

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und
Onkologie)

**Retrospektive Analyse zur Untersuchung der
Bedeutung von Polymorphismen in Chitinasegenen
bei der CF-Lungenerkrankung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Eichler, Laura

2021

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Hartl
2. Berichterstatter:	Professor Dr. P. Bauer
3. Berichterstatter:	Professor Dr. Dr. B. Nürnberg
Tag der Disputation:	01.06.2021

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Zystische Fibrose	1
1.1.1 Ätiologie	1
1.1.2 Pathogenese und Klinik	5
1.1.3 Pulmonale Erreger.....	5
1.1.4 Diagnostik und Therapie.....	9
1.1.5 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen	12
1.2 Einfluss von genetischen Modifikatoren und Umwelteinflüssen	13
1.3 Chitinasen	16
1.3.1 Chitotriosidase	17
1.3.2 AMCase	20
1.4 Fragestellungen und Zielsetzung der Studie	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Patientenproben zur Genotypisierung	23
2.1.2 Patientendaten.....	24
2.1.3 Geräte	26
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.5 Reagenzien und Kits.....	27
2.1.6 Primer und Restriktionsenzyme	28
2.2 Methoden	29
2.2.1 DNA-Isolierung	29
2.2.2 Quantifizierung der extrahierten DNA.....	30
2.2.3 Genotypisierung der Polymorphismen.....	30
2.2.4 Durchführung der Genotypisierung von <i>CHIT1</i> rs3831317	32
2.2.5 Durchführung der Genotypisierung von <i>CHIA</i> rs61756687	34
2.2.6 Durchführung der Genotypisierung von <i>CHIA</i> rs3818822	36
2.3 Statistische Analyse	38

3	Ergebnisse	39
3.1	Patientencharakteristika	39
3.2	Genotypen-Verteilung	42
3.2.1	<i>CHIT1</i> rs3831317	42
3.2.2	<i>CHIA</i> rs61756687	43
3.2.3	<i>CHIA</i> rs3818822	44
3.3	Pulmonales Erregerspektrum	46
3.4	Korrelationen zwischen genetischen Varianten und dem pulmonalen fungalen Kolonisationsstatus	49
3.4.1	<i>CHIT1</i> rs3831317	49
3.4.2	<i>CHIA</i> rs61756687	52
3.4.3	<i>CHIA</i> rs3818822	55
3.5	Korrelation zwischen fungalem Kolonisationsstatus und Lungenfunktionsparametern	58
3.6	Korrelation zwischen Genotyp und Lungenfunktion	59
3.6.1	<i>CHIT1</i> rs3831317 und Lungenfunktionsparameter	60
3.6.2	<i>CHIA</i> rs61756687 und Lungenfunktionsparameter	61
3.6.3	<i>CHIA</i> rs3818822 und Lungenfunktionsparameter	62
4	Diskussion	63
4.1	Pulmonaler Erregerbefall	64
4.2	Lungenfunktion	66
4.3	Assoziationen mit <i>CHIT1</i> rs3831317	68
4.4	Assoziationen mit <i>CHIA</i> rs61756687 und rs3818822	71
4.5	Schlussfolgerung	75
5	Zusammenfassung	78
6	Anhang	80
7	Literaturverzeichnis	81
8	Erklärung zum Eigenanteil	101
9	Veröffentlichungen	102

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Aspergillus</i>
ABC	ATP-bindende Kasette (engl.: ATP-binding cassette)
ABPA	allergische bronchopulmonale Aspergillose
ADP	Adenosindiphosphat
AMCase	saure Säugerchitinase (engl.: acidic mammalian chitinase)
<i>ApoI</i>	Restriktionsenzym
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
C.	<i>Candida</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CF	Zystische Fibrose (engl.: cystic fibrosis)
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
<i>CHIA</i>	kodierendes Gen der AMCase
<i>CHIT1</i>	kodierendes Gen der Chitotriosidase
CLP	Chitinase-ähnliches Protein (engl.: chitinase-like protein)
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung (engl.: chronic obstructive pulmonary disease)
Δ F508	Deletion von drei Basen im <i>CFTR</i> -Gen mit resultierendem Aminosäureverlust von Phenylalanin an Position 508
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
Dup	homozygote Träger der 24-bp-Duplikation im <i>CHIT1</i> -Gen
FEV ₁	expiratorische Einsekundenkapazität (engl.: forced expiratory volume in 1 second)
Het	heterozygote Träger der 24-bp-Duplikation im <i>CHIT1</i> -Gen
<i>HpaII</i>	Restriktionsenzym
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
MSD	Transmembrandomäne (engl.: membrane spanning domain)
NBD	Nukleotid-Bindedomäne (engl.: nucleotid binding domains)

NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PKA	Proteinkinase
SAFS	schweres Asthma mit Sensibilisierung gegenüber Pilzen (engl.: severe asthma and fungal sensitization)
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (engl.: single-nucleotide polymorphism)
TNF- α	Tumornekrosefaktor Alpha
Wt	Wildtyp (Nichtträger der 24-bp-Duplikation im <i>CHIT1</i> -Gen)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Häufigkeitsverteilung der <i>CFTR</i> -Mutationen in Deutschland	2
Tabelle 2:	Einteilung des fungalen und bakteriellen Kolonisationsstatus	24
Tabelle 3:	Liste der verwendeten Geräte.....	26
Tabelle 4:	Liste der Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 5:	Liste der Reagenzien und Kits	27
Tabelle 6:	Liste der verwendeten Primer	28
Tabelle 7:	Liste der verwendeten Restriktionsenzyme	28
Tabelle 8:	PCR-Reaktionsgemisch von <i>CHIT1</i> rs3831317.....	33
Tabelle 9:	PCR-Bedingungen bei <i>CHIT1</i> rs3831317.....	33
Tabelle 10:	PCR-Reaktionsgemisch von <i>CHIA</i> rs61756687	34
Tabelle 11:	PCR-Bedingungen bei <i>CHIA</i> rs61756687.....	34
Tabelle 12:	Reaktionsansatz des Verdaus durch <i>ApoI</i>	34
Tabelle 13:	PCR-Reaktionsgemisch von <i>CHIA</i> rs3818822	36
Tabelle 14:	PCR-Bedingungen bei <i>CHIA</i> rs3818822.....	36
Tabelle 15:	Reaktionsansatz des Verdaus durch <i>HpaII</i>	36
Tabelle 16:	Patientencharakteristika.....	39
Tabelle 17:	Häufigkeitsverteilung der <i>CFTR</i> -Mutationen.....	41
Tabelle 18:	Häufigkeitsverteilung des SNPs <i>CHIT1</i> rs3831317	43
Tabelle 19:	Häufigkeitsverteilung des SNPs <i>CHIA</i> rs61756687	44
Tabelle 20:	Häufigkeitsverteilung des SNPs <i>CHIA</i> rs3818822	45
Tabelle 21:	Fungale Kolonisation	47
Tabelle 22:	Bakterielle Kolonisation.....	48
Tabelle 23:	Korrelation von fungalem Kolonisationsstatus mit FEV ₁	58
Tabelle 24:	Korrelation von fungalem Kolonisationsstatus mit Slope	59
Tabelle 25:	Einteilung des Schweregrades der Lungenerkrankung (modifiziert nach Schluchter et al. 2006).....	80

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>CFTR</i> -Mutationsklassen mit jeweiligem Pathomechanismus.....	3
Abb. 2: Darstellung des <i>CFTR</i> -Proteins als Chloridionenkanal	4
Abb. 3: Prävalenz pulmonaler Keime bei CF nach Altersgruppen.....	6
Abb. 4: Anteil möglicher Einflussfaktoren auf CF-Erkrankungen.....	15
Abb. 5: Darstellung einer Chitinkette mit Spaltungsort der Chitinasen	16
Abb. 6: Ausschnitt aus der Genomsequenz <i>CHIT1</i> rs3831317	33
Abb. 7: Ausschnitt aus der Genomsequenz <i>CHIA</i> rs61756687	35
Abb. 8: Ausschnitt aus der Genomsequenz <i>CHIA</i> rs3818822	37
Abb. 9: Häufigkeitsverteilung des Schweregrads der Lungenerkrankung	40
Abb. 10: Geldokumentation von <i>CHIT1</i> rs3831317	42
Abb. 11: Geldokumentation von <i>CHIA</i> rs61756687	44
Abb. 12: Geldokumentation von <i>CHIA</i> rs3818822	45
Abb. 13: <i>CHIT1</i> rs3831317 Varianten und <i>C. albicans</i> Status.....	49
Abb. 14: <i>CHIT1</i> rs3831317 Varianten und <i>A. fumigatus</i> bzw. <i>A. flavus</i> Status.....	50
Abb. 15: <i>CHIT1</i> rs3831317 Varianten und <i>C. glabrata</i> bzw. <i>C. parapsilosis</i> Status.....	51
Abb. 16: <i>CHIA</i> rs61756687 Varianten und <i>C. albicans</i> bzw. <i>A. fumigatus</i> Status	52
Abb. 17: <i>CHIA</i> rs61756687 Varianten und <i>A. flavus</i> bzw. <i>C. glabrata</i> Status.....	53
Abb. 18: <i>CHIA</i> rs61756687 Varianten und <i>C. parapsilosis</i> Status.....	54
Abb. 19: <i>CHIA</i> rs3818822 Varianten und <i>C. albicans</i> bzw. <i>A. fumigatus</i> Status	55
Abb. 20: <i>CHIA</i> rs3818822 Varianten und <i>A. flavus</i> bzw. <i>C. glabrata</i> Status.....	56
Abb. 21: <i>CHIA</i> rs3818822 Varianten und <i>C. parapsilosis</i> Status.....	57
Abb. 22: <i>CHIT1</i> rs3831317 Varianten und FEV ₁ (links) bzw. Slope (rechts)....	60
Abb. 23: <i>CHIA</i> rs61756687 Varianten und FEV ₁ (links) bzw. Slope (rechts)....	61
Abb. 24: <i>CHIA</i> rs3818822 Varianten und FEV ₁ (links) bzw. Slope (rechts).....	62

1 Einleitung

1.1 Zystische Fibrose

1.1.1 Ätiologie

Die Zystische Fibrose (*Cystic fibrosis*, CF) ist eine lebensverkürzende angeborene Stoffwechselerkrankung verursacht durch einen monogenetischen Defekt im *CFTR*-Gen (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Als Multisystemerkrankung führt sie zu Funktionsstörungen vieler Organe bedingt durch die Produktion eines zähen Sekrets exokriner Drüsen. Abgeleitet aus den lateinischen Worten *mucus* = Schleim und *viscidus* = zäh bezeichnet man die Erkrankung im Deutschen daher auch als Mukoviszidose [1; 2; 3].

Mit einer Inzidenz von 1 : 2500 - 1 : 3500 Lebendgeborenen ist CF eine der häufigsten genetischen Stoffwechselstörungen in Europa [4; 5]. Sie folgt dem autosomal-rezessiven Erbgang, sodass nur homozygote Merkmalsträger erkranken. In Deutschland leben derzeit über 8000 Betroffene. Die Prävalenz von heterozygoten Anlageträgern beträgt etwa 4 % [3; 6].

Genetik

Das *CFTR*-Gen befindet sich auf Chromosom 7 an Position 7q31.2 mit einer Länge von 250 kb. Aktuell sind mehr als 2000 verschiedene Mutationen im *CFTR*-Gen bekannt [7]. Mit etwa 70 % stellt die Mutation $\Delta F508$ die häufigste weltweit dar. Die prozentualen Anteile der Mutationen variieren zwar geografisch, innerhalb der kaukasischen Bevölkerung ist jedoch keine weitere *CFTR*-Mutation mit einer Häufigkeit von mehr als 5 % anzutreffen [8; 9]. Eine Auflistung der häufigsten Mutationen in Deutschland findet sich in Tabelle 1 [6].

Tabelle 1: Häufigkeitsverteilung der *CFTR*-Mutationen in Deutschland

Mutation	Relative Häufigkeit (%)
$\Delta F508$	65,6
G542X	1,7
R553X	1,7
N1303K	1,7
G551D	1,5
R347P	1,1
1717-1G > A	0,7
3849 + 10 kb C > T	0,7
W1282X	0,5
R117H	0,5

Aufgelistet sind alle Mutationen mit einer Häufigkeit von mindestens 0,5 %. Gezählt wurde jeder Nachweis auf mindestens einem Allel. Die Tabelle stammt aus der Qualitätssicherung Mukoviszidose von Sens & Stern 2012 [6].

Die zahlreichen Mutationen im *CFTR*-Gen kann man in sechs verschiedene Klassen einteilen, denen unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde liegen.

Klasse-I-Mutationen führen zu einem Funktionsdefekt in der Synthese des *CFTR*-Proteins. Den Vertretern der Klasse-II-Mutationen liegt ein Fehler in der Prozessierung des *CFTR*-Proteins zugrunde. Das fehlerhafte Protein wird frühzeitig im endoplasmatischen Retikulum degradiert [10]. Zu dieser Klasse gehört die häufigste Mutation $\Delta F508$. Eine Deletion von drei Basenpaaren im Exon 10 mit einem daraus resultierenden Aminosäureverlust von Phenylalanin an Position 508 führt zu einem vorzeitigen Abbau des *CFTR*-Proteins [11; 12]. Bei Mutationen der Klasse III - VI wird das synthetisierte *CFTR*-Protein zwar an der apikalen Zellmembran exprimiert, die Funktion des Proteins ist jedoch je nach Mutationsklasse gestört. In Klasse-III-Mutationen liegt eine Störung der Regulierung des Ionenkanals vor. Mutationen der Klasse IV führen zu einer Störung der Ionen-Leitfähigkeit mit einem daraus resultierenden reduzierten Chloridionen-Transport [13]. Klasse V beinhaltet Mutationen, die eine reduzierte Proteinsynthese zur Folge haben [14]. Mutationen der Klasse VI führen zu einer reduzierten Proteinstabilität, womit eine verringerte Halbwertszeit mit

frühzeitiger Degradierung verbunden ist [15]. In Abbildung 1 sind die verschiedenen Mutationsklassen mit ihrem jeweiligen Pathomechanismus dargestellt.

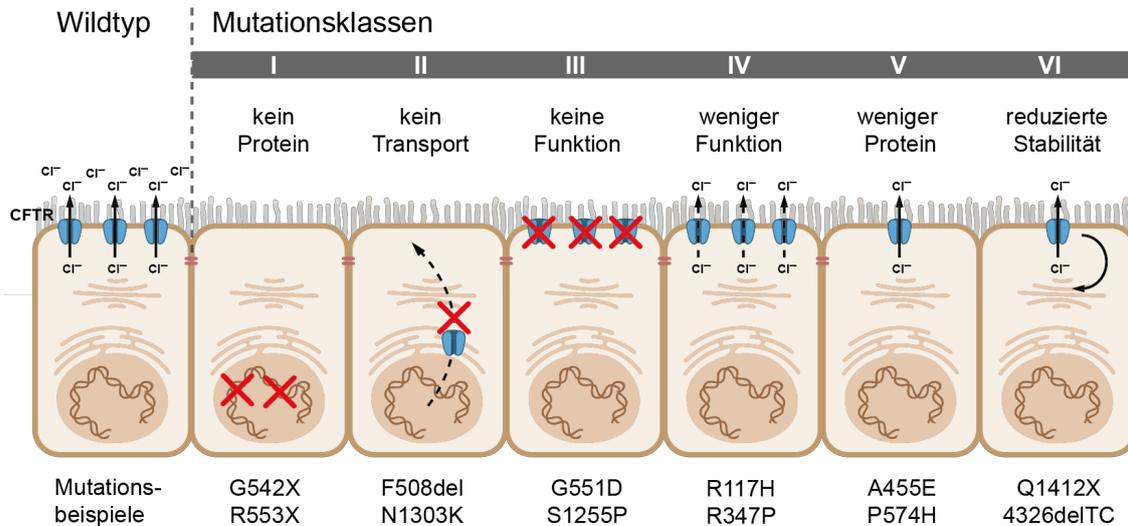


Abb. 1: CFTR-Mutationsklassen mit jeweiligem Pathomechanismus

Links ist das Wildtyp-CFTR-Protein als Chloridionenkanal an der apikalen Zellmembran dargestellt. Rechts sind die verschiedenen Mutationsklassen I - VI mit jeweiligem Pathomechanismus abgebildet. Unter den Zellen sind zur Mutationsklasse gehörige Mutationsbeispiele aufgelistet. Die Abbildung wurde modifiziert nach Amaral 2015 [16].

Durch Transkription und Translation von insgesamt 27 Exons des *CFTR*-Gens entsteht am Ende das aus 1480 Aminosäuren bestehende CFTR-Protein [2; 11; 17; 18]. Nach Struktur und Funktion ordnet man das CFTR-Protein den ABC-Transportern zu [2; 19]. Diese Transporter stellen Membranproteine dar, die mit Hilfe einer ATP-bindenden Kasette (engl. *ATP-binding cassette*, ABC) Substrate aktiv über eine Zellmembran befördern. Das CFTR-Protein fungiert nach diesem Mechanismus als ein Chloridionenkanal und ist hauptsächlich an der apikalen Membran sekretorischer Zellen lokalisiert [20; 21].

1.1.2 Pathogenese und Klinik

Die Mutationen im *CFTR*-Gen bedingen einen fehlenden oder verminderten Strom von Chlorid (Cl^-) aus den Zellen exkretorischer Drüsen. Die folglich vermehrte Resorption von Natrium (Na^+) und Wasser in die Zellen führt zu einer Eindickung exkretorischer Sekrete des Bronchialsystems, des Pankreas, der Leber, des Dünndarms sowie der Gonaden. Der zähflüssige Schleim verstopft die Drüsenausführungsgänge und prädisponiert für Entzündungen und Infektionen, die letztendlich Funktionsstörungen unterschiedlicher Art verursachen [26].

Das klinische Bild ist vor allem durch eine fortschreitende Lungenerkrankung mit rezidivierenden Atemwegsinfekten charakterisiert (siehe Abschnitt 1.1.3). Langfristig entwickelt sich durch chronische Entzündungen eine respiratorische Insuffizienz mit Destruktion des Lungengewebes bis hin zur Lungenfibrose mit Rechtsherzversagen. Zusätzliche gastrointestinale Störungen umfassen als früheste Form der Manifestation einen Mekoniumileus, später dann Obstipation, Maldigestion, Steatorrhoe und Gedeihstörungen, bedingt durch eine exokrine Pankreasinsuffizienz [27; 28]. Eine zunehmende Fibrosierung des endokrinen Pankreas verursacht bei etwa 50 % der Patienten einen so genannten *Cystic fibrosis-related diabetes mellitus* (CFRD) [29]. Durch Beteiligung des Reproduktionstraktes ist die Fertilität beider Geschlechter beeinträchtigt. Männer leiden sehr häufig an einer *kongenitalen bilateralen Aplasie* der *Vas deferens* (CBAVD), woraus eine Unfruchtbarkeit durch obstruktive Azoospermie resultiert. Frauen weisen ein zähflüssigeres Sekret im Zervixkanal auf, welches die Empfängnisfähigkeit erschwert [30].

1.1.3 Pulmonale Erreger

Normalerweise wird die mukoziliäre Clearance, die dem Abtransport von Schadstoffen aus der Lunge dient, durch die Atemwegsoberflächenflüssigkeit und den Schlag der Zilien gewährleistet. Der *CFTR*-Kanal in den Zellen des Bronchialepithels reguliert dabei maßgeblich den Grad der Hydratation der Atemwegsoberflächenflüssigkeit. Ist der Kanal defekt, kommt es durch die herabgesetzte Cl^- -Sekretion zu einer kompensatorisch erhöhten Na^+ -

Absorption. Durch die osmotische Wirkung strömt Wasser vermehrt in die Zellen des Bronchialepithels, was zur Dehydratation der Atemwegsoberflächenflüssigkeit führt. Das zähflüssige Bronchialsekret beeinträchtigt die Beweglichkeit der Zilien und bedingt ein Versagen der mukoziliären Clearance. Das pulmonal verbliebene visköse Sekret bietet einen idealen Nährboden für verschiedene Keimspektren und prädisponiert so für bronchopulmonale Infekte [31; 32; 33].

Bakterien sind die häufigsten infektiösen Organismen in den Atemwegen bei CF-Patienten. Darunter zählen im Kindes- und Jugendalter *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* und *Haemophilus* (*H.*) *influenzae*, mit zunehmendem Alter dann *Pseudomonas* (*P.*) *aeruginosa* [6]. Aber auch Keime wie *Burkholderia* (*B.*) *cepacia*, *Stenotrophomonas* (*S.*) *maltophilia* und *Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus* (*MRSA*) nehmen an Bedeutung zu [34; 35; 36; 37]. Abbildung 3 zeigt die Prävalenz bakterieller Erreger in Abhängigkeit der verschiedenen Altersgruppen von CF-Patienten in Deutschland [6].

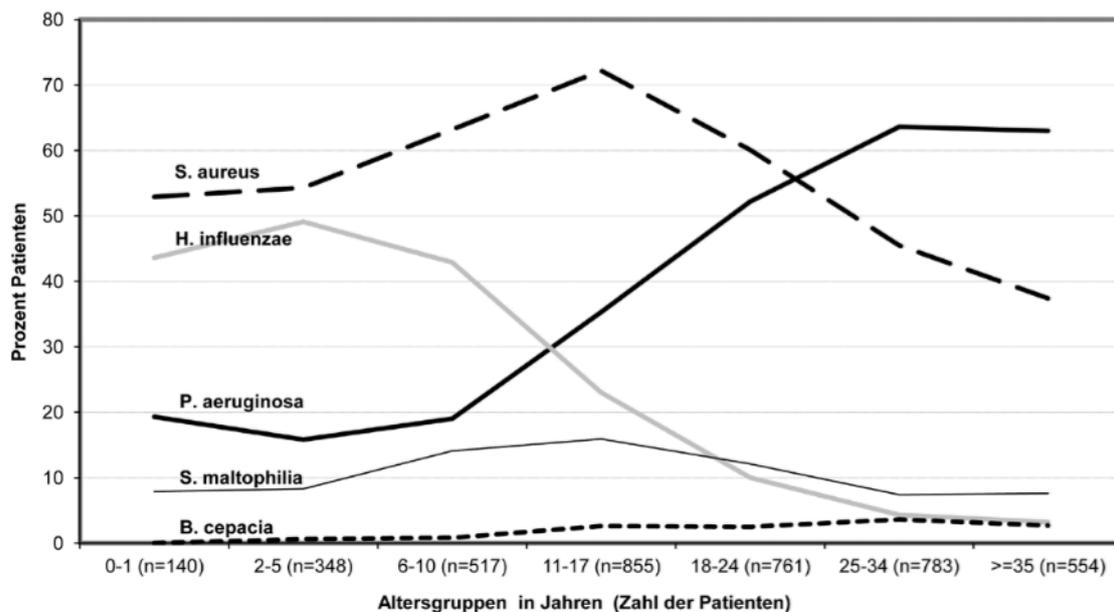


Abb. 3: Prävalenz pulmonaler Keime bei CF nach Altersgruppen

Die Abbildung wurde aus der Qualitätssicherung Mukoviszidose von Sens & Stern 2012 entnommen [6].

In den letzten Jahren wurde eine Zunahme pulmonaler Besiedlungen durch Pilze beobachtet. Dies begründet sich unter anderem durch den prolongierten Gebrauch inhalativer Antibiotika und Kortikosteroide, stetig verbesserte Nachweismethoden sowie die steigende Lebenserwartung von CF-Patienten [38; 39; 40; 41].

Pilze sind eukaryotische Zellen, das Grundgerüst ihrer Zellwand besteht im Wesentlichen aus Glukan und Chitin sowie eingewobenen Glykoproteinen und Mannanen [42]. Da Pilze mehr als 25 % der Biomasse unserer Erde ausmachen, wird der Mensch ständig mit ihnen konfrontiert. So werden in der Luft befindliche Pilzsporen eingeatmet sowie über Lebensmittel mit der Nahrung aufgenommen. Zudem spielen Pilze eine große Rolle in der Medikamentenherstellung [43]. Die meisten Pilzarten sind für den Menschen ungefährlich. Einige haben jedoch als opportunistische Erreger pathogenes Potential bei Immunkompromittierung. Bei CF-Patienten stellen *Candida* (*C.*) *albicans* als Hefepilz und *Aspergillus* (*A.*) *fumigatus* als Schimmelpilz die häufigsten Vertreter im Respirationstrakt dar [44; 45].

Der Hefepilz *C. albicans* ist ein Mikroorganismus der transienten Flora von Haut und Schleimhäuten. Als apathogener Keim ist er bei etwa 50 % der gesunden Bevölkerung nachweisbar. Bei immunsupprimierten Menschen ist *C. albicans* für die meisten Pilzinfektionen weltweit verantwortlich. Der Erreger kann sich im Rahmen von oberflächlichen Infektionen als oropharyngeale, vulvovaginale und kutane Candidose äußern oder auch systemisch manifestieren [46]. Weitere *Candida*-Arten adhärieren zudem bevorzugt an Oberflächen von Medizinprodukten, wie Kathetern und Implantaten. Durch die Bildung von Biofilmen können Angriffe des Immunsystems sowie die Wirkung von Antimykotika abgeschwächt werden. Mit der Produktion von gewebeschädigenden hydrolytischen Enzymen ist es Hefepilzen möglich, durch Zellwände in den Körper einzudringen und persistierende systemische Infektionen auszulösen [47; 48; 49; 50].

Bezüglich der Prävalenz von *Candida* im Respirationstrakt von CF-Patienten existieren diverse Studien. *C. albicans* wird mit einer Prävalenz von bis zu 78 % als häufigster Erreger beschrieben, gefolgt von *C. dubliniensis*, *C. glabrata* und *C. parapsilosis* [45; 51; 52; 53]. Die klinische Relevanz ist bis dato noch nicht ausreichend geklärt. Es konnte jedoch belegt werden, dass ein pulmonaler chronischer Befall mit *C. albicans* bei CF-Patienten zu einem signifikanten Abfall der Lungenfunktion sowie erhöhter Hospitalisierungsrate führt [51; 54].

Der Schimmelpilz *A. fumigatus* ist als Sporenbildner ubiquitär in der Umwelt vorhanden. Seine Sporen werden aufgrund des geringen Durchmessers leicht über die Atemwege aufgenommen. Für gesunde Personen ist die Inhalation luftgetragener Schimmelpilzsporen normalerweise nicht gefährlich. Aufgrund der gestörten mukoziliären Clearance bei CF-Patienten wird der Pilz jedoch mit einer Reihe von Atemwegsinfektionen in Verbindung gebracht [55]. Die Sporen fungieren als Träger von Allergenen und können so allergische Reaktionen wie die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) auslösen. Sie kommt bei CF-Patienten mit einer Prävalenz von 3 - 15 % vor und verursacht durch überschießende Entzündungen eine schwere Schädigung des Lungengewebes mit Fibrosierung [55; 56; 57]. Vom Respirationstrakt aus können die Pilzerreger auch hämatogen oder lymphogen disseminieren und dadurch andere Organe befallen. Eine gefürchtete Erkrankung ist die invasive Aspergillose. Ausgehend von der Lunge als primärem Infektionsherd verbreitet sich der Erreger und kann unter anderem Niere, ZNS und Herz befallen [55].

Der Nachweis von *A. fumigatus* bei CF-Patienten variiert stark, reicht bis zu 58 % und ist damit nach *C. albicans* der zweithäufigste isolierte Pilz bei CF-Patienten [45; 52]. Ebenso wie bei *C. albicans* konnte auch bei einem pulmonalen chronischen Befall mit *A. fumigatus* ein signifikanter Abfall der Lungenfunktion mit erhöhter Hospitalisierungsrate nachgewiesen werden [58]. Andere *Aspergillus*-Arten wie *A. flavus*, *A. niger* und *A. terreus* werden weitaus seltener im Respirationstrakt von CF-Patienten nachgewiesen, über ihre klinische Wirkung ist noch wenig bekannt [44].

1.1.4 Diagnostik und Therapie

Eine frühzeitige Diagnosestellung und adäquate Therapie ist für das Überleben von CF-Patienten essentiell. Bei Vorliegen von typischen klinischen Symptomen wie z.B. rezidivierenden pulmonalen Infekten, Mekoniumileus und Dystrophie oder positiver Familienanamnese wird ein Schweißtest als Standarddiagnostik durchgeführt. Dieser misst die Chloridkonzentration im Schweiß und gilt ab einer Konzentration von 60 mmol/l als positiv. Bei nicht eindeutigen Symptomen oder negativem Schweißtest wird eine Komplettanalyse des *CFTR*-Gens beider Allele mit dem Nachweis von CF-verursachenden Mutationen angestrebt [59; 60]. Ein Neugeborenen-Screening auf Mukoviszidose ist in Deutschland seit 2016 bundesweit etabliert. Es beinhaltet als dreistufiges Konzept zunächst eine quantitative Bestimmung des immunreaktiven Trypsins (IRT) im Blut. Bei nicht eindeutig positivem Ergebnis folgt ein Test auf das Pankreatitis-assoziierte Protein (PAP) im Blut mit anschließender DNA-Mutationsanalyse [61].

