

Einfluss der Modifier-Gene Mannose-bindendes Lektin und Gap junction protein A4 auf den Phänotyp von delta F508 homozygoten Mukoviszidosepatienten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Jörn Pascal Laubach

aus Siegen

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: PD. Dr. med. Sabina Schmitt-Grohé
2. Gutachterin: Prof. Dr. med. Eva Bartok

Tag der Mündlichen Prüfung: 10.06.2024

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde
Direktor: Prof. Dr. med. Johannes Breuer

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	5
1.	Einleitung	8
1.1	Definition	8
1.2	Epidemiologie	8
1.3	Pathophysiologie	9
1.4	Symptome	11
1.5	Diagnosestellung	13
1.6	Hintergrund der Studie	15
1.7	Zielsetzung der Dissertation	23
2.	Material und Methoden	25
2.1	Patienten	25
2.1.1	Patientenkollektiv	25
2.1.2	Patientengruppierung	26
2.2	Lungenfunktionsuntersuchungen	27
2.3	Messung der MBL-Serumkonzentration	28
2.4	Interleukin-8 Bestimmung	29
2.5	Molekulargenetische Untersuchungen	29
2.5.1	Reagenzien und Geräte	29
2.5.2	DNA-Extraktion	31
2.5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.5.4	Gelelektrophorese	34
2.5.5	Sequenzierungs-PCR	35
2.6	Statistik	37
3.	Ergebnisse	39
3.1	Patientencharakteristika	39
3.2	Haplotypisierung	39
3.3	Mortalität	42
3.3.1	Einfluss von Mannose-bindendem Lektin	42
3.3.2	Einfluss von <i>Gap junction protein alpha 4</i>	44

3.3.3	Einfluss der Risikohaplotypen	46
3.4	Besiedlung mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
3.4.1	Einfluss von Mannose-bindendem Lektin	48
3.4.2	Einfluss von <i>Gap junction protein alpha 4</i>	49
3.4.3	Einfluss der Risikohaplotypen	51
3.5	Zeitpunkt der Erstinfektion mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und Umwandlung in den mukoiden Phänotypen	52
3.6	Lungenfunktion	52
3.7	Body-Mass-Index	54
3.8	Inflammatorische Marker	54
4.	Diskussion	55
4.1	Einfluss des Genotyps auf die Lungenfunktion	55
4.2	Einfluss des Genotyps auf <i>P. aeruginosa</i> -Infektion und Gesamtüberleben	56
4.3	Kritische Beurteilung der durchgeführten Studie	58
4.4	Einfluss des Genotyps auf den BMI	58
4.5	Klassifizierung des Genotyps YA/YO im <i>MBL2</i> -Gen	59
5.	Zusammenfassung	62
6.	Abbildungsverzeichnis	63
7.	Tabellenverzeichnis	64
8.	Literaturverzeichnis	66
9.	Publikationen	71

Abkürzungsverzeichnis

<i>B. cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
BMI	Body-Mass-Index
bp	base pairs
CF	Cystische Fibrose
CFRD	Cystic Fibrosis Related Diabetes
<i>CFTR</i>	<i>Cystic Fibrosis Transmembran Conductance Regulator</i>
CRP	C-reaktives Protein (Entzündungsparameter)
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
FEF ₇₅	Forcierter expiratorischer Fluss bei 75 % der FVC
FEV ₁	Forcierte Einsekundenkapazität
FVC	Forcierte Vitalkapazität
<i>GJA4</i>	<i>Gap junction protein A4</i>

GLI	Global Lung Function Initiative
GLM	General Linear Model
Gly-X-Y-Sequenz	Kollagensequenz, Gly steht für Glycin, X-Y sind verschiedene Aminosäuren (meist aber Prolin oder Hydroxyprolin)
GRE	Glucorticoid-Responsive Element
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSE	Heat-Shock Promoter Element
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IQA	Interquartilsabstand
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
LBP	Lipopolysaccharide Binding Protein
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MEF ₂₅	Maximaler expiratorischer Fluss bei 25 % der FVC
PAP	Pankreatitisassoziiertes Protein
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism
SPRI	Solid Phase Reversible Immobilization

Staph. aureus

Staphylococcus aureus

TBE

TRIS-Borat-EDTA

TGF- β

Transforming Growth Factor β

TMB

Tetramethylbenzidin

TNF α

Tumornekrosefaktor α

1. Einleitung

1.1 Definition

Bei der Cystischen Fibrose (CF), auch Mukoviszidose genannt, handelt es sich um die häufigste autosomal-rezessiv vererbare Multisystemerkrankung in Deutschland (Eickmeier et al., 2019). Durch Veränderungen der Chlorid- und Bikarbonat-Sekretion sezernieren die exokrinen Drüsen in verschiedenen Organsystemen äußerst visköse Sekrete. Diese führen durch Obstruktionen zu den klinischen Manifestationen. Die am häufigsten betroffenen Organe sind die Bauchspeicheldrüse, der Darm, die Leber und die Lunge. Weitere Manifestationen finden sich in den Fertilitätsorganen und an den Schweißdrüsen der Haut. Ursächlich für dieses Krankheitsbild sind unterschiedliche Mutationen des *cystic fibrosis transmembran conductance regulator (CFTR)* Gens (Crawford und Downey, 2018). Dieses Protein wird als cAMP-gesteuerter Chlorid-Bikarbonat-Kanal in die Zellmembran exkretorischer Epithelzellen eingebaut. Bei der Cystischen Fibrose (CF) kommt es durch verminderte Synthese, verringerten Einbau und Stabilität in der Zellmembran und durch eine herabgesetzte Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals zu einer Verminderung funktionstüchtigen Proteins.

1.2 Epidemiologie

Die epidemiologischen Daten basieren auf dem Berichtsband des Deutschen Mukoviszidose-Registers aus dem Jahre 2021 (Nährlich et al., 2022). Im Jahre 2021 umfasste das Register 6776 in Deutschland registrierte Personen, welche im Durchschnitt 23,0 Jahre alt waren (Anteil Erwachsener: 59,4 %). Dies entspricht in etwa einer Inzidenz, die zwischen 1:3300 und 1:4800 liegt (Nährig et al., 2017). In Deutschland wurden 2021 150 Neudiagnosen gestellt.

Die häufigste krankheitsverursachende Mutation ist delta F508. Hierbei handelt es sich um eine Deletion des Codons für Phenylalanin an Position 508. Sie ist weltweit bei etwa 80 % aller Patienten zu finden und zu 50 % liegt sie homozygot vor (van Koningsbruggen-Rietschel und Rietschel, 2017).

Innerhalb der im Deutschen Mukoviszidose-Register gelisteten Patienten lag bei 6710 Patienten (99,2 %) eine Genotypisierung vor. Von diesen Patienten waren 46,6 % der Patienten homozygot für delta F508; insgesamt lag die Allelfrequenz bei 67,1 % (Nährlich et al., 2022). Ähnliche Zahlen gelten für Mitteleuropa (Allelfrequenz von 62 %). Die europäisch-stämmigen Einwohner der USA sind zu 50 % delta F508 homozygot, nur 10 % sind nicht heterozygot für diese Mutation (Schmitt-Grohé et al., 2020).

Durch die stetige Verbesserung supportiver Maßnahmen und der medikamentösen Therapien konnte die mittlere Überlebenszeit auf 54,3 Jahre angehoben werden (im 5-Jahres-Zeitfenster von 2016-2020). Die durchschnittliche Lebenserwartung eines im Jahre 2020 in Deutschland geborenen Kindes mit Mukoviszidose beträgt 57 Jahre (Nährlich et al., 2022).

1.3 Pathophysiologie

Das Gen, welches das *CFTR*-Protein codiert, befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 7. Das CF-Gen umfasst etwa 250.000 Basenpaare (Schmitt-Grohé et al., 2020) und wurde 1989 von Riordan und Mitarbeitern identifiziert (Riordan et al., 1989). Die 27 Exons des CF-Gens codieren für 1480 Aminosäuren. Mittlerweile sind über 2000 Mutationen des CF-Gens bekannt, wobei nur ein kleiner Teil (etwa 360) Symptome oder das Vollbild einer Cystischen Fibrose auslöst (US CF Foundation, 2011). Es wird unterschieden, ob eine cis-Heterozygotie (auf beiden Chromosomen ist die gleiche Mutation zu finden) oder eine in-trans Heterozygotie (es sind unterschiedliche Mutationen auf den beiden Allelen zu finden) vorliegt. Nicht jede krankheitsauslösende Mutation führt zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des Proteins. Es gibt ebenfalls Mutationen, die zu Veränderungen in der Prozessierung und der Regulation des Kanals führen. Die Mutationen werden nach ihrer Auswirkung auf das *CFTR*-Protein in sechs Klassen eingeteilt. Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über die sechs Klassen und führt die häufigsten Mutationstypen auf.

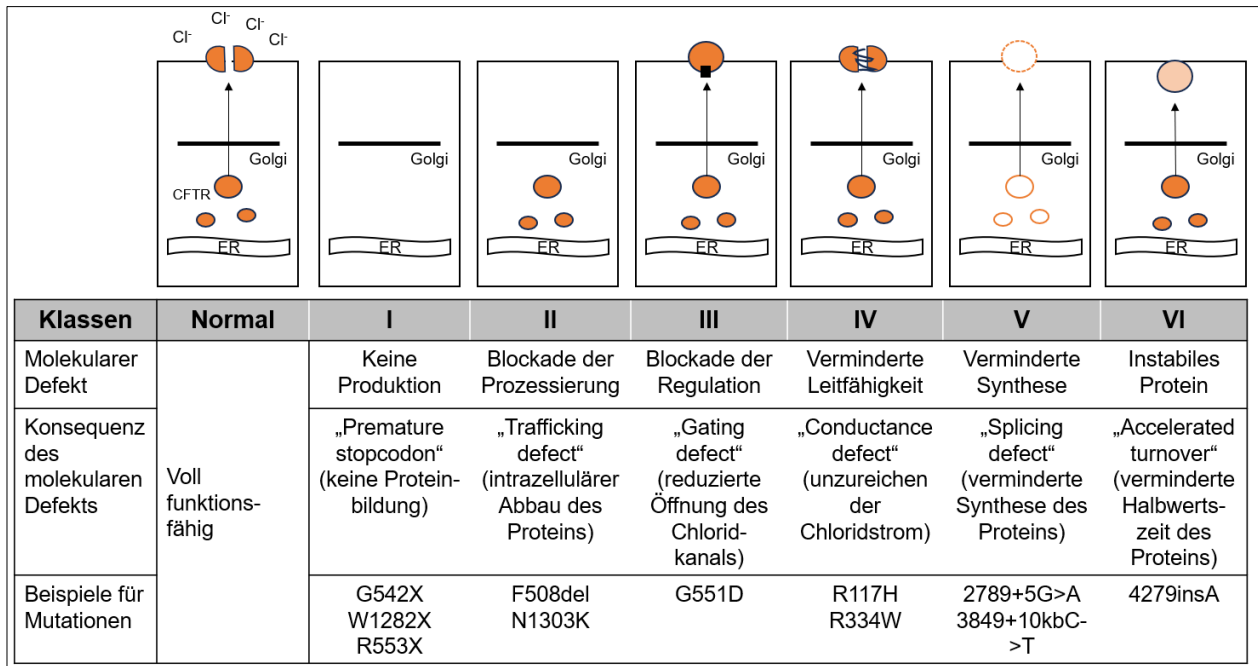


Abb. 1: Einteilung der CF-Mutationen in sechs Klassen mit jeweiliger Konsequenz des zugehörigen Defekts (modifiziert nach van Koningsbruggen-Rietschel und Rietschel, 2017).

Mutationen der Klasse 1 führen dazu, dass keinerlei *CFTR*-Protein synthetisiert wird (Crawford und Downey, 2018). Mutationen der Klasse 2 bewirken eine fehlerhafte Proteinfaltung im Endoplasmatischen Retikulum. Durch die Fehlfaltung verbleibt das Protein im Endoplasmatischen Retikulum, anstatt zur Zelloberfläche transportiert zu werden. Die fehlgefalteten Proteine werden durch das Proteasom abgebaut. Zu den Mutationen dieser Klasse gehört die delta F508 Mutation. An Position 508 im *CFTR*-Gen findet eine Deletion der für die Aminosäure Phenylalanin codierenden Sequenz statt. In der Klasse 3 werden Mutationen zusammengefasst, die zu einer Veränderung in der Aktivierung und Regulation des Kanals führen. Klasse 4-Mutationen zeichnen sich durch einen verminderten Ionenfluss durch den Kanal aus. Bei Mutationen der Klasse 5 liegt ein Teil des Proteins in korrekter Form vor, allerdings ist die Gesamtmenge im Vergleich zu gesunden Personen reduziert. Ein verstärkter Abbau des Kanals steht bei Klasse 6 Mutationen im Vordergrund. Die Mutationen der Klassen 1-3 führen zu einem deutlich ausgeprägteren Krankheitsverlauf als die Mutationen der Klassen 4-6 (Crawford und Downey, 2018). Jeder der oben genannten Typen von Mutationen bewirkt eine Veränderung des *CFTR*-Chloridkanals. Dadurch sinkt die Menge der von intra- nach extrazellulär sezernierten Chlorid- und Bikarbonat-Ionen ab.

Dem veränderten Gradienten entsprechend treten vermehrt Natrium-Ionen durch epitheliale Natriumkanäle (ENaC) in die Zelle über. Aufgrund des sich hierdurch ändernden osmotischen Drucks strömt mehr Wasser in die Zelle ein, bzw. es kommt konsekutiv zu einem Flüssigkeitsmangel auf dem respiratorischen Epithel (Eickmeier et al., 2019). Hieraus resultiert eine gesteigerte Viskosität des extrazellulär auf den Epithelien aufliegenden Sekrets. Das visköse Sekret führt zur Obstruktion der Ausführungsgänge. Vor allem im respiratorischen Epithel der Atemwege schränkt das Sekret die Zilienbeweglichkeit ein und vermindert somit die mukoziliäre Clearance. In der Lunge und auch in anderen Organsystemen kommt es zu Entzündungsreaktionen, die zu einem Umbau des Organparenchyms und damit zu einer zunehmenden Organinsuffizienz führen. In den Schweißdrüsen dient der *CFTR*-Kanal hingegen der Rückresorption des Chlorids aus dem Schweiß (Eickmeier et al., 2019).

1.4 Symptome

Der defekte *CFTR*-Chloridkanal manifestiert sich in einer Vielzahl von Organsystemen, bzw. die Cystische Fibrose imponiert als eine Multisystemerkrankung. Die wichtigsten Symptome finden sich in folgenden Organsystemen: Atemwege, Gastrointestinaltrakt, Reproduktionssystem und Schweißdrüsen.

Bei 99 % der Patienten liegt eine Lungenbeteiligung vor (Nährig et al., 2017). Durch die verminderte mukoziliäre Clearance kommt es zu rezidivierenden Atemwegsinfekten, die zu einer schrittweisen Destruktion von Lungengewebe führen, letztlich bis hin zu einer respiratorischen Partial- oder Totalinsuffizienz. Mittels bildgebender und endoskopischer Verfahren lassen sich Bronchiektasen, Atelektasen und in fortgeschritteneren Stadien ein Lungenemphysem nachweisen. Unter Bronchiektasen versteht man permanente Erweiterungen von Bronchien im Rahmen chronischer Entzündungsvorgänge der Atemwege (Chalmers et al., 2013). Viele Patienten leiden durch den zähen Bronchialschleim an chronisch produktivem Husten. Als weitere Symptome des Respirationstrakts finden sich gehäuft Polyposis nasi und chronische Sinusitiden.

Ein Erstsymptom der CF ist der Mekoniumileus (15-20 %). Im Gastrointestinaltrakt ist am häufigsten die Bauchspeicheldrüse betroffen und 87 % der Patienten leiden an einer exokrinen Pankreasinsuffizienz (Nährig et al., 2017). Diese zeigt sich durch Gedeihstörungen und Steatorrhoe.

Es findet sich auch gelegentlich ein Rektumprolaps. Durch die Malabsorption von fettlöslichen Vitaminen kann es zu Folgeerscheinungen wie hämolytischer Anämie (durch Vitamin-E-Mangel) oder Osteoporose (durch Vitamin-D-Mangel) kommen. Neben der exokrinen Pankreasinsuffizienz wird bei circa 30 % ab dem 30. Lebensjahr der erwachsenen Patienten ein cystic fibrosis related diabetes (CFRD) als Ausdruck der endokrinen Pankreasinsuffizienz beschrieben. Zu den hepatischen Manifestationen werden Steatosis hepatis und der fibrotische Umbau bis hin zur einer Leberinsuffizienz und portaler Hypertonie gezählt. Männliche Erkrankte leiden überwiegend unter Infertilität durch obstruktive Azoospermie, aber auch weibliche Erkrankte können eine verminderte Fertilität haben.

Durch die verringerte Chlorid-Rückresorption kommt es in den Schweißdrüsen zu vermehrtem Salzverlust. Dies kann bei starkem Schwitzen zum sog. Salz-Verlust-Syndrom führen, welches orthostatische, neurologische und gastroenterologische Symptome verursachen kann. Tabelle 1 führt die jeweiligen Häufigkeiten der Organbeteiligungen auf.

Tab. 1: Häufigkeiten der Organmanifestationen der Cystischen Fibrose mit Aufführung der konkreten Ausprägung (modifiziert nach Nährig et al., 2017).

Organbeteiligung	Ausprägung	Häufigkeit
Lunge	Chronische Pneumonie - Fibrose	99 %
Nase	Chronische Rhinosinusitis	61 %
	Polyposis nasi et sinuum	46 %
Leber	Steatosis	25-60 %
	Zirrhose	10 %
	Cholezystolithiasis	15%
Pankreas	Exokrine Pankreasinsuffizienz	87 %
	Diabetes mellitus	32 %
	Pankreatitis	2 %
Darm	Mekoniumileus	20 %
	Distal intestinales Obstruktionssyndrom	6 %
Reproduktionstrakt	Obstruktive Azoospermie	97 %

1.5 Diagnosestellung

Im Jahr 2016 wurde zur frühzeitigen Erkennung der Cystischen Fibrose in Deutschland ein Neugeborenencreening eingeführt. Durch das Screening wird die Erkrankung in über 90 % der Fälle deutlich früher entdeckt, was sich günstig auf den Krankheitsverlauf auswirkt (Nährig et al., 2017). Im Jahr 2021 wurde in 69,4 % der Fälle die Neudiagnose im ersten Lebensjahr gestellt (Nährlich et al., 2022).

