

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

**Reduced neutrophil elastase inhibitor elafin and
elevated TGF- β_1 are linked to inflammatory
response in sputum of CF patients
with *P. aeruginosa***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

vorgelegt von

Jan Christoph Thomassen

aus Düsseldorf

promoviert am:

16. September 2024

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Gereon R. Fink

1. Gutachterin: Privatdozentin Dr. med. S. B. van Koningsbruggen-Rietschel
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. Jantsch
3. Gutachterin: Dr. med. J. Fischer

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau PD Dr. med. habil. Silke van Koningsbruggen-Rietschel, Oberärztin der Kinderpneumologie, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln. Herr PD Dr. med. habil. Ernst Rietschel, Personaloberarzt und Leiter des Schwerpunktes Pädiatrische Pneumologie und Allergologie, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln. Junior-Professor Dr. Dr. Miguel Angel Alejandre Alcazar, Leiter der Arbeitsgruppe experimentelle Pneumologie – Translationale experimentelle Pädiatrie, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln. Frau Christina Vohlen und Herr Gregor Fink, medizinisch-technische Assistent*in im Labor für Pneumologie und Allergologie, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters/einer Promotionsberaterin in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Als Grundlage dieser kumulativen Dissertationsarbeit dient die im Juli 2021 im *European Respiratory Journal Open Research* veröffentlichte Originalpublikation mit dem Titel „Reduced neutrophil elastase inhibitor elafin and elevated TGF- β_1 are linked to inflammatory response in sputum of CF patients with *P. aeruginosa*“.

Die dieser Arbeit angegebenen Experimente und Datensätze sind nach entsprechender Anleitung durch die medizinisch-technischen Assistenten Herr Gregor Fink und Frau Christina Vohlen von mir selbst ausgeführt worden. Frau Dr. med. Maxine Walz und Herr Dr. med. Tobias Trojan waren an der Erhebung der klinischen Daten mitbeteiligt. Die experimentellen Versuche der Sputumanalyse, die statistische Auswertung mittels GraphPad-Software, sowie die Erstellung des Manuskriptes wurden von mir unter wissenschaftlichen Begleitung durch meine Betreuerin Frau PD Dr. med. habil. Silke van Koningsbruggen-Rietschel und Professor Dr. Dr. Miguel Angel Alejandre Alcazar eigenständig durchgeführt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 05.02.2024

Unterschrift:

Danksagung

Ich danke meiner Doktormutter Frau Priv. Doz. Dr. med. Silke van Koningsbruggen-Rietschel für die Möglichkeit, unter ihrer Aufsicht die Dissertation schreiben zu können. Darüber hinaus danke ich ihr sehr für die stets exzellente Betreuung, ihr außerordentliches Engagement und die Denkanstöße bei der Durchsicht meines Manuskriptes. Ihre Begeisterung für das Krankheitsbild der zystischen Fibrose und ihr Enthusiasmus in der Betreuung von Menschen mit CF haben mich nachhaltig beeindruckt und sind Motivation für mich, auch in Zukunft in der ärztlichen und wissenschaftlichen Tätigkeit dem Krankheitsbild der zystischen Fibrose einen Schwerpunkt zu widmen.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Miguel A. Alcazar für die vorbildliche Heranführung an das wissenschaftliche Arbeiten im Labor und die stetige Bereitschaft mir während meiner Forschungsrotation mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Nicht nur seine fachlich herausragende Betreuung, sondern auch seine angenehme menschliche Art eine Arbeitsgruppe zu leiten, haben meine Forschungsrotation zu einer ganz besonderen und wertvollen Erfahrung für mich gemacht.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Priv. Doz. Dr. med. Ernst Rietschel, der es mir als Leiter der kinderpneumologischen Abteilung stets ermöglicht hat, Freiräume für das wissenschaftliche Arbeiten während der Facharztausbildung zu bekommen und mich stets in meiner klinischen und wissenschaftlichen Entwicklung unterstützt hat.

Ein weiterer Dank gilt auch dem Team des Labors der Klinik und Poliklinik für Kinder und Jugendmedizin. Dabei danke ich besonders Frau Christina Vohlen und Herrn Gregor Fink, die mich in die Labortechniken einarbeiteten und bei Schwierigkeiten jederzeit für mich ansprechbar waren.

Herzlich danke ich auch den Mukoviszidose-Patienten und ihren Eltern, welche sich bereit erklärt haben, an der Studie teilzunehmen und damit diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich stets in der Zeit des wissenschaftlichen Arbeitens mit all seinen Höhen und Tiefen unterstützt hat und mir immer Kraft und Zuversicht vermittelt.

Jan Christoph Thomassen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Zusammenfassung	7
2. Einleitung	9
2.1 Das Krankheitsbild der zystischen Fibrose	9
2.2 Epidemiologische Grundlagen der zystischen Fibrose	9
2.3 Genetische Grundlagen der zystischen Fibrose	10
2.4 Pathophysiologische Grundlagen der zystischen Fibrose	12
2.5 Charakteristik der pulmonalen Inflammation bei zystischer Fibrose	14
2.6 Schlüsselregulatoren der pulmonalen Inflammation bei zystischer Fibrose	15
2.7 Grundlagen zur Infektion mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bei zystischer Fibrose	17
2.8 Bedeutung von Sputum-Biomarkern bei zystischer Fibrose	19
2.9 Fragestellungen und Ziele der Arbeit	20
3. Originalpublikation	21
4. Diskussion	33
4.1 Zusammensetzung des Patientenkollektivs	34
4.2 Zusammenhang von der Besiedlung mit PA und dem Gleichgewicht von Proteasen und Antiproteasen im Sputum von CF-Patienten	34
4.3 Korrelation von PA-Infektion und der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine im Sputum von CF-Patienten	36
4.4 Korrelation von PA und TGF- β_1 -Sputumkonzentration	37
4.5 Korrelation von TGF- β_1 -Sputumkonzentration zum klinischen und inflammatorischen Phänotyp	37
4.6 Limitationen der Studie	39
5. Literaturverzeichnis	40
6. Anhang	48
6.1 Abbildungsverzeichnis	48

Abkürzungsverzeichnis

ASL	Airway surface liquid
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BMI	Body Mass Index
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CBAVD	Kongenitale bilaterale Aplasie des Vas deferens
CF	Zystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator
CrP	C-reaktives Protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
FEV1	Forciertes expiratorisches Volumen (Einsekundenkapazität)
IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
NE	Neutrophile Elastase
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PA	Pseudomonas aeruginosa
mRNA	Messenger ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
TGF-β₁	Transforming Growth Factor β₁

1. Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer Erhöhung proinflammatorischer Mediatoren im Sputum von CF-Patienten und einer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Dieses Ergebnis bestätigt die Bedeutung einer frühen und aggressiven antibiotischen PA-Eradikationstherapie für neu besiedelte sowie eine konsequente Suppressionstherapie chronisch infizierter Menschen mit zystischer Fibrose (CF) zur Reduktion der pulmonalen Inflammation.

Die Ergebnisse dieser Dissertationsschrift verdeutlichen den relevanten Einfluss einer PA-Infektion sowohl auf die Induktion eines Ungleichgewichtes zwischen neutrophiler Elastase (NE) und Elafin, als auch auf die gesteigerte pulmonale Inflammation mittels einer vermehrten Freisetzung von TGF- β_1 , einem Anstieg der Expression von IL-1 β und IL-8 sowie einer Aktivierung der NF κ B-Signalkaskade. All diese Prozesse führen somit zu einem Fortschreiten der chronischen pulmonalen Inflammation und Fibrosierung im Rahmen der CF-Lungenerkrankung (Abbildung 1).

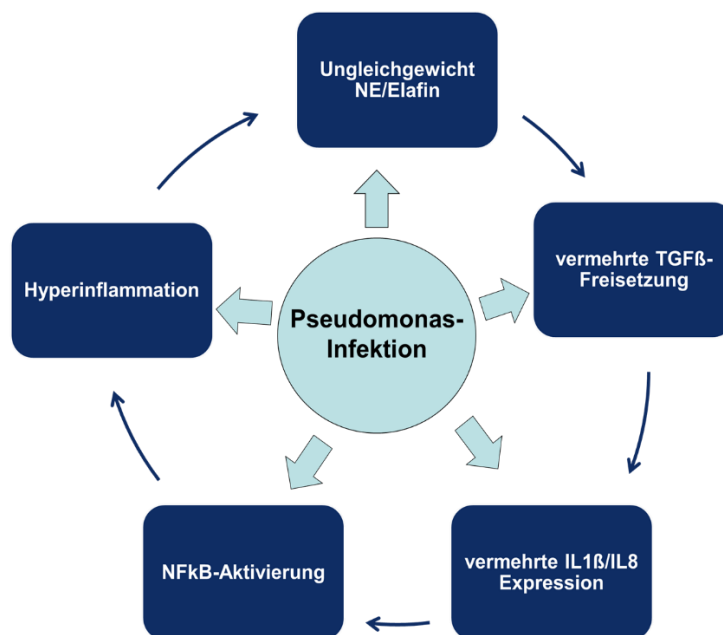


Abbildung 1: Zusammenfassende schematische Darstellung des Einflusses einer Pseudomonasinfektion auf den Kreislauf der chronischen Inflammation bei CF.

Die Identifizierung von hohen TGF- β_1 -Sputumspiegeln und der Elafin-Defizienz als begünstigende Faktoren des Inflammationsgeschehens in der CF-Lunge eröffnet somit neben der etablierten antibiotischen PA-Eradikations- bzw. Suppressionstherapie neue Therapieansätze. Die Reduktion der pulmonalen Inflammation mittels Hemmung der NE durch

Substitution von Elafin und die Inhibition von TGF- β_1 sind vielversprechende Ansätze und stellen möglicherweise eine komplementäre Ergänzung zur sog. CFTR-Modulatortherapie dar.

2. Einleitung

2.1 Krankheitsbild der zystischen Fibrose

Das Krankheitsbild der zystischen Fibrose (auch Mukoviszidose, engl.: Cystic Fibrosis, CF) ist die häufigste genetische Stoffwechselerkrankung der kaukasischen Bevölkerung und weist in Deutschland unter Neugeborenen eine Inzidenz von ca. 1:3300 auf (1, 2). Ursächlich für diese autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung ist eine mutationsbedingte Bildungs- bzw. Funktionsstörung eines epithelialen Chloridkanals, dem sogenannten *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR). Beim Krankheitsbild der CF handelt es sich um eine Multiorganerkrankung mit einer Vielzahl an Symptomen und Komplikationen. Klinisch führend ist vor allem die pulmonale Beteiligung (CF-Lungenerkrankung), die durch eine chronische Inflammation und bronchiale Fibrosierung gekennzeichnet ist und mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergeht (3). Symptomatisch führt dies zu persistierenden bakteriellen Infektionen mit Husten, Dyspnoe, Hämoptysen, Bronchiektasien bis hin zu einer Lungenparenchymdestruktion mit respiratorischer Globalinsuffizienz. Weitere häufige extrapulmonale Komorbiditäten umfassen eine exokrine Pankreasinsuffizienz mit Malnutrition und Malabsorption, Leberfibrose, intestinale Obstruktionssyndrome, Entwicklung eines CF-assoziierten Diabetes mellitus sowie eine kongenitale bilaterale Aplasie des Vas deferens (CBAVD) bei männlichen CF-Patienten (4).