Die pulmonale Manifestation stellt in 70 - 90 % der Fälle die häufigste Todesursache bei CF-Patienten dar [62; 63]. Bisher standen hauptsächlich rein symptomatische Therapien zur Verfügung. Dabei kommen Sekretolytika, Kochsalzinhalation und Physiotherapie sowie frühzeitige antibiotische Therapien zur Vorbeugung von Atemwegsinfektionen zum Einsatz. Bei zunehmender respiratorischer Insuffizienz kann die Notwendigkeit einer Sauerstoff-Langzeittherapie bis hin zur Lungentransplantation bestehen. Die Forschung beschäftigt sich aktuell hauptsächlich mit mutationsspezifischer Therapie bei CF zur kausalen Behandlung des Gendefekts. Hier werden CFTR-Potentioren und CFTR-Korrektoren voneinander unterschieden. Korrektoren korrigieren die defekte CFTR-Kanalfunktion, während Potentioren die Aktivierung des Chloridionen-Kanals an der Zelloberfläche verstärken, so dass dessen Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht und damit einhergehend der Chloridionentransport verbessert wird [64; 65; 66]. Seit 2012 ist *Ivacaftor* (*Kalydeco*[®]) als mutationsspezifischer CFTR-Potentiator zur Behandlung der Mukoviszidose bei Patienten mit Klasse-III-Mutationen im *CFTR*-Gen zugelassen. In den Folgejahren erweiterte sich dieses Konzept kontinuierlich, auch auf Klasse-IV-

Mutationen. Die auf *Ivacaftor* ansprechende *CFTR*-Mutation muss dabei auf mindestens einem *CFTR*-Allel nachweisbar sein [67]. Der genaue Wirkmechanismus von *Ivacaftor* ist noch nicht bekannt. Es existieren jedoch mehrere Studien über potentielle Bindungsstellen am *CFTR*-Protein [68; 69; 70; 71; 72]. Der gesteigerte Chloridionentransport führt pulmonal zu einer Verflüssigung des zähen Sekrets mit signifikanter Verbesserung der Lungenfunktion [67; 73; 74; 75; 76; 77]. Der Großteil der CF-Patienten trägt die Klasse-II-Mutation $\Delta F508$, bei der ein Fehler in der Prozessierung des *CFTR*-Proteins mit einem vorzeitigen Abbau im endoplasmatischen Retikulum verbunden ist [10; 11; 12]. *Ivacaftor* zeigte hier als Potentiator keine klinische Wirksamkeit [78]. Für Klasse-II-Mutationen sind *CFTR*-Korrektoren erforderlich. Sie verbessern die Konformationsstabilität des *CFTR*-Proteins und ermöglichen so den Transport bis an die Zelloberfläche [64; 79]. *Lumacaftor* wurde als Korrektor der $\Delta F508$ -Mutation identifiziert [80]. Diese Mutation befindet sich in der NBD1 des *CFTR*-Proteins. *Lumacaftor* scheint Wechselwirkungen zwischen der NBD1 und den MSDs zu stabilisieren [81; 82; 83; 84]. Der Wirkstoff zeigte bei homozygoten $\Delta F508$ -Trägern einen Abfall der Chloridkonzentration im Schweiß, konnte jedoch keine signifikante Verbesserung der Lungenfunktion erzielen [85]. Die Mutation $\Delta F508$ führt nicht nur zu einem Fehler in der Prozessierung des *CFTR*-Proteins. Der Teil, der trotz Prozessierungsfehler an die Zelloberfläche gelangt, weist Defekte sowohl in der Kanalfunktion als auch in der Proteinstabilität auf [86; 87]. Dahingehend wurden Studien mit einer Kombination aus *Ivacaftor* und *Lumacaftor* durchgeführt. Bei homozygoten Trägern der $\Delta F508$ -Mutation konnte eine signifikante Verbesserung der Lungenfunktion erreicht werden, sodass die Medikamentenkombination (*Orkambi*[®]) 2015 erfolgreich zugelassen wurde [88; 89; 90]. *Orkambi*[®] zeigte jedoch keine pulmonale Verbesserung bei CF-Patienten mit nur einer Kopie der $\Delta F508$ -Mutation [88; 91]. Zudem induziert *Lumacaftor* den CYP3A4-Metabolismus von *Ivacaftor* und verringert durch diese Wechselwirkung dessen klinische Wirksamkeit [85; 90; 92]. *Tezacaftor* agiert ebenfalls als *CFTR*-Korrektor. Im Gegensatz zu *Lumacaftor* ist der Wirkstoff jedoch kein Induktor von CYP3A4 und hat demzufolge ein reduziertes Potential für

Arzneimittelwechselwirkungen [92; 93]. In Kombination mit *Ivacaftor* konnte bei homozygoten $\Delta F508$ -Trägern eine signifikante Verbesserung der Lungenfunktion nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde über eine bessere Verträglichkeit berichtet [94]. Darüber hinaus zeigte diese Medikamentenkombination auch eine klinische Wirksamkeit bei heterozygoten $\Delta F508$ -Trägern mit einer *CFTR*-Restfunktionsmutation im zweiten Allel, sodass die Kombination von *Ivacaftor* mit *Tezacaftor* (*Symdeko*[®]) seit 2018 zur Behandlung von CF-Patienten ebenfalls zugelassen ist [95; 96; 97]. Für viele heterozygote $\Delta F508$ -Träger mit einer zweiten Mutation, die entweder zu keinem *CFTR*-Protein oder zu einem *CFTR*-Protein führt, welches nicht auf *Ivacaftor* allein oder auf *Symdeko*[®] anspricht, ist 2019 eine neue Kombinationstherapie entwickelt worden [98]. Diese beinhaltet neben dem *CFTR*-Korrektor *Tezacaftor* und dem Potentiator *Ivacaftor* noch *Elexacaftor* als Korrektor der zweiten Generation. Es wurde vermutet, dass die Kombination zweier Korrektoren mit unterschiedlicher Wirkung einen größeren Einfluss auf die Menge des an die Zelloberfläche exprimierten *CFTR*-Proteins haben könnte. *Elexacaftor* und *Tezacaftor* binden an verschiedenen Stellen im *CFTR*-Protein und könnten einen additiven Effekt aufweisen [99; 100]. Mehrere Studien zeigten eine signifikante Verbesserung der Lungenfunktion unter dieser Dreifachtherapie im Vergleich zu *Symdeko*[®], sowohl bei homozygoten als auch heterozygoten $\Delta F508$ -Trägern [99; 101; 102; 103]. Diese Dreifachtherapie (*Trikafta*[®]) kann eine wirksame *CFTR*-Modulatortherapie für mehr als 90 % der CF-Patienten darstellen und wurde 2019 erfolgreich zugelassen [98].

Durch den rasanten Fortschritt der Behandlungsmöglichkeiten und Maßnahmen zur frühzeitigen Diagnosestellung steigt die Lebenserwartung stetig an. Aktuell liegt die durchschnittliche Lebenserwartung von an CF erkrankten Patienten bereits bei über 40 Jahren [6; 104; 105].

1.1.5 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Trotz stetiger Zunahme der durchschnittlichen Lebenserwartung in den letzten Jahrzehnten sind bei der individuellen Überlebensdauer einzelner Patienten nach wie vor starke Unterschiede festzustellen. McKone und Mitarbeiter beschäftigten sich mit Korrelationen zwischen Genotyp und Prognose bei CF-Patienten. Sie konnten darlegen, dass Mutationen der Klassen I - III, welche in der Regel zu einem Funktionsverlust des CFTR-Proteins führen, einen eher schweren Krankheitsverlauf mit erhöhter Mortalitätsrate aufwiesen. Mutationen der Klassen IV – V mit noch erhaltener Restfunktion des CFTR-Proteins zeigten eher mildere Krankheitsverläufe [106; 107].¹ Abgesehen von nachgewiesenen engen Korrelationen zwischen dem *CFTR*-Genotyp und der exokrinen Pankreasinsuffizienz scheint der Verlauf der Erkrankung, vor allem hinsichtlich der Lungenbeteiligung, weniger vom Genotyp abhängig zu sein [108; 109; 110]. In mehreren Studien an Geschwistern und Zwillingen mit gleicher *CFTR*-Mutation konnten Unterschiede bezüglich des Schweregrads der pulmonalen Erkrankung festgestellt werden [111; 112; 113]. Die klinische Varianz kann durch die verschiedenen *CFTR*-Mutationen also nicht vollständig begründet werden, sodass zusätzliche Einflussfaktoren wie exogene Umwelteinflüsse und modifizierende Gene (siehe Abschnitt 1.2) zunehmend Gegenstand der Forschung sind [114; 115].

¹ Die Mutationsklasse VI wurde in diesen Studien nicht berücksichtigt.

1.2 Einfluss von genetischen Modifikatoren und Umwelteinflüssen

Obwohl CF auf einem monogenetischen Defekt beruht, weisen Individuen mit gleicher *CFTR*-Mutation zum Teil erhebliche Unterschiede in der Krankheitsausprägung auf. Zusätzliche genetische Einflüsse, sogenannte modifizierende Gene, und Umweltfaktoren beeinflussen den Verlauf der Erkrankung. Der pulmonale Phänotyp scheint zu über 50 % von modifizierenden Genen abhängig zu sein [113; 114; 115].

Modifizierende Gene entstehen durch Variationen eines Genabschnitts, die die Proteinstruktur und -funktion verändern können. Klassischerweise sind diese Variationen durch Einzelnukleotidpolymorphismen (engl. *single-nucleotide polymorphism*, SNPs) bedingt, einige Polymorphismen können auch die Deletion oder Insertion mehrerer Nukleotide umfassen.

Zur Identifizierung solcher Modifikatoren existieren bereits diverse Studien. Mittlerweile wurde eine Vielzahl von potentiellen Kandidaten mit der CF-Lungenerkrankung in Verbindung gebracht [116]. Darunter zählen beispielsweise genetische Varianten im Mannose-bindenden Lektin (engl. *Mannose-binding lectin*, MBL). Das Gen wurde als eines der ersten potentiellen Modifikatorgene identifiziert und spielt eine Rolle in der angeborenen Immunabwehr. Eine verringerte Expression dieses Gens ist mit einem schwereren Verlauf der CF-Lungenerkrankung assoziiert [117; 118]. Der Transformierende Wachstumsfaktor Beta 1 (engl. *Transforming growth factor beta 1*, TGF β 1) war aufgrund seiner Rolle in Entzündungsprozessen ebenfalls in diversen Studien als Modifikatorgen von großem Interesse. Es zeigte sich, dass eine erhöhte TGF β 1-Expression mit einer vermehrten Entzündung und Fibrose und daraus resultierendem schwereren pulmonalen Krankheitsverlauf einhergeht [119; 120; 121]. Weitere Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- α) [122] und Interleukin-10 (IL-10) [123] wurden ebenfalls als Modifikatoren mit einer schlechteren Lungenfunktion in Verbindung gebracht.

Im Verlauf des technischen Fortschritts wurden genomweite Assoziationsstudien mittels vollständiger Genomsequenzierung durchgeführt [124; 125; 126]. Vorteil dieser Methodik ist die vergleichsweise wesentlich größere Anzahl beteiligter Probanden. In solch einer Studie von Corvol et al. wurden 6365 Patienten aus Frankreich, Kanada und den USA eingeschlossen. Hierbei konnten unter anderem genetische Varianten in MUC 4 und 20 (engl. *Mucin*), SLC9A3 (engl. *Solute carrier family 9 member 3*), HLA (engl. *Human leukocyte antigen*) und AGTR2 (engl. *Angiotensin II receptor type 2*) als modifizierende Gene der CF-Lungenerkrankung identifiziert werden [126].

Abgesehen von genetischen Einflüssen konnten auch andere Faktoren mit dem Schweregrad der CF-Lungenerkrankung in Verbindung gebracht werden. Das Geschlecht scheint eine Rolle zu spielen. Studien zeigten, dass weibliche CF-Patienten einen früheren pulmonalen Befall mit *P. aeruginosa*, einen stärkeren Abfall der Lungenfunktion und ein reduziertes mittleres Überlebensalter im Vergleich zu männlichen CF-Patienten aufweisen [127; 128; 129].

Des Weiteren gibt es Zusammenhänge mit einigen Umwelteinflüssen: der sozioökonomische Status, die Exposition gegenüber Zigarettenrauch und bakterielle Infektionen können zu einem stärkeren Progress der CF-Lungenerkrankung beitragen [130; 131; 132; 133].

Abbildung 4 veranschaulicht den relativen Anteil von möglichen Modifikatoren und Umwelteinflüssen auf verschiedene CF-Erkrankungssymptome.

Über Assoziationen zwischen modifizierenden Genen und der Anfälligkeit für Pilze bei der CF-Lungenerkrankung ist aktuell noch sehr wenig bekannt. Aufgrund der möglichen fungiziden Wirkung von Chitinasen wurden diese als potenzielle Modifikatoren in der vorliegenden Arbeit näher betrachtet (siehe Abschnitt 1.3).

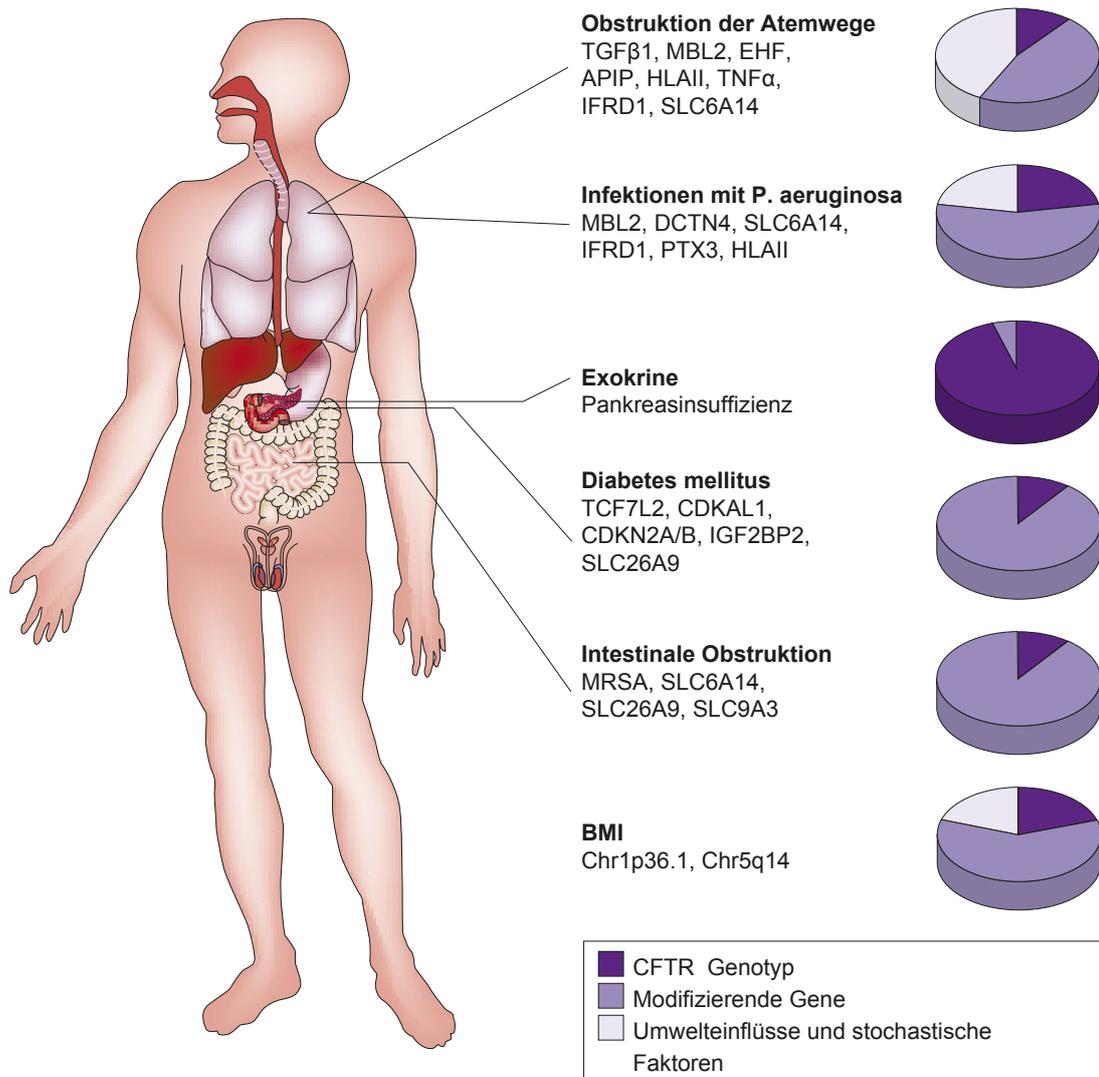


Abb. 4: Anteil möglicher Einflussfaktoren auf CF-Erkrankungen

Genetische Modifikatoren und nicht-genetische Faktoren tragen in unterschiedlichem Ausmaß zur Merkmalsausprägung der CF-Erkrankung bei. Aufgelistet sind einzelne Symptome der CF-Erkrankung mit jeweils darunter stehenden Beispielen möglicher modifizierender Gene. Die Kreisdiagramme stellen die Einflussanteile vom *CFTR*-Genotyp (dunkel-lila), modifizierenden Genen (hell-lila) und nicht-genetischen Faktoren (weiß) auf das jeweilige Symptom dar. Die Abbildung wurde modifiziert nach Cutting 2015 [115].

1.3 Chitinasen

Chitin ist eines der häufigsten natürlich vorkommenden Biopolymere, welches einer Vielzahl von Organismen zur Strukturbildung dient. Das Polysaccharid besteht aus β -1,4-glykosidisch verknüpften N-Acetyl-D-Glucosamin-Einheiten und ist ein wesentlicher Zellwandbestandteil von Pilzen [42]. Außerdem kommt es als Komponente des Exoskeletts vor allem bei Gliederfüßern, wie Insekten, Krebstieren und Tausendfüßern vor [134]. Enzymatisch abgebaut wird Chitin durch hydrolysierende Enzyme, sogenannte Chitinasen. Darüber hinaus gibt es Chitinase-ähnliche Proteine (*chitinase-like protein*, CLP), welche mit Chitin zwar eine Bindung eingehen, jedoch keine enzymatische Aktivität besitzen [135].

Chitinasen und CLPs gehören zur Familie 18 und 19 der Glykosidasen [136; 137]. Die Spaltung der glykosidischen Bindungen erfolgt entweder innerhalb der Chitinkette über Endochitinasen oder von einem Ende des Polymers aus durch Exochitinasen [138] (siehe Abbildung 5).

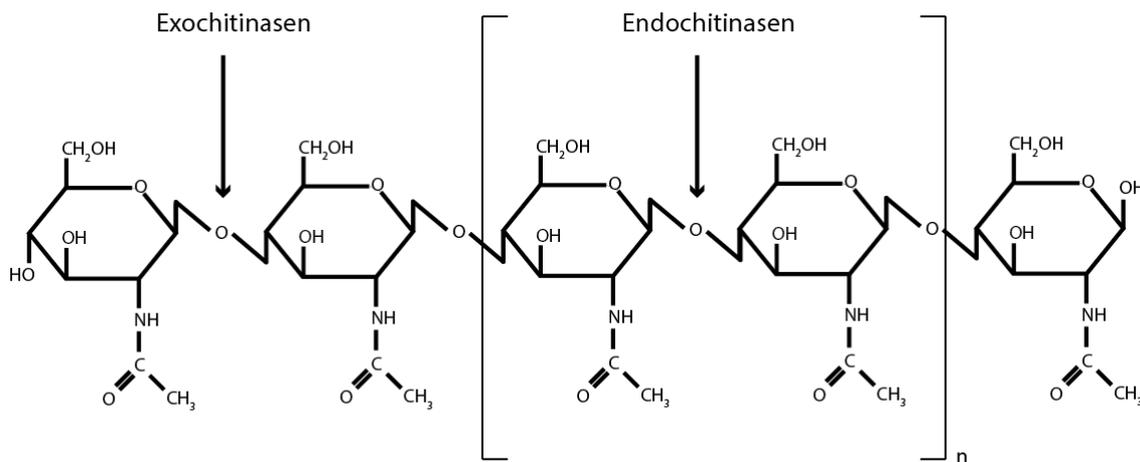


Abb. 5: Darstellung einer Chitinkette mit Spaltungsort der Chitinasen

Exochitinasen spalten Chitin von einem Ende der Kette, wohingegen Endochitinasen innerhalb der Polymerkette spalten.

Diese hydrolysierenden Enzyme sind bei Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren weit verbreitet und dienen unter anderem der Abwehr chitinhaltiger Pathogene. Pflanzen produzieren beispielsweise Chitinasen zum Schutz vor schädlichen Pilzen [139]. Bakterien nutzen Chitin-Abbauprodukte als Energiequelle. Für Pilze wiederum ist der durch Chitinasen katalysierte Abbau des Chitinpolymers wichtig für das eigene Wachstum und die Zellteilung [140; 141; 142; 143].

Obwohl Säugetiere Chitin weder synthetisieren noch metabolisieren können, wurden bereits mehrere chitinolytische Enzyme und Chitin-bindende Proteine in Säugern nachgewiesen. Beim Menschen wurden unter anderem die Chitotriosidase [144; 145] und AMCCase (*Acidic mammalian chitinase*, saure Säugerchitinase) [146] als Chitinasen und YKL-40 als Prototyp der CLPs [147; 148] entdeckt. Studien zeigten auf, dass die Sezernierung dieser Enzyme vor allem in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen stattfindet. Ihnen wird eine Rolle im angeborenen Immunsystem und in Entzündungsprozessen zugeschrieben [149; 150; 151; 152; 153; 154].

1.3.1 Chitotriosidase

Die Chitotriosidase wurde als erste humane Chitinase 1995 von Boot und Mitarbeitern entdeckt [144]. Es existieren zwei Isoformen: ein Protein mit 50 kDa und ein durch dessen proteolytische Prozesse in Phagozyten entstandenes Protein mit 39 kDa. Beide besitzen chitinolytische Aktivität. Das Protein mit 50 kDa stellt jedoch die vorherrschende sekretorische Form im Blutkreislauf dar und fungiert dabei als Endochitinase [145; 155; 156].

Das Enzym wird von Phagozyten sezerniert, welche unter anderem durch immunmodulatorische Zytokine, darunter TNF- α und IFN γ , und chitinhaltige Pathogene aktiviert werden [149; 157; 158; 159].

So konnte die Chitotriosidase bereits mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden und stellt für einige auch einen potentiellen diagnostischen und prognostischen Marker dar. Die größte Bedeutung wurde ihr bei Morbus Gaucher zuteil, einer angeborenen lysosomalen

Speicherkrankheit. Bei dieser Erkrankung kommt es durch einen Enzymdefekt zur lysosomalen Glykolipidakkumulation in Gewebsmakrophagen, welche dadurch chronisch aktiviert werden. Sekundär erhöht sich die Chitotriosidase-Sekretion, deren Höhe mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert. Behandelt wird Morbus Gaucher mit einer Enzymersatztherapie, wobei die Chitotriosidase-Aktivität zur Kontrolle des Therapieerfolgs herangezogen wird [160; 161]. Anschließend wurden auch bei anderen Erkrankungen, die mit entzündlicher Aktivität und Makrophagenaktivierung im Zusammenhang stehen, signifikante Zunahmen der Chitotriosidase-Aktivität nachgewiesen. Darunter zählen beispielsweise die β -Thalassämie, Arteriosklerose und Multiple Sklerose [162; 163; 164].

Des Weiteren konnten erhöhte Chitinase-Aktivitäten im durch BAL (bronchoalveoläre Lavage) gewonnenen Sekret von Patienten mit Sarkoidose, Lungenfibrose, COPD und Asthma festgestellt werden [165; 166; 167; 168; 169]. Seibold und Kollegen demonstrierten schließlich 2008, dass beim Menschen die Chitotriosidase als vorherrschend aktive Chitinase in den Luftwegen exprimiert wird [170].

Bezüglich der Enzymfunktion ist aktuell noch wenig bekannt. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise für eine fungizide Wirkung [171]. Im Blut von Meerschweinchen konnten nach systemischen Infektionen mit *A. fumigatus* erhöhte Chitinase-Aktivitäten gemessen werden [172]. Vandevenne und Kollegen bewiesen *in vitro* eine antimykotische Aktivität der Chitotriosidase gegenüber *C. albicans* [173]. Darüber hinaus konnte eine *in vitro* Studie zeigen, dass rekombinante Chitotriosidase künstliches Chitin hydrolysiert und damit das Pilzwachstum hemmt [146]. In einem vergleichbaren *in vivo* Experiment an neutropenen Mäusen mit systemischen Mykosen konnte deren Überlebenswahrscheinlichkeit durch Injektion von rekombinanter Chitotriosidase gesteigert werden [149].

Das für die Chitotriosidase kodierende Gen *CHIT1* befindet sich auf Chromosom 1q31-q32. Der Genomabschnitt besteht aus 12 Exons und umspannt etwa 20 kb genomische DNA [156; 174]. Forscher entdeckten im *CHIT1*-Gen eine 24-bp-Duplikation im Exon 10 (rs3831317). Durch fehlerhaftes Spleißen resultiert eine Produktion von funktionsunfähigem Protein, welches mit einem Mangel an enzymatischer Aktivität assoziiert ist [174]. Bei homozygoten Polymorphismus-Trägern führt dies zum kompletten, bei heterozygoten Trägern zum inkompletten Verlust der Chitinase-Aktivität [170]. In der kaukasischen Bevölkerung weisen etwa 6 % eine Homozygotie und 35 % eine Heterozygotie für die 24-bp-Duplikation auf [174; 175; 176; 177; 178]. Dieser Enzymmangel scheint keinen unmittelbaren Krankheitswert zu besitzen. Es wird jedoch vermutet, dass Individuen mit genetischem *CHIT1*-Polymorphismus eine erhöhte Anfälligkeit für Chitin-haltige Pathogene aufweisen.

In einer Fallstudie von Vicencio und Kollegen an sechs Kindern mit schwerem Asthma und fungaler Sensibilisierung (SAFS, *severe asthma and fungal sensitization*) wiesen alle Patienten eine Heterozygotie bezüglich der 24-bp-Duplikation auf. Die Forscher stellten damit die Hypothese auf, der Polymorphismus sei ein Risikofaktor für die Entstehung von SAFS und anderen ähnlichen Erkrankungen [179]. Im Gegensatz dazu existieren auch mehrere Studien, welche diese Hypothese nicht bestätigen konnten [180; 181]. Livnat und Mitarbeiter untersuchten vor kurzem CF-Patienten hinsichtlich der Prädisposition für ABPA und *A. fumigatus*-Kolonisation in Bezug auf den *CHIT1*-Polymorphismus. Sie konnten dabei keinen signifikanten Zusammenhang feststellen [182].

Es wurden auch andere Polymorphismen im *CHIT1*-Gen entdeckt, darunter G354R und A442V. Diese scheinen jedoch nur mit einer leichten bis mäßigen Abnahme der Chitinase-Aktivität assoziiert zu sein [183].

1.3.2 AMCase

Die AMCase ist ein 50 kDa schweres Protein, welches eine 39 kDa N-terminale katalytische Domäne zur Hydrolyse von Chitin enthält [146]. Das Enzym fungiert als Exochitinase [184] mit einer chitinolytischen Aktivität bei einem pH-Optimum von 2, woraus auch der Name „saure Säugerchitinase“ resultierte [146]. Das für die AMCase kodierende Gen *CHIA* (*Chitinase, Acidic*) befindet sich auf Chromosom 1p13.1-21.3, besteht aus insgesamt 12 Exons und kodiert mehrere Spleiß-Isoformen [185]. Das Enzym wird durch Epithelzellen und Makrophagen im Gastrointestinaltrakt und der Lunge sezerniert [186; 187]. Eine Überproduktion wurde mit der angeborenen Immunantwort, speziell der Th2-Entzündung (T-Helferzellen vom Typ 2) in Verbindung gebracht.

Zhu und Mitarbeiter konnten an Maus-Modellen einen Zusammenhang zwischen der AMCase-Expression und allergischem Asthma demonstrieren. Dafür wurden Mäuse zur Allergenprovokation gegenüber Ovalbumin exponiert. Die Exposition führte zur Ausbildung charakteristischer Asthma-Merkmale wie Th2-gesteuerter allergischer Entzündung und Eosinophilie. Damit einhergehend zeigte sich eine Th2-spezifische, IL-13-vermittelte AMCase-Expression in pulmonalen Epithelzellen und Makrophagen. Parallel konnten in der Studie auch vermehrte AMCase-Expressionen bei Patienten mit bronchialem Asthma nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten Zhu und Kollegen zeigen, dass die Inhibierung der AMCase-Aktivität durch Zugabe von Allosamidin, einem Chitinase-Inhibitor, zu einer signifikanten Abnahme der Inflammation, Gewebseosinophilie und Lymphozytenakkumulation führt. Sie stellten damit die Hypothese auf, AMCase könne ein wichtiger Vermittler von IL-13-vermittelten Reaktionen bei Th2-dominanten Störungen wie Asthma sein [188].

Es existieren noch diverse weitere Studien, welche erhöhte AMCase-Expressionen mit Asthma in Verbindung bringen konnten [150; 189; 190].

Auch in anderen inflammatorischen Erkrankungen konnten erhöhte AMCCase-Expressionen beobachtet werden, darunter die chronische Rhinosinusitis [191] und allergische Konjunktivitis [192; 193].

Aufgrund der chitinolytischen Aktivität und der Annahme fungizider Wirkungen beschäftigten sich Forscher mit Zusammenhängen zwischen AMCCase und Chitin-haltigen Pathogenen. Chen und Mitarbeiter demonstrierten 2009 als eine der ersten, dass AMCCase das Wachstum von *C. albicans*, *A. fumigatus* und *Trichophyton rubrum in vitro* signifikant hemmt [194]. Weitere Studien an Asthma-induzierten Maus-Modellen konnten ebenfalls aufzeigen, dass ein Vorkommen von Chitin bzw. Chitin-haltigen Pathogenen, darunter Hausstaubmilben, mit einer verstärkten AMCCase-Expression einhergeht [190; 195]. Diese Erkenntnisse lassen auf ein antifungales Potential schließen.

In dieser Arbeit wurden die SNPs rs61756687 und rs3818822 im *CHIA*-Gen beleuchtet.

Der SNP rs61756687 im *CHIA*-Gen befindet sich im Exon 5. Ein Basenaustausch von Adenin (A) zu Guanin (G) führt im Protein zu einem Aminosäureaustausch von Lysin (K) zu Arginin (R) [196; 197]. In der Normalbevölkerung sind Häufigkeitsverteilungen um AA 75 %, AG 23 % und GG 2 % angegeben [197; 198; 199; 200].

Der SNP rs3818822 im *CHIA*-Gen befindet sich im Exon 4. Ein Basenaustausch von Guanin (G) zu Adenin (A) führt im Protein zu einem Aminosäureaustausch von Glycin (G) zu Arginin (R) [197; 201]. In der Normalbevölkerung sind Häufigkeitsverteilungen um AA 2 %, AG 26 % und GG 71 % angegeben [197; 199; 202].

Bierbaum und Mitarbeiter gingen in einer Studie mit 322 an Asthma erkrankten Kindern verschiedenen genetischen Varianten der AMCase auf den Grund. Dabei zeigten sich sowohl für den SNP *CHIA* rs61756687 als auch für den SNP *CHIA* rs3818822 signifikante Assoziationen mit kindlichem Asthma [197]. Auniddin und Mitarbeiter analysierten genetische Chitinase-Varianten im Zusammenhang mit der Erkrankung COPD. Diese Studie konnte für den SNP *CHIA* rs3818822 eine signifikante Korrelation zwischen Genotyp und Lungenfunktion als auch der gemessenen Chitinaseaktivität nachweisen [203]. Wu und Kollegen untersuchten an 395 Asthmatikern Chitin-haltige Pathogene, hier Hausstaubmilben im eigenen Haushalt, bezüglich ihres Effekts auf die Expression genetischer Varianten der AMCase. Hierbei konnten keine signifikanten Assoziationen zwischen Pilzexposition und der Expression des SNPs *CHIA* rs3818822 festgestellt werden [204].