Eine Erhöhung von immunreaktivem Trypsin im Fersenblut gibt einen Hinweis auf eine mögliche Erkrankung. Liegt der Wert unter der 99. Perzentile, gilt der Test als negativ. Bei einem uneindeutigen Wert zwischen der 99. und der 99,9. Perzentile wird als weitere Diagnostik in Deutschland eine Untersuchung auf pankreatitisassoziertes Protein (PAP) durchgeführt. Liegt hier der Wert über dem Cut-Off, findet eine molekulargenetische Untersuchung auf die 31 häufigsten *CFTR*-Mutationen statt (Eickmeier et al., 2019).

Zur Diagnosestellung der Cystischen Fibrose benötigt es gemäß Leitlinien das Vorliegen eines diagnostischen Hinweises und einer *CFTR*-Funktionsstörung (Nährlich et al., 2013). Tabelle 2 zeigt, welche Befunde zu diesen Kategorien zählen.

Tab. 2: Diagnostische Hinweise und *CFTR*-Funktionsstörungen, die zur Diagnosestellung einer Cystischen Fibrose führen.

Diagnostische Hinweise	<i>CFTR</i>-Funktionsstörung
positives Neugeborenenenscreening	pathologischer Schweißtest in zwei unabhängigen Messungen
an CF erkranktes Geschwisterkind	molekulargenetischer Nachweis zweier krankheitsverursachender <i>CFTR</i> -Mutationen
klinischer Hinweis auf CF	Nachweis einer typischen Abnormalität der <i>CFTR</i> -Funktion

In Deutschland wird der Schweißtest in folgender Weise durchgeführt: Bei der so genannten Pilocarpin-Iontophorese werden zwei Elektroden auf der Haut aufgebracht, die nun fünf Minuten lang mittels einer Spannungsquelle die Haut stimulieren. Anschließend wird der Schweiß über 30 Minuten gesammelt und die darin vorliegende Chlorid-Konzentration gemessen. Bei Defekt des *CFTR*-Proteins kann dem Schweiß weniger Chlorid entzogen werden, die Konzentration im sezernierten Schweiß steigt demnach. Hierdurch kommt es im Gegensatz zu anderen exokrinen Drüsen im Körper nicht zu einer Obstruktion durch visköses Sekret, sondern zu einem vermehrten Salzverlust. Liegt die Chlorid-Konzentration unter 30 mmol/l, kann eine Cystische Fibrose mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Liegt der Wert in zwei unabhängigen Messungen über 59 mmol/l, kann bei ebenfalls vorliegendem diagnostischem Hinweis die Diagnose Cystische Fibrose gestellt werden. Findet sich ein Ergebnis in einem Bereich zwischen 30 mmol/l und 59 mmol/l, sollte weitere Diagnostik (*CFTR*-Genetik, Elektrophysiologie (nasale oder rektale Potentialdifferenzmessung)) erfolgen (Nährlich et al., 2013).

1.6 Hintergrund der Studie

Die Morbidität und Mortalität wird bei Patienten mit Cystischer Fibrose entscheidend durch den pulmonalen Verlauf bestimmt (Cantin et al., 2015). Durch die herabgesetzte mukoziliäre Clearance kommt es zu einer vermehrten Keimbesiedlung in der Lunge.

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) gilt als das wichtigste Pathogen in der Genese der CF-Lungenerkrankung. Besonders Erreger wie *P. aeruginosa*, aber auch *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*), *Staphylococcus aureus* (*Staph. aureus*) sowie mit fortschreitendem Lebensalter Pilze führen zu rezidivierenden Pneumonien. Im Rahmen einer im Verlauf auch chronischen Besiedelung mit diesen Keimen kommt es neben der intrinsischen Inflammation (durch den *CFTR*-Defekt getriggert) auch zu einer massiven Inflammation des Lungengewebes durch o.g. exogene Trigger. Sind mehr als 50 % der mikrobiologischen Proben binnen 12 Monaten positiv auf *P. aeruginosa*, spricht man von einer chronischen Infektion. Sind es weniger als 50%, so ist die Infektion intermittierend (Schmitt-Grohé et al., 2020). Als Marker für eine Entzündungsreaktion in der Lunge lässt sich oft schon im Säuglingsalter die Neutrophilen-Elastase in den Atemwegen nachweisen. Diese Protease führt zusammen mit weiteren, von Entzündungszellen sezernierten Proteasen, zur Zerstörung von Lungengewebe. In der Folge findet sich ein Verlust an Lungenfunktion (Eickmeier et al., 2019). So verlieren chronisch mit *P. aeruginosa* Infizierte jährlich im Durchschnitt mehr als 2 % ihrer Lungenfunktion. Ebenfalls geht die chronische Besiedelung mit *Pseudomonas* langfristig mit einer Mortalität von über 90 % einher (Eickmeier et al., 2019).

Bei Patienten mit homozygotem delta F508-Genotyp findet sich ein sehr variabler pulmonaler Phänotyp (McKone et al., 2006). Cutting (Cutting, 2015) hat in seinen Studien den Einfluss der *CFTR*-Mutation auf den pulmonalen Verlauf untersucht. Hierzu hat er eineiige Zwillinge mit zweieiigen Zwillingen verglichen. Er konnte zeigen, dass der Einfluss der *CFTR*-Mutation auf den pulmonalen Phänotyp etwa 25 % beträgt. Hingegen haben „Modifier-Gene“ einen entscheidenden Einfluss auf den pulmonalen Verlauf bei CF-Patienten.

Die deutliche Variation der pulmonalen Manifestation bzw. des klinischen Phänotyps bei gleichem krankheitsverursachendem Genotyp lassen sich auch durch die variable Expression dieser Genotypen erklären. Des Weiteren haben Umweltfaktoren, das sozioökonomische Umfeld und psychosoziale Faktoren einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf (Nährig et al., 2017).

Die Destruktion von Lungengewebe findet ganz entscheidend durch eine von Leukozyten ausgelöste Entzündungsreaktion statt. In früheren Arbeiten unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass Serum-Spiegel des Zytokins Interleukin-8 (IL-8), von Tumornekrosefaktor α (TNF α), Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP), und Transforming Growth Factor β (TGF- β) im Blut negativ mit der Lungenfunktion bei homozygoten delta-F508 Patienten korrelieren (Eickmeier et al., 2013; Schmitt-Grohé et al., 2005, 2006)

Auch scheinen Faktoren eine Rolle zu spielen, die die Migration von Leukozyten in das Lungengewebe beeinflussen. Neben den Tight Junctions könnten auch Gap Junctions ein wichtiger Faktor sein. Voruntersuchungen unserer Gruppe beschäftigten sich mit dem *Gap junction protein A4 (GJA4)*, auch als Connexin 37 bezeichnet. Dieses findet sich in Epithelien der Bronchien und der Alveolen, sowie im Endothel pulmonaler Arterien (Freund-Michel et al., 2016). Ludwig et al. (2014) konnten einen klinisch relevanten single-nucleotide polymorphism (SNP) identifizieren. Diese *GJA4*-Variante (c.388G>A; rs41266431) führt zur Substitution der Aminosäure Valin durch Isoleucin (p.Val130Ile), was zu einer protektiven Wirkung für Träger dieses Allels (A-Allel) führt (Ludwig et al., 2014). Horn und Mitarbeiter (2020) konnten nachweisen, dass Träger des A-Allels einen signifikant besseren Verlauf in Bezug auf schwere Manifestationen wie Lungentransplantationen oder Tod haben. Auch geht dieser Genotyp mit einem Phänotyp einher, der bei chronischer Besiedelung mit *P. aeruginosa* bessere Lungenfunktionswerte aufweist (Horn et al., 2020).

Ein weiteres Protein, für das ein Einfluss auf den Phänotyp der klinischen CF beschrieben wird, ist Mannose-bindendes Lektin (MBL). Es wird zu den Proteinen der angeborenen Immunabwehr (Innate Immunity) gezählt. Die Synthese erfolgt in der Leber.

Beschrieben ist die Komplementaktivierung über den Lektin-Weg. Darüber hinaus kann es Organismen (z. B. Bakterien, Viren und Pilze) direkt opsonisieren, um die Phagozytose zu verstärken. Obwohl MBL in erster Linie ein Serumprotein ist, reichert es sich bei akuter Entzündung in der Lunge an (Chalmers et al., 2011).

Im Einzelnen bindet MBL an Zuckerstrukturen wie Mannose oder N-Acetylglucosamin, die auf der Oberfläche zahlreicher Mikroorganismen zu finden sind (Moller-Kristensen et al., 2006).

Bindet MBL an ein solches Oligosaccharid, aktiviert es das Komplementsystem über einen der drei bekannten Wege, den sogenannten Lektinweg. Ebenfalls aktiviert MBL unabhängig davon Makrophagen und andere phagozytierende Zellen, indem es diese in unmittelbarem Kontakt mit den Mikroorganismen oder den von diesen befallenen Zellen bringt (Chalmers et al., 2011). Es ist bekannt, dass mittlere MBL-Konzentrationen (1-5 µg/ml) die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (IL-6, TNF-α) begünstigen, während hohe Mengen an MBL (> 6 µg/ml) die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen unterdrücken und das entzündungshemmende Zytokin IL-10 hochregulieren (Dorfman et al., 2008; Fraser et al., 2006; Jack et al., 2001).

MBL wird durch das *MBL2*-Gen codiert, welches sich auf dem Chromosom 10 im Abschnitt 10q11.2-q21 befindet. Es umfasst 4 Exone (Madsen et al., 1995). Ebenfalls findet sich auf diesem Chromosom das *MBL-1*-Gen, ein Pseudogen. Als Genprodukt des *MBL2*-Gens entsteht ein Protein, welches eine kollagenähnliche Tripelhelix als Schwanz besitzt und einen Kopfteil, mit dessen Hilfe pathogene Strukturen erkannt und gebunden werden können (Chalmers et al., 2011). Jeweils drei solcher Proteine lagern sich zu einer 32 kDa schweren Untereinheit zusammen. Diese Untereinheiten wiederum bilden miteinander Quartärstrukturen bis hin zu Hexameren (Madsen et al., 1995). Erst ab der Größe eines Trimers kann das MBL-Protein effektiv Zuckerstrukturen binden bzw. das Komplementsystem aktivieren.

Drei unterschiedliche SNPs innerhalb des Exon 1 des *MBL2*-Gens (siehe Abb. 2) führen letztlich dazu, dass sich die Untereinheiten nicht mehr richtig assoziieren können.

Die Varianten B (Codon 54, rs1800450) und C (Codon 57, rs1800451) führen zu einem Austausch von Glycin durch Aspartat, bzw. Glutamat. Dies bewirkt die Unterbrechung einer sich wiederholenden Gly-X-Y-Sequenz (X-Y steht für verschiedene Aminosäuren, meist aber Prolin oder Hydroxyprolin), was wiederum zu einer veränderten Disulfidbrückenbindung im Bereich der Tripelhelix führt. Die Variante D im Codon 52 (rs5030737) führt über den Austausch von Arginin durch Cystein ebenfalls zu einer geänderten Bildung von Disulfidbrücken (Wallis und Cheng, 1999; McDougal et al., 2010). Liegt in einem dieser Codons ein Basenaustausch vor, wird das Allel typischerweise mit 0 bezeichnet, wohingegen die Normvariante mit A gekennzeichnet wird.

Jede der genannten Varianten führt zu einer Erniedrigung von funktionstüchtigem MBL. Der A/A-Genotyp geht oft mit MBL-Serumwerten >600 ng/ml einher, wohingegen der 0/0-Genotyp oft Werte <200 ng/ml zeigt (Chalmers et al., 2011). Auch in der Promotorregion des *MBL2*-Gens finden sich unterschiedliche Varianten, die einen Einfluss auf die Konzentration des MBLs im Serum haben. Allen voran ein SNP (rs7096206) an Position -221 führt zu einer Herunterregulation des *MBL2*-Promotors. Liegt ein Basenaustausch vor, findet sich statt eines Guanins ein Cytosin. Die Normvariante des Promotors, bei der deutlich mehr MBL exprimiert wird, wird mit Y bezeichnet, das weniger stark exprimierende Allel mit X (Garred et al., 1999). Abbildung 2 gibt einen Überblick über das Exon 1 und die Promotorregion des *MBL2*-Gens.

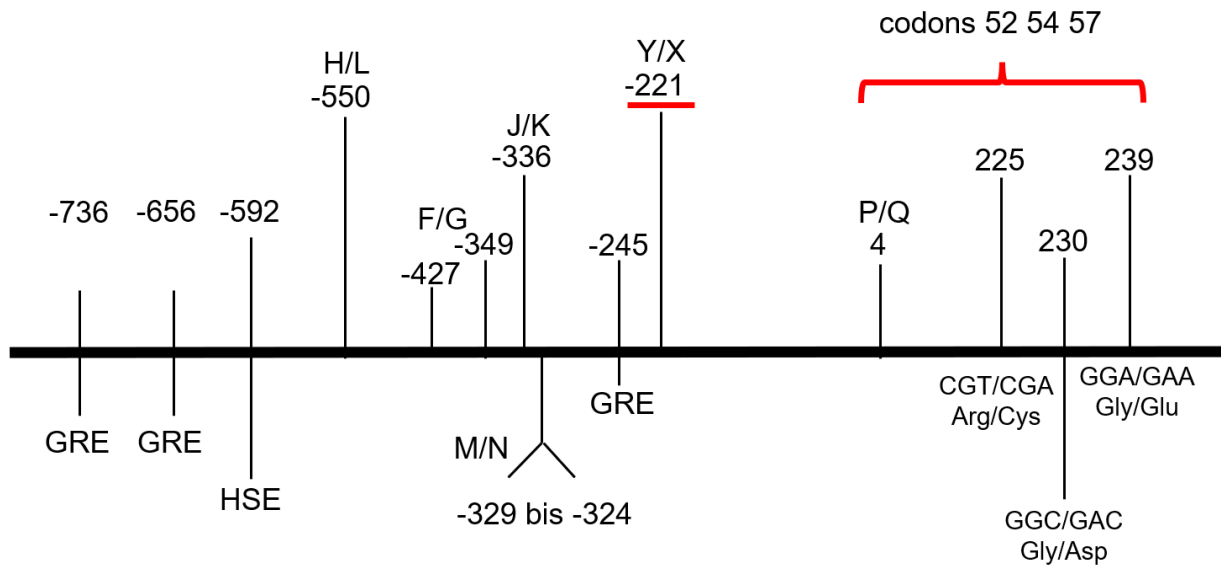


Abb. 2: Schematische Übersicht über das Exon 1 des *MBL2*-Gens mit den umgebenden Abschnitten. Über den variablen Nukleotiden und ihrer entsprechenden Position in *MBL2* findet sich die in der Literatur dafür häufig verwendete Bezeichnung (z.B. H/L). Die in dieser Arbeit analysierten Gensequenzen wurden rot unterstrichen. Die in 5' gezeigten Abkürzungen stehen für glucorticoid-responsive element (GRE) und heat-shock promoter element (HSE). Zusätzlich zu jedem der drei Codons sind die möglichen Basentriplets und die dadurch resultierende Aminosäure dargestellt (modifiziert nach Baxter et al., 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Erniedrigung des im Serum vorhandenen MBL mit vermehrtem Auftreten von Infektionen im Kindesalter, aber auch bei Erwachsenen einhergeht (Turner, 1991).

MBL bindet Erreger wie *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *Staph. aureus*, die häufig bei chronischer Besiedelung zu einer Abnahme der Lungenfunktion im Rahmen einer Mukoviszidose führen (Moller-Kristensen et al., 2006). Auch bei Autoimmunerkrankungen scheint ein Mangel an MBL eine Rolle zu spielen (Davies et al., 1995). Eine unzureichende Expression von MBL gehört mit einer Prävalenz von 10-30 % (Zahlen variieren je nach Klassifikation der MBL-Insuffizienz) zu den häufigsten Immundefekten (Chalmers et al., 2013).

Garred und Mitarbeiter haben als Erste den Zusammenhang zwischen Varianten im *MBL2*-Gen und dem pulmonalen Verlauf bei Cystischer Fibrose untersucht (Garred et al., 1999). Hierzu wurden 149 dänische Patienten in die Studie eingeschlossen.

Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass sich die verschiedenen Varianten im *MBL2*-Gen signifikant auf die Lungenfunktion (gemessene Parameter: FEV₁, FVC) auswirken. Hierbei wies die Subkohorte der homozygoten Träger des Wildtyp-Allels (A/A) keinen signifikanten Altersunterschied zu denjenigen auf, bei denen Varianten im Exon 1 gefunden wurden. Bei einem veränderten Allel hatten die heterozygoten Probanden im Durchschnitt eine um 11 % geminderte Lungenfunktion. Waren beide Allele betroffen, war die Lungenfunktion verglichen mit den homozygoten Trägern des Normal-Allels um 25 % verringert. Besonders stark scheint der Einfluss bei Patienten zu sein, die eine chronische Besiedlung mit *P. aeruginosa* aufweisen. Oft haben Infektionen mit *P. aeruginosa* einen aggressiven Verlauf und der Keim lässt sich nicht eradizieren. Daher kommt es zu einer chronischen Infektion und Inflammation der betroffenen Lungenabschnitte und zur Destruktion von Lungengewebe (Garred et al., 1999). Bei delta-F508 Homozygoten kommt es etwa zweieinhalb Mal so oft zu einer Infektion mit *P. aeruginosa* im Vergleich zu nicht-homozygoten Erkrankten (McDougal et al., 2010). Die Studie von Garred et al. (1999) zeigte auch, dass die Varianten im *MBL2*-Gen nicht nur mit einer signifikanten Reduktion der Lungenfunktion einhergehen, sondern auch ein signifikant erhöhtes Risiko für den Träger haben, „End-stage CF lung disease“ zu erreichen (Garred et al., 1999). Darunter werden in dieser Studie als mögliche Endpunkte Tod und Lungentransplantation zusammengefasst.

