Davidson H.E., Davies J.C., Davies L.A., Dekkers J.F., Doherty A., Gea-Sorli S., Gill D.R., Griesenbach U., Hasegawa M., Higgins T.E., Hironaka T., Hyndman L., McLachlan G., Inoue M., Hyde S.C., Innes J.A., Maher T.M., Moran C., Meng C., Paul-Smith M.C., Pringle I.A., Pytel K.M., Rodriguez-Martinez A., Schmidt A.C., Stevenson B.J., Sumner-Jones S.G., Toshner R., Tsugumine S., Wasowicz M.W., Zhu J. (2017): Preparation for a first-in-man lentivirus trial in patients with cystic fibrosis. *Thorax*; doi: 10.1136/thoraxjnl-2016-208406

Anderson M.P., Berger H.A., Rich D.P., Gregory R.J., Smith A.E. & Welsh M.J. (1991): Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell*; 67:775-784.

Bagheri-Hanson A., Nedwed S., Rueckes-Nilges C. & Naehrlich L. (2014): Intestinal current measurement versus nasal potential difference measurements for diagnosis of cystic fibrosis: a case-control study. *BMC Pulm Med*; 14:156; doi: 10.1186/1471-2466-14-156.

Beauchamp M. & Lands L.C. (2005): Sweat-testing: a review of current technical requirements. *Pediatr Pulmonol*; 39:507-511.

Berschneider H.M., Knowles M.R., Azizkhan R.G., Boucher R.C., Tobey N.A., Orlando R.C. & Powell D.W. (1988): Altered intestinal chloride transport in cystic fibrosis. *FASEB J*; 2:2625-2629.

Boucher R.C. (2004): New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*; 23:146-158.

Boucher R.C., Cheng E.H., Paradiso A.M., Stutts M.J., Knowles M.R. & Earp H.S. (1989): Chloride secretory response of cystic fibrosis human airway epithelia. Preservation of calcium but not protein kinase C- and A-dependent mechanisms. *J Clin Invest*; 84:1424-1431.

Boucher R.C., Cotton C.U., Gatzky J.T., Knowles M.R. & Yankaskas J.R. (1988): Evidence for reduced Cl⁻ and increased Na⁺ permeability in cystic fibrosis human primary cell cultures. *J Physiol*; 405:77-103.

Boyle M.P., Bell S.C., Konstan M.W., McColley S.A., Rowe S.M., Rietschel E., Huang X., Waltz D., Patel N.R., Rodman D. & VX09-809-102 Study Group (2014): A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*; 2:527-538.

Brezillon S., Dupuit F., Hinrasky J., Marchand V., Kälin N., Tümmler B. & Puchelle E. (1995): Decreased expression of the CFTR protein in remodeled human nasal epithelium from non-cystic fibrosis patients. *Lab Invest*; 72:191-200.

Castellani C., Southern K.W., Brownlee K., Dankert Roelse J., Duff A., Farrell M., Mehta A., Munck A., Pollitt R., Sermet-Gaudelus I., Wilcken B., Ballmann M., Corbetta C., de Monestrol I., Farrell P., Feilcke M., Férec C., Gartner S., Gaskin K., Hammermann J., Kashirskaya N., Loeber G., Macek M., Mehta G., Reiman A., Rizzotti P., Sammon A., Sands D., Smyth A., Sommerburg O., Torresani T., Travert G., Vernooij A. & Elborn S. (2009): European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *J Cyst Fibros*; 8:153-173.

Chilvers M.A., McKean M., Rutman A., Myint B.S., Silverman M. & O'Callaghan C. (2001): The effects of coronavirus on human nasal ciliated respiratory epithelium. *Eur Respir J*; 18:965-970.

Clancy J.P., Szczesniak R.D., Ashlock M.A., Ernst S.E., Fan L., Hornick D.B., Karp P.H., Khan U., Lymp J. & Ostmann A.J. (2013): Multicenter intestinal current measurements in rectal biopsies from CF and non-CF subjects to monitor CFTR function. *PLoS One*; 8:e73905; doi: 10.1371/journal.pone.0073905.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2009): CLSI. Sweat Testing: Sample Collection and Quantitative Chloride Analysis; Approved Guideline - Third Edition. Wayne, PA, USA.