1.4 Fragestellungen und Zielsetzung der Studie

Die vergangene Forschung deutet auf einen Zusammenhang zwischen Chitinasen und inflammatorischen Erkrankungen hin. Nach aktuellem Kenntnisstand existieren wenige Studien mit CF-Patienten über eine Assoziation von Modifikatorgenen und der pulmonalen Anfälligkeit gegenüber Pilzen.

Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit folgenden Fragestellungen:

- a) Können Polymorphismen in Chitinasegenen bei CF-Patienten mit einem pulmonalen Befall durch fungale Erreger in Verbindung gebracht werden?
- b) Gibt es Assoziationen zwischen den Polymorphismen und der Lungenfunktion?

Dabei wurden für das *CHIT1*-Gen die 24-bp-Duplikation (rs3831317) und für das *CHIA*-Gen die SNPs rs61756687 und rs3818822 als Polymorphismen näher betrachtet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenproben zur Genotypisierung

Die für die hier durchgeführte Studie verwendete CF-Patienten-Kohorte besteht aus DNA-Proben von Probanden der CF-Zentren Tübingen, München und Graz. Diese wurde in der Publikation von Hector et al. 2016 genauer beschrieben [205]. Insgesamt wurden 528 Proben von an CF erkrankten Patienten analysiert. 108 Proben stammten dabei aus der Ambulanz der klinischen Abteilung für pädiatrische Pulmonologie und Allergologie der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz, welche als Vollblutproben bereitgestellt wurden. 311 DNA-Proben wurden von der Christiane-Herzog-Ambulanz für Mukoviszidose und Cystische Fibrose des Dr. von Haunersches Kinderspital der Universität München zur Verfügung gestellt. 109 DNA-Proben stammten von der Mukoviszidose-Ambulanz der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen.

Alle Patienten erhielten eine ausführliche Aufklärung über die Verwendung der von ihnen bereitgestellten Proben sowie die Erfassung klinischer Daten im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen. Eine Einverständniserklärung wurde von allen Teilnehmern selbst oder im Falle von Minderjährigen von deren Eltern eingeholt. Die Ethik-Kommission der Universitätsklinik Tübingen erteilte nach eingehender Prüfung die Genehmigung unter der Projekt-Nummer: 501/2015BO2.

2.1.2 Patientendaten

Neben der Gewinnung von Probenmaterial zur Genotypisierung wurden relevante Patientendaten wie Alter, Geschlecht und die zugrundeliegenden *CFTR*-Mutationen erfasst. Darüber hinaus wurden über einen Untersuchungszeitraum von mehreren Jahren klinische Parameter wie BMI, pulmonaler Erregerbefall und Lungenfunktionsparameter erhoben. Dabei lag der Erhebungszeitraum der Patienten der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz zwischen 2012 und 2013, des Dr. von Haunersches Kinderspital der Universität München zwischen 2008 und 2010 und der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen zwischen 2010 und 2013.

Mikrobiologische Befunde

Für die Erhebung des pulmonalen Erregerspektrums wurden von den Patienten regelmäßig Sputumproben bzw. tiefe Rachenabstriche entnommen. In den spezialisierten Instituten der verschiedenen Kliniken wurde das Vorkommen von Pilzen und Bakterien darin analysiert.

Zur besseren Beurteilung und Vergleichbarkeit des Kolonisationsstatus wurde der Erregerbefall in vier Gruppen eingeteilt. Dies erfolgte in Anlehnung an die Einteilung von Chotirmall et al. [51], welche in Tabelle 2 aufgeführt ist.

Tabelle 2: Einteilung des fungalen und bakteriellen Kolonisationsstatus

Gruppe	Befall	Positive Befunde
3	chronisch	> 50 %
2	intermittierend	35 - 50 %
1	selten	< 35 %
0	nie	0%

Die Einteilung des Kolonisationsstatus der Patienten in vier Gruppen ist abhängig von der Häufigkeit der positiven Befunde und bezieht sich auf alle mikrobiologischen Befunde innerhalb von 12 Monaten.

Lungenfunktion

Mittels Spirometrie wurde die Lungenfunktion eines jeden Patienten regelmäßig ermittelt. Die Spirometrie ist ein gängiges Verfahren im Rahmen der Lungenfunktionsdiagnostik zur Messung von statischen und dynamischen Atemvolumina und dient der Beurteilung der Lungenfunktion. Ein wichtiger Lungenfunktionsparameter bei CF-Patienten ist die expiratorische Einsekundenkapazität (FEV_1). Das FEV_1 zählt zu den dynamischen Atemvolumina und stellt das Volumen dar, welches der Patient nach maximaler Inspiration innerhalb einer Sekunde forciert ausatmen kann. Bei CF-Patienten gilt dieser Wert als ein wesentliches prognostisches Kriterium [206].

Bei jeder Lungenfunktionsuntersuchung wurde jeweils das beste Resultat von drei Messversuchen ausgewählt und dokumentiert. Die Ergebnisse des FEV_1 erschienen dabei in Prozent des Vorhersagewertes (% IST zu SOLL), basierend auf Referenzwerten der gesunden Bevölkerung.

Zusätzlich wurde der Slope anhand der FEV_1 -Werte bestimmt. Der Slope stellt die durchschnittliche Veränderung des FEV_1 -Wertes pro Jahr dar und wurde berechnet, wenn Daten von zwei oder mehr konsekutiven Jahren existierten.

2.1.3 Geräte

Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Gefrierschrank	-20 °C	Liebherr
Geldokumentationssystem	Odyssey® Fc	Li-Cor® Biosciences GmbH
Gelkammer	PerfectBlue™ 40-1214	Peqlab Biotechnologie GmbH
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf AG
Kühlschrank	+4 °C	Kirsch
Magnetrührer	Agitateur magnétique chauffant 10515	Thermo Fisher Scientific
Mikrowelle	MW 311 Perfect	De'Longhi
PCR-Cycler	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
Pipetten	0,5 – 10 µl	Abimed GmbH
Pipetten	10 – 100 µl	Gilson
Pipetten	100 – 1000 µl	Abimed GmbH
Plattformschüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Präzisionswaage	EMB 1200-1	Kern und Sohn GmbH
Spannungsgerät	PowerPac 1000	Bio-Rad Laboratories GmbH
Spektralphotometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank	HERAsafe	Heraeus Holding GmbH
Vortexer	MS1 Minishaker	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Zentrifuge	Mikro 22 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
Zentrifuge	Rotixa 50 RS	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
Zentrifuge	Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH & Co. KG

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Liste der Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
<i>Biosphere® Filter Tips (10 µl, 100 µl, 1000 µl)</i>	Sarstedt AG & Co. KG
<i>PCR Tubes Multiply®-Pro 0,2 ml</i>	Sarstedt AG & Co. KG
<i>Polypropylen Tubes (50 ml)</i>	Greiner Bio-One GmbH
<i>Premium Tips (10 µl, 100 µl, 1000 µl)</i>	Biozym Scientific GmbH
<i>Safe-Lock Tubes (1,5 ml / 2,0 ml)</i>	Eppendorf AG

2.1.5 Reagenzien und Kits

Tabelle 5: Liste der Reagenzien und Kits

Reagenz	Hersteller
<i>BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10x)</i>	Invitrogen
<i>CutSmart® Buffer (10x)</i>	New England BioLabs® GmbH
<i>DNA Ladder 25 bp; 100 bp</i>	Invitrogen
Ethanol	AppliChem GmbH
<i>GelRed Nucleic Acid Stain, 10.000x in water</i>	Biotium
<i>GoTaq® Colorless Master Mix</i>	Promega
<i>GoTaq® Green Master Mix</i>	Promega
<i>NEBuffer 3.1 (10x)</i>	New England BioLabs® GmbH
Nuklease-freies Wasser	Promega
<i>Purified BSA (100x) 10 mg/ml</i>	New England BioLabs® GmbH
<i>QIAamp DNA Blood Mini Kit</i>	Qiagen
<i>Rotiphorese® TBE-Puffer (10x)</i>	Carl Roth GmbH und Co. KG
<i>SeaKem® LE Agarose</i>	Lonza

2.1.6 Primer und Restriktionsenzyme

Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der Sequenzen verwendeter Primer. Diese wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Lediglich der aufgereinigte Primer *CHIA* rs3818822 forward wurde aufgrund des speziellen Designs von der Firma biomers.net GmbH hergestellt.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Primer

SNP	Primer	Sequenz (5' - 3')
<i>CHIT1</i> rs3831317	forward	AGCTATCTGAAGCAGAAG
	reverse	GGAGAAGCCGGCAAAGTC
<i>CHIA</i> rs61756687	forward	GTCTCACCCCTGCCTTCTTTG
	reverse	ACCCAATTCTCCTCGGAAAG
<i>CHIA</i> rs3818822	forward	CCATTGGAGGCTGGA ACTCC
	reverse	CCCCAAATGTCCACCAAAT

Die Restriktionsenzyme *ApoI* und *HpaII* wurden von der Firma New England BioLabs® GmbH bezogen. Tabelle 7 zeigt eine Übersicht der Erkennungssequenzen und Schnittstellen.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Restriktionsenzyme

Restriktionsendonuklease	Erkennungssequenz
<i>ApoI</i>	(5'... R [▼] AATTY ... 3')
	(3'... YTTAA [▼] R ... 5')
<i>HpaII</i>	(5'... C [▼] CGG ... 3')
	(3'... GGC [▼] C ... 5')

▼ = Schnittstelle, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, R = Purin-Base, Y = Pyrimidin-Base

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung

Zur Isolierung der DNA aus Patientenvollblut wurde das *QIAamp DNA Blood Mini Kit* von der Firma Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll.

Zunächst wurden 200 µl Vollblut, 20 µl *Qiagen Protease* und 200 µl *Buffer AL* in ein 1,5 ml *Eppendorf-Tube* gegeben und für 15 Sekunden auf dem Vortex gemischt. Anschließend inkubierte die Probe für zehn Minuten bei 56 °C im Heizblock. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol wurde die Probe erneut gemischt und zentrifugiert. Um die DNA an eine Membran zu binden, wurde das Gemisch in eine *QIAamp Mini Spin* Säule mit 2 ml *Collection-Tube* überführt und für eine Minute bei 22 °C und 6000x g zentrifugiert. Die mit aufgefangener DNA gefüllte Säule wurde in ein neues *Collection-Tube* überführt, der gefilterte Rest verworfen. Zur ersten Waschung der DNA wurden der Probe 500 µl *Buffer AW1* zugefügt und diese für eine Minute bei 22 °C und 6000x g zentrifugiert. Die Säule, wiederum in einem neuen *Collection-Tube*, wurde für die zweite Waschung mit 500 µl *Buffer AW2* gefüllt und für weitere drei Minuten bei 22 °C und 20000x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe in einem neuen *Collection-Tube* für eine Minute trocken zentrifugiert, um alle Reste des Puffers aus der Membran zu lösen. Am Ende wurde die in der *QIAamp Mini Spin* Säule befindliche DNA mit 50 µl nukleasefreiem Wasser von der Membran gelöst und in einem 1,5 ml *Eppendorf-Tube* für eine Minute bei 6000x g zentrifugiert. So wurden von jeder Probe 50 µl DNA extrahiert. Zur direkten Weiterverarbeitung erfolgte die kurzzeitige Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank. Ansonsten wurden alle Proben bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.2 Quantifizierung der extrahierten DNA

Alle Proben, bei denen die DNA-Extrahierung eigenständig durchgeführt wurde sowie bei allen Proben der Universitätsklinik Tübingen erfolgte die Messung von DNA-Konzentration und Bestimmung des Reinheitsgrades mithilfe eines NanoDrop Spektralphotometers. Dieses kann das Absorptionsspektrum über einen Wellenlängenbereich von 190 - 840 nm messen.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte die Messung anhand der Extinktion der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dies entspricht dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Nach der Messung wurde die Konzentration automatisch durch das Gerät berechnet und in ng/µl ausgegeben. Um den Reinheitsgrad der Proben zu bestimmen, wurde neben der oben beschriebenen Messung die Extinktion auch bei 280 nm gemessen. Dies entspricht dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Das Gerät errechnet den Absorptionskoeffizienten anhand des Verhältnisses der Extinktion von 260 nm zu 280 nm. Reine DNA zeigt ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0, wohingegen Werte < 1,8 auf eine Proteinverunreinigung deuten. Vor der Messung wurde das Spektralphotometer zunächst mit nukleasefreiem Wasser kalibriert. Für die eigentliche Messung wurde 1 µl unverdünnte DNA-Probe analysiert.

2.2.3 Genotypisierung der Polymorphismen

Für die Ermittlung der Genotypen wurde zunächst das bekannte, den Polymorphismus tragende DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert. Im Falle der SNPs rs61756687 und rs3818822 im *CHIA*-Gen wurden die amplifizierten DNA-Fragmente anschließend mit der spezifischen Restriktionsendonuklease *ApoI* (rs61756687) bzw. *HpaII* (rs3818822) versetzt. Es folgte die Gelelektrophorese in 2%igem Agarosegel. Die Banden wurden zum Abschluss mithilfe eines Geldokumentationssystems sichtbar gemacht und ausgewertet. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte zunächst allgemein dargestellt und anschließend die spezifischen Durchführungen der einzelnen Genotypisierungen dargelegt.

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR, welches der Biochemiker K. Mullis im Jahre 1983 entwickelte, besteht aus der Amplifizierung bekannter DNA-Abschnitte mittels spezifischer Primer und einer *Taq-Polymerase* [207]. Die Amplifizierung erfolgt bei der konventionellen PCR in mehreren temperaturregulierten Zyklen. Ein Zyklus besteht dabei aus drei Teilschritten. Zunächst wird die DNA mittels Hitze denaturiert. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen, welche den DNA-Doppelstrang zusammenhalten, aufgebrochen. Im nächsten Schritt erfolgt die Primeranlagerung (Annealing) an die DNA-Zielsequenz. Primer sind synthetisierte Oligonukleotide, die spezifisch komplementär an die Einzelstrang-DNA binden und so den Startpunkt der Amplifizierung festlegen. In einem letzten Schritt erfolgt die Amplifizierung (Elongation) durch Anlagerung von freien Nukleotiden mithilfe der thermostabilen DNA-Polymerase. Diese katalysiert die Neusynthese des DNA-Strangabschnitts beginnend am 3'-Ende des angelagerten Primers. Durch Wiederholung der Zyklen erreicht man eine exponentielle Amplifizierung des DNA-Fragments. Im Anschluss an die Amplifizierungszyklen werden in der finalen Elongationsphase noch alle begonnenen Elongationen beendet.

Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, welche bestimmte DNA-Abschnitte anhand ihrer Basenabfolge erkennen und innerhalb dieser schneiden können. Die dadurch entstehenden DNA-Fragmente (Restriktionsfragmente) lassen sich mithilfe der Gelelektrophorese anhand ihrer Längen auftrennen. Bei SNPs führt die veränderte Basenabfolge zu einem Verlust der Bindungsstelle der spezifisch für diesen Abschnitt hergestellten Endonuklease. Dadurch werden die DNA-Fragmente an dieser Stelle nicht geschnitten. Somit ergeben sich längere DNA-Fragmente bzw. abweichende Banden im Agarosegel. In dieser Arbeit wurden die Restriktionsendonukleasen *ApoI* und *HpaII* verwendet, die spezifischen Erkennungssequenzen sind in Tabelle 7 dargestellt.

Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Molekülen anhand ihres Molekulargewichts und der elektrischen Ladung. DNA-Fragmente können so nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes, der mit DNA interkaliert, können die entstandenen charakteristischen Banden anschließend unter UV-Licht ausgewertet werden.

In allen Versuchen wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet. Hierfür wurden 2 g *SeaKem[®] LE Agarose* mit 10 ml *Rotiphorese[®] TBE-Puffer (10x)* und 90 ml H₂O durch einen Magnetrührer vermischt und durch dreiminütiges Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Anschließend wurde das Gel mit 10 µl *GelRed Nucleic Acid Stain* versetzt und in eine vorbereitete Gelkammer gefüllt. Nach der Aushärtung des Agarosegels wurde die gesamte Gelapparatur mit *TBE-Puffer (1x)* aufgefüllt. Zum Beladen der Geltaschen wurden 9 µl Probe mit 1 µl *BlueJuice[™] Gel Loading Buffer* versetzt. Für die genauere Bestimmung der PCR-Produktlängen wurde als Referenz parallel eine 25 bp- bzw. 100 bp-DNA-Leiter aufgetragen. Eine DNA-Leiter ist ein Gemisch von DNA-Strängen bekannter unterschiedlicher Längen, welche als Größenmarker zur Abschätzung von DNA-Fragmentlängen dient. Die Proben liefen etwa 90 Minuten bei einer elektrischen Spannung von 100 V. Anschließend wurden die Banden mittels des Geldokumentationssystems *Odyssey[®] Fc* ausgewertet.

2.2.4 Durchführung der Genotypisierung von *CHIT1* rs3831317

Die PCR mit zugehörigen Primern wurde nach folgendem Schema pipettiert und unter nachstehenden Bedingungen durchgeführt. Dabei wurden die Primer nach dem Protokoll von Boot et al. [174] gewählt.

Tabelle 8: PCR-Reaktionsgemisch von *CHIT1* rs3831317

Reagenz	Volumen	Konzentration
<i>GoTaq[®] Green Master Mix</i>	12,5 µl	1x
<i>Primer forward</i>	1,0 µl	0,2 µM
<i>Primer reverse</i>	1,0 µl	0,2 µM
DNA	1,0 µl	10 ng
H ₂ O (Nuklease-frei)	9,5 µl	-

Tabelle 9: PCR-Bedingungen bei *CHIT1* rs3831317

Schritt	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	30 s
Annealing	57 °C	30 s
Elongation	72 °C	20 s
finale Elongation	72 °C	5 min
Kühlung	4 °C	

Mittels Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte anschließend nach ihrer Größe aufgetrennt und ausgewertet.

Zur Veranschaulichung des Designs der Primer und der 24-bp-Duplikation ist in Abbildung 6 der zugehörige Genomausschnitt dargestellt.

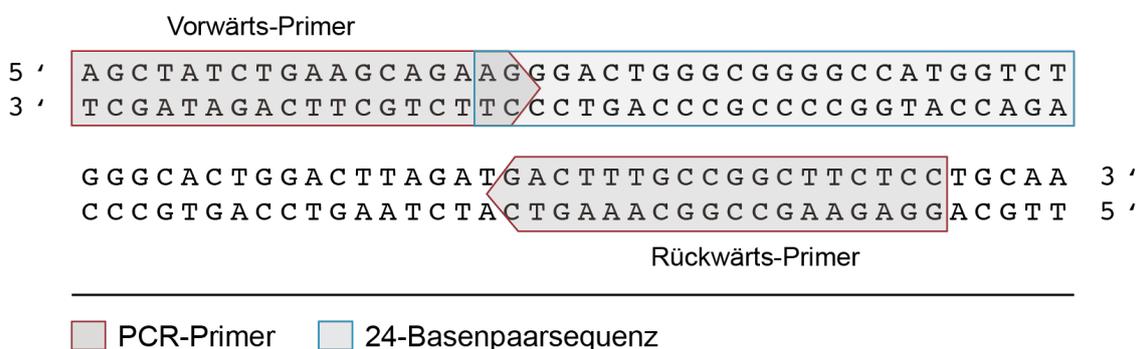


Abb. 6: Ausschnitt aus der Genomsequenz *CHIT1* rs3831317

Die roten Markierungen zeigen die Bereiche, in denen die beiden Primer binden. Die blaue Markierung umfasst die 24-Basenpaarsequenz, welche als Polymorphismus dupliziert ist.

2.2.5 Durchführung der Genotypisierung von *CHIA* rs61756687

Der SNP rs61756687 im *CHIA*-Gen wurde nach untenstehendem PCR-Schema analysiert. Dabei wurden sowohl die Primer als auch das Restriktionsenzym *ApoI* nach dem Protokoll von Bierbaum et al. [197] gewählt.

Tabelle 10: PCR-Reaktionsgemisch von *CHIA* rs61756687

Reagenz	Volumen	Konzentration
<i>GoTaq</i> [®] <i>Colorless Master Mix</i>	12,5 µl	1x
<i>Primer forward</i>	1,5 µl	0,3 µM
<i>Primer reverse</i>	1,5 µl	0,3 µM
DNA	1,0 µl	10 ng
H ₂ O (Nuklease-frei)	8,5 µl	-

Tabelle 11: PCR-Bedingungen bei *CHIA* rs61756687

Schritt	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	30 s
Annealing	35 x 56 °C	30 s
Elongation	72 °C	30 s
finale Elongation	72 °C	5 min
Kühlung	4 °C	

Für die Ermittlung des SNPs wurde das amplifizierte DNA-Produkt anschließend mit der Restriktionsendonuklease *ApoI* versetzt.

Tabelle 12: Reaktionsansatz des Verdaus durch *ApoI*

Reagenz	Volumen	Konzentration
PCR-Produkt	8,4 µl	-
<i>NEBuffer</i> 3.1	1,0 µl	1x
<i>BSA</i>	0,1 µl	1x
<i>ApoI</i>	0,5 µl	5 U

Das Gemisch wurde bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert.

Mittels Gelelektrophorese wurden die verdauten PCR-Produkte anschließend nach ihrer Größe aufgetrennt und ausgewertet.

Zur Veranschaulichung des Designs der Primer, der Schnittstelle des Enzyms *ApoI* und des Basenaustauschs von Adenin (A) zu Guanin (G) ist in Abbildung 7 der zugehörige Genomausschnitt dargestellt.

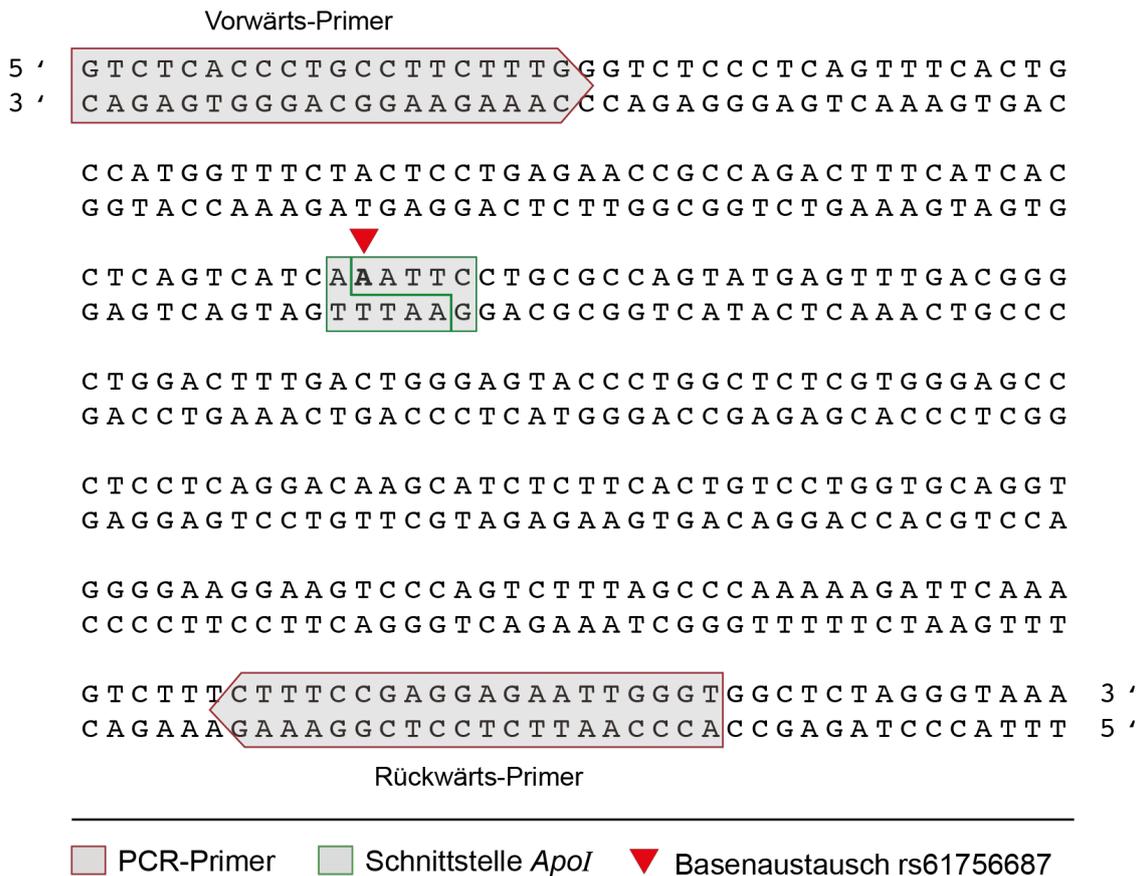


Abb. 7: Ausschnitt aus der Genomsequenz *CHIA* rs61756687

Die roten Markierungen zeigen die Bereiche, in denen die Primer binden. Die grüne Markierung veranschaulicht die SNP-Stelle mit Darstellung der Restriktionsschnittstelle des Enzyms *ApoI*. Der rote Pfeil kennzeichnet die Stelle des Basenaustauschs.

2.2.6 Durchführung der Genotypisierung von *CHIA* rs3818822

Der SNP rs3818822 im *CHIA*-Gen wurde nach untenstehendem PCR-Schema analysiert. Dabei wurden sowohl die Primer als auch das Restriktionsenzym *HpaII* nach dem Protokoll von Bierbaum et al. [197] gewählt.

Tabelle 13: PCR-Reaktionsgemisch von *CHIA* rs3818822

Reagenz	Volumen	Konzentration
<i>GoTaq</i> [®] <i>Colorless Master Mix</i>	12,5 µl	1x
<i>Primer forward</i>	1,0 µl	0,2 µM
<i>Primer reverse</i>	1,0 µl	0,2 µM
DNA	1,0 µl	10 ng
H ₂ O (Nuklease-frei)	9,5 µl	-

Tabelle 14: PCR-Bedingungen bei *CHIA* rs3818822

Schritt	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	30 s
Annealing	33 x 58 °C	15 s
Elongation	72 °C	30 s
finale Elongation	72 °C	5 min
Kühlung	4 °C	

Für die Ermittlung des SNPs wurde das amplifizierte DNA-Produkt anschließend mit der Restriktionsendonuklease *HpaII* versetzt.

Tabelle 15: Reaktionsansatz des Verdaus durch *HpaII*

Reagenz	Volumen	Konzentration
PCR-Produkt	8,5 µl	-
<i>CutSmart</i> [®] <i>Buffer</i>	1,0 µl	1x
<i>HpaII</i>	0,5 µl	5 U

Der Ansatz inkubierte bei 37 °C über Nacht. Mittels Gelelektrophorese wurden die verdauten PCR-Produkte anschließend nach ihrer Größe aufgetrennt und ausgewertet.

Der zugehörige Genomausschnitt zur Veranschaulichung des Designs der Primer, der Schnittstelle des Enzyms *HpaII* und des Basenaustauschs von Guanin (G) zu Adenin (A) ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Schnittstelle des Enzyms *HpaII* befindet sich direkt am 3'-Ende der Sequenz des Primers *CHIA* rs3818822 *forward*. Dafür wurde diese Primersequenz verändert. Die eigentliche Base Thymin (T) wurde durch die Base Cytosin (C) ersetzt, um hier die Schnittstelle des Restriktionsenzym *HpaII* einfügen zu können. Dies ist in der Abbildung mit einem roten Kreis gekennzeichnet.

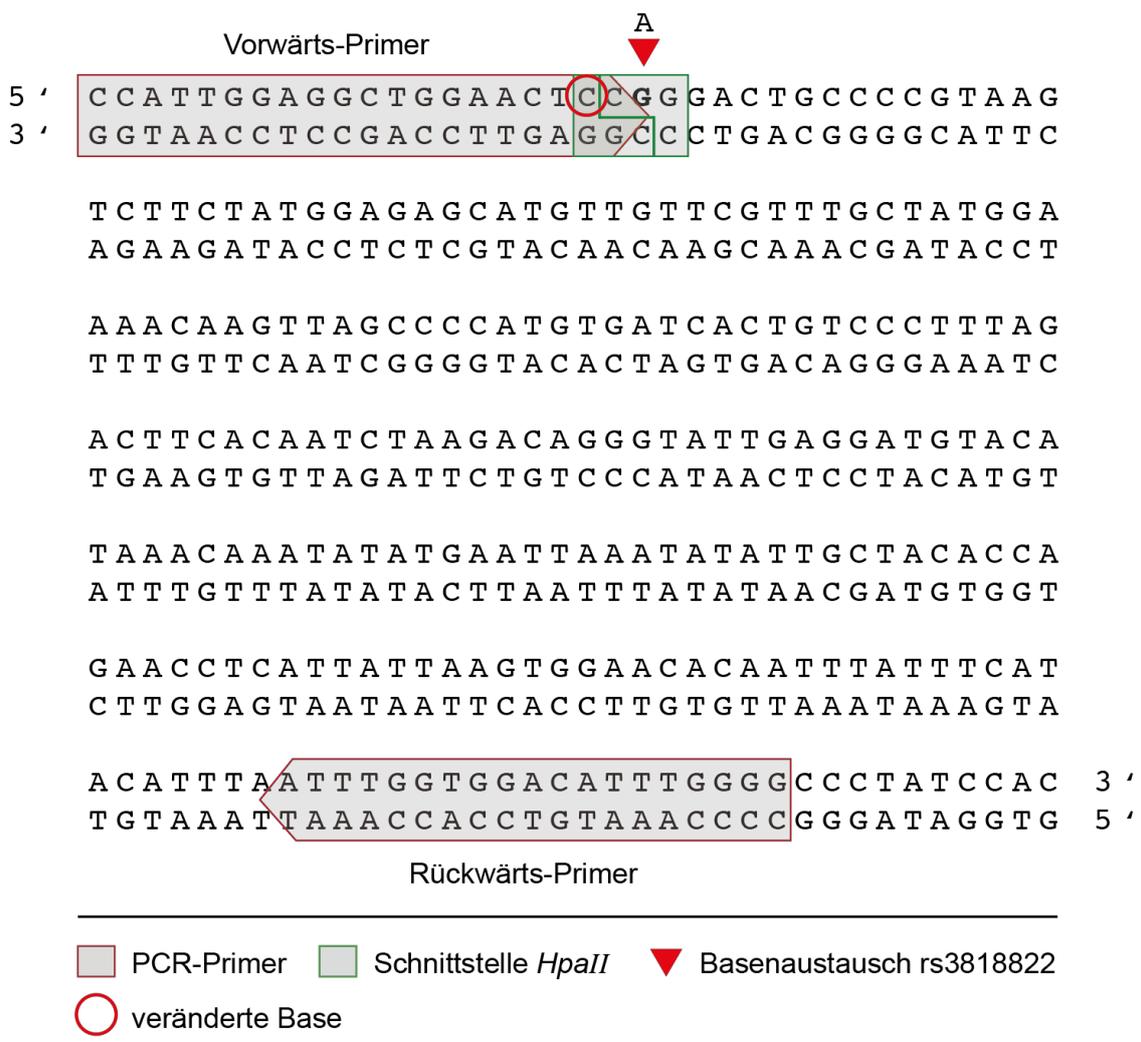


Abb. 8: Ausschnitt aus der Genomsequenz *CHIA* rs3818822

Die roten Markierungen zeigen die Bereiche, in denen die Primer binden. Die grüne Markierung veranschaulicht die SNP-Stelle mit Darstellung der Restriktionsschnittstelle des Enzyms *HpaII*. Der rote Pfeil kennzeichnet die Stelle des Basenaustauschs. Der rote Kreis umrundet die veränderte Base in der Primersequenz.