Unter den MBL-Insuffizienten lag das mediane Überlebensalter bei 25 Jahren, wohingegen dieses bei den MBL-Suffizienten 36 Jahre betrug. Ebenfalls zeigte sich in der Studie ein Trend, dass die Infektion mit *P. aeruginosa* früher chronifiziert. In der Gruppe derjenigen, die heterozygot oder homozygot für die MBL-Varianten waren, zeigte sich ebenfalls ein signifikant häufigeres Auftreten einer Infektion mit *B. cepacia*, was andere Studien aber nicht bestätigen konnten (Chalmers et al., 2011).

Dorfman und Mitarbeiter haben in einer groß angelegten Studie ebenfalls untersucht, ob der MBL-Genotyp mit einer früher ablaufenden Erstinfektion mit *P. aeruginosa* einhergeht und auch, ob es zu einer signifikant verringerten Lungenfunktion kommt (Dorfman et al., 2008). In der 1019 Personen umfassenden kanadischen Kohorte war etwa die Hälfte delta F508 homozygot.

Die Studie zeigte, dass bei MBL-Insuffizienz eine Erstinfektion mit *P. aeruginosa* früher auftritt. Auch kam es in dieser Gruppe zu einem stärkeren Verlust von Lungenfunktion im Beobachtungszeitraum (Dorfman et al., 2008).

McDougal et al. haben im Rahmen der „US CF Twin and Sibling“-Studie mithilfe eines statistischen Modells den Zusammenhang zwischen *MBL2*-Varianten, mittlerer Lebensdauer, Infektionshäufigkeit und Zeitpunkt der Erstinfektion mit *P. aeruginosa* untersucht (McDougal et al., 2010). Die Studie schloss 788 Individuen ein, deren Daten im „Cystic Fibrosis Foundation Data Registry“ geführt wurden. Auch in dieser Studie wurden anhand der vorliegenden *MBL*-Genotypen zwei Gruppen (MBL-Suffizient vs. MBL-Insuffizient) gebildet. Es konnte keine signifikante Verkürzung der Lebenszeit in der Gruppe der MBL-Insuffizienten gezeigt werden. Ebenfalls wurde kein Zusammenhang des *MBL*-Genotyps und der Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit *P. aeruginosa* nachgewiesen, jedoch wurde knapp 2 Jahre früher die Erstinfektion beobachtet. Die MBL-Insuffizienz beeinflusste zwar nicht die Häufigkeit einer Transformation von *P. aeruginosa* in einen mukoiden Stamm, aber die Transformation war zu einem früheren Zeitpunkt nachweisbar (durchschnittlich 2,72 Jahre früher). Allerdings war der Zeitraum zwischen der Erstinfektion mit *P. aeruginosa* und dem Nachweis eines mukoiden Stammes nicht signifikant kürzer im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Umwandlung in einen mukoiden Stamm korreliert bei Patienten mit Mukoviszidose oft mit einem deutlichen Verlust an Lungenfunktion und damit auch mit einer erhöhten Mortalität. Um zu untersuchen, ob der *MBL*-Genotyp eine direkte Auswirkung auf die Lungenfunktion hat, wurde dieser Zusammenhang ausschließlich bei chronisch mit *P. aeruginosa* Besiedelten betrachtet. Es konnte kein Einfluss auf die Lungenfunktion festgestellt werden (Chalmers et al., 2011). Allerdings war die Kohorte der MBL-Insuffizienten in dieser Studie signifikant jünger, was als wichtiger Störfaktor zu sehen ist, da die Lungenfunktion mit dem Alter abnimmt. Somit kommt die Studie zu dem Schluss, dass der *MBL*-Genotyp den Zeitpunkt der Infektion mit *P. aeruginosa* und auch die Umwandlung in die Mukoid-Form bei chronischer Besiedelung beeinflusst, nicht jedoch unmittelbar die Lungenfunktion (Chalmers et al., 2011).

Trevisiol et al. konnten ebenfalls einen früheren Infektionszeitpunkt nachweisen, allerdings ebenfalls kein häufigeres Vorliegen einer chronischen Infektion (Trevisiol et al., 2005).

Genau wie in der Studie von McDougal et al. konnten auch Drumm et al. in einer nordamerikanischen Kohorte (im Gegensatz zu Dorfman et al.) keinen Einfluss des *MBL2*-Genotyps auf die Lungenfunktion nachweisen (Drumm et al., 2005). Bei 808 Patienten, die eine homozygote delta F508-Mutation aufweisen, wurden 16 Varianten in zehn unterschiedlichen Modifier-Genen untersucht, darunter auch die vier zuvor erwähnten SNPs im *MBL2*-Gen (siehe Abb. 2). Vorher wurde bereits eine Einteilung je nach Lungenfunktion (gemessen am FEV₁) in jeweils eine Gruppe mit mildem klinischem Phänotyp (liegen oberhalb der 75 % Perzentile des altersabhängigen FEV₁-Wertes) und mit schwerem pulmonalem Verlauf vorgenommen (liegen unterhalb der 25 % Perzentile). Signifikante Auswirkungen auf den Phänotyp hatte in dieser Studie jedoch nur eine TGF- β Variante (Drumm et al., 2005).

Chalmers et al. untersuchten 2013 den Einfluss der Expression von MBL auf die Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Bronchiektasen (Chalmers et al., 2013). Hierzu wurden 430 Patienten untersucht, die nicht an Cystischer Fibrose erkrankt waren, sondern bei denen die Bronchiektasen größtenteils idiopathisch oder postinfektiös aufgetreten waren. Außerdem wurde eine Kontrollgruppe mit 414 gesunden Probanden rekrutiert. Die Verteilung der *MBL*-Genotypen und die Höhe des im Serum gemessenen MBL waren in beiden Gruppen vergleichbar. Es konnte kein signifikanter Überlebensvorteil bei höheren MBL-Spiegeln gezeigt werden. Hingegen zeigte sich bei niedriger Expression von MBL eine radiologisch gemessene, stärkere Ausprägung der Bronchiektasen und eine Häufung von chronischen bakteriellen Entzündungen der Atemwege. Auch konnte gezeigt werden, dass die MBL-insuffizienten Patienten signifikant häufiger schwere Verläufe mit einer höheren Frequenz an Exazerbationen und häufiger notwendigen Hospitalisierungen im vierjährigen Beobachtungszeitraum aufwiesen (Chalmers et al., 2013).

Die Metaanalyse von Chalmers et al. (2011) umfasst 16 unterschiedliche Studien, darunter auch die oben zitierten Arbeiten von Garred und McDougal, die sich mit dem Zusammenhang zwischen dem *MBL*-Genotyp und dem pulmonalen Phänotyp bei CF beschäftigen. Die Metaanalyse zeigte, dass es in der Gruppe der *MBL*-Insuffizienten durchschnittlich 2,83 Jahre ($p < 0,001$) früher zu einer chronischen Besiedelung mit *P. aeruginosa* kommt. Genauso konnte gezeigt werden, dass die *MBL*-Insuffizienz mit einer signifikant schlechteren Lungenfunktion einhergeht (gemessen am FEV_1 und FVC), allerdings nur in der Gruppe der Erwachsenen. In der pädiatrischen Subkohorte konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Auch zeigte die Metaanalyse eine erhöhte Mortalität und eine erhöhte Rate an Lungentransplantationen in der Risikogruppe. Zusammenfassend kommen die Autoren zu dem Schluss, dass es sich beim *MBL2*-Gen um ein wichtiges Modifier-Gen des pulmonalen Verlaufs der Cystischen Fibrose handelt (Chalmers et al., 2011).

1.7 Zielsetzung der Dissertation

In vorherigen Arbeiten unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass ein SNP im *Gap junction protein A4*-Gen einen Einfluss auf die Lungenfunktion und das Gesamtüberleben bei Trägern einer homozygoten delta F508-Mutation hat (Horn et al., 2020). Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu prüfen, ob dieser Einfluss unabhängig von dem *MBL2*-Genotyp besteht.

Durch die Genotypisierung des *MBL2*-Gens innerhalb unserer Kohorte sollte der Einfluss von Varianten innerhalb dieses Modifier-Gens auf den Phänotyp untersucht werden. Bisher liegen, soweit uns bekannt, abgesehen von einer Studie mit kleiner Fallzahl (Nourkami-Tutdibi et al., 2021) ($n=35$) noch keine Daten zur Epidemiologie des *MBL2*-Genotyps in Deutschland und den Niederlanden vor. In der Studie von Garred, an der wir uns orientiert haben, wurden überwiegend Patienten mit homozygoter delta F508-Mutation ($n=126$ von 149, entspricht 85 %) eingeschlossen, weitere 22 Patienten waren heterozygote Träger der delta F508-Mutation. Ein Patient trug keine delta F508-Mutation (Garred et al., 1999). Um den Einfluss unabhängig von der vorliegenden *CFTR*-Mutation beurteilen zu können, wurde die Genotypisierung in unserer Studie ausschließlich bei 112 Patienten mit homozygoter delta F508-Mutation durchgeführt.

Die bereits genannte Metaanalyse von Chalmers zeigte, dass es unterschiedliche Auswirkungen einer Mutation im *MBL2*-Gen auf den Krankheitsverlauf der CF gibt (Chalmers et al., 2011). Vor allem in der Frage, ob erniedrigte MBL-Serumspiegel zu einer verkürzten Überlebenszeit oder zu einer schlechteren Lungenfunktion führen, kommen die zum Teil bereits erwähnten Studien zu unterschiedlichen Resultaten.

In vorherigen Arbeiten unserer Gruppe wurde bereits eine Genotypisierung des gleichen Patientenkollektivs durchgeführt, sodass die Varianten des *Gap junction protein A4*-Gens innerhalb der gleichen Kohorte bekannt sind (Horn et al., 2020). Somit untersucht die vorliegende Studie auch, ob die beiden Modifier-Gene im Zusammenspiel zu Risiko-Genotypen führen, bei denen ein besonders ausgeprägtes Krankheitsbild hinsichtlich des pulmonalen Verlaufs zu beobachten ist. Die Interaktion zwischen den *GJA4*-Genotypen und den Genotypen des *MBL2*-Gens wurde statistisch u.a. mithilfe eines gemischten Modells untersucht. Um die Auswirkungen des Genotyps auf den Phänotyp beurteilen zu können, wurden Lungenfunktionsuntersuchungen (primäre Prüfgröße) der Patienten longitudinal über drei Jahre herangezogen.

Dazu wurde neben der Lungenfunktion mit Hilfe von Registerdaten aus dem deutschen CF-Register (MUKOWEB, www.mukovisziose-register.de) der Einfluss der Varianten innerhalb des *MBL2*- und des *GJA4*-Gens auf das Gesamtüberleben, die chronische Besiedlung mit *P. aeruginosa*, cystic fibrosis related diabetes (CFRD), die Häufigkeit von Bronchiektasen und den Body-Mass-Index (BMI) untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Patientenkollektiv

Für diese Studie wurden Kinder (ab sechs Jahren) und Erwachsene aus CF-Zentren in Bonn, Frankfurt und Amsterdam rekrutiert. Für eine erste Untersuchung wurden ausschließlich Patienten der Kinderklinik der Universitätsklinik Bonn rekrutiert, für die Replikationsstudie kamen Patienten der Universitätsklinik Frankfurt und der Universitätsklinik Amsterdam hinzu.

Alle untersuchten Patienten waren homozygot für die delta F508-Mutation. Allen Probanden wurde einmalig im Zeitraum zwischen 2016 und 2018 insgesamt ca. 10 ml Blut entnommen, aufgeteilt auf eine EDTA-Monovette (EDTA, SARSTEDT Monovette®) und ein Serumröhrchen (Serum SARSTEDT®). Aus dem EDTA-Vollblut wurde die DNA extrahiert, mit Hilfe des Serums konnte die MBL-Konzentration bestimmt werden.

Ausschlusskriterien bei der Rekrutierung waren eine Therapie mit systemischen Steroiden 14 Tage vor der Blutentnahme, die Einnahme von Orkambi (*CFTR*-Modulator) oder eine Teilnahme an anderen Studien innerhalb der vorherigen 30 Tage. Daten von Patienten mit Zustand nach Lungentransplantation wurden ausschließlich hinsichtlich der Überlebensdauer analysiert. Es wurden bei allen Probanden Lungenfunktionsuntersuchungen durchgeführt. In einer vorher durchgeführten Studie unserer Gruppe (Horn et al., 2020) fand innerhalb der gleichen Kohorte bereits eine Genotypisierung des *Gap junction protein A4*-Gens statt.

Bei allen Patienten wurden durch die CF-Zentren regelmäßig mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt. Als Material wurden Sputumproben oder Rachenabstriche untersucht. Des Weiteren konnte dem Deutschen Mukoviszidose-Register der jeweilige Body-Mass-Index (BMI) sowie die Lungenfunktionswerte entnommen werden. Für die Patienten der holländischen Kohorte lagen nur Daten zu einem Zeitpunkt aus dem Jahre 2017 vor.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Universitäten Bonn (178/01 + 092/17), Frankfurt (07/02 + 206/16) und Amsterdam UMC (NL60220.018.16) genehmigt.

Die Einverständniserklärung zur Teilnahme an dieser Studie wurde von allen Patienten bzw. den Eltern eingeholt. Die Dissertation wurde auf Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt.

2.1.2 Patientengruppierung

Diese Studie orientiert sich an der Patientengruppierung, die Garred und Mitarbeiter in ihrer Studie vorgenommen haben (Garred et al., 1999). Es wurden sechs verschiedene *MBL2*-Genotypen definiert.

In der A/A-Gruppe befinden sich all diejenigen, die in den drei untersuchten Codons im Exon 1 die Normvarianten aufweisen und die entweder homozygot für die stärker exprimierende Promotorvariante in Position -221 sind (YA/YA), die einen stärker und einen weniger stark exprimierenden Promotor besitzen (YA/XA) oder die homozygot für die weniger stark exprimierende Variante des Promotors sind (XA/XA). Die A/0-Gruppe wird gebildet aus allen Patienten, die in einem der beiden Allele eine Mutation im Exon 1 aufweisen. In dem anderen Allel liegt entweder die stärker exprimierende Promotorvariante vor (YA/0) oder der weniger stark exprimierende Promotor (XA/0). In der 0/0-Gruppe befinden sich alle Patienten, die auf beiden Allelen Mutationen im Exon 1 des *MBL2*-Gens aufweisen.

Bei Vorliegen des *MBL2*-Genotyps A/0 befindet sich die weniger stark exprimierende Promotorvariante X auf dem einzigen funktionstüchtigen Allel A. Daher finden sich auch bei Vorliegen dieses Genotyps niedrige MBL-Serumspiegel. Aus diesem Grund wurden folgende zwei Gruppen gebildet: Die Gruppe der MBL-Insuffizienten, die niedrige MBL-Serumspiegel aufweist, umfasst die Genotypen 0/0, XA/0, YA/0. Die Gruppe derjenigen, die hohe MBL-Serumspiegel aufweist (MBL-Suffiziente), umfasst die Genotypen XA/XA, YA/XA, YA/YA (Garred et al., 1999).

2.2 Lungenfunktionsuntersuchungen

Bei allen Probanden wurden spirometrische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurden als Lungenfunktionsparameter die forcierte Einsekundenkapazität (FEV_1) und die forcierte Vitalkapazität (FVC) bestimmt. Die forcierte Einsekundenkapazität stellt das Volumen dar, das nach vollständiger Inspiration mit maximaler Atemanstrengung innerhalb der ersten Sekunde ausgeatmet werden kann. Die forcierte Vitalkapazität meint das Volumen, das nach größtmöglicher Inspiration insgesamt ausgeatmet werden kann. Ebenfalls wurde der maximale expiratorische Fluss bei 25 % (MEF_{25}) der FVC gemessen, welcher dem forcierten expiratorischen Fluss bei 75 % (FEF_{75}) entspricht. Der MEF_{25} spiegelt die Obstruktion der kleinen Atemwege wider. Da diese bei der Cystischen Fibrose zuerst betroffen sind, ist der MEF_{25} auch schon in frühen Krankheitsstadien ein sensitiver Marker für eine pulmonale Beteiligung der Erkrankung.

In Bonn und in Frankfurt wurden die Lungenfunktionsuntersuchungen mit Hilfe des Master Screen Body oder Master Screen IOS (Vyair Medical GmbH, Würzburg, Deutschland) durchgeführt, in Amsterdam wurde der Carefusion Jaeger® Pneumo Vyntus genutzt. Da die Lungenfunktion vom Alter und der Größe abhängt, wurden die gemessenen Lungenfunktionsdaten als Prozent der vorher für das entsprechende Alter, Größe und Geschlecht vorhergesagten Normwerte angegeben. Die Messung der Lungenfunktion erfolgte entsprechend der Empfehlung der American Thoracic Society und der European Respiratory Society (Miller et al., 2005).

Die Lungenfunktionsdaten der deutschen Probanden wurden dem Deutschen Mukoviszidose-Register entnommen. Für die Bonner Subkohorte lagen die Daten einer Lungenfunktionsuntersuchung pro Jahr vor (Stufe-1 Registerdaten). Bei dem Großteil der Probanden der Frankfurter Subkohorte wurde im Beobachtungszeitraum mehr als eine Lungenfunktionsuntersuchung pro Jahr durchgeführt (Stufe-2 Registerdaten). Lag mehr als eine Lungenfunktionsuntersuchung pro Jahr vor, wurde diejenige mit dem höchsten FEV_1 -Wert in die Auswertung mit einbezogen. Es wurden Lungenfunktionswerte über einen Beobachtungszeitraum von drei Jahren (2016-2018) verwendet. Für jeden Probanden wurde aus den drei ausgewählten Messungen der Median ermittelt und in die Analyse miteinbezogen.

