

Aus der Abteilung für Kinderpneumologie

Leiter: Prof. Dr. med. Matthias Griese

Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein



Charakterisierung seltener Lungenerkrankungen im Kindesalter

Kumulative Habilitationsschrift

vorgelegt von

Dr. med. Carolin Kröner

2017

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	
1.1 Seltene Lungenerkrankungen im Kindesalter	
1.1.1 Interstitielle Lungenerkrankungen im Kindesalter (chILD)	
1.1.1.1 Erkrankungen mit einer Dysfunktion des Surfactant Systems	
1.1.1.1.1 Mutationen im <i>ABCA3</i> Gen	
1.1.1.1.2 Mutationen im <i>SFTPC</i> Gen	
1.1.2 Nicht-interstitielle, diffuse Lungenerkrankungen im Kindesalter	
1.1.2.1. Cystische Fibrose	
2 Zielsetzungen	
3 Ergebnisse	
3.1 Genotyp Phänotyp Korrelation.....	
3.2 Krankheitsverlauf - Einflussfaktoren und Biomarker.....	
3.3 Modelle für die funktionelle Analyse.....	
3.4 Effektivität der eingesetzten diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen.....	
4 Abkürzungsverzeichnis	
5 Literaturverzeichnis	

1 Einleitung

1.1 Seltene Lungenerkrankungen im Kindesalter

Seltene Erkrankungen betreffen weniger als 5/10.000 Personen in der europäischen Union [1], in Deutschland leben ca. 4 Millionen Menschen, in Europa 30 Millionen Menschen mit einer von geschätzt 8000 seltenen Erkrankungen. Seltene Lungenerkrankungen machen einen erheblichen Anteil dieser seltenen Erkrankungen aus, in Orphanet [2] sind ca. 90 seltene Erkrankungen gelistet, die die Lunge betreffen.

Diffuse Lungenerkrankungen im Kindesalter werden wie in Abbildung 1 dargestellt unterteilt in häufigere diffuse Lungenerkrankungen, die z.B. im Rahmen einer Infektion oder im Rahmen der Cystischen Fibrose entstehen und dem „childhood interstitial lung disease“ (chILD) Syndrom, das neben den spezifischen chILD Diagnosen auch die „nicht-interstitiellen Lungenerkrankungen, die sich jedoch als solche darstellen“ („ILD masqueraders“) und nicht klassifizierbare chILD einschließt [3]. Eine weitere kleine Gruppe sind die sog. asymptotische chILD Diagnosen, z.B. bei Patienten, die einen genetischen Defekt aufweisen, jedoch asymptotisch sind.

Die im Kindesalter auftretenden seltenen Lungenerkrankungen gehen mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Sie sind daher klinisch sehr relevant und müssen zeitnah und intensiv therapiert werden. Aufgrund der Seltenheit und aufgrund der Ähnlichkeit der Symptomatik zu häufigeren Lungenerkrankungen im Kindesalter, z.B. dem Asthma bronchiale, werden die Diagnosen jedoch häufig nicht oder erst sehr spät gestellt und die Kinder nicht der optimalen Therapie zugeführt. Zudem sind einzelne Erkrankungsgruppen noch gar nicht oder nur unzureichend charakterisiert.

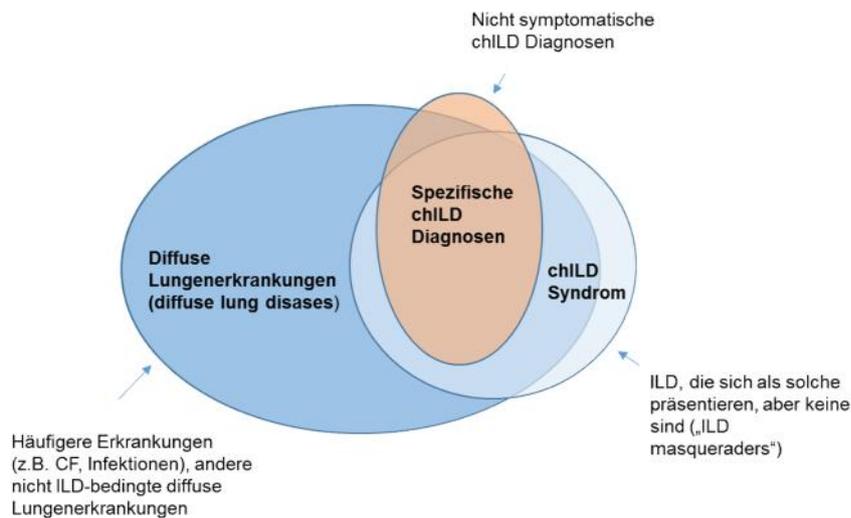


Abbildung 1 Übersicht über den Zusammenhang von diffusen Lungenerkrankungen, chILD Syndrom und spezifischen chILD Diagnosen (nach Kurland et al [3]). chILD Syndrom ist eine Untergruppe diffuser Lungenerkrankungen. Vor Diagnosestellung müssen häufigere diffuse Lungenerkrankungen wie die Cystische Fibrose oder infektionsbedingte Erkrankungen ausgeschlossen werden. Es gibt auch jeweils eine kleine Gruppe nicht symptomatischer chILD Diagnosen (z.B. asymptotische Patienten mit nachgewiesener *SFPTC* Mutation) oder ILD, die sich als solche präsentieren, jedoch keine sind (z.B. kardiale, pulmonal-vaskuläre oder lymphatische Erkrankungen). Spezifische chILD Diagnosen machen nur einen Teil des chILD Syndroms aus, da zahlreiche Diagnosen noch unbekannt sind und nicht klassifiziert werden können.

Um die Diagnostik und Therapie dieser Patienten zu verbessern wurde an dem nationalen und internationalen Zentrum für seltene Lungenerkrankungen im Kindesalter am Dr. von Haunerschen Kinderspital der LMU München eine Daten- und Biomaterialienbank etabliert, in der in den letzten 20 Jahren Informationen zu über 3000 pädiatrischen Patienten mit verschiedenen seltenen Lungenerkrankungen archiviert wurden (www.kids-lung-register.de). In Kooperation mit zahlreichen europäischen Partnern wurde diese Daten- und Biomaterialienbank im Rahmen eines EU Projektes (chILD-EU, European Register and Biobank on Childhood Interstitial Lung Diseases, European Commission, FP7, GA 305653) in den vergangenen 5 Jahren laufend aktualisiert und weiter entwickelt. Es werden hier anamnestische und klinische Informationen zusammengeführt, Lungenbiopsiepräparate, radiologische Untersuchungen und EDTA Blut der Patienten und z.T. der Eltern archiviert. Gemeinsam mit Experten aus verschiedenen Ländern wird das diagnostische und therapeutische Vorgehen besprochen und ausgewertet. Mehrere hundert Kinder mit seltenen Lungenerkrankungen wurden zudem in den letzten Jahren in der Christiane-Herzog-Ambulanz direkt betreut.

1.1.1 Interstitielle Lungenerkrankungen im Kindesalter – childhood interstitial lung disease (chILD)

Eine wichtige Gruppe seltener Lungenerkrankungen im Kindesalter sind die chILD, deren Inzidenz zwischen 1.32 [4] und 3.6 Patienten/eine Million Menschen [5] liegt. chILD bilden eine

heterogene Gruppe sehr seltener pulmonaler Erkrankungen, die durch diffuse Umbauprozesse der distalen Luftwege und des Interstitiums der Lunge charakterisiert sind. Allerdings liegt der Ursprung nicht aller Erkrankungen im Interstitium der Lunge, so dass der Terminus chILD z.T. irreführend sein kann.

Die Diagnose chILD wird erst nach Ausschluss von anderen, häufigeren Erkrankungen mit diffuser Lungenbeteiligung gestellt; diese häufigeren Erkrankungen mit diffuser Lungenbeteiligung sind vornehmlich die Cystische Fibrose (CF), die primäre ziliäre Dyskinesie, die bronchopulmonale Dysplasie (BPD), angeborene oder erworbene Immundefekte, angeborene Herzfehler, pulmonale Infektionen oder wiederholte Aspirationen. Die American Thoracic Society (ATS) hat im Jahr 2013 eine Konsensus-basierte Richtlinie erstellt mit praktischen Empfehlungen zur Klassifikation, Evaluation und Management von chILD, mit einem Fokus auf Kindern < 2 Jahren [3]. Eine diffuse Lungenerkrankung eines Neugeborenen oder Kleinkinds, die nicht durch eine der o.g. häufigeren Erkrankungen verursacht ist, wird nach Erfüllung von drei der folgenden vier diagnostischen Kriterien als chILD klassifiziert: (1) respiratorische Symptome (z.B. Husten, (Belastungs-)dyspnoe, schnelles Ermüden), (2) klinische Zeichen einer respiratorischen Insuffizienz (z.B. Tachypnoe, Trommelschlegelfinger, pathologischer Auskultationsbefund, Einziehungen, Gedeihstörung, respiratorisches Versagen), (3) Hypoxämie und (4) diffuse pathologische Veränderungen in Röntgen oder CT Thorax. Auch Kinder, die eine diffuse Lungenerkrankung verursacht durch eine der häufigeren Erkrankungen haben, deren Schweregrad jedoch ungewöhnlich ausgeprägt erscheint, sollten auf das zusätzliche Vorliegen einer chILD untersucht werden [3].

Klassifikation

Grundlage für eine adäquate Diagnostik und Therapie aber auch für eine verlässliche Prävalenz- und Inzidenzbestimmung ist eine einheitliche Klassifikation von chILD. Von Deutsch et al [6] wurde im Jahr 2007 anhand von Lungenbiopsiepräparaten von 187 Kindern < 2 Jahren ein histopathologisches Kategorisierungssystem entwickelt, das Grundlage zahlreicher Studien und Fallberichte wurde und die Terminologie seltener Lungenerkrankungen im Kindesalter vereinheitlicht hat. Diese Klassifikation wird nach wie vor, z.T. in leicht abgeänderter Version, verwendet. chILD werden hier nach dem Alter der Patienten in zwei große Gruppen unterteilt: „Erkrankungen, die häufiger im Kleinkindsalter auftreten“ und „Erkrankungen, die nicht spezifisch für das Kleinkindsalter sind“. In jeder Gruppe gibt es 6 große Subkategorien, die diverse Diagnosen umfassen (Tabelle 1).

Diagnostik

Die diagnostische Aufarbeitung eines Kindes, bei dem der Verdacht auf ein chILD Syndrom besteht, beinhaltet neben der Durchführung einer Echokardiographie, eines Dünnschicht CT

des Thorax und von Lungenfunktionstests, ggfs. auch die Durchführung einer flexiblen Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage (BAL) und ggfs. die Durchführung einer Lungenbiopsie. Bei Neugeborenen mit schwerer, schnell fortschreitender Erkrankung, oder bei einer positiven Familienanamnese für adulte ILD oder chILD, sollte eine genetische Untersuchung der Gene *SFTPB* (Surfactant Protein B Gen), *SFTPC* (Surfactant Protein C Gen) und *ABCA3* (ATP-binding cassette subfamily A member Gen) durchgeführt werden. Wenn zeitgleich ein Hypothyroidismus und eine Hypotonie vorliegen, wird empfohlen, eine Mutation bzw. Deletion des *NKX2.1* (thyroid transcription factor (*TTF-1*)) Gens auszuschließen. Bei Neugeborenen mit einer therapierefraktären pulmonalen Hypertonie und respiratorischem Versagen sollten Mutationen oder Deletionen im *FOXF1* Gen ausgeschlossen werden. Auch bei Kindern jenseits der Neonatalperiode mit chILD Syndrom und unklarer Diagnose, wird eine genetische Untersuchung der *SFTPC* und *ABCA3* Gene empfohlen. Für Kinder jenseits der Neonatalperiode mit Alveolarproteinose und negativer *SFTPC* und *ABCA3* Genetik, wird eine Testung für die Rezeptorgene *CSF2RA* und *CSF2RB* (colony stimulating factor receptor 2 (CSF2R) und β Kette) empfohlen, ebenso wie die Bestimmung der Serumwerte des granulocyte-macrophage colony stimulating factors (GMCSF). Bei Kindern jenseits der Neonatalperiode mit chILD Syndrom, Hypothyreoidismus und/oder neurologischen Auffälligkeiten (z.B. Hypotonie oder Choreoathetose) oder bei Kindern mit schwerer chILD, positiver Familienanamnese oder anderen Auffälligkeiten, die bei negativer *ABCA3* und *SFTPC* Genetik auf eine Surfactant Dysfunktion hindeuten, wird ebenfalls empfohlen, eine *NKX2.1* (*TTF1*) Mutation oder Deletion auszuschließen.

Tabelle 1 – Übersicht der Kategorien und Unterkategorien diffuser Lungenerkrankungen im Kindesalter adaptiert nach Deutsch et al [6]

Category	Subcategories – examples
A DPLD disorders manifesting primarily in infancy	
A1 Diffuse developmental disorders	- Acinar dysplasia - Congenital alveolar dysplasia - Alveolar-capillary dysplasia with pulmonary vein misalignment
A2 Alveolarisation deficiencies	- Pulmonary hypoplasia, primary (idiopathic) - Pulmonary hypoplasia, secondary (e.g. diaphragmatic hernia) - Related to chromosomal disorders
A3 Specific conditions of undefined etiology	- Chronic tachypnea of infancy (CTI) - Neuroendocrine cell hyperplasia of infancy (NEHI)
A4 Surfactant dysfunction disorders	- <i>ABCA3</i> mutations - <i>SFTPC</i> mutations - <i>SFTPB</i> mutations
Ax Unclear Respiratory Distress Syndrome in the mature neonate	- Familial - Pulmonary hypertension - No or very low surfactant proteins SP-B or SP-C biochemically
Ay Unclear Respiratory Distress Syndrome in the almost (30-36 weeks) mature neonate	- Familial - Pulmonary hypertension - No or very low surfactant proteins SP-B or SP-C biochemically

B DPLD disorders occurring at all ages

B1	DPLD related to systemic disease processes	- Achondroplasia, e.g. cartilage-hair hypoplasia - Goodpasture's disease - Sickle cell disease
B2	DPLD in the presumed immune-intact host, related to exposures (infectious/non-infectious)	- Acute fibrinous and organizing pneumonia - Aspiration syndromes, with or without obliterative bronchiolitis - Diffuse alveolar damage and acute interstitial pneumonia
B3	DPLD in the immunocompromised or transplanted host	- Diffuse lung damage of unknown etiology - Infections, due to antibody deficiencies - Related to transplantation and rejection, with or without obliterative bronchiolitis
B4	DPLD related to lung vessels structural processes	- Pulmonary hypertension, primary or secondary - Congestive changes related to cardiac dysfunction
B5	DPLD related to reactive lymphoid lesions	- Follicular bronchitis/bronchiolitis - Giant lymph node hyperplasia (Castleman's disease)
Bx	Unclear Respiratory Distress Syndrome in the non-neonate	- familial

Reference: [7]

Therapie

Kontrollierte Therapiestudien für chILD Diagnosen gibt es nicht, die Therapie stützt sich auf unsystematische Beobachtungen, klinische Erfahrungen und Fallbeschreibungen. Es gibt immer mehr internationale Kooperationen, die das Ziel haben, für chILD eine Verbesserung der Fallaufnahme zu ermöglichen, Register und Biobanken zu etablieren, sowie dringend benötigte klinische Studien zu realisieren [8].

Für chILD gibt es noch keine effektive Therapie. Für lebensbedrohlich erkrankte Patienten gibt es die Möglichkeit einer Lungentransplantation. Es besteht ferner die Möglichkeit einer immunsuppressiven Therapie, die aufgrund der Schwere potentieller Nebenwirkungen im Einzelfall abgewogen werden muss. Es sollte eine Infektionsprophylaxe erfolgen und begleitende Symptome, wie die Hypoxämie und eine Gedeihstörung müssen symptomatisch therapiert werden. Die Familien müssen engmaschig begleitet und aufgeklärt werden, eine genetische Beratung sollte durchgeführt werden. Die Betreuung der Patienten erfordert meist eine interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen pädiatrischen Pneumologen, Radiologen, Chirurgen, Pathologen und Genetikern.

Aufgrund der unzureichenden Datenlage für chILD bleiben trotz der hohen Morbidität und Mortalität der Erkrankungen viele Fragen hinsichtlich der Pathophysiologie, Diagnostik, Prognose und Therapie offen. So müssen Inzidenz und Prävalenz einzelner Erkrankungsentitäten, aufbauend auf einer einheitlichen Terminologie und Kategorisierung, präzisiert werden. Klinische Phänotypen und Verläufe einzelner Erkrankungen müssen genau charakterisiert werden und ihr Zusammenhang mit adulter ILD untersucht werden. Genetische, epigenetische, zelluläre und molekulare Grundlagen einzelner chILD Diagnosen müssen

analysiert werden, Daten- und Biomaterialienbanken aufgebaut und bestehende ausgeweitet werden. Basierend hierauf müssen Multicenter Studien zu Diagnostik und Therapie durchgeführt werden.

1.1.1.1 Erkrankungen mit einer Dysfunktion des Surfactant Systems

Eine wichtige Entität aus der Gruppe der Erkrankungen, die häufiger im Kleinkindsalter auftreten, sind Erkrankungen, die mit einer Dysfunktion des Surfactant-Systems einhergehen. Diese Erkrankungen sind die molekular am besten definierte Gruppe der chILD, seit verschiedene Gene identifiziert werden konnten, die wichtige und für die Surfactant Homöostase essentielle Proteine kodieren, z.B. dem ATP-binding cassette subfamily A member 3 (*ABCA3*) Gen und dem Surfactant Protein C (*SFPTC*) Gen.

In den unter 3.1 beschriebenen Arbeiten konnten anhand einer relativ großen Patientenzahl zwei Erkrankungen dieser Gruppe hinsichtlich der Genotyp-Phänotyp Korrelation analysiert werden und wichtige klinische, diagnostische und therapeutische Informationen abgeleitet werden.

1.1.1.1.1 Mutationen im ABCA3 Gen

Das ABCA3 Protein besteht aus 1704 Aminosäuren; es gehört zu den ABC Transportern und wird von einem 33 Exon langem Gen kodiert, das auf Chromosom 16 liegt. Das ABCA3 Protein wird v.a. in Lungengewebe exprimiert, an der Lamellarkörperchen-Membran der Typ II Pneumozyten. Das ABCA3 Protein ist dort wesentlich für die pulmonale Surfactant Synthese und Verarbeitung. Mutationen im *ABCA3* Gen führen zu Surfactant Stoffwechsel Störungen, zu neonatalem respiratorischem Versagen und zu interstitiellen Lungenerkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter. In der vorliegenden Habilitationsarbeit konnte anhand einer Kohorte von 40 Patienten mit homozygoten oder compound heterozygoten Mutationen wichtige genotypische und phänotypische Erkenntnisse generiert werden (vgl. 3.1).

1.1.1.1.2 Mutationen im SFTPC Gen

Ein weiteres, für die Surfactant Homöostase wesentliches Protein ist das Surfactant Protein C (SP-C), ein hydrophobes Protein, das von dem *SFTPC* Gen auf Chromosom 8p21.3 kodiert wird. SP-C wird als pro-Protein in Typ II Pneumozyten exprimiert, und wird nach post-translationaler Prozessierung als matures SP-C in den Alveolarraum sezerniert [9]. Die Erstbeschreibung einer interstitiellen Lungenerkrankung aufgrund einer Mutation im *SFTPC* Gen erfolgte 2001 [10], seitdem wurden mehr als 50 ursächliche Mutationen identifiziert, vornehmlich in kleineren Fallserien oder Fallberichten [11]. Die häufigste Mutation im *SFTPC* Gen ist c.218T>C (p.I73T), die zu einer Störung der Proteinfaltung und der intrazellulären

Prozessierung führt [9]. Ein sehr konservierter Abschnitt des SP-C pro-Proteins ist die sogenannte BRICHOS Domäne am C-terminalen Ende (p.F94-p.I197) [11]. Diese Domäne verhindert normalerweise, dass das Protein Amyloid-ähnliche Fibrillen formiert, die bei Patienten mit *SFTPC* assoziierten ILD häufig zu unlöslichen, fibrillären β -Blatt Polymer Ablagerungen führen [12]. Der Phänotyp bei Patienten mit Mutationen im *SFTPC* Gen ist sehr breit und reicht von neonatalem respiratorischen Versagen [13] bis hin zu asymptomatischer, milder oder schwerer ILD im Adoleszenten- oder Erwachsenenalter [14-16]. In der vorliegenden Arbeit (vgl. 3.1) konnte eine Genotyp-Phänotyp Analyse bei 17 Patienten mit *SFTPC* Mutation, u.a. auch hinsichtlich der Positionierung der Mutation relativ zur BRICHOS Domäne, durchgeführt werden.