2.2 Epidemiologische Grundlagen der zystischen Fibrose

Die Prävalenz von CF und das Spektrum von CFTR-Mutationen variiert deutlich zwischen unterschiedlichen Ethnien und Regionen (5). Weltweit sind derzeit etwa 106.000 Menschen an CF erkrankt, von denen der Großteil der kaukasischen Bevölkerungsgruppe zugeordnet werden kann (6, 7). In Europa konnte 2017 eine Gesamtpatientenzahl von 50.902 ermittelt werden (2). Im aktuellen deutschen CF-Register (Stand:2019) sind 6463 CF-Patienten registriert und weisen ein medianes Lebensalter von 21 Jahren und einen männlichen Patientenanteil von 51,9% auf. Unter der kaukasischen Bevölkerungsgruppe mit einer Heterozygotenfrequenz von 1:25 – 1:30 (8) ist eine Inzidenz von ca. 1:2500 Neugeborenen zu erwarten (9). Durch Sensibilisierung der Ärzteschaft in den letzten Jahrzehnten und das im Oktober 2016 in der Bundesrepublik Deutschland flächendeckend eingeführte Neugeborenenenscreening auf zystische Fibrose konnte das mediane Alter bei Diagnosestellung von 1995 bei 1,9 Jahren auf 0,50 Jahre im Jahr 2016 gesenkt werden (10,11). Somit wurden im Vergleich zu 1995 (~40%) im Jahr 2016 bereits über 67% aller Neuerkrankungen innerhalb

der ersten 12 Lebensmonate diagnostiziert (10,11). Während das aktuelle mittlere Sterbealter 34 Jahre beträgt (12), ist mit der Entwicklung und Zulassung neuer CFTR-modulierender Medikamente, sowie dem Trend zur früheren Diagnosestellung und somit Beginn einer frühen symptomatischen Therapie von einem deutlichen Anstieg der Lebenserwartung auszugehen. Im Jahr 2016 erreichten bereits über 50% aller deutschen CF-Patienten das 30. Lebensjahr (10) und bei den nach 2000 geborenen CF-Erkrankten wird eine Lebenserwartung von über 50 Jahren als realistisch eingestuft (13).

2.3 Genetische Grundlagen der zystischen Fibrose

Nach der Erstbeschreibung von 1936 als eigenes Krankheitsbild durch den Schweizer Kinderarzt G. Fanconi (14), gelang 1989 der Nachweis des zugrundeliegenden Gendefektes auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (Position q31.2) (15). Dieses Gen kodiert für ein 1480 Aminosäuren langes, cAMP-reguliertes Membranprotein, das dem CFTR-Kanal entspricht (16).

Aktuell sind über 2100 verschiedene Mutationen bekannt (17, 18), welche sich anhand ihrer Auswirkungen auf das *CFTR*-Gen in sechs unterschiedliche Klassen einteilen lassen (Abbildung 2):

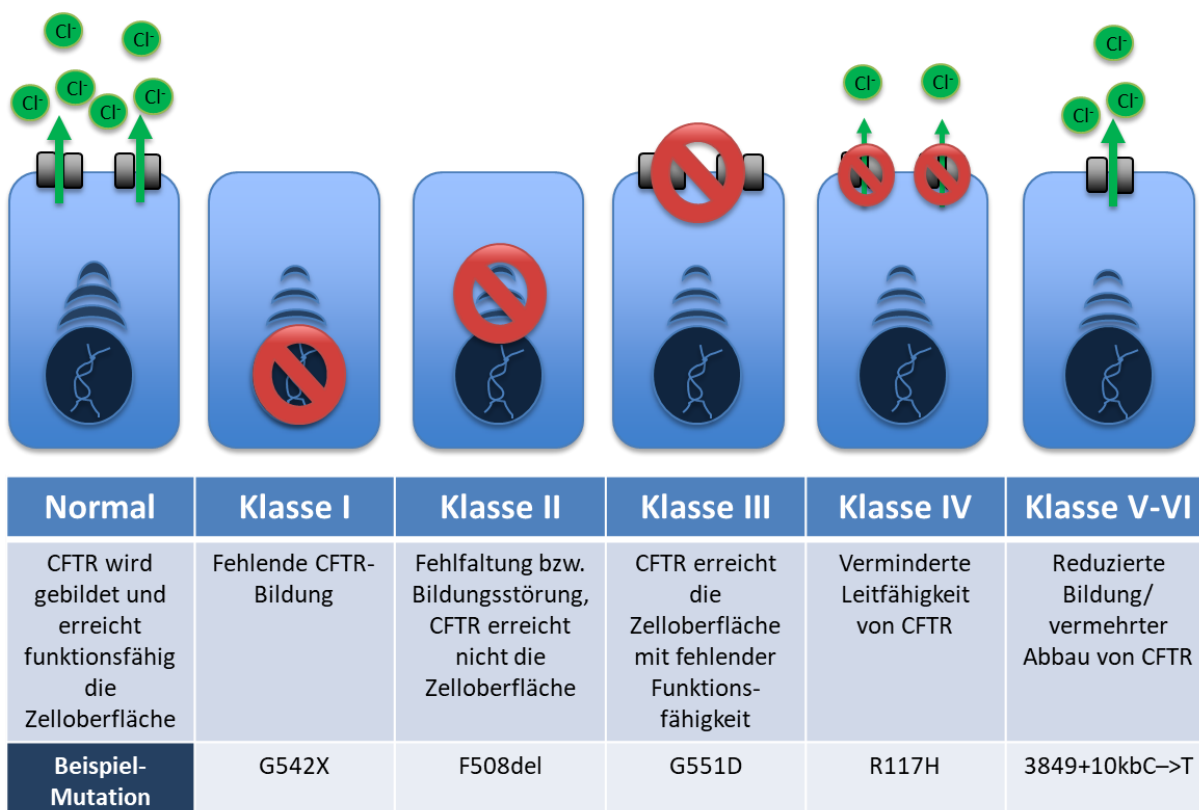
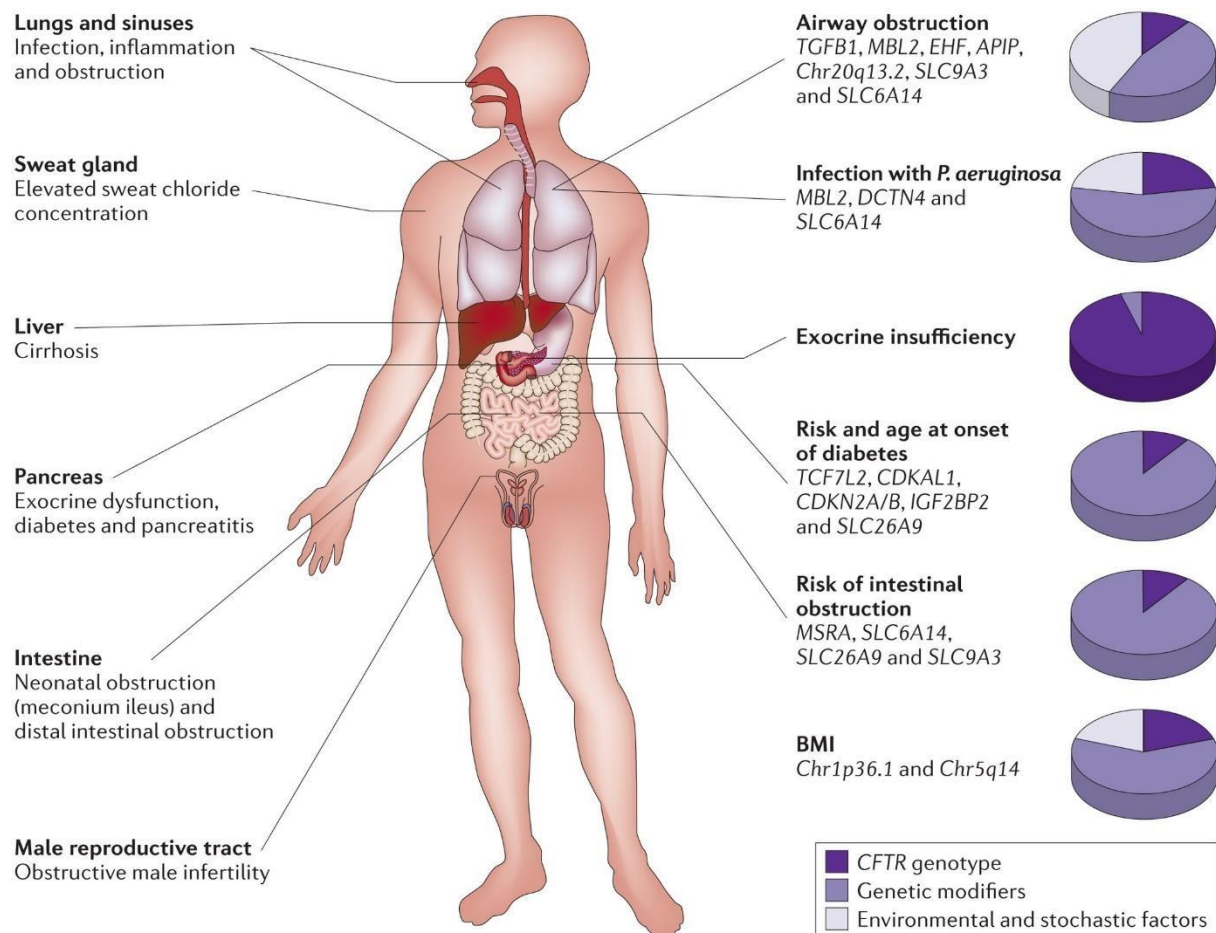


Abbildung 2: Übersicht der CFTR-Mutationsklassen mit Auflistung der zugrundeliegenden Defekte und Beispielmutationen (modifiziert nach Boyle and de Boeck, 2013) (19).

Abhängig von der Klasse der Mutationen ist die CFTR-Funktion in unterschiedlicher Intensität eingeschränkt oder bleibt völlig aus. Eine klassische CF liegt vor, wenn zwei sog. „loss-of-function“-Allele vorhanden sind (Klassen I-III). Hier kommt es durch die generalisierte Störung des sekretorischen Epithels aller exokrinen Drüsen im Rahmen der Erkrankung zu schweren Sekundärveränderungen an Lunge, Pankreas, Leber und Reproduktionstrakt. Liegt mindestens ein Allel mit einer Mutation aus den Klassen IV bis VI vor, spricht man von einer atypischen Mukoviszidose, da eine partielle Funktion von CFTR erhalten bleibt und die CF-Patienten meist einen milderen Verlauf und eine längere Überlebenszeit aufweisen (19-21). Die F508del-Mutation ist mit über 80% die häufigste Mutation unter der europäischen Bevölkerung (22) und geht mit dem Fehlen einer Phenylalaninsäure in Position 508 des CFTR-Proteins in Form einer Codon-Depletion einher (15). Es ist bekannt, dass geringe Anteile der F508del-mutanten CFTR-Fraktion trotz zellulärer Qualitätskontrolle an die apikale Epithelmembran gelangen (23), die eine Restfunktion von etwa 20% der normalen CFTR-Proteine haben (22, 24). Somit vereint die F508del-Mutation sowohl Eigenschaften der Klasse II mit denen der Klassen III und IV. Die strikte Klassifizierung der Mutationsklassen anhand einzelner zugrunde liegender Defekte ist daher nur begrenzt möglich (25).

Dem CFTR-Genotyp kann phänotypisch eine gute Korrelation zum Schweregrad der exokrinen Pankreasinsuffizienz und Höhe der Schweißchloridkonzentration zugeordnet werden. Hinsichtlich der CF-Lungenerkrankung zeigt sich die CFTR-Genotyp-Phänotyp Korrelation jedoch sehr variabel (26). Neben dem CFTR-Genotyp konnte in den letzten Jahren darüber hinaus eine Vielzahl weiterer krankheitsmodifizierender Faktoren identifiziert werden (6). So spielen auch modifizierende Gene und Umweltfaktoren eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung des klinischen Phänotyps von Menschen mit CF (Abbildung 3).