2.3 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit IBM SPSS Statistics, Version 24. Bei der vorliegenden Gruppengröße und in Analogie zu ähnlichen CF-Genotypisierungsstudien [208; 209] wurde eine Normalverteilung angenommen. Anhand von t-Tests bei unabhängigen Stichproben wurde zunächst auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen eines Genotyps und pulmonalem Erregerbefall untersucht. Dabei wurden für den SNP *CHIT1* rs3831317 Nichtträger des Polymorphismus (Wildtyp) jenen mit der 24-bp-Duplikation auf beiden Allelen gegenübergestellt. Bei den SNPs rs61756687 und rs3818822 im *CHIA*-Gen wurde je der Genotyp AA mit dem Genotyp GG verglichen. Anschließend wurden mithilfe des exakten Tests nach Fisher jeweils noch die heterozygoten Träger in die statistischen Auswertungen miteinbezogen. Mit der Korrelation nach Pearson wurden potentiell statistische Zusammenhänge zwischen pulmonal-fungalem Erregerbefall/ Kolonisationsstatus und dem obstruktiven Lungenfunktionsparameter FEV₁ sowie dem longitudinalen Lungenfunktionsabfall (Slope) untersucht. Zur abschließenden Eruierung einer Assoziation zwischen Genotypen und den Lungenfunktionsparametern diente die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, *Analysis of variance*). Das Signifikanzniveau in den statistischen Auswertungen wurde bei $P < 0,05$ festgelegt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Excel 2007.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

Das Kollektiv der Studie umfasste 528 Teilnehmer, die an CF erkrankt sind. Die Geschlechterverteilung war mit 266 männlichen (50,4 %) und 262 weiblichen (49,6 %) Patienten ausgeglichen. Im Durchschnitt waren die Patienten im Untersuchungsjahr 19 ± 10 Jahre alt, wobei der jüngste noch unter einem Jahr und der älteste bereits 58 Jahre alt war. Der BMI betrug im Schnitt $19,5 \pm 3,3 \text{ kg/m}^2$ mit einem Minimum von $10,96 \text{ kg/m}^2$ und einem Maximum von $29,7 \text{ kg/m}^2$. Die Lungenfunktion wurde anhand der expiratorischen Einsekundenkapazität (FEV_1) eruiert. Bei 33 Personen fehlten hierzu die Angaben, das Mittel der restlichen 495 lag bei $81 \pm 27 \%$ mit einem Minimum von $8,64 \%$ und einem Maximum von $133,98 \%$. Zusätzlich wurde der Slope des FEV_1 errechnet, wobei bei 418 Patienten ein durchschnittlicher Abfall des FEV_1 von $-0,98 \pm 2,0 \%$ pro Jahr beobachtet werden konnte. Der maximale Abfall betrug $-7,21 \%$, der maximale Anstieg lag bei $+6,56 \%$. Bei den restlichen 110 Patienten konnte aufgrund von fehlenden oder unzureichenden Angaben kein Slope erhoben werden. Tabelle 16 fasst die Patientencharakteristika zusammen.

Tabelle 16: Patientencharakteristika

Charakteristika	
Anzahl	528
Geschlecht (männlich / weiblich)	266 / 262
Alter im Untersuchungsjahr (Jahre)	19 ± 10
BMI (kg/m^2)	$19,5 \pm 3,3$
FEV_1 (% IST zu SOLL)	81 ± 27
Slope von FEV_1 / Jahr (%)	$-0,98 \pm 2,0$

Bei den Geschlechtern handelt es sich um Absolutzahlen. Die restlichen Angaben zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

Anhand von Alter und FEV₁ wurde die Lungenerkrankung der Patienten modifiziert nach dem Prinzip von Schluchter et al. in vier Schweregrade eingeteilt [210] (siehe Anhang). Zu 33 Personen lagen keine Angaben bezüglich des FEV₁ vor. Von den übrigen 495 Personen wiesen 50,7 % eine milde Form auf. Bei 17,8 % ergab sich eine mäßig-milde Form, bei 19,8 % eine mittelmäßige und bei 11,7 % eine schwere Form der Lungenerkrankung. In Abbildung 9 ist die Häufigkeitsverteilung des Schweregrads der Lungenerkrankung dargestellt.

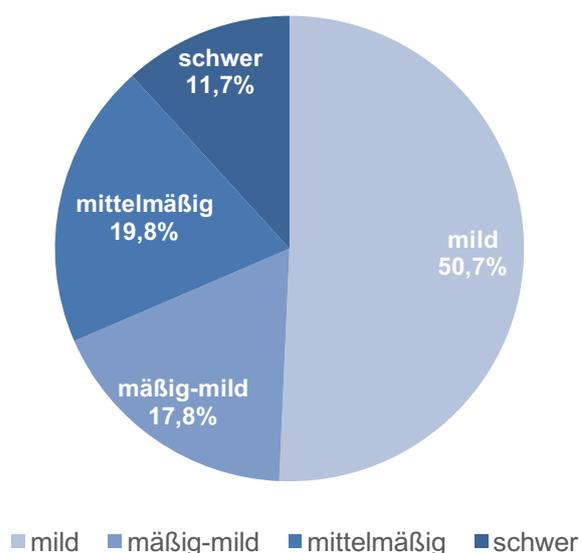


Abb. 9: Häufigkeitsverteilung des Schweregrads der Lungenerkrankung

Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung des Schweregrads der Lungenerkrankung bei dem untersuchten Patientenkollektiv (n = 495). Die Einteilung anhand von Alter und FEV₁ wurde modifiziert nach dem Prinzip von Schluchter et al. [210] vorgenommen.

Es wurde die Häufigkeitsverteilung der *CFTR*-Mutationen im Probenkollektiv ausgewertet. Gezählt wurde dabei jeder Nachweis einer *CFTR*-Mutation auf mindestens einem Allel. In Tabelle 17 sind alle Mutationen mit einer Häufigkeit von mindestens 0,25 % aufgelistet. Ein Vorkommen unter 0,25 % wurde zusammengefasst. 244 Patienten waren homozygot und 170 Patienten heterozygot für die häufigste Mutation $\Delta F508$.

Tabelle 17: Häufigkeitsverteilung der *CFTR*-Mutationen

<i>CFTR</i> -Mutation	Allelhäufigkeit	Prozent
$\Delta F508$ homozygot	488	46,21
$\Delta F508$ heterozygot	170	16,10
G542X	28	2,65
R553X	15	1,42
N1303K	14	1,33
G551D	10	0,95
R347P	8	0,76
M1101K	7	0,66
R1162X	6	0,57
2789+5G>A	5	0,47
1717-1G>A	4	0,38
3659delC	3	0,28
457TAT>G	3	0,28
E92X	3	0,28
Vorkommen unter 0,25 %	73	6,92
Fehlende Angaben	219	20,74*

* Bei 13,63 % (72 Patienten) fehlten die Angaben zu beiden Allelen

3.2 Genotypen-Verteilung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Genotypen-Verteilungen von *CHIT1* rs3831317, *CHIA* rs61756687 und *CHIA* rs3818822 dargestellt.

3.2.1 *CHIT1* rs3831317

Der SNP rs3831317 des Gens *CHIT1* wurde mithilfe einer PCR und anschließender Gelelektrophorese ermittelt (siehe Abschnitt 2.2.3). Die Basenduplikation von 24 bp führt zu einer Verlängerung des DNA-Fragments, was sich in der Gelelektrophorese als unterschiedliche Banden widerspiegelt. Abbildung 10 zeigt beispielhaft ein Agarosegel mit Ergebnissen von PCR-Amplifikationen für zehn Proben. Die Banden befinden sich entsprechend der PCR-Produktlängen bei 75 bp für das nicht-mutierte Allel (Wildtyp, Wt) und 99 bp für das mutierte Allel, also die 24-bp-Duplikation (Dup). Sind beide Banden sichtbar, liegt eine Heterozygotie (Het) vor. Um die Produktgrößen genauer abschätzen zu können, wurde eine 100 bp-DNA-Leiter verwendet.

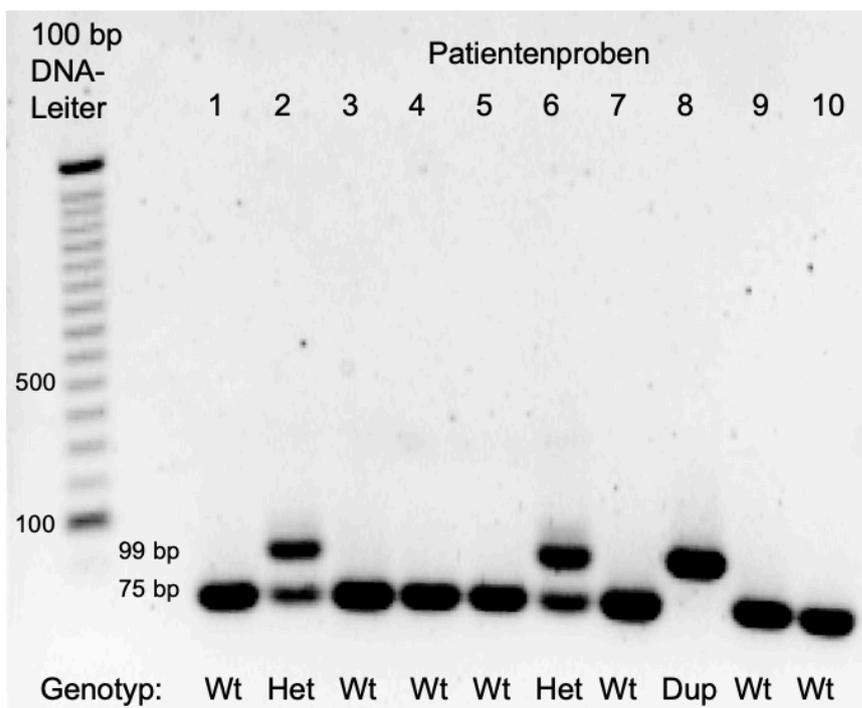


Abb. 10: Geldokumentation von *CHIT1* rs3831317

Die Abbildung zeigt ein exemplarisches Beispiel einer Geldokumentation für den Polymorphismus *CHIT1* rs3831317 bei zehn CF-Patienten. Mögliche Genotypen: Wt = Wildtyp (Nichtträger des Polymorphismus), Het = heterozygoter Träger der 24-bp-Duplikation, Dup = homozygoter Träger der 24-bp-Duplikation

Im untersuchten Kollektiv konnte bei 5,6 % die 24-bp-Duplikation homozygot nachgewiesen werden. 63,3 % der Patienten wiesen den Wildtyp auf, bei 31,1 % lag eine Heterozygotie vor (siehe Tabelle 18). Sieben DNA-Proben konnten nicht amplifiziert werden.

Tabelle 18: Häufigkeitsverteilung des SNPs *CHIT1* rs3831317

Genotyp	Häufigkeit	Prozent
Wildtyp	330	63,3
Heterozygotie	162	31,1
Homozygotie	29	5,6
Gesamtsumme	521	100,0

3.2.2 *CHIA* rs61756687

Für die Ermittlung des SNPs rs61756687 im *CHIA*-Gen wurde das PCR-Produkt mit einem Restriktionsenzym versetzt. Um den Basenaustausch von Adenin (A) zu Guanin (G) zu identifizieren, wurde die Restriktionsendonuklease *ApoI* verwendet. Dieses Enzym schneidet spezifisch vor der Base Adenin (5'... R[^]AATTY ... 3'). Liegt hier ein Basenaustausch zu Guanin (G) vor, kann die Restriktionsendonuklease nicht schneiden. Die daraus resultierenden unterschiedlichen PCR-Produktlängen wurden durch Gelelektrophoresen ermittelt. Abbildung 11 zeigt beispielhaft ein Agarosegel mit den Ergebnissen der verdauten PCR-Amplifikationen von 16 Proben. Die Banden befinden sich entsprechend der PCR-Produktlängen bei 91 und 175 bp für den Genotyp AA und bei 266 bp für den Genotyp GG. Sind alle drei Banden (91 + 175 + 266 bp) sichtbar, liegt der Genotyp AG vor. Um die Größe der PCR-Produkte genauer bestimmen zu können, wurde eine 25 bp-DNA-Leiter verwendet.

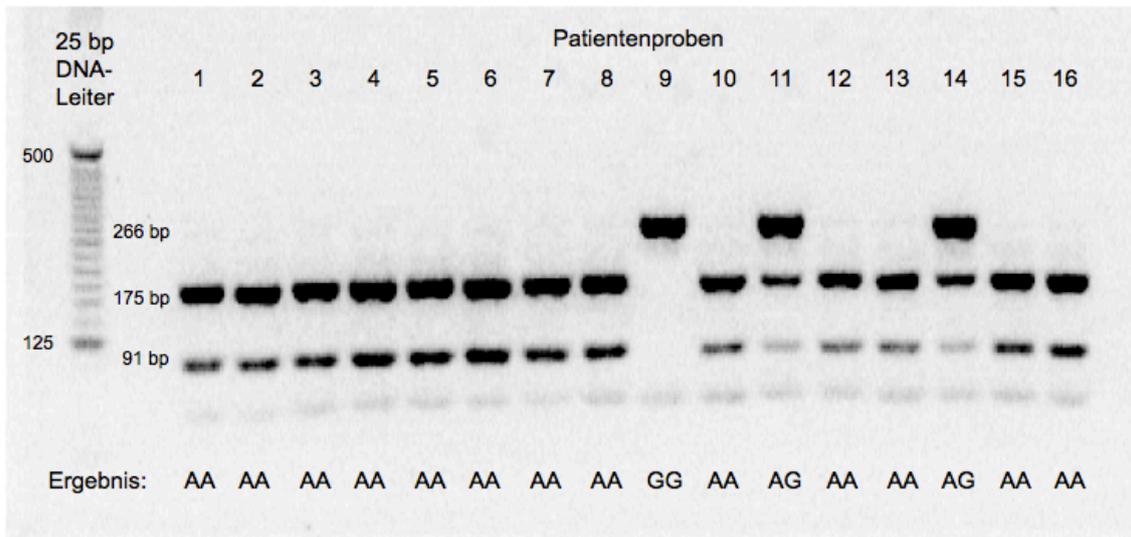


Abb. 11: Geldokumentation von *CHIA* rs61756687

Die Abbildung zeigt ein exemplarisches Beispiel einer Geldokumentation für den SNP *CHIA* rs61756687 bei 16 CF-Patienten. A = Adenin, G = Guanin, mögliche Genotypen: AA, AG, GG

70,6 % des Patientenkollektivs wiesen den Genotyp AA auf. Bei 2,7 % konnte der Genotyp GG nachgewiesen werden. Bei 26,7 % der Patienten lag der Genotyp AG vor (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Häufigkeitsverteilung des SNPs *CHIA* rs61756687

Genotyp	Häufigkeit	Prozent
AA	373	70,6
AG	141	26,7
GG	14	2,7
Gesamtsumme	528	100,0

3.2.3 *CHIA* rs3818822

Für die Analyse des SNPs rs3818822 im *CHIA*-Gen wurde das PCR-Produkt mit der Restriktionsendonuklease *HpaII* versetzt. Durch einen Basenaustausch von Guanin (G) zu Adenin (A) ist kein Schneiden durch das Restriktionsenzym möglich. Dies spiegelt sich in der Gelelektrophorese als unterschiedliche Banden wider. Diese befinden sich entsprechend der PCR-Produktlängen bei 19 und 223 bp für den Genotyp GG und bei 242 bp für den Genotyp AA. Sind alle drei Banden (19 + 223 + 242 bp) sichtbar, liegt der Genotyp AG vor.

Für die genauere Abschätzung der PCR-Produktgrößen wurde eine 25 bp-DNA-Leiter verwendet. Ein Beispiel eines Agarosegels mit den Ergebnissen verdauter PCR-Amplifikationen von zehn Proben findet sich in Abbildung 12.

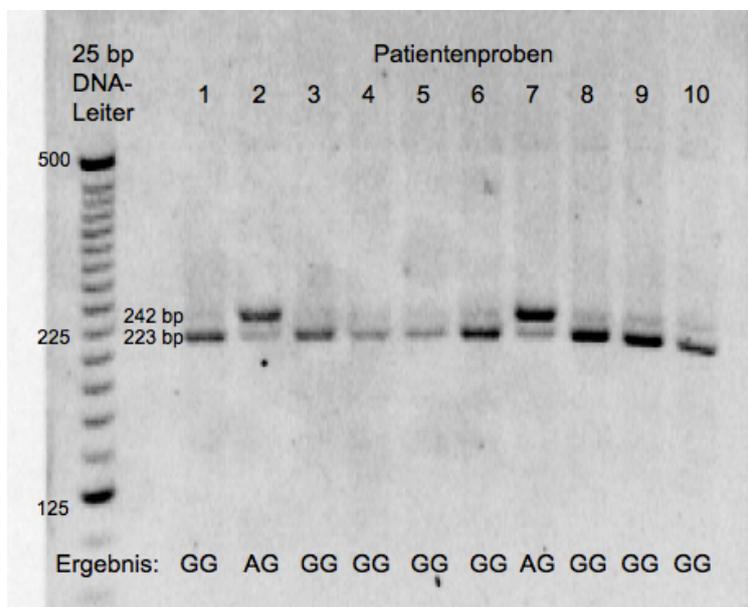


Abb. 12: Geldokumentation von *CHIA* rs3818822

Die Abbildung zeigt ein exemplarisches Beispiel einer Geldokumentation für den SNP *CHIA* rs3818822 bei zehn CF-Patienten.

A = Adenin, G = Guanin, mögliche Genotypen: AA, AG, GG

Im untersuchten Kollektiv wiesen 76,1 % den Genotyp GG auf. Bei 22,2 % der Patienten konnte der Genotyp AG und bei 1,7 % der Genotyp AA nachgewiesen werden (siehe Tabelle 20). 173 DNA-Proben konnten nicht amplifiziert werden.

Tabelle 20: Häufigkeitsverteilung des SNPs *CHIA* rs3818822

Genotyp	Häufigkeit	Prozent
AA	6	1,7
AG	79	22,2
GG	270	76,1
Gesamtsumme	355	100,0

3.3 Pulmonales Erregerspektrum

Für die Erhebung des Erregerspektrums der Patienten wurden alle mikrobiologischen Befunde der verschiedenen Kliniken herangezogen.

Im untersuchten Kollektiv stellte *C. albicans* mit 79,5 % den häufigsten fungalen Erreger des Respirationstraktes dar. Darunter war der größte Teil der Patienten (65,2 %) jedoch nur „selten“² befallen. Lediglich 6,2 % wiesen einen chronischen Befall auf, 8,1 % einen intermittierenden Befall. Eine Kolonisation mit *A. fumigatus* wurde bei 66,3 % der untersuchten Patienten festgestellt. Dieser konnte bei 15,9 % der Patienten als häufigster Erreger chronischer Pilzinfektionen nachgewiesen werden, bei 18,2 % aller Patienten bereits als intermittierender Befall.

Der häufigste nachweisbare bakterielle Erreger mit 88,1 % war *S. aureus*. Dabei bestand bei 14,3 % der Patienten ein intermittierender Befall, bei 32,3 % bereits ein chronischer Befall. Mit 40,5 % stellte *P. aeruginosa* jedoch den häufigsten Erreger chronisch bakterieller Infektionen des Respirationstraktes dar.

In Tabelle 21 und 22 ist der Kolonisationsstatus der wichtigsten untersuchten Pilze und Bakterien mit absoluter Anzahl und Prozent der jeweiligen Gesamtsumme aufgelistet.

² Der Kolonisationsstatus wurde in Anlehnung an die Einteilung von Chotirmall et al. [51] wie folgt definiert: nie = 0 %, selten < 35 %, intermittierend 35 - 50 %, chronisch > 50 %. Dabei bezieht sich der Nachweis positiver Befunde auf 12 Monate.

Tabelle 21: Fungale Kolonisation

Erreger	Kolonisationsstatus ³	Anzahl	% von Gesamtsumme
<i>Candida albicans</i> (n = 420)	nie	86	20,5
	selten	274	65,2
	intermittierend	34	8,1
	chronisch	26	6,2
<i>Aspergillus fumigatus</i> (n = 528)	nie	178	33,7
	selten	170	32,2
	intermittierend	96	18,2
	chronisch	84	15,9
<i>Aspergillus flavus</i> (n = 420)	nie	377	89,8
	selten	37	8,8
	intermittierend	6	1,4
	chronisch	0	0,0
<i>Candida glabrata</i> (n = 420)	nie	376	89,5
	selten	18	4,3
	intermittierend	18	4,3
	chronisch	8	1,9
<i>Candida parapsilosis</i> (n = 420)	nie	337	80,2
	selten	68	16,2
	intermittierend	12	2,9
	chronisch	3	0,7

³ Für die statistische Auswertung und grafische Darstellung wurde der Kolonisationsstatus wie folgt kategorisiert: 0 = nie, 1 = selten, 2 = intermittierend, 3 = chronisch

Tabelle 22: Bakterielle Kolonisation

Erreger	Kolonisationsstatus	Anzahl	% von Gesamtsumme
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 528)	nie	109	20,6
	selten	146	27,7
	intermittierend	59	11,2
	chronisch	214	40,5
<i>Burkholderia cepacia</i> (n = 504)	nie	466	92,4
	selten	23	4,6
	intermittierend	8	1,6
	chronisch	7	1,4
<i>Staphylococcus aureus</i> (n = 504)	nie	60	11,9
	selten	209	41,5
	intermittierend	72	14,3
	chronisch	163	32,3
MRSA / ORSA (n = 504)	nie	458	90,9
	selten	29	5,7
	intermittierend	8	1,6
	chronisch	9	1,8
<i>Haemophilus influenzae</i> (n = 504)	nie	227	45,0
	selten	194	38,5
	intermittierend	47	9,3
	chronisch	36	7,2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (n = 504)	nie	203	40,3
	selten	202	40,1
	intermittierend	51	10,1
	chronisch	48	9,5
Mykobakterien (n = 504)	nie	473	93,8
	selten	15	3,0
	intermittierend	8	1,6
	chronisch	8	1,6

3.4 Korrelationen zwischen genetischen Varianten und dem pulmonalen fungalen Kolonisationsstatus

Um Korrelationen von *CHIT1* rs3831317, *CHIA* rs61756687 und *CHIA* rs3818822 mit dem pulmonalen Kolonisationsstatus zu untersuchen, wurden die analysierten Genotypen und mikrobiologisch nachgewiesenen Erreger herangezogen. Dabei wurden die fungalen Erreger *C. albicans*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *C. glabrata* und *C. parapsilosis* beleuchtet.

3.4.1 *CHIT1* rs3831317

Der Kolonisationsstatus von *C. albicans* in Verbindung mit der Genotypisierung konnte bei 413 Patienten erfasst werden. Unter diesen wiesen 266 Patienten den Wildtyp, 127 Patienten eine Heterozygotie und 20 Patienten eine Homozygotie für die 24-bp-Duplikation auf. Mit einem Mittelwert von $1,35 \pm 0,813$ war der durchschnittliche Erregerbefall bei Patienten mit 24-bp-Duplikation auf beiden Allelen signifikant höher ($P = 0,012$) als bei Patienten mit Wildtyp mit einem Mittelwert von $0,94 \pm 0,684$. Unter Einbeziehung der heterozygoten Träger (Mittelwert $1,08 \pm 0,803$) zeigte sich jedoch keine signifikante Assoziation ($P = 0,108$).

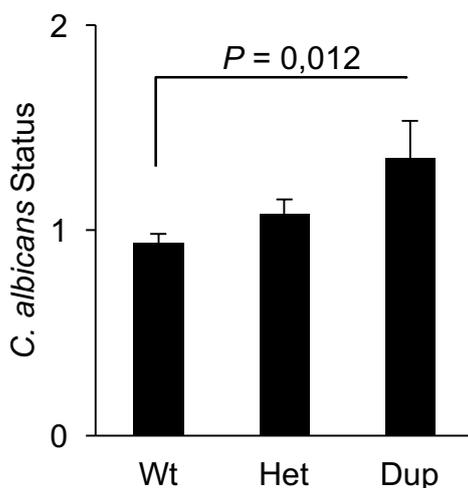


Abb. 13: *CHIT1* rs3831317 Varianten und *C. albicans* Status

Die Abbildung zeigt die genetischen *CHIT1* rs3831317 Varianten und deren Kolonisationsstatus mit *C. albicans*. Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an: Wt = Wildtyp (n = 266), Het = Heterozygotie (n = 127), Dup = Homozygotie (n = 20). Die Ordinate stellt den Kolonisationsstatus nach der Methode von Chotirmall et al. 2010 dar [51]. Die Abbildung wurde nach Hector et al. 2016 modifiziert [211].

Der Kolonisationsstatus von *A. fumigatus* in Verbindung mit der Genotypisierung konnte bei 521 Patienten erfasst werden. Unter diesen wiesen 330 Patienten den Wildtyp, 162 Patienten eine Heterozygotie und 29 Patienten eine Homozygotie für die 24-bp-Duplikation auf. Mit einem Mittelwert von $1,28 \pm 1,162$ war der durchschnittliche Erregerbefall bei Patienten mit 24-bp-Duplikation auf beiden Allelen zwar höher als bei Patienten mit Wildtyp mit einem Mittelwert von $1,16 \pm 1,067$, jedoch nicht statistisch signifikant ($P = 0,580$). Unter Einbeziehung der heterozygoten Träger (Mittelwert $1,15 \pm 1,055$) zeigte sich ebenfalls keine signifikante Assoziation ($P = 0,645$).

Der Kolonisationsstatus von *A. flavus* in Verbindung mit der Genotypisierung konnte bei 413 Patienten erfasst werden. Unter diesen wiesen 266 Patienten den Wildtyp, 127 Patienten eine Heterozygotie und 20 Patienten eine Homozygotie für die 24-bp-Duplikation auf. Mit einem Mittelwert von $0,20 \pm 0,523$ war der durchschnittliche Erregerbefall bei Patienten mit 24-bp-Duplikation auf beiden Allelen zwar höher als bei Patienten mit Wildtyp mit einem Mittelwert von $0,13 \pm 0,387$, jedoch nicht statistisch signifikant ($P = 0,434$). Unter Einbeziehung der heterozygoten Träger (Mittelwert $0,08 \pm 0,270$) zeigte sich ebenfalls keine signifikante Assoziation ($P = 0,264$).

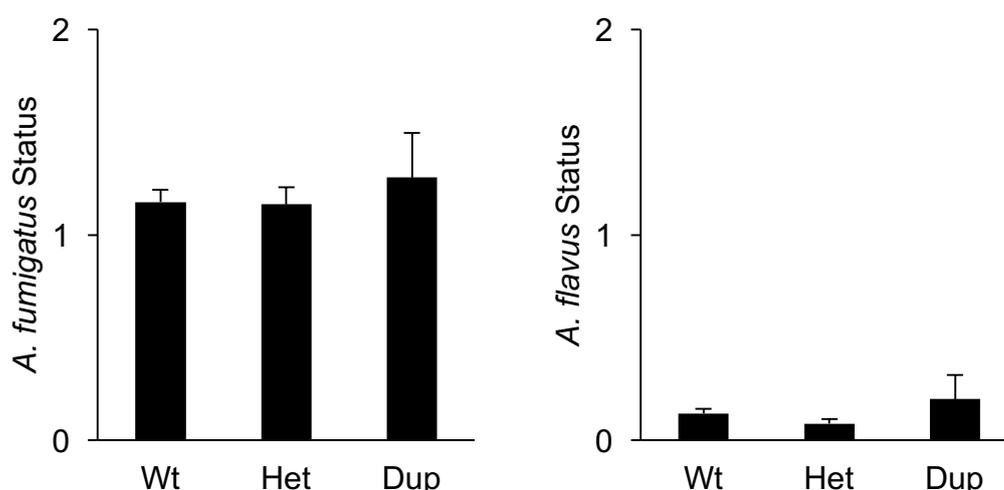


Abb. 14: *CHIT1* rs3831317 Varianten und *A. fumigatus* bzw. *A. flavus* Status

Die Abbildung zeigt die genetischen *CHIT1* rs3831317 Varianten und deren Kolonisationsstatus mit *A. fumigatus* (links) bzw. *A. flavus* (rechts). Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an: Links: Wt = Wildtyp (n = 330), Het = Heterozygotie (n = 162), Dup = Homozygotie (n = 29). Rechts: Wt (n = 266), Het (n = 127), Dup (n = 20). Die Ordinate stellt den Kolonisationsstatus nach der Methode von Chotirmall et al. 2010 dar [51].

Der Kolonisationsstatus von *C. glabrata* in Verbindung mit der Genotypisierung konnte bei 413 Patienten erfasst werden. Unter diesen wiesen 266 Patienten den Wildtyp, 127 Patienten eine Heterozygotie und 20 Patienten eine Homozygotie für die 24-bp-Duplikation auf. Mit einem Mittelwert von $0,05 \pm 0,224$ war der durchschnittliche Erregerbefall bei Patienten mit 24-bp-Duplikation auf beiden Allelen signifikant geringer ($P = 0,032$) als bei Patienten mit Wildtyp mit einem Mittelwert von $0,19 \pm 0,610$. Unter Einbeziehung der heterozygoten Träger (Mittelwert $0,20 \pm 0,591$) zeigte sich jedoch keine signifikante Assoziation ($P = 0,932$).