1.1.2 Nicht-interstitielle, diffuse Lungenerkrankungen im Kindesalter

1.1.2.1 Cystische Fibrose (CF)

Die CF gehört zwar definitionsgemäß zu den seltenen Lungenerkrankungen im Kindesalter, ist jedoch andererseits die häufigste genetische, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung in der kaukasischen Bevölkerung. Die Prävalenz eines Neugeborenen mit CF beträgt bei nordeuropäischen Familien ca. 1:4000 und ist bei asiatischen oder afrikanischen Familien deutlich seltener [2]. Die CF wird verursacht durch eine Mutation im chlorid-conducting transmembrane channel (*CFTR*) Gen, das den transmembranösen Chloridkanal kodiert, der den Anionen Transport und die mukoziliäre Clearance in den Luftwegen reguliert [17]. Es wurden inzwischen über 2000 verschiedene Genvarianten identifiziert [18]. Je nach Auswirkung auf die Proteinfunktion werden die Mutationen in 6 unterschiedliche Klassen eingeteilt. Die Dysfunktion des CFTR Kanals führt zu Schleimretention, chronischer Infektion und Inflammation der Luftwege. Die CF ist eine Systemerkrankung, die neben der Lunge auch das Pankreas, die Leber, die Schweißdrüsen und das Vas deferens betrifft. Die CF wurde erstmals 1938 beschrieben [19]. In den 50-er Jahren lag die mittlere Überlebensdauer bei nur einigen Monaten, Haupttodesursachen waren der Mekoniumileus und die Gedeihstörung aufgrund der Pankreasinsuffizienz [20]. Heute liegt die mittlere Überlebensdauer bei über 40 Jahren und die Haupttodesursache ist respiratorisches Versagen aufgrund der chronischen, fortschreitenden Lungenerkrankung. Die symptomatische Therapie umfasst u.a. die Verbesserung der mukoziliären Clearance, eine frühzeitige und intensive Therapie von Infektionen und die Behandlung der Malabsorption. Zunehmend relevant werden Therapien, die den zugrundeliegenden CFTR Defekt korrigieren [21], sie werden bereits erfolgreich eingesetzt und führen zur einer Reduktion von pulmonalen Exazerbationen und einer Verbesserung der Lungenfunktion. Auch andere „small molecule“ Therapien und Gentherapien sind in der Entwicklungsphase. Sie haben das Potential, die Lebensqualität für Patienten mit CF nachhaltig zu verbessern und die Lebenserwartung zu verlängern. Ziel der

vorliegenden Arbeiten war es, für die Lungenerkrankung bei CF den Zusammenhang zwischen Biomarkern, Infektionen, Therapieregime und Outcome zu analysieren, um so die Therapie der Patienten weiter zu optimieren (vgl. 3.2, 3.3, 3.4).

2 Zielsetzungen

Ziel des Habilitationsprojektes war es, spezifische seltene Lungenerkrankungen im Kindesalter anhand einer großen europäischen Kohorte umfassend zu charakterisieren, für ein besseres Verständnis dieser seltenen Erkrankungen und um Diagnostik und Therapie spezifischer Entitäten zu optimieren.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

1. Korreliert der Genotyp seltener, genetisch bedingter Lungenerkrankungen im Kindesalter mit dem klinischen Verlauf, mit radiologischen, histologischen und biochemischen Parametern und dem Therapieerfolg?
2. Welche zusätzlichen Einflussfaktoren auf den Krankheitsverlauf gibt es? Sind Biomarker verfügbar, die eine optimierte Diagnostik und Therapie ermöglichen?
3. Welche Modelle eignen sich für die funktionelle Analyse eines verminderten/veränderterten Genprodukts und prospektiv für Therapiestudien?
4. Sind die eingesetzten diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen bei spezifischen seltenen Lungenerkrankungen effektiv?

3 Ergebnisse

3.1 Genotyp-Phänotyp Korrelation seltener Lungenerkrankungen im Kindesalter

Zusammenfassung der folgenden maßgeblichen Publikationen:

Kröner C, Wittmann T, Reu S, Teusch V, Klemme M, Rauch D, Hengst M, Kappler M, Cobanoglu N, Sismanlar T, Aslan AT, Campo I, Proesmans M, Schaible T, Terheggen-Lagro S, Regamey N, Eber E, Seidenberg J, Schwerk N, Aslanidis C, Lohse P, Brasch F, Zarbock R, Griese M. Lung disease caused by ABCA3 mutations. *Thorax*. 2016 Aug 11

Kröner C, Reu S, Teusch V, Schams A, Grimmelt AC, Barker M, Brand J, Gappa M, Kitz R, Kramer BW, Lange L, Lau S, Pfannenstiel C, Proesmans M, Seidenberg J, Sismanlar T, Aslan AT, Werner C, Zielen S, Zarbock R, Brasch F, Lohse P, Griese M. Genotype alone does not predict the clinical course of SFTPC deficiency in paediatric patients. *Eur Respir J*. 2015 Jul;46(1):197-206

Griese M, Zarbock R, Costabel U, Hildebrandt J, Theegarten D, Albert M, Thiel A, Schams A, Lange J, Krenke K, Wesselak T, Schön C, Kappler M, Blum H, Krebs S, Jung A, **Kröner C**, Klein C, Campo I, Luisetti M, Bonella F. GATA2 deficiency in children and adults with severe pulmonary alveolar proteinosis and hematologic disorders. *BMC Pulm Med*. 2015 Aug 12;15:87

Mutationen im ABCA3 Gen

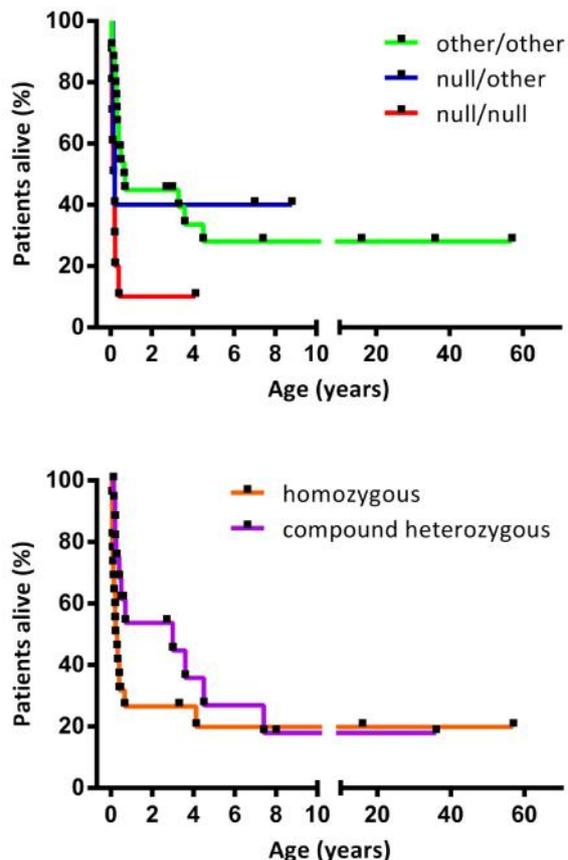
Von 1153 zwischen dem 1. Januar 2001 und dem 30. Juni 2015 im Kinderlungenregister registrierten Patienten mit diffuser parenchymatöser Lungenerkrankung, bestand bei 242 klinisch der Verdacht auf eine ABCA3 Mutation, bei ihnen wurde eine Sequenzierung des ABCA3 Gens durchgeführt. 60 dieser Patienten wiesen mindestens eine Mutation im ABCA Gen auf. 29 Patienten mit nur einer Variation und/oder mit einer nicht krankheitsverursachenden Mutation wurden von der Studie ausgeschlossen. 40 Patienten mit zwei krankheitsverursachenden Mutationen, davon 22 homozygote und 18 compound heterozygote Patienten wurden hinsichtlich der Anamnese, des klinischen Verlaufs, der Therapie, der radiologischen, histologischen und immunhistochemischen Analyse und hinsichtlich der biochemischen Untersuchung der Surfactant Proteine in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit (BALF) analysiert.

Tabelle 2 Phänotyp Gruppen der Patienten mit ABCA3 Mutationen

Group	Phenotype (age [years])	n	% of cohort	Pt ID	mutation	type of mutations	presentation (age [years])	follow up (age [years])
<i>1) early lethal</i>								
1 a)	(post)neonatal death (< 0.5)	25	62.5%	(cf Suppl. Tbl 1)	(cf Suppl Tbl 1)	9 null/null 3 null/other 13 other/other	RDS (neonatal)	dead (median 0.19, 0 - 0.32)
1 b)	death early childhood (0.5 – 5)	5	12.5%	4	p.W308R	other/other	RDS (neonatal)	LTX (1.5, stable 3.3)
				19	p.W308R p.delEx16	null/null	RDS (neonatal)	LTX (1.5, dead 4.1)
				24	p.P193S p.G1412R	other/other	RDS (neonatal)	LTX (0.6, dead 0.7)
				27	p.R43 p.R208W	other/other	cough, failure to thrive (0.9)	dead (4.5)

			28	p.P32S p.G1314E	other/other	cough, failure to thrive, cyanosis (0.5)	dead (3.6)
<i>2) prolonged survival</i>							
prolonged survival (> 5)	7	17.5%	37	p.E292V p.E765X	null/other	RDS (neonatal)	sick-better (7)
			32	p.D953H p.F1077I	other/other	hypoxemia, clubbing, mycoplasma pneumonia (2.2)	sick-same (7.4)
			35	p.P969S p.D1439Gfs*11	null/other	6 days RDS (neonatal), discharge day 11	sick-same (8.8)
			11	p.G964D	other/other	cough, PAP (2)	sick-same (16)
			12	p.G964D	other/other	cough, dyspnea (52)	sick-same (57)
			13	p.G964D	other/other	none (52)	sick-same (57)
			31	p.R709W p.I1193M	other/other	dyspnea at exercise, PAP (33)	sick-same (36)
<i>Patients with observation periods too short for definite allocation likely group</i>							
1 a) or higher			9	p.Q1045R	other/other	RDS (neonatal)	sick-better (0.46)
1 b) or higher			23	p.Q1045R p.R208W c.3863-98C>T	other/other	gestational age 32 weeks, RDS (neonatal)	sick-same (2.7)
1 b) or higher			33	p.Y963C p.E292V	other/other	na	sick-same (3)
LTX lung transplantation, na information not available, PAP pulmonary alveolar proteinosis, RDS respiratory distress syndrome							
Reference: [22]							

Neben 19 bislang noch nicht beschriebenen ABCA3 Mutationen konnten verschiedene Phänotyp-Gruppen identifiziert werden (Tabelle 2). Die beiden Hauptphänotypen sind (1) Patienten mit frühem letalem Verlauf, darunter (1a) Patienten, die innerhalb der ersten 6 Lebensmonate oder (1b) innerhalb der ersten 5 Lebensjahre versterben. Die zweite Gruppe (2) sind Patienten, die bis in die späte Kindheit oder sogar bis ins Erwachsenenalter überleben. Um den Zusammenhang mit dem Genotyp herzustellen, wurden die vorhandenen Mutationen analog zu einer Studie von Wambach et al [23] wie folgt eingeteilt: Als „Null-Mutationen“ wurden „frameshift-“, „nonsense-“ Mutationen oder Deletionen eines ganzen Exons definiert, als „other“-Mutationen wurden „missense“-Mutationen, Insertionen oder Deletionen definiert. Es konnte gezeigt werden, dass alle Patienten mit einem null/null Genotyp in früher Kindheit versterben (9 Patienten < 0.5 Jahre, ein Patient überlebte bis zur Lungentransplantation, die im Alter von 1,5 Jahren durchgeführt wurde). Patienten mit null/other und other/other Genotypen waren in allen Phänotyp Gruppen zu finden. 60% der homozygoten Patienten mit einem other/other Genotyp verstarben in einem medianen Alter von 0.25 Jahren, 64% der compound heterozygoten in einem medianen Alter von 0.4 Jahren. Die Patienten mit null/null Genotyp verstarben in beiden Gruppen zu 100% in einem medianen Alter von 0.11 und 0.19 Jahren. 60% der compound-heterozygoten Patienten mit einem null/other Genotyp verstarben in einem medianen Alter von 0.13 Jahren. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten nach Kaplan-Meier sind in Abbildung 2 dargestellt.

**Abbildung 2**

Kaplan Meier Überlebenskurven der Patienten mit null/null, null/other und other/other Mutationen im ABCA3 Gen (oberer Abschnitt) und gleiche Patienten aufgeteilt nach Homozygotie (Konsanguinität wahrscheinlich) und Heterozygotie (unterer Abschnitt). Überlebenskurven wurden verglichen mittels Log-Rank Test (oberer Abschnitt: $p=0.0148$, unterer Abschnitt: $p=0.1629$) und mittels Gehan-Breslow-Wilcoxon Test (oberer Abschnitt: $p=0.0307$, unterer Abschnitt $p=0,0041$).

Quelle: [22]

Die histologische Aufarbeitung der Lungenbiopsien der Patienten ergab variable Ergebnisse, von einer nicht spezifischen interstitiellen Pneumonie (NSIP), einer pulmonalen Alveolarproteinose (PAP), einer desquamativen interstitiellen Pneumonie (DIP) bis hin zu einer „chronic pneumonitis of infancy“ (CPI), allein oder in Kombination. Histologisch imponierten v.a. eine Hyperplasie von Typ II Pneumozyten, eine intraalveoläre Makrophagenakkumulation und alveoläre septale Verdickungen. Immunhistochemisch konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die Färbung mit ABCA3 Antikörper bei Patienten mit ABCA3 Mutationen nur schwach oder nicht nachweisbar war und ABCA3 Protein Aggregate nicht vorhanden oder klein waren im Vergleich zu den Kontrollen. Erstmals konnte auch eine Korrelation des immunhistochemischen Bildes mit dem Genotyp und dem Überleben gezeigt werden: bei allen Patienten mit null/null Mutationen war die ABCA3 Färbung negativ, wohingegen zwei Patienten mit other/other Mutationen eine moderate Intensität der Färbung aufwiesen und zumindest kleine ABCA3 Aggregate (Abbildung 3).

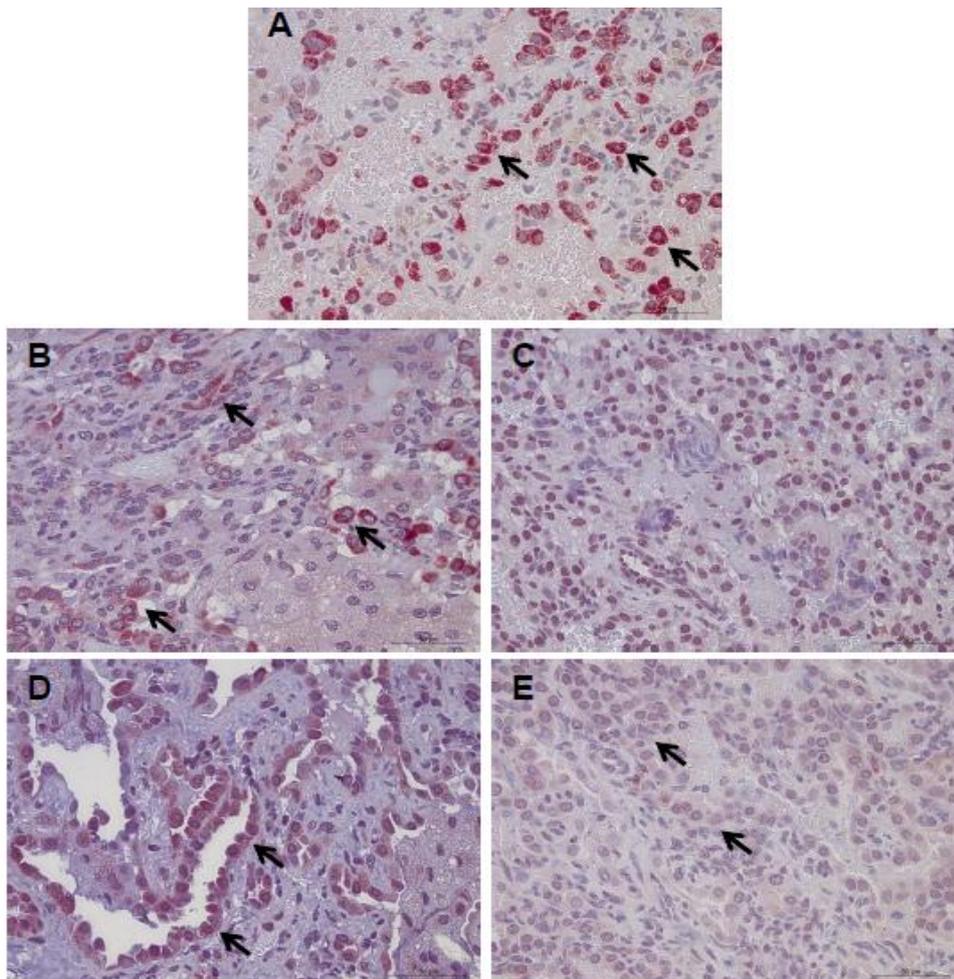


Abbildung 3

Immunohistochemische Färbung von ABCA3 Protein in Lungengewebe

A: Kontrollgewebe mit starker zytoplasmatischer ringförmiger Färbung des ABCA3 Proteins in Typ II Pneumozyten (Pfeil) B: Gewebe eines Patienten mit homozygoter other/other ABCA3 Mutation: diffuse Färbung des ABCA3 Proteins und/oder fast nicht nachweisbares ABCA3 Protein (Pfeil) C: Gewebe eines Patienten mit homozygoter null/null Mutation: keine Proteinexpression (Pfeil, Patient 20) D: Gewebe eines Patienten mit heterozygoter other/other ABCA3 Mutation: schwache und diffuse Färbung des ABCA3 Proteins (Pfeil, Patient 27) E: Gewebe eines Patienten mit compound heterozygoter null/other ABCA3 Mutation: diffuse und sehr schwache Färbung des ABCA3 Proteins (Pfeil, Patient 38). Vergrößerung: 50µm.

Quelle: [22]

Radiologisch imponierten v.a. eine milchglasartige Dichteanhebung, retikuläre Zeichnungsvermehrung und Bronchialwandverdickungen. In einigen Fällen wurden auch Zysten, Hyperinflation und noduläre Verdichtungen oder z.T. Wabenlungen beobachtet. Der Effekt therapeutischer Intervention in dieser Kohorte war sehr eingeschränkt. Durch die Applikation von exogenem Surfactant konnte eine moderate bis gute, aber nur sehr kurzfristige Verbesserung des klinischen Zustandes bei einigen Patienten gezeigt werden. Die Behandlung mit systemischen Steroiden führte bei 10/32 Patienten zu einem positiven Effekt und die Therapie mit Hydroxychloroquin bei 9/15 Patienten. Die Effekte waren jedoch auch hier transient und das Überleben insgesamt sehr eingeschränkt. Etwas längeres Überleben ist

bei Patienten, die keinen null/null Genotyp möglich, hier sollten alle o.g. Therapieoptionen ausgeschöpft werden.

Mutationen im SFTPC Gen

17 Patienten (10 weiblich, 7 männlich, darunter 3 homozygote Drillinge) mit dominant heterozygoter Mutation im *SFTPC* Gen, registriert im Kinderlungenregister zwischen 1998 und 2013, wurden in die Studie aufgenommen. Alle 17 Patienten waren kaukasischer Abstammung, 8 Patienten waren Träger der häufigsten Mutation p.I73T. 8 Patienten hatten andere, dominant heterozygote Sequenzvariationen, ein Patient war compound heterozygot für p.L101P und p.E191K. Drei Mutationen waren zum Zeitpunkt der Veröffentlichung noch nicht beschrieben. Neun Patienten hatten de Novo Mutationen, und vier Patienten familiäre. Vier Elternpaare lehnten eine genetische Untersuchung ab. Die Lokalisation der Mutationen dieser Kohorte im *SFTPC* Gen ist in Abbildung 4 dargestellt.

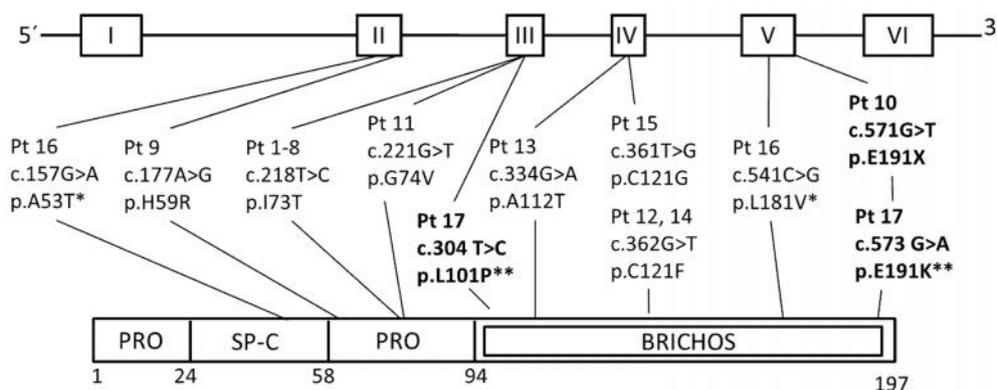


Abbildung 4

Lokalisation der Mutationen der Münchner Kohorte im *SFTPC* Gen

Das *SFTPC* Gen ist schematisch dargestellt, der obere Balken repräsentiert die mRNA (Exon I bis V), der untere Balken die Proteinsequenz (Aminosäuren 1 bis 197). Die Mutationen der Patienten der Kohorte sind auf dem cDNA (c.) und auf dem Proteinlevel (p.) dargestellt. Patienten 16 (*) und 17 (**) sind compound heterozygot. Pt = patient; fettgedruckt sind zum Zeitpunkt der Veröffentlichung noch nicht beschriebene Mutationen.

Quelle: [24]

Die Patienten dieser Kohorte wurden in einem medianen Alter von 3 Jahren (0.2-19 Jahren) symptomatisch: 8 Patienten während der Neonatalperiode, 9 Patienten zu einem späteren Zeitpunkt. Es konnten drei klinische Phänotypen identifiziert werden: (1) ein Phänotyp ist charakterisiert durch neonatales respiratorisches Versagen, zumeist des reifen Neugeborenen. Patienten mit Mutationen in der BRICHOS Domäne (vgl. 1.1.1.1.2) wurden häufiger bereits in der ersten Lebenswoche symptomatisch. (2) Ein weiterer Phänotyp ist charakterisiert durch die Präsentation als Kleinkind mit Tachydyspnoe (hier 7/17 Patienten) und/oder Gedeihstörung (hier 15/17 Patienten, davon 10 Patienten mit perkutan endoskopischer Gastrostomie (PEG)). Die Symptomatik in dieser Gruppe begann häufig

schleichend und wurde bei einigen Patienten durch eine Virusinfektion getriggert. Im CT war in der Altersgruppe 6-9 Monate eine milchglasartige Dichteanhebung das vorherrschende radiologische Bild. Die dritte Gruppe (3) wurde im späteren Kindes- oder Erwachsenenalter symptomatisch mit Tachydyspnoe, Hypoxie und z.T. wiederholten respiratorischen Infekten. Der Langzeitverlauf der Patienten dieser Kohorte variierte von gesund im Alter von 2 Jahren bis hin zu chronischer respiratorischer Insuffizienz (Tabelle 3).