Clunes M.T. & Boucher R.C. (2011): Introduction to section I: overview of approaches to study cystic fibrosis pathophysiology. *Methods Mol Biol*; 742:3-14.

Cuthbert A.W. (2011): New horizons in the treatment of cystic fibrosis. *Br J Pharmacol*; 163:173-183.

Cutting G.R. (2015): Cystic Fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet*; 16:45-56.

Dalemans W., Barbry P., Champigny G., Jallat S., Dott K., Dreyer D., Crystal R.G., Pavirani A., Lecocq J.P. & Lazdunski M. (1991): Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature*; 354:526-528.

De Boeck K., Wilschanski M., Castellani C., Taylor C., Cuppens H., Dodge J. & Sinaasappel M. (2006): Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*; 61:627-635.

De Jonge H.R., Ballmann M., Veeze H., Bronsveld I., Stanke F., Tummler B. & Sinaasappel M. (2004): *Ex vivo* CF diagnosis by intestinal current measurements (ICM) in small aperture, circulating Ussing chambers. *J Cyst Fibros*; 3:159-163.

Derichs N., Sanz J., Von Kanel T., Stolpe C., Zapf A., Tummler B., Gallati S. & Ballmann M. (2010): Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax*; 65:594-599.

Donaldson S.H., Bennett W.D., Zeman K.L., Knowles M.R., Tarran R. & Boucher R.C. (2006): Mucus clearance and lung function in cystic fibrosis with hypertonic saline. *N Engl J Med*; 354:241-250.

Döring G., Flume P., Heijerman H., Elborn J.S. & Group C.S. (2012): Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. *J Cyst Fibros*; 11:461-479.

- Elborn J.S., Bell S.C., Madge S.L., Burgel P.R., Castellani C., Conway S., De Rijcke K., Dembski B., Drevinek P., Heijerman H.G., Innes J.A., Lindblad A., Marshall B., Olesen H.V., Reimann A.L., Solé A., Viviani L., Wagner T.O., Welte T., Blasi F.** (2016): Report of the European Respiratory Society/European Cystic Fibrosis Society task force on the care of adults with cystic fibrosis. *Eur Respir J*; 47(2):420-8.
- Farrell P.M., White T.B., Derichs N., Castellani C. & Rosenstein B.J.** (2017a): Cystic Fibrosis Diagnostic Challenges over 4 Decades: Historical Perspectives and Lessons Learned. *J Pediatr*; 181S:S16-S26.
- Farrell P.M., White T.B., Ren C.L., Hempstead S.E., Accurso F., Derichs N., Howenstine M., McColley S.A., Rock M., Rosenfeld M., Sermet-Gaudelus I., Southern K.W., Marshall B.C., Sosnay P.R.** (2017b): Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr*; 181S:S4-S15.e1
- Gentsch M., Dang H., Dang Y., Garcia-Caballero A., Suchindran H., Boucher R.C. & Stutts M.J.** (2010): The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator impedes proteolytic stimulation of the epithelial Na⁺ channel. *J Biol Chem*; 285:32227-32232.
- Gibson L.E. & Cooke R.E.** (1959): A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*; 23:545-549.
- Gillie D.J., Pace A.J., Coakley R.J., Koller B.H. & Barker P.M.** (2001): Liquid and ion transport by fetal airway and lung epithelia of mice deficient in sodium-potassium-2-chloride transporter. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 25:14-20.
- Graeber S.Y., Hug M.J., Sommerburg O., Hirtz S., Hentschel J., Heinzmann A., Dopfer C., Schulz A., Mainz J.G., Tümmler B. & Mall M.A.** (2015): Intestinal current measurements detect activation of mutant CFTR in patients with cystic fibrosis with the G551D mutation treated with ivacaftor. *Am J Respir Crit Care Med*; 192:1252-1255.
- Griesenbach U., corresponding author Pytel K.M., Alton E.W.F.W.** (2015): Cystic Fibrosis Gene Therapy in the UK and Elsewhere. *Hum Gene Ther*; 26(5): 266–275.
- Hebestreit H., Hebestreit A.** (2013): Zystische Fibrose. In: Speer C.P., Gahr M. (Hrsg). Pädiatrie. Berlin, Heidelberg: Springer (4.Aufl); Kap.22: 499-505.
- Hirtz S., Gonska T., Seydewitz H.H., Thomas J., Greiner P., Kuehr J., Brandis M., Eichler I., Rocha H., Lopes A., Barreto C., Ramalho A., Amaral M.D., Kunzelmann K. & Mall M.** (2004): CFTR Cl⁻ channel function in native human colon correlates with the genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Gastroenterology*; 127:1085-1095.
- Hoffmann E.K., Lambert I.H. & Pedersen S.F.** (2009): Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev*; 89:193-277.
- Högenauer C., Santa Ana C.A., Porter J.L., Millard M., Gelfand A., Rosenblatt R.L., Prestidge C.B. & Fordtran J.S.** (2000): Active intestinal chloride secretion in human carriers of cystic fibrosis mutations: an evaluation of the hypothesis that heterozygotes have subnormal active intestinal chloride secretion. *Am J Hum Genet*; 67:1422-1427.
- Hug M.J., Derichs N., Bronsveld I. & Clancy J.P.** (2011): Measurement of ion transport function in rectal biopsies. *Methods Mol Biol*; 741:87-107.
- Kälin N., Claaß A., Sommer M., Puchelle E. & Tümmler B.** (1999): F508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest*; 103:1379-1389.