Der Kolonisationsstatus von *C. parapsilosis* in Verbindung mit der Genotypisierung konnte bei 413 Patienten erfasst werden. Unter diesen wiesen 266 Patienten den Wildtyp, 127 Patienten eine Heterozygotie und 20 Patienten eine Homozygotie für die 24-bp-Duplikation auf. Mit einem Mittelwert von $0,55 \pm 0,686$ war der Erregerbefall bei Patienten mit 24-bp-Duplikation auf beiden Allelen zwar höher als bei Patienten mit Wildtyp mit einem Mittelwert von $0,24 \pm 0,539$, jedoch nicht statistisch signifikant ($P = 0,065$). Unter Einbeziehung der heterozygoten Träger (Mittelwert $0,17 \pm 0,420$) zeigte sich ebenfalls keine signifikante Assoziation ($P = 0,061$).

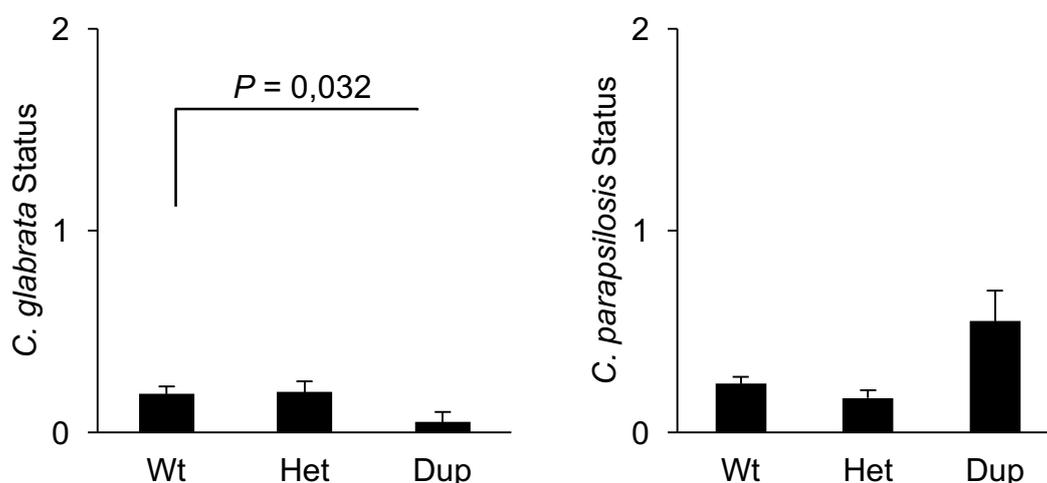


Abb. 15: CHIT1 rs3831317 Varianten und *C. glabrata* bzw. *C. parapsilosis* Status

Die Abbildung zeigt die genetischen *CHIT1* rs3831317 Varianten und deren Kolonisationsstatus mit *C. glabrata* (links) bzw. *C. parapsilosis* (rechts). Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an: Links: Wt = Wildtyp (n = 266), Het = Heterozygotie (n = 127), Dup = Homozygotie (n = 20). Rechts: Wt (n = 266), Het (n = 127), Dup (n = 20). Die Ordinate stellt den Kolonisationsstatus nach der Methode von Chotirmall et al. 2010 dar [51].

3.4.2 CHIA rs61756687

Der Kolonisationsstatus von *C. albicans* konnte bei 420 Patienten erfasst werden. Unter diesen wiesen 304 Patienten den Genotyp AA, 10 Patienten den Genotyp GG und 106 Patienten den Genotyp AG auf. Mit einem Mittelwert von $0,90 \pm 0,568$ war der durchschnittliche Erregerbefall bei Patienten mit Genotyp GG etwas geringer als bei jenen mit Genotyp AA mit einem Mittelwert von $0,98 \pm 0,719$, dies jedoch nicht statistisch signifikant ($P = 0,738$). Unter Einbeziehung der Patienten mit Genotyp AG (Mittelwert $1,08 \pm 0,777$) zeigte sich ebenfalls keine signifikante Assoziation ($P = 0,890$).

Der Kolonisationsstatus von *A. fumigatus* konnte bei 528 Patienten erfasst werden. Unter diesen wiesen 373 Patienten den Genotyp AA, 14 Patienten den Genotyp GG und 141 Patienten den Genotyp AG auf. Mit einem Mittelwert von $0,71 \pm 0,611$ war der durchschnittliche Erregerbefall bei Patienten mit Genotyp GG signifikant geringer ($P = 0,031$) als bei jenen mit Genotyp AA mit einem Mittelwert von $1,12 \pm 1,073$. Unter Einbeziehung der Patienten mit Genotyp AG (Mittelwert $1,31 \pm 1,057$) zeigte sich jedoch keine signifikante Assoziation ($P = 0,057$) mehr.

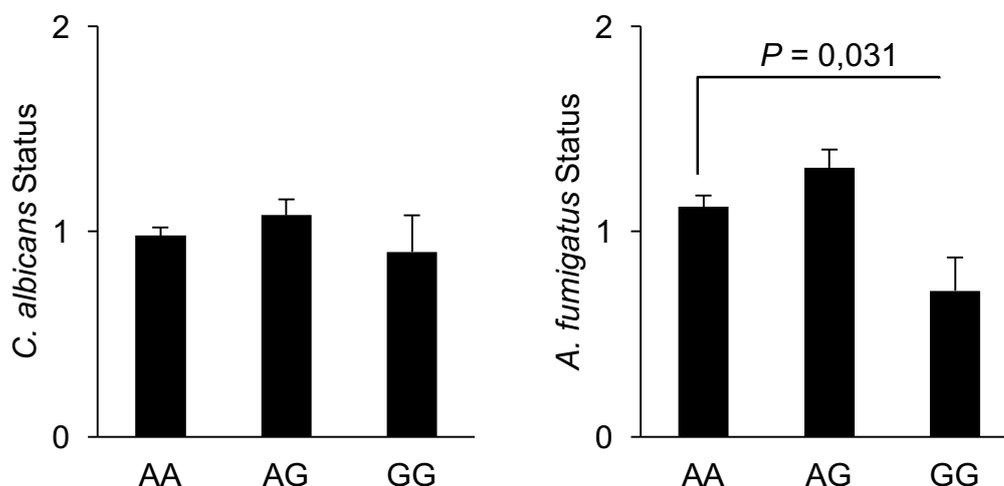


Abb. 16: CHIA rs61756687 Varianten und *C. albicans* bzw. *A. fumigatus* Status

Die Abbildung zeigt die genetischen CHIA rs61756687 Varianten und deren Kolonisationsstatus mit *C. albicans* (links) bzw. *A. fumigatus* (rechts). Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an: Links: AA (n = 304), AG (n = 106), GG (n = 10). Rechts: AA (n = 373), AG (n = 141), GG (n = 14). Die Ordinate stellt den Kolonisationsstatus nach der Methode von Chotirmall et al. 2010 dar [51].

Der Kolonisationsstatus von *A. flavus* konnte bei 420 Patienten erfasst werden. Unter diesen wiesen 304 Patienten den Genotyp AA, 10 Patienten den Genotyp GG und 106 Patienten den Genotyp AG auf. Mit einem Mittelwert von $0,00 \pm 0,000$ war der durchschnittliche Erregerbefall bei Patienten mit Genotyp GG signifikant geringer ($P = 0,000$) als bei jenen mit Genotyp AA mit einem Mittelwert von $0,13 \pm 0,378$. Unter Einbeziehung der Patienten mit Genotyp AG (Mittelwert $0,10 \pm 0,336$) zeigte sich jedoch keine signifikante Assoziation ($P = 0,981$) mehr.

Der Kolonisationsstatus von *C. glabrata* konnte bei 420 Patienten erfasst werden. Unter diesen wiesen 304 Patienten den Genotyp AA, 10 Patienten den Genotyp GG und 106 Patienten den Genotyp AG auf. Mit einem Mittelwert von $0,20 \pm 0,632$ war der durchschnittliche Erregerbefall bei Patienten mit Genotyp GG etwas höher als bei jenen mit Genotyp AA mit einem Mittelwert von $0,16 \pm 0,542$, dies jedoch nicht statistisch signifikant ($P = 0,825$). Unter Einbeziehung der Patienten mit Genotyp AG (Mittelwert $0,25 \pm 0,718$) zeigte sich ebenfalls keine signifikante Assoziation ($P = 0,174$).

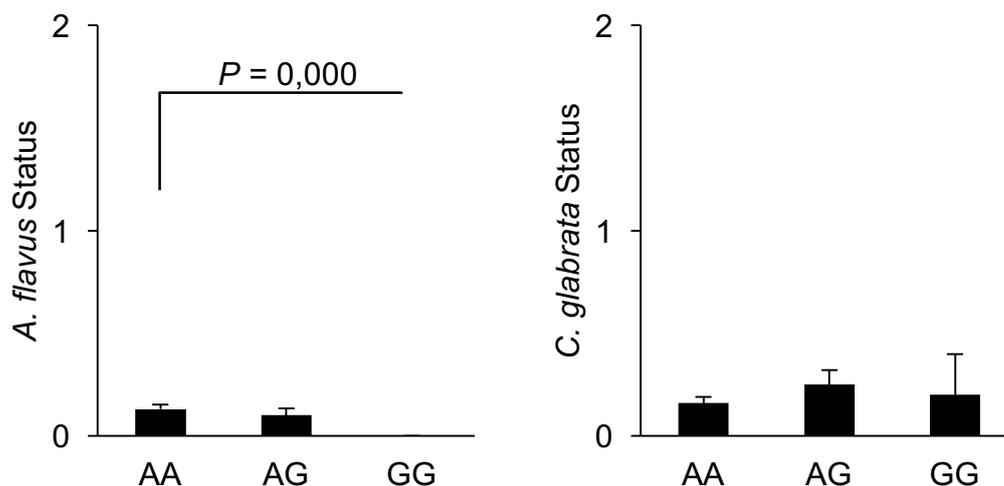


Abb. 17: CHIA rs61756687 Varianten und *A. flavus* bzw. *C. glabrata* Status

Die Abbildung zeigt die genetischen CHIA rs61756687 Varianten und deren Kolonisationsstatus mit *A. flavus* (links) bzw. *C. glabrata* (rechts). Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an: Links: AA (n = 304), AG (n = 106), GG (n = 10). Rechts: AA (n = 304), AG (n = 106), GG (n = 10). Die Ordinate stellt den Kolonisationsstatus nach der Methode von Chotirmall et al. 2010 dar [51].

Der Kolonisationsstatus von *C. parapsilosis* konnte bei 420 Patienten erfasst werden. Unter diesen wiesen 304 Patienten den Genotyp AA, 10 Patienten den Genotyp GG und 106 Patienten den Genotyp AG auf. Mit einem Mittelwert von $0,50 \pm 0,850$ war der durchschnittliche Erregerbefall bei Patienten mit Genotyp GG höher als bei jenen mit Genotyp AA mit einem Mittelwert von $0,23 \pm 0,494$, dies jedoch nicht statistisch signifikant ($P = 0,344$). Unter Einbeziehung der Patienten mit Genotyp AG (Mittelwert $0,25 \pm 0,599$) zeigte sich ebenfalls keine signifikante Assoziation ($P = 0,075$).

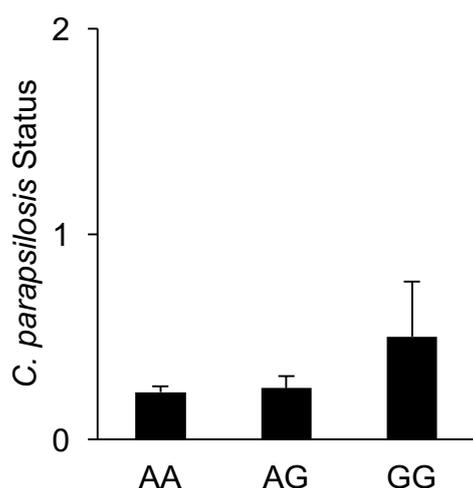


Abb. 18: CHIA rs61756687 Varianten und *C. parapsilosis* Status

Die Abbildung zeigt die genetischen *CHIA rs61756687* Varianten und deren Kolonisationsstatus mit *C. parapsilosis*. Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an: AA (n = 304), AG (n = 106), GG (n = 10). Die Ordinate stellt den Kolonisationsstatus nach der Methode von Chotirmall et al. 2010 dar [51].

3.4.3 CHIA rs3818822

Der Kolonisationsstatus von *C. albicans* in Verbindung mit der Genotypisierung konnte bei 247 Patienten erfasst werden. Unter diesen wiesen 193 Patienten den Genotyp GG, 5 Patienten den Genotyp AA und 49 Patienten den Genotyp AG auf. Mit einem Mittelwert von $1,40 \pm 1,140$ war der durchschnittliche Erregerbefall bei Patienten mit Genotyp AA höher als bei jenen mit Genotyp GG mit einem Mittelwert von $1,12 \pm 0,794$, dies jedoch nicht statistisch signifikant ($P = 0,499$). Unter Einbeziehung der Patienten mit Genotyp AG (Mittelwert $1,29 \pm 0,935$) zeigte sich ebenfalls keine signifikante Assoziation ($P = 0,337$).

Der Kolonisationsstatus von *A. fumigatus* in Verbindung mit der Genotypisierung konnte bei 355 Patienten erfasst werden. Unter diesen wiesen 270 Patienten den Genotyp GG, 6 Patienten den Genotyp AA und 79 Patienten den Genotyp AG auf. Mit einem Mittelwert von $1,33 \pm 0,816$ war der durchschnittliche Erregerbefall bei Patienten mit Genotyp AA etwas höher als bei jenen mit Genotyp GG mit einem Mittelwert von $1,18 \pm 1,103$, dies jedoch nicht statistisch signifikant ($P = 0,732$). Unter Einbeziehung der Patienten mit Genotyp AG (Mittelwert $1,30 \pm 1,090$) zeigte sich ebenfalls keine signifikante Assoziation ($P = 0,089$).

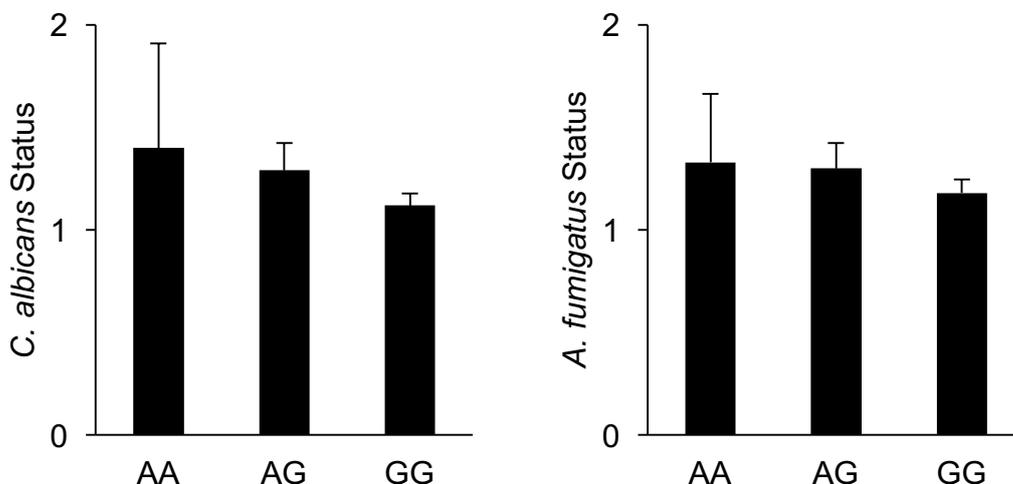


Abb. 19: CHIA rs3818822 Varianten und *C. albicans* bzw. *A. fumigatus* Status

Die Abbildung zeigt die genetischen CHIA rs3818822 Varianten und deren Kolonisationsstatus mit *C. albicans* (links) bzw. *A. fumigatus* (rechts). Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an: Links: AA (n = 5), AG (n = 49), GG (n = 193). Rechts: AA (n = 6), AG (n = 79), GG (n = 270). Die Ordinate stellt den Kolonisationsstatus nach der Methode von Chotirmall et al. 2010 dar [51].

Der Kolonisationsstatus von *A. flavus* in Verbindung mit der Genotypisierung konnte bei 247 Patienten erfasst werden. Unter diesen wiesen 193 Patienten den Genotyp GG, 5 Patienten den Genotyp AA und 49 Patienten den Genotyp AG auf. Mit einem Mittelwert von $0,40 \pm 0,548$ war der durchschnittliche Erregerbefall bei Patienten mit Genotyp AA höher als bei jenen mit Genotyp GG mit einem Mittelwert von $0,12 \pm 0,384$, dies jedoch nicht statistisch signifikant ($P = 0,111$). Unter Einbeziehung der Patienten mit Genotyp AG (Mittelwert $0,16 \pm 0,472$) zeigte sich ebenfalls keine signifikante Assoziation ($P = 0,142$).

Der Kolonisationsstatus von *C. glabrata* in Verbindung mit der Genotypisierung konnte bei 247 Patienten erfasst werden. Unter diesen wiesen 193 Patienten den Genotyp GG, 5 Patienten den Genotyp AA und 49 Patienten den Genotyp AG auf. Mit einem Mittelwert von $0,00 \pm 0,000$ war der durchschnittliche Erregerbefall bei Patienten mit Genotyp AA geringer als bei jenen mit Genotyp GG mit einem Mittelwert von $0,11 \pm 0,418$, dies jedoch nicht statistisch signifikant ($P = 0,543$). Unter Einbeziehung der Patienten mit Genotyp AG (Mittelwert $0,14 \pm 0,540$) zeigte sich ebenfalls keine signifikante Assoziation ($P = 0,785$).

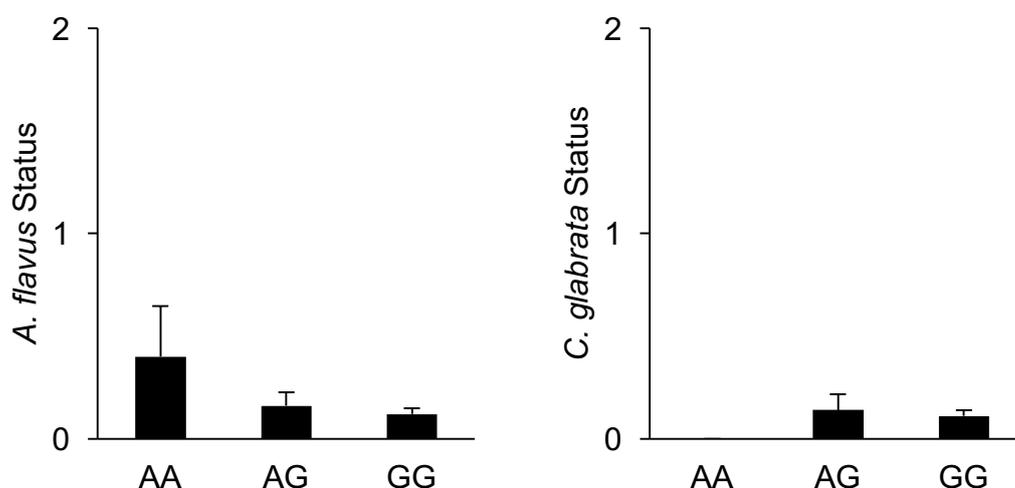


Abb. 20: CHIA rs3818822 Varianten und *A. flavus* bzw. *C. glabrata* Status

Die Abbildung zeigt die genetischen CHIA rs3818822 Varianten und deren Kolonisationsstatus mit *A. flavus* (links) bzw. *C. glabrata* (rechts). Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an: Links: AA (n = 5), AG (n = 49), GG (n = 193). Rechts: AA (n = 5), AG (n = 49), GG (n = 193). Die Ordinate stellt den Kolonisationsstatus nach der Methode von Chotirmall et al. 2010 dar [51].

Der Kolonisationsstatus von *C. parapsilosis* in Verbindung mit der Genotypisierung konnte bei 247 Patienten erfasst werden. Unter diesen wiesen 193 Patienten den Genotyp GG, 5 Patienten den Genotyp AA und 49 Patienten den Genotyp AG auf. Mit einem Mittelwert von $0,20 \pm 0,447$ war der durchschnittliche Erregerbefall bei Patienten mit Genotyp AA etwas geringer als bei jenen mit Genotyp GG mit einem Mittelwert von $0,27 \pm 0,533$, dies jedoch nicht statistisch signifikant ($P = 0,757$). Unter Einbeziehung der Patienten mit Genotyp AG (Mittelwert $0,14 \pm 0,500$) zeigte sich ebenfalls keine signifikante Assoziation ($P = 0,091$).

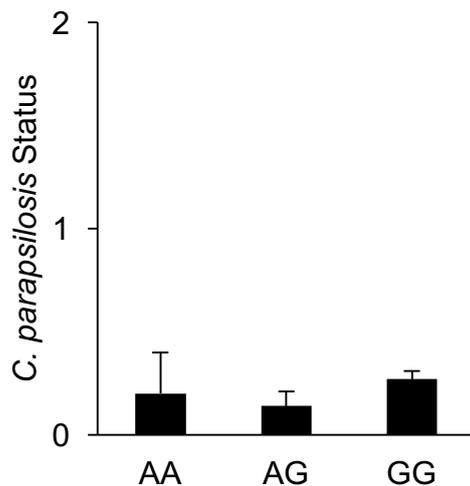


Abb. 21: CHIA rs3818822 Varianten und *C. parapsilosis* Status

Die Abbildung zeigt die genetischen *CHIA rs3818822* Varianten und deren Kolonisationsstatus mit *C. parapsilosis*. Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an: AA (n = 5), AG (n = 49), GG (n = 193). Die Ordinate stellt den Kolonisationsstatus nach der Methode von Chotirmall et al. 2010 dar [51].

3.5 Korrelation zwischen fungalem Kolonisationsstatus und Lungenfunktionsparametern

Das FEV₁ und der Slope sind als Lungenfunktionsparameter aussagekräftige Werte zur Beurteilung der Lungenerkrankung bei CF-Patienten. Dafür wurde untersucht, ob der fungale Kolonisationsstatus der Lunge mit diesen beiden Parametern und demzufolge mit der Lungenerkrankung korreliert.

Es konnten negative Korrelationen zwischen *A. fumigatus* ($P = 0,000$), *A. flavus* ($P = 0,017$) und *C. glabrata* ($P = 0,000$) bezüglich des FEV₁ nachgewiesen werden. Je stärker der fungale Befall mit diesen Erregern war, desto niedriger war auch das FEV₁. Für *C. albicans* und *C. parapsilosis* wurden keine Zusammenhänge mit dem FEV₁ festgestellt.

Tabelle 23: Korrelation von fungalem Kolonisationsstatus mit FEV₁

Erreger	r (Korrelationskoeffizient)	Signifikanz (2-seitig)	N (Anzahl der Fälle)
<i>C. albicans</i>	0,004	0,931	397
<i>A. fumigatus</i>	-0,278*	0,000	495
<i>A. flavus</i>	-0,120*	0,017	397
<i>C. glabrata</i>	-0,237*	0,000	397
<i>C. parapsilosis</i>	-0,049	0,325	397

Für die statistische Analyse wurde folgendes Signifikanzniveau festgelegt: * $P < 0,05$.

Bezüglich des Slopes konnte ein Zusammenhang mit *C. glabrata* ($P = 0,024$) gefunden werden. Je stärker der Befall mit dem Erreger war, desto stärker war auch der durchschnittliche jährliche Abfall des FEV₁. Solch eine Korrelation wurde für *C. albicans*, *A. fumigatus*, *A. flavus* und *C. parapsilosis* nicht nachgewiesen.

Tabelle 24: Korrelation von fungalem Kolonisationsstatus mit Slope

Erreger	r (Korrelationskoeffizient)	Signifikanz (2-seitig)	N (Anzahl der Fälle)
<i>C. albicans</i>	0,032	0,557	334
<i>A. fumigatus</i>	-0,082	0,094	418
<i>A. flavus</i>	0,009	0,872	334
<i>C. glabrata</i>	-0,124*	0,024	334
<i>C. parapsilosis</i>	-0,085	0,119	334

Für die statistische Analyse wurde folgendes Signifikanzniveau festgelegt: * $P < 0,05$.

3.6 Korrelation zwischen Genotyp und Lungenfunktion

Nachdem Assoziationen zwischen Genotyp-Varianten und Erregerstatus sowie zwischen Erregerstatus und Lungenfunktionsparametern untersucht wurden, erfolgte zum Abschluss eine statistische Analyse zur Beurteilung der Korrelation zwischen Genotyp-Varianten der Polymorphismen rs3831317, rs61756687 und rs3818822 mit den Lungenfunktionsparametern FEV₁ und Slope.

3.6.1 *CHIT1* rs3831317 und Lungenfunktionsparameter

Bei 488 Patienten konnte sowohl der Genotyp des Polymorphismus rs3831317 als auch das FEV₁ bestimmt werden. Das durchschnittliche FEV₁ betrug bei Patienten mit Wildtyp $79,87 \pm 28,01$ %, bei den heterozygoten Trägern $83,77 \pm 26,35$ % und bei Patienten mit 24-bp-Duplikation auf beiden Allelen $82,13 \pm 19,33$ % (siehe Abbildung 22 links). Es konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des FEV₁ zwischen den einzelnen Genotypen festgestellt werden ($P = 0,344$).

Für die Beurteilung des Slopes in Abhängigkeit von den *CHIT1* rs3831317 Genotyp-Varianten konnten die Daten von 411 Patienten verwendet werden. Patienten mit Wildtyp (Mittelwert $-1,05 \pm 2,01$ %) wiesen zwar einen stärkeren Abfall des FEV₁ auf als die heterozygoten (Mittelwert $-0,87 \pm 1,98$ %) und homozygoten Träger (Mittelwert $-0,43 \pm 2,02$ %) der 24-bp-Duplikation, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($P = 0,307$) (siehe Abbildung 22 rechts).

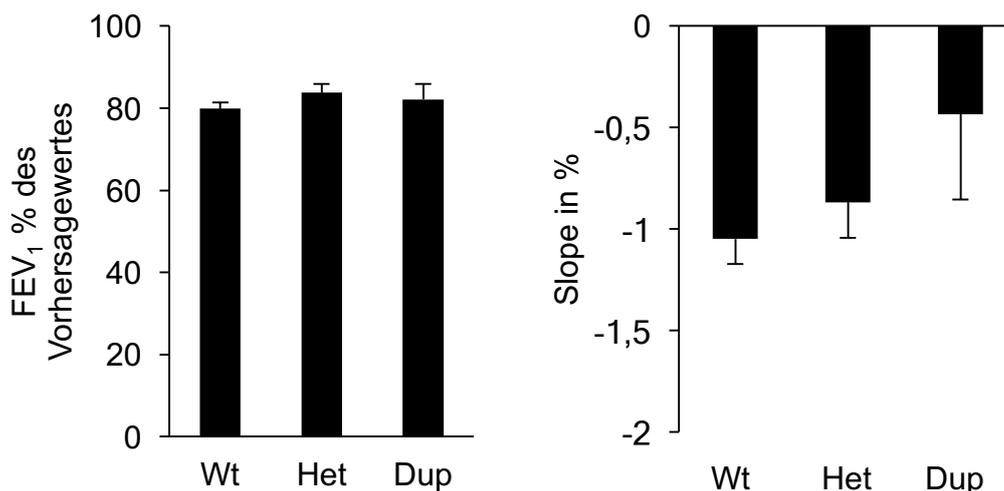


Abb. 22: *CHIT1* rs3831317 Varianten und FEV₁ (links) bzw. Slope (rechts)

Links: Die Abbildung zeigt den Mittelwert des FEV₁ in Prozent des Vorhersagewertes in Abhängigkeit von den genetischen *CHIT1* rs3831317 Varianten bei CF-Patienten ($n = 488$). Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an: Wt = Wildtyp ($n = 310$), Het = Heterozygotie ($n = 152$), Dup = Homozygotie ($n = 26$).

Rechts: Die Abbildung zeigt den durchschnittlichen Abfall des FEV₁ pro Jahr (Slope) in Abhängigkeit von den genetischen *CHIT1* rs3831317 Varianten bei CF-Patienten ($n = 411$). Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an: Wt ($n = 262$), Het ($n = 126$), Dup ($n = 23$).

3.6.2 CHIA rs61756687 und Lungenfunktionsparameter

Bei 495 Patienten konnte sowohl der Genotyp des SNPs rs61756687 als auch das FEV₁ bestimmt werden. Für Patienten mit dem Genotyp AA ergab sich ein durchschnittliches FEV₁ von 82,53 ± 26,39 %. Patienten mit dem Genotyp AG wiesen im Mittel ein FEV₁ von 78,22 ± 28,39 % auf und jene mit dem Genotyp GG eines von 69,09 ± 27,94 % (siehe Abbildung 29 links). Es konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des FEV₁ zwischen den einzelnen Genotypen AA, AG und GG festgestellt werden ($P = 0,088$).

Für die Beurteilung des Slopes in Abhängigkeit von den CHIA rs61756687 Genotyp-Varianten konnten die Daten von 418 Patienten verwendet werden. Dabei sank bei Patienten mit dem Genotyp GG (Mittelwert -1,42 ± 1,83 %) das FEV₁ am stärksten. Patienten mit dem Genotyp AG wiesen einen mäßigen Abfall von -1,09 ± 2,16 % auf, während jene mit Genotyp AA (Mittelwert -0,92 ± 1,94 %) den geringsten FEV₁-Abfall zeigten (siehe Abbildung 29 rechts). Auch hier war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ($P = 0,570$).

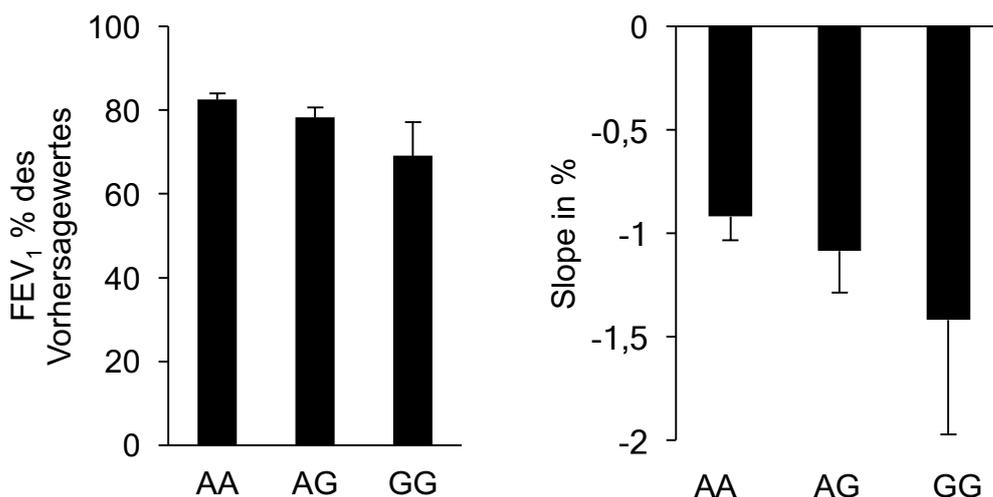


Abb. 23: CHIA rs61756687 Varianten und FEV₁ (links) bzw. Slope (rechts)

Links: Die Abbildung zeigt den Mittelwert des FEV₁ in Prozent des Vorhersagewertes in Abhängigkeit von den genetischen CHIA rs61756687 Varianten bei CF-Patienten (n = 495). Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an: AA (n = 349), AG (n = 134), GG (n = 12).