Diese Werte wurden als Prozente des durch den Global Lung Function Initiative (GLI) vorgegebenen Referenzwertes angegeben. Ebenfalls wurden anhand des Registers im Rahmen einer Matched-Pair-Analyse 22 Patienten auf das Vorliegen von Bronchiektasen untersucht. Für die niederländischen Probanden lagen nur die Daten einer Lungenfunktionsuntersuchung aus dem Jahre 2017 vor. Daher wurde die deutsche Subkohorte auch zusätzlich einzeln analysiert.

2.3 Messung der MBL-Serumkonzentration

Zur Bestimmung der MBL-Konzentration im Serum wurde ein Sandwich-Enzym-Immunoassay durchgeführt.

Hierzu wurde das Thermo Scientific™Pierce™ Human MBL (MBL2) ELISA Kit EHMBL2 der Firma Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., USA verwendet. Mithilfe des Kits lässt sich die Menge an humanem *MBL2* im Serum, Plasma oder in Zellkulturen quantifizieren.

Die Serumproben (jeweils 100 µl) wurden hierzu auf eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind bereits mit einem Antikörper beschichtet, der spezifisch *MBL2* bindet. Im Folgenden wurden ein enzymgebundener *MBL2*-Antikörper und ein Substrat (TMB-Substrat) hinzugefügt, welches zu einer Farbreaktion führte. Die Intensität des Farbsignals ist direkt proportional zu der in der Probe vorhandenen *MBL2*-Konzentration. Zur Quantifizierung der *MBL2*-Menge wurde der Plattenreader Perkin Elmer Wallac 1420 VICTOR2™ verwendet, welcher mittels Festfilter auf eine Wellenlänge von 450 nm und 550 nm voreingestellt wurde.

Laut Herstellerangaben in den Gebrauchsanweisungen detektiert das Assay *MBL2*-Konzentrationen im Bereich von 0,034 bis 25 ng/ml. In diesem Bereich weist das Assay eine Sensitivität von 0,03 ng/ml auf. Es liegt sowohl eine hohe Intraassay-Präzision (CV < 10 %), als auch eine hohe Interassay-Präzision (CV < 12 %) vor.

Die Bestimmung der *MBL2*-Serumkonzentration wurde im Labor der Kinderklinik des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt.

2.4 Interleukin-8 Bestimmung

Interleukin-8 im Serum wurde durch Chemilumineszenz (Immulate, Siemens Healthcare Diagnostics, ehemals DPC Biermann, Deutschland) gemessen, wie in früheren Veröffentlichungen bereits beschrieben (Schmitt-Grohé et al., 2005).

2.5 Molekulargenetische Untersuchungen

Im Folgenden ist die Genotypisierung des *MBL2*-Gens beschrieben. Da die Genotypisierung des *Gap junction protein A4*-Gens bereits im Rahmen einer vorherigen Arbeit unserer Gruppe durchgeführt wurde, wird diese nicht noch einmal gesondert aufgeführt, auch vor dem Hintergrund, dass auf diese Untersuchungsergebnisse zurückgegriffen wurde (Horn et al., 2020). Alle in den folgenden Abschnitten beschriebenen Untersuchungen wurden im genetischen Labor von Professor Ludwig, Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Bonn durchgeführt.

2.5.1 Reagenzien und Geräte:

Kommerzielle Kits

Agencourt AMPure XP System	Beckman Coulter
Agencourt CleanSEQ Kit	Beckman Coulter
BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1	Life Technologies GmbH
QIAmp® Blood Maxi Kit	Qiagen

Zentrifugen

Mini Star silverstar	VWR International GmbH
Megafuge 1.0	Heraeus GmbH
Megafuge 1.0 R	Heraeus GmbH

Vortexer

Vortex Genie 2

Scientific Industries Inc.

VWR Signature™ High-Speed
Microplate Shaker

VWR International GmbH

Gel-Dokumentation

GelStick „Imager“

Intas Science Imaging Instruments
GmbH**Waage**

TE3102-S

Sartorius AG

Gel-Elektrophorese-Kammer

WIDE MINI SUB CELL® GT

BioRad Laboratories GmbH

Mikrowelle

MW 9625

Severin

Spannungsgeräte

PowerPac Basic™

BioRad Laboratories GmbH

Eismaschine

AF100

Scotsman® Ice Systems

Thermocycler

Mastercycler® pro vapo protect

Eppendorf GmbH

PipettenEppendorf Research® Plus 0,1-2,5 µl,
0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl

Eppendorf GmbH

Transferpette® S-8 0,5-10 µl, 2-20 µl,
20-200 µl

BRAND GmbH & Co. KG

Sequenzierautomat

3130xl Genetic Analyzer

Life Technologies Corporation

Software

SeqMan II Version 5.0

DNAST AR Inc.

Chemikalien, Lösungen und Enzyme

HPLC Wasser

Merck KGaA

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Sigma-Aldrich

Agarose low EEO (Agarose Standard)

AppliChem GmbH

Bromphenolblau

Sigma-Aldrich

DNA ladder 100 bp

GeneCraft

dNTPs 10 mM

Labomedic GmbH

Ethanol absolut (100 %)

AppliChem GmbH

Ethanol (EtOH, 96 %)

WALTER CMP GmbH & Co. KG

Ethidiumbromid (EtBr-Lösung, 1 %)

Merck KGaA

10 x TBE Puffer

Life Technologies GmbH

VWR-Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)

VWR International GmbH

70 % Ethanol: 729 ml 96 % Ethanol, ad 1000 ml destilliertes Wasser

85 % Ethanol: 885 ml 96 % Ethanol, ad 1000 ml destilliertes Wasser

Bromphenolblau-Auftragungspuffer: 10 ml 10 x TBE, 10 ml 0,1 % Bromphenolblau, 40 ml
20 % Ficoll (8 g) ad 100 ml dest. Wasser

2.5.2 DNA-Extraktion

Die DNA wurde aus den Leukozyten extrahiert, die im EDTA-Vollblut vorlagen. Dies erfolgte mit Hilfe des „QIAmp® Blood Maxi Kit“ der Firma Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers.

Im ersten Schritt wurde das Blut zusammen mit einer im Set enthaltenen Protease und Lysispuffer mittels Vortexer vermischt und für zehn Minuten in einem etwa 70 °C heißen Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde 96-prozentiges Ethanol hinzugefügt und nach erneutem Mischen wurde die Flüssigkeit in ein „QIAmp Maxi“-Röhrchen überführt. Dieses enthält eine Säule mit Silikat-Membran, an welche die DNA binden kann. So fungiert die Membran als Filter.

In zwei Waschschrritten wurde die DNA mit ebenfalls im Set enthaltenen Puffern mittels Zentrifugation von anderen Zellbestandteilen und Verunreinigungen gereinigt. Schlussendlich wurde die DNA in destilliertem Wasser gelöst, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 5 °C gelagert.

2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die in-vitro Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte. In diesem Fall wurden mittels spezifischer Primer Teile des *MBL2*-Gens (Promotorbereich und Exon 1) amplifiziert. Das PCR-Produkt enthält alle Varianten, die in den Studien von Madsen und Garred genannt werden (Garred et al., 1999; Madsen et al., 1995). Es handelt sich um folgende Positionen im *MBL2*-Gen: rs7096206 an Position -221. Hierbei handelt es sich um einen Polymorphismus in der Promotorregion. Des Weiteren umfasst das PCR-Produkt drei Varianten, die im Exon 1 an folgenden Stellen lokalisiert sind: Die Variante D (rs5030737) befindet sich im Codon 52, die Variante B (rs1800450) im Codon 54 und die Variante C (rs1800451) im Codon 57.

Es wurde mit dem Standard-Programm TD100 gearbeitet, welches auf dem „Mastercycler pro“ der Firma Eppendorf GmbH vorinstalliert war. In diesem Programm wird in 30 Zyklen das DNA-Segment amplifiziert und bei jedem Zyklus wird die DNA-Menge im Idealfall verdoppelt. Innerhalb jedes Zyklus finden im Wesentlichen drei Reaktionsschritte statt. Die Initiierung jedes Schrittes findet durch Temperaturänderung statt, sodass die einzelnen Reaktionen unter optimalen Bedingungen ablaufen. Im ersten Schritt findet eine Trennung des DNA-Doppelstrangs in zwei Einzelstränge statt (bei 95 °C, initial für fünf Minuten, bei jedem weiteren Zyklus für 30 Sekunden). Daran anschließend lagert sich der Primer an die komplementäre Sequenz auf dem Einzelstrang an (bei einer Temperatur zwischen 63 °C und 55 °C, Dauer 30 Sekunden).

Bei 72 °C findet dann für die Dauer von einer Minute die Elongation durch die DNA-Polymerase statt. Die in der Tabelle 3 aufgeführten Komponenten wurden für einen 25 µl PCR-Ansatz verwendet.

Tab. 3: Ansatz der PCR zur in-vitro Vervielfältigung von Teilen des *MBL2*-Gens.

Komponente	Menge [µl]	Hinweise
extrahierte DNA	1	
Forward Primer	1	vorher 1:10 verdünnt
Reverse Primer	1	vorher 1:10 verdünnt
DNTP-Mix	0,5	
Key-Puffer	2,5	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	1,25	
TAQ-Polymerase	0,2	muss gekühlt werden
HPLC-Wasser (destilliert)	17,55	ergänzt Ansatz auf 25 µl

Da die DNA-Polymerase auf den beiden Einzelsträngen jeweils nur in eine Richtung amplifizieren kann, wurden sowohl ein Forward-, als auch ein Reverse-Primer benötigt. Es wurden Primer benutzt, die an die Promotor-Region und an 3' von Exon 1 des *MBL2*-Gens binden. Die Primer haben folgende Sequenzen (von 5' -> 3'):

Forward-Primer *MBL2*-PF: TATTTAGCACTCTGCCAGGGC

Reverse-Primer *MBL2*-1R: CAGTCTCCTCATATCCCCAGG

Die genannten Reagenzien wurden in einem sterilen Eppendorfgefäß der Größe 0,2 ml zusammengeführt und anschließend mittels Vortexer und Zentrifuge miteinander vermischt. Um die Reaktion durch die Taq-Polymerase nicht vorzeitig zu starten, wurde der Ansatz durch Eis gekühlt, bevor die Eppendorf-Gefäße in den Thermocycler gegeben wurden.

2.5.4 Gelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob die Vervielfältigung des spezifischen DNA-Abschnitts erfolgt ist, wurden etwa 5 µl des PCR-Ansatzes mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

Bei diesem Elektrophorese-Verfahren werden die DNA-Fragmente abhängig von ihrer Größe (gemessen in Basenpaaren) und ihrer Ladung aufgetrennt.

Die DNA wird hierzu in ein Agarose-Gel gegeben, welches die negativ geladenen DNA-Fragmente durch Anlegen einer Spannung in Richtung der Anode durchwandern. Abhängig von der angelegten Spannung und den oben erwähnten Eigenschaften der Fragmente wandern diese unterschiedlich schnell und trennen sich somit auf. Angepasst an die Basenpaarlänge des PCR-Produkts wurde 2,0-prozentiges Agarose-Gel verwendet, um die Fragmente aufzutrennen.

Das Gel wurde wie folgt hergestellt: 1,6 g Agarose wurden in 80 ml TBE Puffer gelöst. Hierzu wurden die beiden Substanzen in einem hitzebeständigen Gefäß mit Hilfe eines Mikrowellenherdes zum Kochen gebracht, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hat. Anschließend wurde dem noch flüssigen Gel 6 µl Ethidiumbromid-Lösung zugesetzt. Ethidiumbromid färbt als fluoreszierender Farbstoff die DNA-Banden an, indem es in den DNA-Doppelstrang interkaliert. Die hierdurch angefärbten Banden können mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden. Das durch Erhitzen noch flüssige Agarosegel wurde in einen Gelträger gegossen, in dem durch Plastikeinsätze Taschen innerhalb des Gels gebildet wurden. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde es in eine Gelelektrophorese-Kammer gegeben, die mit TBE-Puffer befüllt wurde und an die eine Spannung angelegt werden konnte.

Die DNA wurde mit einem Beschwerungspuffer versetzt, bevor die einzelnen Proben in die Geltaschen pipettiert werden konnten. Ebenfalls wurde eine der Taschen mit einem Längenstandard befüllt. Dieser enthält unterschiedlich lange DNA-Fragmente bis zu einer Länge von 1000 base pairs (bp), die sich in ihrer Länge jeweils um 100 bp unterscheiden. So konnte später die Größe der vorhandenen DNA-Fragmente abgeschätzt werden. Bei einer Spannung von 120 Volt und einer Stromstärke von 400 Milliampere dauerte die Agarose-Gelelektrophorese etwa 25 Minuten.

Nach dieser Zeit wurden die einzelnen Banden mittels GelStick IMAGER (Intas Science Imaging Instruments GmbH) unter UV-Licht sichtbar gemacht und das Gel wurde fotografiert. Abbildung 3 zeigt ein solches Gelelektrophorese-Gel.

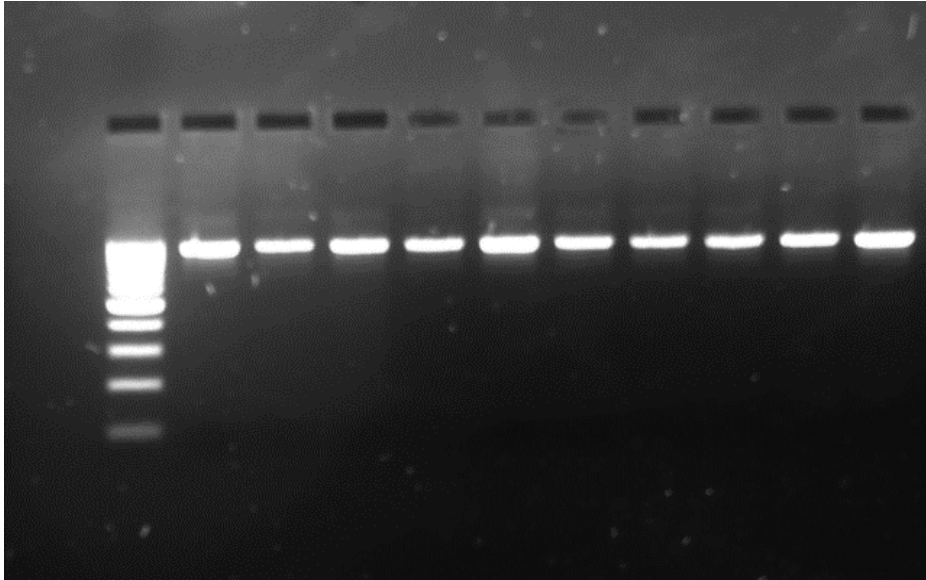


Abb. 3: Bild eines Gelelektrophorese-Gels mit zehn Proben. Am linken Bildrand ist der Längenstandard (100 bp-Leiter) erkennbar.

Im Anschluss folgte eine Aufreinigung des PCR-Produkts mittels Agencourt AMPure XP System. Bei der zugrunde liegenden SPRI-Technologie (Solid Phase Reversible Immobilization) wird die DNA an magnetische Teilchen gebunden, um anschließend in einem Magnetfeld von vorliegenden Verunreinigungen getrennt zu werden. Die Verunreinigungen werden mit 70 % Ethanol ausgewaschen. Das Verfahren macht ein Filtrieren oder Zentrifugieren überflüssig (Beckmann Coulter, 2020).

2.5.5 Sequenzierungs-PCR

Im nächsten Schritt folgte eine weitere PCR, die durch Verwendung von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden eine Sequenzierung ermöglicht. Mittels Sequenzierung lässt sich die Nukleotid-Reihenfolge eines bestimmten DNA-Abschnittes auslesen. In der Methode nach Sanger werden während einer Standard-PCR fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleosidtriphosphate in die Amplifikate eingebaut, die zu einem Abbruch der DNA-Synthese führen.

So erhält man unterschiedlich lange Amplifikate, deren letztes Nukleotid durch die Fluoreszenzmarkierung identifiziert werden kann. In Zusammenschau lässt sich so die vollständige Nukleotid-Reihenfolge des DNA-Abschnittes rekonstruieren. Die Sequenzierung wurde mittels Cycle-Sequencing-Methode durchgeführt.

Hierbei handelt es sich um eine Abwandlung der Sanger-Methode, bei der die Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase die Wiederholung des Reaktionsvorgangs ermöglicht.

Im Gegensatz zu der vorher stattgefundenen PCR wurde bei der Sequenzierungs-PCR jeweils nur noch einer der beiden Primer verwendet. Da der zu untersuchende DNA-Abschnitt zu lang war, um in einem Sequenzier-Vorgang vollständig analysiert zu werden, wurden für jedes PCR-Produkt zwei Reaktionsansätze gebraucht, die folgende Bestandteile enthielten:

- 1 µl PCR-Produkt (je nach Aussehen der Bande in der Gelelektrophorese auch eine größere Menge)
- 1 µl Primer; entweder Forward- oder Reverse-Primer
- 0,5 µl Big Dye™
- 3,75 µl Sequenzierpuffer
- 13,75 µl destilliertes HPLC-Wasser (Reaktionsansatz wird auf 20 µl ergänzt)

Das Big Dye Sequencing Kit 3.1 (Life Technologies GmbH) enthält die benötigten Nukleotide und die DNA-Polymerase. Die Sequenzierungs-PCR fand ebenfalls in den oben genannten Thermocyclern durch Auswahl des vorinstallierten Programms „Seq 50“ statt. Es fanden 24 Reaktionszyklen bei jeweils folgenden Temperaturen statt: 96 °C für zehn Sekunden zur Trennung der DNA-Stränge, 50 °C für fünf Sekunden zur Anlagerung der Primer und 60 °C für vier Minuten zur Synthese der komplementären Stränge. Im Anschluss an die Sequenzierungs-PCR fand ein weiterer Aufreinigungsvorgang mit dem Agencourt CleanSEQ Kit (Beckman Coulter) statt. Unter Hinzunahme einer Magnetplatte und 85 % Ethanol wurde erneut nach in Abbildung 4 geschildertem Prinzip das PCR-Produkt aufgereinigt.