Tabelle 3
Klinischer Status der Patienten der Münchner Kohorte mit SFPTC Mutation am Ende des Beobachtungszeitraums

n	Age at last observation [years]	Symptoms at last observation (age [years])
17	Median 3 (0.3-19)	2 global respiratory insufficiency, mechanical ventilation (0.3, 0.8) 1 fibrosis, listed for LTX (16.9) 1 home ventilation, mainly at night (1.3) 4 hypoxia (median 6.5, 6.5-13) 3 mild tachypnea (0.8, 1.6, 2.6) 1 hypoxemia with exercise (15.8) 1 severe pneumonia in past years (19) 2 mild upper airway infections (3, 6.7), 1 oxygen demand during infection (2.5) 1 healthy (2)

Abbreviations: LTX=lung transplantation
Reference: [24]

Die radiologische Auswertung aller Patienten mit *SFPTC* Mutation ergab, dass häufig initial eine milchglasartige Dichteanhebung im Vordergrund stand, die später in ein fibrotisches Bild übergeht mit der Präsentation als Wabenlunge, peribronchialen, interlobären und interlobulären septalen Verdickungen und Zystenbildung. Bei zwei Patienten der Kohorte konnte eine neue Entität des kombinierten Oberlappen Emphysem und Fibrose Syndroms (CPFE) beschrieben werden, das üblicherweise bei männlichen Rauchern, bei idiopathischer Lungenfibrose (IPF), Hypersensitivitätspneumonitis, Asbestose und Bindegewebserkrankungen auftritt, und erst kürzlich auch bei Patienten mit *SFTPC* Mutation beschrieben worden war [25].

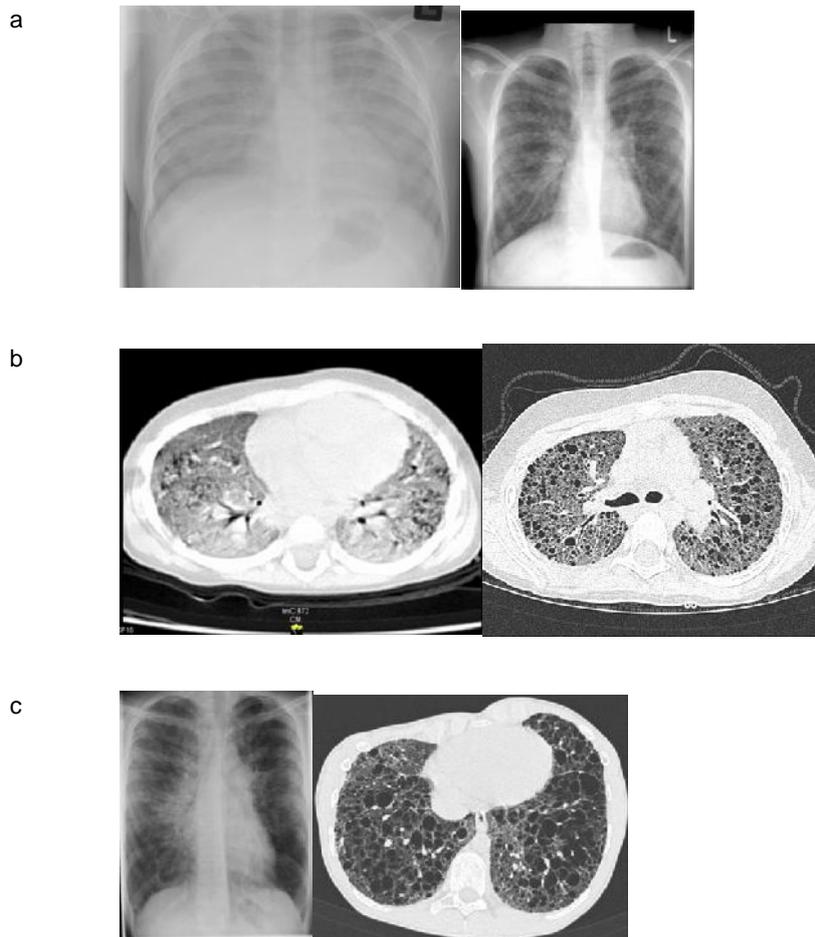


Abbildung 4

Exemplarische Darstellung der radiologischen Untersuchungen zweier Patienten mit SFTPC Mutation

a: konventionelles Röntgenbild a.p. von Patient 5 im Alter von 1,5 Jahren: diffuse milchglasartige Dichteanhebung, und im Alter von 18,7 Jahren: ausgeprägte Fibrose und Hyperinflation

b: CT von Patient 5 im Alter von 1,1 Jahren: diffuse milchglasartige Dichteanhebung, beginnende Fibrose und im Alter von 9,7 Jahren: diffuse Honigwabenlunge

c: konventionelles Röntgenbild von Patient 11 im Alter von 16,5 Jahren: ausgeprägte Bullae, Hyperinflation und interstitielle Verdickungen

Quelle: [24]

Histologisch zeigte sich auch bei Patienten mit *SFTPC* Mutation das Bild einer NSIP, PAP, oder einer kombinierten NSIP, PAP und DIP. Die meisten Patienten wiesen ein kombiniertes Bild einer interstitiellen Fibrose und einer interstitiellen chronischen Inflammation mit Hyperplasie der Typ II Pneumozyten, alveolärer septaler Verdickung, sowie der Akkumulation von Makrophagen und anderem Material in den Alveolarräumen, sowie von mesenchymalen Zellen im alveolären Interstitium auf.

Die Untersuchung der BALF zeigte, dass reifes SP-C bei keinem Patienten mit Mutationen in der BRICHOS Domäne vorhanden war. Bei Patienten mit p.I73T war SP-C in jungem Alter vorhanden, bei älteren Patienten (> 2 Jahre) jedoch nicht mehr. Diagnostisch kann die Bestimmung von SP-C und auch SP-B in BALF Hinweise geben auf eine Erkrankung aus dem

Formenkreis der Erkrankungen mit einer Dysfunktion des Surfactant Systems. Reduziertes oder fehlendes SP-C ist aber nicht spezifisch für *SFPTC* Mutationen, sondern kann im Rahmen von *ABCA3* oder *SFTPB* Mutationen vorkommen. Therapeutisch konnte in dieser Kohorte ein moderater (6 Patienten) bis positiver (weitere 6 Patienten) Effekt von Hydroxychloroquin auf den klinischen Verlauf gezeigt werden. Auch systemische Steroide zeigten einen moderat positiven Effekt bei 13 Patienten.

Tabelle 4
Therapie bei 17 Patienten mit SFPTC Mutation

Treatment	Number of total patients	BRICHOS/ Non BRICHOS Mutation
Surfactant treatment	10 Not done	4/6
	5 No improvement	4/1
	1 Moderate improvement	0/1
	1 Good response	0/1
Systemic steroids	2 Not done	2/0
	1 No improvement	1/0
	13 Moderate improvement	5/8
	1 Good response	0/1
Colchicin	14 Not done	11/3
	3 No improvement	0/3
	0 Moderate improvement	0
	0 Good response	0
Hydroxychloroquine	3 Not done	1/2
	2 No improvement	1/1
	6 Moderate improvement	2/4
	6 Good response	4/2
Other treatments	17 Antibiotic therapy	7/10
	8 Azithromycin	2/6
	5 Whole lung lavage	1/4
	1 Left lung volume reduction	0/1
General response to all treatments at end of observation	3 No long-term treatment	1/2
	7 Moderate improvement	2/5
	7 Good improvement	5/2

Reference: [24]

Mutationen im GATA2 Gen

In einer weiteren Studie wurde der Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp bei Patienten mit GMCSF negativer PAP im Rahmen von hämatologischen Erkrankungen untersucht. PAP ist eine seltene pulmonale Erkrankung mit fortschreitender Akkumulation von Surfactant in den Alveolen, die zu hypoxämischem respiratorischen Versagen und in schweren Fällen zum Tod führt [26]. PAP kann im Rahmen von drei verschiedenen Krankheitsentitäten entstehen: 1) im Rahmen von genetischen Erkrankungen, die zu einer Dysfunktion des Surfactantssystem führen, z.B. im Rahmen von *SFPTC*, *SFTPB*, *ABCA3* oder *TTF1* Mutationen oder 2) durch eine Dysfunktion des GM-CSF-Signalwegs, entweder aufgrund von Mutationen im Rezeptorgen (*GM-CSFRa*, *GM-CSFRb*) oder durch erworbene Autoantikörper gegen GM-CSF oder 3) durch einen gestörten Abbau von Surfactant aufgrund einer abnormen Anzahl oder einer gestörten Phagozytose-Funktion von Alveolarmakrophagen [27]. Letzteres entsteht entweder aufgrund der Inhalation von Partikeln oder im Rahmen

hämatologischer Erkrankungen, die die Vorläufer der Makrophagen beeinträchtigen. Zahlreiche hämatologische Erkrankungen wurden bereits mit PAP assoziiert, am häufigsten das myelodysplastische Syndrom (MDS), aber auch die akute myeloische Leukämie (AML), die chronische myeloische Leukämie (CML) und andere [28]. Bislang konnte nur ein Gen identifiziert werden, das im Hinblick auf diese Art der PAP relevant zu sein scheint: das *GATA2* Gen, das einen Zinkfinger Transkriptionsfaktor kodiert, der für die Differenzierung unreifer, hämatopoetischer Zellen relevant ist [29] und der u.a. die Phagozytose von Alveolarmakrophagen reguliert [30]. *GATA2* Haploinsuffizienz, verursacht durch heterozygote Mutationen im *GATA2* Gen, ist mit zahlreichen Diagnosen assoziiert, so z.B. mit dem MDS, der AML, der chronisch myelomonozytären Leukämie (CMML), mit schweren viralen, disseminierten mykobakteriellen und invasiven Pilzinfektionen und anderen Erkrankungen [31]. PAP wurde bei 18% aller erwachsener Patienten mit *GATA2* Defizienz nachgewiesen [31, 32], Schweregrad und klinischer Verlauf wurden jedoch bislang nicht umfassend beschrieben. In der vorliegenden Studie wurde eine Kohorte von 8 Patienten mit schwerer, chronischer PAP und hämatologischen Erkrankungen hinsichtlich des Vorhandenseins einer *GATA2* Mutation und hinsichtlich des klinischen Verlaufs und des Therapieerfolgs untersucht. Insgesamt wurden aus dem Kinderlungenregister bzw. dem chILD EU Projekt 21 Patienten mit GM-CSF negativer PAP, diagnostiziert mittels Lungenbiopsie oder BAL und den typischen CT Veränderungen, identifiziert. Hiervon war bei 13 Patienten nur die Lunge betroffen, bei 8 Patienten lag zusätzlich eine hämatologische Erkrankung vor. Diese 8 Patienten wurden in einem Alter zwischen 0,4 und 64 Jahren symptomatisch. Die Hälfte der Patienten waren Kinder. Neben der chronischen respiratorischen Insuffizienz aufgrund der PAP, litten alle Patienten zusätzlich unter wiederkehrenden respiratorischen Infekten oder Exazerbationen, häufig verursacht durch Viren, aber auch durch nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM), Herpes simplex Virus (HSV) oder Cytomegalievirus (CMV). Alle Patienten wiesen einen Immundefekt auf: zwei Patienten litten unter einer nicht weiter spezifizierten Monozytendefizienz und ein Patient hatte ein Di George Typ II Syndrom mit einem kombinierten Immundefekt. Bei fünf Patienten bestand der Immundefekt im Rahmen einer hämatologischen Erkrankung, insbesondere einer CML, einer juvenilen myelomonozytären Leukämie (JMML), einer c-akuten lymphoblastischen Leukämie (cALL) und einem MDS und/oder im Rahmen einer therapeutischen Immunsuppression. Alle Patienten hatten kontinuierlichen Sauerstoffbedarf.

Die Sanger Sequenzierung der acht Patienten der Kohorte ergab bei zwei Patienten eine heterozygote Punktmutation im *GATA2* Gen, die als schadhaft eingestuft wurden: p.Y377D, eine bislang noch nicht beschriebene „missense“ Mutation, die hier mit einem klassischen mono-MAC Syndrom assoziiert war [33] und p.R398W, eine in der Literatur bekannte

Mutation. Zwei von sechs in der Literatur beschriebenen Patienten mit p.R398W wiesen eine PAP auf [31]. Der Patient mit p.R398W dieser Kohorte zeigte zusätzlich eine Cholesterinpneumonie. Die beiden heterozygoten Variationen im GATA2 Gen wurden als nicht krankheitsverursachend eingestuft (Tabelle 5).

Tabelle 5
Mutation und klinische Charakteristika von acht Patienten mit hämatologischer PAP

Pt	sex	GATA2 gene analysis	interpretation	final diagnosis	treatment	age at follow up (y)	outcome
1	f	c.564G>C ht; p.T188T	synonymous variant; C-allele frequency 0.09	CML, karyotype 46XX t(9,22)(q34,q11) 25, CD2+, renal failure	oxygen, WLL (2x)	66	dead
2	m	c.1129T>G ht; p.Y377D	missense mutation, deleterious	Monocyte defect, <i>M. avium intracellulare</i> infection	oxygen, WLL (3x), prednisolone, azathioprine	37	dead
3	m	None		Juvenile myelomonocytic leukemia, Monosomy 7	oxygen, WLL (3x), immunosuppressive treatment, prednisolone; SCT 2x), GVHD	3, lost on follow-up	sick-same
4	f	c.1192C>T ht; p.R398W	missense mutation, deleterious	Monocyte defect, cholesterol pneumoniae	oxygen	43, lost on follow-up	sick-same
5	f	None		c-acute lymphoblastic leukemia	oxygen	7	sick-better
6	f	None		MDS	oxygen	59	dead
7	f	c.490G>A ht; p.A164T	missense variant, tolerated; C-allele frequency 0.24	Di George Syndrome type II, MDS, Monosomy 7, Trisomy 8	oxygen, WLL (14x), SCT	10	sick-better, PAP resolved
8	m	None		Sideoblastic anemia	oxygen, WLL (11x)	2	sick-better

Abbreviations: f female, CML chronic myeloid leukemia, GVHD graft versus host disease m male, MDS myelodysplastic syndrome, pt patient, SCT stem cell transplant, WLL whole lung lavage, y years, number in () number of WLL
Reference: [34]

Therapeutisch wurden sechs Patienten symptomatisch mit Ganz-Lungen-Lavagen (whole lung lavage, WLL) therapiert.

Am Ende des Beobachtungszeitraums waren drei Patienten an respiratorischer Insuffizienz verstorben, exazerbiert durch Infektion oder akutem respiratorischem Distress Syndrom (ARDS), bei drei Patienten hatte sich der klinische Zustand gebessert (sick-better) und bei zwei Patienten war der klinische Zustand unverändert (sick-same) (Table 5). Als therapeutische Optionen konnten in dieser Studie insbesondere die Stammzelltransplantation (eine Patientin) und therapeutische WLL (3 Patienten mit gutem oder sehr gutem Erfolg) herausgestellt werden. Die Stammzelltransplantation wurde bei einer Patientin mit Di George Syndrom Typ II (Deletion 10p), Immundefekt, MDS und ausgeprägter PAP durchgeführt. Bei

Erstvorstellung im Alter von 6 Jahren bestand ein chronischer, trockener Husten, eine v.a. nächtlich auftretende Dyspnoe und ein kontinuierlichen Sauerstoffbedarf von 6l/min. Die Analyse der BALF zeigte erhöhte Eosinophile mit granulär eosinophilen, PAS+ Material, typisch für PAP. Die Patientin wurde ein Jahr lang mit 14 WLLs therapiert, mit gutem klinischem und radiologischen Erfolg. Im Alter von 10 Jahren konnte ein HLA-identischer, nicht verwandter Stammzell-Spender identifiziert werden, sie erhielt eine allogene Stammzelltransplantation. Wenigen Wochen nach Stammzelltransplantation sistierte die respiratorische Symptomatik in Gänze und die PAP war nicht mehr nachweisbar. Auch der positive Effekt von wiederholten WLLs, konnte erstmals auch für pädiatrische Patienten demonstriert werden. WLLs können eingesetzt werden, um alle Arten von PAP symptomatisch zu therapieren und um die Zeit zu überbrücken, bis kausal therapiert werden kann oder andere Therapieoptionen eingesetzt werden können.

Auch in dieser Studie wurde, analog zu anderen Studien [31, 35, 36], der Schweregrad der PAP durch Infektionen, u.a. mit Mykobakterien, Norkardia, Herpes Viren und Pilzen, deutlich verschlechtert. Eine frühzeitige antimikrobielle Therapie bei Infektionen wird empfohlen. Auch sollte der exzessive Einsatz von Steroiden vermieden werden, zum Einen, da kein positiver Effekt auf die PAP zu erwarten ist und zum Anderen aufgrund des zugrundeliegenden Immundefekts, der durch Steroide verstärkt werden kann und die antimikrobielle Abwehr zusätzlich verschlechtern würde.

Vor Diagnose einer PAP anhand von charakteristischen CT Befunden, BALF Ergebnissen und/oder einer Lungenbiopsie, muss die zugrundeliegende Ursache eruiert werden. Es sollten zunächst Autoantikörper gegen GM-CSF im Serum bestimmt werden, sie sind bei mehr als 90% der PAP Patienten positiv [26]. Es sollte zudem auch das GM-CSF Level im Serum bestimmt werden: dies ist bei autoimmuner PAP meist niedrig, kann jedoch im Falle von angeborenen *GM-CSFRa* oder *GM-CSFRb* Defekten auch erhöht sein. In dieser Kohorte von Patienten mit hämatologischer Erkrankung und PAP war GMCSF im Serum niedrig bis moderat erhöht, dies könnte auf eine Hochregulation von GM-CSF hinweisen. Die genetische Untersuchung auf eine *GATA2* Mutation hin kann hilfreich sein, um eine zugrundeliegende hämatologische Erkrankung aufzudecken, v.a. bei Patienten mit dem breiten, aber charakteristischen Phänotyp einer *GATA2* Defizienz.

3.2 Einflussfaktoren auf den Krankheitsverlauf und Biomarker in Diagnostik und Therapie

Zusammenfassung der folgenden maßgeblichen Publikationen:

Hector A*, **Kröner C***, Carevic M, Bakele M, Rieber N, Riethmüller J, Griese M, Zissel G, Hartl D The chemokine CCL18 characterises *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*. 2014 Dec;44(6):1608-15 (* shared first authorship)

Kappler M, Nagel F, Feilcke M, Heilig G, Grimmelt AC, Pawlita I, Irnstetter A, Hildebrandt J, Burmester H, **Kröner C**, Griese M. Predictive values of antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis one year after early eradication treatment. *J Cyst Fibros*. 2014 Sept;13(5):534-41

Kröner C, Ganster B, Kappler M, Grimmelt AC, Belohradsky BH, Hogardt M, Laniado G, Meissner M, Schubert S, Griese M. Molecular Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteria in a German CF Center and Clinical Course of NTM Positive Patients *Open Journal of Medical Microbiology*. 2013; 3(1): 39-47

Kröner C, Kappler M, Grimmelt AC, Laniado G, Würstl B, Griese M. The basidiomycetous yeast *Trichosporon* may cause severe lung exacerbation in cystic fibrosis patients - clinical analysis of *Trichosporon* positive patients in a Munich cohort. *BMC Pulm Med*. 2013 Nov 1; 13: 61

Die Besiedelung des Respirationstrakts von CF Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ist mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert, v.a. wenn mukoide Formen des Keims vorliegen [37]. Im Falle einer chronischen Infektion der Patienten mit *P. aeruginosa* ist eine Eradikationstherapie meist schwierig [38], es wird daher heute empfohlen, bereits kurz nach dem ersten Nachweis des Keims eine frühe Eradikationstherapie einzuleiten, da diese mit besseren Erfolgsraten assoziiert ist [39, 40].

Serum Antikörper gegen *P. aeruginosa* als Marker für eine Infektion können mittels kommerziellem ELISA bestimmt werden. Es besteht eine gute Korrelation der Antikörperwerte mit einer chronischen *P. aeruginosa* Infektion. Widersprüchlich sind jedoch die Ergebnisse hinsichtlich des Nutzens der Antikörperbestimmung für die Früherkennung einer *P. aeruginosa* Infektion [41-43]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* Antikörper mit einem Therapieversagen und dem Risiko einer Re-Infektion korrelierten [44]. In unserer Arbeitsgruppe wurde der bislang noch nicht untersuchte Zusammenhang zwischen dem Verlauf der Serumantikörper und dem langfristigen Therapieerfolg einer frühen Eradikationstherapie untersucht. Insgesamt wurde bei 58 Patienten, die zwischen Januar 2005 und Dezember 2008 in der Christiane Herzog Ambulanz des Dr. von Haunerschen Kinderspitals betreut wurden, erstmalig *P. aeruginosa* in Sputum oder Rachenabstrich nachgewiesen. Alle 58 Patienten waren nach der Definition von Lee et al. [45] „bislang noch nicht infiziert“. Die mikrobiologischen und serologischen Ergebnisse der drei Jahre nach Erstinfektion wurden retrospektiv untersucht. Der langfristige Therapieerfolg wurde wie folgt definiert: kein *P. aeruginosa* Nachweis im dritten Jahr nach Erstinfektion. Es konnte gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* Antikörper ein Jahr nach Erstinfektion den langfristigen Erfolg

einer frühen Eradikationstherapie vorhersagen. Der positiv prädiktive Wert ein Jahr nach Erstinfektion betrug 75%, der negativ prädiktive Wert 82%. Bei 60% der Patienten konnte der Keim langfristig erfolgreich eradiziert werden, die Rate der Reinfektion betrug 8,5%.