Rechts: Die Abbildung zeigt den durchschnittlichen Abfall des FEV₁ pro Jahr (Slope) in Abhängigkeit von den genetischen CHIA rs61756687 Varianten bei CF-Patienten (n = 418). Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an: AA (n = 292), AG (n = 115), GG (n = 11).

3.6.3 CHIA rs3818822 und Lungenfunktionsparameter

Bei 325 Patienten konnte sowohl der Genotyp des SNPs rs3818822 als auch das FEV₁ bestimmt werden. Dabei wiesen Patienten mit dem Genotyp AA das geringste FEV₁ mit einem Mittelwert von $74,99 \pm 38,97$ % auf. Patienten mit dem Genotyp AG (Mittelwert $82,06 \pm 28,36$ %) und GG (Mittelwert $81,68 \pm 25,91$ %) hatten annähernd gleiche durchschnittliche FEV₁-Werte (siehe Abbildung 30 links). Bezüglich des FEV₁ und den einzelnen Genotypen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($P = 0,848$).

Von 266 Patienten konnte sowohl der Genotyp des SNPs rs3818822 im CHIA-Gen als auch der Slope erhoben werden. Dabei wiesen Patienten mit den Genotypen GG (Mittelwert $-1,02 \pm 1,95$ %) und AG (Mittelwert $-1,04 \pm 2,33$ %) einen stärkeren Abfall des FEV₁ auf als Patienten mit dem Genotyp AA (Mittelwert $-0,02 \pm 1,57$ %) (siehe Abbildung 30 rechts). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($P = 0,547$).

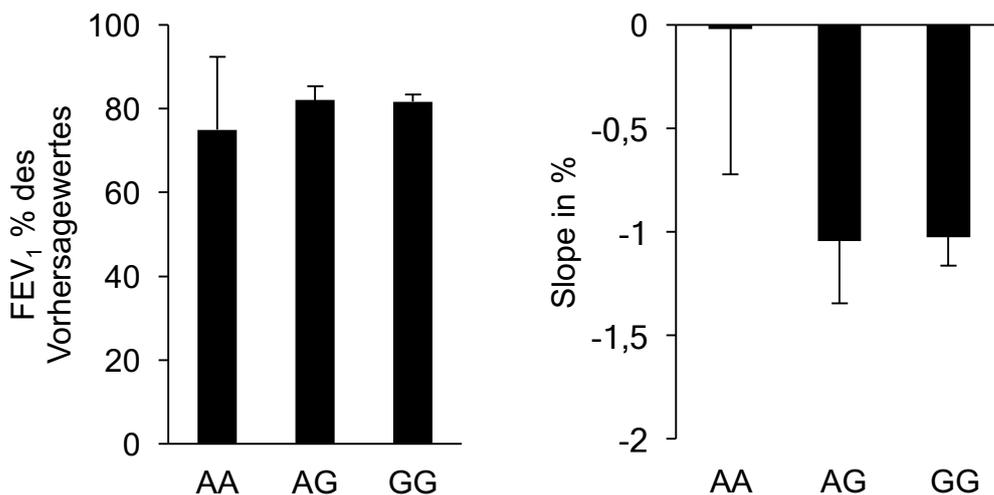


Abb. 24: CHIA rs3818822 Varianten und FEV₁ (links) bzw. Slope (rechts)

Links: Die Abbildung zeigt den Mittelwert des FEV₁ in Prozent des Vorhersagewertes in Abhängigkeit von den genetischen CHIA rs3818822 Varianten bei CF-Patienten ($n = 325$). Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an: AA ($n = 5$), AG ($n = 76$), GG ($n = 244$).

Rechts: Die Abbildung zeigt den durchschnittlichen Abfall des FEV₁ pro Jahr (Slope) in Abhängigkeit von den genetischen CHIA rs3818822 Varianten bei CF-Patienten ($n = 266$). Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an: AA ($n = 5$), AG ($n = 59$), GG ($n = 202$).

4 Diskussion

CF-Patienten weisen trotz gleicher *CFTR*-Mutation teilweise erhebliche Unterschiede bezüglich des Schweregrads der pulmonalen Erkrankung auf [111; 112; 113]. Diese Beobachtung ließ auf zusätzliche relevante Einflussfaktoren schließen. Mehrere Studien demonstrierten, dass der pulmonale Phänotyp maßgebend von modifizierenden Genen abhängig zu sein scheint [113; 114; 115].

Die pulmonale Erkrankung ist gekennzeichnet durch rezidivierende Infektionen mit stetiger Zerstörung des Lungengewebes und daraus resultierendem Versagen der Lungenfunktion. Neben bakteriellen Keimen wurde in den vergangenen Jahren eine Zunahme pulmonaler Pilzbesiedlungen beobachtet [38; 40; 41]. Es ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt, ob diese als infektiöse Erreger den Organismus schädigen oder nur als natürliche Besiedlung vorkommen [38].

Ein wesentlicher Zellwandbestandteil von Pilzen ist Chitin, welches durch Enzyme, sogenannte Chitinasen, gespalten werden kann. Durch diesen Mechanismus stellen Chitinasen bei Pflanzen eine Art Abwehrwaffe gegenüber Chitin-haltigen Pathogenen dar [139; 140; 212; 213]. Beim Menschen konnten ebenfalls aktive Chitinasen nachgewiesen werden, die Chitotriosidase [144; 145] und AMCase [146].

Aufgrund dieser Erkenntnisse war die Zielsetzung unserer Arbeit, genetische Varianten der humanen aktiven Chitinasen, Chitotriosidase und AMCase, bei CF-Patienten zu analysieren und diese auf Zusammenhänge mit verschiedenen pulmonalen Erregern und der Lungenfunktion als mögliche modifizierende Gene zu untersuchen.

4.1 Pulmonaler Erregerbefall

Im hier untersuchten Patientenkollektiv konnten als häufigste fungale Erreger *C. albicans* und *A. fumigatus* nachgewiesen werden, gefolgt von *C. parapsilosis*, *C. glabrata* und *A. flavus*.

Der Hefepilz *C. albicans* wurde bei 79,5 % der Patienten mindestens einmal dokumentiert, 14,3 % wiesen bereits einen intermittierenden bis chronischen Befall auf. In den letzten Jahrzehnten konnte ein massiver Anstieg pulmonaler *C. albicans* Nachweise beobachtet werden. Eine Studie von Bauernfeind et al. 1987 zeigte noch eine geringe Prävalenz von 29,4 % [214]. Im Jahr 2001 wiesen Máiz und Mitarbeiter bereits ein Vorkommen von 87,9 % nach [215]. Spätere Studien ergaben ähnlich hohe Prävalenzwerte zwischen 60,7 % und 78,3 % [39; 51; 52]. Die zusätzlich in dieser Arbeit untersuchten Hefen *C. parapsilosis* und *C. glabrata* wurden weitaus weniger nachgewiesen, wie auch schon in anderen Studien zuvor [39; 52; 216].

Der Schimmelpilz *A. fumigatus* trat bei 66,3 % der Patienten mindestens einmal auf, 34,1 % waren bereits intermittierend bis chronisch kolonisiert. Über den pulmonalen Befall mit *A. fumigatus* bei CF-Patienten existieren diverse Studien. Die Prävalenzen weisen eine große Spannbreite von 5,9 - 78,8 % auf [39; 45; 52; 214]. Der zusätzlich in dieser Arbeit untersuchte Schimmelpilz *A. flavus* trat mit der geringsten Häufigkeit auf, ähnlich einer Studie von Masoud-Landgraf et al. [39].

Bezüglich Ursachen der unterschiedlichen Prävalenzen von Pilzen gibt es viele Hypothesen. Zum einen könnten die Unterschiede auf verschiedene Altersspannen zurückgeführt werden. Mit zunehmendem Alter steigt die pulmonale Prävalenz von Pilzen [45; 217]. Auch geografische Unterschiede und klimatische Bedingungen müssen berücksichtigt werden. Simmonds und Mitarbeiter konnten aufzeigen, dass CF-Patienten mit hohen Titern von Antikörpern gegen *A. fumigatus* signifikant häufiger in ländlichen Gebieten lebten [218].

Zum anderen ist der Fortschritt in Diagnostik und Therapie zu bedenken. Die diagnostischen Nachweismethoden haben sich durch neuere technische Verfahren verbessert, was eine Erhöhung der Sensitivität und Spezifität nach sich zieht [39; 216; 219; 220]. Auch die Therapiemöglichkeiten entwickeln sich in rasanter Geschwindigkeit. Neben regelmäßigen Inhalationen und Physiotherapie kommen Antibiotika zur frühzeitigen Infektsanierung sowie Steroide zur Behandlung akuter Entzündungsprozesse zum Einsatz. Zu beachten hierbei ist, dass der vermehrte Einsatz von inhalativen Antibiotika und Kortikosteroiden laut Studien jedoch zu einem stärkeren pulmonalen Pilzbefall beiträgt [218; 219; 221].

Die diagnostischen Methoden unserer Studie waren folgender Limitierung ausgesetzt: Bei den hier eingeschlossenen Teilnehmern handelte es sich sowohl um erwachsene als auch pädiatrische Patienten. Gerade kleinen Kindern ist es häufiger nicht möglich, genügend Sputum „hochzuhusten“. Bei diesen wurde anstatt Sputum ein tiefer Rachenabstrich entnommen. Nicht ausgeschlossen sind dabei eine Kontamination mit Erregern der Mundflora und abweichende Keimanzahlen im Bezug zu den tiefen Atemwegen. Armstrong und Mitarbeiter kamen zu dem Entschluss, die BAL sei oropharyngealen Kulturen hinsichtlich der Vorhersage für Erreger in den unteren Atemwegen überlegen [222]. Eine aktuelle Studie von D´Sylva und Mitarbeitern kam zu dem gleichen Ergebnis [223]. Demgegenüber steht eine Studie von Jain et al., die keinen Benefit der BAL gegenüber oropharyngealen Kulturen feststellten [224]. Aktuell findet die BAL aufgrund der Invasivität im klinischen Alltag keine routinemäßige Anwendung.

4.2 Lungenfunktion

Da die Mortalität von CF-Patienten maßgebend durch die pulmonale Manifestation bestimmt wird, sind FEV₁ und Slope wichtige Parameter des pulmonalen Zustands [62; 63; 206]. Das FEV₁ lag bei unseren untersuchten Patienten im Mittel bei 81 ± 27 % mit einem durchschnittlichen Abfall von -0,98 ± 2,0 % pro Jahr. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse stark abhängig von der Mitarbeit des Patienten sind. Zudem können pulmonale Infekte die Lungenfunktion temporär herabsetzen, sodass schlechtere Werte dokumentiert werden. Aufgrund der hohen Anzahl an Messungen spielten diese jedoch eine untergeordnete Rolle.

In unserer Studie konnten signifikante Korrelationen zwischen *A. fumigatus*, *A. flavus* und *C. glabrata* bezüglich des FEV₁ nachgewiesen werden. Je stärker der pulmonale Befall mit diesen Erregern war, desto niedriger war auch das gemessene FEV₁. Für *C. albicans* und *C. parapsilosis* wurde solch ein Zusammenhang mit dem FEV₁ nicht festgestellt.

Bezüglich Korrelationen zwischen pulmonalem Pilzbefall und einer reduzierten Lungenfunktion bei CF-Patienten existieren weitere Studien mit unterschiedlichsten Ergebnissen. Navarro und Kollegen führten im europäischen epidemiologischen Register für Mukoviszidose eine Querschnittanalyse durch, um Einflussfaktoren auf das FEV₁ zu identifizieren. Dabei waren sowohl die *Aspergillus*- als auch die *Candida*-Besiedlung mit einem um 5 - 10 % reduzierten FEV₁ assoziiert. Einzelne Pilz-Arten oder mögliche Ursachen wurden hier jedoch nicht näher betrachtet [225]. Eine Studie von Maiz et al. hingegen konnte weder *C. albicans* noch *A. fumigatus* als unabhängigen Risikofaktor für eine Beeinträchtigung der Lungenfunktion nachweisen [226].

Chotirmall veröffentlichte 2010 eine Studie, welche erstmals das FEV₁ als eigenständigen Faktor mit der pulmonalen Besiedlung durch *C. albicans* in Verbindung brachte. Er führte eine prospektive Beobachtungsstudie an 89 CF-Patienten über 11 Jahre durch. Dabei ermöglichte die Häufigkeitsverteilung des

C. albicans Wachstums im Sputum eine Einteilung der Kohorte hinsichtlich des Kolonisationsstatus. Der intermittierende und chronische Befall der Atemwege war mit einer stärkeren Abnahme des FEV₁ und einer erhöhten Hospitalisierungsrate assoziiert [51]. Zu dem gleichen Ergebnis ist auch eine Studie von Gileles-Hillel et al. 2015 gekommen [54].

In unserer Studie wurde *C. glabrata* mit einem signifikanten FEV₁-Abfall in Verbindung gebracht. Solch ein Zusammenhang konnte für *C. albicans* nicht beobachtet werden. Dies könnte möglicherweise durch Kohortenunterschiede in den Studien erklärt werden, da vorangegangene Studien oftmals nur an Erwachsenen durchgeführt wurden. Darüber hinaus könnte die Diskrepanz auf Unterschiede zwischen den beiden Pilz-Arten in Bezug auf die Bildung von Hyphen und Infektionsstrategien zurückzuführen sein [227].

In einer retrospektiven Kohortenstudie von Amin et al. 2010 an 230 CF-Patienten war eine persistierende *A. fumigatus* Kolonisation in den unteren Atemwegen mit einer verringerten Lungenfunktion und vermehrten Hospitalisierungen verbunden. Eine persistierende Infektion war hierbei definiert als das Vorliegen von mindestens zwei positiven Sputum- oder BAL-Kulturen pro Jahr. Das FEV₁ war bei diesen Patienten signifikant geringer als bei CF-Patienten ohne persistierende Kolonisation [58]. Eine Studie von de Vrankrijker et al. 2011 konnte diesen Zusammenhang nicht bestätigen [228]. Unsere Ergebnisse stützen die Annahme, dass eine pulmonale Kolonisation mit *A. fumigatus* zu einem Lungenfunktionsabfall führt.

4.3 Assoziationen mit *CHIT1* rs3831317

Das *CHIT1*-Gen kodiert die Chitotriosidase, welche 1995 als erste aktive Chitinase im Menschen entdeckt wurde [144; 145]. Die Aktivität des Enzyms wird durch eine 24-bp-Duplikation im *CHIT1*-Gen (rs3831317) beeinflusst [174]. Seibold und Mitarbeiter analysierten in einer Studie an 91 Probanden, darunter 40 Patienten mit Asthma (Nichtraucher), 25 Patienten mit milder COPD (Raucher) und 26 gesunde Kontrollteilnehmer, die pulmonale Chitinaseaktivität in Sekret aus BAL. Zusätzlich bestimmten sie die Chitotriosidase- und AMCase-Genexpression in Epithelzellen und Makrophagen der Lunge. Dabei zeigte sich bei Probanden mit Homozygotie für die *CHIT1* 24-bp-Duplikation eine fehlende Chitinaseaktivität. Die AMCase-Genexpression war hingegen normal. Sie schlussfolgerten daraus, die Chitotriosidase sei die primär aktive Chitinase in den Atemwegen des Menschen. Zudem konnten sie bei Patienten, welche eine Heterozygotie für die 24-bp-Duplikation aufwiesen, erniedrigte Chitinaseaktivitäten messen. Dies ließ auf einen Gen-Dosis-Effekt schließen [170].

Aufgrund der Annahme einer fungiziden Wirkung der Chitotriosidase [146; 149; 171; 172; 173] und steigender Prävalenz der fungalen Atemwegs-Kolonisation bei CF-Patienten [38; 40; 41] war von Interesse zu bestimmen, ob die 24-bp-Duplikation im *CHIT1*-Gen bei der CF-Lungenerkrankung für Infektionen mit Pilzpathogenen prädisponiert.

Um die Rolle der Chitotriosidase als hauptsächlich aktive Chitinase bei der CF-Lungenerkrankung fokussiert zu analysieren, wurde eine Studie an den CF-Zentren Tübingen und Dublin durchgeführt [211], welche mitunter auch genetische Daten aus der hier durchgeführten Studie beinhaltet. Ziel dieser Studie von Hector et al. war es, die Chitinaseaktivität systemisch im Blut und in durch BAL gewonnener Atemwegsflüssigkeit bei Patienten mit CF und allergischem Asthma im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden zu analysieren. Hector und Kollegen konnten nachweisen, dass die Chitinaseaktivität bei CF-Patienten im Vergleich zu Asthmatikern und gesunden Kontrollprobanden systemisch erhöht war. Aufgrund der Heterogenität der CF-

Lungenerkrankung folgten Korrelationsanalysen, um Faktoren, die mit der Chitinaseaktivität assoziiert waren, genauer zu beurteilen. Unter allen relevanten Einflussfaktoren, darunter Alter, Geschlecht, BMI, *CFTR*-Genotyp, Kolonisationsstatus von Bakterien und Pilzen sowie Medikamenteneinnahmen, ergab nur die Besiedlung mit *C. albicans* einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der systemischen Chitinaseaktivität. Diese zeigte sich bei CF-Patienten mit *C. albicans* Kolonisierung erhöht im Vergleich zu nicht-kolonisierten Patienten. Für *A. fumigatus* konnte solch eine Korrelation nicht nachgewiesen werden. Anschließend analysierten Hector und Kollegen die Chitinaseaktivität in der Atemwegsflüssigkeit von CF-Patienten. Auch hier wurde eine erhöhte Aktivität bei Patienten mit *C. albicans* Kolonisierung im Vergleich zu nicht-kolonisierten Patienten beobachtet. Zusammenfassend zeigten diese Daten eine erhöhte Chitinaseaktivität bei CF-Patienten und eine Assoziation mit der Kolonisierung durch *C. albicans*.

Weiterhin war es von Interesse, ob ein genetischer Chitinase-Mangel bei CF-Patienten mit einer erhöhten Anfälligkeit für eine *C. albicans* Kolonisierung in den Atemwegen assoziiert ist. In der hier durchgeführten Arbeit analysierten wir zunächst die 24-bp-Duplikation im *CHIT1*-Gen (rs3831317) an einer großen europäischen CF-Patienten-Kohorte. Bei 5,6 % der Patienten wurde diese dabei homozygot nachgewiesen. 31,1 % wiesen eine Heterozygotie auf, bei 63,3 % lag der Wildtyp vor. In der Normalbevölkerung sind ähnliche Verteilungen der Genotypen bereits in früheren Studien ausführlich beschrieben worden [174; 175; 176; 177; 178; 229], weshalb wir hier auf eine gesunde Kontrollgruppe verzichteten. Anschließend wurden in dieser Arbeit Assoziationen zwischen dem genetischen Chitinase-Mangel und der fungalen Atemwegs-Kolonisation untersucht. Auch hier erschien uns der Einschluss einer gesunden Kontrollgruppe als nicht zielführend, da gesunde Kontrollprobanden keine relevante fungale Atemwegs-Kolonisation aufweisen.

Unsere Untersuchungen zeigten eine Assoziation zwischen *C. albicans* und *CHIT1*. Patienten mit der 24-bp-Duplikation auf beiden Allelen wiesen einen signifikant stärkeren Befall mit *C. albicans* als Patienten mit Wildtyp auf

($P = 0,012$). Unter Einbeziehung der heterozygoten Polymorphismus-Träger konnte der von Seibold et al. beschriebene Gen-Dosis-Effekt hier jedoch nicht bestätigt werden ($P = 0,108$). Darüber hinaus wurde ein stärkerer Befall mit *A. fumigatus*, *A. flavus* und *C. parapsilosis* bei Patienten mit Homozygotie für die 24-bp-Duplikation beobachtet, diese Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant. Für *C. glabrata* wurde paradoxerweise eine signifikante Assoziation mit dem Wildtyp festgestellt ($P = 0,032$). Dies könnte auf die kleine Fallzahl der homozygoten Träger der 24-bp-Duplikation ($n = 20$) zurückzuführen sein. Zukünftige Studien an größeren Kohorten könnten darüber Aufschluss geben.

In unserer Studie wiesen Patienten mit der 24-bp-Duplikation auf beiden Allelen im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp einen signifikant stärkeren Befall mit *C. albicans*, hingegen nicht mit *A. fumigatus* auf. Da Chitin jedoch in den Zellwänden beider Pilze vorhanden ist, gibt es für diese Unstimmigkeit aktuell keine Erklärung. Eine Möglichkeit wäre die Zurückführung auf unterschiedliche Pilzmorphologien in der Atemwegsumgebung, was weitere Untersuchungen erfordert.

Weitere Forschungsgruppen konnten ebenfalls erhöhte Chitinaseaktivitäten in pulmonalen inflammatorischen Erkrankungen nachweisen [165; 166; 167; 168; 169]. Vicencio und Kollegen stellten einen Zusammenhang zwischen der 24-bp-Duplikation und Asthma bronchiale her, wobei die Studie nur sechs Patienten beinhaltete und alle eine Heterozygotie bezüglich der 24-bp-Duplikation aufwiesen, keiner eine Homozygotie [179]. Eine größer angelegte Studie von Sinha et al. an 964 Probanden konnte ebenfalls eine Assoziation zwischen den heterozygoten Trägern und Asthma bronchiale aufzeigen [230]. Im Gegensatz dazu existieren auch mehrere Studien an Asthma-Patienten, welche diesen Zusammenhang widerlegen [180; 181]. Hinsichtlich der CF-Lungenerkrankung wurde bis dato noch kein direkter Zusammenhang zwischen der Lungenfunktion und der 24-bp-Duplikation erforscht. In unserer Arbeit wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den *CHIT1*-Genotypen und den Lungenfunktionsparametern eruiert.

4.4 Assoziationen mit *CHIA* rs61756687 und rs3818822

Das *CHIA*-Gen kodiert das chitinolytische Enzym AMCase, welches 2001 als weitere aktive Chitinase im Menschen entdeckt wurde [146]. Es wird vor allem durch Makrophagen im Gastrointestinaltrakt und der Lunge sezerniert [186; 187]. Dem Enzym wird eine Rolle in der angeborenen Immunantwort zugeschrieben [154]. Eine Studie von Zhu et al. 2004 demonstrierte einen Zusammenhang zwischen der erhöhten AMCase-Expression und Asthma bronchiale [188]. Auch andere Forscher stellten solch einen Zusammenhang dar [150; 189]. Basierend auf der Studie von Zhu et al. setzten sich Bierbaum und Kollegen das Ziel, häufige genetische Varianten der AMCase mittels Gen-Sequenzierung zu identifizieren und auf einen möglichen Zusammenhang mit Asthma bronchiale zu analysieren. Mehrere Polymorphismen wurden bei 322 Kindern mit Asthma, 270 erwachsenen Kontrollpersonen und einer pädiatrischen Kontrollpopulation, welche 565 Kinder umfasste, genotypisiert. Dabei konnten sie eine Assoziation der SNPs rs61756687 und rs3818822 mit Asthma bronchiale aufzeigen [197]. In unserer Arbeit wurden daher als genetische AMCase-Varianten die SNPs rs61756687 und rs3818822 analysiert.

Bei unserer Untersuchung des SNPs rs61756687 im *CHIA*-Gen wurden die Genotypen wie folgt ermittelt: AA 70,6 %, AG 26,7 % und GG 2,7 %. Der SNP rs3818822 im *CHIA*-Gen zeigte eine Genotypenverteilung von AA 1,7 %, AG 22,2 % und GG 76,1 %. In der Literatur sind ähnliche in der Normalbevölkerung auftretende Verteilungshäufigkeiten der SNPs angegeben [197; 198; 199; 200; 202], weshalb wir keine gesunde Kontrollgruppe inkludierten.

Aufgrund der chitinolytischen Aktivität des Enzyms war es für uns auch hier von Interesse zu analysieren, ob diese Polymorphismen im *CHIA*-Gen bei CF-Patienten mit einer erhöhten Anfälligkeit für pulmonale Pilzbesiedlungen und Abnahme der Lungenfunktion assoziiert sind.

In unserer Studie zeigte der SNP rs61756687 im *CHIA*-Gen einen signifikanten Zusammenhang mit *A. fumigatus* ($P = 0,031$) und *A. flavus* ($P = 0,000$). Patienten mit dem Genotyp AA wiesen einen stärkeren Befall auf als Patienten mit Genotyp GG. Unter Einbeziehung des Genotyps AG zeigte sich jedoch sowohl für *A. fumigatus* ($P = 0,057$) als auch für *A. flavus* ($P = 0,981$) keine signifikante Assoziation mehr. Für den Kolonisationsstatus von *Candida* konnte keine Verbindung mit dem SNP hergestellt werden.

In der Studie von Bierbaum et al. wurde über eine Assoziation zwischen dem SNP *CHIA* rs61756687 und Asthma bronchiale berichtet. Dabei waren Patienten mit dem G-Allel anfälliger für Asthma bronchiale, das A-Allel war mit einem gewissen Schutz assoziiert. Die AMCcase-Aktivität wurde hierbei nicht gemessen [197]. Die Stelle des SNPs *CHIA* rs61756687 ist nur 7 Aminosäuren von der katalytischen Domäne des Enzyms entfernt. Diese Missense-Mutation führt zu einem Basenaustausch von Adenin zu Guanin, woraus ein Aminosäureaustausch von Lysin zu Arginin resultiert [185]. Unsere Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass dieser Aminosäureaustausch die katalytische Aktivität der AMCcase moduliert und dadurch einer vermehrten Kolonisation mit *Aspergillus* vorbeugt. Dies könnte durch eine erhöhte Chitinaseaktivität bedingt sein. Die Beobachtungen von Bierbaum bezüglich des G-Allels und der vermehrten Anfälligkeit für Asthma bronchiale [197] in Verbindung mit weiteren Forschungsergebnissen über eine erhöhte AMCcase-Expression bei Asthma bronchiale [188; 189; 190] würden unsere Annahme stützen. Warum diese Modulation nicht auch zu einer vermehrten *Candida*-Besiedelung beiträgt, obwohl beide Pilzgattungen aus einem chitinhaltigen Grundgerüst bestehen, bleibt unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Häufigkeitsverteilung der Genotypen lässt darauf schließen, dass der Genotyp AA trotz höherer Anfälligkeit für Pilzkolonisationen bei CF-Patienten zu keiner evolutionären Selektion führt.

Der SNP *CHIA* rs3818822 zeigte in unserer Studie weder für die *Aspergillus*- noch für die *Candida*-Arten eine signifikante Korrelation. Es bestand jedoch eine Tendenz im Sinne vermehrter Erregerbefälle von *C. albicans* ($P = 0,499$), *A. fumigatus* ($P = 0,732$) und *A. flavus* ($P = 0,111$) bei Patienten mit Genotyp AA im Vergleich zu jenen mit Genotyp AG und GG.

Amuniddin und Mitarbeiter untersuchten genetische Varianten in Chitinasen im Zusammenhang mit der Erkrankung COPD an einer großen Kohorte von 4344 Probanden. Diese Studie beinhaltete unter anderem den SNP *CHIA* rs3818822. Probanden mit Genotyp GG wiesen hierbei eine signifikant bessere Lungenfunktion als Probanden mit Genotyp AA auf. Darüber hinaus exprimierten Probanden mit Genotyp GG signifikant höhere AMCCase-Level, gemessen in pulmonalem Sekret aus BAL. Die in BAL zusätzlich gemessene Chitinaseaktivität war bei Probanden mit Genotyp GG ebenfalls erhöht [203].

Die Tendenz von vermehrtem pulmonalen Pilzbefall bei CF-Patienten mit Genotyp AA in unserer Studie in Verbindung mit den Ergebnissen von Amuniddin et al. geben Grund zu der Annahme, dass das G-Allel des SNPs *CHIA* rs3818822 einen gewissen protektiven Effekt gegenüber chitinhaltigen Pathogenen haben könnte und dies durch eine erhöhte Chitinaseaktivität bedingt ist.

Der Grund für die fehlende Signifikanz könnte unter anderem in der untersuchten Kohortengröße liegen. Die untersuchte Kohorte bezüglich des SNPs rs3818822 fiel im Vergleich zu den hier in dieser Studie untersuchten anderen beiden Polymorphismen wesentlich kleiner aus, da sich die Analyse des SNPs rs3818822 im *CHIA*-Gen problematisch gestaltete. Der Vorwärts-Primer war nicht vollständig komplementär zur Strang-DNA. Die Amplifikation war erschwert, da die Taq-Polymerase am 3'-Ende anknüpft und sich hier direkt der zu untersuchende SNP befindet. Deswegen konnte der SNP nur an 355 Proben erfolgreich untersucht werden.

Die AMCase wurde in Verbindung mit Asthma bronchiale bereits ausführlich untersucht [150; 188; 189; 190]. Ein genetischer Zusammenhang zwischen den SNPs rs61756687 und rs3818822 im *CHIA*-Gen und der CF-Lungenerkrankung wurde jedoch noch nicht erforscht. Bierbaum und Kollegen stellten eine Beziehung zwischen den beiden SNPs im *CHIA*-Gen und Asthma bronchiale her. Auf die Lungenfunktion wurde dabei nicht eingegangen [197]. Demgegenüber steht eine Studie von Chatterjee et al., welche keine Korrelationen mit den beiden SNPs bei Asthma bronchiale nachwies [199]. Wu und Kollegen konnten dies für den SNP rs3818822 bei Asthma-Patienten ebenfalls nicht [181]. In der Studie von Aminuddin et al. konnte bei Patienten mit COPD ein genetischer Zusammenhang zwischen dem SNP rs3818822 im *CHIA*-Gen und der Lungenfunktion hergestellt werden [203].

Die Lungenerkrankungen Asthma bronchiale und COPD weisen Ähnlichkeiten mit CF auf. Alle drei Erkrankungen sind durch chronische Entzündungen der Atemwege gekennzeichnet [231; 232; 233]. Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich Ätiologie und Genetik erheblich, sodass die erhobenen Ergebnisse an Patienten mit Asthma oder COPD nicht automatisch Rückschlüsse auf CF-Patienten erlauben. Aufgrund der Gemeinsamkeiten ist es jedoch naheliegend, auch bei CF-Patienten den Einfluss der SNPs rs61756687 und rs3818822 im *CHIA*-Gen auf die Lungenfunktion zu erforschen.