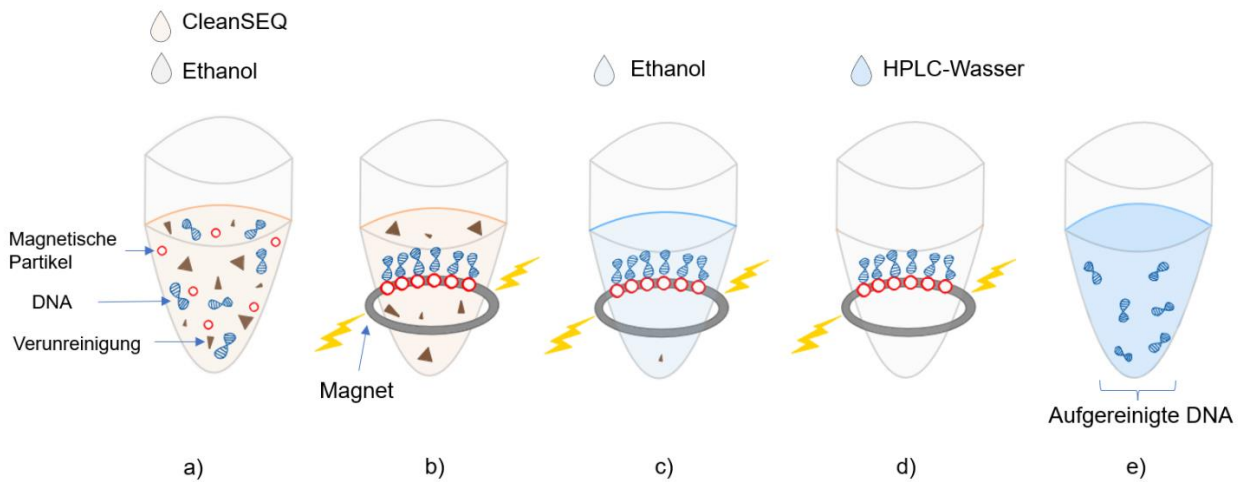


Abb. 4: Schematische Darstellung der Aufreinigung mit Hilfe des Agencourt CleanSEQ Kit. In a bindet die DNA an magnetische Partikel, worüber sie in b mittels Magnetplatte gebunden wird. In c findet ein Waschschrift mit Ethanol statt, wohingegen d und e zeigen, dass die DNA anschließend wieder in einer Flüssigkeit (in unserem Fall HPLC-Wasser) gelöst wird. (modifiziert nach Beckmann Coulter, 2017).

Abschließend wurden 6 µl des aufgereinigten PCR-Produkts und 6 µl destilliertes HPLC-Wasser in eine Sequenzierplatte gegeben. Zur Sequenzierung selbst wurde der 16-Kapillar-Sequenzierautomat 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies GmbH) genutzt und zur anschließenden Auswertung der Sequenzen das Software-Programm SeqMan II Version 5.0 (DNAST AR Inc.).

2.6 Statistik

Zur Auswertung der Lungenfunktionsparameter wurde der Median aus Messungen ausgewählt, die in drei aufeinander folgenden Jahren durchgeführt wurden. So konnten die zu mehreren Zeitpunkten gemessenen Lungenfunktionsparameter miteinander verglichen werden. Für die parametrischen Daten wurde der Mittelwert mit dem dazugehörigem 95 % Konfidenzintervall (KI) und die Standardabweichung berechnet und mit dem t-test verglichen. Nichtparametrische Daten wurden durch den Median und den Interquartilsabstand (IQA) beschrieben. Die nichtparametrischen Daten wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests ausgewertet.

Um den Einfluss der Besiedelung mit *P. aeruginosa* zu untersuchen, konnten die Patienten anhand von Sputum-Kulturen oder Rachenabstrichen in *P. aeruginosa* positiv/negativ eingeteilt werden. Dieser binäre Datensatz wurde mit dem χ^2 -Test analysiert.

Um den Einfluss auf das Gesamtüberleben oder das Erreichen von „End-stage lung disease“ zu untersuchen, wurden die Gruppen MBL-Suffizient/MBL-Insuffizient, die zwei Gruppen je nach vorliegendem *GJA4*-Genotyp und die Risiko-Haplotypen mittels Kaplan-Meier-Kurven analysiert. Um den Einfluss der *MBL*- und *Gap junction protein A4*-Genotypen und der chronischen Besiedelung mit *P. aeruginosa* auf die Lungenfunktion zu untersuchen, wurde ein gemischtes lineares Modell verwendet. In weiteren Analysen wurde auf die Kovariablen Alter, BMI und chronische Besiedelung mit *P. aeruginosa* adjustiert. Da die MBL-Serumkonzentration als Querschnittsanalyse vorlag, wurde eine univariate Varianzanalyse (General Linear Modell, GLM) verwendet, um den Einfluss des *MBL2*- und *Gap junction protein A4*-Genotyps und der chronischen Besiedelung mit *P. aeruginosa* auf die MBL-Serumkonzentration zu überprüfen.

Ein $p < 0,05$ wurde in der Auswertung als statistisch signifikant angesehen. Alle Berechnungen wurden mit dem Statistik-Programm SPSS (Version 25.0) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

In die Studie wurden 112 delta F508-homozygote Patienten (61 männliche und 51 weibliche Patienten, $p < 0,395$) einbezogen. Vierundneunzig der Patienten gehören zu der deutschen Kohorte und 18 zu der holländischen Kohorte. Eine erste Untersuchung wurde mit 22 Patienten aus Bonn durchgeführt.

Für die Replikationsstudie wurden 72 Patienten aus Frankfurt und 18 Patienten aus Amsterdam rekrutiert. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug bei Einschluss 27,6 Jahre (95 % Konfidenzintervall (KI) [25,2 - 30,0 Jahre], Spannweite 7 - 60 Jahre). Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten konnten die erforderlichen Lungenfunktionsuntersuchungen durchführen. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen lagen bei 111 Patienten vor. Ob ein Cystic Fibrosis related diabetes (CFRD) vorlag, war bei allen deutschen Patienten bekannt ($n=94$).

Bei 74 % der Patienten lag der dreijährige Beobachtungszeitraum innerhalb der Jahre 2010 bis 2018. Aufgrund von Ortswechseln wurden bei 26 % der Patienten ältere Daten miteinbezogen.

Die im folgenden genannten altersbezogenen Daten der Kohorten variieren je nach betrachtetem Parameter, da die Erhebung der jeweiligen Parameter über unterschiedliche Zeiträume hinweg erfolgt ist.

3.2 Haplotypisierung

Bei allen Patienten wurde eine Genotypisierung durchgeführt. Von den 112 Patienten wurden 79 Patienten (71 %) als MBL-Suffizient und 33 Patienten (29 %) als MBL-Insuffizient eingestuft. Tabelle 4 zeigt die Verteilung der Patienten auf die beiden Gruppen und die daraus resultierenden Charakteristika.

Tab. 4: Patientencharakteristika der beiden Gruppen MBL-Suffizient und MBL-Insuffizient
Der Unterschied im BMI zwischen den beiden Gruppen weist eine Signifikanz von $p < 0,059$ auf.

Genotyp Mannose-bindendes Lektin	Suffizient (n=79)	Insuffizient (n=33)
Geschlecht (männlich/weiblich)	46/33	15/18
Alter (in Jahren) ^c	28,9	24,4
Positiver Nachweis von <i>P. aeruginosa</i> (in %)	67	73
BMI (angegeben als Perzentile) ^d	35,2	23,8
Diabetes Mellitus (in %) ^a	33	32
FEV ₁ (in % der altersentsprechenden Norm)	66	68
FVC (in % der altersentsprechenden Norm)	79,7	80,2
FEF ₇₅ (in % der altersentsprechenden Norm)	53,2	61,4
MBL (ng/ml) ^{a,e}	820	372
Interleukin-8 (pg/ml) ^{a,b}	10,6	9
CRP (mg/dl) ^{a,b}	0,185	0,365

^a Daten nur für deutsche Patienten vorhanden, ^b Median, ^c $p < 0,058$, ^d $p < 0,059$, ^e $p < 0,001$

Anhand des Genotyps der *GJA4*-Variante (rs41266431) wurden dieselben Patienten in folgende zwei Gruppen aufgeteilt: Eine Gruppe aus denjenigen, die homozygot für das G-Allel sind (G/G Genotyp, n=82, 73 %) und eine Gruppe aus denjenigen, die Träger des A-Allels sind (A/G + A/A Genotyp, n=30, 27 %). In Tabelle 5 finden sich die Charakteristika der Subkohorten beider Genotypen.

Tab. 5: Dargestellt sind die Patientencharakteristika der beiden Genotypen des *GJA4*-Gens. Der Unterschied der FVC zwischen den beiden Gruppen weist eine Signifikanz von $p < 0,055$ auf.

Genotyp <i>Gap junction protein 4</i>	G/G (n=82)	A/G; A/A (n=30)
Geschlecht (männlich/weiblich)	44/38	17/13
Alter (in Jahren)	26,7	29,8
Positiver Nachweis von <i>P. aeruginosa</i> (in %)	66	76
BMI (angegeben als Perzentile)	29,7	37,7
Diabetes Mellitus (in %) ^a	33	32
FEV ₁ (in % der altersentsprechenden Norm)	65,5	69,4
FVC (in % der altersentsprechenden Norm) ^c	78	85,4
FEF ₇₅ (in % der altersentsprechenden Norm)	54,2	59
MBL (ng/ml) ^{a,d}	533	365
Interleukin-8 (pg/ml) ^{a,b}	10,8	9,0
CRP (mg/dl) ^{a,b}	0,42	0,23

^a Daten nur für deutsche Patienten vorhanden, ^b Median, ^c $p < 0,055$, ^d $p < 0,088$

Es wurden drei Risikohaplotypen gebildet, denen die Patienten je nach vorliegendem Genotyp zugeordnet wurden. Die Gruppe der Patienten mit hohem Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf (n=24, 21 %) bestand aus den Patienten, die sowohl MBL-insuffizient sind, als auch die Risikovariante im *GJA4*-Gen aufweisen. Zur Gruppe mit intermediärem Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf wurden alle Patienten gezählt (n=67, 60 %), die in einem der Gene eine protektive Variante und in dem anderen Gen eine Risikovariante aufwiesen. Lag in beiden Genen die protektive Variante vor, wurde das Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf als niedrig eingestuft (n=21, 19 %). Die durch die Einteilung in die Risikohaplotypen gebildeten Patientengruppen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tab. 6: Patientencharakteristika der nach den drei definierten Risikohaplotypen eingeteilten Gruppen. Der Unterschied des Durchschnittsalters der Gruppe mit niedrigem und hohem Risiko weist eine Signifikanz von $p < 0,059$ auf, wohingegen der Altersunterschied zwischen allen Risikohaplotypen eine Signifikanz von $p < 0,068$ zeigt.

Risikohaplotypen	Hoch (n=24)	Mittel (n=67)	Niedrig (n=21)
Geschlecht (männlich/weiblich)	11/13	37/30	13/8
Alter (in Jahren) ^c	25,3	26,6	33,2
Positiver Nachweis von <i>P. aeruginosa</i> (in %)	71	66	75
BMI (angegeben als Perzentile) ^d	19,3	34,3	38,5
Diabetes Mellitus (in %) ^a	35	32	36
FEV ₁ (in % der altersentsprechenden Norm)	65,6	66,9	66,6
FVC (in % der altersentsprechenden Norm)	77,7	79,1	84,6
FEF ₇₅ (in % der altersentsprechenden Norm)	61	52,9	57,9
MBL (ng/ml) ^a	424	589	762
Interleukin-8 (pg/ml) ^{a,b}	11,25	9	10,55
CRP (mg/dl) ^{a,b}	0,34	0,2	0,175

^a Daten nur für deutsche Patienten vorhanden, ^b Median, ^c $p < 0,068$, ^d $p < 0,05$

3.3 Mortalität

3.3.1 Einfluss von Mannose-bindendem Lektin

Die Patienten der Gruppen MBL-Suffizient und MBL-Insuffizient weisen keinen signifikanten Unterschied im Beobachtungszeitraum auf. Die Gruppen MBL-Suffizient/MBL-Insuffizient weisen folgende Charakteristika auf: Durchschnittsalter 31,5 Jahre/28,0 Jahre (95 % KI [28,4 - 34,5 Jahre/24,0 - 31,2 Jahre], Spannweite 9 - 62 Jahre/ 9 - 54 Jahre, $p < 0,101$). Innerhalb der Gruppe der Patienten, die keine Lungentransplantation erhalten haben, verteilen sich die Todesereignisse wie folgt: In der Gruppe der MBL-Insuffizienten finden sich vier Todesfälle (12 %) und fünf (6 %) ereigneten sich in der Gruppe der MBL-Suffizienten. Das Durchschnittsalter der Verstorbenen lag in der Gruppe der MBL-Insuffizienten bei 26 Jahren und in der Gruppe der MBL-Suffizienten bei 38 Jahren ($p < 0,19$).

Mithilfe des Log-Rank-Tests und der Darstellung durch eine Kaplan-Meier Kurve (siehe Abbildung 5) konnte ein Trend ($p < 0,076$) für eine erhöhte Mortalität in der Gruppe der MBL-Insuffizienten gezeigt werden.

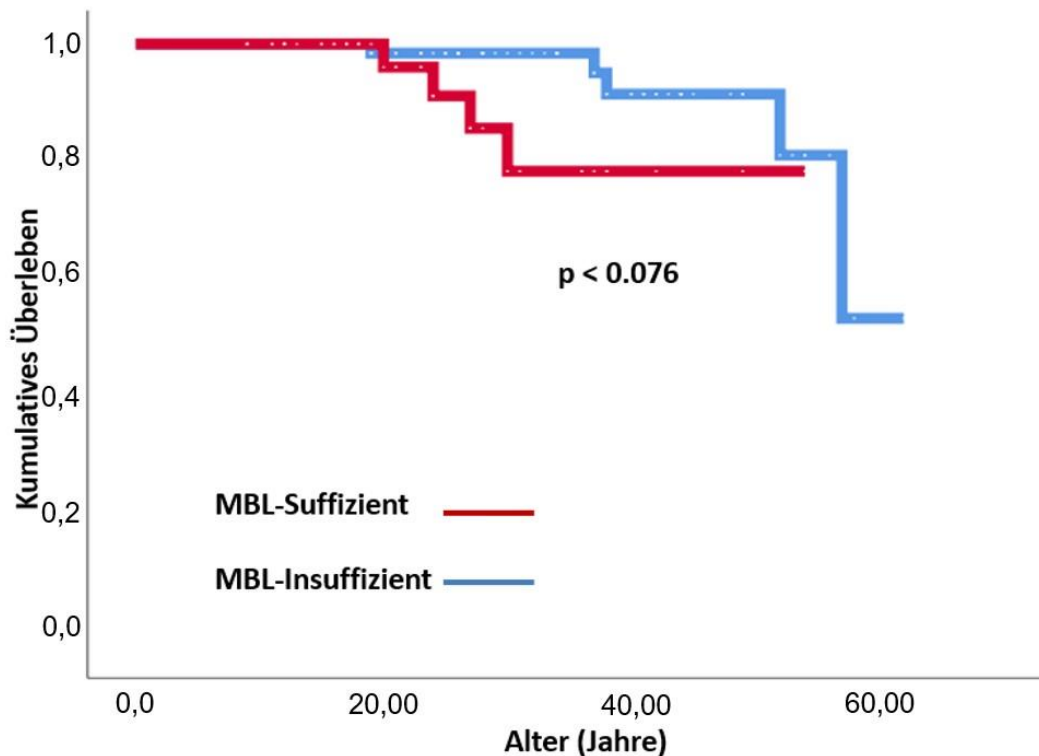


Abb. 5: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens innerhalb der Gruppen MBL-Suffizient/MBL-Insuffizient.

In der holländischen Kohorte konnten keine Todesereignisse beobachtet werden. Die deutsche Kohorte wurde separat analysiert. In der deutschen Kohorte zeigte sich ebenfalls ein Trend (Log-Rank-Test ($p < 0,086$)) für ein längeres Überleben in der Gruppe der MBL-Suffizienten (MBL-Suffizient/MBL-Insuffizient: Durchschnittsalter 32,0 Jahre/28,0 Jahre, 95 % KI [28,7 - 35,8 Jahre/23,8 - 32,3 Jahre], Spannweite 9 - 62 Jahre/9 - 54 Jahre).

Die Cox-Regression ergab für die Gruppe der MBL-Insuffizienten ein 3,4-fach höheres Risiko (KI 0,814 - 13,9), im Beobachtungszeitraum zu versterben, im Vergleich zur Gesamtkohorte ($p < 0,094$). In der deutschen Kohorte zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen den beiden Gruppen ($p < 0,103$).

Werden zusätzlich die nach Lungentransplantation verstorbenen Patienten berücksichtigt, finden sich insgesamt 13 Todesfälle (vier Patienten nach einer Lungentransplantation, neun Patienten ohne Lungentransplantation). Vier der Patienten waren MBL-insuffizient (12 % der MBL-Insuffizienten) und neun Patienten waren MBL-Suffizient (11% der MBL-Suffizienten) ($p < 0,269$). Da in der holländischen Kohorte keine Todesfälle in dem Beobachtungszeitraum auftraten, wurde die deutsche Kohorte separat analysiert. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden ($p < 0,295$).

Als "End-stage lung disease" werden die Ereignisse Tod und Lungentransplantation zusammengefasst. Innerhalb der untersuchten Kohorte kam es bei 15 Patienten zu "End-stage lung disease" (neun Todesereignisse ohne Lungentransplantation, vier Todesfälle nach Lungentransplantationen und zwei (lebende) Patienten nach Lungentransplantation). Zehn dieser Patienten waren MBL-Suffizient (13 % der MBL-Suffizienten) und fünf dieser Patienten waren MBL-insuffizient (15 % der MBL-Insuffizienten). Die Analyse mittels Log-Rank-Test zeigte keinen Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens von "End-stage lung disease" ($p < 0,191$). In der isolierten Analyse der Kohorte der deutschen Patienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p < 0,216$).