Pathophysiologisch relevant für die chronische Lungenerkrankung von CF Patienten ist neben der bakteriellen Infektion der Lunge, auch die Inflammation mit der kontinuierlichen Rekrutierung von Leukozyten in den Luftwegen und der fortwährende Gewebeumbau [46, 47]. Inflammation und Gewebeumbau werden von Chemokinen reguliert, einer Proteinfamilie, die wesentlich ist für die Leukozytenmigration, für die antibakterielle Immunantwort, für die Entstehung einer Fibrose, für den Gewebeumbau und für die Angiogenese [48, 49]. Verschiedene Chemokine werden mit der Pathogenese von Lungenerkrankungen in Verbindung gebracht, insbesondere auch der CC Chemokin Ligand (CCL) 18 [50-53]. CCL18 kommt nur in Primaten vor und wird besonders in Lungengewebe exprimiert, zu einem geringeren Anteil auch in lymphatischem Gewebe [54]. CCL18 wird von Leukozyten produziert und moduliert zahlreiche Immunzellen, z.B. T-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen und hämatopoetische Stammzellen [51, 55]. CCL18 stimuliert ferner die Kollagenproduktion über pulmonale Fibroblasten [56]. CCL18 ist in humanem Serum nachweisbar und bei verschiedenen systemischen [52] und pulmonalen Erkrankungen erhöht, insbesondere bei chronischen Lungenerkrankungen wie z.B. der Hypersensitivitätspneumonitis [57], der idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF) [58], der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) [59], der Sarkoidose [60] und dem allergischen Asthma [61]. Eine Genexpressions Analyse von CF Neutrophilen zeigt, dass die Chemokine CCL17 und CCL18 in CF Neutrophilen spezifisch hochreguliert sind [62]. In einer weiteren Studie konnte die Rolle von CCL17 bei der allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) demonstriert werden [63]. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Rolle von CCL18 für die Pathogenese der CF zu untersuchen. CCL18 wurde in Serum und Atemwegsflüssigkeit von 40 CF Patienten gemessen; es wurden mögliche Korrelationen mit der Lungenfunktion, mit der bakteriellen Besiedelung der Lunge und anderen Chemokinen analysiert.

Das CCL18 Protein Level war sowohl in Serum als auch in Sputum Überständen signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Bei CF Patienten war das CCL18 Protein Level im Serum signifikant höher als im Sputum. Die Menge an CCL18 in Serum und Sputum bei CF Patienten variierte stark, von Werten ähnlich derer von gesunden Kontrollen bis hin zu 30-fach erhöhten Werten (Abbildung 5). Es wird vermutet, dass die CCL18 Level in CF Patienten von anderen CF assoziierten Faktoren moduliert werden.

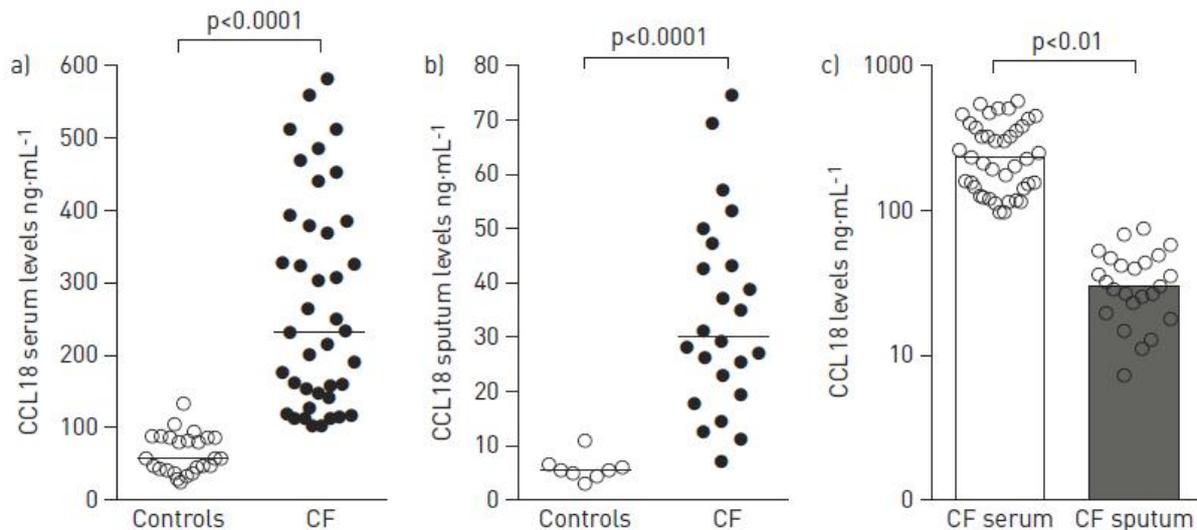
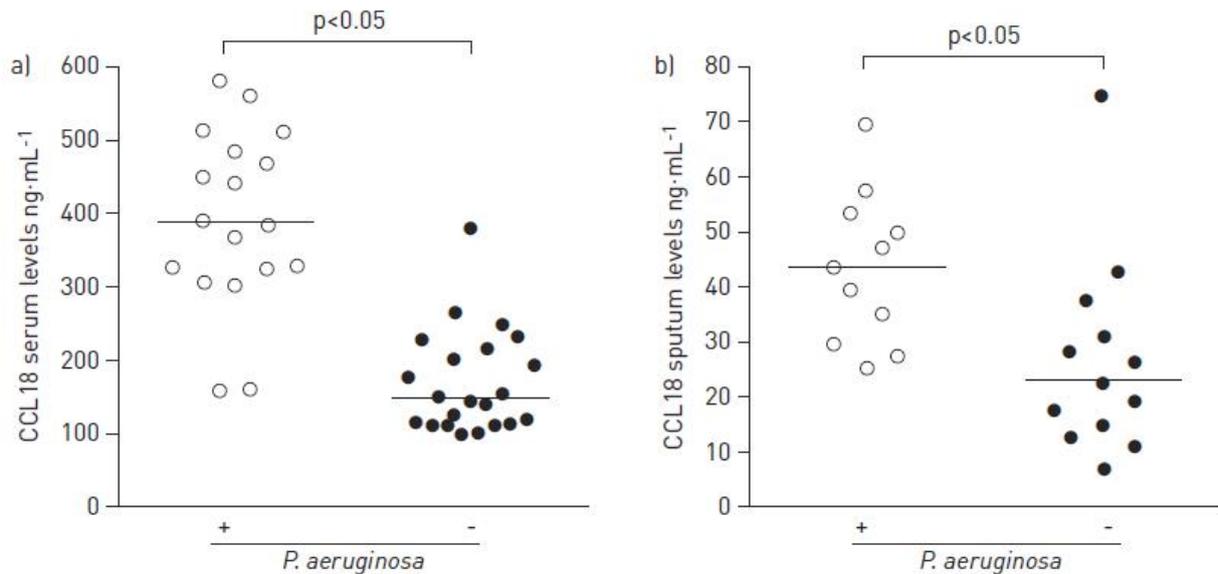


Abbildung 5

CCL18 Level von Patienten mit CF im Vergleich zu gesunden Kontrollen. CCL18 Level wurden mittels ELISA quantifiziert in a) Serum und b) Sputum von CF Patienten und gesunden Kontrollen. Die Punkte stellen einzelne Patienten dar, die horizontale Linie den Median der individuellen Gruppen c) Vergleich der Serum und Sputum Werte bei CF Patienten

Quelle: [64]

Um diese Faktoren genauer zu analysieren, wurden CCL18 Werte in Serum und Sputum mit diversen Parametern korreliert, u.a. mit Alter, Geschlecht, body mass index (BMI), *CFTR* Mutation, Medikamenten und bakteriellen und Pilzinfektionen. Von allen analysierten Faktoren war nur eine chronische Infektion mit *P. aeruginosa* signifikant mit einer CCL18 Erhöhung assoziiert (Abbildung 6). Als chronische Infektion definiert wurde ein positiver Anteil von >50% der Abstriche ein Jahr vor CCL18 Analyse. Der Nachweis anderer typischer CF Keime, z.B. von *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* und *Aspergillus fumigatus* korrelierte nicht signifikant mit den CCL18 Werten. Um die CCL18 Protein Produktion auch *ex vivo* zu messen, wurden Sputum Zellen von CF Patienten und Kontrollen isoliert [65]. Es konnte gezeigt werden, dass isolierte CF Sputum Leukozyten auch *ex vivo* eine im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Menge CCL18 produzieren. Leukozyten von chronisch infizierten *P. aeruginosa* Patienten produzieren zudem eine signifikant höhere Menge CCL18 als nicht infizierte Patienten.

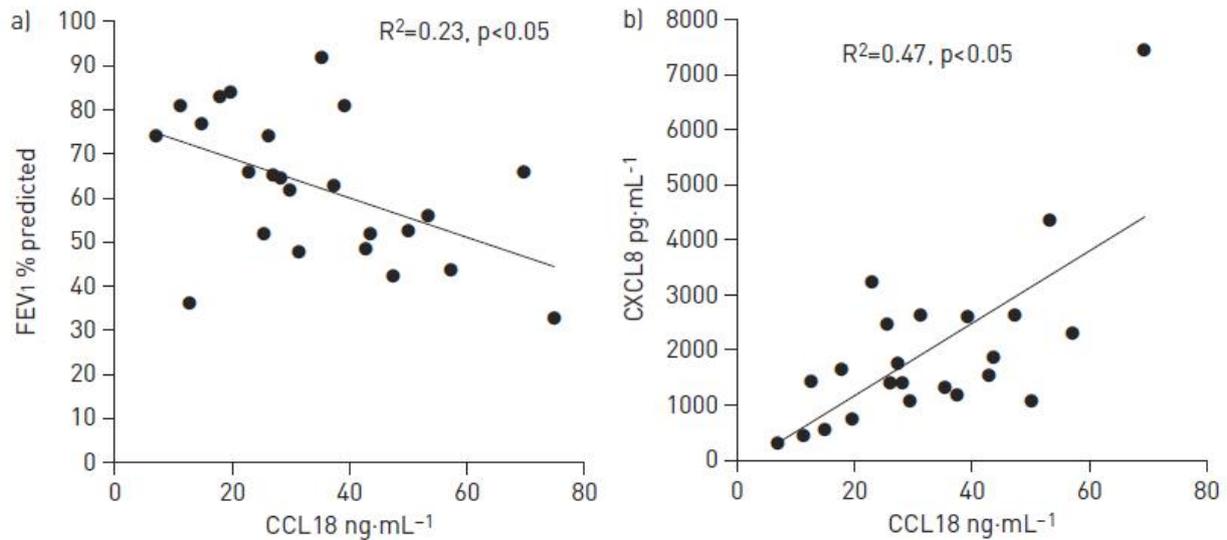
**Abbildung 6**

CCL18 Level und *P. aeruginosa* Infektion in CF Patienten. CCL18 Werte wurden mittels ELISA quantifiziert in a) Serum und b) Sputum von CF Patienten mit (+) und ohne (-) chronischer *P. aeruginosa* Infektion. CF Patienten wurden analog zu ihrem *P. aeruginosa* Status unterteilt, unabhängig von anderen nachweisbaren Pathogenen in den Luftwegen. Die Punkte stellen einzelne Patienten dar, die horizontale Linie stellt den Median der einzelnen Gruppen dar.

Quelle: [64]

Es konnte eine inverse Korrelation der Sputum CCL18 Werte mit dem „forced expiratory volume in one second“ (FEV1) gezeigt werden, es bestand jedoch keine Korrelation mit den Serum Werten (Abbildung 7). In der Literatur wurde bereits bei anderen Erkrankungen eine negative Korrelation der CCL18 Werte mit dem klinischen Verlauf gezeigt, so z.B. bei Patienten mit IPF [66, 67], mit COPD [68] und mit Asthma bronchiale [69].

CCL18 Werte im Sputum korrelierten in dieser Kohorte ferner positiv mit der Anzahl an Neutrophilen und mit der Anzahl an Lymphozyten in den Luftwegen, woraufhin untersucht wurde, ob CCL18 auch mit Neutrophilen-rekrutierenden Chemokinen korreliert: es zeigte sich tatsächlich eine Korrelation zwischen CCL18 Werten im Sputum und den Werten des CXCR1 Liganden CXCL8 im Sputum. Keine Korrelation bestand mit den CXCR2 Liganden CXCL1 und CXCL2. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass CCL18 als Biomarker und mögliches therapeutisches Target für die CF in Betracht gezogen werden kann.

**Abbildung 7**

Korrelation der CCL18 Werte im Sputum mit der Lungenfunktion und den CXCL8 Werten a) Korrelation der CCL18 Protein Werte, quantifiziert mittels ELISA, im Sputum von CF Patienten mit der FEV1. b) Korrelation von CCL18 Werten mit CXCR8 Protein werten, quantifiziert mittels ELISA, im Sputum von CF Patienten.

Quelle: [64]

Nicht tuberkulöse Mykobakterien (NTM)

Die Auswirkungen von NTM auf den klinischen Verlauf wurden anhand einer Kohorte von 357 CF Patienten analysiert, die in der Christiane Herzog Ambulanz des Dr. von Haunerschen Kinderspitals zwischen dem 1. Januar 1998 und dem 1. Januar 2010 behandelt wurden. Die molekulare Epidemiologie der in dieser Kohorte häufigsten NTM Spezies wurde mittels Multilocus-Sequenz Analyse (MLSA) untersucht. Bei 13 der 357 Patienten wurden NTM in Rachenabstrich und/oder Sputum nachgewiesen. Dies entspricht einer Nachweisrate von 3,6%, die im Vergleich zu anderen Studien bei CF Patienten (dort 2-28%) [70, 71] relativ niedrig ist. Das mediane Alter bei Erstnachweis war 17,4 Jahre (13,8 – 28 Jahre), 11 Patienten wurden insgesamt im Median 5,2 Jahre lang beobachtet (2-11,7 Jahre). Ein Patient starb kurz nach dem ersten Nachweis und ein Patient war nicht nachverfolgbar.

3 Patienten hatten nur einen einmaligen NTM Nachweis, wohingegen die NTM bei 9 Patienten wiederholt in Rachenabstrich/Sputum nachgewiesen wurden, im Median für 3,7 Jahre (0,1-11,4 Jahre). Alle bis auf einen Patienten erfüllten die klinischen und mikrobiologischen Kriterien einer NTM Lungenerkrankung [72]. Alle Patienten wurden mit einer Kombinationstherapie aus oralen, inhalativen und i.v. antibiotischen und antimykotischen Medikamenten behandelt, die Mindesttherapiedauer betrug ein Jahr. Bei 5 der 9 Patienten waren die NTM trotz intensiver Therapie mehr als 2 Jahre nachweisbar: bei zwei dieser Patienten blieb die FEV1 stabil (2,4), bei einem Patienten (1) verschlechterte sie sich und zwei Patienten zeigten sogar eine ausgeprägte Verschlechterung der FEV1 (3, 11) (Abbildung 8).

Drei (5,6,10) der 5 chronisch besiedelten Patienten wurden nach im Mittel 1,2 (0,1-1,4) Jahren erfolgreich eradiziert. Ein Patient verstarb 0,7 Jahre nach dem Erstdnachweis von NTM im Sputum, sein klinischer Verlauf vor dem Erstdnachweis war stabil mit kleineren respiratorischen Infektionen. Bei einem weiteren Patienten (Patient 3) mit einer Nachweisperiode von 4,4 Jahren wurde eine dramatische klinische Verschlechterung festgestellt. Er wurde zusätzlich zu der intensiven oralen, intravenösen und inhalativen antimykotischen Therapie, 3x/Woche mit s.c. Interferon-gamma 1b (IFN-gamma 1b) therapiert. Die FEV1 Werte stabilisierten sich auf einem Niveau um die 36%pred, vor Erstdnachweis der NTM lagen diese bei 102%pred (Abbildung 8). Der Effekt der NTM Infektion auf den Body Mass Index (BMI), Immunglobulin G (IGG) und Blutsenkung (BKS) war variabel.

Der Effekt einer NTM Infektion auf den klinischen Verlauf ist in der Literatur umstritten, in einige Studien wurde v.a. eine chronische Infektion mit *M. abscessus* mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion assoziiert [73, 74], wohingegen dies in anderen Studien nicht nachgewiesen wurde [75, 76]. Auch unsere Daten zeigen, dass der Verlauf nach NTM Nachweis sehr variabel ist. Bei einigen Patienten wurde kein Effekt festgestellt, wohingegen bei anderen Patienten eine dramatische Verschlechterung des klinischen Verlaufs beobachtet wurde. Diese Variabilität ist möglicherweise auf Faktoren wie Genetik, zugrundeliegende Schwere der CF Erkrankung, individuelle Abwehr, oder auf eine chronische Exposition zurückzuführen. Systemische und inhalative Behandlung mit IFN-gamma kann zusätzlich zur antimykobakteriellen Therapie einen positiven Effekt haben [77].

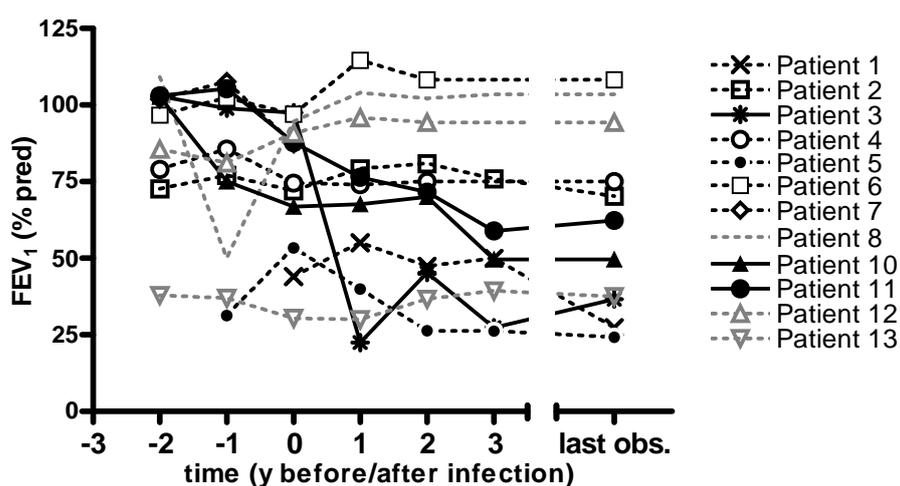


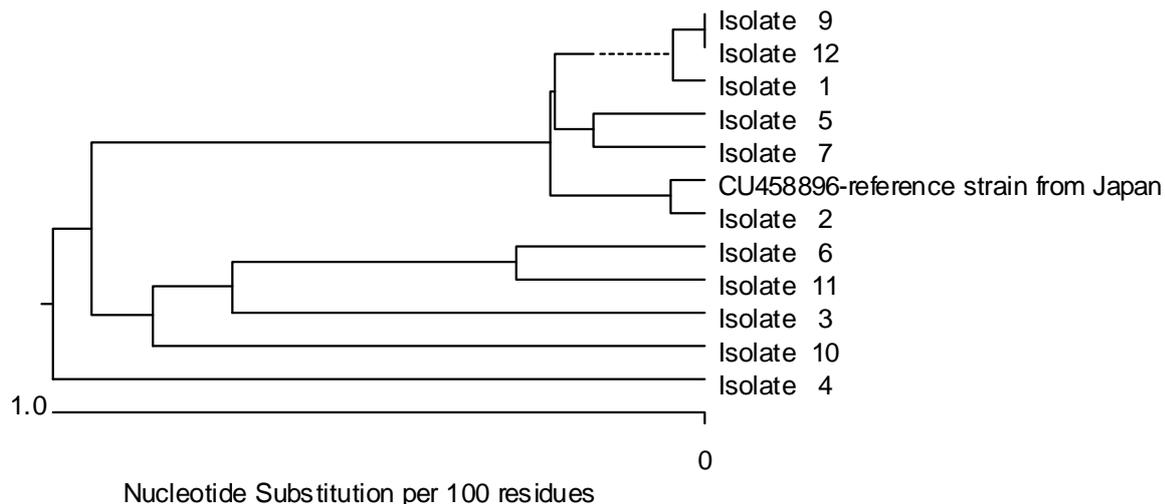
Abbildung 8

FEV1(%soll) der NTM positiven CF Patienten. Mittelwerte der FEV1 (%soll) von 11 NTM positiven CF Patienten in Abhängigkeit von dem Datum des Erstdnachweises (3, 2, 1 Jahr vor, zum Zeitpunkt des Erstdnachweises und 1,2 und 3 Jahre nach Erstdnachweis, sowie am Ende des Beobachtungszeitraums.) Jedes Symbol repräsentiert einen Patienten, die durchgezogenen Linien stellen die Patienten mit dem schlechtesten Verlauf dar, die graue Linie stellt die Patienten mit nur einem einzigen NTM Nachweis dar.