Nature Reviews | Genetics

Abbildung 3: Klinischer Phänotyp bei CF und Abhängigkeit von Genotyp, modifizierenden Genen und Umweltfaktoren (6).

2.4 Pathophysiologische Grundlagen der zystischen Fibrose

Als cAMP-regulierter Chloridkanal in der Zellmembran sekretorischer Epithelien ist CFTR über den transepithelialen Ionen- und Wasseraustausch für ein umfangreiches Spektrum regulativer Funktionen verantwortlich. Durch ein Fehlen oder eine Funktionsstörung des Chloridkanals kommt es somit zu einer intrazellulären Akkumulation von Chlorid mit der Folge einer vermehrten Resorption von Natrium und einem intrazellulären Wassereinstrom (27) (Abbildung 4).

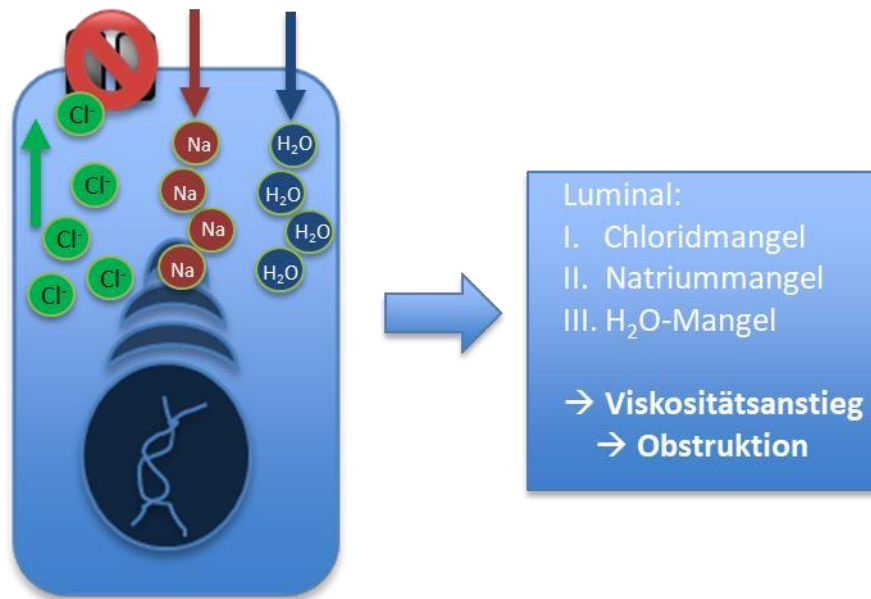


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Auswirkung der CFTR-Dysfunktion auf den zellulären Elektrolythaushalt und die luminalen Homöostase.

Des Weiteren folgt durch den CFTR-Funktionsverlust eine verminderte negative Regulation der epithelialen Natriumkanäle (ENaC), wodurch der intrazelluläre Natriumeinstrom verstärkt wird (28). Intraluminal kommt es somit zu einem Wassermangel mit einer Viskositätszunahme der luminalen Sekrete sowie zu einem Anstieg der epithelialen Potentialdifferenz (29). Sowohl die veränderte Chloridkonzentration, als auch die Potentialdifferenzänderung werden im Rahmen der CF-Diagnostik genutzt. So gilt neben dem Neugeborenencreening weiterhin die Pilocarpin-Iontopherese (Schweißtest) mit erhöhter Chloridkonzentration im Schweiß zusammen mit der genetischen Untersuchung als Goldstandard der CF-Diagnostik. Bei Schweißtestergebnissen im Graubereich und/oder fehlendem Nachweis zweier CF-verursachenden Mutationen kann mittels Bestimmung der epithelialen Potentialdifferenzen über die Nasenschleimhaut (nasale transepitheliale Potentialdifferenzmessung, NPD-Messung) oder rektaler Schleimhautbiopsien (*intestinal current measurements*, ICM) eine Evaluation der CFTR-Funktion erfolgen (30).

Klinisch manifestiert sich die Viskositätszunahme vor allem in einer konsekutiven Obstruktion der Bronchien mit lokaler Entzündungsreaktion. Das Fortschreiten der Erkrankung führt häufig zu einer Chronifizierung der bronchialen Entzündung mit persistierenden bakteriellen Infektionen und einer Fibrosierung des Lungenparenchyms als Folge (31).

2.5 Charakteristik der pulmonalen Inflammation bei zystischer Fibrose

Der pulmonale Krankheitsverlauf bei zystischer Fibrose ist gekennzeichnet durch eine Interaktion von Obstruktion, Infektion und chronischer, dysregulierter Inflammation der Atemwege. Bereits postnatal und im frühen Kindesalter konnten strukturelle Veränderungen der Atemwege, sowie pulmonale Inflammationsmarker als Korrelat einer frühen pulmonalen Schädigung nachgewiesen werden (32, 33). Die pulmonale Inflammation wird somit bereits frühzeitig durch die dem Krankheitsbild zugrundeliegende CFTR-Dysfunktion und der damit einhergehenden Abweichung von physiologischen Atemwegsverhältnissen begünstigt. Eine Schlüsselrolle hinsichtlich der Aufrechterhaltung einer physiologischen Atemwegshomöostase nimmt die Atemwegsoberflächenflüssigkeit (engl. *airway surface liquid*, ASL) ein, die funktionell neben der mukoziliären Clearance von Pathogenen, auch eine Schutzbarriere vor endo- und exogenen Toxinen darstellt (34). Durch die periziliäre Absorption von Flüssigkeit (siehe 1.4) kommt es zu einer Viskositätszunahme der ASL, einer Anlagerung des Mukus an die Glykokalix bronchialer Epithelzellen und folglich zu einer erschwerten mukoziliären Clearance (35). Die Ansammlung der Atemwegsoberflächenflüssigkeit begünstigt somit Infektionen mit Pathogenen wie z.B. *Staphylokokkus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* und führt zu einem Zustand der chronischen pulmonalen Inflammation mit fibrotischem Remodeling und Destruktion des Lungenparenchyms als Folge (36). Der Hauptfokus von bisherigen Forschungsarbeiten zur pulmonalen Entzündungsreaktion bei CF lag neben der Untersuchung der gesteigerten Aktivierung der Inflammation, auch auf dem Verständnis der Mechanismen, die eine Reduktion der Inflammation bei CF verhindern. Genau diesen Mechanismen wird zunehmend eine Schlüsselrolle hinsichtlich des pulmonalen Krankheitsverlauf bei CF zugeordnet (34). In den nachfolgenden Abschnitten werden die Zusammenhänge der wichtigsten inflammatorischen Signalkaskaden und Regulatoren bei CF erläutert.

2.6 Schlüsselregulatoren der pulmonalen Inflammation bei zystischer Fibrose

Die chronische pulmonale Inflammation bei CF ist charakterisiert durch eine von neutrophilen Granulozyten dominierte Entzündungsreaktion. So beträgt der Anteil in der pulmonalen inflammatorischen Zellpopulation bei Gesunden 1%, bei CF-Erkrankten jedoch ca. 70% (36). Eine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten führt zu einer Freisetzung zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren wie Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies und folglich zu einer Verschiebung des Gleichgewichts von Proteasen und Antiproteasen (37) (Abbildung 5).

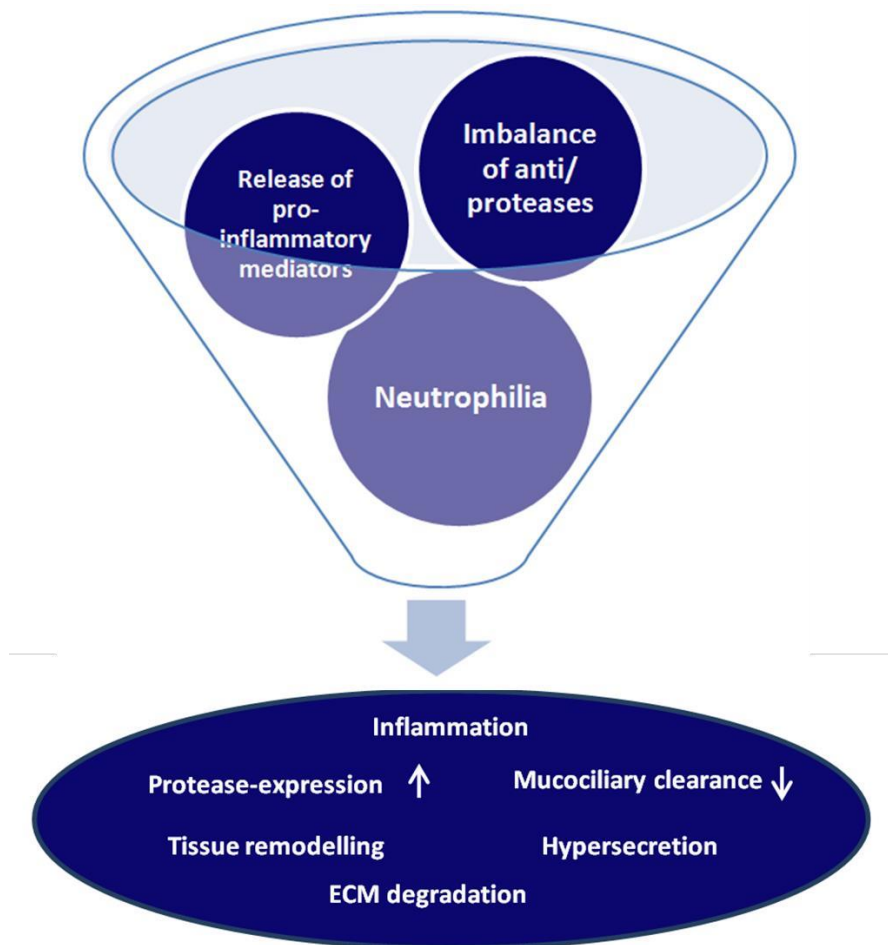


Abbildung 5: Schematische Darstellung zur Charakteristik der pulmonalen Inflammation bei CF.

Die wichtigste an der Lungenparenchymdestruktion bei CF beteiligte Protease ist die von neutrophilen Granulozyten sezernierte neutrophile Elastase (NE). Es ist bekannt, dass die hohe Konzentration an NE im Bronchialsekret von CF-Patienten sowohl Folge der vermehrten Anzahl von neutrophilen Granulozyten, als auch einer erhöhten Sezernierungsrate ist (38, 39) und langfristig zu einer zusätzlichen Abschwächung der mukoziliären Clearance sowie Zunahme des fibrotischen Umbaus der Atemwege führt (40).

In gesunden Lungen wird das zellhomöostatische Gleichgewicht vor allem durch Antiproteasen aufrechterhalten. Dadurch wird einer Gewebedestruktion durch überschießende Proteaseaktivität, wie sie bei CF-Patienten vorliegt, entgegengewirkt. Eine zentrale Bedeutung für ein ausgeglichenes Verhältnis von Proteasen und Antiproteasen hat der Serin-Protease-Inhibitor Elafin, der in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (41) und unter anderem als NE-Inhibitor fungiert. Des Weiteren ist Elafin auch an der Inhibition der proinflammatorischen *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B-cells* (NFκB) Signalkaskade beteiligt, deren Mediatoren in CF-Zelllinien vermehrt exprimiert werden (42, 43) und maßgeblich an der chronischen Inflammation und Gewebsdestruktion beteiligt sind (44).

