

Universitätsklinikum des Saarlandes

Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie

Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Michael Zemlin

Dissertation

Die Rolle von MBL und SFTPD bei Pseudomonas infizierten Patienten mit zystischer Fibrose

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt dem Universitätsklinikum des Saarlandes 2021

von

Klemens Paul Bernhard Freitag

Geb. am 27.01.1992 in Düsseldorf

Tag der Promotion: 12.10.2021

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstatter:

Prof. M. Zemlin

Prof. R. Bals

Inhalt

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Abkürzungsverzeichnis..... | 5 |
| 2 | Zusammenfassung | 6 |
| 3 | Abstract..... | 8 |
| 4 | Einleitung | 10 |
| 4.1 | Definition und Epidemiologie..... | 10 |
| 4.2 | Ätiologie und Pathogenese..... | 10 |
| 4.2.1 | CFTR-Mutation | 10 |
| 4.2.2 | Pathogenese..... | 11 |
| 4.3 | Diagnostik | 12 |
| 4.4 | Klinisches Bild und Verlauf | 13 |
| 4.5 | Therapie | 14 |
| 4.6 | Prognose | 15 |
| 4.7 | Pseudomonas aeruginosa..... | 15 |
| 4.8 | Angeborene Immunität | 16 |
| 4.9 | Mustererkennungsrezeptoren | 17 |
| 4.9.1 | Mannose bindendes Lektin | 17 |
| 4.9.2 | Surfactant-Protein-D | 21 |
| 4.10 | Problemstellung und Zielsetzung | 24 |
| 5 | Material und Methoden | 25 |
| 5.1 | Materialien | 25 |
| 5.2 | Studiendesign und Patientenkollektiv..... | 26 |
| 5.3 | DNA-Extraktion | 27 |
| 5.4 | Genotypisierung | 29 |
| 5.4.1 | Methode der Polymerase-Kettenreaktion..... | 29 |
| 5.4.2 | Gen- und Primer-Sequenzen | 30 |
| 5.5 | Real-Time-PCR | 31 |
| 5.5.1 | MBL-Klassen | 32 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.5.2 | SFTPD-Klassen | 33 |
| 5.6 | Messung der MBL- und SFTPD-Serumspiegel | 33 |
| 5.6.1 | MBL-ELISA..... | 33 |
| 5.6.2 | SFTPD-ELISA..... | 34 |
| 5.7 | Statistik | 35 |
| 6 | Ergebnisse | 36 |
| 6.1 | Patientencharakteristika | 36 |
| 6.2 | MBL..... | 39 |
| 6.2.1 | MBL2-Genotypen und MBL-Serumspiegel..... | 39 |
| 6.2.2 | MBL und PA-Infektion | 41 |
| 6.2.3 | MBL bei chronischer PA-Infektion..... | 44 |
| 6.2.4 | MBL und Lungenfunktion | 46 |
| 6.3 | SFTPD | 47 |
| 6.3.1 | SFTPD-Genotypen und -Serumspiegel | 47 |
| 6.3.2 | SFTPD und PA-Infektion | 50 |
| 6.3.3 | SFTPD und Lungenfunktion | 51 |
| 6.3.4 | SFTPD und CRP | 52 |
| 6.3.5 | SFTPD und chronische PA-Infektion | 53 |
| 7 | Diskussion | 55 |
| 7.1 | MBL..... | 55 |
| 7.2 | Pseudomonas aeruginosa und FEV1 | 56 |
| 7.3 | SFTPD | 57 |
| 7.4 | Spezifischen Therapie | 62 |
| 7.5 | Andere Modifikatoren | 62 |
| 7.6 | Stärken und Limitationen der Arbeit..... | 63 |
| 7.7 | Zusammenfassung | 67 |
| 8 | Literatur | 69 |
| 9 | Publikation | 77 |

| | | |
|----|-----------------|----|
| 10 | Danksagung..... | 77 |
| 11 | Anhang | 78 |

1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| ASL | airways surface liquid |
| BALF | Bronchoalveoläre Lavage |
| CF | Cystische Fibrose |
| CFTR | cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator |
| FEV1 | forced expiratory volume |
| FRET | fluorescence resonance energy transfer |
| HWE | Hardy-Weinberg-Gleichgewicht |
| MGB | minor grove binder |
| MBL | Mannose bindendes Lektin |
| NFQ | non fluorescent Quencher |
| PA | Pseudomonas aeruginosa |
| PA0 | stets PA negativ |
| PA1 | Zeitpunkt der ersten PA-Infektion |
| PAC | Beginn der chronischen PA-Infektion |
| PAI | Intermittierende PA-Infektion |
| PAMP | pathogen associated molecular pattern |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PRR | pattern recognition receptors |
| rpm | revolutions per minute |
| SNP | single nucleotid polymorphism |
| SFTPD | Surfactantprotein-D |

2 Zusammenfassung

Die zystische Fibrose (engl. *cystic fibrosis*, CF) ist mit einer heterozygoten Frequenz von 4% eine der häufigsten, angeborenen Stoffwechselerkrankungen Europas. Auch wenn ihre primär symptomatische Behandlung in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht hat, werden die Betroffenen meist nicht älter als 50 Jahre. Eine signifikante Verringerung der Lebensqualität und Lebenserwartung ergibt sich, wenn die Lunge der Patienten chronisch mit *Pseudomonas aeruginosa* (PA) besiedelt ist.

Da die CF sich auf der einen Seite durch einen sehr variablen Krankheitsverlauf auszeichnet und auf der anderen Seite über 1900 Gene eine Verbindung zum CF Phänotyp aufweisen, liegt es nahe anzunehmen, dass Gene, welche Proteine der pulmonalen Immunantwort codieren, einen entscheidenden Einfluss auf die Besiedlung mit PA haben und damit auch auf die Lebensqualität und Lebenserwartung der Betroffenen.

Für die verschiedenen Allele des Mannose bindenden Lektins (MBL) wurde schon mehrfach gezeigt, dass sie die pulmonale PA Besiedlung signifikant beeinflussen.

Zum Surfactant-Protein-D (SFTPD), als entscheidender Bestandteil der primären Immunantwort und Regulator der Oberflächenspannung in der Lunge, haben wir als einer der ersten Studien die Frage erörtert, ob die unterschiedlichen Genotypen einen Einfluss auf die pulmonale PA Besiedlung haben.

Dazu haben wir bei 35 CF-Patienten, die in der Universitätsklinik des Saarlandes zwischen 1988 und 2018 betreut wurden und homozygot für $\Delta F508$ waren, eine Genotypisierung der SFTPD und MBL Gene durchgeführt und die SFTPD und MBL Spiegel im Blut bestimmt. Des Weiteren wurde retrospektiv der Besiedlungsstatus mit PA, die FEV1 (engl. *forced expiratory volume*, FEV1) und andere klinisch relevante Daten während des Behandlungszeitraums erhoben.

Wir konnten zeigen, dass MBL-suffiziente Patienten signifikant später chronisch mit PA besiedelt wurden als MBL-insuffiziente CF-Patienten (9,8 vs. 16,4 Jahre; $p < 0,03$ Log RankTest).

Als erste Studie konnte wir zudem nachweisen, dass Träger des SFTPD Haplotypen 11Thr160Ala-270Ser im Vergleich zum 11Met-160Thr-270Ser Haplotypen ein dreifach erhöhtes Risiko besitzen eine PA-Infektion zu erleiden (HR 3,0 [95%CI: 1,1 - 8,6], $p < 0,04$). Für die verschiedenen SFTPD Genotypen zeigte sich keine signifikante Korrelation zur PA Besiedlung. Jedoch konnten wir eine negative Korrelation zwischen dem SFTPD Serumlevel und der FEV1 (Spearman $r = 0,41$, $p < 0,03$), unabhängig vom PA Status nachweisen.

So konnten wir den MBL-Genotyp als wichtigen Screeningparameter ausweisen, um „patients at risk“ frühzeitig zu erfassen und antibiotisch therapieren zu können. Um die Rolle von SFTPD in Bezug auf die PA Besiedlung der Lunge umfassender zu verstehen sind weitere Forschungen in größeren Kollektiven und mit bronchoalveolärer Lavage (BALF) notwendig, um die pulmonal wirksame SFTPD-Menge zu erfassen und neben der Korrelation zwischen dem SFTPD-Haplotypen 11Thr-160Ala-270Ser und dem PA-Status auch eine signifikante Korrelation zwischen SFTPD-Genotyp und PA-Status herstellen zu können.

3 Abstract

The role of MBL and SFTPD in infected *Pseudomonas* patients with cystic fibrosis

With a heterozygous frequency of 4%, cystic fibrosis (CF) is one of the most common, congenital metabolic diseases in Europe. Even if their primarily symptomatic treatment has made great strides in recent years, those affected usually do not get older than 50 years. There is a significant reduction in quality of life and life expectancy if the patient's lungs are chronically populated with *Pseudomonas aeruginosa* (PA).

Since CF is characterized by a very variable course of the disease and over 1900 genes have a connection to the CF phenotype, it is reasonable to assume that genes that encode proteins of the pulmonary immune response have a decisive influence on the colonization with PA.

The various alleles of mannose-binding lectin (MBL) have been shown several times to significantly influence pulmonary PA colonization.

Regarding surfactant protein D (SFTPD), as a crucial component of the primary immune response and regulator of surface tension in the lungs, we were the first to discuss the question of whether the different genotypes have an impact on pulmonary PA colonization.

For this purpose, 35 Patients with CF, who were cared for in the Saarland University Clinic between 1988 and 2018 and were homozygous for $\Delta F508$, we genotyped the SFTPD and MBL genes and determined the SFTPD and MBL levels in the blood. Furthermore, the colonization status with PA, forced expiratory volume (FEV1) and other clinically relevant data was collected retrospectively during the treatment period.

We were able to show that MBL-deficient patients were colonized with chronic PA significantly later than MBL-deficient CF patients (9,8 vs. 16,4 years; $p < 0,03$ Log Rank-Test)

As the first study known to us, we were also able to prove that carriers of the SFTPD haplotype 11Thr-160Ala-270Ser have a threefold increased risk of suffering a PA infection compared to the 11Met-160Thr-270Ser haplotype (HR 3.0 [95% CI: 1.1 - 8.6], $p < 0.04$). There was no significant correlation to PA colonization for the various SFTPD genotypes. However, we were able to demonstrate a negative correlation between the SFTPD serum level and the FEV1 (Spearman $r = 0.41$, $p < 0.03$), regardless of the PA status.

We were able to identify the MBL genotype as an important screening parameter in order to detect "patients at risk" at an early stage. In order to better understand the role of SFTPD in

relation to the PA colonization of the lungs, further research in larger collectives and with bronchoalveolar lavage (BALF) is necessary to determine the pulmonary effective amount of SFTPD and the PA status may also be related to the SFTPD genotype.

4 Einleitung

4.1 Definition und Epidemiologie

Die CF ist eine Systemerkrankung exokriner Drüsen von der 4% der Weltbevölkerung betroffen ist. Damit zählt sie mit einer Inzidenz zwischen 1/2500 und 1/1600 zu der zweithäufigsten, angeborenen Stoffwechselerkrankung der weißen Bevölkerung Europas. Die autosomal-rezessiv vererbte Krankheit beruht auf Mutationen im CFTR-Gen (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), welches einen ubiquitär vorkommenden Chloridkanal kodiert. Heterogene Gen-Träger sind asymptomatisch. 5% der nordeuropäischen Bevölkerung zählen mit einem mutierten CF-Allel zu diesen Trägern, sodass es bei 1 unter 600 Geschlechtspartnern mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% zu einem an CF erkrankten Kind kommt [43, 78]. Weshalb die CF-Mutation eine so starke Inzidenz erreichte, ist Gegenstand aktueller Forschung. Am wahrscheinlichsten ist, dass die heterozygoten Träger einen Selektionsvorteil durch vermindertes Ansprechen auf intestinale Toxine, zum Beispiel von *Escherichia coli* besaßen [78].

4.2 Ätiologie und Pathogenese

4.2.1 CFTR-Mutation

Das CFTR-Gen ist über 250kB groß und liegt auf Chromosom 7. Über 1900 Mutationen dieses Gens stehen in Zusammenhang mit CF. Die mit Abstand häufigste Mutation (90%) ist $\Delta F508$. Homozygot macht diese Mutation immerhin noch einen Anteil von 50% der CFTR Mutationen aus. Auf Grund einer drei Basen-Deletion kommt es bei dieser Mutation zum Verlust von Phenylalanin an Position 508. Dies führt zu einer Proteinefehlfaltung, woraufhin das Protein ubiquitinyliert wird und nicht zur apikalen Zellmembran, sondern zum Proteosom transportiert und dort abgebaut wird [6, 7]. Die verschiedenen CFTR-Mutationen werden in sechs Klassen nach ihrem Pathomechanismus eingeteilt.

Dieser korreliert nicht immer mit dem klinischen Ausprägungsgrad der Mukoviszidose. Dies ist wahrscheinlich auf Grund von Umweltfaktoren und weiteren modulierenden Mutationen der Fall.

$\Delta F508$ gehört zur Mutationsklasse II. Die zweithäufigste Mutationsgruppe ist die Mutationsklasse I, bei der es unter anderem durch ein verfrühtes Stopcodon zu keiner CFTR-Produktion kommt.

Mutationsklasse III exprimiert einen Chloridkanal, der sich nicht öffnen lässt. Bei Mutationsklasse IV ist der Kanal dagegen in seiner Durchlässigkeit eingeschränkt. Bei Mutationsklasse V kommt es zu einer Unterproduktion des CFTR-Proteins. Ursächlich hierfür sind meist Mutationen im Intron, die zu einem fehlerhaften Spleißen führen.

Die letzte Mutationsklasse VI ist relativ selten. Dabei kommt es zu einer verringerten Stabilität des CFTR-Proteins, auf Grund dessen das Protein vermehrt aus der Zellmembran abgebaut wird [7]. In Abbildung 1 sind die sechs Klassen der CFTR-Mutationsformen zusammen mit der physiologischen Form dargestellt.

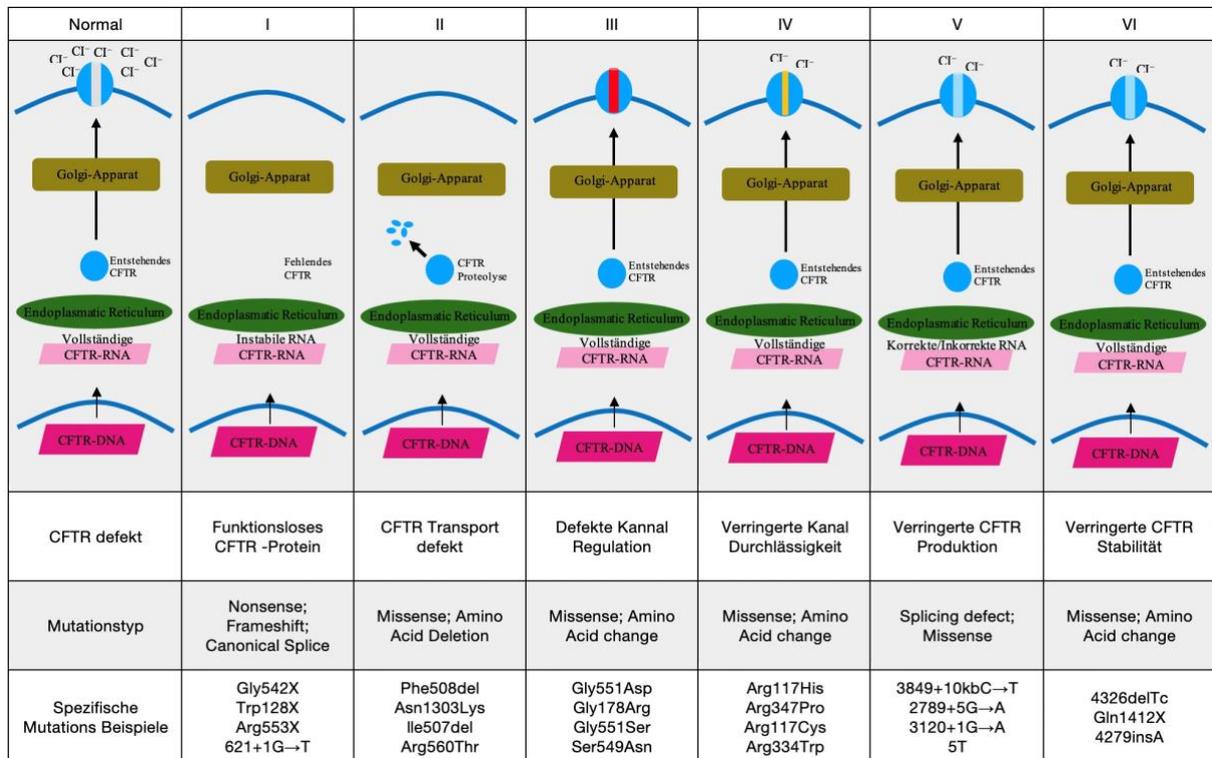


Abbildung 1: CFTR-Mutationsklassen [7]

4.2.2 Pathogenese

Die CFTR-Mutationen betreffen nur einen Chloridkanal, haben jedoch vielfältige Auswirkungen im ganzen Körper. Auf Grund des Mangels an (funktionsfähigen) Chloridkanälen im Epithel, kommt es bei den Betroffenen zur Bildung zäher Schleimsekrete in Dünndarm, Pankreas, Bronchialsystem, Gallenwegen, Gonaden und Schweißdrüsen [49]. Die CF-Lunge beeinflusst entscheidend die Prognose der Erkrankten [92]. Aus diesem Grund ist ihre Sekretbildung und Erregerabwehr besonders gut – jedoch nicht ohne Kontroversen – erforscht.

Die beschriebene, pathologische Schleimbildung in der Lunge lässt sich durch die Doppelfunktion des CFTR-Proteins erklären. Es transportiert Chlorid und Bikarbonat durch die Apikalmembran exokriner Drüsen [92]. Durch den verringerten Chloridtransport, sinkt der osmotische Wassernachstrom und es kommt in Folge der ungenügenden Hydratisierung zur Bildung muköser Sekrete [6].

Durch die unzureichende Bikarbonatsekretion sinkt der pH-Wert in den Ausführungsgängen der Becherzellen. Dies führt erstens zu einer mangelhaften Wasseraufnahme der sezernierten Muzine, die ein alkalische Milieu bevorzugen und präzipitieren [92]. Zweitens werden durch

den verringerten pH-Wert die Fähigkeiten zur Erregerabwehr der Flüssigkeitsschicht (engl. *airway surface liquid*, ASL) direkt geschwächt [73]. Die vermehrte Keimbesiedlung des Bronchialsystems bei CF-Patienten ergibt sich also einerseits durch die Bildung hochmuköser Sekrete und dem dadurch gestörten Zilienschlag und andererseits durch die geschwächte Immunabwehr im ASL [6].

4.3 Diagnostik

Eine frühe und sichere Diagnose der CF verbessert nachweislich die kognitive, körperliche und pulmonale Entwicklung [92]. Im August 2015 wurde deshalb flächendeckend das CF-Neugeborenen-Screening in Deutschland eingeführt. Die erste Stufe dieses Screenings ist der IRT-Test. Das „Immun reaktive Trypsinogen“ wird bei CF-Patienten aufgrund der verstopften Pankreas-Ausführungsgänge vermehrt in die Blutbahn abgegeben und kann dort gemessen werden. Der Schweißtest ist, neben diversen anderen Testmöglichkeiten, seit seiner Einführung 1959 der Goldstandard zur Diagnose der CF. Beim Schweißtest wird – nach Anregung der Schweißsekretion durch Pilocarbin – die Natrium-Chloridkonzentration im Schweiß bestimmt. Indiziert ist er als zweite Stufe nach auffälligem Screening durch den IRT-Test, bei Geschwistern mit CF und klinischem Verdacht. Klinisch verdächtig sind Mekoniumileus, chronischer Husten mit Sputumproduktion, pathologische Bildgebung der Lunge, exokrine Pankreasinsuffizienz, Rektumprolaps, Salzverlust-Syndrom oder der Nachweis persistierender PA, Staphylokokken, Hämophilus und/oder Burkholderia.

Bei Schweißchlorid-Konzentrationen über 60 mmol/l schließt sich die CFTR-Genetik noch zur Bestimmung des Mutationstyps im CFTR-Gen an. Bei Konzentrationen zwischen 30 und 59 mmol/l müssen zwei Mukoviszidose verursachende Mutationen nachgewiesen werden, um CF zu diagnostizieren. Andernfalls müssen noch weitere indirekte Tests auf eine eventuelle CF durchgeführt werden. Bei Schweißchloridkonzentrationen unter 29 mmol/l gilt die CF als unwahrscheinlich und es gilt nach

CFTR assoziierten Erkrankungen zu suchen oder anderen Ursachen für den Eingangsverdacht nachzugehen [67, 66, 82]. In Abbildung 2 ist die Vorgehensweise zur Diagnose der CF nach den aktuellen Leitlinien dargestellt.

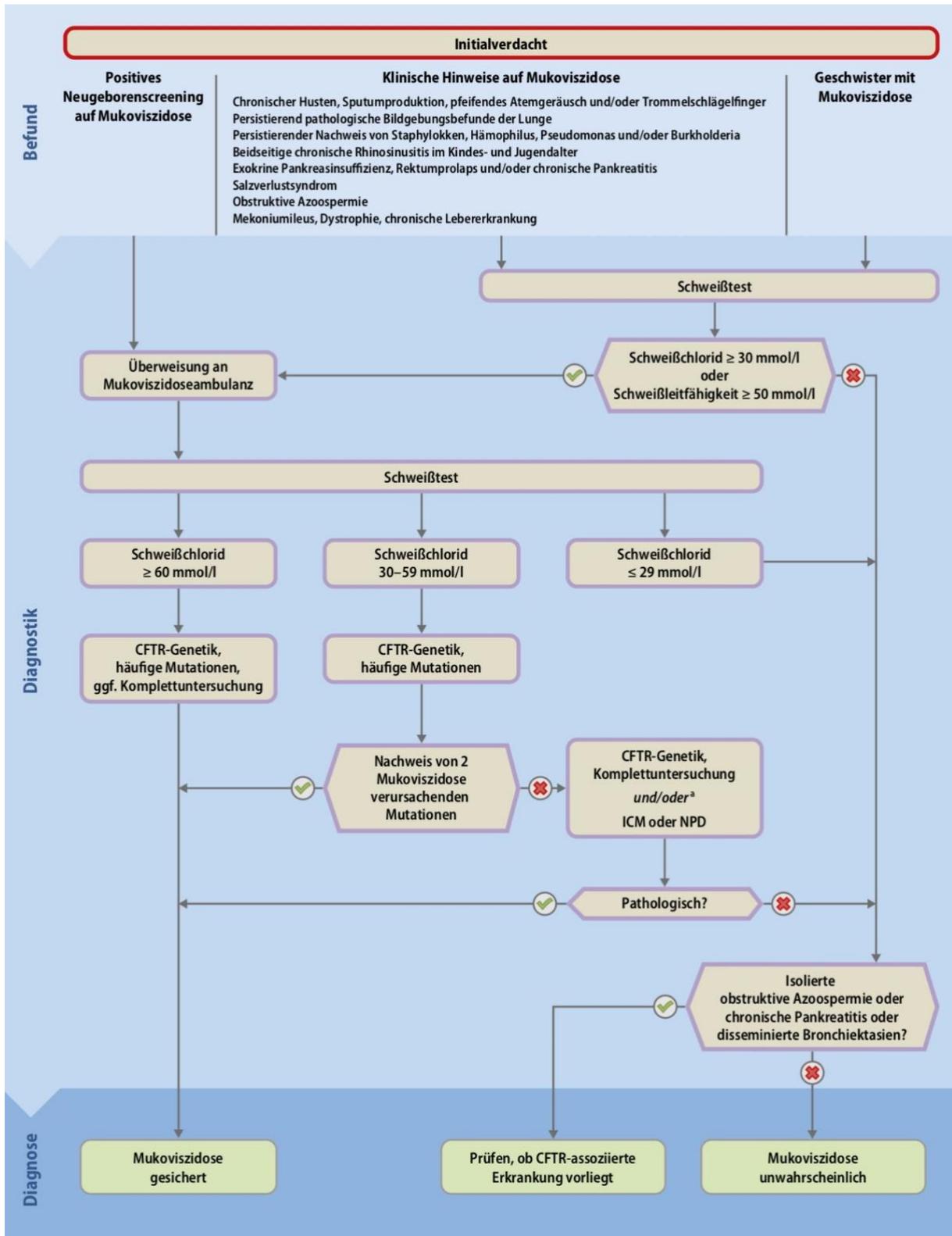


Abbildung 2: Handlungsempfehlung zur Diagnose der CF [68], Seite 2.

4.4 Klinisches Bild und Verlauf

Die sehr vielfältige Klinik der CF ist geprägt durch die verminderte Lungenfunktion und die Malabsorption des Gastrointestinaltraktes. Mit Letzterem eng verknüpft ist die exokrine

Pankreas- und Lebermalfunktion. Eine normale exokrine Pankreasfunktion liegt nur bei 15% der CF-Patienten vor [67]. Dazu kommen Infertilität bei 98% der männlichen CF-Patienten durch Obstruktion des Vas deferens, eine mögliche funktionelle Infertilität bei Frauen auf Grund des verdickten Zervixsekretes sowie die Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 1 oder 2 nach dem ersten Lebensjahrzehnt [77].

Die Lunge von CF-Patienten ist aufgrund der geschwächten Erregerabwehr einer permanenten Keimbesiedlung und damit einhergehenden Entzündungsreaktionen ausgesetzt. Neben vielen selbst apathogenen, aber immunmodulierenden Keimen, dominiert in den ersten Lebensjahren *Staphylococcus aureus* und darauf PA (80%) [92, 49, 43]. In Folge der wiederkehrenden Inflammationen kommt es zur Ausbildung multipler Bronchiektasien und zum fibrotischen Umbau des Lungengewebes, sodass die Gasaustauschfläche kontinuierlich abnimmt. Ein valider Verlaufsparmeter für die abnehmende Lungenfunktion ist die FEV₁, die im Durchschnitt 1,3 Prozentpunkte pro Jahr sinkt [92].

Der hohe Energiebedarf durch die verstärkte Atemarbeit und die fortwährenden Infektionen kann nur unzureichend durch die Malabsorption im Darm gedeckt werden. Diese ergibt sich aus der ungenügenden Ausschüttung von Pankreasenzymen, durch die mukös verstopften Ausführungsgänge und dem Mangel an Gallenblasensekret auf Grund von Leberinsuffizienz. Der schlechte Ernährungsstatus macht die Lunge zusätzlich anfälliger für Infektionen, sodass die Lungeninfektionen, dadurch verursachte Übelkeit und die Malabsorption einen *circulus vitiosus* bilden [77]. Klinisch äußert sich dies, trotz aufwendigem Ernährungsmanagement, in einem kachektischen Erscheinungsbild der CF-Patienten [49].

4.5 Therapie

Die aktuell mögliche Therapie der CF verfolgt primär das Ziel, die pulmonalen und gastrointestinalen Beschwerden der Patienten symptomatisch zu behandeln.