Quelle: [78]

Molekulare Epidemiologie

Die häufigste, bei 12 von 13 Patienten nachgewiesene NTM Spezies in dieser Kohorte war *M. abscessus*. Bei 4 Patienten wurde eine zweite Spezies nachgewiesen, u.a. *M. chelonae*, *M. avium* und *M. intracellulare*. 11 klinische *M. abscessus* Isolate wurden mittels MLSA untersucht. Hierzu wurden interne Fragmente von 5 Haushaltsgenen zusammen mit der 16S-23S-rRNA „internal transcribed spacer sequence“ (IST) ausgewählt, insgesamt wurden 2972 Nukleotide bestimmt. Diese wurden mit dem *M. abscessus* Referenz Stamm (Gen Bank Zugangsnummer CU458896) verglichen. Nukleotidsequenzbeziehungen wurden als Wurzelbaum dargestellt: es wurde kein dominanter *M. abscessus* Klon identifiziert. Bei 6 Patienten unterschied sich das MLSA Muster, bei 2 Patienten (9,11) wurden Stämme mit identischen Nukleotidsequenzen in allen untersuchten DNA Fragmenten nachgewiesen (Abbildung 9). Die Übertragung von Patient zu Patient erscheint jedoch sehr unwahrscheinlich, da beide Patienten keinen Kontakt hatten. Bei einem weiteren Patienten (1) wurde ein Stamm mit nahezu identischer Sequenz festgestellt, mit nur 3 Nukleotidsubstitutionen. Auch dieser Patient hatte keinen Kontakt zu den anderen beiden Patienten. Die Stämme von 2 weiteren Patienten (5,7) waren verwandt und unterschieden sich nur durch 8 Nukleotidsubstitutionen, konnten aber keiner klonalen Abstammungslinie zugeordnet werden. Die Sequenz von Patient 2 war identisch zu einem in Japan isolierten *M. abscessus* Stamm. Unsere Daten zeigen, dass eine Übertragung von NTM von Patient zu Patient unwahrscheinlich ist, dass es aber möglicherweise klonale *M. abscessus* Gruppen gibt, die sich weltweit ausbreiten und natürliche Reservoirs für *M. abscessus* Kolonisierung von CF Patienten darstellen. In der Literatur gibt es allerdings einen Bericht über einen Ausbruch von *M. abscessus* ss *massiliense* bei 5 CF Patienten, bei der es entweder per Tröpfcheninfektion oder über verunreinigte Gegenstände in einer Klinik zu einer Transmission von Patient zu Patient kam [79]. Wir empfehlen daher, dass die Hygienestandards, die momentan für alle CF Patienten, auch für NTM positive Patienten gelten, erweitert werden: NTM positive Patienten sollten in der Ambulanz separiert werden und während Ihres Aufenthalts in einem CF Zentrum Atemschutzmasken tragen.

**Abbildung 9**

Pylogenetischer Stammbaum der Mykobakterium abscessus MLST (multilocus sequence typing) hsp65/IST/rpoB/pgm/argH/cya (Clustal V). Phylogenetischer Stammbaum der verketteten DNA Sequenzen der 5 Haushaltsgene und der IST Sequenzen der *M. abscessus* Stämme isoliert bei 11 CF Patienten. Die Sequenz der Referenzstamms CU458896 ist zum Vergleich dargestellt. Der Stammbaum wurde mit Clustal V erstellt. Die Reliabilität der Typologie des Baumes wurde durch eine Bootstrap Analyse mit 1000 Replikaten geeicht. Gezeigt werden Bootstrap Werte von 100% an den Knoten. Der horizontale Balken stellt die Skala dar und zeigt die Anzahl der Substitutionen pro 100 Resten. Quelle: [78]

In einer weiteren Studie wurden die Auswirkungen einer Besiedelung der Luftwege von CF Patienten mit *Trichosporon spp* auf den klinischen Verlauf untersucht. Hierzu wurden alle Rachenabstriche/Sputum von 360 CF Patienten untersucht, die zwischen 2003 und 2010 in der Christiane Herzog Ambulanz des Dr. von Haunerschen Kinderspitals behandelt wurden. Trichosporen gehören zur Gattung der basidiomyceten Hefen und sind in der Natur weit verbreitet. Sie sind in Boden und Wasser nachweisbar und kolonisieren z.B. menschliche Haut und den Gastrointestinaltrakt [80, 81]. Einige Spezies der Trichosporen sind humanpathogen, z.B. *T. asahii*, *T. inkin*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. mucoides*, *T. ovoides*, *T. louberei* und *T. japonicum* [82] [83]. Die häufigsten durch Trichosporen verursachten Krankheitsbilder sind die weisse Piedra, die nur in Japan vorkommende Sommer-Hypersensitivitätspneumonitis und die invasive Trichosporonose, die häufig bei immunsupprimierten Patienten auftritt. Die Bedeutung der Besiedelung der CF Lunge mit *Trichosporon spp* wurde bis dato noch nicht untersucht, es liegen nur drei Fallberichte vor [84-86], wobei es bei zwei der beschriebenen Patienten aufgrund einer Infektion mit *T. mycotoxinivorans* zu einem letalen Ausgang kam. Bei 8 von 360 Patienten (3 männlich, 5 weiblich) der Kohorte wurden Trichosporen im Rachenabstrich/Sputum festgestellt, das mediane Alter bei Erstnachweis war 21,8 Jahre (8-41,1). Zwei der *Trichosporon spp* wurden mittels MALDI-TOF MS und DNA Sequenzierung bestimmt: *T. mycotoxinivorans* und *T. inkin*. *T. asahii* wurde mittels Mikroskopie, biochemischer Untersuchung und MALDI-TOF MS nachgewiesen. Bei allen Patienten wurden auch weitere CF typische Mikroorganismen im Rachenabstrich/Sputum nachgewiesen, u.a. bei 5 Patienten *P. aeruginosa*. Vor dem Erstnachweis hatten 5 Patienten hatten eine ABPA, 5

Patienten wurden mit inhalativen Steroiden behandelt, 4 erhielten systemische Steroide. 2 Patienten litten unter einem CF assoziierten Diabetes mellitus. Bei allen 8 Patienten wurde eine dF508 Mutation festgestellt, 3 Patienten hatten eine zusätzliche Stop Mutation (2 Patienten R553X und ein Patient S466X). 6 Patienten mit wiederholt positivem Befund in Rachenabstrich/Sputum wurden über einen mittleren Beobachtungszeitraum von 4,5 Jahren (0,6 – 7,1) Jahren hinsichtlich des Zusammenhangs von Infektion und Verlauf von Lungenfunktion (FEV1), Gewicht (BMI) und Entzündungsparameter (CRP und IgG) untersucht. Bei 2 Patienten blieben alle Parameter stabil. Bei 4 Patienten sank die FEV1 im Mittel um 2,9%_{soll}/Jahr (-1,1 bis -5,8%_{soll}). Es zeigte sich ferner ein CRP Anstieg bei zwei Patienten, ein IgG Anstieg bei drei Patienten und ein BMI Abfall bei 2 Patienten. 2 Patienten der Kohorte erhielten eine antimykotische Behandlung aufgrund einer deutlichen Verschlechterung des klinischen Zustandes nach dem ersten Nachweis. Eine Patientin (3) erlitt ab dem Alter von 16 Jahre bei zuvor stabilem Verlauf (FEV1 zwischen 85 und 106%_{soll}) durch eine Infektion mit *T. inkin* mehrere dramatische Exazerbationen, die sich nur mittels intensiver, wiederholter Therapie mit Amphotericin B i.v. und oraler Dauertherapie mit Voriconazol auf niedrigem Niveau (FEV1 between 50 und 75%_{soll}) stabilisierten. Die Relevanz von Pilzinfektionen für CF Patienten wird zunehmend bekannt [87]: so wurde eine Kolonisation mit *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus*, auch bei Patienten ohne ABPA, mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion und des klinischen Verlaufs assoziiert [88, 89]. Insbesondere für *A. fumigatus* konnte ein proinflammatorischer Effekt auf das CF Epithel gezeigt werden. Die Prävalenz und die Relevanz der *Trichosporon spp* bei CF Patienten wurde bislang noch nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde bei 2,2% der Patienten innerhalb eines 8 Jahres Zeitraums Trichosporen festgestellt. In einer anderen Studie bei nicht-CF Patienten wurde *Trichosporon spp* in 0,8% der Rachenabstriche festgestellt [90]. Risikofaktoren für die Kolonisation oder die Infektion mit *Trichosporon spp* sind nicht bekannt. Man weiß, dass die invasive Trichosporonose durch mukosale Schäden und allgemeine immunologische Dysfunktion im Rahmen einer HIV Infektion oder bei Tumorerkrankungen begünstigt wird [91]. Es ist möglich, dass auch die mukosale Schädigung bei CF die Infektion mit Trichosporon begünstigt. Unsere Daten deuten auf eine mögliche Prädisposition durch Alter, vorausgehende systemische oder inhalative Steroidbehandlung, ABPA und CF assoziiertem Diabetes hin, aufgrund der geringen Fallzahl müssen die Ergebnisse in größeren Studien verifiziert werden. Auch trugen 3 von 8 Patienten, neben dF508 eine weitere Stop Mutation, dies ist deutlich höher ist als die Prävalenz dieser Mutationen in der allgemeinen deutschen CF Population. Unsere Daten lassen ferner auf einen möglichen Zusammenhang zwischen längerem Trichosporonnachweis und eine Reduktion von FEV1, BMI und einer gesteigerten Inflammation schließen. Die Infektion mit *Trichosporon spp* kann wie bereits in drei Fallberichten dargestellt [84, 85, 91] zu einer akuten und nachhaltigen Verschlechterung des klinischen Zustandes führen: in dieser

Kohorte verschlechterte sich der klinische Verlauf einer Patientin aufgrund einer Infektion mit *T. inkin* deutlich; bereits drei weitere Fallberichte in der Literatur beschreiben schwere bis hin zu letalen Verläufen aufgrund einer Infektion mit *Trichosporon spp.* Wiederholter Trichosporon Nachweis in Rachenabstrich/Sputum sollte als Risikofaktor für plötzliche klinische Verschlechterung erkannt werden, prophylaktische antifungale Therapie sollte in Erwägung gezogen werden.

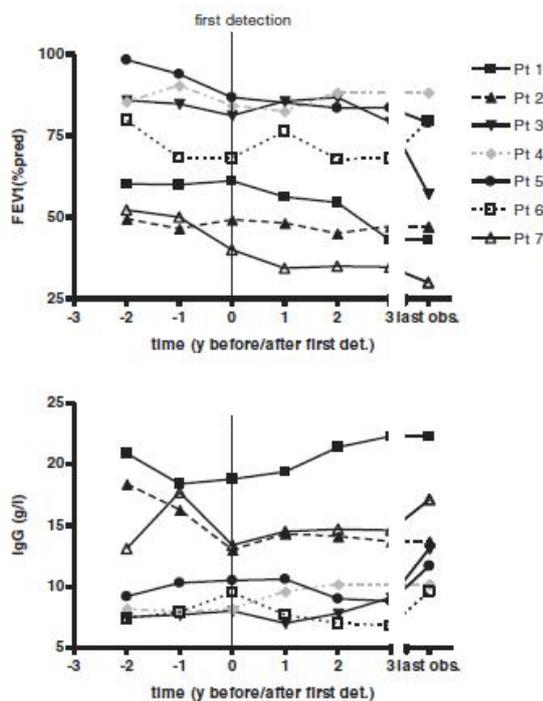


Abbildung 10

Verlauf von FEV1 (%soll) und IgG (g/l) von CF Patienten mit Trichosporon positiven Rachenabstrichen/Sputum Mittelwerte von FEV1 und IgG von 7 *Trichosporon* positiven Patienten zu 7 Zeitpunkten: zwei und ein Jahr vor Erstdiagnose, im Jahr des Erstdiagnoses, ein und zwei Jahre nach Erstdiagnose und am Ende des Beobachtungszeitraums. Die mittlere Anzahl an Datenpunkten betrug 4 (2-7). Jede Linie stellt einen Patienten dar. Die durchgezogenen Linien markieren die Patienten mit einem FEV1 Abfall, die gestrichelten Linien repräsentieren einen Patienten mit nur einem positiven Trichosporon Nachweis.

Quelle: [92]

3.3 Modelle für die funktionelle Analyse verschiedener seltener Erkrankungen

Zusammenfassung der folgenden maßgeblichen Publikationen:

Klymiuk N, Mundhenk L, Kraehe K, Wuensch A, Plog S, Emrich D, Langenmeyer MC, Stehr M, Holzinger A, **Kröner C**, Richter A, Kessler B, Kurome M, Eddicks M, Nagashima H, Heinritzi H, Gruber AD, Wolf E: Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of Cystic Fibrosis. *Journal of Molecular Medicine*. 2012 May; 90(5):597-608

Wittmann T, Schindlbeck U, Höppner S, Kinting S, Frixel S, **Kröner C**, Liebisch G, Hegermann J, Aslanidis C, Brasch F, Reu S, Lasch P, Zarbock R, Griese M. Tools to explore ABCA3 mutations causing interstitial lung disease. *Pediatr Pulmonol*. 2016 May 13

Ein umfassendes Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen von seltenen Lungenerkrankungen im Kindesalter, sowie der dringende Bedarf, Therapiemöglichkeiten zu erarbeiten und zu testen, erfordert zum Einen die Etablierung molekularer Methoden, die Erkrankungsmechanismen möglichst gut replizieren, und zum Anderen die Etablierung von Tiermodellen. In einer Arbeit unserer Gruppe wurden verschiedene *in vitro* und *ex vivo* Methoden etabliert und validiert, um ABCA3 Mutationen genauer zu charakterisieren und deren Effekt auf das Protein zu quantifizieren. In einer weiteren Arbeit wurde ein Großtiermodell für die CF etabliert.

Mutationen im ABCA3 Gen

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der Mutation K1388N im ABCA3 Gen, die bei einem Patienten mit letaler ABCA3 Defizienz festgestellt wurde, verschiedene molekulare Methoden entwickelt, um den Effekt dieser Mutation auf das Protein genauer zu charakterisieren (Abbildung 11).

Die homozygote ABCA3 Variation K1388N wurde bei einem Patienten mit dem typischen klinischen Verlauf einer kompletten ABCA3 Defizienz nachgewiesen: schweres neonatales respiratorisches Versagen mit einer darauffolgender kurzer Erholungsperiode. Es zeigte sich eine ausgeprägte interstitielle Lungenerkrankung mit dem histologischen Bild einer CPI und abnormen Lamellarkörperchen in der Elektronenmikroskopie. Der Patient verstarb nach fortschreitender respiratorischer Insuffizienz im Alter von 9 Wochen. SP-C in der BALF war deutlich reduziert und einige höhermolekulare Formen konnten in geringer Konzentration nachgewiesen werden. Nach den Algorithmen Polyphen [93] und SIFT [94] wird die Mutation K1388N als maligne und nicht toleriert eingestuft. Ein topologisches Modell des ABCA3 Proteins sagt die Lokalisation der K1388N Variante in der Nähe der nukleotid-bindenden Domäne 2 (NBD2) voraus, die 2 Walker Motive umfasst [95].

A549 Lungenepithelzellen, die ABCA3-WT und die ABCA3-K1388N Variante stabil exprimierten, zeigten eine etwa 200-fach erhöhte ABCA3 mRNA Expression im Vergleich zu

mock-transfizierten Zellen. Zellwachstum und –proliferation unterschied sich nicht. Ein Unterschied zwischen der K1388N Variante und der Wildtyp (WT) Variante wurde jedoch im Western Blot festgestellt: beide Proteine waren zwar in der 190 und der 150kDa Form nachweisbar, der Banden-Quotient der 190-150kDa Formen war jedoch bei den ABCA3-K1388N exprimierenden Zellen bis zu 20-fach erhöht im Vergleich zu den ABCA3-WT Zellen. Die intrazelluläre Prozessierung wurde ferner mittels Ko-lokalisierung Studien (CD63 Immunofluoreszenz, Calnexin, und N-Glykolysierung) weiter untersucht, die Hypothese dass beide Proteine im endoplasmatischen Retikulum korrekt gefaltet werden und im Golgi Apparat korrekt prozessiert werden, wurde bestätigt.

Elektronenmikroskopisch wurde gezeigt, dass ABCA3-K1388N Lamellarkörperchen signifikant kleiner sind, als die Lamellarkörperchen der ABCA3-WT Zellen. Auch die Morphologie der ABCA3-K1388N Zellen waren abnorm, die Form erinnerte an ein Spiegelei, wohin gegen die ABCA3-WT transfizierten Zellen normale, wohl formierte Lamellarkörperchen hatten, mit konzentrischen, parallel angeordneten Membranen. Bei den Mock-Kontrollzellen konnten gar keine Lamellarkörperchen nachgewiesen werden. Die immunhistochemische Färbung des Lungengewebes des Patienten mit ABCA3 Antikörpern ergab eine nur sehr schwache und verwaschene Färbung bei der K1388N Variante in Typ II Pneumozyten, im Vergleich zu gesundem Lungengewebe (Abbildung 11).

Die Messung von intrazellulären Lipidklassen in A549 Zellen, mit ABCA3-K1388N transfiziert waren, zeigten dass Phosphatidycholin als Hauptbestandteil des Surfactants deutlich reduziert war, im Vergleich zu den WT Kontrollen. Andere Lipidklassen waren nicht betroffen. Kurzkettige Lipide waren reduziert, langkettige waren erhöht. PC 32:0 als Hauptbestandteil des Surfactants war im Vergleich zu den Kontrollen um 2/3 reduziert. Diese Ergebnisse konnten auch in der BAL des Patienten mit homozygoter K1388N Mutation nachgewiesen werden.

Abbildung 11

Klinische Charakterisierung eines Kindes mit einer homozygoten K1388N Variation des ABCA3 Proteins. A. der Röntgen Thorax (a.p.) zeigt eine homogene fein-retikuläre milchglasartige Dichteanhebung. B. Klinischer Verlauf des Patienten (ECMO: extrakorporale Membranoxygenierung). C. Lungenbiopsie: chronische Pneumonitis des Kleinkindsalter mit zahlreichen Eosinophilen (Pfeile; Maßstab 100mm). D. normale Kontrollbiopsie. E und F: Elektronenmikroskopische Darstellung zahlreicher abnormer Lamellarkörperchen in den Typ II Pneumozyten, es sind keine lamellaren Strukturen nachweisbar und am Rand ist dichtes Material abgelagert (Vergrößerung 20.000). G. Westernblot des Trachealaspirats (SP-B und SP-C) des Patienten im Alter von 5 Wochen, 4,8 Wochen nach Administrierung einer Einzeldosis Surfactant. Nach SDS-PAGE und Transfer wurden die Membranen mit Antikörpern gegen SP-B und SP-C versehen. Das Molekulargewicht (kDA) ist auf der linken Seite dargestellt. Alle Banden wurden im nicht-reduzierenden Zustand analysiert. SP-B war in großen Mengen nachweisbar. Zusätzlich zu den typischen 18kDA Banden, wurden einige niedrigmolekulare Banden (Monomere oder Abbauprodukte) festgestellt, als auch einige höhermolekulare Formen. SP-C wurde in relativ geringen Mengen nachgewiesen, weniger als 10% von SP-C (normal: ca. 50%). Interessant war der Nachweis der Banden mit höherem Molekulargewicht, dieses Muster wird typischerweise bei Patienten mit Alveolarproteinose beobachtet. H. Schematische Darstellung des ABCA3 Proteins mit unterschiedlichen Sequenzmotiven. Die K1388N Mutation ist als rotes Hexagon dargestellt. I. Partielle Ausrichtung des Aminosäuren der ABCA3 Sequenz (Codons 1348-1429). Ausrichtung zeigt dass Lys1388 (roter Pfeil) sehr konserviert ist.

Quelle: [96]

Zusammenfassend konnte für die K1388N Variante des ABCA3 Gens gezeigt werden, dass diese nicht die Proteinexpression, wohl aber die Prozessierung und die Funktion des Proteins beeinträchtigt. Dies wurde sowohl durch einen reduzierten Gehalt von Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (PC32:0) nachgewiesen, als auch durch die malformierten Lamellarkörperchen in den K1388N transfizierten Zellen (Abbildung 11). Detaillierte Informationen hinsichtlich der molekularen Defekte und ihren Auswirkungen und die Korrelation von *in vitro* und *ex vivo* Daten wird ermöglichen, Gruppen von Mutationen zu definieren, die mittels „small molecule correctors“ therapiert werden können, um so ggfs. den defekten ABCA2 Transporter wiederherstellen zu können.