In unserer Arbeit wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Genotyp-Varianten dieser SNPs im *CHIA*-Gen und den Lungenfunktionsparametern FEV₁ und Slope gefunden.

4.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnten wir in unserer Studie an CF-Patienten *C. albicans* und *A. fumigatus* als häufigste fungale Vertreter im Respirationstrakt nachweisen. Zudem konnten wir zeigen, dass eine vermehrte Kolonisierung durch *A. fumigatus*, *A. flavus* und *C. glabrata* mit einer verringerten Lungenfunktion bei CF-Patienten korreliert.

Unterschiede in Alter, Herkunft und Umweltexposition, sowie verschiedene Nachweismethoden und stattgehabte Therapien verkomplizieren den Vergleich mit anderen Studien. Da sich die fungale Kolonisation bei CF jedoch erst mit dem Krankheitsverlauf entwickelt und unterschiedlich schnell voranschreitet, ist es wichtig, ein relativ breites Altersspektrum in Studien zu umfassen. Eine einheitliche Routinediagnostik existiert aktuell nicht, ist jedoch für eine Verbesserung der Vergleichbarkeit von Studien hinsichtlich Epidemiologie, Erregervorkommen und daraus resultierenden Therapieentscheidungen essentiell [234; 235]. Zudem ist die Einteilung des Kolonisationsstatus für Bakterien und Pilze Zentren-übergreifend nicht einheitlich [51; 236]. Auch dies ist methodisch sehr wichtig, um eine objektivierbare Vergleichbarkeit des Erregervorkommens herstellen zu können. Sinnvoll wäre eine geplante prospektive Studie mit einheitlichen Probenentnahmen zur Eruiierung der Lungenerreger über einen längeren Zeitraum an ein und derselben Kohorte.

Die Ausprägung der respiratorischen Symptomatik wird zu über 50 % von modifizierenden Genen beeinflusst [113; 114; 115], weshalb die Erforschung solcher Gene einen immer größeren Stellenwert einnimmt.

Problematisch an vielen Studien ist dabei die oftmals zu geringe Fallzahl, sodass die Replizierung der Ergebnisse an großen Kohorten häufig nicht gelingen konnte. Es existieren daher viele kontroverse Ergebnisse, sodass über die meisten modifizierenden Gene keine endgültige Aussage getroffen werden kann.

In unsere Studie wurden 528 Patienten eingeschlossen. Die Studienparameter wurden so weit wie möglich versucht, homogen zu halten. Eine generelle Herausforderung bei Genotyp-Phänotyp-Analysen bei CF ist jedoch die große Heterogenität der CF-Lungenerkrankung. Durch die Größe der hier analysierten Kohorte und die standardisierte DNA-Analysemethodik haben wir versucht, diese heterogenen Einflussfaktoren zu minimieren. Die Einteilung der Patienten hinsichtlich verschiedener Studienparameter in Subkohorten wäre interessant, würde sich jedoch aufgrund der damit einhergehenden deutlich verringerten Stichprobengrößen negativ auf die Aussagekraft der Korrelationen auswirken.

Unsere Arbeit kam zu dem Schluss, *CHIT1* als mögliches modifizierendes Gen für ein vermehrtes Aufkommen von *C. albicans* zu betrachten. Eine Inaktivierung des Enzyms durch die 24-bp-Duplikation im *CHIT1*-Gen auf beiden Allelen war mit einer erhöhten Anfälligkeit für eine Besiedlung mit *C. albicans* assoziiert. Darüber hinaus wiesen wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem SNP rs61756687 im *CHIA*-Gen und dem Kolonisationsstatus mit *A. fumigatus* und *A. flavus* bei der CF-Lungenerkrankung nach. Der SNP rs3818822 im *CHIA*-Gen zeigte ebenfalls eine Tendenz mit dem pulmonalen Pilzaufkommen, sodass zusammen betrachtet auch das *CHIA*-Gen als mögliches modifizierendes Gen in Betracht kommt.

Interessant wäre, ob ein Mangel an Chitotriosidase durch das Vorhandensein der AMCCase teilweise kompensiert werden könnte. Da *CHIT1* den nachweislich relevanten Effekt auf die Chitinaseaktivität in der Lunge hat [170], wäre es denkbar, Patienten mit der 24-bp-Duplikation auf beiden Allelen jenen mit zusätzlichen Polymorphismen im *CHIA*-Gen gegenüberzustellen. In unserer Studie waren jedoch nur 29 Patienten homozygot für die 24-bp-Duplikation im *CHIT1*-Gen. Es gab darunter keinen einzigen Patienten, der zusätzlich beide Polymorphismen rs61756687 und rs3818822 im *CHIA*-Gen aufwies. Einzeln betrachtet gab es für den SNP rs3818822 ebenfalls keinen Patienten, welcher zusätzlich die 24-bp-Duplikation trug. Für den SNP rs61756687 existierte nur

ein einziger Patient. Eine statistische Auswertung war hierfür somit nicht möglich.

Offen geblieben ist zudem die Frage nach dem Einfluss auf die Chitinaseaktivität. Die enzymatische Aktivität von Chitotriosidase und AMCase bei der CF-Lungenerkrankung wurde in dieser Arbeit nicht gemessen. In zukünftigen Studien wäre dies wünschenswert, um einen Zusammenhang zwischen der Genexpression und resultierenden Enzymaktivität herzustellen.

Bezüglich der Lungenfunktion konnten keine direkten Zusammenhänge mit den Polymorphismen im *CHIT1*- und *CHIA*-Gen eruiert werden.

Die gesamte Kausalkette vom *CHIT1*- bzw. *CHIA*-Polymorphismus über eine veränderte Enzymaktivität zu einem generell vermehrten Pilzbefall mit daraus resultierender Reduzierung der Lungenfunktion konnte hier nicht bestätigt werden. Damit bleibt die klinische Relevanz von Polymorphismen im *CHIT1*- und *CHIA*-Gen bei CF-Patienten weiterhin unklar. Schlussendlich sind zur Klärung der Wirkung dieser Polymorphismen auf die Enzymaktivität und Substratspezifität noch weitere Studien nötig, um die Hypothese des relevanten Potentials als modifizierende Gene zu bestätigen.

5 Zusammenfassung

Die zystische Fibrose (CF) ist eine lebensverkürzende, monogenetische Stoffwechselerkrankung, welche auf Mutationen im *CFTR*-Gen beruht. Die fortschreitend verlaufende Lungenfunktionsstörung mit rezidivierenden Atemwegsinfekten ist Hauptursache für Morbidität und Mortalität bei CF. Trotz gleicher *CFTR*-Mutation variiert der pulmonale Phänotyp teilweise erheblich unter CF-Patienten, sodass die Erforschung modifizierender Gene immer mehr in den Vordergrund rückt. Über Assoziationen zwischen modifizierenden Genen und der Anfälligkeit für Pilze bei der CF-Lungenerkrankung ist noch sehr wenig bekannt. Da in der Vergangenheit eine Zunahme pulmonaler Pilzbesiedlungen bei CF-Patienten beobachtet wurde und Chitin ein wesentlicher Zellwandbestandteil von Pilzen ist, untersuchten wir in dieser Arbeit genetische Varianten der für Chitinasen kodierenden Gene *CHIT1* und *CHIA* als mögliche Modifikatoren bei der CF-Lungenerkrankung.

Unsere Studie schloss 528 CF-Patienten aus Deutschland und Österreich ein. Neben der Erfassung von Alter, Geschlecht und zugrundeliegender *CFTR*-Mutation wurden über einen Zeitraum von 2 bis 3 Jahren der pulmonale Erregerbefall und Lungenfunktionsparameter erhoben. Hierbei wurden *C. albicans* und *A. fumigatus* als häufigste fungale Vertreter im Respirationstrakt nachgewiesen, gefolgt von *C. parapsilosis*, *C. glabrata* und *A. flavus*. Die Lungenfunktion, gemessen am FEV₁, lag im Mittel bei 81 ± 27 %. Ein pulmonaler Befall mit *A. fumigatus*, *A. flavus* und *C. glabrata* korrelierte mit einem verminderten FEV₁ im Vergleich zur Norm. Für *C. albicans* und *C. parapsilosis* ergaben sich keine Korrelationen mit der Lungenfunktion.

Im Labor ermittelten wir die Genotypen des Polymorphismus rs3831317 im *CHIT1*-Gen (24-bp-Duplikation) und der SNPs rs61756687 sowie rs3818822 im *CHIA*-Gen. Die Häufigkeitsverteilung der Genotypen aller drei in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen bei CF-Patienten war vergleichbar mit der in der Normalbevölkerung.

Bei der Untersuchung von Effekten der Genotyp-Varianten auf den pulmonalen Erregerbefall konnte der Polymorphismus rs3831317 im *CHIT1*-Gen mit dem

C. albicans Befallstatus in Verbindung gebracht werden. Die 24-bp-Duplikation auf beiden Allelen war mit einer erhöhten Anfälligkeit für eine Besiedlung mit *C. albicans* assoziiert. Darüber hinaus wiesen wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem SNP rs61756687 im *CHIA*-Gen und dem Kolonisationsstatus mit *A. fumigatus* und *A. flavus* bei der CF-Lungenerkrankung nach. Der SNP rs3818822 im *CHIA*-Gen zeigte ebenfalls eine Tendenz mit dem pulmonalen Pilzaufkommen, hier jedoch nicht signifikant. Zum Abschluss untersuchten wir noch den genetischen Einfluss von *CHIT1* rs3831317, *CHIA* rs61756687 und *CHIA* rs3818822 auf die Lungenfunktion. Es wurde kein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Genotyp-Varianten und den Lungenfunktionsparametern gefunden.

Zusammenfassend legen unsere Ergebnisse der Studie nahe, *CHIT1* und *CHIA* als mögliche modifizierende Gene für den pulmonalen Pilzbefall bei der CF-Lungenerkrankung in Betracht zu ziehen.

6 Anhang

**Tabelle 25: Einteilung des Schweregrades der Lungenerkrankung
(modifiziert nach Schluchter et al. 2006 [210])**

Alter	Schwer	Mittelmäßig	Mäßig-mild	Mild
8	≤ 80			
9	≤ 79			
10	≤ 78	≤ 98	> 98-108	≥ 109
11	≤ 77			
12	≤ 75			
13	≤ 72	≤ 94	> 94-108	≥ 109
14	≤ 69			
15	≤ 67			≥ 97
16	≤ 63	≤ 88	>88	≥ 92
17	≤ 60			≥ 90
18	≤ 59			≥ 87
19	≤ 57	≤ 77	>77	≥ 86
20	≤ 54			≥ 84
21	≤ 50	≤ 58	> 58	≥ 82
22	≤ 45			≥ 77
23	≤ 39			≥ 70
24	≤ 36	≤ 50	> 50	≥ 68
25	≤ 34			≥ 67
26				≥ 62
27	≤ 29	≤ 38	>38	≥ 58
28				≥ 54
29				≥ 52
30	≤ 24	≤ 34	> 34	≥ 50
31				≥ 45
32				≥ 32
33				≥ 32

7 Literaturverzeichnis

- [1] Davis, P. B. (2006). Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med*, 173(5), 475-482.
- [2] Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245(4922), 1066-1073.
- [3] Herold, G. (2016). *Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Köln: Herold. 511-512.
- [4] Southern, K. W., Munck, A., Pollitt, R., Travert, G., Zanolla, L., Dankert-Roelse, J., et al. (2007). A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros*, 6(1), 57-65.
- [5] Farrell, P. M. (2008). The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *Journal of Cystic Fibrosis*, 7(5), 450-453.
- [6] Sens, B., & Stern, M. (2012). Qualitätssicherung Mukoviszidose 2012 - Berichtsband. *Bad Honnef: Hippocampus Verlag*.
- [7] Cystic Fibrosis Mutation Database.
<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>.
Abgerufen am 19.08.2019.
- [8] Lao, O., Andres, A. M., Mateu, E., Bertranpetit, J., & Calafell, F. (2003). Spatial patterns of cystic fibrosis mutation spectra in European populations. *Eur J Hum Genet*, 11(5), 385-394.
- [9] Bobadilla, J. L., Macek, M., Jr., Fine, J. P., & Farrell, P. M. (2002). Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*, 19(6), 575-606.
- [10] Bartoszewski, R., Rab, A., Twitty, G., Stevenson, L., Fortenberry, J., Piotrowski, A., et al. (2008). The mechanism of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transcriptional repression during the unfolded protein response. *J Biol Chem*, 283(18), 12154-12165.
- [11] Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, 245(4922), 1073-1080.
- [12] Cheng, S. H., Gregory, R. J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D. W., White, G. A., et al. (1990). Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*, 63(4), 827-834.
- [13] Welsh, M. J., & Smith, A. E. (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*, 73(7), 1251-1254.

- [14] Zielenski, J., & Tsui, L. C. (1995). Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet*, 29, 777-807.
- [15] Haardt, M., Benharouga, M., Lechardeur, D., Kartner, N., & Lukacs, G. L. (1999). C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem*, 274(31), 21873-21877.
- [16] Amaral, M. D. (2015). Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *J Intern Med*, 277(2), 155-166.
- [17] Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B., Drumm, M. L., Melmer, G., Dean, M., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 245(4922), 1059-1065.
- [18] Zielenski, J., Rozmahel, R., Bozon, D., Kerem, B., Grzelczak, Z., Riordan, J. R., et al. (1991). Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*, 10(1), 214-228.
- [19] Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., et al. (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, 346(6282), 362-365.
- [20] Anderson, M. P., Gregory, R. J., Thompson, S., Souza, D. W., Paul, S., Mulligan, R. C., et al. (1991). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science*, 253(5016), 202-205.
- [21] Zeitlin, P. L., Crawford, I., Lu, L., Woel, S., Cohen, M. E., Donowitz, M., et al. (1992). CFTR protein expression in primary and cultured epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(1), 344-347.
- [22] Cheng, S. H., Rich, D. P., Marshall, J., Gregory, R. J., Welsh, M. J., & Smith, A. E. (1991). Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell*, 66(5), 1027-1036.
- [23] Anderson, M. P., Berger, H. A., Rich, D. P., Gregory, R. J., Smith, A. E., & Welsh, M. J. (1991). Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell*, 67(4), 775-784.
- [24] Bear, C. E., Li, C. H., Kartner, N., Bridges, R. J., Jensen, T. J., Ramjeesingh, M., et al. (1992). Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell*, 68(4), 809-818.
- [25] Sheppard, D. N., & Welsh, M. J. (1999). Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev*, 79(1 Suppl), S23-45.
- [26] Wine, J. J. (1999). The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest*, 103(3), 309-312.

- [27] Davis, P. B., Drumm, M., & Konstan, M. W. (1996). Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 154(5), 1229-1256.
- [28] Davies, J. C., Alton, E. W., & Bush, A. (2007). Cystic fibrosis. *Bmj*, 335(7632), 1255-1259.
- [29] Moran, A., Dunitz, J., Nathan, B., Saeed, A., Holme, B., & Thomas, W. (2009). Cystic fibrosis-related diabetes: current trends in prevalence, incidence, and mortality. *Diabetes Care*, 32(9), 1626-1631.
- [30] Ahmad, A., Ahmed, A., & Patrizio, P. (2013). Cystic fibrosis and fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 25(3), 167-172.
- [31] Regnis, J. A., Robinson, M., Bailey, D. L., Cook, P., Hooper, P., Chan, H. K., et al. (1994). Mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis and in normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 150(1), 66-71.
- [32] Randell, S. H., & Boucher, R. C. (2006). Effective mucus clearance is essential for respiratory health. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 35(1), 20-28.
- [33] Hirche, T. O., & Wagner, T. O. F. (2010). *Update Mukoviszidose; Band 3: Physiotherapie, Inhalation, Mukolyse*. Stuttgart: Thieme. 10-11.
- [34] de Vrankrijker, A. M., Wolfs, T. F., & van der Ent, C. K. (2010). Challenging and emerging pathogens in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*, 11(4), 246-254.
- [35] Ledson, M. J., Gallagher, M. J., Jackson, M., Hart, C. A., & Walshaw, M. J. (2002). Outcome of *Burkholderia cepacia* colonisation in an adult cystic fibrosis centre. *Thorax*, 57(2), 142-145.
- [36] Waters, V., Atenafu, E. G., Lu, A., Yau, Y., Tullis, E., & Ratjen, F. (2013). Chronic *Stenotrophomonas maltophilia* infection and mortality or lung transplantation in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*, 12(5), 482-486.
- [37] Dasenbrook, E. C., Checkley, W., Merlo, C. A., Konstan, M. W., Lechtzin, N., & Boyle, M. P. (2010). Association between respiratory tract methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and survival in cystic fibrosis. *Jama*, 303(23), 2386-2392.
- [38] Chotirmall, S. H., & McElvaney, N. G. (2014). Fungi in the cystic fibrosis lung: bystanders or pathogens? *Int J Biochem Cell Biol*, 52, 161-173.
- [39] Masoud-Landgraf, L., Badura, A., Eber, E., Feierl, G., Marth, E., & Buzina, W. (2014). Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. *Med Mycol*, 52(2), 179-186.
- [40] Horre, R., Symoens, F., Delhaes, L., & Bouchara, J. P. (2010). Fungal respiratory infections in cystic fibrosis: a growing problem. *Med Mycol*, 48 Suppl 1, S1-3.
- [41] Pihet, M., Carrere, J., Cimon, B., Chabasse, D., Delhaes, L., Symoens, F., et al. (2009). Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. *Med Mycol*, 47(4), 387-397.

- [42] Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 28(8), 799-808.
- [43] Haase, G. (2009). Pilze: Vorkommen und Bedeutung für den Menschen. In H. Hahn, S. H. E. Kaufmann, T. F. Schulz, & S. Suerbaum (Eds.), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (pp. 597-601). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- [44] Ziesing, S., Suerbaum, S., & Sedlacek, L. (2016). Fungal epidemiology and diversity in cystic fibrosis patients over a 5-year period in a national reference center. *Med Mycol*.
- [45] Bakare, N., Rickerts, V., Bargon, J., & Just-Nubling, G. (2003). Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses*, 46(1-2), 19-23.
- [46] Singh, S., Fatima, Z., & Hameed, S. (2015). Predisposing factors endorsing *Candida* infections. *Infez Med*, 23(3), 211-223.
- [47] Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 36(2), 288-305.
- [48] Fidel, P. L., Jr., Vazquez, J. A., & Sobel, J. D. (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*, 12(1), 80-96.
- [49] Hajjeh, R. A., Sofair, A. N., Harrison, L. H., Lyon, G. M., Arthington-Skaggs, B. A., Mirza, S. A., et al. (2004). Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol*, 42(4), 1519-1527.
- [50] Trofa, D., Gacser, A., & Nosanchuk, J. D. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 21(4), 606-625.
- [51] Chotirmall, S. H., O'Donoghue, E., Bennett, K., Gunaratnam, C., O'Neill, S. J., & McElvaney, N. G. (2010). Sputum *Candida albicans* presages FEV(1) decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. *Chest*, 138(5), 1186-1195.
- [52] Valenza, G., Tappe, D., Turnwald, D., Frosch, M., König, C., Hebestreit, H., et al. (2008). Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 7(2), 123-127.
- [53] Muthig, M., Hebestreit, A., Ziegler, U., Seidler, M., & Müller, F. M. (2010). Persistence of *Candida* species in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Med Mycol*, 48(1), 56-63.
- [54] Gileles-Hillel, A., Shoseyov, D., Polacheck, I., Korem, M., Kerem, E., & Cohen-Cymbberknoh, M. (2015). Association of chronic *Candida albicans* respiratory infection with a more severe lung disease in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 50(11), 1082-1089.

- [55] Latge, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 12(2), 310-350.
- [56] Maturu, V. N., & Agarwal, R. (2015). Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Allergy*, 45(12), 1765-1778.
- [57] Kraemer, R., Delosea, N., Ballinari, P., Gallati, S., & Cramer, R. (2006). Effect of allergic bronchopulmonary aspergillosis on lung function in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 174(11), 1211-1220.
- [58] Amin, R., Dupuis, A., Aaron, S. D., & Ratjen, F. (2010). The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest*, 137(1), 171-176.
- [59] De Boeck, K., Wilschanski, M., Castellani, C., Taylor, C., Cuppens, H., Dodge, J., et al. (2006). Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*, 61(7), 627-635.
- [60] Farrell, P. M., Rosenstein, B. J., White, T. B., Accurso, F. J., Castellani, C., Cutting, G. R., et al. (2008). Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr*, 153(2), S4-s14.
- [61] Nennstiel, U., Genzel-Boroviczény, O., Odenwald, B., Ensenauer, R., Rossi, R., Hoffmann, G. F., et al. (2019). Neugeborenen-Screening auf angeborene Stoffwechselstörungen, Endokrinopathien und Mukoviszidose. *AWMF-Leitlinien-Register*.
- [62] Courtney, J. M., Bradley, J., McCaughan, J., O'Connor, T. M., Shortt, C., Bredin, C. P., et al. (2007). Predictors of mortality in adults with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 42(6), 525-532.
- [63] Bruce, C., & Marshall, M. D. (2015). Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2015 Annual Data Report. *Cystic Fibrosis Foundation*.
- [64] Van Goor, F., Straley, K. S., Cao, D., González, J., Hadida, S., Hazlewood, A., et al. (2006). Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290(6), L1117-1130.
- [65] Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuis, P. D., Burton, B., Cao, D., Neuberger, T., et al. (2009). Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(44), 18825-18830.
- [66] Yu, H., Burton, B., Huang, C. J., Worley, J., Cao, D., Johnson, J. P., Jr., et al. (2012). Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations. *J Cyst Fibros*, 11(3), 237-245.

- [67] Vertex, Pharmaceuticals, & Incorporated. (2012, 2020). KALYDECO® (Ivacaftor) Full U.S. Prescribing Information. Retrieved from https://pi.vrtx.com/files/uspi_ivacaftor.pdf Abgerufen 11/2020.
- [68] Eckford, P. D., Li, C., Ramjeesingh, M., & Bear, C. E. (2012). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) potentiator VX-770 (ivacaftor) opens the defective channel gate of mutant CFTR in a phosphorylation-dependent but ATP-independent manner. *J Biol Chem*, 287(44), 36639-36649.
- [69] Jih, K. Y., & Hwang, T. C. (2013). Vx-770 potentiates CFTR function by promoting decoupling between the gating cycle and ATP hydrolysis cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(11), 4404-4409.
- [70] Veit, G., Avramescu, R. G., Perdomo, D., Phuan, P. W., Bagdany, M., Apaja, P. M., et al. (2014). Some gating potentiators, including VX-770, diminish $\Delta F508$ -CFTR functional expression. *Sci Transl Med*, 6(246), 246ra297.
- [71] Byrnes, L. J., Xu, Y., Qiu, X., Hall, J. D., & West, G. M. (2018). Sites associated with Kalydeco binding on human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator revealed by Hydrogen/Deuterium Exchange. *Sci Rep*, 8(1), 4664.
- [72] Yeh, H. I., Qiu, L., Sohma, Y., Conrath, K., Zou, X., & Hwang, T. C. (2019). Identifying the molecular target sites for CFTR potentiators GLPG1837 and VX-770. *J Gen Physiol*, 151(7), 912-928.
- [73] Ramsey, B. W., Davies, J., McElvaney, N. G., Tullis, E., Bell, S. C., Dřevínek, P., et al. (2011). A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med*, 365(18), 1663-1672.
- [74] Quittner, A., Suthoff, E., Rendas-Baum, R., Bayliss, M. S., Sermet-Gaudelus, I., Castiglione, B., et al. (2015). Effect of ivacaftor treatment in patients with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation: patient-reported outcomes in the STRIVE randomized, controlled trial. *Health Qual Life Outcomes*, 13, 93.
- [75] De Boeck, K., Munck, A., Walker, S., Faro, A., Hiatt, P., Gilmartin, G., et al. (2014). Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation. *J Cyst Fibros*, 13(6), 674-680.
- [76] Sawicki, G. S., McKone, E. F., Pasta, D. J., Millar, S. J., Wagener, J. S., Johnson, C. A., et al. (2015). Sustained Benefit from ivacaftor demonstrated by combining clinical trial and cystic fibrosis patient registry data. *Am J Respir Crit Care Med*, 192(7), 836-842.
- [77] McKone, E. F., Borowitz, D., Dřevínek, P., Griese, M., Konstan, M. W., Wainwright, C., et al. (2014). Long-term safety and efficacy of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have the Gly551Asp-CFTR mutation: a phase 3, open-label extension study (PERSIST). *Lancet Respir Med*, 2(11), 902-910.

- [78] Flume, P. A., Liou, T. G., Borowitz, D. S., Li, H., Yen, K., Ordoñez, C. L., et al. (2012). Ivacaftor in subjects with cystic fibrosis who are homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Chest*, 142(3), 718-724.
- [79] Pedemonte, N., Lukacs, G. L., Du, K., Caci, E., Zegarra-Moran, O., Galiotta, L. J., et al. (2005). Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest*, 115(9), 2564-2571.
- [80] Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuys, P. D., Burton, B., Stack, J. H., Straley, K. S., et al. (2011). Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(46), 18843-18848.
- [81] Mendoza, J. L., Schmidt, A., Li, Q., Nuvaga, E., Barrett, T., Bridges, R. J., et al. (2012). Requirements for efficient correction of Δ F508 CFTR revealed by analyses of evolved sequences. *Cell*, 148(1-2), 164-174.
- [82] Rabeh, W. M., Bossard, F., Xu, H., Okiyoneda, T., Bagdany, M., Mulvihill, C. M., et al. (2012). Correction of both NBD1 energetics and domain interface is required to restore Δ F508 CFTR folding and function. *Cell*, 148(1-2), 150-163.
- [83] Okiyoneda, T., Veit, G., Dekkers, J. F., Bagdany, M., Soya, N., Xu, H., et al. (2013). Mechanism-based corrector combination restores Δ F508-CFTR folding and function. *Nat Chem Biol*, 9(7), 444-454.
- [84] Hudson, R. P., Dawson, J. E., Chong, P. A., Yang, Z., Millen, L., Thomas, P. J., et al. (2017). Direct Binding of the Corrector VX-809 to Human CFTR NBD1: Evidence of an Allosteric Coupling between the Binding Site and the NBD1:CL4 Interface. *Mol Pharmacol*, 92(2), 124-135.
- [85] Clancy, J. P., Rowe, S. M., Accurso, F. J., Aitken, M. L., Amin, R. S., Ashlock, M. A., et al. (2012). Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the Δ F508del-CFTR mutation. *Thorax*, 67(1), 12-18.
- [86] Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., Dott, K., Dreyer, D., et al. (1991). Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature*, 354(6354), 526-528.
- [87] Lukacs, G. L., Chang, X. B., Bear, C., Kartner, N., Mohamed, A., Riordan, J. R., et al. (1993). The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells. *J Biol Chem*, 268(29), 21592-21598.
- [88] Boyle, M. P., Bell, S. C., Konstan, M. W., McColley, S. A., Rowe, S. M., Rietschel, E., et al. (2014). A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*, 2(7), 527-538.

- [89] Wainwright, C. E., Elborn, J. S., Ramsey, B. W., Marigowda, G., Huang, X., Cipolli, M., et al. (2015). Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med*, 373(3), 220-231.
- [90] Vertex, Pharmaceuticals, & Incorporated. (2015, 2019). ORKAMBI® (Lumacaftor/ Ivacaftor) Full U.S. Prescribing Information. Retrieved from https://pi.vrtx.com/files/uspi_lumacaftor_ivacaftor.pdf Abgerufen 11/2020.
- [91] Rowe, S. M., McColley, S. A., Rietschel, E., Li, X., Bell, S. C., Konstan, M. W., et al. (2017). Lumacaftor/Ivacaftor Treatment of Patients with Cystic Fibrosis Heterozygous for F508del-CFTR. *Ann Am Thorac Soc*, 14(2), 213-219.
- [92] Schneider, E. K. (2018). Cytochrome P450 3A4 Induction: Lumacaftor versus Ivacaftor Potentially Resulting in Significantly Reduced Plasma Concentration of Ivacaftor. *Drug Metab Lett*, 12(1), 71-74.
- [93] Garg, V., Shen, J., Li, C., Agarwal, S., Gebre, A., Robertson, S., et al. (2019). Pharmacokinetic and Drug-Drug Interaction Profiles of the Combination of Tezacaftor/Ivacaftor. *Clin Transl Sci*, 12(3), 267-275.
- [94] Taylor-Cousar, J. L., Munck, A., McKone, E. F., van der Ent, C. K., Moeller, A., Simard, C., et al. (2017). Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *New England Journal of Medicine*, 377(21), 2013-2023.
- [95] Rowe, S. M., Daines, C., Ringshausen, F. C., Kerem, E., Wilson, J., Tullis, E., et al. (2017). Tezacaftor-Ivacaftor in Residual-Function Heterozygotes with Cystic Fibrosis. *N Engl J Med*, 377(21), 2024-2035.
- [96] Donaldson, S. H., Pilewski, J. M., Griese, M., Cooke, J., Viswanathan, L., Tullis, E., et al. (2018). Tezacaftor/Ivacaftor in Subjects with Cystic Fibrosis and F508del/F508del-CFTR or F508del/G551D-CFTR. *Am J Respir Crit Care Med*, 197(2), 214-224.
- [97] Vertex, Pharmaceuticals, & Incorporated. (2018, 2019). SYMDEKO® (Tezacaftor/ Ivacaftor) Full U.S. Prescribing Information. Retrieved from https://pi.vrtx.com/files/uspi_tezacaftor_ivacaftor.pdf Abgerufen 11/2020.
- [98] Vertex, Pharmaceuticals, & Incorporated. (2019). TRIKAFTA® (Elexacaftor, Tezacaftor and Ivacaftor) Full U.S. Prescribing Information. Retrieved from https://pi.vrtx.com/files/uspi_elexacaftor_tezacaftor_ivacaftor.pdf Abgerufen 11/2020.
- [99] Keating, D., Marigowda, G., Burr, L., Daines, C., Mall, M. A., McKone, E. F., et al. (2018). VX-445–Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *New England Journal of Medicine*, 379(17), 1612-1620.