Den regelmäßigen Abstrichen entsprechend werden Keimbesiedlungen der Lunge großzügig mit antimikrobiellen Chemotherapeutika behandelt. Besonders bei PA sollte eine konsequente antibiotische Eradikation erfolgen. Zur Schleimmobilisation und Bronchospasmyolyse werden hypertone Kochsalzlösungen und β -Mimetika eingesetzt. Dazu kommen anti-inflammatorische Medikamente und physiotherapeutisches Atemtraining.

Eskalativ können Sauerstofftherapie, Maskenbeatmung und als *ultima ratio* die Lungentransplantation angewendet werden.

Um die gestörte Funktion des exokrinen Pankreas zu ersetzen, bekommen CF-Patienten zur Mahlzeit magensäureresistente Pankreasenzyme substituiert. Dazu kommen hochkalorische, fettreiche Nahrung und die Substitution fettlöslicher Vitamine. Bei schlechtem

Ernährungsstatus können hochkalorische Zwischenmahlzeiten oder sogar eine Ernährungssonde erwogen werden [92].

4.6 Prognose

Die Lebenserwartung für CF-Patienten hat sich in den letzten Jahrzehnten aufgrund der verbesserten symptomatischen Therapie dramatisch gesteigert. So betrug die Überlebensrate im Jahr 2003 von den 1978 in Großbritannien geborenen, männlichen CFPatienten nur 55%. Bei den 1992 geborenen waren es schon 97%. Heute beträgt die mittlere Lebenserwartung für CF-Patienten über 50 Jahre [23].

Da 90% der Todesursachen von CF-Patienten auf Infektionen der Lunge zurückzuführen sind [74], ist die Lungenfunktion der wichtigste Parameter, um Aussagen über den individuellen Verlauf der Krankheit zu machen. Durch eine Infektion mit PA verschlechtert sich die Lungenfunktion nachweislich schneller als bei PA freien Patienten [4, 65]. Aus diesem Grund sollte die Infektionsprävention fest in die Patientenumgebung integriert werden. Dies ist etwa durch getrennte Ambulanzzeiten von Infizierten und Nicht-Infizierten, Keimfilter in den Wasserhähnen und Vermeidung von feuchten Hygieneutensilien möglich [92].

Obwohl noch viele weitere Keime in CF-Lungen regelmäßig nachgewiesen werden (zum Beispiel *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* und seltener *Burkholderia cepacia*), führt nur die Infektion mit PA zu einer verkürzten Lebenserwartung bei CFPatienten [47].

4.7 *Pseudomonas aeruginosa*

PA ist ein gramnegatives, begeißeltes und 1,5-30 µm langes Bakterium. Als obligater

Aerobier wächst er an der äußersten Flüssigkeitsoberfläche und bildet so ein regelrechtes Häutchen auf der Bakterienmasse aus. Weitere Erkennungsmerkmale sind ein süßlicharomatischer Geruch durch die Bildung von Aminoacetophenon und ein blaugrüner Wundeiter (*aeruginosus* = grünspanartig). Aufgrund seiner niedrigen Nährstoffansprüche besitzt PA unter anderem eine hohe Umweltpersistenz, was ihn zu einem wichtigen Verursacher nosokomialer Infektionen macht.

Hinzu kommen sehr effektive Abwehrmechanismen gegenüber den meisten Antibiotika. Zum einen ist die Membran von PA durch besonders enge und undurchlässige Poren ein großes Penetrationshindernis für die meisten Antibiotika [25], zum anderen besitzt PA ein Pumpsystem, welches neben diversen anderen Substanzen auch β -Lactame, Chloramphenicol, Fluorchinolone, Makrolide, Sulfonamide, Tetrazykline aus der Zelle transportiert. Das Auftreten beider Mechanismen – angepasst an verschiedenste Antibiotika – entsteht jedoch erst durch vielfache Mutationen [15]. So unterscheiden sich akut infizierte Patienten in ihren PA-Resistenzmechanismen massiv von chronisch besiedelten PAPatienten.

Dabei gehen auch Virulenzfaktoren verloren, die für die akute Infektion entscheidend sind (zum Beispiel osmotisches Gleichgewicht, Biofilm-Produktion, Exotoxin A-Regulation). Die *loss-of-function*-Mutationen können in Analogie zu onkologischen Therapien auch Angriffspunkte für neue therapeutische Möglichkeiten bei der entscheidenden PA-Eradikation darstellen [84].

Die entscheidende Rolle der Mutationen für die Resistenzentwicklung zeigt sich auch darin, dass bei akuter PA-Infektion meist keine Hypermutatoren isoliert werden können, wohingegen bei 11 von 30 CF-Patienten mit chronischer PA-Infektion PA-Stämme isoliert werden können, deren DNA-Duplikation mit deutlich mehr Fehlern und Mutationen verläuft. Dies befähigt diese Stämme dazu schneller Resistenzmechanismen aufzubauen und verdeutlicht die Relevanz einer frühen und konsequenten antibiotischen Therapie bei PA-Infektion von CF-Patienten [15].

Das Auftreten von PA ist für die CF nicht spezifisch. Allerdings findet sich PA hier deutlich häufiger als bei anderen chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen [80]. So leiden 50-80% der CF-Patienten mit 18 Jahren an einer chronischen PA-Besiedlung [82]. Die Prävalenz von PA ist jedoch stark altersabhängig. Im Alter von 10 Jahren gibt es einen sprunghaften Anstieg der PA-Besiedlung von ca. 40 auf 80% [48].

Eine mögliche Theorie für die massive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs von CF-Patienten durch PA ist die Tatsache, dass das physiologische CFTR-Protein direkt an der Bindung und Phagozytose von PA beteiligt ist. Wenn diese frühe Elimination des Keims durch eine CF-Mutation gestört ist, entwickelt sich PA zur mukoiden (= schleimbildenden) Form weiter, welche sich der körpereigenen Immunantwort erfolgreich entzieht, sodass es zu einer fortwährenden, überschießenden Entzündungsreaktion mit den beschriebenen Umbauprozessen in der Lunge kommt.

Eine Besonderheit von PA verhindert bisher die Entwicklung eines Impfstoffes gegen das Bakterium: Bei der Umwandlung zur mukoiden Form verändert PA seine Oberflächenstruktur, sodass bereits gebildete Antikörper wirkungslos werden [47].

4.8 Angeborene Immunität

Bei den für CF entscheidenden Infektionen der Lunge nimmt die angeborene Immunität eine Schlüsselrolle ein. Diese basiert auf allen postnatal vorhandenen physikalischen, chemischen, zellulären sowie humoralen Abwehrmechanismen gegen Krankheitserreger. Als sogenannte unspezifische Immunreaktion benötigt sie keine erregerspezifische Anpassung. Für die Lunge ist der Hustenreflex, das Flimmerepithel der Atemwege und der von diesem produzierte Schleim mit den darin enthaltenen Peptiden und Immunglobulinen relevant. Da das CFTR-Protein in der apikalen Membran des Lungenepithels sitzt, liegt es nahe, eine Dysfunktion des pulmonalen Epithels oder der Proteine des von ihm sezernierten Schleims als Ursache der frühen und wiederkehrenden Lungeninfektionen bei CF-Patienten anzunehmen [40].

4.9 Mustererkennungsrezeptoren

Sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*, PRRs) gehören zum angeborenen Immunsystem und dienen unter anderem Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen zur Erkennung von Antigenen. Im Gegensatz zu den Rezeptoren des erworbenen Immunsystems ist ihre Spezifität sehr gering und bezieht sich vor allem auf wiederkehrende Strukturen von Infektionserregern - die sogenannten „*pathogen-associated molecular patterns*“ (PAMPs). Dazu zählen zum Beispiel Zellwandbestandteile von Bakterien (Lipopolysaccharide) oder Pilzen (1,3-Glucan).

Die löslichen PRRs binden diese Strukturen, um sie für das Immunsystem zu markieren und zum Beispiel der Phagozytose zugänglich zu machen (Opsonierung). Im Folgenden geht es um die löslichen PRRs MBL und SFTPD, die zu der Familie der Kollektine gehören [25].

4.9.1 Mannose bindendes Lektin

MBL gehört zur unspezifischen Immunabwehr des Körpers und wird von Leberzellen als Akut-Phase-Protein gebildet. Zusammen mit SP-A und SFTPD ist es Teil der Kollektine. Diese bestehen aus meist identischen Polypeptidketten mit einer Kollagen-ähnlichen Region auf die eine C-Typ-Lektin-Domäne folgt. Die Polypeptide bilden Homotrimere, die eine Untereinheit mit einer kollagenartigen Helix und drei gruppierten Lektin-Domänen enthalten.

Diese Untereinheiten wiederum assoziieren sich zu größeren Strukturen aus 12-18 Polypeptiden [76].

Als C-Typ-Lektin bindet MBL Calcium-abhängig die Kohlenhydratreste Mannose, Fucose und N-Acetyl-Glucosamin, wie sie auf bakteriellen Glycanen zu finden sind [25]. Neben Bakterien wie *Salmonella montevideo*, *Listeria monocytogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria subflava* und *Streptococcus agalactiae* bindet MBL jedoch auch eine Reihe von Hefen und Viren wie *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* oder das Humane-Immundefizienz-Virus sowie das Influenzavirus [93]. Des Weiteren erkennt MBL wie auch SFTPD apoptotische Zellen, freie DNA und veränderte, körpereigene Antigene. Letzteres verdeutlicht die immunregulatorische Funktion von MBL zusätzlich zu seinen Funktionen in der First-Line-Response [91].

Die Bindung mit den genannten Infektionserregern bewirkt eine Konformationsänderung der Mannose-bindenden Protein-assozierten Serin-Protease 2 (MASP-2). Durch diese Konformationsänderung spaltet MASP-2 die Komplementkomponente C4. Wie in Abbildung 3 dargestellt, initiiert MBL damit als einziges Kollektin den Lektin-Signalweg an deren Ende C3b den von MBL gebunden Erreger opsoniert und so seine Eliminierung durch Makrophagen eingeleitet wird [25, 76]. Zusätzlich interagiert MBL unabhängig vom MASP-2 abhängigen Lektin-Signalweg mit Phagozyten-Rezeptoren und stimuliert deren Phagozytose durch Verbindung des Erregers mit phagozytierenden Zellen [11].

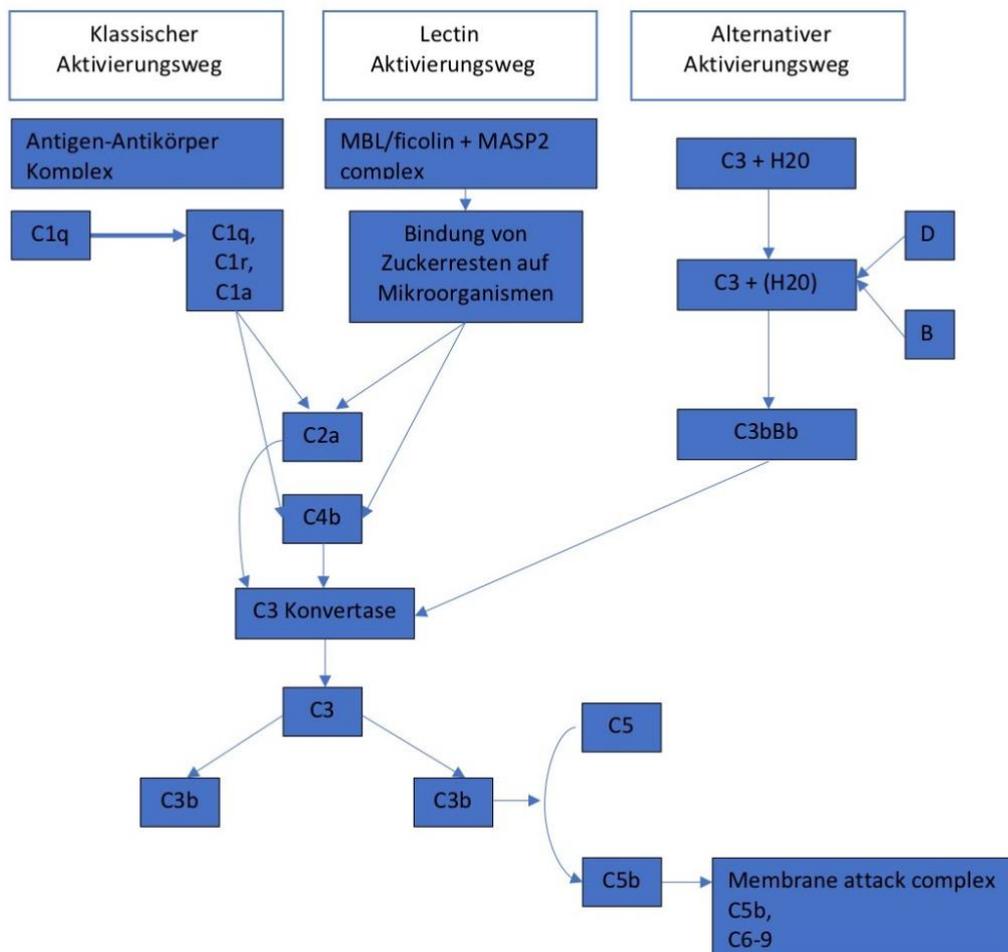


Abbildung 3: Komplement Aktivierungswege [11]

4.9.1.1 MBL-Insuffizienz

MBL-Insuffizienz zählt mit 10-30% (abhängig von der verwendeten Definition) zu den häufigsten Beeinträchtigungen des Immunsystems [12, 46]. Wie in Zwillingsstudien gezeigt wurde [46], lassen sich die Unterschiede im MBL-Serumspiegel stark, aber nicht ausschließlich auf genetische Variationen im MBL2 auf Chromosom 10 zurückführen. Dabei unterscheidet man zwei Allele im Exon 1: Der Wildtyp-Allel A hat keine negativen Auswirkungen auf den MBL-Spiegel.

Als Allel O zusammengefasst werden drei Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) in Codon 52 (Allel D), 54 (Allel B) und 57 (Allel C), die die Oligomerisation von MBL beeinflussen und so die Menge an funktionsfähigem MBL im Serum reduzieren [88, 11, 28].

Zusätzlich gibt es noch Variationen in der Promoter-Region des MBL2, die vor allem bei heterozygoten Formen der oben genannten Strukturmutationen das Verhältnis von hochmolekularem, funktionsfähigem MBL zu niedermolekularem, funktionslosem MBL beeinflussen [28]. Geringere Spiegel des funktionellen MBL verursacht nur das Allel X an Position -221, anstelle von Allel Y.

Aufgrund von Kopplungsungleichgewichten zwischen der Promoter-Region und den Genvariationen, ergeben sich aus den möglichen 64 Kombinationen nur die folgenden krankheitsrelevanten Genotypen: Sie werden in Individuen mit hohem (YA/YA oder YA/XA), mittlerem (XA/XA oder YA/YO) und niedrigem (YO/XA oder YO/YO) MBL-Serumspiegel eingeteilt [88, 11].

Die Prävalenz der Mutationen in Codon 52, 54 und 57 unterscheidet sich zwischen den Populationen. Während die Codon 54-Mutation in der eurasischen Population mit 0,11-0,16% häufig vorkommt, ist die Codon 57-Mutation primär in der sub-Sahara Population (0,23-0,29%) verbreitet. Die Codon 52-Mutation ist mit einer Prävalenz von 0,05% oder weniger die seltenste Mutation unabhängig von der Population [63].

Grundsätzlich führt eine MBL-Insuffizienz aufgrund einer der genannten Mutationen zu einem erhöhten Infektionsrisiko [5, 52]. Des Weiteren sind rheumatoide Arthritis und systemischer Lupus erythematodes (SLE) mit den genannten Mutationen assoziiert und der Krankheitsverlauf von HIV infizierten Männern verläuft progressiver [93]. Einige Ergebnisse deuten jedoch auch darauf hin, dass die konstant hohe Prävalenz der Mutationen in einigen Populationen Überlebensvorteile schafften und somit durch einen positiven Selektionsdruck zu erklären sind [93, 31]. Die Mutationen in Codon 54 und 57 fanden wahrscheinlich sogar unabhängig voneinander in der afrikanischen und der nicht-afrikanischen Population statt [63].

Evolutionäre Vor- beziehungsweise Nachteile betreffen Frühgeburten, die signifikant häufiger mit den MBL-Genotypen des hohen MBL-Serum-Level assoziiert sind [94] und die Infektion mit Mykobakterien und Leishmaniose, die über die direkte Bindung der Bakterien an MBL leichter möglich ist [29]. Des Weiteren verhindern niedrige MBL-Serumkonzentrationen die negativen Effekte MBL-vermittelter, überschießender Entzündungsreaktionen [93].

4.9.1.2 Die Rolle von MBL bei zystischer Fibrose und Pseudomonas aeruginosa

Während akuter, pulmonaler Entzündungsprozesse tritt MBL vermehrt aus dem Blut in die Lunge über und lässt sich dort nachweisen. Niedrige MBL-Spiegel korrelieren mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen. Dies trifft auch auf die Infektanfälligkeit von CF-Lungen zu [35, 13].

Eine gute Möglichkeit, die Rolle von MBL bei CF-Patienten zu verstehen, ist der Vergleich von CF-Patienten des MBL-suffizienten Genotyps mit MBL-insuffizienten CF-Patienten.

Chalmers et al. [11] haben 2011 eine groß angelegte Meta-Analyse zu den Auswirkungen von MBL-Insuffizienz auf die FEV₁, die Besiedlung mit PA und die Lebenszeit bzw. Zeitpunkt der Lungentransplantation von CF-Patienten publiziert. So liegt das Alter der Erstbesiedlung mit PA bei den MBL-Insuffizienten in allen untersuchten Studien niedriger als bei den MBL-Suffizienten. Die unterschiedliche Ausprägung dieses Ergebnisses kam wahrscheinlich durch differierende Definitionen von MBL-Insuffizienz zustande.

In Bezug auf die FEV₁ zeigten Chalmers et al. [11], dass MBL-Insuffizienz mit einer reduzierten FEV₁ bei Erwachsenen einhergeht.

Für Kinder fand sich in keinem Vergleich eine signifikante Korrelation zwischen der MBL-Klasse und der FEV₁.

Die Analyse der Lebenszeit beziehungsweise des Zeitpunkts der Lungentransplantation ergab einen signifikanten Nachteil für Individuen der niedrigen MBL-Klasse.

Zusammenfassend erlitten MBL-insuffiziente Patienten früher akute und chronische PA Besiedlungen, hatten eine verringerte FEV₁ und verstarben früher [11].

Haerynck et al. [39] kamen bei gleicher MBL-Suffizienz-Definition wie Chalmers et al. [11] ebenfalls zu dem Ergebnis, dass MBL-Insuffizienz zu einer früheren Besiedlung mit PA bei CF-Patienten führt.

2015 publizierten Gravina et al. [35] unter einer geänderten MBL-Suffizienz-Definition weitere Ergebnisse zur Beeinflussung von MBL-Insuffizienz des Krankheitsverlaufes von CF-Patienten. Gravina et al. [35] definierten die intermediate MBL-Genotyp-Gruppe (XAXA, YAYO) im Gegensatz zu Chalmers et al. [11] als MBL-insuffizient statt als suffizient (MBL-Suffizienz: YAYA, YAXA; MBL-Insuffizienz: XAXA, YAYO, YOXA, YOYO). Dabei kamen sie zu folgenden Ergebnissen: MBL-insuffiziente CF-Patienten haben ein 3,5fach erhöhtes Risiko einen schweren klinischen Verlauf (nach Schwachmann Score) zu erleiden und der Erstbefall mit PA ist signifikant früher als bei MBL-suffizienten Patienten. Eine Beeinflussung der FEV₁ konnten sie nicht bestätigen. Jedoch zeigt sich in der mindestens 4 Jahre andauernden Verlaufsbeobachtung eine signifikant schlechtere FEV₁ bei MBL-insuffizienten Patienten im Vergleich zu MBL-suffizienten Patienten [35].

Unabhängig von der Einteilung der MBL-Serumspiegel-Klassen sind die Serum-Grenzwerte, die sich aus diesen ergeben und deren klinische Auswirkung in allen Studien die zentrale Fragestellung war, mit einem gewissen Vorbehalt zu betrachten, da sie Schwankungen unterliegen. So gibt es zum Beispiel auch bei den homozygoten A/A-Genotypen einzelne

Individuen, die nicht den für die hohe MBL-Spiegel Klasse erforderlichen MBL-Serumwert über 600 ng/ml erreichen. Das gleiche gilt für die niedrige MBL-Serumklasse (<200 ng/ml). Die mittlere MBL-Serumklasse bewegt sich um einen Mittelwert von 400 ng/ml [11].

Dass trotz dieser Problematik und unterschiedlicher MBL-Insuffizienz-Definitionen alle genannten Forschungsgruppen den MBL-Genotyp als wichtigen Modifikator für den Krankheitsverlauf der CF mit einer signifikant früheren PA-Besiedlung der MBL-insuffizienten Patienten ausweisen, zeigt die Stärke des Modifikators MBL für die CF.

Auf die FEV1 wurden die negativen Auswirkungen der MBL-Insuffizienz vor allem mit zunehmendem Lebensalter deutlich. Dies zeigten Garred et al. bereits 1999, als sie eine signifikante FEV1-Verschlechterung zwischen der MBL-suffizienten und -insuffizienten CF-Gruppe erst ab einem Lebensalter von 8 Jahren bis zum Alter von 16 Jahren feststellen konnten. Davor bestand nur eine geringfügig schlechtere FEV1 bei der MBL-insuffizienten Gruppe [31].

4.9.2 Surfactant-Protein-D

Das pulmonale Surfactant erfüllt zwei Kernaufgaben in der Lunge. Es reduziert die Oberflächenspannung in den Alveolen und übernimmt vielfältige, zum Teil noch ungeklärte, immunologische Aufgaben. 90% des Surfactants sind Lipide während die restlichen 10% durch Proteine gebildet werden. Dazu gehören auch die vier Surfactant-Proteine (SP): SP-A, SP-B, SP-C und SFTPD, benannt nach der Chronologie ihrer Entdeckung. Mit 50-70% hat SP-A zwar den größten Anteil, SP-B scheint jedoch eine Schlüsselrolle zu besitzen. Mutationen, die eine Malfunktion von SP-B verursachen, führen kurz nach der Geburt zu Atemversagen [14].

SP-B gehört zusammen mit SP-C zu den hydrophoben Surfactant-Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht. SP-A und SFTPD hingegen zählt man zu den hochmolekular-gewichtigen mit hydrophilen Eigenschaften.

Zusammen mit MBL und SP-A gehört SFTPD zu den Calcium-abhängig bindenden Kollektinen, deren Name sich aus den stets vorhandenen Kollagen- und Lektin-Domänen ableitet. Diese Domänen sind in Polypeptid-Ketten integriert, die zu einer Kollagen-TripleHelix verbunden werden, welche wiederum über Disulfid-Brücken zu höheren Oligomeren gefaltet werden. Daraus ergibt sich die in Abbildung 4 gezeigte kreuzförmige Struktur von SFTPD, wohingegen MBL eine Bouquet-Form erhält.

Über die mangelhafte Bindung von körperfremden Zuckerresten erkennt SFTPD vielfältige Mikroorganismen und agiert dabei sowohl als Opsonin, als auch als Komplement-Aktivator. An der Bildung des Surfactant-Komplex nimmt es dagegen nicht teil [42, 21].

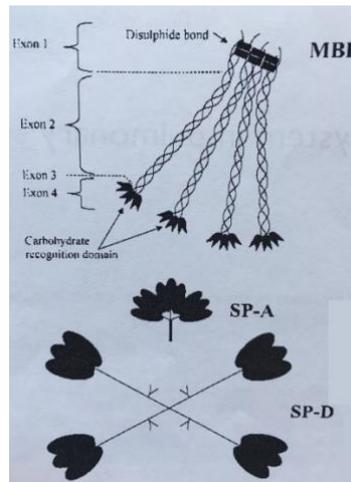


Abbildung 4: Aufbau von MBL im Vergleich zu SFTPD [21]

Das für SFTPD codierende Gen (SFTPD) liegt zusammen mit den Erbinformationen für SP-A und MBL auf dem langen Arm des Chromosoms 10q22.2-23.1 [44].

SFTPD wird primär von alveolaren Typ II und bronchialen Epithelzellen in den distalen Atemwegen synthetisiert [21]. SFTPD m-RNA wurde jedoch auch in Geweben verschiedenster Organe wie Leber, Pankreas, Zunge, Cervix und sogar in nicht epithelialen Geweben wie Herzmuskulatur und Ösophaguskulatur nachgewiesen. Das vielfältige Auftreten von SFTPD könnte auf seine diversen Funktionen sowohl in der primären Immunabwehr, als auch in der Immunregulation hindeuten [89]. Aus der Lunge tritt SFTPD primär über das alveoläre Epithel ins Blut über und bildet dort den Serumspiegel. Geringere SFTPD Anteile (circa 25%) könnten jedoch auch auf lymphatischem Weg oder über das Interstitium ins Blut übertreten. Dort wird es wahrscheinlich hauptsächlich über die Leber eliminiert, da es aufgrund seiner Größe nicht über die Niere filtriert werden kann [42].

Zwillingsstudien haben gezeigt, dass der Basis-Serumspiegel von SFTPD einem starken genetischen Einfluss unterliegt und nur geringfügig durch Umweltfaktoren beeinflusst wird. Infektion können nichtsdestotrotz – ausgehend vom SFTPD-Basis-Serumspiegel – zu einem SFTPD-Anstieg im Serum führen [85, 46]. Beispielsweise führen Endotoxine wie Lipopolysaccharide (LPS) zu einer erhöhten SFTPD-Gen-Expression in der Lunge [64]. Auch diverse akute und chronische Lungenerkrankungen führen zu einem Anstieg der SFTPD-Serumkonzentration [58, 57, 14].

Es gibt drei genetische Polymorphismen, die mit einer Aminosäure-Veränderung von SFTPD einhergehen: Codon 11 (Met11Thr), 160 (Ala160Thr) und 270 (Ser270Thr) [57].

Signifikante Unterschiede für das SFTPD-Serumspiegel entstehen durch die homozygoten Varianten in Codon 11. Erwachsene des Genotyps Met/Met besitzen einen signifikant höheren SFTPD-Serumspiegel, als Individuen des Genotyps Thr/Thr. Einige Studien konnten diesen

Zusammenhang nur bei Kindern nachweisen [71, 41, 57]. Zusätzlich zum quantitativen Effekt hat die genetische Variation in Codon 11 auch Einfluss auf die Funktionalität von SFTPD. So binden die Multimere, Dodecamere und Monomere, die nur beim Met/Met-Genotyp gebildet werden, signifikant stärker den Influenzavirus A [41, 57], sowie grampositive und gramnegative Bakterien. Wohingegen die SFTPD-Proteine vom Thr/Thr-Genotyp primär Lipopolysaccharide binden, also höchstens nachgestellte, noch ungeklärte Funktionen in der Immunantwort übernehmen [57].