Großtiermodell für die CF

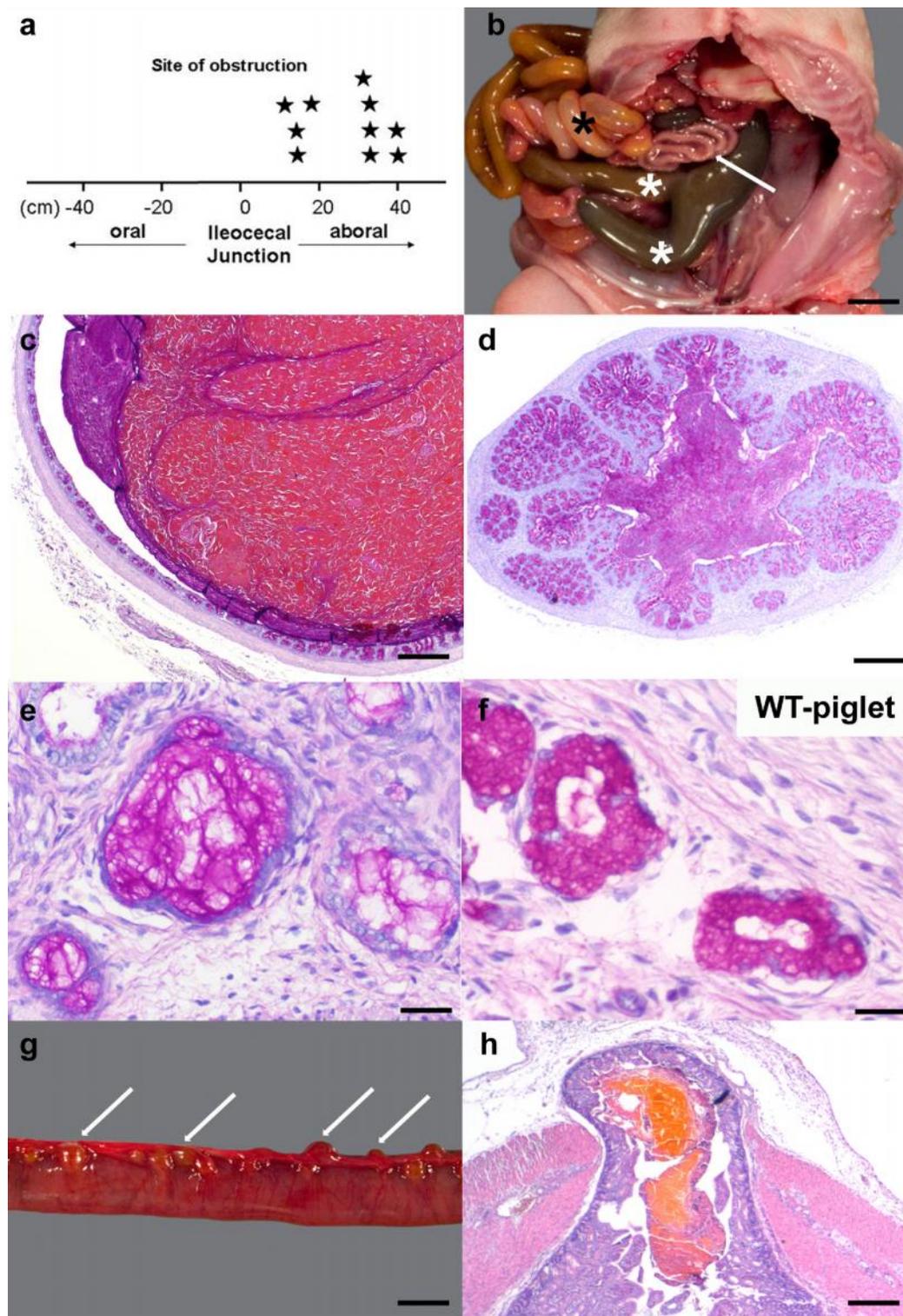
Als Tiermodell für die CF existieren seit Jahren verschiedene *CFTR* mutante Mausmodelle, die es ermöglichen, grundlegende pathophysiologische Mechanismen der CF zu untersuchen. Insbesondere die humane CF Pathologie des Intestinaltraktes wird in den Mausmodellen gut repliziert, weniger gut werden allerdings andere Organsysteme repliziert, u.a. Pankreas, Leber und der männliche Reproduktionstrakt. Das größte Problem der *CFTR* mutanten Mausmodelle ist das Fehlen der beim Menschen im Vordergrund stehenden Lungenpathologie [97] [98]. Um die Lungenpathologie der *CFTR* mutanten Mäuse der humanen Pathologie anzunähern, wurden transgene Mäuse mit einer lungenspezifischen Überexpression von epithelialen Na⁺ Kanälen generiert. Die vermehrte Natrium Resorption in diesem Modell führt zu einer Depletion der Oberflächenflüssigkeit in den Luftwegen, einer Reduktion des Schleimtransports und somit einer CF-artigen Lungenerkrankung mit Schleimobstruktion der Luftwege und chronischer Inflammation [99]. Neben der Etablierung des *CFTR* mutanten Frettschens [100], erschien die Etablierung eines CF Schweinemodells am vielversprechendsten, um der

humanen CF Pathologie am nächsten zu kommen [101]. Von Rogers et al wurde 2008 ein CF Schweinmodell vorgestellt [102], durch das wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Pathologie der beteiligten Organsysteme gewonnen werden konnten, insbesondere der Lunge [102, 103], des Gastrointestinaltrakts [104], des männlichen Reproduktionstrakts [105] und der Zähne [106]. Auch weitere pathophysiologische Phänomene konnten anhand des Schweinmodells gezeigt werden, so z.B. die Relevanz der gestörten Chlorid Leitfähigkeit, nicht jedoch der Erhöhung der Natrium Leitfähigkeit [107] und die Reduktion des Levels an Insulin-like-growth Faktors (IGF1) in CFTR mutanten Ferkeln und porcinen, sowie humanen Zellen [108]. Das CF Schweinmodell ist das wichtigste Tiermodell für die CF, nicht zuletzt auch aufgrund der anatomischen Ähnlichkeiten zur humanen Lungen, aufgrund der ähnlichen Größe und Physiologie und aufgrund der Möglichkeit einer standardisierten Stallhaltung, Züchtung und genetischen Modifikation [97]. Die strengen sanitären Restriktionen erschweren jedoch einen internationalen Austausch der Tiere. Zudem wurden auch bereits bei den Mausmodellen wichtige phänotypische Unterschiede in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund festgestellt [97]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher mittels einer zu Rogers et al [102] distinkten *CFTR* knock out Methode ein weiteres *CFTR* knock out Schweinmodell etabliert, das zudem einen distinkten genetischen Hintergrund aufweist.

Nach Nukleofektion des *CFTR* Targeting Vektors mit dem *neo^R/kan^R* Resistenzgen in primären Nierenzellen eines 3 Monate alten wild-typ Schweins und Selektion, wurden insgesamt 446 resistente Kolonien generiert, die für den homologe Ersatz der *CFTR* Zielsequenz mittels qPCR gescreent wurden. Sieben *CFTR^{+/-}* Zellklone wurden identifiziert. Sechs *CFTR^{+/-}* Zellklone wurden in der ersten Runde des somatischen Zellkerntransfers (SCNT) verwendet. Insgesamt wurden 264 geklonte Embryos in drei Empfänger transferiert, zwei Schwangerschaften entstanden. Eine Schwangerschaft endete nach 58 Tagen und die 7 Föten wurden mittels qPCR als *CFTR^{+/-}* bestätigt. Die andere Schwangerschaft wurde zum errechneten Termin beendet und 5 Ferkel, alle *CFTR^{+/-}*, kamen zur Welt. Vier dieser Ferkel wurden aufgezogen, sie waren zum Zeitpunkt der Veröffentlichung 18 Monate alt, fertil und zeigten keinerlei klinische Pathologie. Ein *CFTR^{+/-}* Ferkel wurde im Alter von 4 Monaten euthanasiert und eine primäre Zellkultur aus Nierenzellen wurde für das Targeting des zweiten *CFTR* Allels etabliert. Nach Nukleofektion der *CFTR^{+/-}* Zellen mit dem Targeting Vektor mit dem *bsr^R* Resistenzgen und Selektion mittels Blastidicin S wurden insgesamt 213 stabile Kolonien generiert, 173 wurden gescreent und 2 Klone wurden als *CFTR^{-/-}* identifiziert. Ein *CFTR^{-/-}* Klon wurde für den SCNT verwendet. Insgesamt wurden 348 klonierte Embryonen in vier synchronisierte Empfänger transferiert. Zwei Schwangerschaften entstanden und wurden zum errechneten Termin beendet, jeweils neun und zwei Ferkel wurden geboren, zwei davon als Totgeburten. Nach einigen Stunden fielen die Lebendgeborenen durch Unwohlsein auf,

drei Ferkel wurden 8 Stunden postpartal euthanasiert, die übrigen Ferkel überlebten maximal 37 Stunden und wurden ebenfalls euthanasiert, sobald sich ihr Gesundheitszustand verschlechtert hatte.

Im Kolon der *CFTR*^{-/-} Ferkeln konnte mittels RT-PCR keine *CFTR mRNA* nachgewiesen werden, mittels Immunhistochemie konnte ebenfalls kein CFTR Protein nachgewiesen werden. Alle *CFTR*^{-/-} Ferkel wiesen einen schweren Mekoniumileus auf, der aboral des Ileozökals lokalisiert war (Abbildung 12). Das Intestinum aboral des Mekoniumileus war stark dilatiert und mit Mekonium und Schleim gefüllt. Der Abschnitt distal des Mekoniumileus war z.T. mit Schleim gefüllt. Das Lumen der duodenalen Brunner'schen Drüsen war teilweise mit Schleimpropfen verstopft, das Epithel war atroph. Bei vier Ferkeln wurde eine mesenteriale Divertikulose nachgewiesen, mit einem Prolaps der Lamina propria des Jejunums durch die Lamina muskularis. Zudem wies ein Ferkel eine jejunale Atresie 142cm oral des Ileozökals auf. Histologisch zeigte sich bei den Ferkeln, die länger als 12 Stunden überlebten, eine schwere, multifokale, nekrotisierende und z.T. suppurative Enteritis mit bakterieller Besiedelung und eine multifokale, suppurative Peritonitis.

**Abbildung 12**

Intestinaler Phänotyp der *CFTR*^{-/-} Ferkel a. Exklusive Lokalisierung des Mekoniumileus aboral des Ileozökalpols (Sternchen, n=10) b. Ileum und Zökum (weiße Sterne) stark erweitert mit Mekonium und Gasansammlung im Jejunum (schwarze Sterne), Spiralkolon als Mikrokolon (weißer Pfeil), Balken=1cm c. Histologie des intestinalen Segments oral der Obstruktion, größtenteils gefüllt mit schleimigem Mekonium, PAS Färbung, Balken=350µm d. Kleinkalibriges Kolon, aboral der Obstruktion mit Schleim gefüllt, PAS Reaktion, Balken=350µm e. Lumen der duodenalen Brunner Drüsen, mit Schleim gefüllt. f. Brunner Drüsen der wt Kontrollen; PAS Reaktion, Balken=30 µm g. jejunale Divertikulose (weiße Pfeile), Balken=1cm. h. histologischer Schnitt der Divertikulose, HE Färbung, Balken=350µm
Quelle: [109]

Die Trachea aller *CFTR*^{-/-} Ferkel war im Gegensatz zu den Kontrollen oval geformt. Der Knorpel imponierte verdickt und die Ringe waren z.T. unterbrochen. Auffallend war eine variable Verdickung der Hinterwand der Trachea/Bronchien im Bereich der kaudalen Trachea und den großen Bronchien, die auf eine im Vergleich zu den Kontrollen fehlerhafte Orientierung der Muskelbündel der glatten Muskulatur zurückzuführen war. Im Gegensatz zu diesen Veränderungen des oberen Respirationstrakts, konnte im Lungengewebe der *CFTR*^{-/-} Ferkel keine Veränderungen nachgewiesen werden (Abbildung 13).

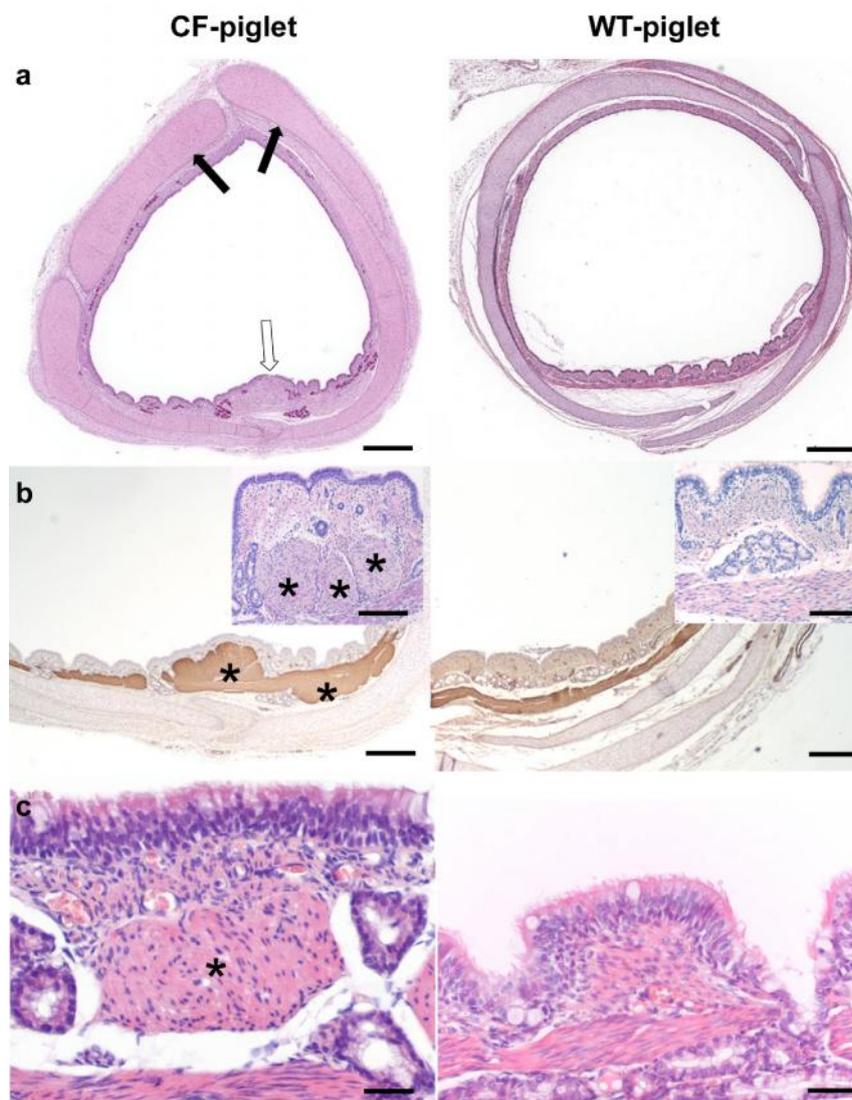


Abbildung 13

Respiratorischer Phänotyp der *CFTR*^{-/-} Ferkel a. Histologie der malformierten Trachea der CF Ferkel im Vergleich zu WT Ferkeln, Hämatoxylin Eosin (HE) Färbung; weißer Pfeil zeigt Muskelbündel der glatten Muskulatur; schwarze Pfeile zeigen den verdickten und diskontinuierlichen Knorpel (Balken=580µm). b. Immunhistochemischer Nachweis von Aktin der glatten Muskulatur zeigt fehlerhaft orientierte Muskelbündel an der Hinterwand der Trachea von CF Ferkeln, nicht jedoch von WT Ferkeln (Balken=380µm) In den Einsätze sind Muskelbündel der glatten Muskulatur in höherer Auflösung dargestellt (Sternchen), HE Färbung (Balken=150µm) c. Muskelbündel und Pakete der verdickten glatten Muskulatur (Sternchen) in den großen Bronchien, HE Färbung (Balken=30µm). *WT* wild-typ
Quelle: [109]

Pankreas

Charakteristisch für das Pankreas aller *CFTR*^{-/-} Ferkel war eine schmale Lappenstruktur, separiert durch undifferenziertes Bindegewebe. Die Anzahl der Azinuszellen und die Zymogen-Granula war deutlich reduziert im Vergleich zu den Kontrollen. Einige Pankreasgänge waren dilatiert und mit eosinophilem Material gefüllt; es bestand eine milde neutrophile Infiltration. Die Proliferation von Pankreasgangzellen war in einigen Lobuli zu beobachten, ebenso war z.T. eine Schleimzellmetaplasie zu beobachten, sowie Schleim, der die kleinen Pankreasgänge obstruierte. Pankreasgangzellen zeigten sich zudem z.T. nekrotisch mit dystropher Kalzifizierung. Eosinophiles, azelluläres Material, das an Zymogen erinnerte, war innerhalb der Pankreasgänge, aber auch extrazellulär im Interstitium zu beobachten. Bei allen Ferkeln wurde eine lymphozytäre Infiltration in das Pankreas Interstitium beobachtet und eine milde bis moderate Fibrose.

Alle *CFTR*^{-/-} Ferkeln wiesen zudem eine Mikro-Gallenblase mit einem Durchmesser von ca. 3mm auf. Das Lumen der Gallblase war mit PAS-positiven, Muzin-haltigem Material okkludiert. Das hyperplastische Epithel der Gallenblase war gefältelt. Innerhalb des Leberparenchyms zeigte sich eine multifokale Proliferation der biliären Epithelzellen, v.a. in den Periportalfeldern und z.T. gangförmig. Eine milde Brückenfibrose wurde in einigen Leberschnitten beobachtet, z.T. wurden Gallepröpfe in den intrahepatischen Gallenwegen nachgewiesen. Die hepatischen Veränderungen waren sehr variabel.

Die Epididymis und das Vas deferens der *CFTR*^{-/-} Ferkel wiesen die CF-typischen Veränderungen auf mit einer deutlichen Hypoplasie des Gangsystems im Caput der Epididymis. Der Schwanz der Epididymis wirkte atretisch, hatte kein tubuläres Profil, sondern undifferenziertes Bindegewebe. Der Samenstrang bestand entweder aus undifferenziertem Bindegewebe ohne duktuläre Strukturen oder das Vas deferens war dysplastisch ohne oder mit nur sehr schmalen Lumen.

In dieser Arbeit wurde ein alternatives Modell des Gen-Targetings in Primärzellen vorgestellt: die Verwendung von BAC Vektoren, die leicht in der Handhabung sind und durch Rekombination gut modifizierbar. Es wurde eine Targeting Effizienz von ca. 1% für modifizierten BAC Vektoren für das erste und für das zweite *CFTR* Allel beobachtet und durch SCNT konnte ausreichend geklonter Nachwuchs generiert werden. Diese Methode ermöglicht eine deutlich schnellere Generierung von homozygoten *CFTR*^{-/-} Ferkeln als mit der herkömmlichen Kreuzung von heterozygoten *CFTR* Mutanten. Trotz der Unterschiede in der Methode der Inaktivierung des *CFTR* Gens im Vergleich zu dem amerikanischen Schweinmodell [103], wurde ein ähnlicher Phänotyp generiert.

Der größte Nachteil des CF Schweinemodells ist die hohe Inzidenz des Mekoniumileus, die die experimentelle Nutzung stark einschränkt, da die meisten Tiere bereits innerhalb von 48 Stunden nach der Geburt versterben. Es besteht die Möglichkeit, postpartal eine Ileostomie durchzuführen, diese Maßnahme ist jedoch insbesondere auch in der Nachsorge sehr aufwändig und mit einer hohen Komplikationsrate assoziiert [110]. Eine alternative Option wäre es, den Mekoniumileus durch eine für den Gastrointestinaltrakt spezifische Expression eines Transgens, das CFTR mit einem trunkierten N-Terminus codiert, zu exprimieren. Dies wurde bereits in einem *CFTR*^{-/-} Mausmodell erfolgreich gezeigt und führte dort zu einer Korrektur des intestinalen Phänotyps [111]. Ein sog. „gut-corrected“ Schweinemodell wäre ein geeigneter Ansatz, um Tiere für längere Beobachtungszeiträume zu generieren.

3.4 Effektivität der eingesetzten therapeutischen und diagnostischen Maßnahmen

Zusammenfassung der folgenden maßgeblichen Publikationen:

Griese M, Irnstetter A, Hengst M, Burmester H, Nagel F, Ripper J, Feilcke M, Pawlita I, Gothe F, Kappler M, Schams A, Wesselak T, Rauch D, Wittmann T, Lohse P, Brasch F, **Kröner C**. Categorizing diffuse parenchymal lung disease in children. *Orphanet J Rare Dis*. 2015 Sep 25;10(1):122

Kröner C, Griese M, Kappler M, Schoen C, Hoffmann F, Nicolai T, Reiter K. Endobronchial lesions caused by nontuberculous mycobacteria in apparently healthy pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J*. 2015 May;34(5):532-5

Kappler M, Nagel F, Feilcke M, **Kröner C**, Pawlita I, Naehrig S, Ripper J, Hengst M, von Both U, Forstner M, Hector A, Griese M. Eradication of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* detected for the first time in cystic fibrosis: A single center observational study. *Pediatr Pulmonol*. 2016 Jul 5

chILD als große Gruppe jeweils seltener parenchymatöser Lungenerkrankungen im Kindersalter umfassen mehr als 200 verschiedener Entitäten [4, 6]. Aufgrund der Ähnlichkeit der Symptome ist es häufig schwierig, diese seltenen Patienten von Kindern mit häufigeren respiratorischen Erkrankungen zu differenzieren [3]. Zudem verzerren wiederholte Infekte oder Allergien das klinische Bild. So werden chILD häufig übersehen oder es werden falsche Diagnosen gestellt. Eine korrekte Klassifizierung von chILD ist unabdingbare Voraussetzung für die richtige Diagnosestellung und therapeutische Intervention, für das Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie, für die Identifikation von Biomarkern und für die Durchführung von Langzeit Studien. Verschiedene Kategorisierungssysteme von chILD wurden in der Vergangenheit vorgeschlagen. Die Mehrheit der zuletzt vorgeschlagenen Systeme orientiert sich an der histologischen Einteilung der Entitäten und basiert auf einer Studie von Deutsch et al [6], die das breite Spektrum der Patienten mit chILD in 12 Hauptkategorien unterteilt, die jeweils verschiedene Unterdiagnosen beinhalten. In der vorliegenden Arbeit wurde ein nach Deutsch et al adaptiertes Kategorisierungssystem systematisch auf die Praktikabilität und die Validität hin überprüft. In die Studie eingeschlossen wurden alle Patienten, die zwischen 1997 und 2012 im KLR registriert wurden. Alle Patienten wurden primär anhand des nach Deutsch et al [6] adaptierten Kategorisierungssystems

klassifiziert. Die folgenden zusätzlichen Kategorien wurden eingeführt: Ax „unklares Atemnotsyndrom“ des reifen Neugeborenen und Ay des fast reifen Neugeborenen, sowie By „unklares Atemnotsyndrom“ außerhalb des Neugeborenenalters. Ferner wurde die Kategorie „disorders masquerading as ILD“ in zwei spezifischere Unterkategorien unterteilt: B4 DPLD – „related to lung vessel structural processes“ und B5 DPLD – „related to reactive lymphoid lesions“. Praktische Kategorisierungsrichtlinien wurden durch das KLR zu Beginn festgelegt. Insgesamt wurden 2322 Kinder mit seltenen Lungenerkrankungen im KLR zwischen 1997 und 2012 registriert. Der Verdacht auf chILD bestand bei einem Kind mit 1) respiratorischen Symptomen und Zeichen wie Husten, Tachy-/Dyspnoe, „crackles“, Einziehungen, Trommelschlegelfinger, Gedeihstörung oder respiratorischem Versagen und 2) Hypoxie und 3) diffusen radiologischen Auffälligkeiten und 4) (falls vorhanden) auffälliger Lungenfunktion. Die Symptome bestanden seit mindestens 4 Wochen. Bei Aufnahme in das KLR wurde die Diagnose durch den behandelnden Arzt, häufig in Kooperation mit dem Radiologen oder dem Pathologen, gestellt. Eine weitere Diagnose wurde unabhängig von der Erstdiagnose von drei Experten des KLR gestellt. Für die Kategorisierung wurde ein 4-stufiger Algorithmus angewendet (vgl. Table 1 [112]). Insgesamt wurde bei 791 Kindern (55% männlich, Manifestationsalter 4,2 +/- 5,5 Jahre) eine chILD Diagnose gestellt und sie wurden entsprechend in die 12 Kategorien mit den dazugehörigen Unterkategorien eingeteilt. 549 Patienten hatten eine Lungenerkrankung, die sich im Kleinkindsalter manifestiert, die größte Gruppe bestand aus 294 Patienten in der Kategorie A4 – DPLD – related to the alveolar surfactant region (vgl. Figure 1[112]).