- Kerem B., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwald M. & Tsui L.C.** (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*; 245:1073-1080.
- Knowles M., Gatzky J. & Boucher R.** (1981): Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med*; 305:1489-1495.
- Knowles M., Gatzky J. & Boucher R.** (1983a): Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. *J Clin Invest*; 71:1410-1417.
- Knowles M.R., Paradiso A.M. & Boucher R.C.** (1995): *In vivo* nasal potential difference: techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis. *Hum Gene Ther*; 6:445-455.
- Knowles M.R., Stutts M.J., Spock A., Fischer N., Gatzky J.T. & Boucher R.C.** (1983b): Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science*; 221:1067-1070.
- Kunzelmann K., Koslowsky T., Hug T., Gruenert D.C. & Greger R.** (1994): cAMP-dependent activation of ion conductances in bronchial epithelial cells. *Pflugers Arch*; 428:590-596.
- LeGrys V.A.** (1996): Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: practical considerations. *J Pediatr*; 129:892-897.
- LeGrys V.A., Applequist R., Briscoe D.R., Farrell P., Hickstein R., Lo S.F., Passarell R., Rheinheimer D.W., Rosenstein B.R. & Vaks J.E.** (2009): CLSI. Sweat Testing: Sample Collection and Quantitative Chloride Analysis; Approved Guideline - Third Edition. CLSI documents C34-A3. Editor: Wayne P.A: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Li C. & Naren A.P.** (2005): Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. *Pharmacol Ther*; 108:208-223.
- Liu B., Hathorne H., Hill A., Hovick G., Cohen M., Beamer J., Solomon M.G., Clancy J.P. & Rowe S.M.** (2010): Normative values and receiver operating characteristics of NPD for diagnostic measurements; *Pediatr Pulmonol*; 303:307-307.
- Lubamba B., Dhooghe B., Noel S. & Leal T.** (2012): Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem*; 45:1132-1144.
- Mall M., Bleich M., Greger R., Schreiber R. & Kunzelmann K.** (1998a): The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways. *J Clin Invest*; 102:15-21.
- Mall M., Bleich M., Schurlein M., Kuhr J., Seydewitz H.H., Brandis M., Greger R. & Kunzelmann K.** (1998b): Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivation by cAMP. *Am J Physiol*; 275:G1274-1281.
- Mall M., Hirtz S., Gonska T. & Kunzelmann K.** (2004): Assessment of CFTR function in rectal biopsies for the diagnosis of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*; 3:165-169.
- Mall M., Wissner A., Seydewitz H.H., Hübner M., Kuehr J., Brandis M., Greger R. & Kunzelmann K.** (2000): Effect of genistein on native epithelial tissue from normal individuals and CF patients and on ion channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol*; 130:1884-1892.
- Naehrlich L.** (2007): Sweat testing in CF. *Thorax*; 62:462.