Physiologischer Weise opsoniert SFTPD sowohl Bakterien als auch Pilze. Interaktionen wurden unter anderem für Influenza A, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae*, PA und *Escherichia coli* nachgewiesen [89]. Zur Elimination der Bakterien interagiert es mit Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und dendritischen Zellen [38]. Des Weiteren besitzt SFTPD auch direkt mikrobizidale Wirkung, indem es die Membranpermeabilität der opsonierten Erreger erhöht. Dies erleichtert sowohl das Eindringen von Antibiotika in die Zelle, als auch den Austritt von Proteinen aus der Zelle. Beides führt zur Elimination des Bakteriums [25].

Eine wichtige Funktion von SFTPD scheint außerdem zu sein, die Agglutination von PA - neben anderen Bakterien, Pilzen und Viren [8] – als Bindungsmediator zu unterstützen, sowohl in vivo als auch in vitro. Allerdings ist die Korrelation zwischen SFTPD-Konzentration und Agglutination von PA in vivo schwächer ausgeprägt als in vitro. Ein Grund dafür könnte der Einfluss anderer Modifikatoren sein, die für die Agglutination von PA relevant sind, z.B. MBL [38]. Andere Teams konnten keine Aggregation von PA durch SFTPD nachweisen, sondern nur eine Opsonierung von PA durch SFTPD und dadurch eine massiv gesteigerte Elimination von PA in Anwesenheit von SFTPD [79].

Die immunregulatorische Funktion von SFTPD zeigt sich besonders stark an SFTPD-Knockout-Mäusen. Diese entwickeln unter der fehlenden Hemmung von SFTPD spontane, progressiv verlaufende Lungenentzündungen mit Emphysembildung und einer erhöhten Metalloproteinase, Alveolar-Makrophagen und NF- κ B-Aktivität [54, 89]. Die Suppression der Entzündungsreaktion findet maßgeblich über toll-like Rezeptoren in den Makrophagen und alveolaren Epithelzellen statt [14]. Beim Menschen spielt die immunsuppressive Wirkung von SFTPD im Rahmen von Allergien eine wichtige Rolle. SFTPD und auch SP-A binden über ihre CRD-Region an Allergene von Hausstaub oder Pollen, blockieren damit die IgE Bindung und verhindern die Histamin-Ausschüttung. Auch therapeutische Anwendungen von rekombinantem SP-A und SFTPD bei unkontrollierten pulmonalen Entzündungsreaktionen oder Asthma wären dadurch denkbar [51].

4.9.2.1 Die Rolle von SFTPD bei zystischer Fibrose und *Pseudomonas aeruginosa*

In der bronchoalveolären Lavage (BALF) von CF-Patienten finden sich erniedrigte Werte für SFTPD, insbesondere während einer Infektion der Lunge [75, 70, 54]. Diese Tatsache steht im Kontrast zu den infektiösen Triggern der SFTPD-Expression, wie man sie etwa bei Ratten nach Zugabe von LPS gefunden hat [42]. Daten aus verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Herangehensweisen an dieses Phänomen lassen vermuten, dass die erniedrigten SFTPD-Werte in der BALF eine Folge der überschießenden Entzündungsreaktion sind und nicht CF selbst die Ursache ist [45].

Unabhängig davon ist der SFTPD-Serumspiegel zu betrachten. Für dieses wurde bei CF-Patienten eine inverse Korrelation im Verhältnis zur FEV1 nachgewiesen. Dementsprechend könnte die SFTPD-Serumkonzentration, wie schon bei anderen pulmonalen Erkrankungen (z.B. bei akutem Lungenversagen), ein stabiler Entzündungsmarker für CF-Patienten sein.

Für den Genotyp wurde im Gegensatz zu MBL bisher keine direkte Beeinflussung klinischer Verlaufparameter von CF-Patienten nachgewiesen [71].

4.10 Problemstellung und Zielsetzung

Der Krankheitsverlauf von Patienten, die an CF desselben Genotyps ($\Delta F508$) erkrankt sind, weist eine große Varianz auf. Insbesondere die Beeinträchtigung der Lunge weist eine große Variabilität innerhalb der $\Delta F508$ Homozygoten auf [19, 50].

Dies legt die Vermutung nahe, dass andere genetische Modifikatoren die Ausprägung der Krankheit beeinflussen. Externe Faktoren, wie Behandlung und soziales Umfeld, scheinen, eher einen geringen Einfluss auf den CF-Phänotyp zu haben [16].

Ein wichtiger Faktor, der direkt die Lebensqualität als auch die Lebenszeit der CF-Patienten beeinflusst, ist die Funktionalität der Lunge und deren Befall mit PA. Interessanterweise weist auch das Alter bei Erstinfektion mit PA und das Alter bei chronischer Besiedlung von CF-Lungen mit PA eine große Varianz innerhalb desselben Genotyps ($\Delta F508$) auf [39].

Da der MBL-Genotyp schon in einigen Arbeiten als wichtiger Modifikator für die Ausprägung von CF identifiziert wurde und SFTPD im engen funktionalen Zusammenhang zu PA-Besiedlung steht, möchte wir in dieser Arbeit einen möglichen Zusammenhang zwischen dem MBL- und SFTPD-Genotyp sowie dem Patientenalter bei Erstbefall mit PA, der Latenz zwischen Erst- und chronischer Besiedlung mit PA und dem Patientenalter bei der chronischen Besiedlung von CF-Lungen mit PA untersuchen.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

Die Materialien, Substanzen und Software, die wir in dieser Studie verwendet haben sind in Tabelle 1 und 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Laborequipment, Verbrauchsgüter und Assays

| Equipment | Details |
|--|--|
| Biophotometer | <i>Eppendorf AG, Hamburg, Germany</i> |
| Zentrifugen | <i>Zentrifuge 5804: Eppendorf AG, Hamburg, Germany EBA 12: Hettich GmbH & Co. KG Zentrifugen, Tuttlingen, Germany Microcentrifuge Model IR: Carl Roth , Taiwan [used in CSHW, Colombo]</i> |
| 7500 Real-Time PCR System | <i>Applied Biosystems, Darmstadt, Germany</i> |
| Thermoblocks | <i>Techne DRI-BLOCK® DB-3: Techne Cambridge Ltd., Duxford, Cambridge, UK Thermomixer Comfort: Eppendorf AG, Hamburg, Germany</i> |
| Vortexer | <i>Vibrofix VF 1 Electronic: IKA-Werk, Staufen im Breisgau, Germany</i> |
| Küvetten | <i>Cuvettes Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany</i> |
| MicroAmp®Optical 96-Well Reaction Applied Biosystems, Darmstadt, Germany Plate | <i>Applied Biosystems, Darmstadt, Germany</i> |
| Pipetten | <i>Eppendorf Reference Pipettes: Eppendorf AG, Hamburg, Germany</i> |
| Pipettenspitzen | <i>Sarstedt AG, Nümbrecht, Germany</i> |
| QIAmp DNA Mini Kit (250) | <i>QIAGEN GmbH, Hilden, Germany</i> |
| Human SFTPD Elisa Kit | <i>HK335, Edition 04-17: Hycult®Biotech, 5405 PB Uden Netherlands,</i> |
| Human MBL Elisa Kit | <i>HK323, Edition 09-18: Hycult®Biotech, 5405 PB Uden Netherlands,</i> |
| DNA-free water (<i>Molecular Biology Grade, 10 x 50 ml</i>) | <i>Eppendorf AG, Hamburg, Germany</i> |

| | |
|--|--|
| Ethanol (absolute) | <i>Riedel-de-Haën, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Germany</i> |
| TaqMan® SNP Genotyping Assays | <i>Assay IDs: C__2336608_20, C__2336610_10, C__27858274_10, C__1362980_10, C__26726205_10, C__26726209_10, :Applied Biosystems, Darmstadt, Germany</i> |
| Protein Kinase-K Solution | <i>QIAGEN GmbH, Hilden, Germany</i> |
| TaqMan® Reagents: <i>TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG</i> | <i>Applied Biosystems, Darmstadt, Germany</i> |

Tabelle 2: Genutzte Software

| Software | Details |
|--|---|
| Microsoft Office®: <i>Word 2018, Excel 2018</i> | <i>Microsoft Corporation Deutschland, Unterschleißheim, Germany</i> |
| <i>Citavi 6: Version 6.3.0.0</i> | <i>Swiss Academic Software GmbH</i> |
| Statistical Package for Social Science for Windows (SPSS): Version 20.0 | <i>SPSS GmbH Software, Munich, Germany</i> |

5.2 Studiendesign und Patientenkollektiv

In einem retrospektiven Studiendesign haben wir Daten von Kindern mit CF und homozygoter $\Delta F508$ -Mutation analysiert, die zwischen 1988 und 2018 in der CF-Ambulanz der Universitätsklinik des Saarlandes gesehen und betreut wurden. Eingeschlossen wurden Patienten mit vollständigem Datensatz und mit Einwilligung zur Studie. Zusätzlich mussten Blutproben von den Patienten zur weiteren Genotypisierung des MBL2 und SFTPD sowie zur Messung der Serumspiegel verfügbar sein. Die EDTA-Blutprobe wurde im Rahmen der Routine-Blutentnahme bei einem der regulären Vorstellungstermine in der CF-Ambulanz zu Studienzwecken abgenommen. Die Blutproben wurden innerhalb einer Stunde nach Entnahme für 15 Minuten und 4°C bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die feste Phase und das Plasma wurden für spätere Messungen bei -80°C gelagert.

In der Studie wurden folgende Zeitpunkte definiert: „T1“ als Zeitpunkt der Blutentnahme zur Messung der Serumspiegel von MBL und SFTPD und „T2“ als Zeitpunkt der letzten Stuserhebung

An beiden Zeitpunkten wurden alle relevanten klinischen Daten retrospektiv erhoben (unter anderem Körpergewicht, Körperlänge, Serumwerte und FEV1). Für alle Patienten wurden die relevanten klinischen Daten (unter anderem Körpergewicht, Körperlänge, Serumwerte und FEV1) sowie der Zeitpunkt der ersten PA-Infektion (PA1) und der Beginn einer chronischen PA-Infektion (PAC) retrospektiv erhoben.

Als erstes Auftreten (PA1) wurde der Zeitpunkt gewählt, an dem PA erstmalig im Sputum nachgewiesen werden konnte. Die chronische PA-Infektion wurde nach den europäischen CF-Leitlinien definiert [90]: Der Nachweis von mindestens 50% PA-positiven Proben, mit mindestens einem Monat Probenabstand und mindestens 6 Proben im Jahr, gilt demnach als chronische PA-Infektion. Als Alter der PAC-Infektion wurde das Lebensalter beim ersten PA-Nachweis aus der chronischen PA-infizierten Probenreihe definiert. Jedes andere PAAuftreten wurde, gemäß den Leitlinien, als intermittierend definiert (PAI).

Unsere Studie erhielt ein positives Ethikvotum von der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes (Kenn-Nr. 220/05).

5.3 DNA-Extraktion

Wir extrahierten die DNA unserer Patienten aus dem entnommenen EDTA-Blut. Die Schritte unserer DNA-Extraktion sind in der folgenden Tabelle 3 beschrieben.

Tabelle 3: Ablauf der DNA-Extraktion

| Ablauf | Details |
|------------------------------|---|
| 1. Aufbrechen der Blutzellen | Zusammen mit 180 µl Pufferlösung ATL wurde das EDTA-Blut in die Mikrozentrifugen-Röhrchen gegeben. Im Anschluss werden diese für 15 Sekunden (s) gevortext. |
| | Die Reaktion wird im Thermomixer-Comfort für 15 Minuten (min) bei 90° Celsius (C) inkubiert. Danach folgt ein kurzes Zentrifugieren bei 10 Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i> : rpm) |
| | 20µl der Protein-Kinase-K Lösung werden hinzugefügt. Diese Reaktion wird kurz gevortext und bei 56 Grad für 60 min im „Techne DRI-Block DB-3“ inkubiert. Eine weitere Zentrifugation bei 10rpm folgt. |

| | |
|-----------------------------|---|
| | <p>Im Anschluss werden 200µl der AL Pufferlösung hinzugefügt, die Reaktion für 15s gevortext, im Thermomixer-Comfort bei 70°C für 15min inkubiert und schließlich bei 10000rpm für 1min zentrifugiert.</p> |
| | <p>Dann werden 200µl Ethanol zur Reaktion hinzugefügt und für 15s gevortext. Schließlich wird das Röhrchen kurz bei 10000rpm zentrifugiert, um Tropfen von der Innenseite des Deckels zu entfernen.</p> |
| <p><i>2. Adsorption</i></p> | <p>Dieses Reaktionsgemisch wird in einen QIAmp Spin-Column getan, welches sich in einem 2ml Sammelröhrchen befindet und bei 8000rpm für 1min zentrifugiert wird.</p> |
| | <p>Die QIAmp Spin-Column wird nun in ein neues Sammelröhrchen getan und 500µl Waschpuffer AW1 werden dem SpinColumn hinzugefügt. Dieses wird bei 8000rpm für 3min zentrifugiert. Dann wird die QIAmp Spin-Column wieder in ein neues Sammelröhrchen getan, um zuletzt 500µl Waschpuffer AW2 dem Spin-Column hinzuzufügen. Anschließend wird es erneut bei 14000rpm für 3min und nochmal für 1min bei 4000rpm zentrifugiert.</p> <p>Nach jeder Zentrifugation wird die abzentrifugierte Flüssigkeit verworfen.</p> |

| | |
|---|---|
| <p>3. Herauslösen der Membrangebundenen DNA</p> | <p>Der Spin-Column wird in ein 1,5ml Auffangröhrchen getan und es werden 120 µl Herauslösungspuffer AE hinzugetan. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die DNA durch Zentrifugation bei 8000rpm für 1min herausgelöst. Das herauszentrifugierte Filtrat wird anschließend in das selbe SpinColumn und Auffangröhrchen zurückgetan, um im Anschluss für 1min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 8000rpm für 1min zentrifugiert zu werden.</p> <p>Durch Messung der optischen Dichte des Filtrats mit einem Bio-Photometer bei 260nm und 280nm wird die Konzentration und die Reinheit der DNA sichergestellt.</p> <p>Zuletzt werden die Proben beschriftet und bei -20° C zur weiteren Verwendung eingefroren.</p> |
|---|---|

5.4 Genotypisierung

5.4.1 Methode der Polymerase-Kettenreaktion

Zur Untersuchung der extrahierten DNA auf SNPs in den MBL2 und SFTPD codierenden Genen muss diese in hoher Anzahl vorliegen. Aus diesem Grund wird vor der eigentlichen Genotypen-Bestimmung die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) durchgeführt.

1983 von Kary Mullis erfunden ahmt die PCR die physiologische DANN-Replikation nach. Allerdings läuft sie exponentiell ab und ist um ein Vielfaches schneller. Als Ausgangsstoffe benötigt man die zu replizierende DNA, zwei Primer, die spezifisch für diese DNA-Region sind, eine thermostabile Taq-Polymerase, Nukleotide und eine entsprechende Pufferlösung.

Die Taq-Polymerase nutzt den Primer als Startmolekül und hybridisiert von diesem ausgehend einen zur Ausgangs-DNA komplementären Tochterstrang. Nach einer thermischen Denaturierung des DNA-Doppelstrangs in zwei Einzelstränge beginnt die TaqPolymerase erneut mit der Bildung komplementärer Tochterstränge. Dieser Zyklus setzt sich fort bis die

gewünschte DNA-Menge erreicht ist. Die drei Phasen der PCR unterscheiden sich primär in ihrer Temperatur und sind im Folgenden genauer beschrieben:

- Zur DNA-Replikation braucht die Taq-Polymerase DNA-Einzelstränge. Dazu wird die Reaktionslösung auf 92°C erhitzt, so dass sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Nukleotiden lösen. Dieser Prozess wird Denaturierung genannt.
- Im zweiten Schritt, der Hybridisierung, wird die Lösung auf 62°C heruntergekühlt. Dadurch können sich die spezifischen Primer an den beiden DNA-Einzelsträngen anlagern und mit diesen hybridisieren. Gleichzeitig lagert sich ab dem zweiten Zyklus der zweite, entgegengesetzte Primer an einen Einzelstrang an, so dass es ab diesem Zeitpunkt nur noch zu einer Replikation des gewünschten DNA-Abschnittes kommt.
- Im dritten und letzten Schritt des PCR-Zyklus, der Polymerisation, hybridisiert die Taq-Polymerase die Nukleotide in der Pufferlösung zu einem zum Mutterstrang komplementären Tochterstrang. Die optimale Reaktionstemperatur für die Taq-Polymerase liegt bei 60°C.

Durch diesen sich mindestens 20 bis 30mal wiederholenden Zyklus werden in kurzer Zeit viele Replikation des gewünschten DNA-Stranges hergestellt. Die einzelnen Phasenzeiten und deren Arbeitstemperaturen der von uns genutzten PCR sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Real-Time PCR Bedingungen dieser Studie

| Reaktionsschritt | Temperatur | Zeit |
|------------------------------|------------|-------|
| UNG Aktivierung | 50°C | 120s |
| Initiale Denaturierung | 95°C | 10min |
| Denaturierung | 92°C | 15s |
| Hybridisierung | 60°C | 60s |
| Polymerisation | | |
| Abschließende Polymerisation | 60°C | |

Insgesamt führten wir 40 Zyklen der Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation durch.

5.4.2 Gen- und Primer-Sequenzen

Die Basen-Abfolge der Primer ist essentiell für die Replikation des exakten DNA-Abschnittes. Die Taq-Polymerase nutzt den Primer als Starter-Nukleotid und wird von einem weiteren bei der Bildung des Tochterstranges gestoppt, so dass nur der von den Primern eingeschlossene

DNA-Abschnitt repliziert wird. Tabelle 5 zeigt die von uns verwendeten Primer mit ihren Basenfolgen und die PCR-Reagenzien zur SNP-Analyse.

Tabelle 5: Untersuchte SNP und Primer Sequenzen

| GEN | SNP | reference SNP ID | Ort | Basensequenz | Primersequenz |
|-------|-------|------------------|---|--|--|
| SFTPD | T135C | rs721917 | Chr10: 79,946,568– 79,946,569 | CATGACCAGGGTGCAAGCACTGGGC[A/G] TTGTTCTGTCBCACTAGGCTCTCTC | Erfasst bei Applied Biosystem |
| | A581G | rs2243639 | Chr10: 79,941,966– 79,941,967 | TTCCACTGCTCACCTGCTGCCCTG[C/T] GTTTCCAGGGACTCCACCGCTCACCA | Erfasst bei Applied Biosystem |
| | T911A | rs3088308 | Chr10: 79,938,112 - 79,938,113 | GCATTCTCAGCGGCAGAGCGTGGAG[A/T] GGCCAACGTCCACCAGCCTGTGTG | Erfasst bei Applied Biosystem |
| MBL2 | C219T | rs5030737 | Chr10: 52,771,48 2- 52,771,483 | CCCTTTTCTCCCTTGGTGCCATCAC[A/G] CCCATCTTTGCCTGGGAAGCCGTTG | Erfasst bei Applied Biosystem |
| | G226A | rs1800450 | Chr10: 52,771,47 5- 52,771,476 | TGGTTCCCCTTTTCTCCCTTGGTG[C/T] CATCACGCCCATCTTTGCCTGGGAA | Forward Primer: MBL2_Exon1226F: 5'GGCTTCCCAGGCAAAGATG- 3' Reverse Primer: MBL2_Exon1- 226R: 5'GCCCAACACGTACCTGGTT- 3' |
| | G235A | rs1800451 | Chr10: 52,771,466 - 52,771,467 | ACACGTACCTGGTTCCCCTTTTCT[C/T] CCTTGGTGCCATCACGCCCATCTTT | Erfasst bei Applied Biosystem |
| | C221G | rs7096206 | Chr10: 52,771,925 - 52,771,926 | GCTGGAAGACTATAAACATGCTTTTC[C/G] GTGGCAGTGAGAACAAATGGGACCG | Erfasst bei Applied Biosystem |

Codon 11 Met-Thy

Codon 160 Thr Ala

Codon 270 Ser Thr

5.5 Real-Time-PCR

Zur SNP-Analyse verwendeten wir das 7500 Real-Time-PCR System von Applied Biosystem. Die Software des Systems wurde zur Versuchskontrolle, Überwachung und Ergebnisanalyse genutzt.

Bei der sog. Taqman-Real-Time-PCR werden zusätzlich zu den oben genannten PCRSubstanzen DNA-Sonden eingesetzt, die komplementäre Basenabfolgen zu den Nukleotiden der zur untersuchenden SNP besitzen. Ein Fluoreszenzfarbstoff an der DNA-

Sonde macht diese für das System detektierbar. Taqman-Sonden besitzen vier besondere Eigenschaften:

- Auf Grund einer fehlenden Hydroxygruppe können sie nicht durch die TaqPolymerase elongiert werden
- Am 5'-Ende befindet sich ein Molekül - der "Reporter" - welches unter bestimmten Umständen fluoresziert
- Am 3'-Ende befindet sich ein Molekül, welches Quencher (engl. Unterdrücker) genannt wird. Taqman benutzt nicht-fluoreszierende Quencher (engl. *non fluorescent quencher*, NFQ), was unter anderem Störsignale verringert.
- Des Weiteren bestehen Taqman-DNA-Sonden aus relativ kurzen Basenfolgen, da sie mit sogenannten *minor groove bindern* (MGB) gekoppelt sind, die trotz der kurzen Basenfolge für eine ausreichend hohe Denaturierungstemperatur (engl. *melting temperature*) sorgen.
- Des Weiteren besitzen die DNA-Sonden durch ihre kurze Basenfolge eine hohe Spezifität für die gesuchte SNP. Dies kommt dadurch zu Stande, dass einzelne Basenfehlpaarungen zwischen Marker und Pseudo-SNP bei kurzen Markern einen höheren Anteil an der Gesamtbindung ausmachen und die fehlerhafte Bindung zwischen Pseudo-SNP und DNA-Sonde schneller instabil wird.

Solange die Polynukleotidkette der DNA-Sonde intakt ist, verhindert der Quencher die Fluoreszenz des Markers, indem die in den Reporter eingeleitete Energie auf den Quencher übertragen wird. Dies wird *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) genannt. Wird die Polynukleotidkette jedoch aufgebrochen, findet kein FRET statt und der Reporter fluoresziert.

Tritt nun der Fall ein, dass die gesuchte SNP vorliegt, hybridisiert die Sonde mit dessen, beziehungsweise der benachbarten, Basenfolge. Bei der Replikation des Einzelstranges zerstört die Taq-Polymerase die Sonde und löst sie vom Einzelstrang. Dadurch kann mit jeder DNA-Replikation ein zunehmendes Fluoreszenzsignal gemessen werden, welches nur bei Vorliegen der gesuchten SNP auftritt.

Um homo- und heterozygote Individuen für unsere SNPs zu identifizieren nutzten wir jeweils zwei Sonden mit unterschiedlichen Marker-Wellenlängen, die für den Wildtyp und die variierte Basenfolge spezifisch waren. Bei homozygoten Individuen konnten wir dementsprechend nur das Absorptionsmaximum eines Markers identifizieren, wohingegen bei heterozygoten Individuen die Wellenlängen beider Marker erfasst werden konnten.

5.5.1 MBL-Klassen

Anhand der Ergebnisse dieser Genotypisierung haben wir unsere Patienten in drei MBLGruppen eingeteilt: Klasse „Low“, die entweder ≈ 400 ng/ml (YOXA) oder <200 ng/ml

(YOYO) Serum-MBL bilden, „Intermediate“, die >600 ng/ml (XAXA) oder \approx 400 ng/ml (YAYO) Serum-MBL produzieren und in die Gruppe „High“, die stets >600 ng/ml (YAXA und YAYA) Serum-MBL besitzen [11].

Patienten, deren Haplotypen mit hohen MBL-Serumspiegeln assoziiert sind (YAYA und YAXA), wurden als MBL-suffiziente Klasse definiert. Patienten, deren Haplotypen mit geringen MBL-Spiegeln assoziiert sind (YAYO, XAXA, YOXA und YOYO), wurden als MBLinsuffiziente Individuen definiert.

5.5.2 SFTPD-Klassen

Durch unsere SFTPD-Genotypisierung teilten wir unsere Patienten in zwei Gruppen ein.

Patienten mit dem SFTPD-Haplotyp MetMet11 (T135C) wurden in die SFTPD-suffiziente Gruppe eingeteilt, wohingegen der ThrThr11-Haplotyp als SFTPD-Insuffizient definiert wurde.

5.6 Messung der MBL- und SFTPD-Serumspiegel

Die MBL-Plasmaspiegel unserer Patienten wurden mittels des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Verfahrens bestimmt. Dazu nutzten wir die Elisa-Kit „Human MBL“ (HK323-Edition 09-18) und „Human SFTPD“ (HK335-Edition 04-17) von „HycultBiotech“. Das ELISA-Verfahren eignet sich zur Detektion von Viren, Proteinen, Toxinen und auch von Pestiziden in einer Probe (zum Beispiel Blut, Urin, Milch). Dazu wird die Probe mit dem fraglichen Antigen immobilisiert und es werden für das Substrat spezifische Antikörper hinzugegeben. An diese Antikörper ist ein Enzym gekoppelt, welches ein weiteres Substrat umsetzt. Dieser Umsatz (meist ein Farbumschlag) ist proportional zur Antigen-Konzentration in der Probe und kann über ein Photometer bestimmt werden.

5.6.1 MBL-ELISA

Im ersten Schritt ließen wir alle verwendeten Substrate inklusive unserer eisgekühlten Serumproben auf eine Raumtemperatur von 20-25°C erwärmen. Die weiteren Arbeitsschritte waren wie folgt:

1. 150 μ l verdünnter Aktivierungspuffer werden in die Testvertiefungen auf die Mikrotiterplattenstreifen eingebracht.
2. Nach Abdeckung der Testplatte wird diese bei 37° C für 30 min inkubiert.
3. Die Testplatte wird gewaschen.
 - a. Dazu wird die Platte ausgeschüttet und invertiert trocken geklopft.
 - b. 200 μ l Waschpuffer werden in jede Vertiefung gegeben.
 - c. Nach 20s wurde die Platte erneut geleert wie in „a“ beschrieben.
 - d. Dieser Waschvorgang wird dreimal wiederholt.

4. Nun werden 100 µl unserer vorbereiteten Blutproben und des Standards in die Vertiefungen gegeben.
5. Nach Abdeckung der Platte und leichtem Klopfen, zur Entfernung von Luftblasen, wird die Platte für 1 Stunde bei 37° C inkubiert.
6. Ein weiterer Waschvorgang wie unter "3." beschrieben folgt.
7. Bei gleicher Pipettierreihenfolge wie bei der Probeneinbringung wird der Tracer (Antikörper) in die Vertiefungen eingebracht.
8. Abgedeckte Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde.
9. Waschvorgang wie unter "3." beschrieben.
10. Als Reporterenzym wird nun in jede Vertiefung 100 µl der Streptavidin-Peroxidase eingebracht - bei gleichbleibender Pipettierreihenfolge.
11. Abgedeckte Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde.
12. Ein Waschvorgang wie unter "3." beschrieben folgt.
13. In jede Vertiefung wird 100 µl TMB-Substrat eingebracht.
14. Unter Kontrolle der Reaktion wird die Platte bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert.
15. Nach ausreichender Reaktionsentwicklung wird die Reaktion mit Zugabe von 100 µl Stopplösung beendet.
16. Nach 15 min wird die Testplatte in ein Photometer gelegt. Bei 450nm wird durch Vergleich der Standardkurven mit den Absorptionskurven unserer Serumproben die MBL-Konzentration unserer Proben berechnet.