3.3.2 Einfluss von *Gap junction protein alpha 4*

Für die Patienten mit dem G/G-Genotyp (Risikovariante) und die Träger des A-Allels (protektive Variante) fanden sich keine Unterschiede für den Beobachtungszeitraum. Die Gruppen der Patienten mit G/G-Genotyp/A-Allel weisen folgende Charakteristika auf: Durchschnittsalter 29,4 Jahre/32,9 Jahre (95 % KI [26,7 - 32,1 Jahre/27,8 - 38,1 Jahre], Spannweite 9 - 58 Jahre/13 - 62 Jahre, $p < 0,192$).

Innerhalb des Patientenkollektivs, das keine Lungentransplantation erhalten hat, verteilen sich die Todesereignisse wie folgt: Innerhalb der Gruppe Patienten, die den G/G-Genotyp aufweisen, gab es neun Todesfälle ohne Lungentransplantation, wohingegen es bei den Trägern des A-Allels im Beobachtungszeitraum zu keinem Todesereignis kam.

Das Durchschnittsalter der Verstorbenen lag bei 30 Jahren. Die Analyse mittels Log-Rank-Test und die Kaplan-Meier-Kurve zeigten ein längeres Überleben derjenigen, die Träger des A-Allels sind ($p < 0,043$). Auch in der deutschen Kohorte zeigte sich ein Trend ($p < 0,052$) für ein besseres Überleben bei den Trägern des A-Allels (G/G-Genotyp/A-Allel: Durchschnittsalter 30 Jahre/35 Jahre, 95 % KI [26,8 - 32,8 Jahre, 28,3 - 41,5 Jahre], Spannweite 9 - 58 Jahre/13 - 62 Jahre).

Zusätzlich zu den neun Todesereignissen der Nicht-Lungen-Transplantierten kam es zu weiteren vier Todesereignissen bei Patienten, die zuvor eine Lungentransplantation erhalten haben. Alle 13 Todesfälle fanden in der Gruppe statt, die den Risikogenotyp G/G aufweist, wohingegen im Beobachtungszeitraum kein Patient mit A-Allel verstorben ist ($p < 0,009$). Der für die deutsche Kohorte durchgeführte Log-Rank-Test zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied im Überleben ($p < 0,012$).

Sechs Patienten wurden lungentransplantiert, davon lebten noch zwei Patienten zum Endpunkt der Datenerhebung. So können 15 Patienten als "End-stage CF lung disease" klassifiziert werden. Bei 14 Patienten fand sich das Risikoallel G/G, wohingegen ein Patient (überlebend bei Zustand nach Lungentransplantation) Träger des protektiven A-Allels ist. Es konnte gezeigt werden, dass "End-stage CF lung disease" signifikant häufiger in der Gruppe derer auftritt, die den Risikogenotyp G/G aufweisen ($p < 0,029$). Abbildung 6 zeigt durch eine Kaplan-Meier-Kurve dargestellt das Auftreten von "End-stage lung disease" innerhalb der beiden Gruppen. In der separaten Analyse der deutschen Kohorte zeigte sich ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Häufigkeit von "End-stage CF lung disease" ($p < 0,039$).

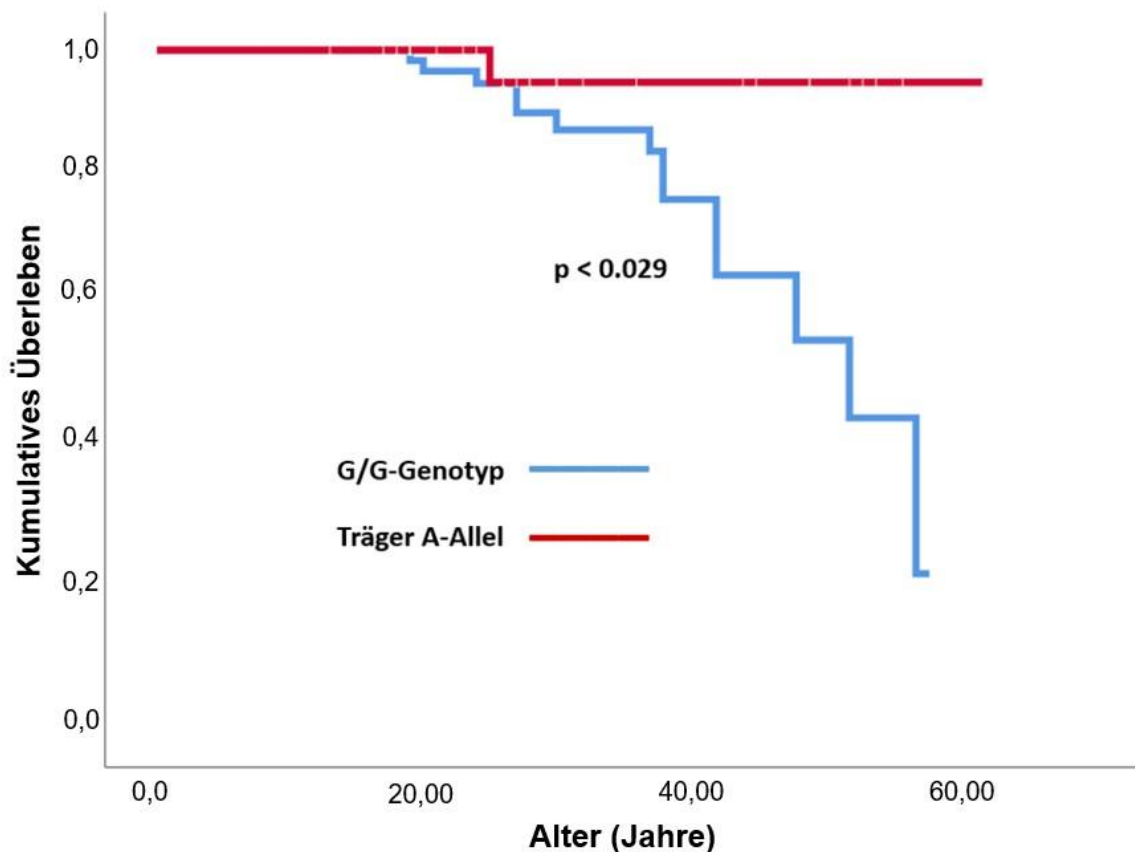


Abb. 6: Kaplan-Meier-Kurve des Auftretens von „End-stage lung disease“ innerhalb der Gruppen G/G-Genotyp/Träger des A-Allels.

Die Cox-Regression zeigte ein siebenfach erhöhtes Risiko (KI 0,917 - 54,136), dass Träger des Risikoallels G/G „End-stage CF lung disease“ erleiden ($p < 0,061$). Innerhalb der deutschen Kohorte ergab die Analyse ein 6,5-fach erhöhtes Risiko (KI 0,84 - 50,03) im Vergleich zum protektiven Genotyp (Träger des A-Allels) ($p < 0,073$).

3.3.3 Einfluss der Risikohaplotypen

Bei keinem der drei Risikohaplotypen gab es Unterschiede in der Länge des Beobachtungszeitraums. Die Charakteristika des jeweiligen Patientenkollektivs sind folgende: Haplotyp mit niedrigem Risiko: Durchschnittsalter 35,5 Jahre (95 % KI [28,6 - 42,5 Jahre], Spannweite 13 - 62 Jahre), Patientengruppe mit mittlerem Risiko: Durchschnittsalter 29,6 Jahre (95 % KI [26,6 - 32,5 Jahre], Spannweite 9 - 58 Jahre) und Hochrisikohaplotyp: Durchschnittsalter 27,9 Jahre (95 % KI [23,1 - 32,7 Jahre], Spannweite 9 - 54 Jahre), $p < 0,224$.

In der Gruppe mit niedrigem genetischen Risikoprofil gab es keine Todesfälle, in der Gruppe mit mittlerem Risiko fanden sich fünf Todesfälle (8 % aller Patienten mit mittlerem Risiko) und in der Gruppe mit dem Hochrisikohaplotyp vier Todesfälle (17 % aller Patienten mit hohem Risiko). Das Durchschnittsalter der Verstorbenen lag in der Gruppe mit mittlerem Risiko bei etwa 38 Jahren und in der Gruppe mit hohem Risiko bei 25,5 Jahre ($p < 0,19$). Der Log-Rank-Test (Kaplan-Meier-Kurve) zeigte, dass Patienten, die einen Haplotyp aufweisen, der mit einem mittleren bis hohem Risiko schwer zu erkranken assoziiert ist, signifikant häufiger im Beobachtungszeitraum verstarben ($p < 0,033$). Auch für die deutsche Kohorte ergab sich eine erhöhte Mortalität im Vergleich zur Gruppe mit niedrigem Risiko ($< 0,036$). Die Charakteristika der Patientengruppen waren dabei folgende: niedriges Risiko/mittleres Risiko/hohes Risiko: Durchschnittsalter 39,2 Jahre/29,9 Jahre/28,3 Jahre (95 % KI [29,6 - 48,9 Jahre/26,7 - 33,2 Jahre/22,5 - 34,1 Jahre], Spannweite 13 - 62 Jahre/9 - 58 Jahre/9 - 54 Jahre). Da es in der Gruppe mit niedrigem Risiko keine Todesfälle gab, wurden die Gruppen mit intermediärem und hohem Risiko miteinander verglichen. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied der Mortalität festgestellt werden.

Die Cox-Regression zeigte ein 4,3-fach höheres Risiko (KI 1,3 bis 13,8) im Beobachtungszeitraum zu versterben, wenn ein Haplotyp mit mittlerem oder hohem Risiko vorliegt ($p < 0,016$). Auch hier konnte kein Unterschied im Vergleich der Gruppen mit mittlerem und hohem Risiko festgestellt werden, auch in der deutschen Subkohorte nicht.

Von den insgesamt 13 Patienten, die bis 2018 verstorben sind (vier nach einer Lungentransplantation, neun ohne vorangegangene Lungentransplantation) gehören neun zur Gruppe mit intermediärem Risiko (13,4 % aller Patienten mit intermediärem Risiko) und vier zur Hochrisikogruppe (16,7 % aller Patienten mit hohem Risiko) ($p < 0,035$). Der Log-Rank-Test mit den Daten der deutschen Kohorte ergab ein ähnliches Ergebnis ($p < 0,044$). Der Vergleich der Haplotypen, die mit einem mittleren und einem hohen Risiko einhergehen, ergab keinen signifikanten Unterschied der Mortalität.

Die drei Gruppen wurden auch hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens von “End-stage CF lung disease” untersucht: Die Überlebenden nach Lungentransplantation verteilen sich auf einen Patienten mit niedrigem Risiko (5 % aller Patienten mit niedrigem Risiko), neun mit mittlerem Risiko (13,4 % aller Patienten mit mittlerem Risiko) und fünf mit hohem Risiko (21 % aller Patienten mit hohem Risiko).

Es konnte gezeigt werden, dass “End-stage CF lung disease” häufiger vorzukommen scheint, wenn ein Haplotyp vorliegt, der mit hohem Risiko verbunden ist ($p < 0,062$). Auch die Ergebnisse der deutschen Kohorte zeigen einen ähnlichen Trend ($p < 0,077$).

3.4 Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa*

Mikrobiologische Untersuchungsergebnisse waren bei 111 Patienten verfügbar. Ein mikrobiologischer Nachweis von *P. aeruginosa* lag bei 76 Patienten (68,5 %) vor. Chronisch besiedelt waren 57 Patienten (51,4 %) und eine intermittierende Infektion mit *P. aeruginosa* wiesen 19 Patienten auf (17,0 %).

3.4.1 Einfluss von Mannose-bindendem Lektin

Der MBL-Genotyp (MBL-Suffizient oder MBL-Insuffizient) hat in dieser Studie keinen Einfluss auf das Vorliegen einer Infektion mit *P. aeruginosa* (intermittierend oder chronisch): Es waren 52 MBL-Suffiziente Patienten mit *P. aeruginosa* besiedelt (67 % aller MBL-Suffizienten) und 24 Patienten, die MBL-insuffizient sind (73 % aller MBL-Insuffizienten) ($p < 0,66$). Auch in Bezug auf eine chronische Kolonisation machte es keinen Unterschied, welcher-MBL Genotyp vorlag ($p < 0,683$). In der gesamten Kohorte gehörten zur Gruppe der MBL-Suffizienten 39 chronisch besiedelte Patienten (50 % aller MBL-Suffizienten) und zur Gruppe der MBL-Insuffizienten 18 Patienten (55 % aller MBL-Insuffizienten).

Um den Einfluss einer chronischen Besiedlung mit *P. aeruginosa* auf den klinischen Verlauf innerhalb der beiden Gruppen beurteilen zu können, wurden longitudinale Daten verwendet, die ausschließlich bei den deutschen Patienten vorlagen.

Die Charakteristika der Patienten, bei denen eine chronische Infektion mit *P. aeruginosa* festgestellt werden konnte, sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tab. 7: Charakteristika der Patienten mit chronischer Besiedlung mit *P. aeruginosa*, aufgeteilt in die beiden Gruppen MBL-Suffizient und MBL-Insuffizient. Alle Daten beziehen sich auf deutsche Patienten, da nur für diese longitudinale Daten verfügbar waren.

Genotyp Mannose-bindendes Lektin	Suffizient (n=33)	Insuffizient (n=15)
Geschlecht (männlich/weiblich)	23/10	10/5
Alter (in Jahren) ^b	37	29
BMI (angegeben als Perzentile) ^c	21	10
Diabetes Mellitus (in %)	49	47
FEV ₁ (in % der altersentsprechenden Norm)	52	48
FVC (in % der altersentsprechenden Norm)	71	62
FEF ₇₅ (in % der altersentsprechenden Norm)	28	26
MBL (ng/ml) ^d	556	456
Interleukin-8 (pg/ml) ^a	9	10,6
CRP (mg/dl) ^a	0,3	0,47

^a Median, ^b p<0,021, ^c p<0,046, ^d p<0,066

Innerhalb der deutschen Kohorte, in der longitudinale Daten über die Besiedlung mit *P. aeruginosa* vorlagen, zeigte sich folgendes Ergebnis: Eine Infektion mit *P. aeruginosa* (intermittierend oder chronisch) wurde in der Gruppe der MBL-Suffizienten bei 46 Patienten festgestellt (70 %) und in der Gruppe der MBL-Insuffizienten bei 21 Patienten (75 %) (p<0,631). Bei Betrachtung der Verteilung der chronisch besiedelten Patienten auf die beiden Gruppe zeigte sich Folgendes: 33 chronisch mit *P. aeruginosa* besiedelte Patienten gehörten zur Gruppe der MBL-Suffizienten (50 % aller MBL-Suffizienten Patienten) und 15 Patienten mit chronischer Besiedlung fanden sich in der Gruppe der MBL-Insuffizienten (54 % aller MBL-Insuffizienten) (p<0,823).

3.4.2 Einfluss von *Gap junction protein alpha 4*

Der *GJA4*-Genotyp hat keinen Einfluss auf die Infektion mit *P. aeruginosa* (intermittierend oder chronisch): Innerhalb der Gruppe der Patienten, die homozygot für das Risikoallel (G/G-Genotyp) waren, waren 54 Patienten (65,9 % aller Patienten mit G/G-Genotyp) mit *P. aeruginosa* infiziert.

Unter den Trägern des A-Allels waren 22 Patienten infiziert (75,9 % aller Patienten mit A-Allel) ($p < 0,361$). Auch gab es keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit chronisch besiedelter Patienten innerhalb der zwei Gruppen: 39 Patienten mit Risikogenotyp G/G waren chronisch besiedelt (47,6 % aller Patienten mit G/G-Genotyp) und bei Trägern des protektiven A-Allels 18 Patienten (62,1 % aller Patienten mit A-Allel) ($p < 0,201$). Um den Einfluss einer chronischen Besiedlung mit *P. aeruginosa* auf den klinischen Verlauf zu beurteilen, wurden longitudinale Daten verwendet, die nur für die deutsche Kohorte verfügbar waren. Die Charakteristika dieser chronisch besiedelten Patienten finden sich in Tabelle 8.

Tab. 8: Charakteristika der Patienten mit chronischer Besiedlung mit *P. aeruginosa*, aufgeteilt in die beiden Gruppen anhand des Genotyps des *GJA4*-Gens. Alle Daten beziehen sich auf deutsche Patienten, da nur für diese longitudinale Daten verfügbar waren.

Genotyp <i>Gap junction protein alpha 4</i>	G/G (n=35)	A/G; A/A (n=13)
Geschlecht (männlich/weiblich)	23/12	10/3
Alter (in Jahren)	34	38
BMI (angegeben als Perzentile)	18	15
Diabetes Mellitus (in %)	51	39
FEV ₁ (in % der altersentsprechenden Norm)	48	59
FVC (in % der altersentsprechenden Norm) ^b	65	78
FEF ₇₅ (in % der altersentsprechenden Norm)	26	30
MBL (ng/ml)	492	556
Interleukin-8 (pg/ml) ^a	10,6	7
CRP (mg/dl) ^a	0,42	0,23

^a Median, ^b $p < 0,078$

3.4.3 Einfluss der Risikohaplotypen

Auch die drei Risikogruppen, die je nach vorliegendem Genotyp der *MBL2*- und *GJA4*-Gene gebildet wurden, haben keinen Einfluss, ob es zu einer Infektion mit *P. aeruginosa* kommt ($p < 0,746$).

Die Patienten, die im Beobachtungszeitraum mit *P. aeruginosa* infiziert waren (intermittierend oder chronisch), verteilten sich wie folgt auf die Gruppen: Haplotyp mit niedrigem Risiko: 15 Patienten (75 % aller Patienten mit niedrigem Risiko), Haplotyp mit intermediärem Risiko: 44 Patienten (66 % aller Patienten mit intermediärem Risiko) und Patienten der Gruppe mit hohem Risiko: 17 Patienten (71 % aller Patienten mit hohem Risiko). Die Verteilung ist in Tabelle 6 mit weiteren klinischen Merkmalen der Gruppen dargestellt. Erneut wurden die longitudinalen Daten (nur für die deutsche Kohorte verfügbar) analysiert, um den Einfluss der chronischen Infektion mit *P. aeruginosa* auf den klinischen Verlauf in jeder der Gruppen zu untersuchen. Die entsprechenden Charakteristika der einzelnen Gruppen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tab. 9: Charakteristika der Patienten mit chronischer Besiedlung mit *P. aeruginosa*, aufgeteilt nach den drei definierten Risikohaplotypen. Alle Daten beziehen sich auf deutsche Patienten, da nur für diese longitudinale Daten verfügbar waren.