Im Jahr 2012 wurde die Validität und die Interobserver-Abhängigkeit anhand einer willkürlichen Stichprobe von 100 der 791 Patienten getestet. Alle 100 Fälle, die proportional zu ihrer Häufigkeit in den jeweiligen Kategorien, willkürlich selektiert wurden, wurden pseudonymisiert und blind und unabhängig von zwei pädiatrischen Pneumologen rekategorisiert. Die Rekategorisierung stimmte in 80% der Fälle mit der primären Kategorisierung überein. Mangelnde Übereinstimmung gab es aus folgenden Gründen: 1) es wurden nicht alle vorhandenen Details berücksichtigt und daher erfolgte eine fehlerhafte Zuordnung oder 2) die Kategorisierungsrichtlinien wurden aufgrund mangelnder Kenntnis der Richtlinien nicht richtig angewendet oder 3) es wurde angenommen, dass die Datenlage für eine Kategorisierung insuffizient sei oder 4) es gab Unzulänglichkeiten des Kategorisierungssystems selbst. Ein wesentliches Defizit wurde für die Kategorisierung der chronischen Tachypnoe des Kleinkinds festgestellt und für Erkrankungen, die sowohl das Parenchym als auch oder auch primär die peripheren Luftwege betreffen. So wurde z.B. die Bronchiolitis obliterans oder auch das MacLeod-Swyer-Syndrom bei immunkompromittierten und bei immunkompetenten Patienten häufig als Erkrankung der Luftwege definiert und nicht als DPLD. Weitere Beispiele

fehlerhafter Kategorisierung wurden analysiert und praktische Regeln zur Vermeidung dieser abgeleitet (vgl. Table S3 [112]). Ein konsistentes Kategorisierungssystem ist die Basis für zukünftige Anpassungen, für den Einschluss neuer molekularer Entitäten oder neuer diagnostischer Methoden. Eine spezifische Arbeitsdiagnose kann sich ändern oder das Wissen über einen Fall kann sich entwickeln, die Kategorisierungsregeln sollten möglichst konstant bleiben. In dieser Studie wurden wichtige Hindernisse für eine konsistente Kategorisierung identifiziert. Es wurde gezeigt, dass konsistentes Kategorisieren immer wieder geübt werden muss und der Kategorisierungsprozess regelmäßig evaluiert werden muss. Die Anwendung eines klinisch orientierten Kategorisierungssystems, wie das hier präsentierte, hat den großen Vorteil, dass verschiedene Datenbanken und Studien mit den gleichen Definitionen arbeiten. Die Regeln können verglichen werden, die Daten für die Analyse zusammengeführt. Die Validierung und die konsistente Kategorisierung ist die wesentliche Voraussetzung für die Etablierung dringend benötigter, größerer Patientenkohorten von Kindern mit seltenen Lungenerkrankungen.

Neben der Untersuchung der Praktikabilität und der Effektivität der Kategorisierung für chILD als Voraussetzung für eine korrekte Diagnosestellung wurde in den folgenden Arbeiten auch die Effektivität eingesetzter therapeutischer Maßnahmen zweier seltener Lungenerkrankungen untersucht.

In einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe wurde eine seltene, infektiös bedingte Erkrankung der Lunge untersucht: ein kleines Patientenkollektiv mit ausgeprägten endobronchialen Läsionen aufgrund einer Infektion mit nicht-tuberkulösen Mykobakterien (NTM) wurde hinsichtlich des klinischen Verlaufs, der diagnostischen Aufarbeitung und des Therapieerfolgs ausgewertet. NTM sind säurefeste, ubiquitär vorkommende Bakterien. Es gibt mehr als 150 Spezies, von denen ca. 50 humanpathogen sind [113]. Die häufigste Manifestation einer Infektion mit NTM ist die zervikale Lymphadenitis [114]. Seltener werden lokalisierte Organinfektionen beschrieben, z.B. Osteomyelitis, Mastoiditis oder Meningitis, sowie isolierte Haut- oder Bindegewebsinfektionen [115]. Eine disseminierte NTM Infektion wird häufig bei Kindern mit Immundefekt festgestellt. Pulmonale NTM Infektion tritt am häufigsten bei Kindern mit CF auf [113]. In der Literatur gibt es nur wenige Studien zu pulmonaler NTM Infektion gesunder Kinder [116], sowie einige Fallberichte zu endobronchialen Läsionen oder mediastinaler oder hilärer Adenopathie durch NTM bei gesunden Kindern [116, 117], im Gegensatz zur parenchymalen NTM Infektion, die vornehmlich im Erwachsenenalter auftritt [118]. Weder das diagnostische noch das therapeutische Vorgehen bei pulmonaler NTM Infektion im Kindesalter ist standardisiert, auch sind genetische und immunologische Risikofaktoren noch unzureichend untersucht [118]. Die

5 Patienten dieser Kohorte mit unauffälliger Anamnese waren im Median bei Erstmanifestation 1,94 (1,8 – 4,6) Jahre alt. Sie zeigten über mehrere Wochen Husten, Stridor und Giemen, bei zwei Patienten bestanden zusätzlich systemische Symptome u.a. Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust. Im Röntgen Thorax zeigte sich jeweils eine Verschattung eines Lappens oder eine Raumforderung, in einem Fall mit Bronchuskompression und Mediastinalverschiebung und einseitiger Hyperinflation. In der jeweils durchgeführten CT Untersuchung konnten einzelne Raumforderungen von ca. 1- 3,5 cm Durchmesser festgestellt werden, die mediastinal oder endobronchial lokalisiert waren. In einem Fall wurde aufgrund einer bilateralen hilären Lymphadenopathie der Verdacht auf ein Lymphom gestellt. Durch die CT Untersuchung konnte jedoch keine diagnostische Zuordnung erfolgen. Dies gelang erst durch die Bronchoskopie, die ein relativ charakteristisches Bild zeigte: bei vier Patienten zeigten sich breitbasige, glatte, gut umschriebene, rundliche Raumforderungen, die gelblich oder weißlich imponierten und von einer intakten Mukosa umgeben waren, ohne verstärkte Gefäßinjektion. Alle Läsionen traten in den großen Bronchien auf, nur in einem Fall war zusätzlich ein Segmentbronchus betroffen. In vier Fällen wurde ein Hauptbronchus durch die Läsion obstruiert und in allen Fällen war eine begleitende Lymphadenopathie festzustellen. Erstmals beschrieben wurden multiple kleine, kopfsteinpflasterartige Granulome des Tracheobronchialsystems bei zwei Patienten, bei einem dieser Patient waren nur die Granulome nachweisbar, keine zusätzlich obstruierende Raumforderung. Diffuse tracheobronchiale Granulome wurden bislang nur als endobronchialer Sarkoidose im Erwachsenenalter beschrieben [119], jedoch noch im Zusammenhang mit einer NTM Infektion. Es ist unklar, ob in diesen tracheobronchialen Granulomen tatsächlich NTM nachweisbar waren oder ob sie reaktive Läsionen darstellten. Eine Sarkoidose konnte bei den vorliegenden Patienten ausgeschlossen werden. Aufgrund der mangelnden Spezifität der CT Untersuchungen kann überlegt werden, ob bei Patienten, bei denen klinisch der Verdacht auf eine Fremdkörperaspiration besteht, vor Durchführung einer CT Untersuchung eine Bronchoskopie durchgeführt werden sollte und im Falle einer typischen makroskopischen Darstellung der Läsionen, auch ohne vorheriges CT eine Biopsie oder eine bronchoskopische Reduktion der Masse („debulking“) durchgeführt werden kann. Der mikrobiologische Nachweis der NTM (*M. avium*) gelang bei 3 Patienten nur durch mikrobiologische Kultur der ersten Biopsie. NTM waren weder mikroskopisch noch durch „acid-fast-staining“ noch in der BAL nachweisbar. *M. avium* war auch in anderen Studien häufig für pulmonale Infektion und intrathorakale Läsionen bei pädiatrischen Patienten verursachend [72]. Bei einem unserer Patienten wurden ausschließlich in der molekularpathologischen Untersuchung für *M. chelonae* typische PCR Produkte nachgewiesen, bei einem weiteren Patienten wurden nur unspezifische mykobakterielle PCR Produkte nachgewiesen. Die ATS Diagnosekriterien der pulmonalen NTM Infektion wurden daher nicht erfüllt, klinischer Verlauf und pathologische

Ergebnisse in der Zusammenschau ließen jedoch eine pulmonale NTM Infektion als sehr wahrscheinlich erscheinen. Immunologische Aufarbeitung der Patienten, inklusive der Untersuchung der mit NTM assoziierten IL-12-IFN γ Achse lieferten keine positiven Ergebnisse. Therapeutisch konnte gezeigt werden, dass die nach den 2007 ATS Richtlinien für Erwachsene [72] durchgeführte orale antimykobakterielle Therapie bei vier Patienten gute Erfolge zeigten. Drei Patienten wurden mit einem intermittierendem Dosierungsschema 3x/Woche behandelt, das ebenso effektiv zu sein scheint [120]. In dieser Kohorte traten keine signifikanten Nebenwirkungen auf. Makroskopisches Wiederauftreten der Läsion kam bei zwei unserer Patienten vor, deren Läsionen wiederholt bronchoskopisch abgetragen werden mussten. Bei einem Patienten wurden daraufhin Steroid Inhalationen mit Erfolg angewendet, die ein erneutes Wiederauftreten der Läsionen verhinderten. Auch die diffusen tracheobronchialen Granulome persistierten bei einem Patienten bis zu 2 Jahre nach Beginn der Therapie. Ein Patient wurde nicht antimykobakteriell behandelt, sondern die Läsion wurde nur endoskopisch abgetragen, die Läsion ging makroskopisch im Verlauf deutlich zurück, nach 3 Monaten war nur noch ein minimales Schleimhautinfiltrat nachweisbar. Auch bei der zervikalen Lymphadenopathie ist die chirurgische Intervention ohne antimykobakterielle Therapie kurativ, es wurden sogar in einigen Fällen eine spontane Resolution der Läsionen beschrieben [121]. Ein abwartender, beobachtender Ansatz nach bronchoskopischer Abtragung kann ggfs. in Erwägung gezogen werden, v.a. bei Patienten ohne signifikante Symptome.

Ein wichtiges klinisches Problem für CF Patienten ist die Besiedelung des Respirationstrakts mit dem methicillin resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA). Die Prävalenz von MRSA im Respirationstrakt liegt in den USA bei CF Patienten bei 23.7% [122]. Die klinische Auswirkung einer Besiedelung mit MRSA für CF Patienten wird kontrovers diskutiert. Zuletzt wurde in einer Studie bei mehr als 20.000 CF Patienten gezeigt, dass die Besiedelung mit MRSA über ein Jahr signifikant mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion assoziiert war [123], wohingegen in einer europäischen Studie kein Zusammenhang zwischen einer MRSA Besiedelung und einer Verschlechterung der FEV1 festgestellt wurde [124]. Eine weitere Studie ermittelte ein um den Faktor 1,27 erhöhtes Mortalitätsrisiko durch eine Besiedelung mit MRSA verglichen mit Patienten ohne MRSA [125], wobei sich das Risiko nach einer erfolgreichen Eradikationstherapie nicht mehr unterschied. In der vorliegenden Studie unserer Arbeitsgruppe wurde die Effektivität der frühen Eradikationstherapie von MRSA untersucht. Hierzu wurden die klinischen Daten aller 505 CF Patienten, die in der Christiane Herzog Ambulanz zwischen 2002 und 2012 behandelt wurden, hinsichtlich einer Besiedelung mit MRSA und hinsichtlich des Erfolgs der applizierten Therapie ausgewertet. Bei 57 von 505 Patienten (37 weiblich) wurde MRSA nachgewiesen, das mittlere Alter bei Erstnachweis lag

bei 15,3 Jahren (0,6 – 36,9 Jahre, Inzidenz 0,9%/Jahr). 9 von 57 Patienten gingen im Beobachtungszeitraum verloren, 7 chronisch kolonisierte Patienten wurden von der Studie ausgeschlossen. Die Untersuchung des Nasenabstrichs enger Familienangehöriger ergab bei 14 Familien einen positiven Nachweis. Allen Patienten wurde eine intensive Eradikationstherapie vorgeschlagen, 37/41 Patienten willigten ein, die Therapie durchzuführen. Das Therapieschema bestand aus zwei Schritten: a) zweifach i.v. antibiotische Therapie mit Glykopeptiden, z.B. Vancomycin oder Teicoplanin über 3 Wochen zusätzlich zu Hygienemaßnahmen und topischer Therapie für 5 Tage, gefolgt von b) einer 6-wöchigen oralen antibiotischen 2-fach Therapie und Inhalation mit Vancomycin. Insgesamt wurden 22 Patienten nach diesem Schema therapiert. Jeder erneute Nachweis von MRSA wurde 6 Wochen lang mit inhalativem Vancomycin und 5-tägiger topischer Therapie behandelt, dies war bei 15 Patienten erforderlich. Der Langzeit-Eradikationserfolg wurde anhand des mikrobiologischen Status im dritten Jahr nach Erstnachweis bestimmt. 31/37 (84%) Patienten wurden erfolgreich eradiziert. Der klinische Verlauf dieser Patienten war stabil, die mittlere FEV1 ein Jahr vor Erstnachweis betrug 80,4%, 3 Jahre nach Erstnachweis 81%. Patienten, die nicht erfolgreich eradiziert wurden, waren signifikant jünger ($P=0,025$) und hatten signifikant häufiger enge Kontaktpersonen, bei denen ebenfalls MRSA festgestellt wurde ($P=0,013$). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine frühzeitige und intensive Eradikationstherapie von MRSA bei CF Patienten effektiv ist. Die Lungenfunktion erscheint bei Patienten mit erfolgreicher Eradikation nicht beeinträchtigt, im Gegensatz zu den Patienten ohne erfolgreiche Eradikation.

4 Abkürzungsverzeichnis

ABCA3	ATP-binding cassette subfamily A member
ARDS	acute respiratory distress syndrome
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
CF	Cystische Fibrose
CFTR	chlorid-conducting transmembrane channel
chILD	childhood interstitial lung disease
CML	chronische myeloische Leukämie
CPI	chronic pneumonitis of infancy
CSF2R	colony stimulating factor receptor 2
DIP	desquamative interstitielle Pneumonie
DLD	diffuse lung disease
FEV1	forced expiratory volume in one second
FOXF1	
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
ILD	interstitielle Lungenerkrankung, interstitial lung disease
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MRSA	methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NKX2.1	thyroid transcription factor gene
NSIP	nicht spezifische interstitielle Pneumonie
NTM	nicht-tuberkulöse Mykobakterien
PAP	pulmonale Alveolarproteinose
PEG	perkutane endoskopische Gastrostomie
SCNT	somatic cell nuclear transfer, somatischer Zellkerntransfer
SFTPb	surfactan protein B gene
SFTPC	surfactant protein C gene
SP-B	Surfactant Protein B
SP-C	Surfactant Protein C
TTF-1	thyroid transcription factor 1
WLL	whole lung lavage

5 Literaturverzeichnis

1. <http://www.bmg.bund.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/seltenerkrankungen.html>
2. <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>
3. Kurland G, Deterding RR, Hagood JS, Young LR, Brody AS, Castile RG, Dell S, Fan LL, Hamvas A, Hilman BC, et al: **An official American Thoracic Society clinical practice guideline: classification, evaluation, and management of childhood interstitial lung disease in infancy.** *Am J Respir Crit Care Med* 2013, **188**:376-394.
4. Griese M, Haug M, Brasch F, Freiherst A, Lohse P, von Kries R, Zimmermann T, Hartl D: **Incidence and classification of pediatric diffuse parenchymal lung diseases in Germany.** *Orphanet J Rare Dis* 2009, **4**:26.
5. Dinwiddie R, Sharief N, Crawford O: **Idiopathic interstitial pneumonitis in children: a national survey in the United Kingdom and Ireland.** *Pediatr Pulmonol* 2002, **34**:23-29.
6. Deutsch GH, Young LR, Deterding RR, Fan LL, Dell SD, Bean JA, Brody AS, Nogee LM, Trapnell BC, Langston C, et al: **Diffuse lung disease in young children: application of a novel classification scheme.** *Am J Respir Crit Care Med* 2007, **176**:1120-1128.
7. Griese M, Irnstetter A, Hengst M, Burmester H, Nagel F, Ripper J, Feilcke M, Pawlita I, Gothe F, Kappler M, et al: **Categorizing diffuse parenchymal lung disease in children.** *Orphanet J Rare Dis* 2015, **10**:122.
8. Bush A, Anthony G, Barbato A, Cunningham S, Clement A, Epaud R, Gilbert C, Goldbeck L, Kronfeld K, Nicholson AG, et al: **Research in progress: put the orphanage out of business.** *Thorax* 2013, **68**:971-973.
9. Devine MS, Garcia CK: **Genetic interstitial lung disease.** *Clin Chest Med* 2012, **33**:95-110.
10. Nogee LM, Dunbar AE, 3rd, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA: **A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease.** *N Engl J Med* 2001, **344**:573-579.
11. Willander H, Askarieh G, Landreh M, Westermarck P, Nordling K, Keranen H, Hermansson E, Hamvas A, Nogee LM, Bergman T, et al: **High-resolution structure of a BRICHOS domain and its implications for anti-amyloid chaperone activity on lung surfactant protein C.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:2325-2329.
12. Knight SD, Presto J, Linse S, Johansson J: **The BRICHOS domain, amyloid fibril formation, and their relationship.** *Biochemistry* 2013, **52**:7523-7531.
13. Turcu S, Ashton E, Jenkins L, Gupta A, Mok Q: **Genetic testing in children with surfactant dysfunction.** *Arch Dis Child* 2013, **98**:490-495.

14. Amin RS, Wert SE, Baughman RP, Tomashefski JF, Jr., Nogee LM, Brody AS, Hull WM, Whitsett JA: **Surfactant protein deficiency in familial interstitial lung disease.** *J Pediatr* 2001, **139**:85-92.
15. Lawson WE, Grant SW, Ambrosini V, Womble KE, Dawson EP, Lane KB, Markin C, Renzoni E, Lympny P, Thomas AQ, et al: **Genetic mutations in surfactant protein C are a rare cause of sporadic cases of IPF.** *Thorax* 2004, **59**:977-980.
16. Avital A, Hevroni A, Godfrey S, Cohen S, Maayan C, Nusair S, Nogee LM, Springer C: **Natural history of five children with surfactant protein C mutations and interstitial lung disease.** *Pediatr Pulmonol* 2014, **49**:1097-1105.
17. Elborn JS: **Cystic fibrosis.** *Lancet* 2016, **388**:2519-2531.
18. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Jr., Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, et al: **Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice.** *J Cyst Fibros* 2008, **7**:179-196.
19. Andersen DH: **Cystic fibrosis of the pancreas.** *J Chronic Dis* 1958, **7**:58-90.
20. Davis PB: **Cystic fibrosis since 1938.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **173**:475-482.
21. Bell SC, De Boeck K, Amaral MD: **New pharmacological approaches for cystic fibrosis: promises, progress, pitfalls.** *Pharmacol Ther* 2015, **145**:19-34.
22. Kroner C, Wittmann T, Reu S, Teusch V, Klemme M, Rauch D, Hengst M, Kappler M, Cobanoglu N, Sismanlar T, et al: **Lung disease caused by ABCA3 mutations.** *Thorax* 2016.
23. Wambach JA, Casey AM, Fishman MP, Wegner DJ, Wert SE, Cole FS, Hamvas A, Nogee LM: **Genotype-phenotype correlations for infants and children with ABCA3 deficiency.** *Am J Respir Crit Care Med* 2014, **189**:1538-1543.
24. Kroner C, Reu S, Teusch V, Schams A, Grimmelt AC, Barker M, Brand J, Gappa M, Kitz R, Kramer BW, et al: **Genotype alone does not predict the clinical course of SFTPC deficiency in paediatric patients.** *Eur Respir J* 2015, **46**:197-206.
25. Jankowich MD, Rounds SI: **Combined pulmonary fibrosis and emphysema syndrome: a review.** *Chest* 2012, **141**:222-231.
26. Seymour JF, Presneill JJ: **Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **166**:215-235.
27. Campo I, Kadija Z, Mariani F, Paracchini E, Rodi G, Mojoli F, Braschi A, Luisetti M: **Pulmonary alveolar proteinosis: diagnostic and therapeutic challenges.** *Multidiscip Respir Med* 2012, **7**:4.
28. Ishii H, Seymour JF, Tazawa R, Inoue Y, Uchida N, Nishida A, Kogure Y, Saraya T, Tomii K, Takada T, et al: **Secondary pulmonary alveolar proteinosis complicating**

- myelodysplastic syndrome results in worsening of prognosis: a retrospective cohort study in Japan.** *BMC Pulm Med* 2014, **14**:37.
29. Bresnick EH, Katsumura KR, Lee HY, Johnson KD, Perkins AS: **Master regulatory GATA transcription factors: mechanistic principles and emerging links to hematologic malignancies.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**:5819-5831.
 30. Tang X, Lasbury ME, Davidson DD, Bartlett MS, Smith JW, Lee CH: **Down-regulation of GATA-2 transcription during *Pneumocystis carinii* infection.** *Infect Immun* 2000, **68**:4720-4724.
 31. Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, Shaw PA, Zerbe CS, Calvo KR, Arthur DC, Gu W, Gould CM, Brewer CC, et al: **GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity.** *Blood* 2014, **123**:809-821.
 32. Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, Calvo KR, Lemieux JE, Patel SY, Frucht DM, Vinh DC, Auth RD, Freeman AF, et al: **Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome.** *Blood* 2011, **118**:2653-2655.
 33. Camargo JF, Lobo SA, Hsu AP, Zerbe CS, Wormser GP, Holland SM: **MonoMAC syndrome in a patient with a GATA2 mutation: case report and review of the literature.** *Clin Infect Dis* 2013, **57**:697-699.
 34. Griese M, Zarbock R, Costabel U, Hildebrandt J, Theegarten D, Albert M, Thiel A, Schams A, Lange J, Krenke K, et al: **GATA2 deficiency in children and adults with severe pulmonary alveolar proteinosis and hematologic disorders.** *BMC Pulm Med* 2015, **15**:87.
 35. Kazenwadel J, Secker GA, Liu YJ, Rosenfeld JA, Wildin RS, Cuellar-Rodriguez J, Hsu AP, Dyack S, Fernandez CV, Chong CE, et al: **Loss-of-function germline GATA2 mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for GATA2 in the lymphatic vasculature.** *Blood* 2012, **119**:1283-1291.
 36. Hsu AP, Johnson KD, Falcone EL, Sanalkumar R, Sanchez L, Hickstein DD, Cuellar-Rodriguez J, Lemieux JE, Zerbe CS, Bresnick EH, Holland SM: **GATA2 haploinsufficiency caused by mutations in a conserved intronic element leads to MonoMAC syndrome.** *Blood* 2013, **121**:3830-3837, S3831-3837.
 37. Pier GB: **Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:8822-8828.
 38. Jensen T, Pedersen SS, Garne S, Heilmann C, Hoiby N, Koch C: **Colistin inhalation therapy in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection.** *J Antimicrob Chemother* 1987, **19**:831-838.