5.6.2 SFTPD-ELISA

Im ersten Schritt ließen wir alle verwendeten Substrate inklusive unserer eisgekühlten Serumproben auf eine Raumtemperatur von 20-25°C erwärmen. Die weiteren Arbeitsschritte waren wie folgt:

1. Jeweils zweimal 100 µl des Standards und 100µl unserer Serumproben werden in die mit Mikrotiterplattenstreifen vorbereiteten Vertiefungen eingebracht.
2. Nach Abdeckung der Testplatte und leichtem Rütteln zur Entfernung von Luftblasen wird die Platte eine Stunde lange bei Raumtemperatur inkubiert.
3. Nun wird die Platte wie folgt gewaschen:
 - a. Die Platte wird ausgeschüttet und invertiert trocken geklopft.
 - b. 200 µl Waschpuffer werden in jede Vertiefung gegeben.
 - c. Nach 20 s wird die Platte wieder geleert wie in "a" beschrieben.
 - d. Dieser Waschvorgang wird dreimal wiederholt.

4. Bei gleicher Pipettierreihenfolge wird in jede Vertiefung 100 µl Tracer eingebracht.
5. Die Platte wird bei Raumtemperatur für eine Stunde abgedeckt inkubiert.
6. Nun folgt ein weiterer Waschvorgang wie unter "3." beschrieben.
7. In jede Vertiefung wird 100 µl verdünnte Streptavidin-Peroxidase gegeben.
8. Die Testplatte wird für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
9. Ein weiterer Waschvorgang wie unter "3." beschrieben folgt.
10. In jede Vertiefung wird nun 100 µl verdünntes TMB-Substrat gegeben.
11. Unter regelmäßiger Reaktionskontrolle wird die Testplatte für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
12. Durch Zugabe von 100 µl Stopplösung wird die Reaktion beendet, durch leichtes Schwenken der Testplatte das Reaktionsgemisch vermischt und Luftbläschen entfernt.
13. Nach 15 min wird die Testplatte in ein Photometer gelegt. Bei 450nm berechneten wir durch Vergleich der Standardkurven mit den Absorptionskurven unserer Serumproben die SFTPD-Konzentration unserer Proben.

5.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels IBM SPSS Statistics 20 für Windows (Armonk, New York, USA). Metrische Variablen wurden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Bei Normalverteilung erfolgte der Gruppenvergleich mit dem t-Test, andernfalls wurden die nicht-parametrischen Tests nach Mann-Whitney U und Kruskal-Wallis angewendet. Qualitative Variablen wurden als Anzahl mit prozentualem Anteil angegeben. Häufigkeiten wurden mit dem exakten Fisher-Test verglichen. Der Zusammenhang zwischen zwei metrischen Variablen wurde mittels der Korrelationsanalyse nach Spearman untersucht. Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Analyse und des Log Rank-Tests wurden die Ereigniszeiten für das Auftreten einer PA-Infektion untersucht. Die Haplotypenanalyse aus den erhaltenen SFTPD-Genotypen erfolgte mit dem Programm HPlus Version 2.5 [61]. Als Signifikanzniveau wurde ein $p < 0,05$ angenommen.

6 Ergebnisse

6.1 Patientencharakteristika

Von insgesamt 76 CF-Patienten mit homozygoter $\Delta F508$ -Mutation, die zwischen 1988 und 2018 in der CF-Ambulanz betreut wurden, haben 35 Fälle die Einschlusskriterien erfüllt. Die abschließende retrospektive Erhebung der klinischen Daten wurde im April 2018 durchgeführt. In Tabelle 6 sind die klinischen Charakteristika des Studienkollektivs zusammengefasst.

Tabelle 6: Charakteristika der Studienpatienten (Werte sind als Häufigkeiten oder als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben)

| | |
|---|------------------|
| Studienteilnehmer, N | 35 |
| Männliches Geschlecht, N (%) | 20 (57,1%) |
| Alter bei Erstdiagnose der CF | 1,3 ± 1,8 Jahre |
| Alter zum Zeitpunkt der Blutentnahme | 11,6 ± 5,1 Jahre |
| Alter zum Zeitpunkt der letzten Vorstellung | 18,8 ± 5,0 Jahre |

Bei unseren Studienpatienten wurde erstmals ab einem Alter von $9,6 \pm 5,5$ Jahren eine mikrobiologische Untersuchung des Sputums bzw. Rachenabstriches dokumentiert. Entsprechend des Nachweises von PA hatten 8 (22,9%) Patienten stets einen negativen (PA0) und 27 (77,1%) mindestens einen positiven PA-Befund. Von den 27 Patienten mit positivem PA-Befund entwickelten 12 (34,3%) Patienten eine intermittierende (PAI) und 15 (42,9%) eine chronische PA-Besiedelung (PAC) (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Verteilung des Studienkollektivs nach PA-Status

| | Häufigkeit |
|---|-------------------|
| Gruppe ohne PA-Nachweis (PA0) | 8 (22,9%) |
| Gruppe mit intermittierender PA-Infektion (PAI) | 12 (34,3%) |
| Gruppe mit chronischer PA-Infektion (PAC) | 15 (42,9%) |

Wie in Tabelle 8 aufgeführt, waren die 3 PA-Gruppen aus unserem Studienkollektiv hinsichtlich der Geschlechterverteilung, des mittleren Alters zum Zeitpunkt der CFErstdiagnose und der letzten Stuserhebung sowie der erstmalig dokumentierten Rachen- bzw. Sputumuntersuchung statistisch gleich.

Tabelle 8: Klinische Charakteristika nach PA-Status (Werte sind als Häufigkeiten oder als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. *statistische Analyse mittels Fisher Exakt-Test oder Kruskal-Wallis-H Test)

| | PA0 (n=8) | PAI (n=12) | PAC (n=15) | p* Wert |
|--|------------|------------|------------|---------|
| Männliches Geschlecht, n (%) | 5 (62,5%) | 7 (58,3%) | 8 (53,3%) | < 0,91 |
| Alter bei Erstdiagnose der CF [Jahre] | 1,6 ± 2,3 | 1,5 ± 2,0 | 1,0 ± 1,3 | < 0,84 |
| Alter bei erster Abstrich- bzw. Sputumuntersuchung [Jahre] | 11,9 ± 5,2 | 8,5 ± 6,5 | 9,3 ± 4,9 | < 0,40 |
| Alter zum Zeitpunkt der Blutentnahme [Jahre] | 12,5 ± 4,9 | 11,2 ± 6,5 | 11,5 ± 4,2 | < 0,81 |
| Alter beim erstmaligen PANachweis [Jahre] | - | 12,7 ± 6,1 | 10,2 ± 5,4 | < 0,22 |
| Alter zum Zeitpunkt der letzten Vorstellung [Jahre] | 19,0 ± 4,4 | 17,4 ± 5,0 | 19,7 ± 5,3 | < 0,45 |

PA-Infektion und Geschlecht

Wir konnten zwischen der PA-Infektion und dem Geschlecht keinen statistischen Zusammenhang zeigen. So waren 75% der Jungen und 80% der Mädchen im Studienkollektiv positiv für PA ($p < 0,70$). Eine chronische PA-Infektion (PAC) entwickelten 40,1% der Jungen und 46,7% der Mädchen ($p < 0,69$).

PA-Infektion und Alter

Das mittlere Alter zum Zeitpunkt des ersten positiven PA-Nachweis lag bei $11,2 \pm 5,7$ Jahren und des Beginns einer chronischen PA-Infektion bei $14,3 \pm 5,5$ Jahren. Das Geschlecht zeigte weder einen Einfluss auf das PA1- noch auf das PAC-Alter (siehe Abbildung 5 und 6).

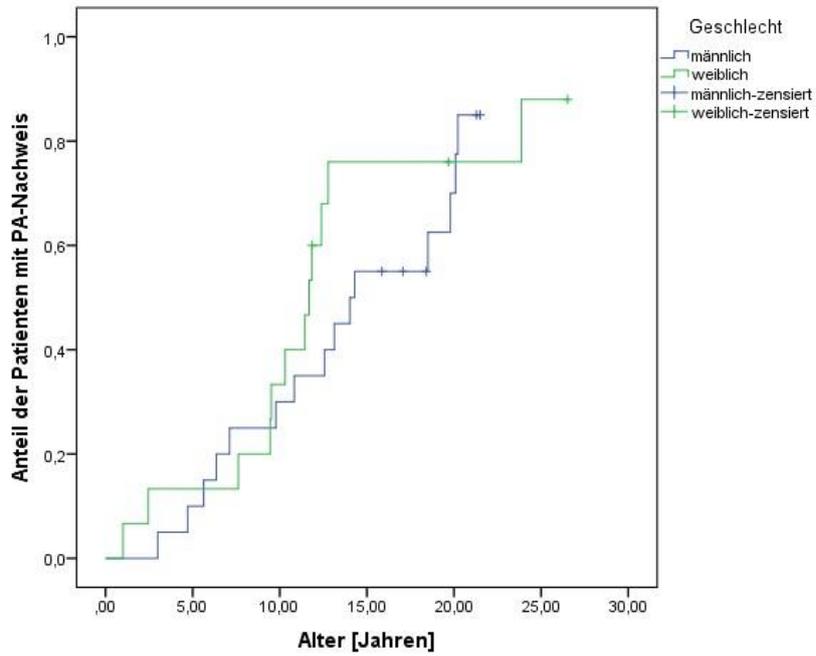


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve für chronischen PA-Infektion nach Geschlecht (n=35, p=0,50 Log Rank-Test)

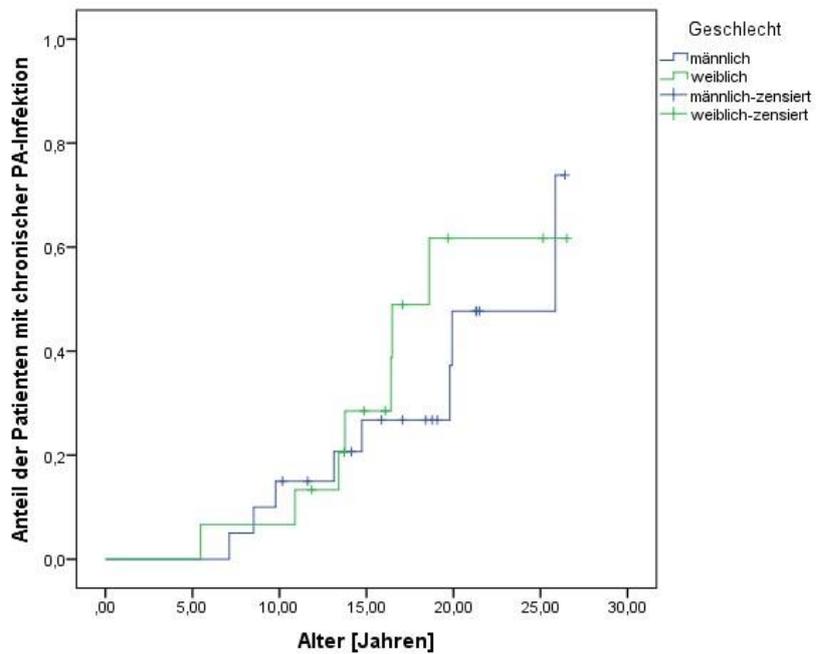


Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve für positiven PA-Nachweis nach Geschlecht (n=35, p=0,53 Log Rank-Test)

6.2 MBL

6.2.1 MBL2-Genotypen und MBL-Serumspiegel

Unser Kollektiv zeigte die in Abbildung 9 dargestellten Variationen des MBL2-Gens. Alle untersuchten Polymorphismen waren im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE).

Tabelle 9: Genotypisierung der untersuchten Mutationen im MBL2-kodierenden Gen (*Hardy-WeinbergGleichgewicht)

| Mutation | Genotyp | N (%) | HWE p-Wert* |
|------------|---------|-----------|-------------|
| MBL2_C221G | CC | 2 (5,7) | p < 0,69 |
| | CG | 11 (31,4) | |
| | GG | 22 (62,9) | |
| MBL2_C219T | CC | 26 (74,3) | p < 0,38 |
| | CT | 9 (25,7) | |
| | TT | 0 | |
| MBL2_G226A | GG | 27 (77,1) | p < 0,45 |
| | GA | 8 (22,9) | |
| | AA | 0 | |
| MBL2_G235A | GG | 33 (94,3) | p < 0,86 |
| | GA | 2 (5,7) | |
| | AA | 0 | |

Entsprechend der Genotypen ergab sich daraus die in der Tabelle 10 dargestellte Verteilung der MBL-Expressionsstufen.

Tabelle 10: Häufigkeiten der MBL-Expressionsstufen

| MBL-Expressionsstufe | N (%) |
|----------------------------|------------|
| „low“ (YOYO+YOXA) | 6 (17,1%) |
| „intermediate“ (YAYO+XAXA) | 13 (37,1%) |
| „high“ (YAYA+YAXA) | 16 (45,7%) |

Für die weitere Untersuchung sind die „low“ und „intermediate“ MBL-Expressionsstufen zur MBL-Klasse „insuffizient“ zusammengefasst. Daraus ergab sich die in Tabelle 11 dargestellte Verteilung der beiden MBL-Klassen mit dem zugehörigen mittleren Alter und MBLSerumspiegel.

Tabelle 11: Alter und MBL-Serumspiegel nach MBL-Klassen (*statistische Analyse mittels Mann-Whitney-U Test; Signifikanzniveau $p < 0,05$)

| | MBL-Suffizient (N=16) | MBL-Insuffizient (N=19) | p-Wert |
|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| mittleres Alter [Jahre] | 12,1 ± 5,1 | 11,1 ± 5,2 | < 0,58 |
| mittlerer MBL-Serumspiegel [ng/ml] | 269 ± 126 | 74 ± 98 | < 0.001* |

Patienten der MBL-Insuffizienten Genotypen haben einen signifikant geringeren mittleren MBL-Serumspiegel, als Patienten der MBL-suffizienten Gruppe ($p < 0,001$). In Abbildung 7 wird dies nach den MBL-Expressionsstufen dargestellt.

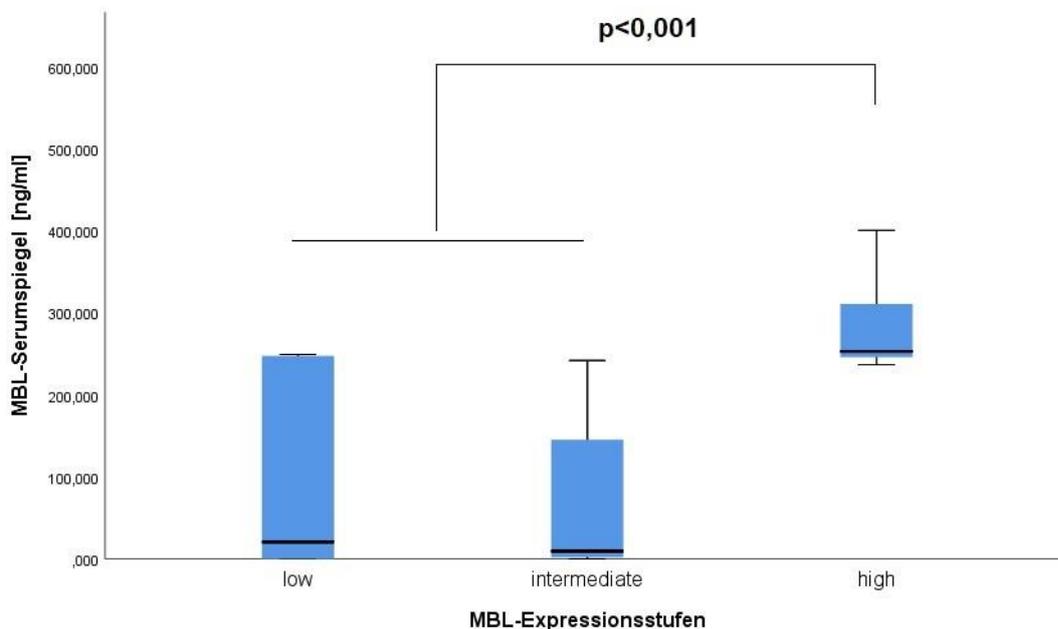


Abbildung 7: MBL-Serumspiegel nach MBL-Expressionsstufen (statistische Analyse mittels Mann-Whitney-U Test; Signifikanzniveau $p < 0,05$)

Unabhängig vom PA-Status zeigt sich, wie in Abbildung 8 dargestellt, zwischen dem MBL-Serumspiegel und dem Alter der Patienten keine Korrelation nach Spearman ($r = 0,13$, $p < 0,46$).

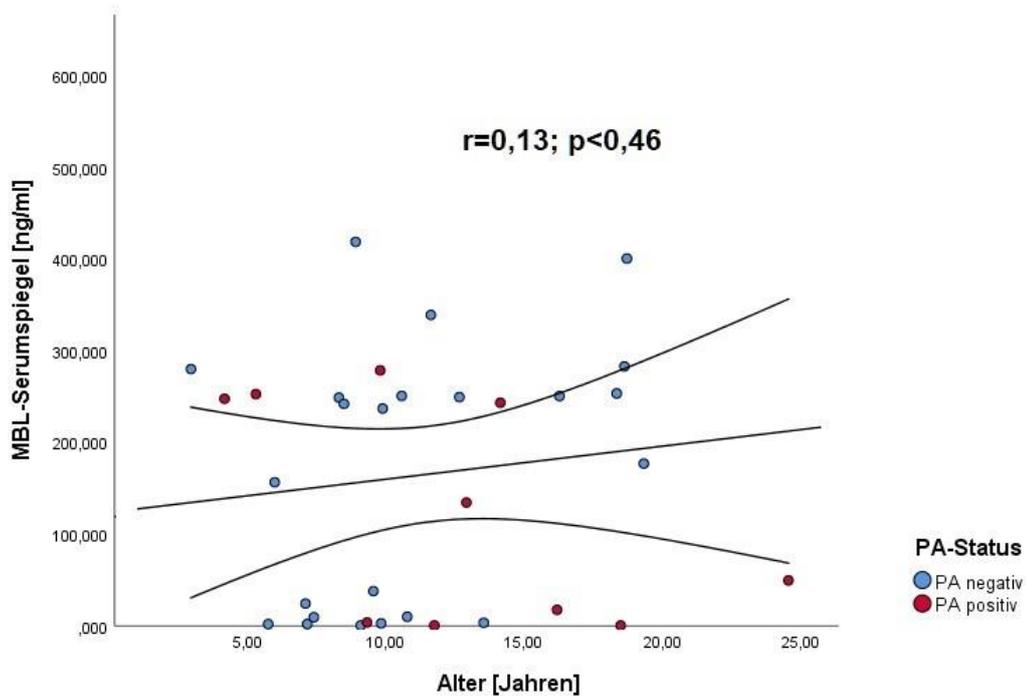


Abbildung 8: Korrelation nach Spearman zwischen MBL-Spiegel und Patientenalter)

6.2.2 MBL und PA-Infektion

Patienten mit der suffizienten MBL-Expressionsstufe entwickelten häufiger eine chronische PA-Infektion als die der insuffizienten MBL-Expressionsstufe (50% vs. 36,8%). Wir konnten zwischen der chronischen PA-Besiedlungsform und den MBL-Klasse jedoch keinen statistischen Zusammenhang feststellen ($p < 0,43$) (s. Tabelle 12).

Tabelle 12: Chronische PA-Infektion (PAC) und MBL-Klasse ($p < 0,43$ nach Fisher Exakt-Test)

| | PA0+PAI | PAC |
|-------------------------|------------|------------|
| MBL-Suffizient | 8 (50,0%) | 8 (50,0%) |
| MBL-Insuffizient | 12 (63,2%) | 7 (36,8%) |
| Gesamt | 20 (57,1%) | 15 (42,9%) |

Unabhängig von einer chronischen PA-Infektion zeigte sich der MBL-Serumspiegel bei MBLsuffizienten im Vergleich zu den MBL-Insuffizienten Patienten signifikant höher (PAC: $p < 0,014$, keine PAC: $p < 0,001$) (s. Abbildung 9).

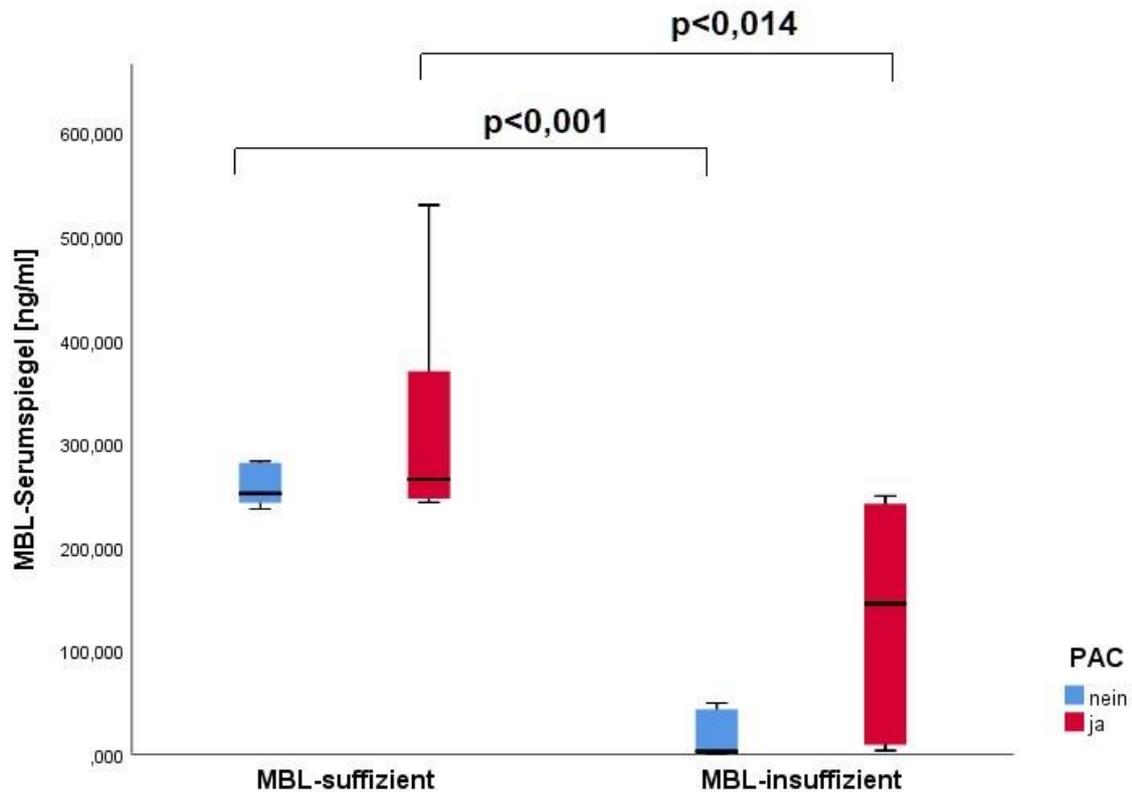


Abbildung 9: MBL-Serumspiegel nach MBL-Klasse und PAC-Status (Analyse mittels Mann-Whitney-U Test)

Die Hälfte unserer CF-Patienten hatten im Alter von 12,6 Jahren erstmals einen positiven PA-Nachweis und im Alter von 19,9 Jahren eine chronische PA-Infektion. Die MBL-Klasse zeigte auf beide Infektionszeitpunkte keinen statistischen Einfluss (PA1: $p < 0,52$ und PAC:

$p < 0,92$ Log Rank-Test). Dies wird in folgenden Abbildungen 10 und 11 ersichtlich:

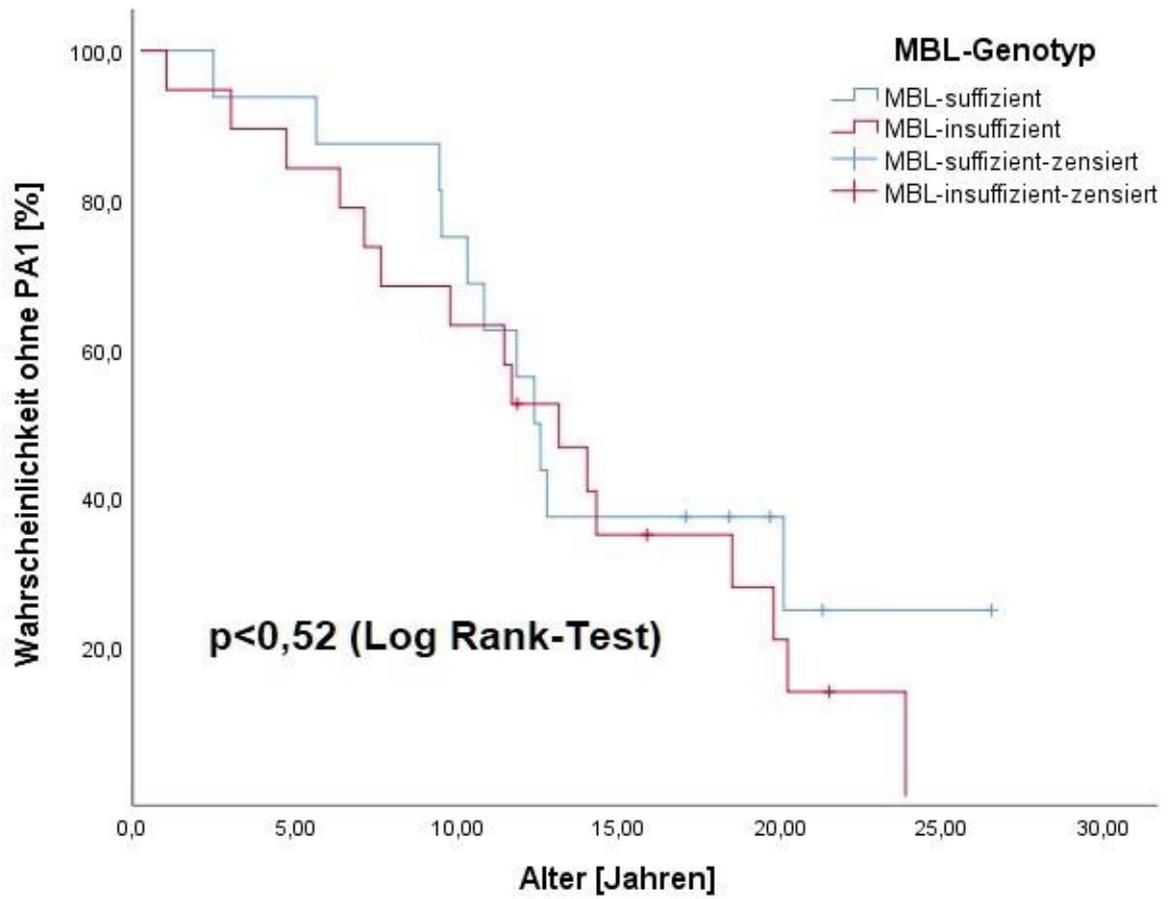


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve einer PA-Erstbesiedlung und MBL-Klasse.