- [100] Davies, J. C., Moskowitz, S. M., Brown, C., Horsley, A., Mall, M. A., McKone, E. F., et al. (2018). VX-659–Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *New England Journal of Medicine*, 379(17), 1599-1611.
- [101] Taylor-Cousar, J. L., Mall, M. A., Ramsey, B. W., McKone, E. F., Tullis, E., Marigowda, G., et al. (2019). Clinical development of triple-combination CFTR modulators for cystic fibrosis patients with one or two F508del alleles. *ERJ Open Res*, 5(2).
- [102] Heijerman, H. G. M., McKone, E. F., Downey, D. G., Van Braeckel, E., Rowe, S. M., Tullis, E., et al. (2019). Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet*, 394(10212), 1940-1948.
- [103] Middleton, P. G., Mall, M. A., Dřevínek, P., Lands, L. C., McKone, E. F., Polineni, D., et al. (2019). Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *New England Journal of Medicine*, 381(19), 1809-1819.
- [104] MacKenzie, T., Gifford, A. H., Sabadosa, K. A., Quinton, H. B., Knapp, E. A., Goss, C. H., et al. (2014). Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: survival analysis of the Cystic Fibrosis Foundation patient registry. *Ann Intern Med*, 161(4), 233-241.
- [105] Stephenson, A. L., Tom, M., Berthiaume, Y., Singer, L. G., Aaron, S. D., Whitmore, G. A., et al. (2015). A contemporary survival analysis of individuals with cystic fibrosis: a cohort study. *Eur Respir J*, 45(3), 670-679.
- [106] McKone, E. F., Goss, C. H., & Aitken, M. L. (2006). CFTR genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis. *Chest*, 130(5), 1441-1447.
- [107] McKone, E. F., Emerson, S. S., Edwards, K. L., & Aitken, M. L. (2003). Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet*, 361(9370), 1671-1676.
- [108] Kerem, E., Corey, M., Kerem, B. S., Rommens, J., Markiewicz, D., Levison, H., et al. (1990). The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med*, 323(22), 1517-1522.
- [109] Kristidis, P., Bozon, D., Corey, M., Markiewicz, D., Rommens, J., Tsui, L. C., et al. (1992). Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet*, 50(6), 1178-1184.
- [110] Koch, C., Cuppens, H., Rainisio, M., Madessani, U., Harms, H., Hodson, M., et al. (2001). European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Pediatr Pulmonol*, 31(1), 1-12.

- [111] Mekus, F., Ballmann, M., Bronsveld, I., Bijman, J., Veeze, H., & Tummler, B. (2000). Categories of deltaF508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics. *Twin Res*, 3(4), 277-293.
- [112] Bronsveld, I., Mekus, F., Bijman, J., Ballmann, M., de Jonge, H. R., Laabs, U., et al. (2001). Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of Delta F508 homozygous twins and siblings. *J Clin Invest*, 108(11), 1705-1715.
- [113] Vanscoy, L. L., Blackman, S. M., Collaco, J. M., Bowers, A., Lai, T., Naughton, K., et al. (2007). Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 175(10), 1036-1043.
- [114] Collaco, J. M., & Cutting, G. R. (2008). Update on gene modifiers in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*, 14(6), 559-566.
- [115] Cutting, G. R. (2015). Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet*, 16(1), 45-56.
- [116] Shanthikumar, S., Neeland, M. N., Saffery, R., & Ranganathan, S. (2019). Gene modifiers of cystic fibrosis lung disease: A systematic review. *Pediatr Pulmonol*.
- [117] Garred, P., Pressler, T., Madsen, H. O., Frederiksen, B., Svejgaard, A., Hoiby, N., et al. (1999). Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest*, 104(4), 431-437.
- [118] Gravina, L. P., Crespo, C., Giugno, H., Sen, L., Chertkoff, L., Mangano, A., et al. (2015). Mannose-binding lectin gene as a modifier of the cystic fibrosis phenotype in Argentinean pediatric patients. *Journal of Cystic Fibrosis*, 14(1), 78-83.
- [119] Arkwright, P. D., Laurie, S., Super, M., Pravica, V., Schwarz, M. J., Webb, A. K., et al. (2000). TGF-beta(1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. *Thorax*, 55(6), 459-462.
- [120] Drumm, M. L., Konstan, M. W., Schluchter, M. D., Handler, A., Pace, R., Zou, F., et al. (2005). Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 353(14), 1443-1453.
- [121] Kramer, E. L., & Clancy, J. P. (2018). TGFβ as a therapeutic target in cystic fibrosis. *Expert opinion on therapeutic targets*, 22(2), 177-189.
- [122] Hull, J., & Thomson, A. H. (1998). Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis. *Thorax*, 53(12), 1018-1021.
- [123] Bonfield, T. L., Konstan, M. W., Burfeind, P., Panuska, J. R., Hilliard, J. B., & Berger, M. (1995). Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 13(3), 257-261.

- [124] Gu, Y., Harley, I. T., Henderson, L. B., Aronow, B. J., Vietor, I., Huber, L. A., et al. (2009). Identification of IFRD1 as a modifier gene for cystic fibrosis lung disease. *Nature*, 458(7241), 1039-1042.
- [125] Wright, F. A., Strug, L. J., Doshi, V. K., Commander, C. W., Blackman, S. M., Sun, L., et al. (2011). Genome-wide association and linkage identify modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis at 11p13 and 20q13.2. *Nat Genet*, 43(6), 539-546.
- [126] Corvol, H., Blackman, S. M., Boelle, P. Y., Gallins, P. J., Pace, R. G., Stonebraker, J. R., et al. (2015). Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nat Commun*, 6, 8382.
- [127] Demko, C. A., Byard, P. J., & Davis, P. B. (1995). Gender differences in cystic fibrosis: Pseudomonas aeruginosa infection. *J Clin Epidemiol*, 48(8), 1041-1049.
- [128] Corey, M., Edwards, L., Levison, H., & Knowles, M. (1997). Longitudinal analysis of pulmonary function decline in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr*, 131(6), 809-814.
- [129] Rosenfeld, M., Davis, R., FitzSimmons, S., Pepe, M., & Ramsey, B. (1997). Gender gap in cystic fibrosis mortality. *Am J Epidemiol*, 145(9), 794-803.
- [130] Schechter, M. S., Shelton, B. J., Margolis, P. A., & Fitzsimmons, S. C. (2001). The association of socioeconomic status with outcomes in cystic fibrosis patients in the United States. *Am J Respir Crit Care Med*, 163(6), 1331-1337.
- [131] O'Connor, G. T., Quinton, H. B., Kneeland, T., Kahn, R., Lever, T., Maddock, J., et al. (2003). Median household income and mortality rate in cystic fibrosis. *Pediatrics*, 111(4 Pt 1), e333-339.
- [132] Rubin, B. K. (1990). Exposure of children with cystic fibrosis to environmental tobacco smoke. *N Engl J Med*, 323(12), 782-788.
- [133] Kerem, E., Corey, M., Gold, R., & Levison, H. (1990). Pulmonary function and clinical course in patients with cystic fibrosis after pulmonary colonization with Pseudomonas aeruginosa. *J Pediatr*, 116(5), 714-719.
- [134] Tharanathan, R. N., & Kittur, F. S. (2003). Chitin--the undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43(1), 61-87.
- [135] Adrangi, S., & Faramarzi, M. A. (2013). From bacteria to human: a journey into the world of chitinases. *Biotechnol Adv*, 31(8), 1786-1795.
- [136] Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 280 (Pt 2), 309-316.
- [137] Bussink, A. P., Speijer, D., Aerts, J. M., & Boot, R. G. (2007). Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics*, 177(2), 959-970.

- [138] Robbins, P. W., Albright, C., & Benfield, B. (1988). Cloning and expression of a *Streptomyces plicatus* chitinase (chitinase-63) in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 263(1), 443-447.
- [139] Kasprzewska, A. (2003). Plant chitinases--regulation and function. *Cell Mol Biol Lett*, 8(3), 809-824.
- [140] Cohen, E. (1993). Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. *Arch Insect Biochem Physiol*, 22(1-2), 245-261.
- [141] Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A., & Takagi, M. (1998). Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. *Biosci Biotechnol Biochem*, 62(1), 60-65.
- [142] Dahiya, N., Tewari, R., & Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71(6), 773-782.
- [143] Hartl, L., Zach, S., & Seidl-Seiboth, V. (2012). Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93(2), 533-543.
- [144] Boot, R. G., Renkema, G. H., Strijland, A., van Zonneveld, A. J., & Aerts, J. M. (1995). Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem*, 270(44), 26252-26256.
- [145] Renkema, G. H., Boot, R. G., Muijsers, A. O., Donker-Koopman, W. E., & Aerts, J. M. (1995). Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J Biol Chem*, 270(5), 2198-2202.
- [146] Boot, R. G., Blommaart, E. F., Swart, E., Ghauharali-van der Vlugt, K., Bijl, N., Moe, C., et al. (2001). Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem*, 276(9), 6770-6778.
- [147] Hakala, B. E., White, C., & Recklies, A. D. (1993). Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem*, 268(34), 25803-25810.
- [148] Bleau, G., Massicotte, F., Merlen, Y., & Boisvert, C. (1999). Mammalian chitinase-like proteins. *Exs*, 87, 211-221.
- [149] van Eijk, M., van Roomen, C. P., Renkema, G. H., Bussink, A. P., Andrews, L., Blommaart, E. F., et al. (2005). Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol*, 17(11), 1505-1512.
- [150] Elias, J. A., Homer, R. J., Hamid, Q., & Lee, C. G. (2005). Chitinases and chitinase-like proteins in T(H)2 inflammation and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 116(3), 497-500.

- [151] Rehli, M., Krause, S. W., & Andreesen, R. (1997). Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation. *Genomics*, 43(2), 221-225.
- [152] Volck, B., Price, P. A., Johansen, J. S., Sorensen, O., Benfield, T. L., Nielsen, H. J., et al. (1998). YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Proc Assoc Am Physicians*, 110(4), 351-360.
- [153] Funkhouser, J. D., & Aronson, N. N., Jr. (2007). Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evol Biol*, 7, 96.
- [154] Lee, C. G., Da Silva, C. A., Dela Cruz, C. S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M. J., et al. (2011). Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu Rev Physiol*, 73, 479-501.
- [155] Renkema, G. H., Boot, R. G., Strijland, A., Donker-Koopman, W. E., van den Berg, M., Muijsers, A. O., et al. (1997). Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *Eur J Biochem*, 244(2), 279-285.
- [156] Fusetti, F., von Moeller, H., Houston, D., Rozeboom, H. J., Dijkstra, B. W., Boot, R. G., et al. (2002). Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J Biol Chem*, 277(28), 25537-25544.
- [157] Malaguarnera, L., Musumeci, M., Di Rosa, M., Scuto, A., & Musumeci, S. (2005). Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages. *J Clin Lab Anal*, 19(3), 128-132.
- [158] van Eijk, M., Scheij, S. S., van Roomen, C. P., Speijer, D., Boot, R. G., & Aerts, J. M. (2007). TLR- and NOD2-dependent regulation of human phagocyte-specific chitotriosidase. *FEBS Lett*, 581(28), 5389-5395.
- [159] Di Rosa, M., Malaguarnera, G., De Gregorio, C., D'Amico, F., Mazzarino, M. C., & Malaguarnera, L. (2013). Modulation of chitotriosidase during macrophage differentiation. *Cell Biochem Biophys*, 66(2), 239-247.
- [160] Hollak, C. E., van Weely, S., van Oers, M. H., & Aerts, J. M. (1994). Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest*, 93(3), 1288-1292.
- [161] Schoonhoven, A., Rudensky, B., Elstein, D., Zimran, A., Hollak, C. E., Groener, J. E., et al. (2007). Monitoring of Gaucher patients with a novel chitotriosidase assay. *Clin Chim Acta*, 381(2), 136-139.
- [162] Barone, R., Di Gregorio, F., Romeo, M. A., Schiliro, G., & Pavone, L. (1999). Plasma chitotriosidase activity in patients with beta-thalassemia. *Blood Cells Mol Dis*, 25(1), 1-8.

- [163] Artieda, M., Cenarro, A., Ganan, A., Jerico, I., Gonzalvo, C., Casado, J. M., et al. (2003). Serum chitotriosidase activity is increased in subjects with atherosclerosis disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(9), 1645-1652.
- [164] Sotgiu, S., Barone, R., Arru, G., Fois, M. L., Pugliatti, M., Sanna, A., et al. (2006). Intrathecal chitotriosidase and the outcome of multiple sclerosis. *Mult Scler*, 12(5), 551-557.
- [165] Bargagli, E., Margollicci, M., Perrone, A., Luddi, A., Perari, M. G., Bianchi, N., et al. (2007). Chitotriosidase analysis in bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 24(1), 59-64.
- [166] Bargagli, E., Margollicci, M., Luddi, A., Nikiforakis, N., Perari, M. G., Grosso, S., et al. (2007). Chitotriosidase activity in patients with interstitial lung diseases. *Respir Med*, 101(10), 2176-2181.
- [167] Letuve, S., Kozhich, A., Humbles, A., Brewah, Y., Dombret, M. C., Grandsaigne, M., et al. (2010). Lung chitinolytic activity and chitotriosidase are elevated in chronic obstructive pulmonary disease and contribute to lung inflammation. *Am J Pathol*, 176(2), 638-649.
- [168] Goldman, D. L., Li, X., Tsirilakis, K., Andrade, C., Casadevall, A., & Vicencio, A. G. (2012). Increased chitinase expression and fungal-specific antibodies in the bronchoalveolar lavage fluid of asthmatic children. *Clin Exp Allergy*, 42(4), 523-530.
- [169] James, A. J., Reinius, L. E., Verhoek, M., Gomes, A., Kupczyk, M., Hammar, U., et al. (2016). Increased YKL-40 and Chitotriosidase in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 193(2), 131-142.
- [170] Seibold, M. A., Donnelly, S., Solon, M., Innes, A., Woodruff, P. G., Boot, R. G., et al. (2008). Chitotriosidase is the primary active chitinase in the human lung and is modulated by genotype and smoking habit. *J Allergy Clin Immunol*, 122(5), 944-950.e943.
- [171] Gordon-Thomson, C., Kumari, A., Tomkins, L., Holford, P., Djordjevic, J. T., Wright, L. C., et al. (2009). Chitotriosidase and gene therapy for fungal infections. *Cell Mol Life Sci*, 66(6), 1116-1125.
- [172] Overdijk, B., Van Steijn, G. J., & Odds, F. C. (1996). Chitinase levels in guinea pig blood are increased after systemic infection with *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology*, 6(6), 627-634.
- [173] Vandevenne, M., Campisi, V., Freichels, A., Gillard, C., Gaspard, G., Frere, J. M., et al. (2011). Comparative functional analysis of the human macrophage chitotriosidase. *Protein Sci*, 20(8), 1451-1463.
- [174] Boot, R. G., Renkema, G. H., Verhoek, M., Strijland, A., Bliet, J., de Meulemeester, T. M., et al. (1998). The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem*, 273(40), 25680-25685.

- [175] Malaguarnera, L., Simapore, J., Prodi, D. A., Angius, A., Sassu, A., Persico, I., et al. (2003). A 24-bp duplication in exon 10 of human chitotriosidase gene from the sub-Saharan to the Mediterranean area: role of parasitic diseases and environmental conditions. *Genes Immun*, 4(8), 570-574.
- [176] Rodrigues, M. R., MC, S. M., & Amaral, O. (2004). Allelic frequency determination of the 24-bp chitotriosidase duplication in the Portuguese population by real-time PCR. *Blood Cells Mol Dis*, 33(3), 362-364.
- [177] Piras, I., Melis, A., Ghiani, M. E., Falchi, A., Luiselli, D., Moral, P., et al. (2007). Human CHIT1 gene distribution: new data from Mediterranean and European populations. *J Hum Genet*, 52(2), 110-116.
- [178] Abu-Rumeileh, S., Steinacker, P., Polisch, B., Mammana, A., Bartoletti-Stella, A., Oeckl, P., et al. (2019). CSF biomarkers of neuroinflammation in distinct forms and subtypes of neurodegenerative dementia. *Alzheimers Res Ther*, 12(1), 2.
- [179] Vicencio, A. G., Chupp, G. L., Tsirilakis, K., He, X., Kessel, A., Nandalike, K., et al. (2010). CHIT1 mutations: genetic risk factor for severe asthma with fungal sensitization? *Pediatrics*, 126(4), e982-985.
- [180] Bierbaum, S., Superti-Furga, A., & Heinzmann, A. (2006). Genetic polymorphisms of chitotriosidase in Caucasian children with bronchial asthma. *Int J Immunogenet*, 33(3), 201-204.
- [181] Wu, A. C., Lasky-Su, J., Rogers, C. A., Klanderma, B. J., & Litonjua, A. (2010). Polymorphisms of chitinases are not associated with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 125(3), 754-757, 757.e751-757.e752.
- [182] Livnat, G., Bar-Yoseph, R., Mory, A., Dagan, E., Elias, N., Gershoni, R., et al. (2014). Duplication in CHIT1 gene and the risk for Aspergillus lung disease in CF patients. *Pediatr Pulmonol*, 49(1), 21-27.
- [183] Lee, P., Waalen, J., Crain, K., Smargon, A., & Beutler, E. (2007). Human chitotriosidase polymorphisms G354R and A442V associated with reduced enzyme activity. *Blood Cells Mol Dis*, 39(3), 353-360.
- [184] Chou, Y. T., Yao, S., Czerwinski, R., Fleming, M., Krykbaev, R., Xuan, D., et al. (2006). Kinetic characterization of recombinant human acidic mammalian chitinase. *Biochemistry*, 45(14), 4444-4454.
- [185] Saito, A., Ozaki, K., Fujiwara, T., Nakamura, Y., & Tanigami, A. (1999). Isolation and mapping of a human lung-specific gene, TSA1902, encoding a novel chitinase family member. *Gene*, 239(2), 325-331.
- [186] Boot, R. G., Bussink, A. P., Verhoek, M., de Boer, P. A., Moorman, A. F., & Aerts, J. M. (2005). Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man. *J Histochem Cytochem*, 53(10), 1283-1292.

- [187] Ohno, M., Togashi, Y., Tsuda, K., Okawa, K., Kamaya, M., Sakaguchi, M., et al. (2013). Quantification of Chitinase mRNA Levels in Human and Mouse Tissues by Real-Time PCR: Species-Specific Expression of Acidic Mammalian Chitinase in Stomach Tissues. *PLoS One*, 8(6), e67399.
- [188] Zhu, Z., Zheng, T., Homer, R. J., Kim, Y. K., Chen, N. Y., Cohn, L., et al. (2004). Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science*, 304(5677), 1678-1682.
- [189] Zhao, J., Zhu, H., Wong, C. H., Leung, K. Y., & Wong, W. S. (2005). Increased lung chitinase and chitinase levels in allergic airway inflammation: a proteomics approach. *Proteomics*, 5(11), 2799-2807.
- [190] Shen, C. R., Juang, H. H., Chen, H. S., Yang, C. J., Wu, C. J., Lee, M. H., et al. (2015). The Correlation between Chitin and Acidic Mammalian Chitinase in Animal Models of Allergic Asthma. *Int J Mol Sci*, 16(11), 27371-27377.
- [191] Ramanathan, M., Jr., Lee, W. K., & Lane, A. P. (2006). Increased expression of acidic mammalian chitinase in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Rhinol*, 20(3), 330-335.
- [192] Musumeci, M., Bellin, M., Maltese, A., Aragona, P., Bucolo, C., & Musumeci, S. (2008). Chitinase levels in the tears of subjects with ocular allergies. *Cornea*, 27(2), 168-173.
- [193] Bucolo, C., Musumeci, M., Musumeci, S., & Drago, F. (2011). Acidic Mammalian chitinase and the eye: implications for ocular inflammatory diseases. *Front Pharmacol*, 2, 43.
- [194] Chen, L., Shen, Z., & Wu, J. (2009). Expression, purification and in vitro antifungal activity of acidic mammalian chitinase against *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* strains. *Clin Exp Dermatol*, 34(1), 55-60.
- [195] Kim, L. K., Morita, R., Kobayashi, Y., Eisenbarth, S. C., Lee, C. G., Elias, J., et al. (2015). AMCCase is a crucial regulator of type 2 immune responses to inhaled house dust mites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(22), E2891-2899.
- [196] NCBI. (Zugriff 27.01.2019). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=61756687.
- [197] Bierbaum, S., Nickel, R., Koch, A., Lau, S., Deichmann, K. A., Wahn, U., et al. (2005). Polymorphisms and haplotypes of acid mammalian chitinase are associated with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 172(12), 1505-1509.
- [198] NCBI. (Zugriff 12.10.2019). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs61756687 - frequency_tab.

- [199] Chatterjee, R., Batra, J., Das, S., Sharma, S. K., & Ghosh, B. (2008). Genetic association of acidic mammalian chitinase with atopic asthma and serum total IgE levels. *J Allergy Clin Immunol*, 122(1), 202-208, 208.e201-207.
- [200] Verwer, P. E., Notenboom, C. C., Eadie, K., Fahal, A. H., Verbrugh, H. A., & van de Sande, W. W. (2015). A Polymorphism in the Chitotriosidase Gene Associated with Risk of Mycetoma Due to *Madurella mycetomatis* Mycetoma--A Retrospective Study. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(9), e0004061.
- [201] NCBI. (Zugriff 27.01.2019). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3818822.
- [202] NCBI. (Zugriff 12.10.2019). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3818822 - frequency_tab.
- [203] Aminuddin, F., Akhabir, L., Stefanowicz, D., Pare, P. D., Connett, J. E., Anthonisen, N. R., et al. (2012). Genetic association between human chitinases and lung function in COPD. *Hum Genet*, 131(7), 1105-1114.
- [204] Wu, A. C., Lasky-Su, J., Rogers, C. A., Klanderman, B. J., & Litonjua, A. A. (2010). Fungal exposure modulates the effect of polymorphisms of chitinases on emergency department visits and hospitalizations. *Am J Respir Crit Care Med*, 182(7), 884-889.
- [205] Hector, A., Kirn, T., Ralhan, A., Graepler-Mainka, U., Berenbrinker, S., Riethmueller, J., et al. (2016). Microbial colonization and lung function in adolescents with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 15(3), 340-349.
- [206] Kerem, E., Reisman, J., Corey, M., Canny, G. J., & Levison, H. (1992). Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 326(18), 1187-1191.
- [207] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-273.
- [208] Urquhart, D. S., Allen, J., Elrayess, M., Fidler, K., Klein, N., & Jaffé, A. (2006). Modifier effect of the Toll-like receptor 4 D299G polymorphism in children with cystic fibrosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 54(4), 271-276.
- [209] Steagall, W. K., Barrow, B. J., Glasgow, C. G., Mendoza, J. W., Ehrmantraut, M., Lin, J. P., et al. (2007). Beta-2-adrenergic receptor polymorphisms in cystic fibrosis. *Pharmacogenet Genomics*, 17(6), 425-430.
- [210] Schluchter, M. D., Konstan, M. W., Drumm, M. L., Yankaskas, J. R., & Knowles, M. R. (2006). Classifying severity of cystic fibrosis lung disease using longitudinal pulmonary function data. *Am J Respir Crit Care Med*, 174(7), 780-786.

- [211] Hector, A., Chotirmall, S. H., Lavelle, G. M., Mirkovic, B., Horan, D., Eichler, L., et al. (2016). Chitinase activation in patients with fungus-associated cystic fibrosis lung disease. *J Allergy Clin Immunol*, 138(4), 1183-1189.e1184.
- [212] Punja, Z. K., & Zhang, Y. Y. (1993). Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *J Nematol*, 25(4), 526-540.
- [213] Grover, A. (2012). Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles. *Critical reviews in plant sciences*, 2012 v.31 no.1(no. 1), pp. 57-73.
- [214] Bauernfeind, A., Bertele, R. M., Harms, K., Horl, G., Jungwirth, R., Petermuller, C., et al. (1987). Qualitative and quantitative microbiological analysis of sputa of 102 patients with cystic fibrosis. *Infection*, 15(4), 270-277.
- [215] Maiz, L., Cuevas, M., Quirce, S., Canon, J. F., Pacheco, A., Sousa, A., et al. (2002). Serologic IgE immune responses against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in patients with cystic fibrosis. *Chest*, 121(3), 782-788.
- [216] Nagano, Y., Elborn, J. S., Millar, B. C., Walker, J. M., Goldsmith, C. E., Rendall, J., et al. (2010). Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. *Med Mycol*, 48(1), 166-176.e161.
- [217] Sudfeld, C. R., Dasenbrook, E. C., Merz, W. G., Carroll, K. C., & Boyle, M. P. (2010). Prevalence and risk factors for recovery of filamentous fungi in individuals with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 9(2), 110-116.
- [218] Simmonds, E. J., Littlewood, J. M., Hopwood, V., & Evans, E. G. (1994). *Aspergillus fumigatus* colonisation and population density of place of residence in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*, 70(2), 139-140.
- [219] Middleton, P. G., Chen, S. C., & Meyer, W. (2013). Fungal infections and treatment in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*, 19(6), 670-675.
- [220] Chen, S. C., Meyer, W., & Pashley, C. H. (2018). Challenges in Laboratory Detection of Fungal Pathogens in the Airways of Cystic Fibrosis Patients. *Mycopathologia*, 183(1), 89-100.
- [221] Noni, M., Katelari, A., Kaditis, A., Theochari, I., Lympari, I., Alexandrou - Athanassoulis, H., et al. (2015). *Candida albicans* chronic colonisation in cystic fibrosis may be associated with inhaled antibiotics. *Mycoses*, 58(7), 416-421.
- [222] Armstrong, D. S., Grimwood, K., Carlin, J. B., Carzino, R., Olinsky, A., & Phelan, P. D. (1996). Bronchoalveolar lavage or oropharyngeal cultures to identify lower respiratory pathogens in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 21(5), 267-275.
- [223] D'Silva, P., Caudri, D., Shaw, N., Turkovic, L., Douglas, T., Bew, J., et al. (2017). Induced sputum to detect lung pathogens in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 52(2), 182-189.

- [224] Jain, K., Wainwright, C., & Smyth, A. R. (2016). Bronchoscopy-guided antimicrobial therapy for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*(1), Cd009530.
- [225] Navarro, J., Rainisio, M., Harms, H. K., Hodson, M. E., Koch, C., Mastella, G., et al. (2001). Factors associated with poor pulmonary function: cross-sectional analysis of data from the ERCF. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. *Eur Respir J*, 18(2), 298-305.
- [226] Máiz, L., Cuevas, M., Lamas, A., Sousa, A., Quirce, S., & Suárez, L. (2008). *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in cystic fibrosis: clinical significance and specific immune response involving serum immunoglobulins G, A, and M. *Archivos de Bronconeumología ((English Edition))*, 44(3), 146-151.
- [227] Brunke, S., & Hube, B. (2013). Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cell Microbiol*, 15(5), 701-708.
- [228] De Vrankrijker, A., Van der Ent, C., Van Berkhout, F., Stellato, R., Willems, R., Bonten, M., et al. (2011). *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis: implications for lung function? *Clinical Microbiology and Infection*, 17(9), 1381-1386.
- [229] Pant, S., Agarwal, J., Goel, A., Gangwar, P. K., Waseem, M., Gupta, P., et al. (2016). Does 24bp Duplication of Human CHIT1 Gene (Chitotriosidase1) Predispose to Filarial Chyluria? A Case-Control Study. *J Clin Diagn Res*, 10(9), Pc01-pc04.
- [230] Sinha, S., Singh, J., Jindal, S. K., Birbian, N., & Singla, N. (2014). Association of 24 bp duplication of human CHIT1 gene with asthma in a heterozygous population of north India: a case-control study. *Lung*, 192(5), 685-691.
- [231] De Rose, V., Molloy, K., Gohy, S., Pilette, C., & Greene, C. M. (2018). Airway Epithelium Dysfunction in Cystic Fibrosis and COPD. *Mediators Inflamm*, 2018, 1309746.
- [232] Mall, M. A. (2016). Unplugging Mucus in Cystic Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Ann Am Thorac Soc*, 13 Suppl 2, S177-185.
- [233] Nobakht, M. G. B. F., Aliannejad, R., Rezaei-Tavirani, M., Taheri, S., & Oskouie, A. A. (2015). The metabolomics of airway diseases, including COPD, asthma and cystic fibrosis. *Biomarkers*, 20(1), 5-16.
- [234] Borman, A. M., Palmer, M. D., Delhaes, L., Carrere, J., Favennec, L., Ranque, S., et al. (2010). Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. *Med Mycol*, 48 Suppl 1, S88-97.

- [235] Coron, N., Pihet, M., Fréalle, E., Lemeille, Y., Pinel, C., Pelloux, H., et al. (2018). Toward the standardization of mycological examination of sputum samples in cystic fibrosis: results from a French multicenter prospective study. *Mycopathologia*, 183(1), 101-117.
- [236] Lee, T. W., Brownlee, K. G., Conway, S. P., Denton, M., & Littlewood, J. M. (2003). Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*, 2(1), 29-34.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Studie wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abteilung Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Dominik Hartl durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Mezger, Dr. med. Andreas Hector und Prof. Dr. med. Dominik Hartl. Darüber hinaus betreuten sie die Studie und korrigierten das verfasste Manuskript.

Sämtliche Laborarbeiten wurden nach Einarbeitung durch die medizinisch-technische Assistentin Renate Koch von mir eigenständig durchgeführt. Es erfolgte eine selbstständige DNA-Isolierung aus den 108 Vollblutproben, welche von der Universitätsklinik Graz bereitgestellt wurden. Die Proben aus den CF-Zentren der Universitätskliniken München und Tübingen wurden bereits in isolierter Form zur Verfügung gestellt. Die anschließenden Genotypisierungen durch PCR, Restriktionsenzymverdau und Gelelektrophorese erfolgten ebenfalls durch mich.

Die klinischen Patientendaten wurden von den CF-Zentren der Universitätskliniken Graz, München und Tübingen übermittelt und von Dr. med. Andreas Hector zusammengestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Berlin, den 09.12.2019

9 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Hector, A., Chotirmall, S. H., Lavelle, G. M., Mirkovic, B., Horan, D., Eichler, L., et al. (2016). Chitinase activation in patients with fungus-associated cystic fibrosis lung disease. *J Allergy Clin Immunol*, 138(4), 1183-1189.e1184.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Beteiligten für die Hilfe bedanken, ohne die die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Dominik Hartl für die Möglichkeit dieser Arbeit und stetige Unterstützung herzlichst bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zudem Dr. med. Andreas Hector und Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Mezger für die durchgehend hervorragende Betreuung.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Renate Koch für die großartige Einarbeitung im Labor und freundliche Zusammenarbeit.

Ein großer Dank gilt Markus Arnold für die persönliche Unterstützung und Sabine Lürzer für die Durchsicht dieser Arbeit.

Zuletzt gebührt meiner Familie ein außerordentlicher Dank, die mir mit ihrer unermüdlichen Unterstützung und Motivation immer zur Seite stand.