NFκB selbst ist ein Transkriptionsfaktor, der neben immunologisch-regulativer Funktionen auch an der Expression von Mediatoren der Zellproliferation und der Apoptose beteiligt ist (45, 46). Im Zusammenhang mit CF konnte auf zellulärer Ebene gezeigt werden, dass die erhöhte Aktivität der NFκB-Signalkaskade mit einer vermehrten Expression von Interleukin-8 (IL-8) assoziiert ist (47), die maßgeblich an der chemotaktischen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im Rahmen des Inflammationsprozesses der CF-Lungenerkrankung beteiligt ist (44) und somit den Kreislauf der chronischen Inflammation bei CF weiter aktiviert. Ferner führt eine vermehrte Aktivierung der NFκB-Signalkaskade auch zu einer vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1β (IL-1β) (48). Neben der proinflammatorischen Wirkung von IL-1β als Induktor von *Akute-Phase-Proteinen*, aktiviert IL-1β selbst die NFκB-Kaskade und stellt somit einen positiven Feedback-Modulator der NFκB-Signaltransduktion dar (48).

Neben der Neutrophilie, der erhöhten Elastaseaktivität und der vermehrten Aktivierung der NFκB-Kaskade wird der pulmonale Krankheitsverlauf auch endogen durch modifizierende Gene (engl. *modifying genes*) beeinflusst. Eines dieser modifizierenden Gene kodiert das Zytokin *Transforming Growth Factor-beta 1* (TGFβ₁) welches entscheidend am Prozess der pulmonalen Inflammation und Fibrosierung involviert ist (34). TGF-β₁ kann eine Vielzahl zellulärer Funktionen zugeordnet werden und ist an Prozessen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt (49). Für eine ausgewogene Homöostase in den Lungen ist ein Gleichgewicht in der Konzentration von TGF-β₁ von zentraler Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass zu geringe Konzentrationen in der Embryogenese zu einer abnormalen Lungenstruktur führen und zu hohe Konzentrationen bei ausgereiften Lungen durch eine vermehrte Synthese von Kollagen und Dysregulation der extrazellulären Matrix den fibrotischen Umbau in der Lunge begünstigen (50).

Im Zusammenhang mit CF konnte in Studien gezeigt werden, dass die TGF-β₁Konzentration im Sputum von CF-Patienten im Vergleich zu Gesunden erhöht ist (51) und *high producer genotypes* mit einer beschleunigten Dysfunktion der Lunge bei CF assoziiert sind (52). Drumm et al. konnte in einer großen Multicenterstudie Mutationen im TGF-β₁-Gen (-509 und Codon-10-CC-Polymorphismen) als wichtigstes modifizierendes Gen für den pulmonalen Verlauf bei CF identifizieren (53). Ferner wurde nachgewiesen, dass hohe TGF-β₁-Spiegel in der CF-Lunge zu einer Abnahme der ASL und der ziliären Schlagfrequenz führen und mit einer Abnahme der CFTR-Aktivität, sowie mit einer Inhibition der Wirkung von CFTR-Modulatoren in humanen Bronchialepithelzellen einhergehen (54, 55).

Die hohe neutrophile Aktivität, das Ungleichgewicht zwischen Proteasen und ihren Inhibitoren, sowie die u.a. durch modifizierende Gene induzierte Freisetzung proinflammatorischer und

profibrotischer Mediatoren führt zu einer Vielzahl an pathogenen Effekten und sind in Abbildung 4 zusammenfassend dargestellt.

2.7 Grundlagen zur Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* bei zystischer Fibrose

Durch das Fehlen oder die Dysfunktion des CFTR-Kanals und der damit assoziierten Abnahme der mukoziliären *Clearance* werden pulmonale Infektionen bei CF begünstigt und stellen einen zentralen Risikofaktor für das Fortschreiten der CF-Lungenerkrankung dar. Die Keimbesiedlung der CF-Patienten ist je nach Altersklasse unterschiedlich, so sind im Kindes- und Jugendalter vor allem Besiedlungen mit *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* führend, ab dem Erwachsenenalter ist die chronische Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* (PA) am häufigsten vorzufinden (12) (Abbildung 6).

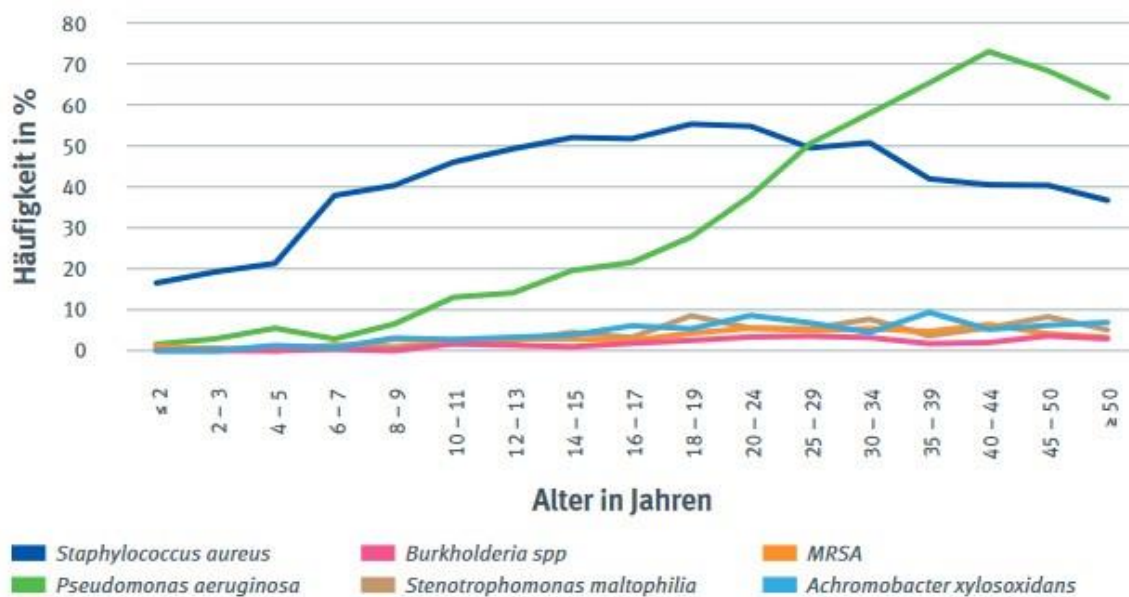


Abbildung 6: Häufigkeiten von chronischen Lungeninfektionen bei Mukoviszidose-Patienten mit mikrobiologischer Untersuchung aus dem deutschen Mukoviszidoseregister 2019 (12).

Die Infektion mit PA ist maßgeblich an dem Prozess der chronischen Inflammation bei CF beteiligt und gilt als das wichtigste Pathogen für den pulmonalen Krankheitsverlauf von CF-Patienten (56). Mit einer Prävalenz von über 80% im Erwachsenenalter stellt die chronische Infektion mit PA einen wesentlichen Risikofaktor für eine erhöhte Morbidität und Mortalität von Patienten mit CF dar (57-59). So führt die chronische PA-Infektion über einen massiven Anstieg von inflammatorischen Zellen wie polymorpher Leukozyten zu einer Aktivierung proinflammatorischer Zytokinkaskaden und schließlich zu einer Zunahme der chronischen

Inflammation der CF-Lunge (60). Wesentlich für die Pathogenität von PA sind dessen Virulanzfaktoren, zu denen u.a. Geißeln, Fimbrien und Typ-IV-Pili zählen, welche eine Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszelle ermöglichen (61). PA verfügt ferner über adaptive Mechanismen in den Atemwegen, die trotz Abwehrreaktionen des Wirtes und regelmäßiger antibiotischer Therapie ein Überleben möglich machen. Durch die Fähigkeit des Wachstums unter dem Schutz eines Biofilmes ist PA in der Lage, sich den inflammatorischen Abwehrmechanismen zu entziehen sowie eine antibiotische Therapie zu tolerieren (62). Neben der Mukostase in der CF-Lunge scheint auch das Fehlen des CFTR-Kanals selbst einen Einfluss auf die Anfälligkeit für PA-Infektionen zu haben. So konnte durch Luan et al. im Schweinemodell eine CFTR-abhängige Sekretion der ASL nachgewiesen werden, die bei Fehlen des CFTR-Kanals ausbleibt und somit die natürliche Schutzbarriere vor endo- und exogenen Toxinen abschwächt (63).

Hinsichtlich der Auswirkung einer chronischen PA-Infektion auf den Krankheitsverlauf von CF-Patienten konnte bereits im frühen Kindesalter in unterschiedlichen Studien ein deutlicher Zusammenhang zwischen PA-Infektion und Verschlechterung des klinischen Phänotyps nachgewiesen werden. So zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen einer chronischen PA-Infektion und einer progressiven Verschlechterung der Lungenfunktion als auch einer signifikanten Gewichtsabnahme (64, 65). Ferner wiesen Patienten mit chronischer PA-Infektion eine 2,6-fach erhöhte 8-Jahresmortalität auf (65). Während eine chronische PA-Infektion somit ein relevanter Risikofaktor für einen progressiven Krankheitsverlauf bei CF ist, sind viele der mechanistischen Zusammenhänge bislang unklar und Gegenstand aktueller Studien.

2.8 Bedeutung von Sputum-Biomarkern bei zystischer Fibrose

Im Rahmen der Verlaufsdagnostik bei chronischen Erkrankungen ist die regelmäßige Reevaluation von verfügbaren klinischen Parametern ein zentraler Bestandteil und hat sich bei zahlreichen Krankheitsbildern als Standarddiagnostik etabliert. Im klinischen Alltag stellen die standardisierte mikrobiologische Erregerdiagnostik, die Lungenfunktionsdiagnostik (wie z.B. Spirometrie, Bodyplethysmographie, multipebreath-wash-out (MBW)), sowie die Bestimmung von Inflammationsparameter im Serum die Grundlagen des Verlaufsmonitorings von CF-Patienten dar. Mit dem steigenden Lebensalter und der verbesserten Lebenserwartung aufgrund der immer früher einsetzenden symptomatischen und teilweise auch kausalen Therapie, hat die Erforschung neuer sensitiver Parameter zur Verlaufsbeurteilung bei CF in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Hierzu gehören sogenannte

Biomarker, biologische Merkmale, die definitionsgemäß objektiv messbar und beurteilbar sein sollen und als Indikator von physiologischen oder pathologischen Prozessen sowie als möglicher Verlaufsparemeter pharmakologischer Therapien interpretiert werden können (66).

Das Monitoring der pulmonalen Inflammation ist für die Indikationsstellung einer therapeutischen Intervention bei CF von zentraler Bedeutung und stellt vor allem bei chronisch PA-Infizierten eine besondere Herausforderung dar. Neben den etablierten Parametern sind weitere zuverlässige systemische Inflammationsmarker zur Beurteilung des pulmonalen Inflammationsgeschehens wünschenswert. Aufgrund der Unspezifität des C-reaktiven Proteins (CrP) vor allem bei chronisch PA-infizierten CF-Patienten hat sich die zusätzliche Bestimmung von PA- Antikörpern gegen alkalische Protease, Elastase und Exotoxin A von PA zur Beurteilung des Infektionsverlaufs etabliert (67). Aufgrund der limitierten Aussagekraft von systemischen Serummarkern hinsichtlich der lokalen pulmonalen Inflammation, kommt der Untersuchung von inflammatorischen Mediatoren im Sputum eine besondere Bedeutung zu. Bislang wurde vor allem die NE in zahlreichen klinischen CF-Studien in der bronchoalveolären Lavage (BAL) und im Sputum von CF-Patienten untersucht (68). So ist eine hohe NE-Aktivität in der BAL von CF-Patienten mit einem vermehrten Auftreten von Bronchiektasien, einem schlechteren Ansprechen der antibiotischen Therapie bei pulmonaler Exazerbation, sowie einer Verschlechterung der Lungenfunktion assoziiert (69, 70). Ferner geht eine eingeschränkte Lungenfunktion mit einer erhöhten Konzentration von Interleukin-1 β und Interleukin-8 sowie einer erhöhten Anzahl an Neutrophilen einher (71).