Risiko	Risikohaplotypen		
	Hoch (n=11)	Mittel (n=27)	Niedrig (n=10)
Geschlecht (männlich/weiblich)	7/4	18/9	8/2
Alter (in Jahren) ^b	28	34	48
BMI (angegeben als Perzentile)	3	16,5	4
Diabetes Mellitus (in %)	55	46	44
FEV ₁ (in % der altersentsprechenden Norm)	37	46	62
FVC (in % der altersentsprechenden Norm) ^c	56	69	84
FEF ₇₅ (in % der altersentsprechenden Norm)	19	20	32
MBL (ng/ml)	474	474	968
Interleukin-8 (pg/ml) ^a	16,3	8,3	8,5
CRP (mg/dl) ^a	0,43	0,425	0,175

^a Median, ^b $p < 0,044$, ^c $p < 0,078$

3.5 Zeitpunkt der Erstinfektion mit *Pseudomonas aeruginosa* und Umwandlung in den mukoiden Phänotypen

Anhand der vorliegenden Daten konnte kein Zusammenhang des *MBL2*- und des *GJA4*-Genotyps zu einer früher stattfindenden Erstinfektion mit *P. aeruginosa* festgestellt werden. Auch die Umwandlung von *P. aeruginosa* in den mukoiden Phänotyp stand in dieser Arbeit in keinem Zusammenhang zu dem Genotyp der zwei untersuchten Gene.

3.6 Lungenfunktion

Für alle 112 in die Studie eingeschlossene Patienten waren spirometrische Daten verfügbar. Bei allen 112 Patienten lag der FEV₁ Wert vor und bei 107 Patienten zusätzlich die Werte für FVC und FEF₇₅. Es wurden für die jeweiligen Gruppen die Durchschnittswerte dieser Lungenfunktionsparameter gebildet (s. Tabellen 4, 5 und 6). In der Subkohorte der erwachsenen Patienten lag zwischen der Gruppe der MBL-Suffizienten und der MBL-Insuffizienten ein signifikanter Altersunterschied vor ($p < 0,040$). Aus diesem Grund wurde eine Matched-Pair-Vergleichsanalyse durchgeführt, bei der das Geschlecht der verglichenen Patienten übereinstimmen musste und sich das Alter nicht mehr als zwei Jahre unterscheiden durfte. Eine Übersicht der Ergebnisse der Matched-Pair-Analyse findet sich in Tabelle 10.

Tab. 10: Patientencharakteristika nach Matched-Pair-Analyse erwachsener Patienten der beiden Gruppen MBL-Suffizient und MBL-Insuffizient. Die jeweils verglichenen Patienten waren gleichen Geschlechts und durften sich im Alter um nicht mehr als zwei Jahre unterscheiden.

Genotyp Mannose-bindendes Lektin	Suffizient (n=22)	Insuffizient (n=22)
Geschlecht (männlich/weiblich)	11/11	11/11
Alter (in Jahren)	25	25
Positiver Nachweis von <i>P. aeruginosa</i> (in %)	68	73
BMI (angegeben als Perzentile) ^b	33	13
Diabetes Mellitus (in %) ^a	41	32
FEV ₁ (in % der altersentsprechenden Norm)	69	65
FVC (in % der altersentsprechenden Norm)	82	76
FEF ₇₅ (in % der altersentsprechenden Norm)	44	48
Bronchiektasen (in %)	77	91

^a Daten nur für deutsche Patienten vorhanden, ^b p<0,005

Es wurde ein gemischtes Modell (mixed linear model) verwendet, bei dem auf die Parameter Alter, BMI und chronische Besiedlung mit *P. aeruginosa* adjustiert wurde. Der Risikogenotyp (G/G) des *GJA4*-Gens ging in der Analyse mit einer signifikant verringerten forcierten Vitalkapazität (FVC, in % vom adjustierten altersentsprechenden Normwert) einher: Die Analyse errechnete geschätzt eine um 10,7 % verringerte FVC (KI -19,1 - 9,48, (p<0,013)). Es konnte kein Zusammenhang der Lungenfunktion (FVC) mit den MBL-Genotypen gezeigt werden. Auch zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von Bronchiektasen. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Lungenfunktionsparameter zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

3.7 Body-Mass-Index

Für alle 112 Patienten lag der Body-Mass-Index (BMI, angegeben in Perzentilen) vor. Im Gemischten Modell zeigte sich ein deutlicher Trend für eine signifikante Erhöhung des BMI innerhalb der Gruppe der MBL-Suffizienten ($p < 0,059$). Der durchschnittliche BMI beider Gruppen ist in Tabelle 4 angegeben.

In der Matched-Pair-Analyse der erwachsenen Patienten (s. Tabelle 10) ($p < 0,005$) und innerhalb der Untergruppe der chronisch mit *P. aeruginosa* Besiedelten ($p < 0,046$) zeigte sich hingegen eine statistisch signifikante Erhöhung des BMI in der Gruppe der MBL-Suffizienten. Die Analyse mittels mixed linear model, bei der auf Alter und chronische Besiedlung mit *P. aeruginosa* adjustiert wurde, zeigte eine BMI-Erhöhung (in Perzentilen) in der Gruppe der MBL-Suffizienten von geschätzt 13,76 (KI 2,84 - 24,67, ($p < 0,014$)).

3.8 Inflammatorische Marker

Es wurden die MBL-Spiegel im Serum bei 52 Patienten untersucht. Die Serumspiegel waren in der Gruppe der MBL-Suffizienten signifikant höher: MBL-Suffizient/MBL-Insuffizient: Median 820/372 ng/ml (IQA 353 - 1310/254 - 474, $p < 0,001$). Auch beim G/G-Genotyp des *GJA4*-Gens zeigte sich für die MBL-Serumspiegel ein Trend für signifikant erhöhte Werte: G/G-Genotyp/Träger des A-Allels: Median 533/365 ng/ml (IQA 357 - 1266/252 - 971, $p < 0,088$).

Es wurde ein gemischtes Modell angewendet, bei dem auf Alter und chronische Besiedlung mit *P. aeruginosa* adjustiert wurde. Der MBL-Serumspiegel war in der Gruppe der MBL-Suffizienten signifikant erhöht: Erhöhung um 503 ng/ml (KI 188 - 818, $p < 0,002$). Es konnte kein signifikanter Unterschied des MBL-Serumspiegels festgestellt werden zwischen den Patienten, die den G/G-Genotyp aufweisen und den Patienten, die Träger des A-Allels im *GJA4*-Gen sind ($p < 0,246$).

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass der Einfluss des *GJA4*-Gens auf den klinischen Phänotyp als unabhängig vom *MBL2*-Genotyp zu bewerten ist. Auch zeigte sich in unserer Untersuchung ein stärkerer Zusammenhang zwischen dem *GJA4*-Genotyp und dem klinischen Verlauf (insbesondere der Lungenfunktion) bei der Cystischen Fibrose als zwischen dem *MBL2*-Genotyp und dem klinischen Phänotyp. Hierdurch ergeben sich weitere Hinweise, dass es sich beim *GJA4*-Gen um ein relevantes Modifier-Gen für Cystische Fibrose handeln könnte. Auch konnte in dieser Studie erstmalig gezeigt werden, dass die MBL-Suffizienten Patienten einen Trend für einen signifikant höheren BMI zeigen im Vergleich zu den Patienten, die MBL-insuffizient sind.

CF-Patienten leiden oft an Sarkopenie und/oder Osteopenie, daher ist der BMI ein entscheidender Parameter in Verlaufskontrollen. Daten des Mukoviszidose-Registers zeigen, dass weiterhin 14,2 % der 2- bis 17-jährigen Mukoviszidose-Patienten untergewichtig sind (Nährlich et al., 2022). Ein ausgewogener Ernährungszustand führt zu einer verringerten Morbidität, bzw. zu weniger pulmonalen und metabolischen Komplikationen.

4.1 Einfluss des Genotyps auf die Lungenfunktion

Wir haben in dieser Studie drei verschiedene Risikohaplotypen definiert und miteinander verglichen, um die Interaktion zwischen dem *MBL2*-Gen und dem *GJA4*-Gen zu untersuchen. Der *GJA4*-Risikogenotyp (G/G-Genotyp) geht mit einem Trend ($p < 0,055$) für eine schlechtere Lungenfunktion (FVC) in unserer Gesamtkohorte einher. Dieser Effekt zeigte sich im Vergleich der Risikohaplotypen nicht mehr. Diejenigen Patienten, die sowohl im *MBL2*-Gen, als auch im *GJA4*-Gen eine Risikovariante aufweisen, haben keine signifikant schlechtere Lungenfunktion im Vergleich zu den zwei anderen Risikohaplotypen.

Andere Studien konnten einen signifikanten Einfluss des *MBL2*-Genotyps auf die Lungenfunktion nachweisen (Gabolde et al., 1999; Garred et al., 1999).

Wir konnten diesen Effekt in unserer Kohorte (bestehend aus deutschen und holländischen Patienten) nicht nachweisen. Nach unserem Kenntnisstand gibt es nur eine weitere Studie mit einer deutschen Kohorte, die den Zusammenhang des MBL-Genotyps und den klinischen Verlauf bei Mukoviszidose untersucht. Diese Studie (Nourkami-Tutibi et al., 2021) mit einer kleinen Fallzahl (n=35) von delta F508-homozygoten Patienten konnte ebenfalls kein Unterschied in Bezug auf die FEV1 gezeigt werden. Vor diesem Hintergrund kann die ethnische Herkunft einen Einfluss haben. Es haben aber auch Studien, die an Patienten gleicher ethnischer Herkunft durchgeführt wurden, widersprüchliche Ergebnisse gezeigt.

Es gibt mehrere Studien zu dieser Fragestellung, die in Nordamerika (USA und Kanada) durchgeführt wurden: Dorfman (Dorfman et al., 2008) konnte einen Effekt des *MBL2*-Genotyps auf die Lungenfunktion nachweisen, während dies in zwei anderen Studien mit Patienten gleicher Ethnie nicht möglich war (Drumm et al., 2005; McDougal et al., 2010). Die von Chalmers et al. (2011) durchgeführte Metaanalyse zum Einfluss des *MBL2*-Genotyps auf den Krankheitsverlauf zeigte, dass der *MBL2*-Genotyp sich nur in der adulten Subkohorte auf die Lungenfunktion auswirkt.

In den fünf in der Metaanalyse untersuchten Studien, die vorwiegend ein pädiatrisches Patientenkollektiv eingeschlossen haben, konnte dieser Einfluss nicht gezeigt werden (Chalmers et al., 2011).

Auch in einer separaten Analyse, in der wir die pädiatrischen Patienten (Alter unter 18 Jahren) ausgeschlossen haben, konnten wir in der Gruppe der MBL-Insuffizienten keine signifikant verringerte Lungenfunktion in der Matched-Pair-Analyse feststellen (s. Tabelle 10)

4.2 Einfluss des Genotyps auf *P. aeruginosa*-Infektion und Gesamtüberleben

McDougal und Mitarbeiter nutzten in ihrer Studie Daten der „US CF Twin and Sibling“-Studie. Es zeigte sich in der Auswertung der Daten kein Einfluss auf die Lungenfunktion.

Hingegen konnte aber ein Einfluss auf den Zeitpunkt der Erstinfektion mit *P. aeruginosa* und auch auf den Zeitabstand, den es braucht, bis eine Umwandlung des Erregers in die mukoide Form stattfindet, festgestellt werden (McDougal et al., 2010).

Der mukoide Phänotyp bei *P. aeruginosa* ist als Resistenzmechanismus gegen die wirtseigene Abwehr zu verstehen. Durch Sauerstoffmangel getriggert kommt es zur Ausbildung eines Biofilms auf der Bakterienoberfläche, welcher zu einem schlechteren Ansprechen auf eine antibiotische Therapie führt (Schmitt-Grohé et al., 2020). Die Studie von Nourkami-Tutdibi et al. (2021) untersuchte an 35 kaukasischen Patienten u.a. den Zusammenhang des *MBL2*-Genotyps und der Infektion mit *P. aeruginosa*. Die Analyse der Subgruppe (n=15) derjenigen, die chronisch mit *P. aeruginosa* besiedelt waren, ergab bei den MBL-Insuffizienten eine signifikant kürzere Zeitspanne zwischen Erstinfektion und Chronifizierung (Nourkami-Tutdibi et al., 2021). In dieser Studie zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem *MBL2*-Genotyp und der Infektion mit *P. aeruginosa*.

Die bereits erwähnte Metaanalyse von Chalmers und seinen Mitarbeitern zeigte folgende Zusammenhänge zwischen dem *MBL2*-Genotyp und dem klinischen Phänotyp der CF-Patienten auf: In der Gruppe der MBL-Insuffizienten kam es zu einer früher stattfindenden Erstinfektion mit *P. aeruginosa* und zu einer verringerten Lungenfunktion in der adulten Subkohorte, aber auch zu einem vermehrten Auftreten von „End-stage CF lung disease“, also zu Todesereignissen oder zu Lungentransplantationen (Chalmers et al., 2011).

In diesem Aspekt zeigt diese Studie ein ähnliches Ergebnis: Es konnte ein Trend für ein gehäuftes Auftreten von Todesfällen in der Gruppe der MBL-Insuffizienten (12 % aller MBL-Insuffizienten) im Vergleich zur Gruppe der MBL-Suffizienten (6 % aller MBL-Suffizienten) beobachtet werden. Die Kaplan-Meier-Analyse ergab hierfür einen Trend ($p < 0,076$), ebenso wie die Cox-Regression ($p < 0,094$). Wird hingegen die Interaktion zwischen den Genotypen im *MBL2*- und im *GJA4*-Gen betrachtet, so gehen die Todesereignisse (n=9) mit dem Vorliegen der Risikovariante im *GJA4*-Gen einher.

In der Analyse der Risikohaplotypen fanden sich in der Gruppe mit dem höchsten Risiko (Risikovariante sowohl im *MBL2*-Gen, als auch im *GJA4*-Gen) hingegen nur vier Todesereignisse.

4.3 Kritische Beurteilung der durchgeführten Studie

Die Power der vorliegenden Studie ist durch die kleine Anzahl an Probanden (n=112) eingeschränkt.

Im Vergleich dazu umfasst beispielsweise die Arbeit von McDougal und Mitarbeitern 788 Patienten (McDougal et al., 2010). Allerdings wurden Studien in die Metaanalyse von Chalmers mit einbezogen, die mit einer vergleichbaren Probandenanzahl oder sogar einer geringeren Anzahl an Personen durchgeführt wurden: Sowohl die Studie von Garred und Mitarbeitern, in der 149 Patienten in Dänemark untersucht wurden, als auch die Studie von Gabolde (n=22) stützen in der Metaanalyse die These, dass Varianten im *MBL2*-Gen zu einer signifikanten Reduktion der Lungenfunktion führen (Gabolde et al., 1999; Garred et al., 1999).

Die unterschiedlichen Ergebnisse in den genannten Studien könnten sich durch einen möglichen Einfluss der ethnischen Herkunft (und damit eines anderen genetischen Hintergrunds), der in den Ländern vorherrschenden unterschiedlichen Umweltbedingungen (Klima, Unterschiede in der Krankenversorgung etc.) und durch die verschiedenen vorliegenden *CFTR*-Mutationen innerhalb der jeweiligen Patientenkollektive erklären lassen.

4.4 Einfluss des Genotyps auf den BMI

Interessanterweise konnte in dieser Studie ein Trend für einen signifikanten Unterschied in den BMI-Perzentilen zwischen den MBL-Suffizienten und den MBL-Insuffizienten festgestellt werden.

Nach unserem Kenntnisstand wurde diese Beobachtung bisher noch nie bei CF-Patienten gemacht. Niedrigere MBL-Serumspiegel könnten zu einem verstärkten Entzündungsgeschehen führen. So fanden sich hier die durchschnittlichen CRP-Serumspiegel in der Gruppe erhöht, die wenig MBL exprimiert, auch wenn das Ergebnis statistisch nicht signifikant war. Es ist jedoch bekannt, dass sowohl der BMI, als auch der CRP-Spiegel mit dem Gesamtüberleben bei der Cystischen Fibrose korrelieren (Hayllar et al., 1997; Snell et al., 1998).

Dies könnte erklären, warum in dieser Studie ein Trend für ein längeres Überleben in der Gruppe der MBL-Suffizienten beobachtet werden konnte, obwohl sich die beiden Gruppen nicht in der Lungenfunktion unterscheiden.

Die zur Verfügung stehenden Daten zu Markern im Serum, die ein inflammatorisches Geschehen abbilden (MBL: n=52/Interleukin-8: n=67/ CRP: n=44), waren jedoch wenig umfangreich. Außerdem wurden die Serumspiegel jeweils nur zu einem einzigen Zeitpunkt gemessen. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich bei einem größeren Patientenkollektiv, einer umfassenderen Messung inflammatorischer Marker und auch bei der Betrachtung von longitudinalen Daten eine Korrelation zwischen dem BMI und den vorliegenden *MBL2*-Varianten noch deutlicher zeigen würde.

4.5 Klassifizierung des Genotyps YA/YO im *MBL2*-Gen

In der Arbeit von McDougal et al. (2010) bildeten die Individuen, die im *MBL2*-Gen den Genotyp YO/YO und XA/YO aufweisen, die Gruppe der MBL-Insuffizienten. Das Vorliegen der Genotypen YA/YO, XA/XA, XA/YA, und YA/YA definierte hingegen die Gruppe der MBL-Suffizienten, da diese Genotypen einen hohen MBL-Serumspiegel aufweisen. Garred et al. ordneten die Individuen mit dem Genotyp YA/YO (die auch in seiner Studie einen niedrigen MBL-Serumspiegel aufwiesen) der Gruppe der MBL-Suffizienten zu, da bei diesen Individuen eine ähnliche Lungenfunktion gemessen wurde, wie bei denen, die hohe MBL-Serumspiegel aufwiesen (Garred et al., 1999).