- Naehrlich L., Ballmann M., Davies J., Derichs N., Gonska T., Hjelte L., van Konigsbruggen-Rietschel S., Leal T., Melotti P., Middleton P., Tummler B., Vermeulen F. & Wilschanski M.** (2014): Nasal potential difference measurements in diagnosis of cystic fibrosis: an international survey. *J Cyst Fibros*; 13:24-28.
- Naehrlich L., Burkhart M., Wosniok J.** (2018): Deutsches Mukoviszidose-Register, Berichtsband 2017. Mukoviszidose e.V. & Mukoviszidose Institut gGmbH, Bonn.
- 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.** (2013): S2-Konsensus-Leitlinie „Diagnose der Mukoviszidose“ (AWMF 026-023) unter Federführung der Gesellschaft für Pädiatrischen Pneumologie. *AWMF-Leitlinien-Registriernummer 026-023*, Düsseldorf; <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/026-023.html>.
- Naehrlich L. & Zimmer K.P.** (2013): Neonatal cystic fibrosis screening--time to begin. *Dtsch Arztebl Int*; 110:354-355.
- Ooi C.Y., Dupuis A., Ellis L., Jarvi K., Martin S., Gonska T., Dorfman R., Kortan P., Solomon M. & Tullis E.** (2012): Comparing the American and European diagnostic guidelines for cystic fibrosis: same disease, different language. *Thorax*; 67:618-624.
- Pedemonte N. & Galletta L.J.** (2012): Pharmacological correctors of mutant CFTR mistrafficking. *Front Pharmacol*; 3:175; doi: 10.3389/fphar.2012.00175.
- Proesmans, M., Vermeulen, F., Boeck, K.D.** (2008). What's new in cystic fibrosis? From treating symptoms to correction of the basic defect. *Eur J Pediatr* 167: 839-849.
- Raju S.V., Jackson P.L., Courville C.A., McNicholas C.M., Sloane P.A., Sabbatini G., Tidwell S., Tang L.P., Liu B., Fortenberry J.A., Jones C.W., Boydston J.A., Clancy J.P., Bowen L.E., Accurso F.J., Blalock J.E., Dransfield M.T. & Rowe S.M.** (2013): Cigarette smoke induces systemic defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function. *Am J Respir Crit Care Med*; 188:1321-1330.
- Robinson M. & Bye P.T.** (2002): Mucociliary clearance in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*; 33:293-306.
- Rowe S.M., Clancy J.P. & Wilschanski M.** (2011): Nasal potential difference measurements to assess CFTR ion channel activity. *Methods Mol Biol*; 741:69-86.
- Rowe S.M., Daines C., Ringshausen F.C., Kerem E., Wilson J., Tullis E., Nair N., Simard C., Han L., Ingenito E.P., McKee C., Lekstrom-Himes J., Davies J.C.** (2017): Tezacaftor-Ivacaftor in Residual-Function Heterozygotes with Cystic Fibrosis. *N Engl J Med*; 377(21):2024-2035.
- Rowe S.M., Miller S. & Sorscher E.J.** (2005): Cystic fibrosis. *N Engl J Med*; 352:1992-2001.
- Schuler D., Sermet-Gaudelus I., Wilschanski M., Ballmann M., Dechaux M., Edelman A., Hug M., Leal T., Lebacqz J., Lebecque P., Lenoir G., Stanke F., Wallemacq P., Tummler B. & Knowles M.R.** (2004): Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurements. *J Cyst Fibros*; 3:151-155.
- Sens B. & Stern M.** (2013): Qualitätssicherung Mukoviszidose 2012. Hippocampus Verlag, Bad Honnef, Deutschland.