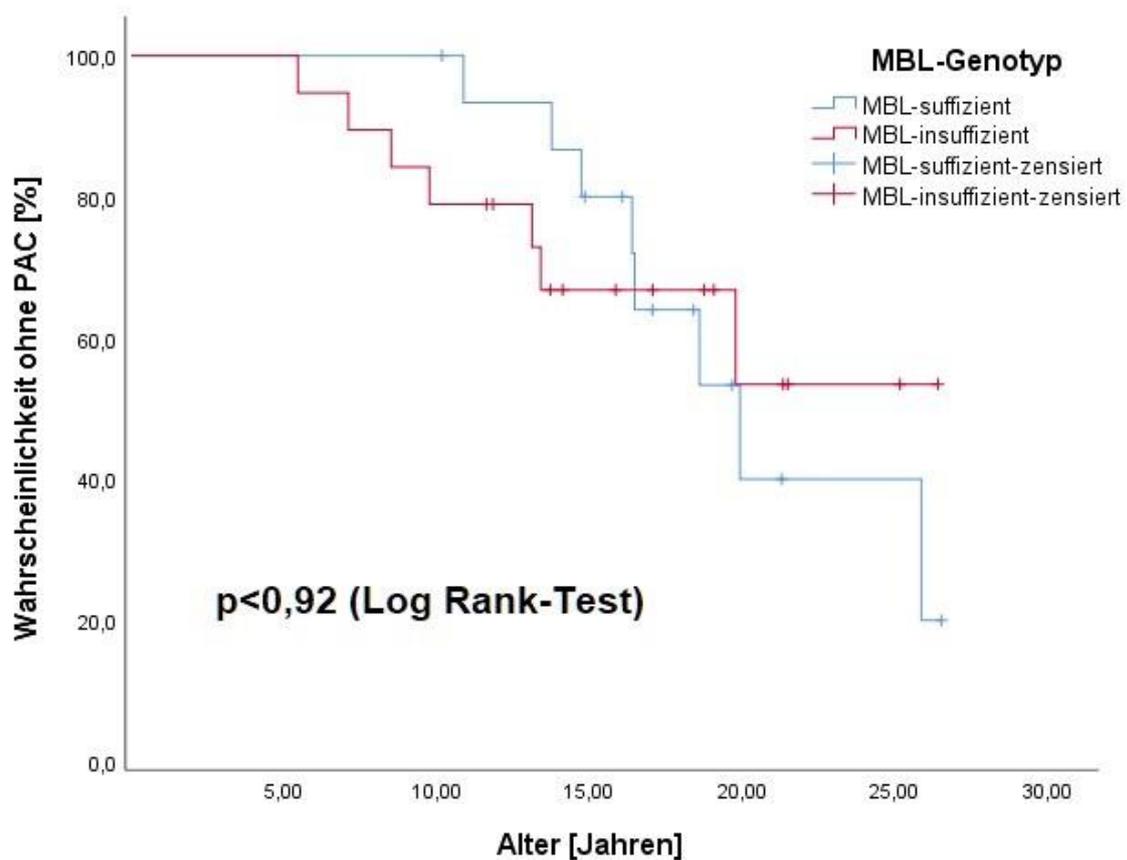


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve einer chronischen PA-Besiedlung und MBL-Klasse.

6.2.3 MBL bei chronischer PA-Infektion

Innerhalb des Kollektivs der chronisch PA-infizierten Patienten (N = 15) konnten wir einen Zusammenhang zwischen der genetischen MBL-Klasse und der PA-Infektion beobachten. So entwickelten CF-Kranke mit einer insuffizienten MBL-Klasse statistisch signifikant früher eine PAC als Patienten mit suffizienter MBL-Klasse (9,8 vs. 16,4 Jahre; $p < 0,03$ Log RankTest) (s. Abbildung 12).

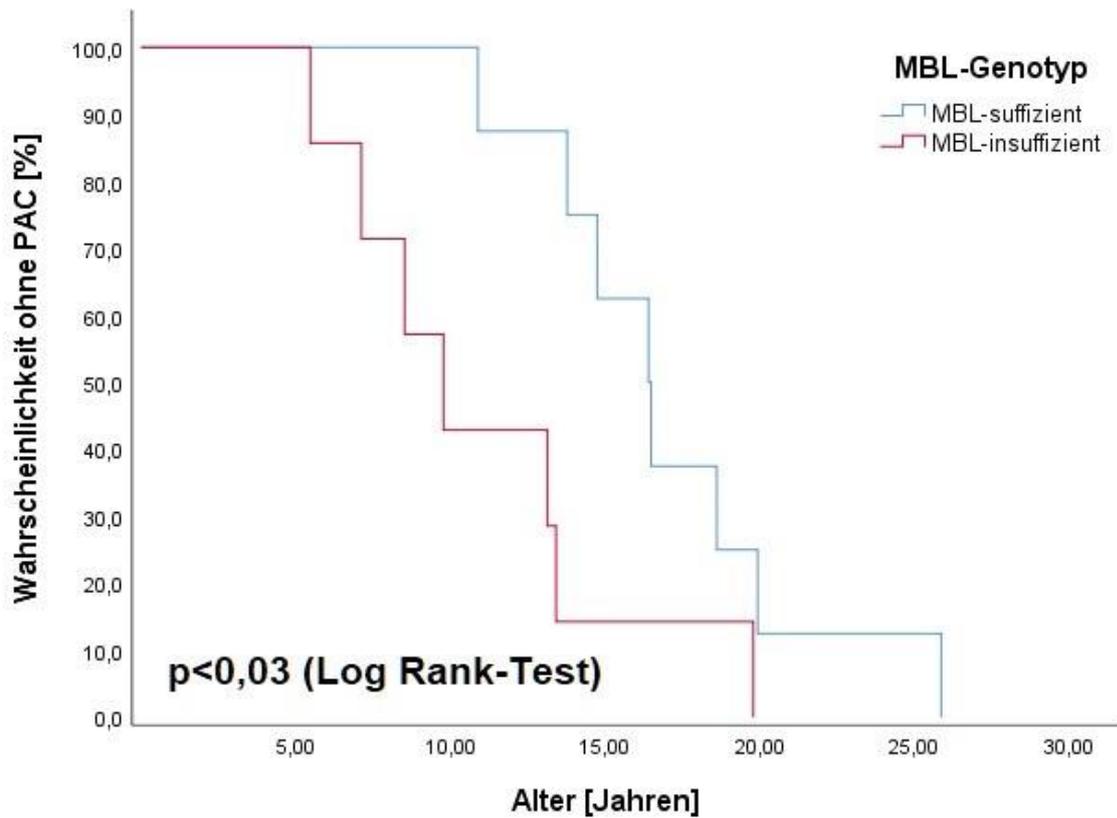


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve der chronischen PA-Besiedlung nach MBL-Klasse bei Patienten mit PAC (N = 15)

Zudem chronifizierten diese MBL-insuffizienten Patienten nach dem ersten positiven PANachweis signifikant schneller als die MBL-suffiziente Patienten (0,01 vs. 4,6 Jahre; $p < 0,04$

Log Rank-Test). Bei über der Hälfte der PAC-Patienten mit MBL-Insuffizienz war der PAErstnachweis zugleich der Beginn ihrer chronischen PA-Infektion (s. Abbildung 13).

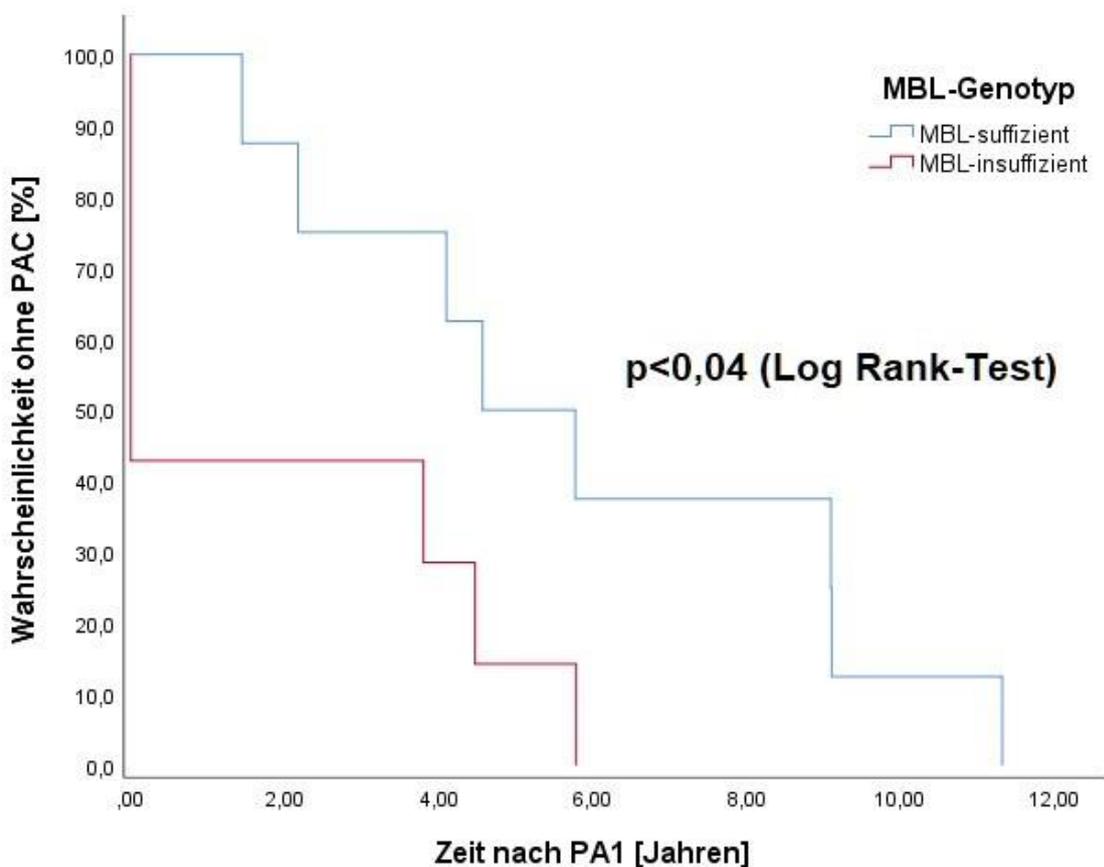


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Überlebensfunktion des Wechsels von PA1 auf PAC bei Patienten mit PAC (N = 15)

Für die Einteilung der MBL-Suffizienz nach Chalmers et al. [11], bei der die „intermediate“-zusammen mit der „high“-MBL-Klasse die MBL-suffiziente Gruppe bilden, ergeben sich diese Korrelationen nicht.

6.2.4 MBL und Lungenfunktion

Der PA-Status beeinflusste den FEV1 im letzten Lungenfunktionstest. So hatten CF-

Patienten ohne PA-Nachweis die besten Ergebnisse und Patienten mit chronischer PABesiedelung die schlechtesten FEV1-Werte (s. Tabelle 13). Eine statistische Signifikanz zwischen FEV1 und PA-Status konnte aber nicht nachgewiesen werden ($p < 0,18$).

Tabelle 13: FEV1 nach PA-Status ($p < 0,18$ nach Kruskal-Wallis-H Test)

| | N | Mittelwert | Standardabweichung | Minimum | Maximum |
|--------|----|------------|--------------------|---------|---------|
| PA0 | 8 | 88,1 | 29,6 | 28,1 | 117,2 |
| PAI | 12 | 70,6 | 25,4 | 37,1 | 108,8 |
| PAC | 15 | 67,8 | 18,5 | 38,8 | 112,7 |
| Gesamt | 35 | 73,2 | 24,2 | 28,1 | 117,2 |

Die MBL-Klasse hatte in unserem Studienkollektiv auf die Lungenfunktion ebenfalls keinen Einfluss (MBL-suffizient: $p < 0,30$ bzw. MBL-insuffizient: $p < 0,63$). Folgende Abbildung 14 stellt für die jeweilige MBL-Klasse die Boxplots der FEV1 entsprechend des PAC-Status dar.

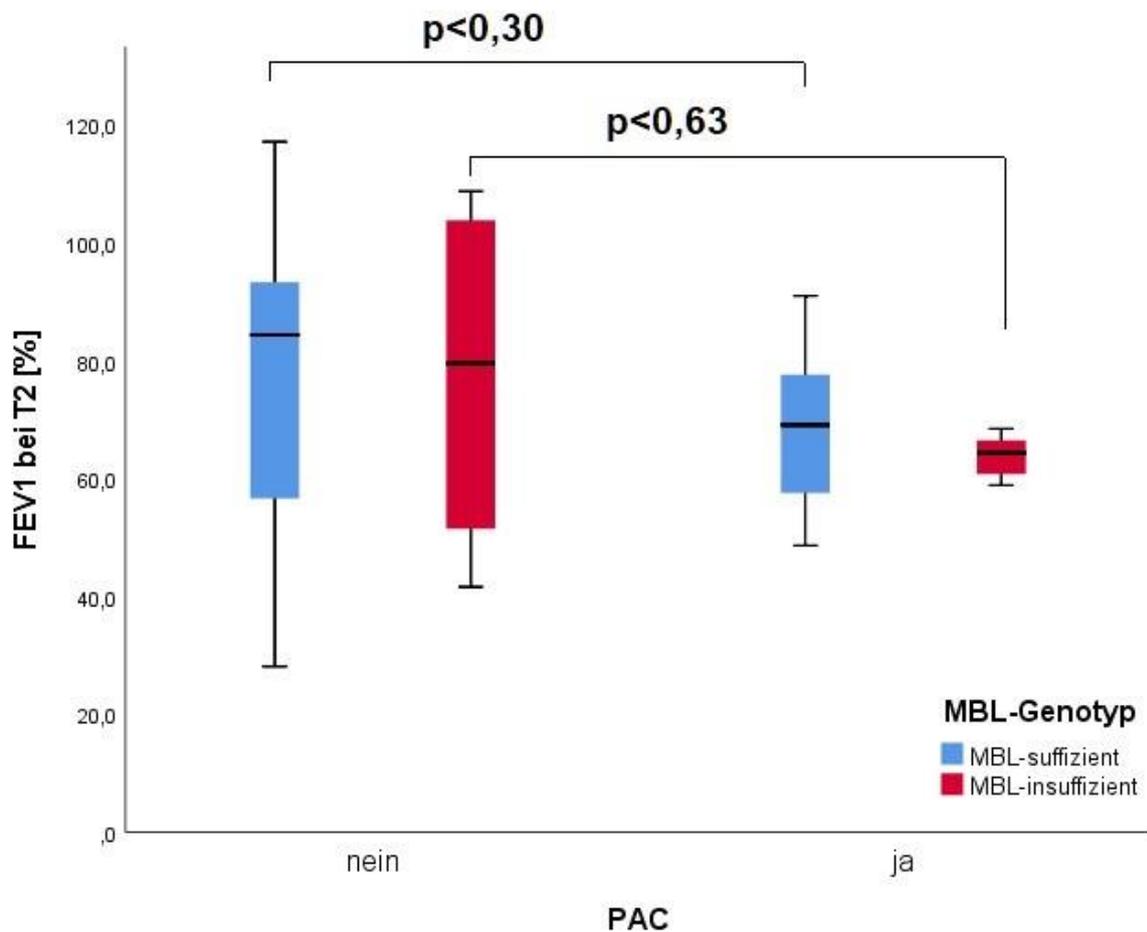


Abbildung 14: FEV1 in Abhängigkeit von PAC-Status (analysiert mittels Mann-Whitney-U Test)

6.3 SFTPD

6.3.1 SFTPD-Genotypen und -Serumspiegel

Unser Kollektiv zeigte die in Tabelle 14 dargestellten SNPs im SFTPD kodierenden Gen. Alle untersuchten Polymorphismen waren im HWE.

Tabelle 14: Genotypisierung der untersuchten Mutationen im SFTPD-kodierenden Gen (*Hardy-WeinbergGleichgewicht)

| Mutation | Genotyp | N (%) | HWE p-Wert* |
|-------------|---------|-----------|-------------|
| SFTPD_T135C | CC | 2 (5,7) | p < 0,48 |
| | TC | 16 (45,7) | |
| | TT | 17 (48,6) | |
| SFTPD_A581G | AA | 7 (20,0) | p < 0,83 |
| | AG | 18 (51,4) | |
| | GG | 10 (28,6) | |
| SFTPD_T911A | TT | 32 (91,4) | p < 0,79 |
| | TA | 3 (8,6) | |
| | AA | 0 | |

Die SFTPD-Serumspiegel korrelierten nicht mit der genotypischen Einteilung, wie in den Abbildungen 15-17 dargestellt.

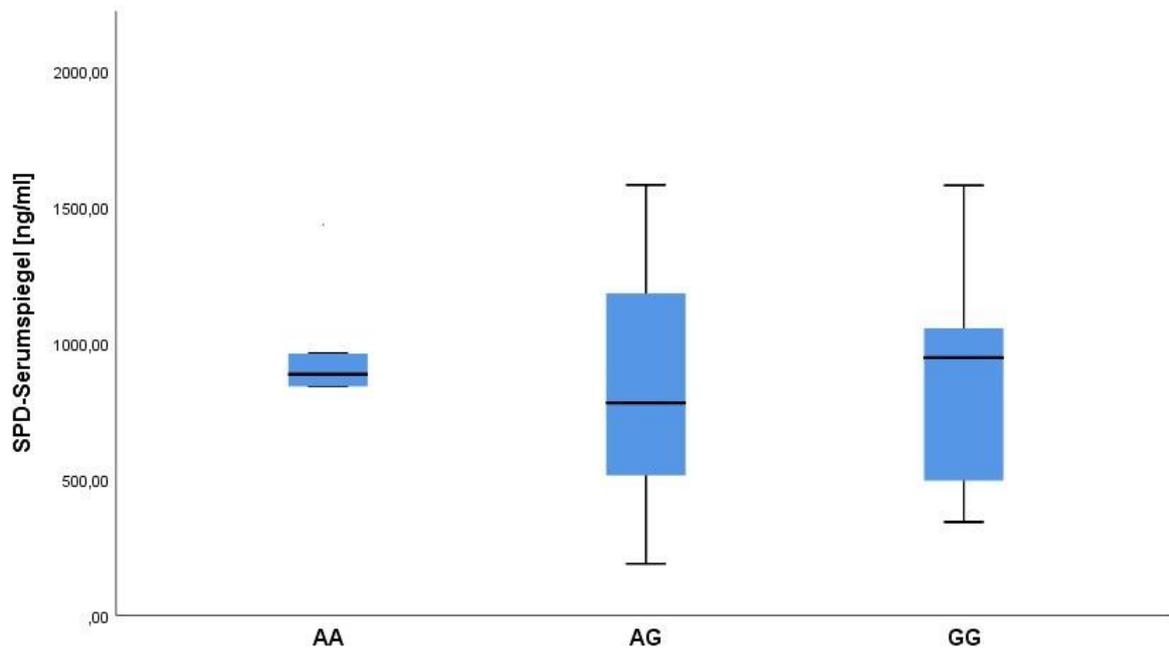


Abbildung 15: SFTPD-Serumspiegel in Abhängigkeit von den genetischen Varianten der SFTPD_A581GMutation (p < 0,21 nach Kruskal-Wallis-H Test)

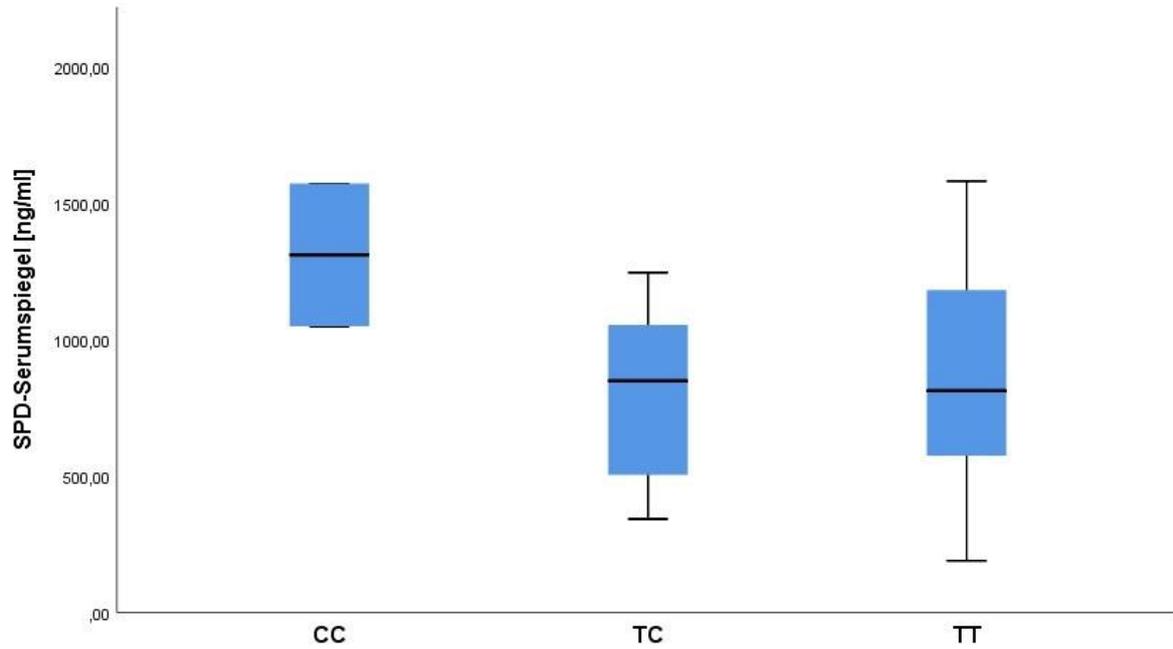


Abbildung 16: SFTPD-Serumspiegel in Abhängigkeit von den genetischen Varianten der SFTPD_T135CMutation ($p < 0,86$ nach Kruskal-Wallis-H Test)

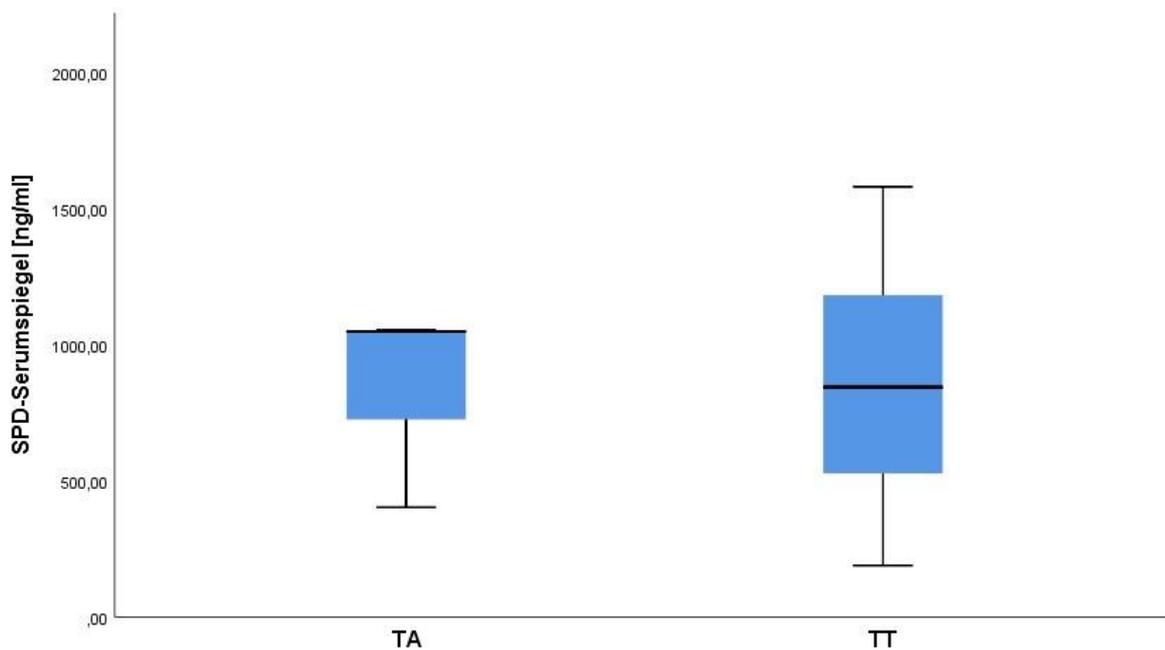


Abbildung 17: SFTPD-Serumspiegel in Abhängigkeit der genetischen Varianten der SFTPD_T911A -Mutation ($p < 0,91$ nach Mann-Whitney-U Test)

Das Geschlecht (Jungen: 887 ± 362 ng/ml vs. Mädchen: 829 ± 434 ng/ml; $p < 0,68$) sowie das Alter der Patienten (Spearman's $r = 0,08$, $p < 0,67$) zeigten keinen Einfluss auf den

SFTPD-Serumspiegel. Abbildung 18 zeigt die Korrelation zwischen dem SFTPD-Serumspiegel und dem Alter.