2.9 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Die gesteigerte Expression von neutrophilen Granulozyten, das Ungleichgewicht zwischen Proteasen und ihren Inhibitoren sowie die u.a. durch modifizierende Gene induzierte Freisetzung proinflammatorischer und profibrotischer Mediatoren sind maßgeblich an dem Prozess der pulmonalen Inflammation bei CF beteiligt.

Zuverlässige Biomarker im Sputum von CF-Patienten zur Überwachung der pulmonalen Inflammation und des Krankheitsverlaufs der CF-Lungenerkrankung gewinnen zunehmend an Bedeutung. Während PA-Infektionen mit einer Verschlechterung des klinischen Outcomes und einer erhöhten Mortalität verbunden sind, ist die Vielfalt und das Zusammenspiel der im Rahmen der pulmonalen Inflammation involvierten Mediatoren bislang wenig verstanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, den Zusammenhang und Einfluss von PA-Infektion auf das Gleichgewicht von Proteasen und Antiproteasen, auf die inflammatorische

Zytokinausschüttung, auf TGF- β 1 als *genetic modifier* und den NF κ B-Signalweg im Sputum von CF-Patienten zu untersuchen.

3. Originalpublikation

Folgendes Manuskript ist im *European Respiratory Journal Open Research Volume 7 2021* (<https://doi.org/10.1183/23120541.00636-2020>) als Originalartikel publiziert worden.

Reduced neutrophil elastase inhibitor elafin and elevated TGF β ₁ are linked to inflammatory response in sputum of CF patients with *Pseudomonas aeruginosa*

Jan C. Thomassen^{1,2}, Tobias Trojan¹, Maxine Walz¹, Christina Vohlen^{2,3}, Gregor Fink², Ernst Rietschel¹, Miguel A. Alejandro Alcazar^{1,2,3} and Silke van Koningsbruggen-Rietschel¹

¹CF Center, Children's Hospital, Faculty of Medicine, University of Cologne, Germany;

²Translational Experimental Pediatrics - Experimental Pulmonology, Children's Hospital, Faculty of Medicine, University of Cologne, Germany;

³Center of Molecular Medicine Cologne (CMMC), Faculty of Medicine, University of Cologne, Germany

Corresponding author: Jan C. Thomassen
Cystic Fibrosis Center
Department of Pediatrics and Adolescent Medicine
Faculty of Medicine
University of Cologne
Kerpener Str. 62
50937 Cologne, Germany
Tel: +49-221-478-3798
Fax: +49-221-478-3330
E-mail: Jan.thomassen@uk-koeln.de

Reduced neutrophil elastase inhibitor elafin and elevated transforming growth factor- β_1 are linked to inflammatory response in sputum of cystic fibrosis patients with *Pseudomonas aeruginosa*

Jan C. Thomassen^{1,2}, Tobias Trojan¹, Maxine Walz¹, Christina Vohlen^{2,3}, Gregor Fink², Ernst Rietschel¹, Miguel A. Alejandre Alcazar^{1,2,3} and Silke van Koningsbruggen-Rietschel¹

¹CF Center, Children's Hospital, Faculty of Medicine, University of Cologne, Cologne, Germany. ²Translational Experimental Pediatrics – Experimental Pulmonology, Children's Hospital, Faculty of Medicine, University of Cologne, Cologne, Germany. ³Center of Molecular Medicine Cologne, Faculty of Medicine, University of Cologne, Cologne, Germany.

Corresponding author: Jan C. Thomassen (Jan.thomassen@uk-koeln.de)



Shareable abstract (@ERSpublications)

P. aeruginosa infection is linked to an imbalance of NE and NE inhibitor elafin, and increased TGF- β_1 sputum levels. Inhibition of NE and TGF- β_1 are promising therapeutic strategies in future CF therapy <https://bit.ly/3emel0u>

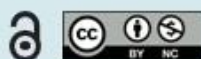
Cite this article as: Thomassen JC, Trojan T, Walz M, et al. Reduced neutrophil elastase inhibitor elafin and elevated transforming growth factor- β_1 are linked to inflammatory response in sputum of cystic fibrosis patients with *Pseudomonas aeruginosa*. *ERJ Open Res* 2021; 7: 00636-2020 [DOI: 10.1183/23120541.00636-2020].

Copyright ©The authors 2021

This version is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License, 4.0. For commercial reproduction rights and permissions contact permissions@ersnet.org

This article has supplementary material available from openres.ersjournals.com

Received: 2 Sept 2020
Accepted: 19 April 2021



Abstract

Research question Pulmonary disease progression in patients with cystic fibrosis (CF) is characterised by inflammation and fibrosis and aggravated by *Pseudomonas aeruginosa* (Pa). We investigated the impact of Pa specifically on: 1) protease/antiprotease balance; 2) inflammation; and 3) the link of both parameters to clinical parameters of CF patients.

Methods Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), interleukin (IL)-1 β , IL-8, neutrophil elastase (NE) and elastase inhibitor elafin were measured (ELISA assays), and gene expression of the NF- κ B pathway was assessed (reverse transcriptase PCR) in the sputum of 60 CF patients with a minimum age of 5 years. Spirometry was assessed according to American Thoracic Society guidelines.

Results Our results demonstrated the following: 1) NE was markedly increased in Pa-positive sputum, whereas elafin was significantly decreased; 2) increased IL-1 β /IL-8 levels were associated with both Pa infection and reduced forced expiratory volume in 1 s, and sputum TGF- β_1 was elevated in Pa-infected CF patients and linked to an impaired lung function; and 3) gene expression of NF- κ B signalling components was increased in sputum of Pa-infected patients, and these findings were positively correlated with IL-8.

Conclusion Our study links Pa infection to an imbalance of NE and NE inhibitor elafin and increased inflammatory mediators. Moreover, our data demonstrate an association between high TGF- β_1 sputum levels and a progress in chronic lung inflammation and pulmonary fibrosis in CF. Controlling the excessive airway inflammation by inhibition of NE and TGF- β_1 might be promising therapeutic strategies in future CF therapy and a possible complement to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) modulators.

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is the most common lethal autosomal recessive disease, caused by mutations and subsequent absence/dysfunction of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). While CF affects multiple organs, the majority of life-limiting sequelae are related to progressive lung disease caused by bronchial inflammation, bacterial infection and lung matrix remodelling resulting in continuous decline of lung function [1]. *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) is one of the most prevalent microorganisms in CF, chronically infecting the lungs of 50–60% of adult CF patients already early in life [2–4]. Persistence

of Pa over years substantially contributes to rapid progression of lung disease and higher mortality and morbidity in CF patients [5, 6]. While Pa infection has been widely recognised as an adverse pulmonary outcome parameter, the mechanisms and potential biomarkers linking Pa to these devastating lung changes over time remain elusive.

Pa infection aggravates CF-related lung disease by adversely affecting the impaired mucociliary clearance and increasing influx of inflammatory cells. These pathophysiological changes result in a release of cytokines, growth factors and proteases, ultimately leading to a protease/antiprotease imbalance [7–9]. Various clinical and experimental studies have shown that protease activity is mechanistically important in CF-related lung matrix remodelling [10, 11]. In particular, neutrophil elastase (NE), released by activated neutrophils, the most prominent inflammatory cell type, is one of the main proteases inducing structural lung damage in CF by impairing mucociliary clearance and mediating proinflammatory activity by degrading elastic fibres [10–16]. Recent studies in CF confirmed a strong association between high NE activity in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and the onset and progression of structural abnormalities including early bronchiectasis and future lung function decline as well as reduced treatment response in pulmonary exacerbations [17, 18]. There is only one study, carried out in a limited number of CF patients, analysing NE and elafin concentrations in sputum which provides evidence that elafin is cleaved by its cognate enzyme NE [19].

There is a growing body of evidence that inflammatory pathways in CF are also extensively influenced by genetic modifiers, notable amongst these being transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1). TGF- β_1 is not only a key regulator of bronchial inflammation, pulmonary fibrosis [20] and cell proliferation and cell differentiation [21], but has also been shown to inhibit CFTR expression [22]. Moreover, matrix remodelling and local hypoxia as a result of increased mucus deposition [23, 24] promote the release of proinflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 β , and activation of inflammatory pathways [11].

Reliable sputum biomarkers for therapeutic monitoring and/or predicting the clinical course of CF are gaining importance. While Pa has been shown to be closely related to the clinical outcome and survival of CF patients [25, 26], the variety and coherences of involved inflammatory mediators are poorly understood, and most studies have a limited number of patients. Therefore, we investigated the link between Pa infection and the protease/antiprotease imbalance, inflammatory cytokines, TGF- β_1 as a genetic modifier and the NF- κ B signalling pathway in sputum inflammatory cells.

Material and methods

Study population

We investigated 60 patients with a confirmed diagnosis of CF according to the consensus guidelines of the Cystic Fibrosis Foundation [27]. Further inclusion criteria for this study were a minimum age of 5 years and the capability to produce and expectorate sputum. Patients with current pulmonary exacerbation or acute respiratory infection were excluded. Based on the Leeds criteria, Pa infection in our cohort is defined by three positive cultures over 12 months with at least a 1-month interval between the samples. Patients who underwent successful Pa eradication (three negative cultures in a row with at least a 1-month interval between the samples) were considered negative. All CF patients infected with Pa were being treated with cycled inhaled antibiotics.

Ethics, consent and permissions

Human guidelines of good clinical practice and the declaration of Helsinki (1964) and Edinburgh (2000) were followed in the conduct of the trial. Ethical approval was obtained from the Medical Ethical Committee of the University Hospital Cologne (approval number 12-168). All parents and all patients older than 8 years of age provided written informed consent.

Sputum analysis

Sputum was induced by inhalation of hypertonic saline during a routine physiotherapist session at regular outpatient visits. Sputum processing was performed according to the standard operating procedure of the TDN (Therapeutic Drug Development Network, USA). Sputum was processed within 1 h of collection and sputum plugs segregated from possible saliva. The sputum samples were diluted in 9:1 (weight to volume) phosphate-buffered saline (D-PBS), filtered through 100 μ m and 40 μ m mesh, and centrifuged for 10 min at 260 \times g at 6°C. Supernatants were stored at -80°C for further analysis; cell suspensions were concentrated by cytopsin (1 \times 10⁶ cells mL⁻¹) and stored at -20°C.

Elastase and elafin concentrations in sputum were determined by specific ELISA assays (EnzChek Elastase Assay Kit, Molecular Probes Europe, Leiden, Netherlands; Elafin/Skaly Human ELISA-kit, abcam).

Cambridge, UK). Proinflammatory cytokine concentrations in the sputum were assessed by using a human inflammatory cytokine ELISA-kit (BD Cytometric Bead Array Humane Inflammatory Cytokine Kit, San Jose, CA, USA). TGF- β_1 levels in sputum of all patients were determined using the TGF-specific ELISA-kit (Quantikine ELISA Human TGF- β_1 , R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). All assays and kits were performed according to the manufacturer's protocol.

The different measurements of our sputum analysis have been done in succession with priorities given to the measurement of TGF- β_1 , IL-1 β and IL-8. For some patients the amount of sputum sample was inadequate to assess the levels of all the inflammatory mediators explored in this study; hence, the number of investigated samples varied among different measurements.

RNA isolation and quantitative reverse transcriptase PCR

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), and quantitative reverse transcriptase PCR was performed using the 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) [28]. The relative amount of the specific mRNA was normalised to β -actin. Primers were designed using Primer Express Software v3.0.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); primer pairs are listed in supplementary table S1.