- Sermet-Gaudelus I., Girodon E., Roussel D., Deneuille E., Bui S., Huet F., Guillot M., Aboutaam R., Renouil M., Munck A., des Georges M., Iron A., Thauvin-Robinet C., Fajac I., Lenoir G., Roussey M. & Edelman A.** (2010): Measurement of nasal potential difference in young children with an equivocal sweat test following newborn screening for cystic fibrosis. *Thorax*; 65:539-544.
- Sawicki S., McKone E.F., Pasta D.J., Millar S.J., Wagener J.S., Johnson C.A., Konstan M.W.** (2015): Sustained Benefit from Ivacaftor Demonstrated by Combining Clinical Trial and Cystic Fibrosis Patient Registry Data. *Am J Respir Crit Care Med*; 192(7):836-42. doi: 10.1164/rccm.201503-0578OC.
- Smith J.J., Travis S.M., Greenberg E.P. & Welsh M.J.** (1996): Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell*; 85:229-236.
- Sousa M., Servidoni M.F., Vinagre A.M., Ramalho A.S., Bonadia L.C., Felicio V., Ribeiro M.A., Uliyakina I., Marson F.A., Kmit A., Cardoso S.R., Ribeiro J.D., Bertuzzo C.S., Sousa L., Kunzelmann K., Ribeiro A.F. & Amaral M.D.** (2012): Measurements of CFTR-mediated Cl⁻ secretion in human rectal biopsies constitute a robust biomarker for Cystic Fibrosis diagnosis and prognosis. *PLoS One*; 7: e47708: doi: 10.1371/journal.pone.0047708.
- Stopsack M. & Hammermann J.** (2009): Neonatal screening for cystic fibrosis: pros and cons. *Monatsschrift Kinderheilkunde*; 157:1222-1229.
- Taylor-Cousar J.L., Munck A., McKone E.F., van der Ent C.K., Moeller A., Simard C., Wang L.T., Ingenito E.P., McKee C., Lu Y., Lekstrom-Himes J., Elborn J.S.** (2017): Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N Engl J Med*; 377(21):2013-2023.
- van Barneveld A., Stanke F., Ballmann M., Naim H.Y. & Tümmler B.** (2006): *Ex vivo* biochemical analysis of CFTR in human rectal biopsies. *Biochim Biophys Acta*; 1762:393-397.
- van Meegen M.A., Terheggen-Lagro S.W., Koymans K.J., van der Ent C.K. & Beekman J.M.** (2013): Apical CFTR expression in human nasal epithelium correlates with lung disease in cystic fibrosis. *PLoS One*; 8: doi: 10.1371/journal.pone.0057617.
- van Meegen M.A., Terheggen-Lagro S.W., van der Ent C.K. & Beekman J.M.** (2011): CFTR expression analysis in human nasal epithelial cells by flow cytometry. *PLoS One*; 6: e27658: doi: 10.1371/journal.pone.0027658.
- Veeze H.J., Sinaasappel M., Bijman J., Bouquet J. & de Jonge H.R.** (1991): Ion transport abnormalities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis. *Gastroenterology*; 101:398-403.
- Vermeulen F., Proesmans M., Feyaerts N. & De Boeck K.** (2011): Nasal potential measurements on the nasal floor and under the inferior turbinate: Does it matter? *Pediatr Pulmonol*; 46:145-152.
- Wainwright C. E., Elborn J. S., Ramsey B. W., Marigowda G., Huang X., Cipolli M., Colombo C., Davies J. C., De Boeck K., Flume P. A., Konstan M. W., McColley S. A., McCoy K., McKone E. F., Munck A., Ratjen F., Rowe S. M., Waltz D., Boyle M. P.; TRAFFIC Study Group; TRANSPORT Study Group** (2015): Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med*; 373(3):220-31.

Wilschanski M., Famini H., Strauss-Liviatan N., Rivlin J., Blau H., Bibi H., Bentur L., Yahav Y., Springer H., Kramer M.R., Klar A., Ilani A., Kerem B. & Kerem E. (2001): Nasal potential difference measurements in patients with atypical cystic fibrosis. *Eur Respir J*; 17:1208-1215.

9. Anhang

Tab. 8: Verwendete Geräte und Materialien.