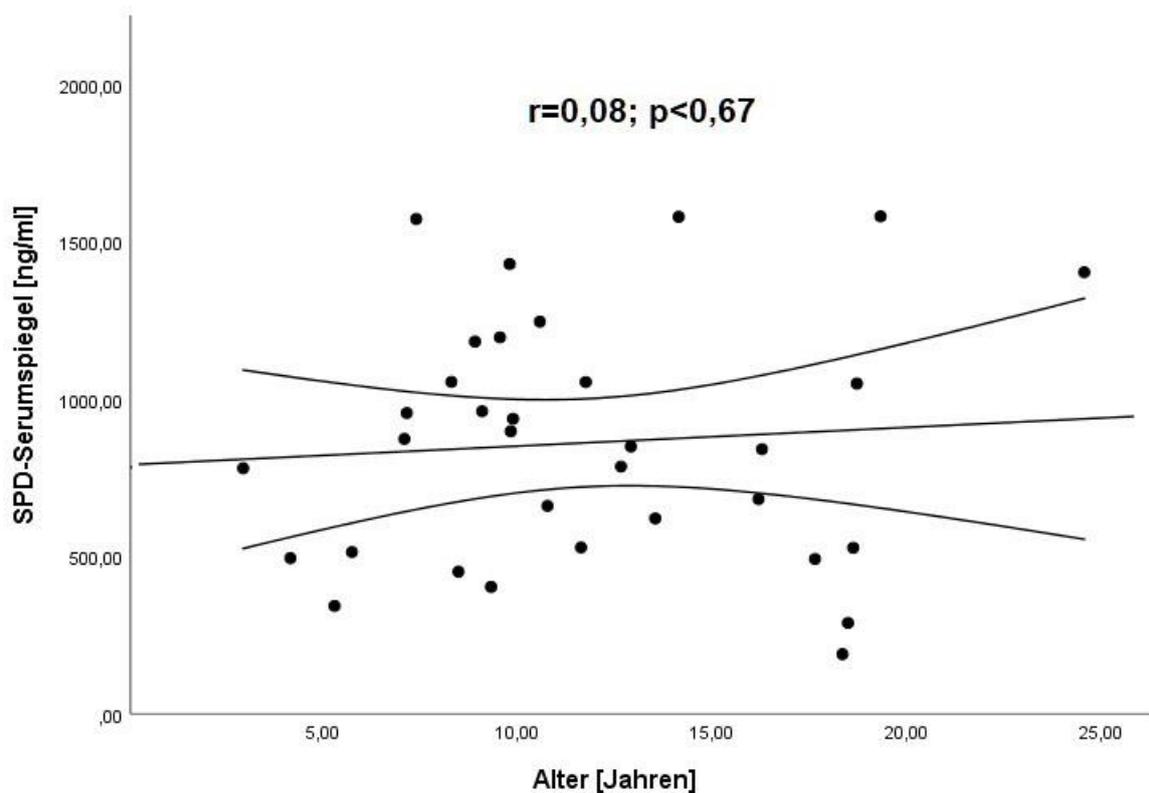


Abbildung 18: SFTPD-Serumspiegel und Patientenalter (Spearman's $r=0,08$, $p<0,67$)

6.3.2 SFTPD und PA-Infektion

Es konnte kein statistischer Zusammenhang zwischen den Genotypen der SFTPD-Mutationen und dem PA-Status nachgewiesen werden. Die Häufigkeiten der drei PA-Besiedlungsformen (PA0, PAI und PAC) verteilen sich innerhalb der untersuchten SFTPDMutationen wie in folgender Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Verteilung der Genvariationen der untersuchten SFTPD-Mutationen nach PA-Status (*Fisher ExaktTest)

| SFTPD-Mutation | Genotyp | PA0, N (%) | PAI, N (%) | PAC, N (%) | p-Wert* |
|----------------|---------|------------|------------|------------|----------|
| T135C | CC | 0 (0) | 0 (0%) | 2 (100) | p < 0,52 |
| | TC | 4 (25,0) | 5 (31,3) | 7 (43,8) | |
| | TT | 4 (23,5) | 7 (41,2) | 6 (35,3) | |
| A581G | AA | 3 (42,9) | 2 (28,6) | 2 (28,6) | p < 0,63 |
| | AG | 4 (22,2) | 6 (33,3) | 8 (44,4) | |
| | GG | 1 (10,0) | 4 (40,0) | 5 (50,0) | |

| | | | | | |
|-------|----|----------|-----------|-----------|----------|
| T911A | TA | 0 (0%) | 1 (33,3) | 2 (66,7) | p < 0,55 |
| | TT | 8 (25,0) | 11 (34,4) | 13 (40,6) | |

Die SFTPD-Serumspiegel der CF-Patienten unterschieden sich nicht zwischen dem PA-Status (s. Tabelle 16 u. 17).

Tabelle 16: SFTPD-Serumlevel nach dem PA-Status (p < 0,37 nach Kruskal-Wallis-H Test)

| | N | Mittelwert | Standardabweichung | Minimum | Maximum |
|--------|----------|-------------------|---------------------------|----------------|----------------|
| PA0 | 23 | 883 | 348 | 189 | 1582 |
| PAI | 8 | 942 | 556 | 289 | 1581 |
| PAC | 4 | 607 | 199 | 403 | 850 |
| Gesamt | 35 | 863 | 389 | 189 | 1582 |

6.3.3 SFTPD und Lungenfunktion

In unserem Studienkollektiv konnten wir eine signifikante Korrelation zwischen der zum Zeitpunkt der Blutentnahme gemessenen FEV1 und dem SFTPD-Serumspiegel zeigen (Spearman's $r = -0,41$, $p < 0,03$). Eine Verschlechterung der Lungenfunktion ging mit einem Anstieg des SFTPD im Serum einher - unabhängig von der Form der PA-Besiedelung (s. Abbildung 19).

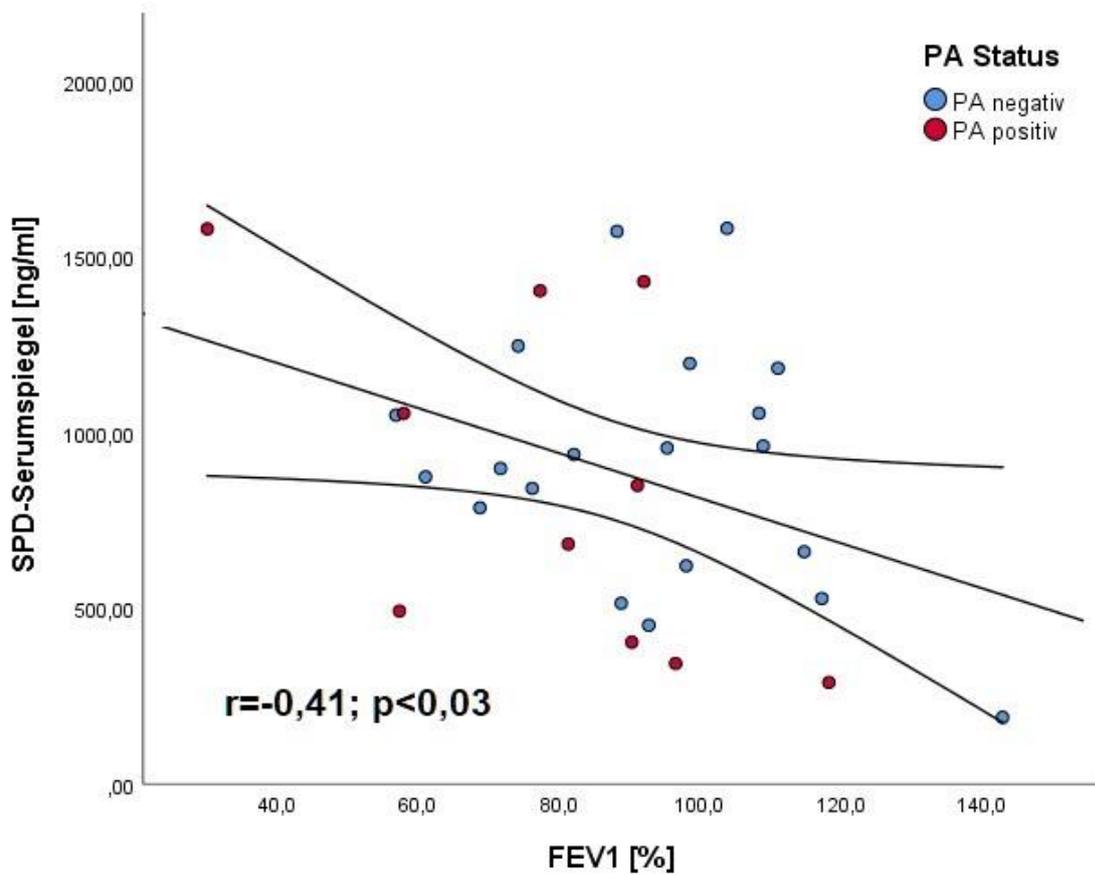


Abbildung 19: Korrelation von SFTPD-Serumspiegel und FEV1 (Spearman's $r = -0,41$, $p < 0,03$ kontrolliert für PAStatus)

6.3.4 SFTPD und CRP

Wie in Abbildung 20 dargestellt, korrelierten die SFTPD- und CRP-Serumspiegel unabhängig vom PA-Status (Spearman's $r = 0,512$, $p < 0,009$).

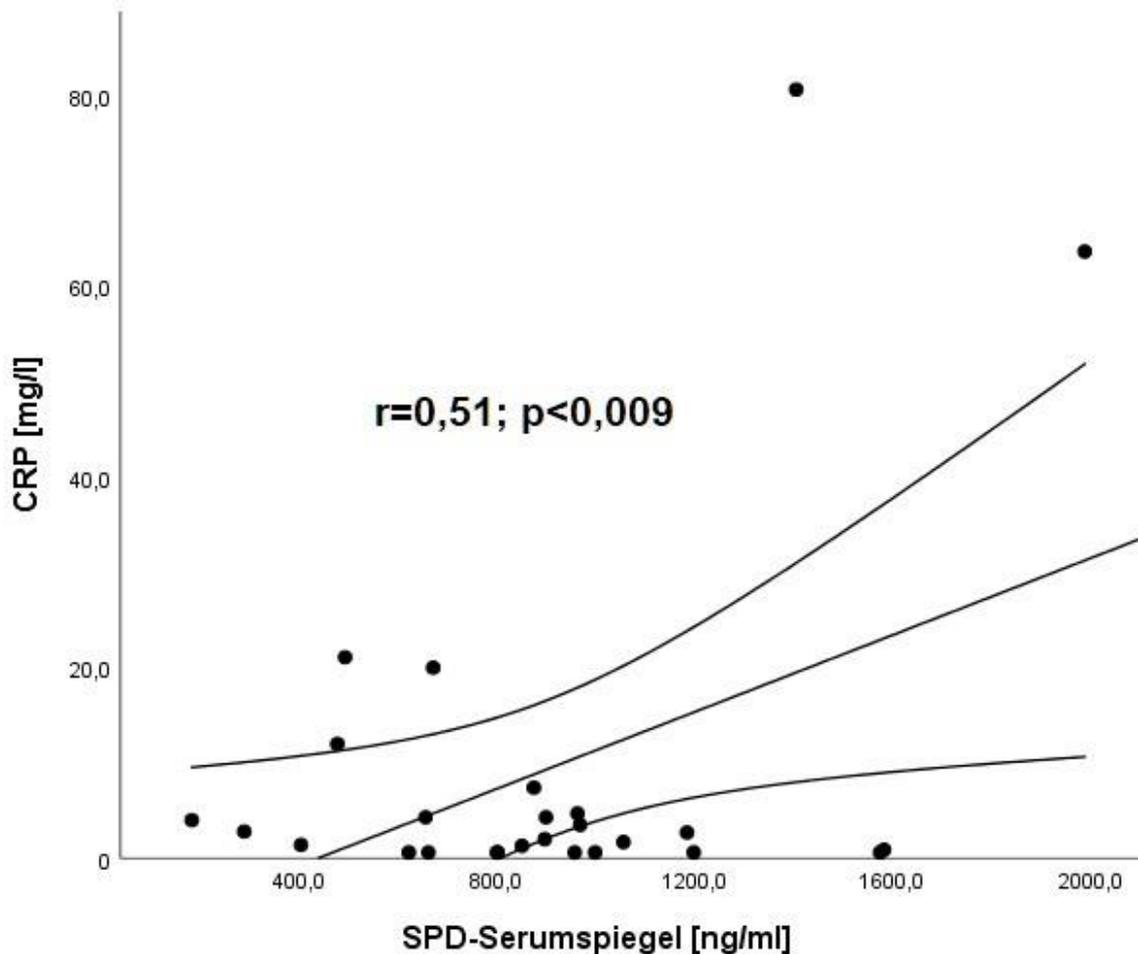


Abbildung 20: Korrelation von SFTPD-Serumspiegel und CRP (Spearman's $r = 0,51$, $p < 0,009$ kontrolliert für PAStatus)

Die PA-Besiedlungsformen zeigten keine signifikante Korrelation mit dem SFTPD-Genotyp oder den SFTPD-Serumspiegeln.

6.3.5 SFTPD und chronische PA-Infektion

Die Analyse mittels des Kaplan-Meier-Schätzers zeigte für die untersuchten SFTPDMutationen und ihre Genotypen keinen statistischen Altersunterschied, an dem eine Erstinfektion mit PA oder eine chronische PA-Besiedelung zu beobachten war ($p < 0,220,94$; Log Rank-Test).

Im nächsten Schritt wurden die Haplotypen aus allen SFTPD-Allelen mittels eines mathematischen Verfahrens (Erwartungs-Maximierungs-Algorithmus implementiert in HPlus Software) geschätzt. Es ergaben sich die in Tabelle 18 aufgeführten Haplotypen:

Tabelle 17: Häufigkeiten der SFTPD-Haplotypen aus den T135C, A581G und T911A SFTPD- Allelen (berechnet mittels HPlus v2.5)

| Haplotypen | Allele | Anteil in % |
|---------------|-------------|-------------|
| TAT (Wildtyp) | Met-Thr-Ser | 44% |
| TGT | Met-Ala-Ser | 29% |
| CGT | Thr-Ala-Ser | 21% |
| CGA | Thr-Ala-Thr | 4% |
| CAT | Thr-Thr-Ser | 2% |

Für Träger des CGT-Haplotyps mit dem varianten Allel im SFTPD_T135C-Allel konnten mittels der Cox-Regression gezeigt werden, dass sie im Vergleich zur Referenzgruppe der Wildtyp-Haplotyp-Träger ein 3fach höheres Risiko für eine chronische PA-Besiedlung haben (HR 3,0, 95%-KI: 1,1-8,6, $p < 0,04$) (s. Abbildung 21).

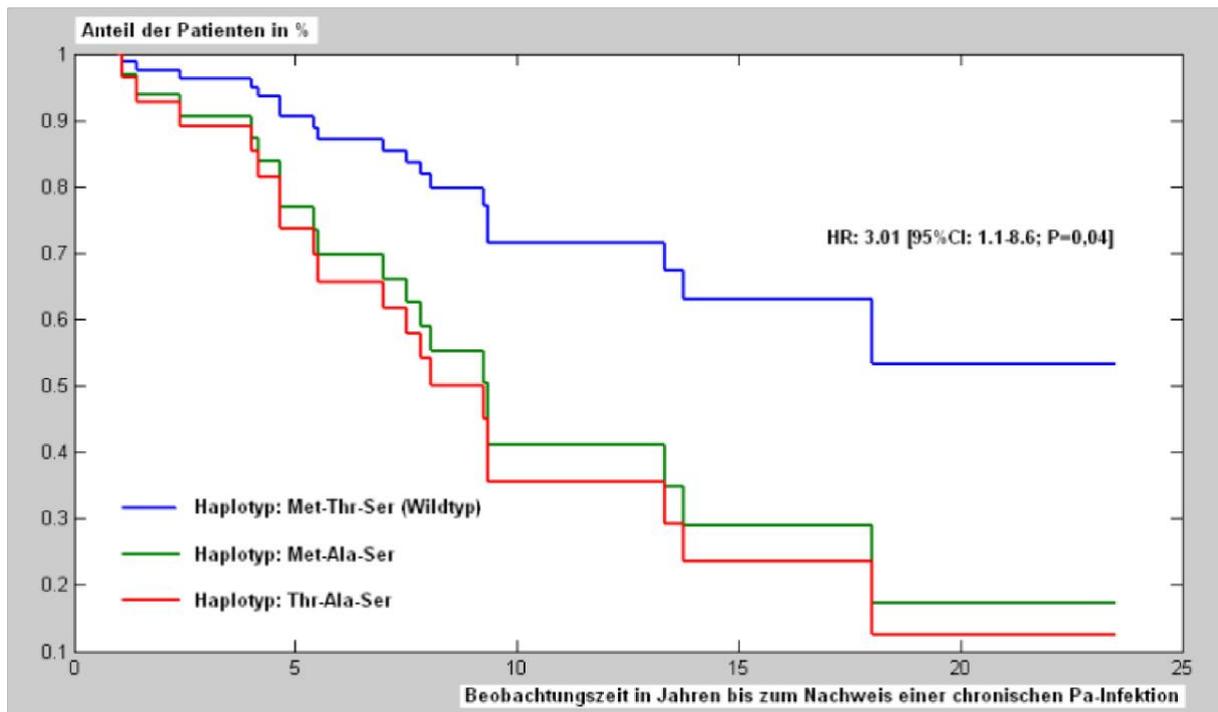


Abbildung 21: Einfluss der SFTPD-Haplotypen auf das Auftreten einer chronischen PA-Infektion (CoxRegressionsanalyse berechnet mittels HPlus v2.5). Der CGT-Haplotyp (Thr-Ala-Ser) mit dem varianten Allel im SFTPD_T135C-Allel ist für CF-Patienten ein negativer Prognosemarker für das Auftreten einer chronischen PA-Infektion (HR 3,01, $p < 0,04$).

7 Diskussion

Die CF zeichnet sich - unabhängig von dem zu Grunde liegenden CF-Mutationstyp - durch einen sehr variablen Krankheitsverlauf aus. Die Lunge und deren (PA-)Besiedlung übt dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Lebensdauer und Lebensqualität der CF-Patienten aus. Da SFTPD und MBL immunologisch wichtige Proteine für die Lunge darstellen und sowohl ihre Funktionalität als auch ihre Quantität durch SNPs beeinflusst wird, liegt es nahe anzunehmen, dass SFTPD und MBL SNPs Risikogene für die CF darstellen können.

In unserer Studie haben wir die Auswirkungen von MBL und SFTPD SNPs auf den Serum Spiegel dieser Proteine, die Lungenfunktion und die Besiedlung mit PA von CF-Patienten untersucht.

Dabei konnten wir zeigen, dass MBL-Insuffiziente Patienten signifikant früher chronisch mit PA besiedelt wurden als MBL-Suffiziente Patienten. Des Weiteren konnten wir nachweisen, dass bei MBL-Insuffizienten Patienten signifikant weniger Zeit zwischen PA-Erstinfection und chronischer PA-Besiedlung lag.

Für den berechneten SFTPD Haplotypen 11Thr-160Ala-270Ser zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp 11Met-160Thr-270Ser Haplotyp ein dreifach erhöhtes Risiko eine PA-Infektion zu erleiden. Eine Korrelation zwischen SFTPD-Genotyp und PA-Status konnten wir nicht nachweisen.

7.1 MBL

Wir konnten zeigen, dass sich der MBL-Genotyp auf den Beginn einer chronischen Besiedlung mit PA auswirkt, wobei MBL-Suffiziente signifikant später besiedelt wurden als MBL-Insuffiziente Patienten. Damit konnten wir die Ergebnisse von Haerynck et al. [39] bestätigen. Des Weiteren vollzog sich bei unserem Kollektiv auch die PA-Chronifizierung schneller, wenn eine MBL-Insuffizienz vorlag, als wenn dies nicht der Fall war.

Dieses Ergebnis weist das MBL-Gen als wichtigen Modulator für den klinischen Verlauf der CF aus und macht es attraktiv zur Identifizierung von engmaschig zu betreuenden „Risikopatienten“.

Eine wichtige Frage bei der Interpretation und dem Vergleich unserer Ergebnisse zu diesem nicht un- aber heterogen erforschten Thema mit den Ergebnissen anderer Teams ist die Definition der MBL-Insuffizienz.

Diese kann über zwei Größen definiert werden: Die Menge des MBL im Serum oder den MBL-Genotyp. Das MBL-Serumlevel wird neben dem Genotyp durch eine Vielzahl von Einflussfaktoren bestimmt.

So wirken sich unter anderem das Patientenalter, Entzündungsmediatoren wie etwa Interleukin 6 sowie Wachstums- und Schilddrüsenhormone auf die Höhe des MBL-Spiegels aus [87]. Des Weiteren berücksichtigt die alleinige Messung der MBL-Menge nicht dessen Unterschiede in der Oligomerisation und Funktionsfähigkeit des MBL. Auch wenn eine Messung des Lectin-Aktivierungsweges dieses Problem umgehen könnte [91], bleiben die MBL-Schwankungen auf Grund der genannten Einflussgrößen als größtes Hindernis bestehen, um eine präzise Aussage zur Wirkfähigkeit des MBLs im Serum über die gesamte Beobachtungsdauer der CF-Patienten machen zu können.

Aus diesem Grund analysierten wir die MBL SNPs unserer Patienten und stellten ähnlich wie L.P. Gravina et al. [35] drei Gruppen auf: „Low“, „Intermediate“ und „High“. Diese drei SNP-Gruppen berücksichtigen sowohl ein gewisses MBL-Serumlevel, welches durchschnittlich mit ihnen einhergeht, als auch Unterschiede in der Funktionsfähigkeit, der von ihnen codierten MBL-Proteine [11].

Wir definierten die „Low“- (17,6 %) und die „Intermediate“- (35,3%) Gruppe als MBL-Insuffizient, da sie vergleichbar niedrige MBL-Serumspiegel zeigen. Insbesondere die MBL-Klassen mit den Genotypen „YAYO“ und „YOXA“, die beide ein MBL-Serumlevel von \approx 400 ng/ml aufweisen, befinden sich bei dieser Einteilung, im Gegensatz zu der Einteilung von Chalmers et al. [11], in einer Gruppe.

Die MBL- „High“ (47,1%) Gruppe kann als MBL-Suffizient gelten. Sowohl diese Definition der Gruppen als auch deren Häufigkeiten entspricht dabei ungefähr der Häufigkeitsverteilung von Gravina et al. [35] mit „Low“: 17,7%, „Intermediate“: 29,2% und „High“: 52,1%.

Zusätzlich zur Genotypen-Analyse überprüften wir die Korrelation von MBL-Genotyp und MBL-Serum-Level in unserem Kollektiv. Die von uns gemessenen MBL-Serum-Level wiesen Schwankungen auf, blieben jedoch stets signifikant abhängig von ihrem Genotyp. Im Zusammenhang mit der signifikanten Korrelation von MBL-Genotyp und chronischer PA-Besiedlung kann somit der MBL-Genotyp als sinnvolles Risikogen zur Einschätzung des CF-Verlaufes angesehen werden.

Unklar ist, wie diese Korrelation genau zu Stande kommt. So bindet MBL z.B. in vitro nicht - oder nur sehr schwach - an PA [32, 20]. Dazu müssen weitere Forschungsergebnisse abgewartet werden.

7.2 *Pseudomonas aeruginosa* und FEV1

Ebenso wie Gravina et al. [35] und Haerynck et al. [39] konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen einer niedrigen MBL-Suffizienz-Klasse und einer verringerten FEV1 finden. In der 4 Jahre andauernden Verlaufsbeobachtung jedoch, konnten Gravina et al. [35]

eine signifikant schlechtere FEV1 bei MBL-Insuffizienten Patienten im Vergleich zu MBL-Suffizienten Patienten nachweisen. Auch Chalmers et al. [11] fand in seiner Metaanalyse einen signifikanten Nachweis für diese Korrelation ($p < 0,0001$) [11].

Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten darin begründet sein, dass die Messung der FEV1 mit abnehmender Lungenfunktion einer hohen Schwankungsbreite unterliegt [10], so dass die hohe Variabilität in der Lungenfunktion der untersuchten Patienten zu den differierenden Ergebnissen geführt hat. Auch könnten Unterschiede im Keimpektrum, welches einer PA-Besiedlung normalerweise vorausgeht [55], die FEV1 beeinflusst haben ohne von unserer oder den genannten Studien erfasst worden zu sein.

Jenseits davon stellt sich die Frage, ob die vermeintlich verschlechterte Lungenfunktion bei MBL-Insuffizienten CF-Patienten eine Folge der insbesondere bei dieser Patientengruppe früheren und häufigeren PA-Infektion ist oder auch ohne PA-Besiedlung durch die MBL-Insuffizienz selbst verursacht wird.

Garred et al. [31] fanden nur bei chronisch PA-Infizierten mit hohen Titern von Anti-PA im Serum einen Unterschied in der FEV1 zwischen MBL-Suffizienten und MBL-Insuffizienten. Auch Kosorok et al. [53] zeigten, dass eine PA-Besiedlung von CF-Patienten direkt mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion einhergeht, so dass die PA-Infektion zumindest eine entscheidende Rolle bei der Verschlechterung der FEV1 spielen muss.

Da wir gezeigt haben, dass die MBL-Insuffizienz mit einer früheren chronischen PA-Besiedlung einhergeht, ist es nahe liegend, dass aus einer MBL-Insuffizienz auch eine stärkere Verschlechterung der FEV1, der Lebensqualität und Lebenszeit von CF-Patienten resultiert. Dass wir keine direkte, signifikante Korrelation zwischen MBL-Klasse und FEV1 nachweisen konnten, ist a.e. auf die genannten Messunsicherheiten oder Limitationen, die im entsprechenden Abschnitt aufgeführt sind, zurückzuführen.

7.3 SFTPD

SFTPD wird pulmonal sezerniert, besitzt mannigfaltige immunologische Aufgaben und ist Teil des lebensnotwendigen Surfactants [11].

Die funktionellen Fähigkeiten von SFTPD hängen stark mit ihrem Multimerisierungsgrad zusammen, der entscheidende Auswirkungen auf Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen wie CF hat [69, 96, 2]. Nur hoch multimere Formen der pulmonalen SFTPD zeigen eine robuste Mannan-Bindungsaktivität [54, 37].

Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass strukturelle SFTPD-Polymorphismen den konstitutionellen Serumspiegel, die Lektinaktivität und den Zustand der SFTPD-Oligomerisierung beeinflussen. Sowohl bei Lungen- als auch bei anderen

Erkrankungen zeigen Träger der Aminosäure Methionin des Codon 11 innerhalb des SFTPD-Gens die höchsten Serumkonzentrationen von SFTPD.

Des Weiteren zeigen sie eine multimere Organisation von SFTPD mit einer uneingeschränkten Lektinbindungsaktivität im Gegensatz zu den Trägern, die Threonin in Codon 11 tragen [57, 26].

Die Agglutination von PA korreliert mit der Konzentration und multimeren Organisation von SFTPD in der BALF [38]. Außerdem konnten genetische Assoziationen zwischen Polymorphismen von SFTPD und verschiedenen Lungenerkrankungen nachgewiesen werden [86, 62]. So gehen Polymorphismen im SFTPD-Gen mit einem erhöhten Risiko für bakterielle und virale Infektionen einher [56, 27]. Bisher konnten die wenigen Studien, in denen Tensidprotein-Gene bei CF-Erkrankungen untersucht wurden, keinen wesentlichen Zusammenhang mit SFTPD-Polymorphismen nachweisen [71, 62].

Olesen et al. konnten weder den berichteten Zusammenhang zwischen der SFTPDMet11Thr-Variation und dem SFTPD-Serumlevel bestätigen, noch konnten sie eine Korrelation zwischen SFTPD-SNPs und der Lungenfunktion nachweisen. Auch unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass keines der drei einzelnen SNPs im SFTPDkodierenden Gen mit den SFTPD-Serumspiegeln, der Lungenfunktion oder der PA-Infektion bei CF-Patienten zusammenhängt. Die Genotypenverteilung jedes SNP ist weder mit dem Status noch mit dem Alter beim ersten Nachweis oder beim Einsetzen einer chronischen PA-Infektion verbunden.

Genetische Assoziationsstudien wie unsere werden jedoch durch die Tatsache erschwert, dass ein starkes Bindungsungleichgewicht zwischen Allelen besteht, die über das Gen hinweg Haplotypen mit relevanten Multilocus-Effekten bilden, die für einzelne Varianten nicht beobachtet werden. Aus diesem Grund rekonstruierten wir aus den drei untersuchten SNPs im SFTPD-kodierenden Gen drei Haupthaplotypen, die etwa 94% aller in unserer Studienkohorte beobachteten Haplotypen ausmachen. Unsere Daten zu den Dreipunkt-Haplotypen, die aus den Polymorphismen Met11Thr, Ala160Thr und Ser270Thr bestehen, stimmen gut mit den zuvor veröffentlichten Ergebnissen einer kaukasischen Kontrollpopulation überein [34].