Spirometry

Spirometric measurements were assessed prior to any study intervention according to the American Thoracic Society guidelines [29] by the use of Master Screen Body (Jaeger, Heidelberg, Germany) and SentrySuite™ version 2.19 software (Carefusion, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). For all spirometric measurements the Global Lung Function Initiative's reference equations were used (GLI-2012). Maximum values of forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) % predicted were used for analysis, defined as FEV₁% of the patient divided by the average FEV₁% in the population for any person of similar age, sex and body composition.

Statistical analysis

Collected data in the text are reported as mean \pm SD. To compare datasets from two subgroups, we used an unpaired t-test for independent samples when the frequency distribution was normal, or the Mann–Whitney U-test when the distribution was not normal. Cytokine levels were correlated by Pearson or Spearman correlation depending on their distribution. The strength of correlation is defined depending on the correlation coefficient r ($r=0.3$ – 0.5 =weak, $r=0.5$ – 0.7 =moderate, $r>0.7$ =strong). A p -value <0.05 was considered as statistically significant; statistical analysis was performed using Prism 7 software package (GraphPad 7, San Diego, CA, USA). All results were correlated to age, body mass index (BMI), FEV₁ values and status of Pa infection by using Pearson or Spearman correlation depending on their distribution.

Results

Clinical data of study population

A cohort of 60 CF patients was recruited based on our inclusion and exclusion criteria. As demonstrated in table 1, the mean \pm SD age was 21.2 \pm 12.2 years; 51.9% were male; 41 patients were Pa-negative (68.3%) whereas 19 patients were infected with Pa (31.7%). The FEV₁ values were reduced in the subgroup of Pa-positive (59.5 \pm 25.0% pred) in comparison to Pa-negative patients (79.8 \pm 22.7% pred), as well as in the subgroup of patients aged 18 years and older (63.8 \pm 23.8% pred). The average BMI of our cohort was 19.2 kg m⁻². Regarding age, BMI, sex and CFTR mutation, we detected no significant relation to the measured inflammatory mediators.

Increased NE and reduced elafin concentration in soluble CF sputum in Pa-positive CF patients

To determine if poor clinical outcome of Pa-colonised CF patients is linked to an imbalance of NE and its inhibitor elafin, we assessed both markers in soluble CF sputum. Concentrations of NE were significantly higher in Pa-positive CF sputa when compared with Pa-negative sputa (211.2 \pm 31.9 ng mL⁻¹ versus 359.1 \pm 65.8 ng mL⁻¹, $p<0.05$) (figure 1a). Elafin is primarily expressed by bronchial epithelial cells and inhibits NE. We found that elafin concentration was significantly lower in sputa of Pa-positive CF patients in comparison to sputa of Pa-negative patients (16 311 \pm 2184 pg mL⁻¹ versus 6975 \pm 943 pg mL⁻¹, $p<0.001$) (figure 1b), suggesting a NE/elafin imbalance in Pa-positive CF lungs, favouring elastic fibres degradation and fibrotic matrix remodelling.

Sputum IL-1 β and IL-8 are linked to decline of lung function in Pa-positive CF patients

To link Pa colonisation to the release of proinflammatory cytokines, IL-1 β and IL-8 were determined in CF sputum samples. We detected a significant increase of IL-1 β (+249.4%, $p<0.001$) and IL-8 concentrations (+218.4%, $p<0.0001$) in sputum of Pa-positive CF patients (IL-1 β : 1278 \pm 314 versus 3187 \pm 407 pg mL⁻¹;

TABLE 1 Demographics of study population

Clinical parameters	Mean±sd or n (%)
Age years	21.2±12.2
<18 years	25 (41.7)
>18 years	35 (58.3)
Female	29 (48.3)
Male	31 (51.7)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> infection	19 (31.6)
FEV ₁ %	73.4±25.1
Pa infected	59.5±25.0
Pa negative	79.8±22.7
<18 years	86.8±20.7
>18 years	63.8±23.8
CFTR mutations	
F508del homozygous	32 (53.3)
F508del heterozygous	21 (35.0)
Other mutations	7 (11.7)

FEV₁: forced expiratory volume in 1 s; CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

IL-8: 2804±465 versus 6124±483 pg mL⁻¹) (figure 2). Sputum IL-1 β and IL-8 concentrations were >3-fold and 1.8-fold, respectively, higher in patients with FEV₁ <80% when compared to patients with FEV₁ \geq 80% (IL-1 β : FEV₁ \geq 80% versus FEV₁ <80%: 902±226 pg mL⁻¹ versus 2899±416 pg mL⁻¹, p<0.0001; IL-8: FEV₁ \geq 80% versus FEV₁ <80%: 2811±553 pg mL⁻¹ versus 5021±548 pg mL⁻¹, p<0.01) (figure 3). Finally, we determined a strong positive correlation between IL-1 β and IL-8 levels in our cohort of Pa-positive and Pa-negative CF patients (r=0.7645; p<0.0001) (figure 4).

Linking concentrations of TGF- β_1 to clinical parameters and inflammatory cytokines in sputum of CF patients

Since TGF- β_1 has been identified as a genetic modifier for CF lung disease, we assessed TGF- β_1 concentrations in sputa of CF patients with or without Pa colonisation. High sputum TGF- β_1 was intimately linked to both Pa colonisation and to lower FEV₁ values at the timepoint of sample collection. Specifically, sputum TGF- β_1 was significantly higher in Pa-positive CF patients compared to Pa-negative CF patients (Pa-negative: 84.5±11.7 pg mL⁻¹, Pa-positive: 173.8±24.0 pg mL⁻¹, p<0.001) (figure 5a). Sputum TGF- β_1 levels were significantly higher in CF patients with reduced FEV₁ values <80% pred than in patients with FEV₁ values \geq 80% pred (FEV₁ \geq 80%: 85.7±14.2 pg mL⁻¹, FEV₁ <80%: 139.7±18.9 pg mL⁻¹, p<0.05) (figure 5b). Moreover, we tested the correlation between TGF- β_1 and the proinflammatory cytokines.

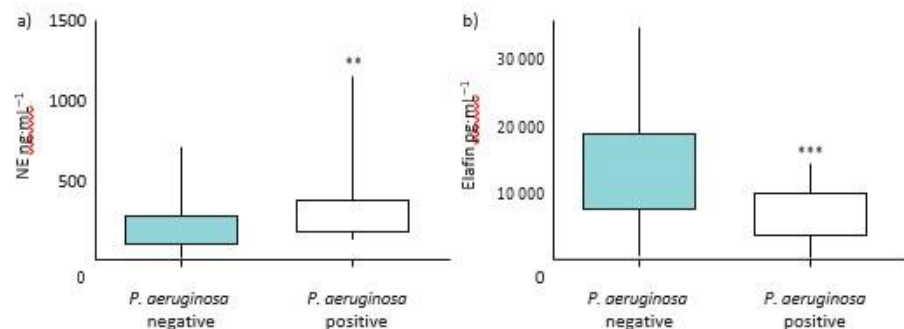


FIGURE 1 Assessment of a) neutrophil elastase (NE) concentrations (ng mL⁻¹) and b) elafin concentrations (pg mL⁻¹) in sputum of cystic fibrosis (CF) patients, related to *Pseudomonas* infection: *P. aeruginosa*-negative CF patients (n=32) and *P. aeruginosa*-positive CF patients (n=16). Data presented as median and interquartile range; Mann–Whitney U-test performed. **: p<0.01; ***: p<0.001.

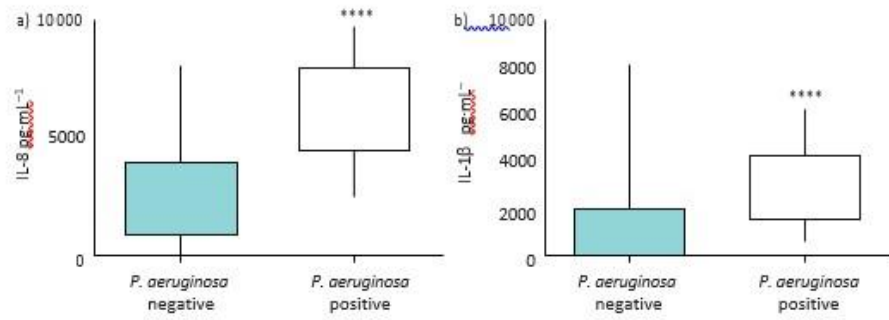


FIGURE 2 a) Interleukin (IL)-8 and b) IL-1 β concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in sputum of cystic fibrosis (CF) patients, related to *Pseudomonas* infection: *P. aeruginosa*-negative CF patients (n=34) and *P. aeruginosa*-positive CF patients (n=18). Data presented as median and interquartile range, Mann–Whitney U-test performed. ****: $p < 0.0001$.

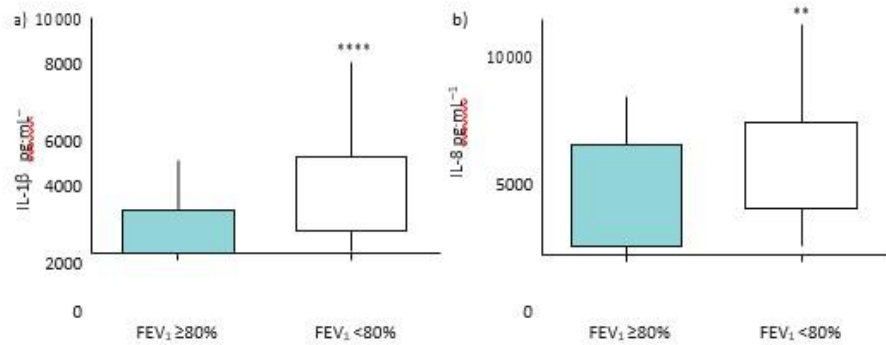


FIGURE 3 a) Interleukin (IL)-1 β and b) IL-8 concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) related to forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) values: elevated IL-1 β and IL-8 levels were detected in cystic fibrosis (CF) patients with FEV₁ $< 80\%$ (n=27) compared to CF patients with FEV₁ values $\geq 80\%$ (n=25). Data presented as median and interquartile range; Mann–Whitney U-test performed. **: $p < 0.01$; ****: $p < 0.0001$.

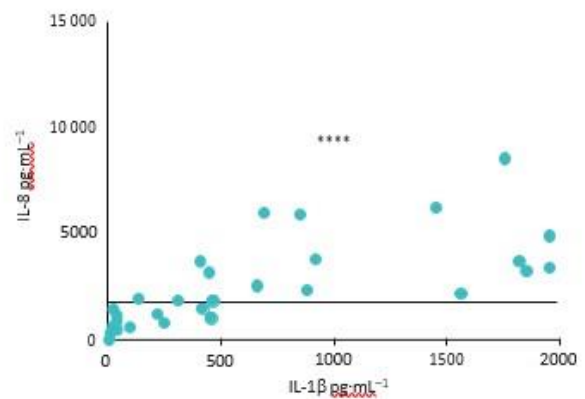


FIGURE 4 Pearson correlation between interleukin (IL)-1 β and IL-8 concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in sputum of cystic fibrosis patients (n=52). A positive correlation between IL-1 β and IL-8 levels was detected ($r=0.763$; ****: $p < 0.0001$).