Anzahl	Typ	Hersteller
1	Wasserbad	Julabo
4	Perfusor® Space	Braun
1	Powerlab 4/30	AD Instruments
1	BMA-200 AC/DC portabler Bioamplifier	AD Instruments
1	ISO-Z Isolation <i>headstage</i> für BMA-200	AD Instruments
1	AD Instruments Software: GLP Client V6 (win)	AD Instruments
1	Silberchlorid-Elektrode, Electrode Mini Calomel Reference (13-620-79) – for calomel setups	Fisher Scientific
2	AgCl Microelektrodenhalter	
1	Manometer Willital (UE7605)	Ulrich GmbH
2	Becherschraubgläser	
--	Leitungen	
1	Nasensonde zur Bestimmung der PD, 45 cm , Ø 2,5 mm Ref.: I0202US	Marquat Genie Biomedical
4	3-Wegehahn	Braun
1	Subkutannadel	Braun
1	Rhinoskop	
1	Kaltlichquelle	
1	Statikmatte	
1	Pflaster weiß	
	Sterile Tupfer	
	Nierenschale	
1	Kopfstütze	
4	Spritze für Lösungen	
1	Sauginstrument nach Willital	Ulrich GmbH
1	Ussing-Kammer EM-LVSY-4	Physiologic Instruments
1	<i>Voltage-clamp</i> -Verstärker VCC MC-4S Multi- Channel	Physiologic Instruments
16	Elektroden P2020	Physiologic Instruments

4	Schieber 1,5 mm P2407C	Physiologic Instruments
4	Schieber 1,2 mm P2407B	Physiologic Instruments
2	Softtip Spritzen	Physiologic Instruments
1	Wasserbad Julabo Lauda Eco Silva	Julabo
1	Carbogengas (95% O ₂ , 5% CO ₂)	Linde
1	Powerlab	AD Instruments
1	Labchart	AD Instruments
1	Windows Computer	DELL

Tab. 9: Verwendete Chemikalien, deren Molekulargewicht sowie die Bezugsquelle.

Chemikalie	Molekulargewicht (g/mol)	Hersteller
NaCl	58	Sigma
CaCl ₂	147	Merck
KCl	76	Merck
MgCl ₂	95	Merck
HEPES	238	Roth
Na ₂ HPO ₄	142	Sigma
NaH ₂ PO ₄	120	Sigma
NaHCO ₃	84	Sigma
D-Glucose	180	Merck
Indometacin	358	Sigma
Amilorid HCl - USP	266	Sigma
Forskolin	411	Sigma
IBMX	222	Sigma
Genistein	270	Sigma
Carbachol	183	Sigma
DIDS	499	Sigma
Histamin	184	Sigma
DMSO	78	Sigma
Ethanol	46	Roth

10. Publikationsverzeichnis

Bagheri-Hanson A.*, **Nedwed S.***, **Rueckes-Nilges C.** & **Naehrlich L.** (2014): Intestinal current measurement versus nasal potential difference measurements for diagnosis of cystic fibrosis: a case-control study. *BMC Pulm Med*; 4:156.

**Contributed equally*

11. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Die vorgelegte Thesis grenzt sich durch ein eigenes Probandenkollektiv und eine eigenständige Fragestellung bei vergleichbaren Untersuchungsmethoden von einer von Frau Bagheri-Hanson vorgelegten Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen mit dem Titel „Einfluss von Tabakrauch auf die CFTR-Funktion“ ab.

Ort, Datum

Unterschrift

12. Danksagung

Nach Abschluss der Dissertation möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer als Leiter der Abteilung der Allgemeinen Pädiatrie und Neonatologie der Universität Gießen danke ich für die bereitwillige Übernahme meiner Betreuung.

Insbesondere möchte ich mich bei meinem Betreuer PD Dr. Lutz Nährlich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die fortwährende Unterstützung, kompetente Betreuung sowie für das Korrektur lesen dieser Dissertation bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei dem ganzen Team der Mukoviszidose-Ambulanz bedanken. Allen voran bei Kai Haus für die Durchführung der Iontophorese-Messungen sowie der Unterstützung im Labor.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Bagheri-Hanson und Frau Claudia Rückes-Nilges für die Entnahme der Probiopsien der ICM-Messungen, die kompetente und fachliche Unterstützung im Labor sowie für die Unterstützung bei der Publikation der Daten.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Mukoviszidose-Patienten und Probanden, die an dieser Studie teilgenommen haben und die Dissertation damit erst ermöglichten.

Der größte Dank gilt meiner Familie und Constanze Vitzthum, die mich während des Studiums sowie der gesamten Phase der Dissertation uneingeschränkt unterstützten. Insbesondere möchte ich mich bei Constanze Vitzthum bedanken, die mich während dieser Zeit begleitete und mir stets bedingungslos ihre Hilfe anbot. Ohne sie hätte ich sicher das ein oder andere Mal den Mut verloren.