Da sich in der vorliegenden Studie kein signifikanter Unterschied in der Lungenfunktion zwischen den einzelnen Gruppen zeigte, wurde der Genotyp YA/YO aufgrund des niedrigen MBL-Serumspiegels als MBL-insuffizient eingestuft.

Um diese Resultate mit Studien vergleichen zu können, die eine Einteilung vorgenommen haben, wie sie für die Studie von McDougal beschrieben ist, wurden die Daten ergänzend auch nach diesem Schema haplotypisiert (Individuen mit YA/YO wurden als MBL-Suffizient eingruppiert) und zur besseren Einordnung im Folgenden in Tabelle 11 aufgeführt.

Tab. 11: Patientencharakteristika der nach McDougal et al. klassifizierten Gruppen MBL-Suffizient/MBL-Insuffizient. Es wurde bei den gezeigten Daten nach dem Schema von McDougal et al. klassifiziert, nach welchem der Genotyp YA/YO der Gruppe der MBL-Suffizienten zugeordnet wurde.

Genotyp Mannose-bindendes Lektin	Suffizient (n=100)	Insuffizient (n=12)
Geschlecht (männlich/weiblich)	57/43	4/8
Alter (in Jahren) ^b	26,5	19
Alter (in Jahren), wenn ≤ 30 Jahre	20	17,5
Positiver Nachweis von <i>P. aeruginosa</i> (in %)	69	67
BMI (angegeben als Perzentile)	26,5	14
BMI (angegeben als Perzentile), wenn ≤ 30 Jahre ^c	39	15,5
Diabetes Mellitus (in %) ^a	32	42
FEV ₁ (in % der altersentsprechenden Norm)	65	85
FVC (in % der altersentsprechenden Norm)	84	88
FEF ₇₅ (in % der altersentsprechenden Norm)	39	53,5
MBL (ng/ml) ^d	579,2	364,8

^a Daten nur für deutsche Patienten vorhanden, ^b p<0,046, ^c p<0,037, ^d p<0,007

Bei der Analyse dieser Daten zeigte sich allerdings, dass die Gruppen MBL-Suffizient/MBL-Insuffizient nun einen signifikanten Altersunterschied aufwiesen (p<0,046). In der Subkohorte der Patienten, die unter 30 Jahre alt waren, lag allerdings kein relevanter Altersunterschied vor. Um diesem Problem entgegen zu wirken, haben wir eine Matched-Pair-Analyse durchgeführt, bei der sich die verglichenen Individuen nicht im Geschlecht unterscheiden durften und im Lebensalter höchstens um zwei Jahre. Die Ergebnisse der durchgeführten Matched-Pair-Analyse sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tab. 12: Patientencharakteristika beider Gruppen MBL-Suffizient/MBL-Insuffizient klassifiziert nach McDougal et al. nach Matched-Pair-Analyse. Die Matched-Pair-Analyse wurde mit folgenden Kriterien durchgeführt: gleiches Geschlecht, Unterschied im Alter < 2 Jahre. Es wurde nach dem Schema von McDougal et al. (2010) klassifiziert, nach welchem der Genotyp YA/YO der Gruppe der MBL-Suffizienten zugeordnet wurde.

Genotyp Mannose-bindendes Lektin	Suffizient (n=12)	Insuffizient (n=12)
Geschlecht (männlich/weiblich)	4/8	4/8
Alter (in Jahren)	20	19
Positiver Nachweis von <i>P. aeruginosa</i> (in %)	67	67
BMI (angegeben als Perzentile) ^b	22,5	14
Diabetes Mellitus (in %) ^a	27	42
FEV ₁ (in % der altersentsprechenden Norm)	76	85
FVC (in % der altersentsprechenden Norm)	91	88
FEF ₇₅ (in % der altersentsprechenden Norm)	39	53,5
MBL (ng/ml) ^c	946	365

^a Daten nur für deutsche Patienten vorhanden, ^b p<0,086, ^c p<0,019

Die wichtigste Beobachtung in der untersuchten Kohorte war ein Trend für einen signifikanten Unterschied des BMI, der auf den MBL-Genotyp zurückgeführt werden konnte. Diejenigen, die der Gruppe der MBL-Suffizienten angehören, hatten einen deutlich höheren BMI.

5. Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass der Einfluss des *Gap junction protein A4*-Genotyps auf den klinischen Phänotyp im Rahmen einer Erkrankung mit Cystischer Fibrose als unabhängig vom Genotyp des Mannose-bindenden Lektins zu bewerten ist. Auch zeigt diese Studie, dass der *Gap junction protein A4*-Genotyp in unserer Kohorte, die 112 delta F508 homozygote Mukoviszidosepatienten umfasst, stärker mit dem klinischen Phänotyp bei Cystischer Fibrose korreliert als der Genotyp des Mannose-bindenden Lektins. Somit scheint die in einer vorherigen Arbeit unserer Gruppe untersuchte Variante (rs41266431) im *Gap junction protein A4*-Gen als „Modifier-Gen“ einen Einfluss auf den Verlauf einer Cystischen Fibrose zu haben. Wie in Abbildung 6 gezeigt, tritt „End-stage cystic fibrosis lung disease“ bei Vorliegen des G/G-Genotyps signifikant häufiger in der untersuchten Kohorte auf ($p < 0,029$).

Es wurde weder ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp des Mannose-bindenden Lektins und der Lungenfunktion festgestellt, noch zwischen dem Genotyp des Mannose-bindenden Lektins und dem Zeitpunkt einer Erstinfektion mit *Pseudomonas aeruginosa*. In der Gruppe, die suffizient Mannose-bindendes Lektin bildet, zeigte sich ein höherer Body-Mass-Index.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der CF-Mutationen in sechs Klassen mit jeweiliger Konsequenz des zugehörigen Defekts.....	10
Abbildung 2: Schematische Übersicht über das Exon 1 des MBL2-Gens mit den umgebenden Abschnitten.....	19
Abbildung 3: Bild eines Gelelektrophorese-Gels mit zehn Proben.....	35
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aufreinigung mit Hilfe des Agencourt CleanSEQ Kit.....	37
Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens innerhalb der Gruppen MBL-Suffizient/MBL-Insuffizient.....	43
Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve des Auftretens von „End-stage lung disease“ innerhalb der Gruppen G/G-Genotyp/Träger des A-Allels.....	46

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeiten der Organmanifestationen der Cystischen Fibrose mit Aufführung der konkreten Ausprägung.....	13
Tabelle 2: Diagnostische Hinweise und CFTR-Funktionsstörungen, die zur Diagnosestellung einer Cystischen Fibrose führen.....	14
Tabelle 3: Ansatz der PCR zur in-vitro Vervielfältigung von Teilen des MBL2-Gens.....	33
Tabelle 4: Patientencharakteristika der beiden Gruppen MBL-Suffizient und MBL-Insuffizient.....	40
Tabelle 5: Patientencharakteristika der nach Genotypen des GJA4-Gens eingeteilten Gruppen.....	41
Tabelle 6: Patientencharakteristika der nach den drei definierten Risikohaplotypen eingeteilten Gruppen.....	42
Tabelle 7: Charakteristika der Patienten mit chronischer Besiedlung mit <i>P. aeruginosa</i> , aufgeteilt in die beiden Gruppen MBL-Suffizient und MBL-Insuffizient.....	49
Tabelle 8: Charakteristika der Patienten mit chronischer Besiedlung mit <i>P. aeruginosa</i> , aufgeteilt in die beiden Gruppen anhand des Genotyps des GJA4-Gens.....	50
Tabelle 9: Charakteristika der Patienten mit chronischer Besiedlung mit <i>P. aeruginosa</i> , aufgeteilt nach den drei definierten Risikohaplotypen.....	51
Tabelle 10: Patientencharakteristika nach Matched-Pair-Analyse erwachsener Patienten der beiden Gruppen MBL-Suffizient und MBL-Insuffizient.....	53

Tabelle 11: Patientencharakteristika der nach McDougal et al. klassifizierten Gruppen MBL-Suffizient/MBL-Insuffizient.....60

Tabelle 12: Patientencharakteristika beider Gruppen MBL-Suffizient/MBL-Insuffizient klassifiziert nach McDougal et al. nach Matched-Pair-Analyse.....61

8. Literaturverzeichnis

Baxter N, Sumiya M, Cheng S, Erlich H, Regan L, Simons A, Summerfield JA. Recurrent miscarriage and variant alleles of mannose binding lectin, tumour necrosis factor α and lymphotoxin α genes. Clin Exp Immunol. 2001; 126: 529-534

Beckmann Coulter, 2017. Agencourt CleanSEQ Dye-Terminator Removal Protocol. https://ls.beckmancoulter.co.jp/files/products/genomics/CleanSEQ/IFU_CleanSEQ.pdf (Zugriffsdatum: 11.07.2022)

Beckmann Coulter, 2020. SPRI Methodology. https://media.beckman.com/-/media/pdf-assets/flyers/genomics-reagents-flyer-how-spri-works.pdf?la=de&country=DE&hash=D8AE0D54DC16F93258C1CC769BF38F5B3CD2A234&_ga=2.249052359.1796593803.1657554274-1416480350.1657554273 (Zugriffsdatum: 13.05.2022)

Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. J Cyst Fibros 2015; 14: 419-430

Chalmers JD, Fleming GB, Hill GB, Kilpatrick DC. Impact of mannose-binding lectin insufficiency on the course of cystic fibrosis: A review and meta-analysis. Glycobiology 2011; 21: 271-282

Chalmers JD, McHugh BJ, Doherty C, Smith MP, Govan JR, Kilpatrick DC, Hill AT. Mannose-binding lectin deficiency and disease severity in non-cystic fibrosis bronchiectasis: a prospective study. Lancet Respir Med. 2013; 1: 224-232

Crawford KJ, Downey DG. Theratyping in cystic fibrosis. Curr Opin Pulm Med. 2018; 24: 612-617

Cutting GR. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. Nat Rev Genet 2015; 16: 45-56

Davies EJ, Snowden N, Hillarby MC, Carthy D, Grennan DM, Thomson W, Ollier WE. Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1995; 38: 110-114

Dorfman R, Sandford A, Taylor C, Huang B, Frangolias D, Wang Y, Sang R, Pereira L, Sun L, Berthiaume Y. Complex two-gene modulation of lung disease severity in children with cystic fibrosis. *J Clin Invest.* 2008; 118: 1040-1049

Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, Fargo D, Xu A, Dunn JM, Darrah RJ, Dorfman R, Sandford AJ, Corey M, Zielenski J, Durie P, Goddard K, Yankaskas JR, Wright FA, Knowles MR, Gene Modifier Study Group. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1443-1453

Eickmeier O, van den Boom L, Schreiner F, Lentze MJ, NGampolo D, Schubert R, Zielen S, Schmitt-Grohé S. Transforming growth factor β 1 genotypes in relation to TGF β 1, Interleukin-8, and Tumor Necrosis Factor Alpha in induced sputum and blood in cystic fibrosis. *Mediators Inflamm.* 2013, Article ID 913135

Eickmeier O, Smaczny C, Rohde G, Schmitt-Grohé S. Zystische Fibrose – vom Screening zur Berufsberatung. *Der Pneumologe* 2019; 16: 19-26

Fraser DA, Bohlson SS, Jasinskiene N, Rawal N, Palmarini G, Ruiz S, Rochford R, Tenner AJ. C1q and MBL, components of the innate immune system, influence monocyte cytokine expression. *J Leukoc Biol.* 2006; 80: 107-116

Freund-Michel V, Muller B, Marthan R, Savineau JP, Guibert C. Expression and role of connexin-based gap junctions in pulmonary inflammatory diseases. *Pharmacol Ther.* 2016; 164: 105-119

Gabolde M, Guilloud-Bataille M, Feingold J, Besmond C. Association of variant alleles of mannose binding lectin with severity of pulmonary disease in cystic fibrosis: Cohort study. *Br Med J.* 1999; 319: 1166-1167

Garred P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Hoiby N, Schwartz M, Koch C. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 1999; 104: 431-437

Hayllar KM, Williams SG, Wise AE, Pouria S, Lombard M, Hodson ME, Westaby D. A prognostic model for the prediction of survival in cystic fibrosis. *Thorax* 1997; 52: 313-317

Horn T, Ludwig M, Eickmeier O, Neerincx AH, Maitland-van der Zee, AH, Smaczny C, Wagner TOF, Schubert R, Zielen S, Majoor C, Bos LD, Schmitt-Grohé S. Impact of a gap junction alpha 4 variant on clinical disease phenotype in delta F508 homozygous patients with cystic fibrosis. *Front Genet.* 2020; 11: 570403

Jack DL, Read RC, Tenner AJ, Frosch M, Turner MW, Klein NJ. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Infect Dis.* 2001; 184: 1152-1162

Ludwig M, Eickmeier O, Smaczny C, Schreiner F, Dubois W, NGampolo D, Schubert R, Zielen S, Ganschow R, Schmitt-Grohé S. Connexin 37 and connexin 43 genotypes in correlation to cytokines in induced sputum and blood in cystic fibrosis (CF). *Mol Cell Pediatr.* 2014; 1: Suppl 1: A11

Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Svejgaard A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannose-binding protein. *J Immunol.* 1995; 155: 3013-3020

McDougal KE, Green DM, Vanscoy LL, Fallin MD, Grow M, Cheng S, Blackman SM, Collaco JM, Henderson LB, Naughton K, Cutting GR. Use of a modelling framework to evaluate the effect of a modifier gene (MBL2) on variation in cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet.* 2010; 18: 680-684

McKone EF, Goss CH, Aitken ML. CFTR Genotype as a Predictor of Prognosis in Cystic Fibrosis. *Chest* 2006; 130: 1441-1447

Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CPM, Gustafsson P, Jensen R, Johnson D, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J. ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005; 26: 319-338

Moller-Kristensen M, Ip WK, Shi L, Gowda LD, Hamblin MR, Thiel S, Jensenius JC, Ezekowitz RA, Takahashi K. Deficiency of mannose-binding lectin greatly increases susceptibility to postburn infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol*. 2006; 176: 1769-1775

Nährig S, Chao C-M, Nährlich L. Cystic fibrosis diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2017; 114: 564-574

Nährlich L, Burkhart M, Wosniok J. Deutsches Mukoviszidose-Register - Berichtsband 2021. In: Nährlich L, Hrsg. Deutsches Mukoviszidose-Register - Berichtsband 2021, Erscheinungsjahr 2022

Nährlich L, Stuhmann-Spangenberg M, Barben J, Bargon J, Blankenstein O, Bremer W, Brunsmann F, Buchholz T, Ellemunter H, Fusch C, Gembruch U, Hammermann J, Jacobeit J, Jung A, Keim V, Loff S, Mayr S, Pfeiffer-Auler S, Rossi R, Sitter H, Stern M, Straßburg C, Derichs N. S2-Konsensus-Leitlinie „Diagnose der Mukoviszidose“. AWMF 026-023, Stand 06/2013

Nourkami-Tutdibi N, Freitag K, Zemlin M, Tutdibi E. Genetic Association With *Pseudomonas aeruginosa* Acquisition in Cystic Fibrosis: Influence of Surfactant Protein D and Mannose-Binding Lectin. *Front Immunol*. 2021; 12: 587313

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1073

Schmitt-Grohé S, Naujoks C, Bargon J, Wagner TO, Schubert R, Hippe V, Zielen S. Interleukin-8 in whole blood and clinical status in cystic fibrosis. *Cytokine* 2005; 29: 18-23

Schmitt-Grohé S, Stüber F, Book M, Bargon J, Wagner TO, Naujoks C, Schubert R, Lentze MJ, Zielen S. TNF- α promotor polymorphisms in relation to TNF- α production and clinical status in cystic fibrosis. *Lung* 2006; 184: 99-104

Schmitt-Grohé S, Lentze MJ, Henker J. Zystische Fibrose (Mukoviszidose) im Kindes- und Jugendalter. In: Hoffmann GF, Michael J, Lentze MJ, Spranger J, Zepp F, Berner R, Hrsg. Lehrbuch Pädiatrie 5. Auflage, Heidelberg: Springer-Verlag, 2020: Kapitel 158: 1-25

Snell GI, Bennetts K, Bartolo J, Levvey B, Griffiths A, Williams T, Rabinov M. Body mass index as a predictor of survival in adults with cystic fibrosis referred for lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 1998; 17: 1097-1103

Trevisiol C, Boniotto M, Giglio L, Poli F, Morgutti M, Crovella S. MBL2 polymorphisms screening in a regional Italian CF center. *J Cyst Fibros*. 2005; 4: 189-191

Turner MW. Deficiency of mannan binding protein: a new complement deficiency syndrome. *Clin Exp Immunol*. 1991; 86: 53-56

US CF Foundation, 2011: Clinical and Functional Translation of CFTR. <https://cftr2.org/resources> (Zugriffsdatum: 25.08.2020)

Van Koningsbruggen-Rietschel S, Rietschel E. Mukoviszidose. *Monatsschr Kinderheilkd*. 2017; 165: 681-687

Wallis R, Cheng JY. Molecular defects in variant forms of mannosebinding protein associated with immunodeficiency. *J Immunol*. 1999; 163: 4953-4959

9. Publikationen

Teile dieser Dissertation sind bereits veröffentlicht in den nachfolgenden Arbeiten:

Laubach JP, Ludwig M, Horn T, Eickmeier O, Smaczny C, Schubert R, Zielen S, Majoor C, Aydin M, Schmitt-Grohé S. Mannose-Binding Lectin (MBL) and Gap Junction Protein Alpha 4 (GJA4) Gene Heterogeneity in Relation to Severity of Clinical Disease in Cystic Fibrosis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022 May 30;27(6):168. doi: 10.31083/j.fbl2706168. PMID: 35748244.

Laubach JP, Ludwig M, Horn T, Eickmeier O, Smaczny C, Schubert R, Zielen S, Majoor C, Aydin M, Schnell A, Schmitt-Grohé S. Transforming Growth Factor β 1 and Gap Junction Protein Alpha 4 Gene Heterogeneity in Relation to the Severity of Clinical Disease in Cystic Fibrosis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2023 July; 28(7): 138. doi: 10.31083/j.fbl2807138 PMID: 37525914.