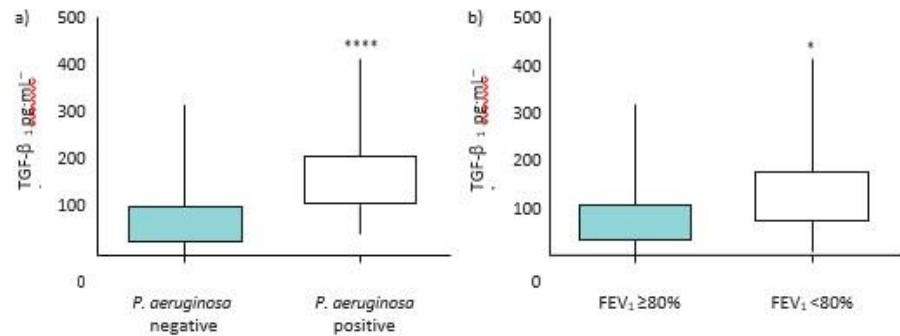


FIGURE 5 Assessment of sputum transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) concentrations (pg mL^{-1}) in cystic fibrosis patients by specific TGF- β_1 ELISA. Correlation to a) *Pseudomonas aeruginosa* colonisation (*P. aeruginosa*-negative: n=33; *P. aeruginosa*-positive: n=17) and b) forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) % predicted (FEV₁ \geq 80%: n=23; FEV₁ <80%: n=27). Data presented as median and interquartile range; Mann-Whitney U-test performed. *: $p < 0.05$; ****: $p < 0.0001$.

Indeed, both IL-1 β and IL-8 showed a significant positive correlation to TGF- β_1 levels in sputum (IL-1 β : $r = 0.707$; $p < 0.0001$; IL-8: $r = 0.670$; $p < 0.0001$) (figure 6a and b).

Expression of the NF- κ B signalling cascade in sputum cells of CF patients is regulated by Pa

The above results linking Pa to increased inflammatory cytokines and higher concentrations of TGF- β_1 in lungs of CF patients led us to the question whether the expression of inflammatory signalling pathways in sputum cells is differentially regulated by Pa colonisation in CF lungs. To this end, we measured gene expression of mediators of the NF- κ B signalling cascade and detected a significant increase in mRNA of IKK α , IL-6, p50 and p65 in sputum samples of patients with Pa infection (figure 7). Furthermore, we found a significant positive weak correlation between high IL-8 levels in sputum and the gene expression of p50 ($r = 0.402$; $p < 0.01$) and p65 ($r = 0.356$; $p < 0.05$) as markers of the NF- κ B signalling cascade (figure 8).

Discussion

The present study shows that the reduction of lung function in Pa-positive CF lungs is intimately linked to an imbalance of proteases (sputum NE) and antiproteases (sputum elafin), and increased concentrations of sputum TGF- β_1 and proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-8), which might adversely affect the inflammation and remodelling of CF lungs. An activation of NF- κ B signalling in sputum cells, presumably neutrophils, might be triggering these processes.

Infections with Pa in CF patients are associated with significantly poorer outcomes [30]. While improvement of life expectancy has been mainly attributed to an early and aggressive treatment of Pa

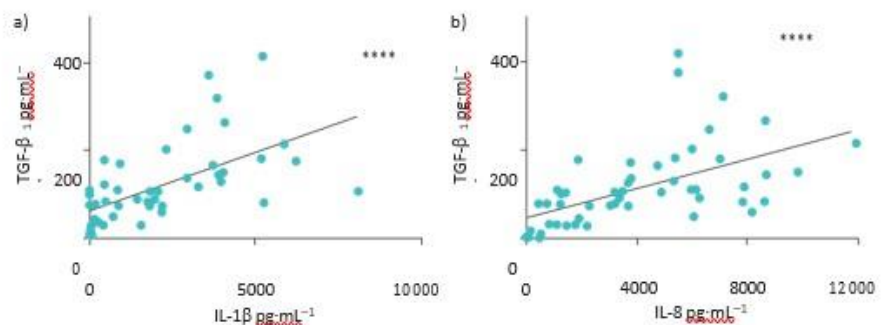


FIGURE 6 Spearman correlation between concentrations of sputum transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) (pg mL^{-1}) and proinflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β and IL-8 in cystic fibrosis patients (n=50). Positive correlations between a) IL-1 β and TGF- β_1 levels ($r = 0.707$; ****: $p < 0.0001$) and b) IL-8 and TGF- β_1 levels ($r = 0.670$; ****: $p < 0.0001$).

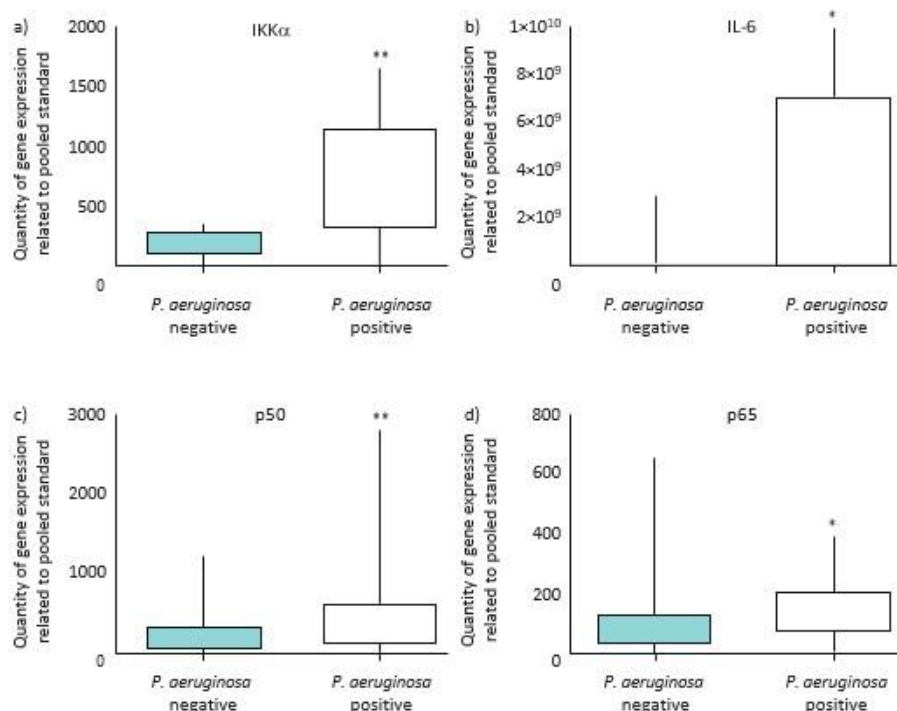


FIGURE 7 Gene expression of NF- κ B signalling cascade mediators in cystic fibrosis sputum cells of 43 patients: p50, p65, IKK α and interleukin (IL)-6 levels were determined by quantitative reverse transcriptase PCR. Significantly elevated mRNA expression of mediators of the NF- κ B signalling cascade: a) IKK α , b) IL-6, c) p50 and d) p65. Data presented as median and interquartile range; Mann-Whitney U-test performed. *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*. *: p<0.05; **: p<0.01.

infections [31], the initial underlying processes triggering a persistent inflammation and leading to lung injury and destruction remain elusive. Several studies have investigated proinflammatory markers in sputum of CF patients [16, 32], but only a few reports addressed the impact of Pa colonisation on disease progression in CF [25, 26]. In our present study, correlation of inflammatory sputum markers with clinical parameters showed that colonisation with Pa was not only significantly related to higher inflammatory sputum markers, but also to reduced lung function. Specifically, we found that Pa is linked to higher concentrations of IL-1 β and IL-8, which in turn were strongly correlated with increased sputum TGF- β ₁. Both inflammatory cytokines IL-1 β and IL-8 as well as TGF- β ₁ induce inflammation and lung matrix remodelling favouring fibrosis, thereby contributing to irreversible structural lung changes and reduced

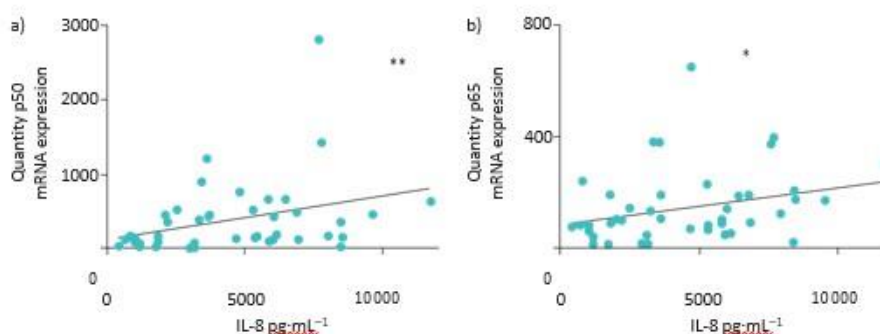


FIGURE 8 Spearman correlations between level of interleukin (IL)-8 and quantitative mRNA expression of p50 and p65. Significant positive correlations between IL-8 levels and quantity of mRNA expression of the NF- κ B signalling proteins a) p50 (r=0.402; **, p<0.01) and b) p65 (r=0.356; *, p<0.05).

lung function [21]. Moreover, inflammatory markers have been identified as risk factors for lung function decline in CF or other chronic lung diseases independent of Pa [33].

Pa elicits massive neutrophil influx in part by release of pyocyanin [34] and modulates neutrophilic myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in CF lungs [35]. Here, we show a marked activation of gene expression of NF- κ B signalling in inflammatory sputum cells of Pa-colonised CF patients, suggesting an activation of inflammatory cells, presumably neutrophils, promoting thereby the release of inflammatory cytokines and matrix-remodelling proteases. In parallel, increased sputum NE, a biomarker for monitoring CF lung disease, was significantly related to Pa. Elevated activity of NE is associated with bronchiectasis in CF [36], is predictive of future lung function decline [16] and is related to treatment response in pulmonary exacerbations [20]. Furthermore, recent studies in CF demonstrated a strong association between high NE activity in BAL fluid and the onset and progression of structural abnormalities including early bronchiectasis [18]. Previous *in vitro* experiments confirm this notion by demonstrating an inhibitory effect of inhaled anti-*Pseudomonas* antibiotic treatment on the activity of NE [37], indicating thereby an activating effect on NE by Pa. This enzyme is pivotal to lung damage because it releases growth factors, e.g. TGF- β_1 , and degrades elastic fibres. Elastin fibre breakdown products are highly proinflammatory, promoting the recruitment of activated inflammatory cells [38]. Increased release of NE by recruited lung neutrophils and elastin peptide fragments are related to chronic lung diseases, such as pulmonary arterial hypertension [39] or pulmonary fibrosis [40].

Inhibition of elastase by lung endogenous elafin, which is primarily produced in bronchial epithelial cells, mitigates lung destructive processes [41, 42]. Measurement of elafin in our cohort showed a marked decrease of elafin in CF lungs colonised with Pa, suggesting a suppressive effect of Pa on elafin expression *in vivo*. Interestingly, GUYOT *et al.* [19] demonstrated that elafin is proteolytically cleaved by its cognate enzyme NE in BAL fluid of CF patients infected with Pa. The confirmed elafin deficiency as seen in our cohort might be the result of an impaired bronchial epithelial cell homeostasis in Pa-positive lungs. Our present findings indicate a relevant imbalance of proteases and antiproteases in CF lungs. While elafin deficiency in CF lungs with Pa may relate to increased NE, other functions of elafin need to be considered. For example, prior studies demonstrated a marked inhibitory effect of elafin on NF- κ B and TGF- β_1 activation in the lung [16, 42]. Thus, deficient release of elafin may promote activation of NF- κ B and TGF- β_1 signalling and aggravate lung injury by triggering inflammatory response and lung matrix remodelling, respectively.

Pa and lung inflammation are important in the clinical course of CF [25, 26]. The present study shows a marked increased expression of components of the NF- κ B pathway in sputum cells and elevated concentrations of sputum IL-1 β and IL-8. These findings were supported by *in vitro* experiments showing that exposure of CF bronchial epithelial IB3-1 cells or CF nasal epithelial cells to Pa upregulates the gene expression of IL-1 β , IL-8 or NF- κ B activity [43]. Alternatively, the lack of inhibitory effect of elafin on NF- κ B signalling could in part underlie the activation of inflammatory NF- κ B signalling and thereby enhance the expression of IL-1 β and IL-8 [16]. Additionally, excessive NE as a result of elafin deficiency could promote IL-8 expression, neutrophil recruitment and a self-perpetuating cycle of neutrophil-mediated inflammation [11]. Interestingly, CARRABINO *et al.* [44] demonstrated that stimulation of Pa-exposed CF nasal epithelial cells with IL-1 β increased IL-8 expression. This strong link between IL-1 β and IL-8 may explain the correlation of both cytokines in our cohort.