39. Doring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS, Consensus Study G: **Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies.** *J Cyst Fibros* 2012, **11**:461-479.
40. Doring G, Hoiby N, Consensus Study G: **Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus.** *J Cyst Fibros* 2004, **3**:67-91.
41. Douglas TA, Brennan S, Berry L, Winfield K, Wainwright CE, Grimwood K, Stick SM, Sly PD, members of AC, Trial A: **Value of serology in predicting Pseudomonas aeruginosa infection in young children with cystic fibrosis.** *Thorax* 2010, **65**:985-990.
42. Farrell PM, Govan JR: **Pseudomonas serology: confusion, controversy, and challenges.** *Thorax* 2006, **61**:645-647.
43. Kappler M, Kraxner A, Reinhardt D, Ganster B, Griese M, Lang T: **Diagnostic and prognostic value of serum antibodies against Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis.** *Thorax* 2006, **61**:684-688.
44. Anstead M, Heltshe SL, Khan U, Barbieri JT, Langkamp M, Doring G, Dharia S, Gibson RL, Treggiari MM, Lymp J, et al: **Pseudomonas aeruginosa serology and risk for re-isolation in the EPIC trial.** *J Cyst Fibros* 2013, **12**:147-153.
45. Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM: **Evaluation of a new definition for chronic Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis patients.** *J Cyst Fibros* 2003, **2**:29-34.
46. Ratjen FA: **Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies.** *Respir Care* 2009, **54**:595-605.
47. Davis PB, Drumm M, Konstan MW: **Cystic fibrosis.** *Am J Respir Crit Care Med* 1996, **154**:1229-1256.
48. Gerard C, Rollins BJ: **Chemokines and disease.** *Nat Immunol* 2001, **2**:108-115.
49. Sabroe I, Lloyd CM, Whyte MK, Dower SK, Williams TJ, Pease JE: **Chemokines, innate and adaptive immunity, and respiratory disease.** *Eur Respir J* 2002, **19**:350-355.
50. Tsicopoulos A, Chang Y, Ait Yahia S, de Nadai P, Chenivesse C: **Role of CCL18 in asthma and lung immunity.** *Clin Exp Allergy* 2013, **43**:716-722.
51. Pochetuhen K, Luzina IG, Locketell V, Choi J, Todd NW, Atamas SP: **Complex regulation of pulmonary inflammation and fibrosis by CCL18.** *Am J Pathol* 2007, **171**:428-437.
52. Schutyser E, Richmond A, Van Damme J: **Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes.** *J Leukoc Biol* 2005, **78**:14-26.
53. Prasse A, Muller-Quernheim J: **Non-invasive biomarkers in pulmonary fibrosis.** *Respirology* 2009, **14**:788-795.

54. Hieshima K, Imai T, Baba M, Shoudai K, Ishizuka K, Nakagawa T, Tsuruta J, Takeya M, Sakaki Y, Takatsuki K, et al: **A novel human CC chemokine PARC that is most homologous to macrophage-inflammatory protein-1 alpha/LD78 alpha and chemotactic for T lymphocytes, but not for monocytes.** *J Immunol* 1997, **159**:1140-1149.
55. Kodolja V, Muller C, Politz O, Hakij N, Orfanos CE, Goerdts S: **Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern.** *J Immunol* 1998, **160**:1411-1418.
56. Atamas SP, Luzina IG, Choi J, Tsymbalyuk N, Carbonetti NH, Singh IS, Trojanowska M, Jimenez SA, White B: **Pulmonary and activation-regulated chemokine stimulates collagen production in lung fibroblasts.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, **29**:743-749.
57. Pardo A, Smith KM, Abrams J, Coffman R, Bustos M, McClanahan TK, Grein J, Murphy EE, Zlotnik A, Selman M: **CCL18/DC-CK-1/PARC up-regulation in hypersensitivity pneumonitis.** *J Leukoc Biol* 2001, **70**:610-616.
58. Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, Schafer M, Eggeling S, Ludwig C, Germann M, Kollert F, Zissel G, Muller-Quernheim J: **CCL18 as an indicator of pulmonary fibrotic activity in idiopathic interstitial pneumonias and systemic sclerosis.** *Arthritis Rheum* 2007, **56**:1685-1693.
59. Pinto-Plata V, Toso J, Lee K, Park D, Bilello J, Mullerova H, De Souza MM, Vessey R, Celli B: **Profiling serum biomarkers in patients with COPD: associations with clinical parameters.** *Thorax* 2007, **62**:595-601.
60. Mrazek F, Sekerova V, Drabek J, Kolek V, du Bois RM, Petrek M: **Expression of the chemokine PARC mRNA in bronchoalveolar cells of patients with sarcoidosis.** *Immunol Lett* 2002, **84**:17-22.
61. de Nadai P, Charbonnier AS, Chenivresse C, Senechal S, Fournier C, Gilet J, Vorng H, Chang Y, Gosset P, Wallaert B, et al: **Involvement of CCL18 in allergic asthma.** *J Immunol* 2006, **176**:6286-6293.
62. Adib-Conquy M, Pedron T, Petit-Bertron AF, Tabary O, Corvol H, Jacquot J, Clement A, Cavillon JM: **Neutrophils in cystic fibrosis display a distinct gene expression pattern.** *Mol Med* 2008, **14**:36-44.
63. Hartl D, Latzin P, Zissel G, Krane M, Krauss-Etschmann S, Griese M: **Chemokines indicate allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **173**:1370-1376.

64. Hector A, Kroner C, Carevic M, Bakele M, Rieber N, Riethmuller J, Griese M, Zissel G, Hartl D: **The chemokine CCL18 characterises Pseudomonas infections in cystic fibrosis lung disease.** *Eur Respir J* 2014, **44**:1608-1615.
65. Hartl D, Latzin P, Hordijk P, Marcos V, Rudolph C, Woischnik M, Krauss-Etschmann S, Koller B, Reinhardt D, Roscher AA, et al: **Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease.** *Nat Med* 2007, **13**:1423-1430.
66. Prasse A, Probst C, Bargagli E, Zissel G, Toews GB, Flaherty KR, Olschewski M, Rottoli P, Muller-Quernheim J: **Serum CC-chemokine ligand 18 concentration predicts outcome in idiopathic pulmonary fibrosis.** *Am J Respir Crit Care Med* 2009, **179**:717-723.
67. Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, Jungraithmayr W, Kollert F, Goldmann T, Vollmer E, Muller-Quernheim J, Zissel G: **A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **173**:781-792.
68. Sin DD, Miller BE, Duvoix A, Man SF, Zhang X, Silverman EK, Connett JE, Anthonisen NA, Wise RA, Tashkin D, et al: **Serum PARC/CCL-18 concentrations and health outcomes in chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2011, **183**:1187-1192.
69. Kim HB, Kim CK, Iijima K, Kobayashi T, Kita H: **Protein microarray analysis in patients with asthma: elevation of the chemokine PARC/CCL18 in sputum.** *Chest* 2009, **135**:295-302.
70. Olivier KN, Weber DJ, Lee JH, Handler A, Tudor G, Molina PL, Tomashefski J, Knowles MR, Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis Study G: **Nontuberculous mycobacteria. II: nested-cohort study of impact on cystic fibrosis lung disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **167**:835-840.
71. Levy I, Grisaru-Soen G, Lerner-Geva L, Kerem E, Blau H, Bentur L, Aviram M, Rivlin J, Picard E, Lavy A, et al: **Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:378-384.
72. Griffith DE, Aksomit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, et al: **An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases.** *Am J Respir Crit Care Med* 2007, **175**:367-416.
73. Petrini B: **Mycobacterium abscessus: an emerging rapid-growing potential pathogen.** *APMIS* 2006, **114**:319-328.

74. Griffith DE: **Emergence of nontuberculous mycobacteria as pathogens in cystic fibrosis.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **167**:810-812.
75. Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ, Jr., Faiz AR, Lee JH, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Handler A, Wilson RW, Schechter MS, et al: **Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **167**:828-834.
76. Pierre-Audigier C, Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Le Bourgeois M, Offredo C, Vu-Thien H, Fauroux B, Mariani P, Munck A, Bingen E, et al: **Age-related prevalence and distribution of nontuberculous mycobacterial species among patients with cystic fibrosis.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**:3467-3470.
77. Holland SM, Eisenstein EM, Kuhns DB, Turner ML, Fleisher TA, Strober W, Gallin JI: **Treatment of refractory disseminated nontuberculous mycobacterial infection with interferon gamma. A preliminary report.** *N Engl J Med* 1994, **330**:1348-1355.
78. Kröner C GB, Kappler M, Grimmelt A-C, Belohradsky BH, Hogardt M, Laniado G, Meissner M, Schubert S, Griese M: **Molecular Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteria in a German CF Center and Clinical Course of NTM Positive Patients.** *Open Journal of Medical Microbiology* 2013, **13**:8.
79. Aitken ML, Limaye A, Pottinger P, Whimbey E, Goss CH, Tonelli MR, Cangelosi GA, Dirac MA, Olivier KN, Brown-Elliott BA, et al: **Respiratory outbreak of Mycobacterium abscessus subspecies massiliense in a lung transplant and cystic fibrosis center.** *Am J Respir Crit Care Med* 2012, **185**:231-232.
80. Pritchard RC, Muir DB: **Trichosporon beigelii: survey of isolates from clinical material.** *Pathology* 1985, **17**:20-23.
81. Walsh TJ, Melcher GP, Lee JW, Pizzo PA: **Infections due to Trichosporon species: new concepts in mycology, pathogenesis, diagnosis and treatment.** *Curr Top Med Mycol* 1993, **5**:79-113.
82. Miceli MH, Diaz JA, Lee SA: **Emerging opportunistic yeast infections.** *Lancet Infect Dis* 2011, **11**:142-151.
83. Fleming RV, Walsh TJ, Anaissie EJ: **Emerging and less common fungal pathogens.** *Infect Dis Clin North Am* 2002, **16**:915-933, vi-vii.
84. Gondor M, Michaels MG, Finder JD: **Non-aspergillus allergic bronchopulmonary mycosis in a pediatric patient with cystic fibrosis.** *Pediatrics* 1998, **102**:1480-1482.
85. Hickey PW, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Wickes BL, Schmidt HJ, Walsh TJ: **Trichosporon mycotoxinivorans, a novel respiratory pathogen in patients with cystic fibrosis.** *J Clin Microbiol* 2009, **47**:3091-3097.
86. Hirschi S, Letscher-Bru V, Pottecher J, Lannes B, Jeung MY, Degot T, Santelmo N, Sabou AM, Herbrecht R, Kessler R: **Disseminated Trichosporon mycotoxinivorans,**

- Aspergillus fumigatus, and Scedosporium apiospermum coinfection after lung and liver transplantation in a cystic fibrosis patient.** *J Clin Microbiol* 2012, **50**:4168-4170.
87. Liu JC, Modha DE, Gaillard EA: **What is the clinical significance of filamentous fungi positive sputum cultures in patients with cystic fibrosis?** *J Cyst Fibros* 2013, **12**:187-193.
88. Chotirmall SH, O'Donoghue E, Bennett K, Gunaratnam C, O'Neill SJ, McElvaney NG: **Sputum Candida albicans presages FEV(1) decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis.** *Chest* 2010, **138**:1186-1195.
89. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F: **The effect of chronic infection with Aspergillus fumigatus on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis.** *Chest* 2010, **137**:171-176.
90. Haupt HM, Merz WG, Beschorner WE, Vaughan WP, Saral R: **Colonization and infection with Trichosporon species in the immunosuppressed host.** *J Infect Dis* 1983, **147**:199-203.
91. Tashiro T, Nagai H, Kamberi P, Goto Y, Kikuchi H, Nasu M, Akizuki S: **Disseminated Trichosporon beigelii infection in patients with malignant diseases: immunohistochemical study and review.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994, **13**:218-224.
92. Kroner C, Kappler M, Grimmelt AC, Laniado G, Wurstl B, Griese M: **The basidiomycetous yeast Trichosporon may cause severe lung exacerbation in cystic fibrosis patients - clinical analysis of Trichosporon positive patients in a Munich cohort.** *BMC Pulm Med* 2013, **13**:61.
93. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR: **A method and server for predicting damaging missense mutations.** *Nat Methods* 2010, **7**:248-249.
94. Kumar P, Henikoff S, Ng PC: **Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm.** *Nat Protoc* 2009, **4**:1073-1081.
95. Beers MF, Zhao M, Tomer Y, Russo SJ, Zhang P, Gonzales LW, Guttentag SH, Mulugeta S: **Disruption of N-linked glycosylation promotes proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCA3.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013, **305**:L970-980.
96. Wittmann T, Schindlbeck U, Hoppner S, Kinting S, Frixel S, Kroner C, Liebisch G, Hegermann J, Aslanidis C, Brasch F, et al: **Tools to explore ABCA3 mutations causing interstitial lung disease.** *Pediatr Pulmonol* 2016.

97. Wilke M, Buijs-Offerman RM, Aarbiou J, Colledge WH, Sheppard DN, Touqui L, Bot A, Jorna H, de Jonge HR, Scholte BJ: **Mouse models of cystic fibrosis: phenotypic analysis and research applications.** *J Cyst Fibros* 2011, **10 Suppl 2**:S152-171.
98. Clarke LL, Grubb BR, Yankaskas JR, Cotton CU, McKenzie A, Boucher RC: **Relationship of a non-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride conductance to organ-level disease in Cftr(-/-) mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:479-483.
99. Zhou Z, Duerr J, Johannesson B, Schubert SC, Treis D, Harm M, Graeber SY, Dalpke A, Schultz C, Mall MA: **The ENaC-overexpressing mouse as a model of cystic fibrosis lung disease.** *J Cyst Fibros* 2011, **10 Suppl 2**:S172-182.
100. Sun X, Yan Z, Yi Y, Li Z, Lei D, Rogers CS, Chen J, Zhang Y, Welsh MJ, Leno GH, Engelhardt JF: **Adeno-associated virus-targeted disruption of the CFTR gene in cloned ferrets.** *J Clin Invest* 2008, **118**:1578-1583.
101. Rogers CS, Abraham WM, Brogden KA, Engelhardt JF, Fisher JT, McCray PB, Jr., McLennan G, Meyerholz DK, Namati E, Ostedgaard LS, et al: **The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, **295**:L240-263.
102. Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA, et al: **Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs.** *Science* 2008, **321**:1837-1841.
103. Rogers CS, Hao Y, Rokhlina T, Samuel M, Stoltz DA, Li Y, Petroff E, Vermeer DW, Kabel AC, Yan Z, et al: **Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer.** *J Clin Invest* 2008, **118**:1571-1577.
104. Meyerholz DK, Stoltz DA, Pezzulo AA, Welsh MJ: **Pathology of gastrointestinal organs in a porcine model of cystic fibrosis.** *Am J Pathol* 2010, **176**:1377-1389.
105. Pierucci-Alves F, Akoyev V, Stewart JC, 3rd, Wang LH, Janardhan KS, Schultz BD: **Swine models of cystic fibrosis reveal male reproductive tract phenotype at birth.** *Biol Reprod* 2011, **85**:442-451.
106. Chang EH, Lacruz RS, Bromage TG, Bringas P, Jr., Welsh MJ, Zabner J, Paine ML: **Enamel pathology resulting from loss of function in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in a porcine animal model.** *Cells Tissues Organs* 2011, **194**:249-254.
107. Itani OA, Chen JH, Karp PH, Ernst S, Keshavjee S, Parekh K, Klesney-Tait J, Zabner J, Welsh MJ: **Human cystic fibrosis airway epithelia have reduced Cl⁻ conductance but not increased Na⁺ conductance.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:10260-10265.

108. Rogan MP, Reznikov LR, Pezzulo AA, Gansemer ND, Samuel M, Prather RS, Zabner J, Fredericks DC, McCray PB, Jr., Welsh MJ, Stoltz DA: **Pigs and humans with cystic fibrosis have reduced insulin-like growth factor 1 (IGF1) levels at birth.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:20571-20575.
109. Klymiuk N, Mundhenk L, Kraehe K, Wuensch A, Plog S, Emrich D, Langenmayer MC, Stehr M, Holzinger A, Kroner C, et al: **Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis.** *J Mol Med (Berl)* 2012, **90**:597-608.
110. Stoltz DA, Meyerholz DK, Pezzulo AA, Ramachandran S, Rogan MP, Davis GJ, Hanfland RA, Wohlford-Lenane C, Dohrn CL, Bartlett JA, et al: **Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth.** *Sci Transl Med* 2010, **2**:29ra31.
111. Ostedgaard LS, Meyerholz DK, Vermeer DW, Karp PH, Schneider L, Sigmund CD, Welsh MJ: **Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with a shortened R domain rescues the intestinal phenotype of CFTR^{-/-} mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:2921-2926.
112. Griese M, Irnstetter A, Hengst M, Burmester H, Nagel F, Ripper J, Feilcke M, Pawlita I, Gothe F, Kappler M, et al: **Categorizing diffuse parenchymal lung disease in children.** *Orphanet J Rare Dis* 2015, **10**:122.
113. Pham-Huy A, Robinson JL, Tapiero B, Bernard C, Daniel S, Dobson S, Dery P, Le Saux N, Embree J, Valiquette L, Quach C: **Current trends in nontuberculous mycobacteria infections in Canadian children: A pediatric investigators collaborative network on infections in Canada (PICNIC) study.** *Paediatr Child Health* 2010, **15**:276-282.
114. Lindeboom JA, Kuijper EJ, Bruijnesteijn van Coppenraet ES, Lindeboom R, Prins JM: **Surgical excision versus antibiotic treatment for nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children: a multicenter, randomized, controlled trial.** *Clin Infect Dis* 2007, **44**:1057-1064.
115. Stone AB, Schelonka RL, Drehner DM, McMahon DP, Ascher DP: **Disseminated Mycobacterium avium complex in non-human immunodeficiency virus-infected pediatric patients.** *Pediatr Infect Dis J* 1992, **11**:960-964.
116. Nolt D, Michaels MG, Wald ER: **Intrathoracic disease from nontuberculous mycobacteria in children: two cases and a review of the literature.** *Pediatrics* 2003, **112**:e434.
117. Fergie JE, Milligan TW, Henderson BM, Stafford WW: **Intrathoracic Mycobacterium avium complex infection in immunocompetent children: case report and review.** *Clin Infect Dis* 1997, **24**:250-253.

-
118. Freeman AF, Olivier KN, Rubio TT, Bartlett G, Ochi JW, Claypool RJ, Ding L, Kuhns DB, Holland SM: **Intrathoracic nontuberculous mycobacterial infections in otherwise healthy children.** *Pediatr Pulmonol* 2009, **44**:1051-1056.
 119. Polychronopoulos VS, Prakash UBS: **Airway involvement in sarcoidosis.** *Chest* 2009, **136**:1371-1380.
 120. Griffith DE, Brown BA, Cegielski P, Murphy DT, Wallace RJ, Jr.: **Early results (at 6 months) with intermittent clarithromycin-including regimens for lung disease due to Mycobacterium avium complex.** *Clin Infect Dis* 2000, **30**:288-292.
 121. Mandell DL, Wald ER, Michaels MG, Dohar JE: **Management of nontuberculous mycobacterial cervical lymphadenitis.** *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003, **129**:341-344.
 122. **Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2009 Annual Data Report.** Bethesda, Maryland: Cystic Fibrosis Foundation; 2011.
 123. Ren CL, Morgan WJ, Konstan MW, Schechter MS, Wagener JS, Fisher KA, Regelman WE, Investigators, Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic F: **Presence of methicillin resistant Staphylococcus aureus in respiratory cultures from cystic fibrosis patients is associated with lower lung function.** *Pediatr Pulmonol* 2007, **42**:513-518.
 124. Sawicki GS, Rasouliyan L, Pasta DJ, Regelman WE, Wagener JS, Waltz DA, Ren CL, Investigators, Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic F: **The impact of incident methicillin resistant Staphylococcus aureus detection on pulmonary function in cystic fibrosis.** *Pediatr Pulmonol* 2008, **43**:1117-1123.
 125. Dasenbrook EC, Merlo CA, Diener-West M, Lechtzin N, Boyle MP: **Persistent methicillin-resistant Staphylococcus aureus and rate of FEV1 decline in cystic fibrosis.** *Am J Respir Crit Care Med* 2008, **178**:814-821.