Wir untersuchten die Beziehung zwischen dem Alter zu Beginn einer chronischen PA-Infektion und den SFTPD-Haplotypen. Unter Verwendung des gemeinsamen T-A-THaplotyps (= 11Met-160Thr-270Ser) als Referenz zeigte die Regressionsanalyse eine signifikante Assoziation des C-G-T-Haplotyps (= 11Thr-160Ala-270Ser) mit einem früheren Alter zu Beginn der PAC.

In der vorliegenden Studie konnten wir erstmalig nachweisen, dass bei der Multilocus-Analyse von drei SFTPD SNP-Haplotypen T-A-T signifikant mit einem verringerten Risiko einer chronischen PA-Infektion assoziiert war. Unsere Ergebnisse legen die Beteiligung des T-A-T-Haplotyps an der Verzögerung der PAC-Infektion nahe. Dies könnte durch das Vorhandensein eines Allels mit Methionin am Codon 11 vermittelt werden, welches die Oligomerisierung von SFTPD und damit seine antimikrobielle Funktion gegen PA beeinflusst.

Dass wir keine klinisch signifikante Korrelation zwischen SFTPD-Genotyp und dem PA-Status nachweisen konnten, ist neben den bereits beschriebenen Problemen genetischer Assoziationsstudien wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die genetisch determinierten Variationen der SFTPD-Funktionsfähigkeit und dem -Serumlevel auf Grund der pathophysiologischen Besonderheiten in CF-Lungen phänotypisch nicht voll zum Tragen kommen.

Viele Untersuchungen deuten darauf hin, dass das pulmonale SFTPD in Quantität und Qualität stark durch die CF und deren Folgen für die gesamte Lunge beeinflusst wird:

In einer Studie von Hull et al. [45] wurden SP-A und SP-B in der Bronchoalveolären Lavage (BALF) von CF-Patienten gemessen. Jedoch fanden sich bei den Patienten ohne allgemeine Entzündungszeichen keine Unterschiede in der Surfactant-Zusammensetzung von CF-

Patienten und Non-CF-Patienten. Im Gegensatz dazu waren die Surfactant-Zusammensetzungen zwischen CF-Patienten mit pulmonalen Entzündungszeichen im Vergleich zu CF-Patienten und zu Non-CF-Patienten ohne pulmonale Entzündungszeichen – im Sinne einer Surfactant-Disfunktion – signifikant verändert [45]. Ähnliches publizierten Noah et al. [70] in ihrer Untersuchung der SFTPD-BALF-Konzentrationen von tracheotomierten Non-CF-Patienten. Einer Patientengruppe, die oft mit Infektionen unter anderem durch PA zu kämpfen hat. Dabei fanden sich auch für diese Non-CF-Patienten reduzierte SFTPD-Konzentrationen unter einer bakteriellen Infektion [70].

Unterstützt wird die Erkenntnis, dass pulmonale Entzündungsprozesse die Qualität und Quantität vom pulmonalem SFTPD stark beeinflussen, durch die Tatsache, dass in hoch entzündeten Bereichen von CF-Lungen immunhistochemisch wenig bis gar kein SFTPD nachgewiesen werden konnte. Verringerte SFTPD-mRNA-Konzentrationen und verstärkte immunhistochemische SFTPD-Makrophageneinfärbung in diesen entzündeten Bereichen und vergleichsweise starke SFTPD-Epithelzelleinfärbung von nicht entzündeten Bereichen sprechen für eine verringerte SFTPD-Expression und gleichzeitig für einen erhöhten SFTPD-Abbau auf Grund der pulmonalen Entzündungsreaktion [70].

Möglich wäre eine SFTPD-Proteolyse, durch die mit den erniedrigten SFTPD-BALF-Werten invers korrelierenden Neutrophilen-Serin-Proteasen: NSP [17, 54, 36], HLE, HLCG und HLP3

[36, 8], welche bei Entzündungsreaktionen vermehrt ausgeschüttet werden. In vitro sind die genannten Proteasen in der Lage SFTPD abzubauen [8].

Auch für die Metalloproteinase von PA wurde eine inverse Korrelation mit der SFTPD-Konzentration in der BALF festgestellt [8]. Dass PA SFTPD abbauen kann, wurde spezifisch in zwei weiteren Studien untersucht: Dabei wurden Fragmente, die bei dem SFTPD-Abbau durch eine von PA sezernierte Elastase entstehen, in CF-Patienten nachgewiesen. Diese SFTPD-Fragmente waren nicht mehr in der Lage, Bakterien zu aggregieren, zu binden oder die Phagozytierung zu fördern [1, 59].

Es liegt nahe, einen Teufelskreis anzunehmen, der mit einer Entzündungsreaktion auf Grund der bei CF-Patienten vulnerablen Lunge beginnt, was in diesen entzündeten Bereichen einen erhöhten Abbau und verminderte Produktion von SFTPD zur Folge hat, woraufhin die Phagozytierung der Infektionserreger geschwächt und die immuninhibierende Wirkung von SFTPD quantitativ verringert wird, so dass die neutrophile Entzündungsreaktion überschießt und der Circulus vitiosus von vorne beginnt [70].

Hier wird ein mögliches Problem der SFTPD-Genotyp-Outcome-Hypothese deutlich: Der Rückschluss vom SFTPD-Genotyp auf das Serum-Level und vom Serum-Level auf das pulmonale SFTPD-Level und damit auf immunologische Fähigkeiten von CF-Patienten ist schwierig, da die Lunge bei der CF eine Doppelrolle einnimmt. Sie ist nicht nur Hauptexpressionsort des SFTPD, sondern gleichzeitig auch Hauptinfektionsort, inklusive der beschriebenen Folgen auf die Quantität und Qualität von SFTPD. Dadurch bleiben die Auswirkungen des SFTPD-Genotyps auf die wirksame, pulmonale SFTPD-Menge in der CF-Lunge gering.

Hinzu kommen weitere externe Einflussfaktoren wie zum Beispiel die Sauerstofftherapie und Passivrauchen. So führt Hyperoxie nachweislich zu einer stärkeren SFTPD-Gen-Expression [89], wohingegen Raucher im Vergleich zu gleichaltrigen Nichtrauchern verringerte bronchoalveoläre SFTPD-Level aufweisen [3].

Dies macht unser Ergebnis, dass nur ein bestimmter Haplotyp (C-G-T) eine signifikante Korrelation zu einer früheren chronischen PA-Infektion aufweist, einzelne SFTPD-Genotypen jedoch nicht, pathophysiologisch plausibel, da sich nur über Multilocus Effekte des C-G-T-Haplotyps eine ausreichende Wirkung auf das von der pulmonalen Entzündungssituation stark beeinflusste SFTPD einzustellen scheint. Zur Bestätigung dieser These müssen jedoch noch weitere Studien in größeren Kollektiven abgewartet werden, um auch die möglichen, schwächeren, von uns jedoch nicht gemessenen, Effekte einzelner SFTPD-Genotypen auf den PA-Status nachzuweisen und unsere Ergebnisse der Haplotypen Analyse zu unterstützen.

Dann könnte der SFTPD Genotyp bzw. der C-G-T Haplotyp in Zukunft zur frühzeitigen Identifikation von Risikopatienten genutzt werden.

Das SFTPD-Serumlevel könnte zudem als Live-Marker für gefährdete CF Patienten nutzbar sein: Olesen et al. [71] konnten eine inverse Korrelation zwischen dem SFTPD-Serum-Level und der FEV1 nachweisen. Auch wir konnten diese Korrelation, welche unabhängig vom PAsstatus und dem SFTPD-Genotyp war, bestätigen.

Diese ist wahrscheinlich nicht darauf zurückzuführen, dass die SFTPD-Expression zunimmt, sondern kommt dadurch zustande, dass mehr SFTPD von der Lunge ins Blut übertritt, da bei CF die Blut-Luft-Schranke fibrotisch umgebaut wird und ihre Durchlässigkeit zunimmt [79] (s. Abbildung 21). Ähnliches gilt z.B. auch für SP-A bei ARDS, welches in direkter Korrelation zum Lungenschaden der Patienten steht [42].

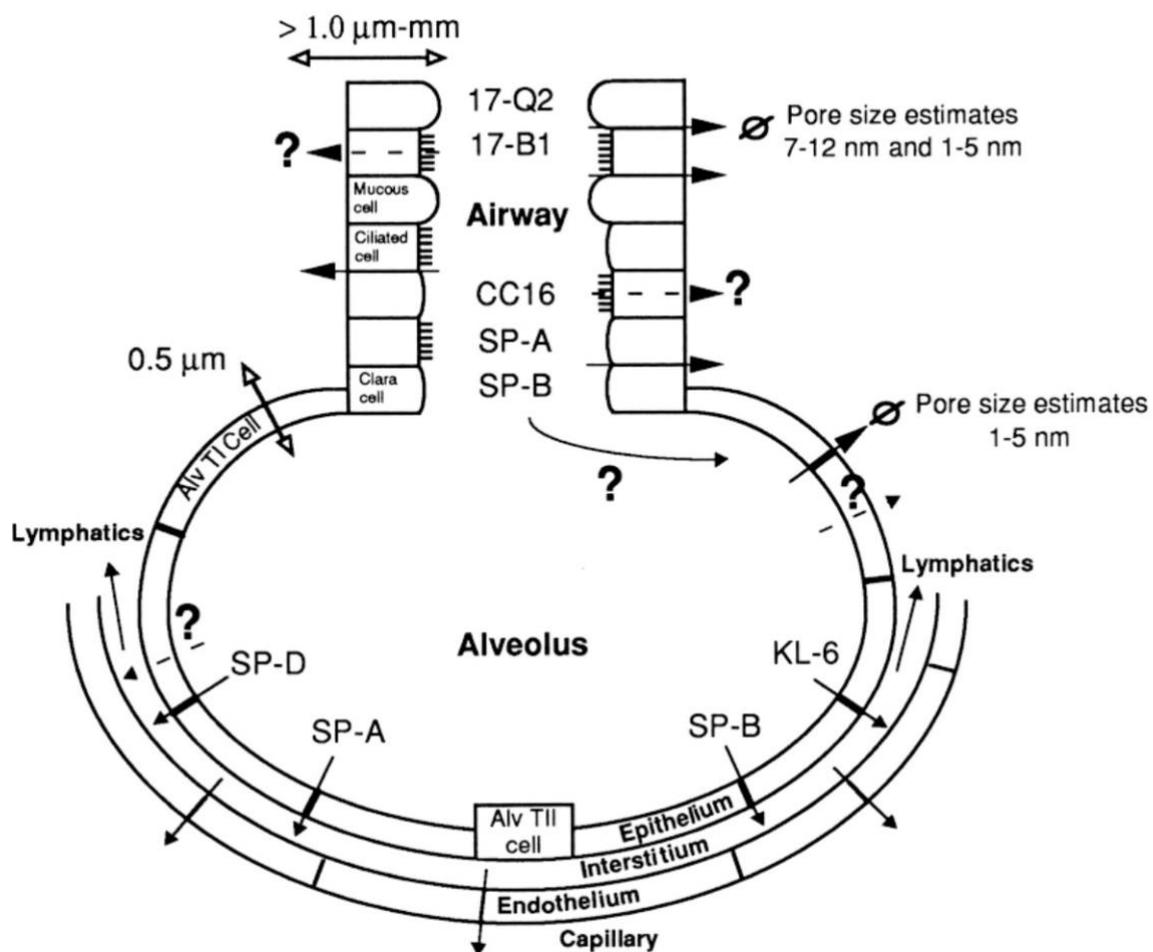


Abbildung 21: Übertritt von SFTPD durch die Alveolarmembran [42]

Eine weitere Erklärung für die inverse Korrelation von SFTPD und FEV1 könnte sein, dass die hepatische SFTPD Elimination durch CF-spezifische Leberschäden reduziert wird.

Dementsprechend könnte das SFTPD-Serumlevel als Entzündungsmarker beziehungsweise Marker für den Alveolarschaden genutzt werden, um kritische Patienten zu überwachen.

Wünschenswert wären diesbezüglich noch weitere Studien in Bezug auf die durch CF ebenfalls oft verschlechterte Leberfunktion und deren Einfluss auf das SFTPD-Serumlevel, um eine potentielle Fehlerquelle eines solchen Markers auszuschließen.

7.4 Spezifischen Therapie

Gegenstand aktueller Forschung ist die MBL-Substitutionstherapie. Unsere Feststellung, dass MBL-Insuffiziente Patienten eine frühere chronische Besiedlung mit PA erleiden, sowie die signifikant verkürzte Lebenserwartung dieser Patienten [46] bei beschleunigter Abnahme der Lungenfunktion (FEV1) [63] und die besondere Rolle von MBL bei der Erregerabwehr legen nahe, dass eine intravenöse MBL-Substitution einen Benefit für MBL-Insuffiziente Patienten darstellen könnte.

Obwohl mehrfach gezeigt wurde, dass MBL-Infusionstherapien bei Patienten mit verringerter MBL-Funktionalität auch über mehrere Monate gut vertragen werden [70] und die LectinKomplementaktivierung wiederherstellen können [90, 9], gibt es bisher nur eine Einzelfallstudie von Garred et al. [30] über eine MBL-Substitutionstherapie bei einem CF-Patienten. Dabei stellte sich eine Stabilisierung, jedoch keine klinische Verbesserung des von rezidivierenden PA-Infektionen geplagten CF-Patienten ein. Die FEV1 korrelierte dabei signifikant mit dem MBL-Serum-Level [29].

Falls sich ein Nutzen einer MBL-Substitutionstherapie in einer großen kontrollierten Studie für CF-Patienten zeigt, bleibt aus Patienten- und ökonomischer Sicht die Frage, ob eine solche Substitution nur bei konstanter Verabreichung mehrfach pro Woche Erfolg hat oder ob auch zeitlich begrenzte Therapien einen langfristigen Nutzen aufweisen. Des Weiteren wäre eine solche Therapie wahrscheinlich nur für einen sehr geringen Anteil der CF-Patienten (10-15%) mit schwerer MBL-Insuffizienz (YOYO, YOXA) von signifikantem Nutzen [11].

7.5 Andere Modifikatoren

Neben den von uns untersuchten CF-Modifikatoren MBL und SFTPD gibt es noch weitere Immunmodulatoren wie MASP2, TGF β und TNF α , die die Lungenfunktion und den klinischen Verlauf von CF-Patienten beeinflussen.

Mutationen im MASP2-Gen auf Exon-3 traten bei einer dänischen Normalpopulation zu 55% auf. Die Funktion der MASP2 ist eng mit dem Lectin/MBL-Aktivierungsweg verknüpft. Da dieser

nicht nur durch MBL-Insuffizienz, sondern auch durch MASP2-Mutationen in seiner Funktion beeinflusst wird [9], wir unsere Patienten jedoch nicht auf MASP2-Mutationen untersucht haben, liegt es nahe anzunehmen, dass unsere Ergebnisse durch etwaige Patienten mit MASP2-Mutationen beeinflusst wurden.

Diese Problematik bleibt obgleich der Tatsache bestehen, dass Carlsson et al. [9] keine Beeinflussung der CF-Klinik durch MASP-2-Gen-Mutationen finden konnten, da MBL und MASP-2 funktionell voneinander abhängig sind und so eine isolierte Betrachtung des MBL-Einflusses fraglich verhindert haben.

Auf der anderen Seite zeigte eine Studie von Olesen et al. [72], dass MASP2-Mutationen den Lectin-Aktivierungsweg zwar nicht beeinflussen, jedoch das Outcome von CF-Patienten. Weitere größere Studien unter Berücksichtigung von MBL- und MASP-2-Mutationen müssen hier abgewartet werden.

Dass TGF β -1 einen Einfluss auf die Lungenfunktion bei CF-Patienten hat, wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt. Über die Auswirkungen auf die Lungenfunktion der verschiedenen TGF β -1 Mutationen gibt es verschiedene Ergebnisse. Das 509C-Allel und Codon 10T scheinen jedoch zu einer verbesserten Lungenfunktion bei CF-Patienten zu führen. Zudem interagieren beide TGF β -1-Varianten direkt mit dem CFTR-Genotyp Δ F508 und die Codon 10-Variante zusätzlich mit MBL2 [16].

Der Tumor necrosis factor α (TNF α) spielt eine entscheidende Rolle in der Immunregulation. Er wird hauptsächlich von Makrophagen sezerniert und induziert die Ausschüttung anderer Zytokine. Des Weiteren ist er pro-thrombotisch und steuert die Lymphozyten-Migration. Aus diesem Grund überrascht es nicht, dass Polymorphismen im TNF α -Gen mit einem schweren Verlauf von CF korrelieren. Insbesondere CF-Patienten mit dem +691gins/+691gdel Genotyp hatten in einer Arbeit von Yarden et al. [95] eine höhere durchschnittliche FEV1. Auch die Erstbesiedlung mit PA wurde durch TNF α SNPs beeinflusst, so dass +691gins/+691gins Homozygote signifikant früher mit PA besiedelt waren als der Wildtyp [95].

7.6 Stärken und Limitationen der Arbeit

Unser Kollektiv setzte sich aus 35 Patientinnen und Patienten zusammen, die alle am Universitätsklinikum des Saarlandes untersucht und behandelt wurden, so dass Unterschiede in Therapie und Messmethode nur einen geringen Einfluss auf das Studienergebnis nehmen konnten.

Um unterschiedliche CFTR-Mutationen, als primären Modulator des CF-Verlaufs auszuschließen, haben wir im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Studien zu diesem Thema, wie Haerynck et al. [39], Gravina et al. [35], Lin et al. [62] und die größte Metastudie von Chalmers et al. [11], Patienten, die nicht homozygot für Δ F508 sind, ausgeschlossen.

Die genannten Studien haben versucht, über das Einschlusskriterium „Pankreasinsuffizienz“ die Heterogenität ihrer Genotypen über eine ähnlich schwere Ausprägung der CF zu nivellieren. Die Homozygote $\Delta F508$ -Mutation geht in 99% der Fälle mit einer Pankreasinsuffizienz einher [50]. Der Umkehrschluss, dass pankreasinsuffiziente Patienten homozygot für $\Delta F508$ sind, gilt jedoch nicht, da die Pankreasinsuffizienz ebenso durch Mutationen außerhalb des CFTR-Locus wie G551D oder S549N verursacht werden kann [81]. Aus diesem Grund ist die genetische Vergleichbarkeit der Patienten in den genannten Studien nicht ausreichend. Insbesondere im Hinblick auf direkte Interaktionen der CFTR-Mutationen mit weiteren (genetischen) CF-Modifikatoren ist es problematisch ein genetisch so heterogenes Kollektiv zu untersuchen.

So wird zum Beispiel IL-1 nur bei einer $\Delta F508$ CFTR-Mutation zu spät oder gar nicht sezerniert, so dass der entscheidende Signalweg über das „myd88 adaptor Protein“ und die Ablesung von NF- κ B zur schnellen Elimination von PA ausfällt. Auch der Verlauf der chronischen Entzündung, die durch PA ausgelöst wird, wird durch IL-1 reguliert [60], so dass der CFTR-Mutationstyp sehr wahrscheinlich einen entscheidenden Einfluss auf die PABesiedlung hat.

Des Weiteren zeigen CF-Patienten, die nicht homozygot für $\Delta F508$ sind, eine schnellere Verschlechterung der Lungenfunktion als $\Delta F508$ homozygote [18], so dass die FEV1 in den bisherigen Studien im Gegensatz zu dem von uns gewählten - genetisch homogenen Patientenkollektiv - nur schwer zu vergleichen ist.

Da von den meisten Autoren eine signifikante Korrelation zwischen einer schlechten FEV1 und einer Pankreasinsuffizienz gefunden wurde [33, 81], schien es uns sinnvoll, insbesondere bei unserer pulmonalen Fragestellung, die Pankreasinsuffizienz zusätzlich zum CFTR-Genotyp als Einschlusskriterium zu definieren.

Neben der Pankreasinsuffizienz beeinflusst auch das Geschlecht die FEV1. So zeigen CFPatientinnen eine signifikant schnellere Abnahme der FEV1 als männliche CF-Patienten [18].

Unser Geschlechterverhältnis betrug 37,5% weibliche zu 62% männliche Patienten in der nie PA-Infizierten Gruppe und 46,7% weibliche zu 53,3% männliche Patienten in der chronisch PA-Infizierten Gruppe. Durch diese gleichmäßige Geschlechterverteilung über die genannten Gruppen, insbesondere der entscheidenden PAC-Gruppe, ist eine Beeinflussung unserer Ergebnisse durch das Geschlecht unwahrscheinlich.

Auf Grund dieses homogenen Patientenkollektivs, unseres langen Beobachtungszeitraums von 9-29 Jahren (1988-2018) und der Behandlung aller Patienten in einem Zentrum und unsere strengen genetischen (homozygot für $\Delta F508$) wie klinischen (Pankreasinsuffizienz)

Einschlusskriterien konnten wir den fraglichen Einfluss der MBL und SFTPD SNPs auf die PA-Besiedlung der CF-Patienten präzise untersuchen.

Nichtsdestotrotz gibt es Limitationen unserer Arbeit, die für die Interpretation sowie für die zukünftige Forschung zu berücksichtigen sind.

Die CF ist eine Erkrankung multifaktorieller Genese. Die Größen, die Einfluss auf den CFPhänotypen nehmen sind in Abbildung 22 dargestellt.

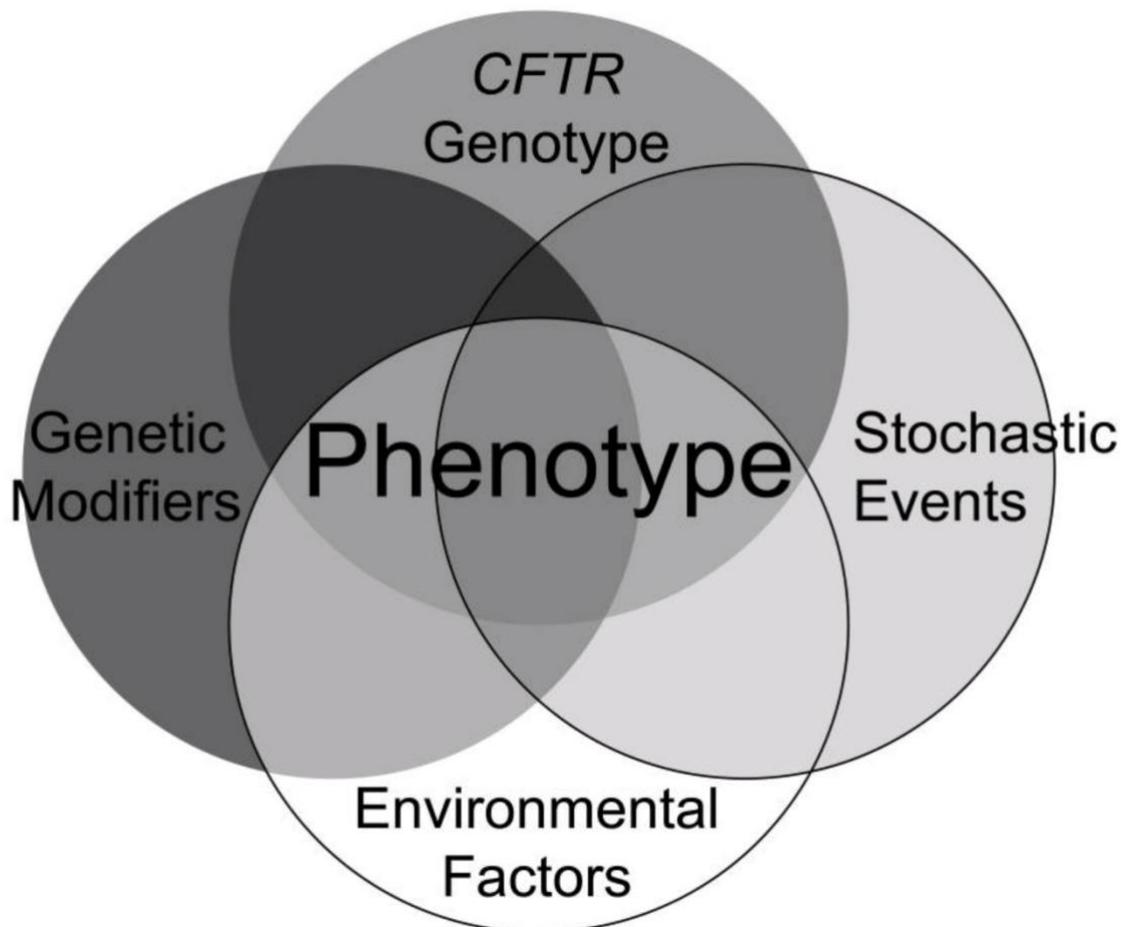


Abbildung 22: Einflussgrößen auf den CF-Phänotyp

Die Kollektive MBL und SFTPD haben wir in Hinblick auf ihre Beeinflussung der CF-Genese untersucht. Neben schwer zu steuernden Einflussfaktoren wie das soziale Umfeld und die Patientencompliance gibt es jedoch noch andere genetische Modifikatoren, die wir nicht ausschließen konnten:

Dazu zählen sowohl die bereits beschriebenen Auswirkungen von MASP2-, TGF β - und TNF α -Mutationen als auch die inter- und intragenetischen Einflüsse von SNPs für SP-A1, SPA2, SP-C und SP-B auf den CF-Verlauf, den Lin et al. [62] erst 2018 nachwiesen.

Daneben ist MBL auf dem gleichen Chromosomarm kodiert wie SFTPD, so dass Kopplungsungleichgewichte wahrscheinlich sind, welche wir in unserer Haplotypen-Analyse jedoch nicht berücksichtigen konnten.

Zweitens ist das von uns und vielen anderen Teams genutzte Modell der MBL-Insuffizienz möglicherweise nicht für alle Genotypen genau genug, um die vielen Abstufungen der qualitativen MBL-Insuffizienz differenziert darzustellen:

So wurden von uns und den meisten anderen Teams in der Strukturmutation O (Wildtyp ist A) drei Allele (B, C und D) zusammengefasst, wohingegen Garred et al. [28] zeigten, dass heterozygote A/D-Individuen für gewöhnlich höher oligomerisiertes MBL bilden als die A/B- oder A/C-Individuen und damit deutlich effizienter bakterielle Zuckerreste binden und das Komplementsystem aktivieren können.

Die Zuordnung der „Intermediate“ Gruppe zur MBL-Insuffizienz-Klasse war auf Grund von lediglich 6 Patienten in der „Low“-Gruppe notwendig und auch durch Gravina et al. [35] etabliert. Jedoch zeigte Chalmers et al. [11], dass sich im isolierten Vergleich zwischen „Intermediate“- und „High“-Gruppe keine Unterschiede im klinischen Outcome ergeben [12] und nutzte in der größten Metaanalyse zur MBL-Insuffizienz eine andere Einteilung („Intermediate“ und „High“ Gruppe bilden die MBL-Suffizienz-Klasse) als wir, was die Vergleichbarkeit unserer Arbeiten erschwert.

Um alle diese bereits identifizierten Modifikatoren abbilden zu können, hätte es ein deutlich größeres Kollektiv als das Vorliegende benötigt. Mit 35 Patienten war unsere Studie relativ klein. Einen Teil der Ergebnisse anderer Autoren wie zum Beispiel die Auswirkungen von MBL-Insuffizienz auf eine frühere PA-Besiedlung oder eine schlechtere FEV1 [35, 11] konnten wir möglicherweise aus diesem Grund nicht nachweisen. Auch die bereits erläuterte Problematik der SFTPD-Haplotypen Analyse hätte durch ein größeres Kollektiv möglicherweise entschärft werden können.

Zu Gute gekommen wären die abmildernden Effekte eines größeren Stichprobe zudem einer dritten möglichen Limitation unserer Arbeit. Die hohen Unterschiede im Lebensalter unserer Patienten (Zeitpunkt T1: 7-18 Lebensjahre) und deren Einfluss auf die von uns untersuchten Parameter:

Auf Grund der wiederkehrenden Infektionen wird das Lungengewebe bei CF mit zunehmender Erkrankungsdauer progressiv fibrotisch umgebaut. Auch das für CF typische, pulmonale Keimspektrum ändert sich im Krankheitsverlauf. Dadurch nimmt die FEV1 mit zunehmendem Lebensalter konstant ab [11], wohingegen die Besiedlung mit PA, unabhängig vom MBL-Status, zunimmt [53].

Des Weiteren ist auch der MBL-Serumspiegel stark altersabhängig wie Turner et al. zeigten [22]: Patienten des gleichen Haplotyps (A/A) hatten in jüngeren Jahren deutlich niedrigere MBL-Serumspiegel als im Erwachsenenalter. Dieser Effekt ist bei Haplotypen der höheren MBL-Serumspiegel-Klassen grundsätzlich stärker ausgeprägt, da Genotypen mit niedrigeren MBL-Serumspiegel-Klassen eine geringere Reaktionsspannweite auf Entzündungsstimuli aufweisen.

Ergebnisrelevant kann die Altersvarianz auf die MBL-Serumspiegelschwankungen jedoch nicht gewesen sein, da wir nachweisen konnten, dass unabhängig von den Altersunterschieden eine signifikante Korrelation zwischen den MBL-Genotypen und der Höhe unserer MBL-Serumspiegel bestand. Andernfalls wäre uns wahrscheinlich kein Nachweis der Korrelation vom MBL-Genotyp und dem Zeitpunkt der chronischen PABesiedlung gelungen.

Wir konnten nachweisen, dass das SFTPD-Serumlevel in unserer Studie nicht vom Lebensalter der Patienten beeinflusst wurde. Die für die PA-Besiedlung entscheidende, pulmonale SFTPD-Menge wurde nicht von uns gemessen, scheint jedoch unabhängig vom Lebensalter zu sein [3]. Dementsprechend hat sich die Altersvarianz unseres Kollektives wahrscheinlich nicht auf die SFTPD-PA-Fragestellung ausgewirkt.

Eine eigene Überprüfung dieses Umstandes an unserem Kollektiv mit Hilfe bronchoalveolär gemessener SFTPD-Werte wäre jedoch wünschenswert gewesen. Dadurch wäre auch eine Evaluation der oben beschriebenen Problematik bzgl. der tatsächlichen Qualität und Quantität des bronchoalveolären SFTPDs und deren fraglicher Abhängigkeit vom SFTPDGenotyp möglich gewesen.

Ein Age-Matching und eine gesunde Kontrollgruppe hätten die Einflüsse der genannten Störfaktoren auf unsere Ergebnisse ebenfalls weiter reduzieren können.

7.7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie konnten wir erstmalig in einem genetisch homogenen Kollektiv zeigen, dass MBL-SNPs und der SFTPD-Haplotyp einen entscheidenden Einfluss auf den variablen Krankheitsverlauf von CF nehmen.

Unsere lange Beobachtungsdauer ermöglichte uns dabei eine konstante Erfassung aller PA-Infektionen und die Bestimmung der lebensverkürzenden PA-Chronifizierung bei CFPatienten. Mit den immer günstigeren Gen-Tests könnte es so gelingen, MBL-Insuffiziente Patienten als „Patients at risk“ zu identifizieren und ihr Outcome durch frühzeitige, intensivierete Überwachung und antibiotische Therapie zu verbessern.

Um die Rolle der pulmonalen SFTPD-Quantität und -Qualität bei CF-Patienten besser zu verstehen und den SFTPD Genotypen als Prädiktor für Risikopatienten nutzbar zu machen, sind weitere Studien anzustreben, die in großen Kollektiven die SFTPD-Serum-Mengen messen, den SFTPD-Genotyp bestimmen und auch den SFTPD-Gehalt in der BALF in Korrelation zu den genetischen CF-Modifikatoren und dem CF-Phänotyp setzen.

Trotz der Arbeit von Lin et al. [62] kann der SFTPD-Genotyp aktuell nicht als alleiniger Marker für CF-Risikopatienten herangezogen werden, jedoch scheint das SFTPD Serumlevel eine hohe Aussagekraft über die Lungenfunktion zu haben.

In der Therapie bleiben MBL- und SFTPD-Substitutionstherapien wahrscheinlich experimenteller Natur, da eine MBL-Substitution nur für die niedrigste MBL-Klasse „Low“ einen messbaren Effekt hätte, während eine langfristige SFTPD-Substitution vor dem erläuterten SFTPD-Abbau in der Lunge wenig sinnvoll erscheint. Zudem wären beide Therapien wahrscheinlich sehr kostenintensiv und würden höchstens kurzfristige Verbesserungen zeigen.

Somit scheint es primär lohnenswert die zukünftigen Forschungen auf die Validierung der Serummarker als auch die Genotypen von Risikopatienten zu fokussieren, um so eine konstante Weiterentwicklung der Therapie und Betreuung von CF-Patienten sicherzustellen.

8 Literatur

1. Alcorn JF, Wright JR (2004) Degradation of Pulmonary Surfactant Protein D by *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Abrogates Innate Immune Function. *Journal of Biological Chemistry* 279(29): 30871–30879. doi: 10.1074/jbc.M400796200
2. Atochina-Vasserman EN (2012) S-nitrosylation of surfactant protein D as a modulator of pulmonary inflammation. *Biochimica et biophysica acta* 1820(6): 763–769. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.12.006
3. Betsuyaku T, KUROKI Y, Nagai K et al (2004) Effects of ageing and smoking on SP-A and SP-D levels in bronchoalveolar lavage fluid. *The European respiratory journal* 24(6): 964–970. doi: 10.1183/09031936.04.00064004
4. Bilton D (2008) Cystic fibrosis. *Medicine* 36(5): 273–278. doi: 10.1016/j.mpmed.2008.03.014
5. Botto M, Kirschfink M, Macor P et al (2009) Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. *Molecular Immunology* 46(14): 2774–2783. doi: 10.1016/j.molimm.2009.04.029
6. Boucher RC (2007) Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease. *Journal of internal medicine* 261(1): 5–16. doi: 10.1111/j.13652796.2006.01744.x
7. Boyle MP, Boeck K de (2013) A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *The Lancet Respiratory Medicine* 1(2): 158–163. doi: 10.1016/S2213-2600(12)70057-7
8. Bredow C von, Wiesener A, Griese M (2003) Proteolysis of Surfactant Protein D by Cystic Fibrosis Relevant Proteases. *Lung* 181(2): 79–88. doi: 10.1007/s00408-003-1008z
9. Carlsson M, Sjöholm AG, Eriksson L et al (2005) Deficiency of the mannan-binding lectin pathway of complement and poor outcome in cystic fibrosis: bacterial colonization may be decisive for a relationship. *Clinical and experimental immunology* 139(2): 306–313. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02690.x
10. Chalmers JD (2020) Cystic fibrosis lung disease and bronchiectasis. *The Lancet Respiratory Medicine* 8(1): 12–14. doi: 10.1016/S2213-2600(19)30335-2
11. Chalmers JD, Fleming GB, Hill AT et al (2011) Impact of mannose-binding lectin insufficiency on the course of cystic fibrosis. A review and meta-analysis. *Glycobiology* 21(3): 271–282. doi: 10.1093/glycob/cwq161
12. Chalmers JD, McHugh BJ, Doherty C et al (2013) Mannose-binding lectin deficiency and disease severity in non-cystic fibrosis bronchiectasis: a prospective study. *The Lancet Respiratory Medicine* 1(3): 224–232. doi: 10.1016/S2213-2600(13)70001-8

13. Choi EH, Ehrmantraut M, Foster CB et al (2006) Association of Common Haplotypes of Surfactant Protein A1 and A2 (SFTPA1 and SFTPA2) Genes with Severity of Lung Disease in Cystic Fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 41(3): 255–262. doi: 10.1002/ppul.20361
14. Chroneos ZC, Sever-Chroneos Z, Shepherd VL (2010) Pulmonary surfactant: an immunological perspective. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 25(1): 13–26. doi: 10.1159/000272047
15. *Clin Infect Dis.*-2002-Livermore-634-40
16. Collaco JM, Cutting GR (2008) Update on gene modifiers in cystic fibrosis. *Current opinion in pulmonary medicine* 14(6): 559–566. doi: 10.1097/MCP.0b013e3283121cdc
17. Cooley J, McDonald B, Accurso FJ et al (2008) Patterns of neutrophil serine protease-dependent cleavage of surfactant protein D in inflammatory lung disease. *Journal of Leukocyte Biology* 83(4): 946–955. doi: 10.1189/jlb.1007684
18. Corey M, Edwards L, Levison H et al (1997) Longitudinal analysis of pulmonary function decline in patients with cystic fibrosis. *The Journal of Pediatrics* 131(6): 809–814. doi: 10.1016/S0022-3476(97)70025-8
19. Cutting CR (2006) Ursachen der Variationen bei den Phänotypen der Mukoviszidose. *Ann Nestlé [Ger]* 64(3): 113–120. doi: 10.1159/000107640
20. Davies J, Neth O, Alton E et al (2000) Differential binding of mannose-binding lectin to respiratory pathogens in cystic fibrosis. *The Lancet* 355(9218): 1885–1886. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02297-2
21. Davies J, Turner M, Klein N (2001) The role of the collectin system in pulmonary defence. *Paediatric Respiratory Reviews* 2(1): 70–75. doi: 10.1053/prrv.2000.0104
22. Davies JC, Turner MW, Klein N (2004) Impaired pulmonary status in cystic fibrosis adults with two mutated MBL-2 alleles. *The European respiratory journal* 24(5): 798–804. doi: 10.1183/09031936.04.00055404
23. Dodge JA, Lewis PA, Stanton M et al (2007) Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *The European respiratory journal* 29(3): 522–526. doi: 10.1183/09031936.00099506
24. Döring G (ed) (2002) *Lungeninfektionen bei Mukoviszidose: Therapie und Prävention. Ein Leitfaden für Ärzte und Betroffene.* Dt. Ärzte-Verl., Köln
25. (2014) *Duale Reihe, Mibi.* In: Hof H, Dörries R, Geginat G (eds) *Medizinische Mikrobiologie. [Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Immunologie, klinische Infektiologie, Hygiene ; + campus.thieme.de], 5., vollst. überarb. Aufl.* Georg Thieme Verlag KG, s.l.

26. Fakhri D, Akiki Z, Junker K et al (2018) Surfactant protein D multimerization and gene polymorphism in COPD and asthma. *Respirology (Carlton, Vic.)* 23(3): 298–305. doi: 10.1111/resp.13193
27. Floros J, Lin HM, García A et al (2000) Surfactant protein genetic marker alleles identify a subgroup of tuberculosis in a Mexican population. *The Journal of infectious diseases* 182(5): 1473–1478. doi: 10.1086/315866
28. Garred P (2003) Mannose-binding lectin deficiency—revisited. *Molecular Immunology* 40(2-4): 73–84. doi: 10.1016/S0161-5890(03)00104-4
29. Garred P, Harboe M, Oettinger T et al (1994) Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? *Eur J Immunogenet* 21(2): 125–131
30. Garred P, Pressler T, Lanng S et al (2002) Mannose-binding lectin (MBL) therapy in an MBL-deficient patient with severe cystic fibrosis lung disease. *Pediatr. Pulmonol.* 33(3): 201–207. doi: 10.1002/ppul.10064
31. Garred P, Pressler T, Madsen HO et al (1999) Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 104(4): 431–437. doi: 10.1172/JCI6861.
32. Garred P, Pressler T, Madsen HO et al (1999) Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 104(4): 431–437. doi: 10.1172/JCI6861
33. Gaskin K, Gurwitz D, Durie P et al (1982) Improved respiratory prognosis in patients with cystic fibrosis with normal fat absorption. *The Journal of Pediatrics* 100(6): 857–862. doi: 10.1016/S0022-3476(82)80501-5
34. Glas J, Beynon V, Bachstein B et al (2008) Increased plasma concentration of surfactant protein D in chronic periodontitis independent of SFTPD genotype: potential role as a biomarker. *Tissue antigens* 72(1): 21–28. doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01056.x
35. Gravina LP, Crespo C, Giugno H et al (2015) Mannose-binding lectin gene as a modifier of the cystic fibrosis phenotype in Argentinean pediatric patients. *Journal of cystic Fibrosis* 14(1): 78–83. doi: 10.1016/j.jcf.2014.07.012
36. Griese M, Birrer P, Demirsoy A (1997) Pulmonary surfactant in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal* 10(9): 1983–1988. doi: 10.1183/09031936.97.10091983
37. Griese M, Heinrich S, Ratjen F et al (2012) Surfactant protein a in cystic fibrosis: supratrimeric structure and pulmonary outcome. *PloS one* 7(12): e51050. doi: 10.1371/journal.pone.0051050
38. Griese M, Starosta V (2005) Agglutination of *Pseudomonas aeruginosa* by Surfactant Protein D. *Pediatr. Pulmonol.* 40(5): 378–384. doi: 10.1002/ppul.20295
39. Haerynck F, van Steen K, Cattaert T et al (2012) Polymorphisms in the lectin pathway genes as a possible cause of early chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic

- fibrosis patients. *Human Immunology* 73(11): 1175–1183. doi: 10.1016/j.humimm.2012.08.010
40. Hartl D, Gaggar A, Bruscia E et al (2012) Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 11(5): 363–382. doi: 10.1016/j.jcf.2012.07.003
 41. Hartshorn KL, White MR, Teclé T et al (2007) Reduced influenza viral neutralizing activity of natural human trimers of surfactant protein D. *Respir Res* 8(1): 9. doi: 10.1186/1465-9921-8-9
 42. Hermans C, Bernard A (1999) Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *Am J Respir Crit Care Med* 159(2): 646–678. doi: 10.1164/ajrccm.159.2.9806064
 43. Herold G (ed) (2014) *Innere Medizin 2014. Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis.* Selbstverl., Köln
 44. Hilgendorff A, Heidinger K, Bohnert A et al (2009) Association of polymorphisms in the human surfactant protein-D (SFTPD) gene and postnatal pulmonary adaptation in the preterm infant. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 98(1): 112–117. doi: 10.1111/j.1651-2227.2008.01014.x
 45. Hull J, South M, Phelan P et al (1997) Surfactant Composition in Infants and Young Children with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 156(1): 161–165. doi: 10.1164/ajrccm.156.1.9609090
 46. Husby S, Herskind AM, Jensenius JC et al Heritability estimates for the constitutional levels of the collectins mannan-binding lectin and lung surfactant protein D. A study of unselected like-sexed mono- and dizygotic twins at the age of 6–9 years, vol 106, pp 389–394
 47. (2002) Kapitel 11.1: *Pseudomonas aeruginosa* und das körpereigene Abwehrsystem der CF-Patienten. In: Döring G (ed) *Lungeninfektionen bei Mukoviszidose: Therapie und Prävention. Ein Leitfaden für Ärzte und Betroffene.* Dt. Ärzte-Verl., Köln, pp 127–131
 48. (2002) Kapitel 4: *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiologie, Übertragungswege und Infektionsprophylaxe. In: Döring G (ed) *Lungeninfektionen bei Mukoviszidose: Therapie und Prävention. Ein Leitfaden für Ärzte und Betroffene.* Dt. Ärzte-Verl., Köln, pp 43–50
 49. (2014) Kapitel CF. In: Herold G (ed) *Innere Medizin 2014. Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis.* Selbstverl., Köln, pp 502–503
 50. Kerem Eitan, Corey Mary, Kerem Bat-sheva, Rommens Johanna, Markiewicz Danuta, Levison Henry, Tsui Lap-Chee, Durie Peter The Relation between Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis — Analysis of the Most Common Mutation ($\Delta F508$)

51. Kishore U, Bernal AL, Kamran MF et al (2005) Surfactant proteins SP-A and SP-D in human health and disease. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 53(5): 399–417
52. Koch A (2001) Acute Respiratory Tract Infections and Mannose-Binding Lectin Insufficiency During Early Childhood. *JAMA* 285(10): 1316. doi: 10.1001/jama.285.10.1316
53. Kosorok MR, Zeng L, West SE et al (2001) Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *Pediatr. Pulmonol.* 32(4): 277–287
54. Kotecha S, Doull I, Davies P et al (2013) Functional heterogeneity of pulmonary surfactant protein-D in cystic fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1832(12): 2391–2400. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.10.002
55. Kronborg G, Weis N, Madsen HO et al (2002) Variant mannose-binding lectin alleles are not associated with susceptibility to or outcome of invasive pneumococcal infection in randomly included patients. *The Journal of infectious diseases* 185(10): 1517–1520. doi: 10.1086/340216
56. Lahti M, Lofgren J, Marttila R et al (2002) Surfactant protein D gene polymorphism associated with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatric research* 51(6): 696–699. doi: 10.1203/00006450-200206000-00006
57. Leth-Larsen R, Garred P, Jensenius H et al (2005) A Common Polymorphism in the SFTPD Gene Influences Assembly, Function, and Concentration of Surfactant Protein D. *The Journal of Immunology* 174(3): 1532–1538. doi: 10.4049/jimmunol.174.3.1532
58. Leth-Larsen R, Nordenbaek C, Tornoe I et al (2003) Surfactant protein D (SP-D) serum levels in patients with community-acquired pneumonia☆☆This work was supported by the Danish Medical Research Council, an EU grant, contract number. QLK2-CT-20000035; the Novo Nordisk Foundation; Fonden til Lægevidenskabens Fremme; Ingemann O. Bucks Foundation and the Benzon Foundation. *Clinical Immunology* 108(1): 29–37. doi: 10.1016/S1521-6616(03)00042-1
59. LeVine AM, Whitsett JA, Gwozdz JA et al Distinct Effects of Surfactant Protein A or D Deficiency During Bacterial Infection on the Lung, vol 165, pp 3934–3940
60. Levy H, Murphy A, Zou F et al (2009) IL1B polymorphisms modulate cystic fibrosis lung disease. *Pediatr. Pulmonol.* 44(6): 580–593. doi: 10.1002/ppul.21026
61. Li SS, Khalid N, Carlson C et al (2003) Estimating haplotype frequencies and standard errors for multiple single nucleotide polymorphisms. *Biostatistics (Oxford, England)* 4(4): 513–522. doi: 10.1093/biostatistics/4.4.513

62. Lin Z, Thorenoor N, Wu R et al (2018) Genetic Association of Pulmonary Surfactant Protein Genes, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SFTPC, and SFTPD With Cystic Fibrosis. *Frontiers in immunology* 9: 2256. doi: 10.3389/fimmu.2018.02256
63. Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV et al (1992) High frequencies in African and nonAfrican populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Human molecular genetics* 1(9): 709–715
64. McIntosh JC, Swyers AH, Fisher JH et al (1996) Surfactant proteins A and D increase in response to intratracheal lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15(4): 509–519. doi: 10.1165/ajrcmb.15.4.8879185
65. Muhlebach MS, MacDonald SL, Button B et al (2006) Association between mannanbinding lectin and impaired lung function in cystic fibrosis may be age-dependent. *Clinical and experimental immunology* 145(2): 302–307. doi: 10.1111/j.13652249.2006.03151.x
66. Mukoviszidose e.V. Mukoviszidose Diagnostik
67. Nährlich L, Stuhmann-Spangenberg M, Derichs N (2014) Handlungsempfehlung nach der Leitlinie „Diagnose der Mukoviszidose“. *Monatsschr Kinderheilkd* 162(8): 723–724. doi: 10.1007/s00112-014-3122-9
68. Nährlich L, Stuhmann-Spangenberg M, Derichs N (2014) Handlungsempfehlung nach der Leitlinie „Diagnose der Mukoviszidose“. *Monatsschr Kinderheilkd* 162(8): 723–724. doi: 10.1007/s00112-014-3122-9
69. Nayak A, Dodagatta-Marri E, Tsolaki AG et al (2012) An Insight into the Diverse Roles of Surfactant Proteins, SP-A and SP-D in Innate and Adaptive Immunity. *Frontiers in immunology* 3: 131. doi: 10.3389/fimmu.2012.00131
70. Noah TL, Murphy PC, Alink JJ et al (2003) Bronchoalveolar Lavage Fluid Surfactant Protein-A and Surfactant Protein-D Are Inversely Related to Inflammation in Early Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168(6): 685–691. doi: 10.1164/rccm.200301-005OC
71. Olesen HV, Holmskov U, Schiøtz PO et al (2010) Serum-surfactant SP-D correlates inversely to lung function in cystic fibrosis. *Journal of cystic Fibrosis* 9(4): 257–262. doi: 10.1016/j.jcf.2010.03.011
72. Olesen HV, Jensenius JC, Steffensen R et al (2006) The mannan-binding lectin pathway and lung disease in cystic fibrosis--disfunction of mannan-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP-2) may be a major modifier. *Clinical Immunology* 121(3): 324– 331. doi: 10.1016/j.clim.2006.08.014
73. Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ et al (2012) Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* 487(7405): 109–113. doi: 10.1038/nature11130
74. Pletz MW, Sauer-Heilborn A, Köhnlein T et al (2010) Mukoviszidose im

- Erwachsenenalter (Cystic fibrosis in adults). *Der Internist* 51 Suppl 1: 277–288. doi: 10.1007/s00108-009-2527-3
75. Postle AD, Mander A, Reid KBM et al (1999) Deficient Hydrophilic Lung Surfactant Proteins A and D with Normal Surfactant Phospholipid Molecular Species in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20(1): 90–98. doi: 10.1165/ajrcmb.20.1.3253
76. Presanis JS, Kojima M, Sim RB (2003) Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). *Biochem. Soc. Trans.* 31(4): 748–752. doi: 10.1042/bst0310748
77. Ratjen F, Döring G (2003) Cystic fibrosis. *The Lancet* 361(9358): 681–689. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12567-6
78. Reinhardt D, Götz M, Kraemer R et al (2001) *Cystische Fibrose*. Springer, Berlin, Heidelberg
79. Restrepo CI, Dong Q, Savov J et al (1999) Surfactant Protein D Stimulates Phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by Alveolar Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21(5): 576–585. doi: 10.1165/ajrcmb.21.5.3334
80. Salehin D Die Bedeutung des Virulenzfaktors Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* bei der Zystischen Fibrose – Untersuchungen an europäischen Zwillingen und Geschwistern –
81. Santis G, Osborne L, Knight RA et al (1990) Independent genetic determinants of pancreatic and pulmonary status in cystic fibrosis. *The Lancet* 336(8723): 1081–1084. doi: 10.1016/0140-6736(90)92566-Z
82. Schöni M (2013) Mukoviszidose - zystische Fibrose. *Pädiatrie up2date* 08(02): 143–157. doi: 10.1055/s-0032-1326479
83. SHWACHMAN H (1956) Cystic Fibrosis of the Pancreas with Varying Degrees of Pancreatic Insufficiency. *Arch Pediatr Adolesc Med* 92(4): 347. doi: 10.1001/archpedi.1956.02060030341004
84. Smith EE, Buckley DG, Wu Z et al (2006) Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(22): 8487–8492. doi: 10.1073/pnas.0602138103
85. Sorensen GL (2006) Genetic and environmental influences of surfactant protein D serum levels. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 290(5): L1010-L1017. doi: 10.1152/ajplung.00487.2005
86. Sorensen GL (2018) Surfactant Protein D in Respiratory and Non-Respiratory Diseases. *Frontiers in medicine* 5: 18. doi: 10.3389/fmed.2018.00018
87. Sørensen CM, Hansen TK, Steffensen R et al (2006) Hormonal regulation of mannanbinding lectin synthesis in hepatocytes. *Clinical and experimental immunology* 145(1): 173–182. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03101.x

88. Speletas M, Gounaris A, Sevdali E et al (2015) MBL2 Genotypes and Their Associations with MBL Levels and NICU Morbidity in a Cohort of Greek Neonates. *Journal of Immunology Research* 2015(6): 1–10. doi: 10.1155/2015/478412
89. Stahlman MT, Gray ME, Hull WM et al (2002) Immunolocalization of surfactant protein-D (SP-D) in human fetal, newborn, and adult tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 50(5): 651–660. doi: 10.1177/002215540205000506
90. T. Presslera,*, C. Bohmovab, S. Conwayc, S. Dumciusd, L. Hjeltee, N. Høibya, H. Kollbergf, B. Tümmlerg, V. Vavrovab Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection definition: EuroCareCF Working Group report
91. Takahashi K, Ip WE, Michelow IC et al (2006) The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. *Current opinion in immunology* 18(1): 16–23. doi: 10.1016/j.coi.2005.11.014
92. Tümmler B *Mukoviszidose*, vol 161, pp 399–405
93. Turner MW (1998) Mannose-Binding Lectin (MBL) in Health and Disease. *Immunobiology* 199(2): 327–339. doi: 10.1016/S0171-2985(98)80037-5
94. van de Geijn FE, Dolhain RJEM, van Rijs W et al (2008) Mannose-binding lectin genotypes are associated with shorter gestational age. An evolutionary advantage of low MBL production genotypes? *Molecular Immunology* 45(5): 1514–1518. doi: 10.1016/j.molimm.2007.08.021
95. Yarden J, Radojkovic D, Boeck K de et al (2005) Association of tumour necrosis factor alpha variants with the CF pulmonary phenotype. *Thorax* 60(4): 320–325. doi: 10.1136/thx.2004.025262
96. Zhang L, Ikegami M, Crouch EC et al (2001) Activity of pulmonary surfactant protein-D (SP-D) in vivo is dependent on oligomeric structure. *Journal of Biological Chemistry* 276(22): 19214–19219. doi: 10.1074/jbc.M010191200

9 Publikation

Die Daten aus der Doktorarbeit wurden als Originalarbeit publiziert in *Frontiers in Immunology* (s. Anhang A): Nourkami-Tutdibi N, Freitag K, Zemlin M and Tutdibi E (2021) Genetic Association With *Pseudomonas aeruginosa* Acquisition in Cystic Fibrosis: Influence of Surfactant Protein D and Mannose-Binding Lectin. *Front. Immunol.* 12:587313. doi: 10.3389/fimmu.2021.587313

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und Nasenien Nourkami und Erol Tutdibi für die vielen wertvollen Ratschläge und ihre unglaubliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

11 Anhang

Anhang A; Publikation: DOI: 10.3389/fimmu.2021.587313