The intimate link between IL-1 β /IL-8 and reduced lung function (lower FEV₁ values) does not only emphasise the important functional role of Pa in the clinical course of CF, but also the additional need for pharmacological approaches targeting specific inflammatory mediators. Initial investigations using IL-1 β receptor inhibitor (Anakinra) demonstrated an amelioration of the inflammasome-dependent inflammation in human CF-mutated bronchial epithelial cells [45]. Previous studies demonstrated that IL-8 serves as first line of host defence against invading microorganisms [46] and as a potent chemoattractant for neutrophils. Moreover, NF- κ B-mediated IL-8 and IL-1 β chemokine secretion and neutrophil influx are prominent early in CF disease progression [47]. Our study identifies Pa colonisation as a possible aggravator for both activation of NF- κ B signalling and related increase of IL-1 β and IL-8.

TGF- β_1 is a pleiotropic growth factor, involved in the regulation of cell differentiation and survival, inflammatory response and fibrotic processes of chronic lung diseases [19]. Furthermore, recent studies identified TGF- β_1 as an important genetic modifier in the lung pathobiology of CF. For example, inhibition of CFTR expression has been shown to be one mechanism by which TGF- β_1 modulates pathomechanisms in CF. However, it remains unclear if the changes in proteases/antiproteases and the increase of inflammatory cytokines in Pa-positive sputum samples are linked to impaired mucociliary clearance, or if

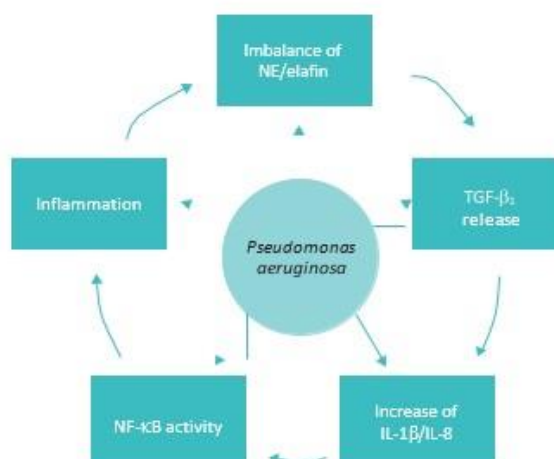


FIGURE 9 Simplified presentation of the vicious circle of chronic inflammation in cystic fibrosis (CF) as a result of high neutrophilic activity, disruption of the homeostatic protease/antiprotease balance and microbial infection with *P. aeruginosa* in the CF lung causing chronic inflammatory lung disease and pulmonary fibrosis. NE: neutrophil elastase; TGF- β_1 : transforming growth factor- β_1 ; IL: interleukin.

an elevation in active TGF- β_1 aggravates these processes and therefore serves as a potential biomarker. Our results demonstrate a correlation between high sputum TGF- β_1 in CF patients and the degree of pulmonary inflammation, as well as an association to Pa colonisation and lower FEV₁ values. These findings indicate the possible role of TGF- β_1 as a sputum biomarker for disease progression in CF.

This study has some limitations. It is well known that longer duration of Pa colonisation is associated with CF lung disease progression [48], but our study did not evaluate the duration of Pa colonisation regarding measured mediators. Moreover, for some patients the amount of sputum sample was inadequate to assess the levels of all the inflammatory mediators explored in this study, and lack of associations between potential confounders may be related to the smaller sample size for some of the inflammatory mediators. In addition, investigating the influence of an inhibition of elafin and TGF- β_1 on the inflammatory response in the CF lung would be of interest. Therefore, further cell culture studies are needed and are planned by our working group for the future.

In conclusion, our results demonstrate a significant association between high inflammatory sputum mediators and Pa infection and confirm the importance of an early eradication therapy for newly colonised patients as well as an aggressive chronic treatment of Pa in already chronically infected CF patients. Our findings also demonstrate the important impact of Pa infection on NE/elafin imbalance and hyperinflammation by the release of TGF- β_1 and increase of IL-1 β /IL-8 as well as NF- κ B activity, all ultimately resulting in progress of chronic inflammatory lung disease and pulmonary fibrosis (figure 9). Reducing the excessive airway inflammation by inhibition of NE and TGF- β_1 might be a promising therapeutic strategy in future CF therapy and a promising complement to CFTR modulators.

Acknowledgements: Research participants and their families for giving up time for the study; the staff of the Department of the CF Center of the Children's University Hospital Cologne, Germany, for their assistance in recruiting the cohort.

Conflict of interest: None declared.

References

- 1 De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies of cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 2016; 4: 662–674.
- 2 Zolin A, Naehrlich L, van Rees J et al. ECFSPR Annual Report 2015. https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-images/working-groups/ecfs-patient-registry/2015_At_A_Glance_Guide_Nov2017.pdf Date last updated and accessed: Nov 2017.

- 3 Burkett A, Vandemheen KL, Giesbrecht-Lewis T, et al. Persistency of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum cultures and clinical outcomes in adult patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 1603–1610.
- 4 Burns JL, Gibson RL, McNamara S, et al. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 2001; 183: 444–452.
- 5 Jacques I, Derelle J, Weber M, et al. Pulmonary evolution of cystic fibrosis patients colonized by *Pseudomonas aeruginosa* and/or *Burkholderia cepacia*. *Eur J Pediatr* 1998; 157: 427–431.
- 6 Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 352: 1992–2001.
- 7 Locke LW, Myerburg MM, Weiner DJ, et al. *Pseudomonas* infection and mucociliary and absorptive clearance in the cystic fibrosis lung. *Eur Respir J* 2016; 47: 1392–1401.
- 8 Hentschel J, Fischer N, Janhsen WK, et al. Protease-antiprotease imbalances differ between cystic fibrosis patients' upper and lower airway secretions. *J Cyst Fibros* 2015; 14: 324–333.
- 9 Scheid P, Kemster L, Griesenbach U, et al. Inflammation in cystic fibrosis airways: relationship to increased bacterial adherence. *Eur Respir J* 2001; 17: 27–35.
- 10 Kelly E, Greene CM, McElvaney NG. Targeting neutrophil elastase in cystic fibrosis. *Expert Opin Ther Targets* 2008; 12: 145–157.
- 11 Twigg MS, Brockbank S, Lowry P, et al. The role of serine proteases and antiproteases in the cystic fibrosis lung. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 293053.
- 12 Gaggar A, Hector A, Bratcher PE, et al. The role of matrix metalloproteinases in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 2011; 38: 721–727.
- 13 Downey DG, Bell SC, Elborn JS. Neutrophils in cystic fibrosis. *Thorax* 2009; 64: 81–88.
- 14 Tirouvanziam R. Neutrophilic inflammation as a major determinant in the progression of cystic fibrosis. *Drug News Perspect* 2006; 19: 609–614.
- 15 Koller DY, Urbanek R, Götz M. Increased degranulation of eosinophil and neutrophil granulocytes in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 629–633.
- 16 Taggart C, Coakley RJ, Grealley P, et al. Increased elastase release by CF neutrophils is mediated by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278: L33–L41.
- 17 Sagel SD, Wagner BD, Anthony MM, et al. Sputum biomarkers of inflammation and lung function decline in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 857–865.
- 18 Sly PD, Gangell CL, Chen L, et al. Risk factors for bronchiectasis in children with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2013; 368: 1963–1970.
- 19 Guyot N, Butler MW, McNally P, et al. Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis. *J Biol Chem* 2008; 283: 32377–32385.
- 20 Waters VJ, Stanojevic S, Sonneveld N, et al. Factors associated with response to treatment of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2015; 14: 755–762.
- 21 Nichols DP, Chmiel JF. Inflammation and its genesis in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonol* 2015; 50: S39–S56.
- 22 Snodgrass SM, Cihil KM, Cornuet PK, et al. TGF- β 1 inhibits CFTR biogenesis and prevents functional rescue of Δ F508-CFTR in primary differentiated human bronchial epithelial cells. *PLoS One* 2013; 8: 63167.
- 23 Zhou-Suckow Z, Duerr J, Hagner M, et al. Airway mucus, inflammation and remodelling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases. *Cell Tissue Res* 2017; 367: 537–550.
- 24 Fritzsche B, Zhou-Suckow Z, Trojanek JB, et al. Hypoxic epithelial necrosis triggers neutrophilic inflammation via IL1 receptor signalling in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191: 902–913.
- 25 Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2002; 34: 91–100.
- 26 Aebi C, Bracher R, Liechti-Gallati S, et al. The age at onset of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis: prognostic significance. *Eur J Pediatr* 1995; 154: Suppl. 4, S69–S73.
- 27 Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 2008; 153: S4–S14.
- 28 Alejandro Alcázar MA, Morty RE, Lendzian L, et al. Inhibition of TGF- β signalling and decreased apoptosis in IUGR-associated lung disease in rats. *PLoS One* 2011; 6: e26371.
- 29 Laszlo G. Standardisation of lung function testing: helpful guidance from the ATS/ERS Task Force. *Thorax* 2006; 61: 744–746.
- 30 Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 918–951.
- 31 Doring G, Meisner C, Stern M. A double-blind randomized placebo controlled phase III study of a *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine in cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 11020–11025.
- 32 Sagel SD, Chmiel JF, Konstan MW. Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 406–417.

- 33 Konstan MW, Morgan WJ, Butler SM, et al. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Pediatr* 2007; 151: 134–139.e1.
- 34 Craig A, Mai J, Cai S, et al. Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect Immun* 2009; 77: 568–575.
- 35 Dieber N, Brand A, Hector A, et al. Flagellin induces myeloid-derived suppressor cells: implications for *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease. *J Immunol* 2013; 190: 1276–1284.
- 36 DeBoer EM, Swiercz W, Hellsthe SL, et al. Automated CT scan scores of bronchiectasis and air trapping in cystic fibrosis. *Chest* 2014; 145: 593–603.
- 37 Hector A, Kappeler M, Griese M. *In vitro* inhibition of neutrophil elastase activity by inhaled anti-*Pseudomonas* antibiotics used in cystic fibrosis patients. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 809591.
- 38 Senior RM, Griffin GL, Mecham RP. Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *J Clin Invest* 1980; 66: 859–862.
- 39 Tojais NF, Cao A, Lai YJ, et al. Codependence of bone morphogenetic protein receptor 2 and transforming growth factor- β in elastic fiber assembly and its perturbation in pulmonary arterial hypertension. *Arterioscle Thromb Vasc Biol* 2017; 37: 1559–1569.
- 40 Nickel NP, Seickertkoetter E, Gu M, et al. Elafin reverses pulmonary hypertension via caveolin-1-dependent bone morphogenetic protein signalling. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191: 1273–1286.
- 41 Chua F, Laurent GJ. Neutrophil elastase-mediator of extracellular matrix destruction and accumulation. *Eur Am Thorac Soc* 2006; 3: 424–427.
- 42 Hilgendorff A, Parai K, Erdsey R, et al. Inhibiting lung elastase activity enables lung growth in mechanically ventilated newborn mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 537–546.
- 43 Borzatti M, Bezzetti V, Mancini I, et al. Induction of IL-6 gene expression in a CF bronchial epithelial cell line by *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on transcription factors belonging to the Sp1 superfamily. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 977–983.
- 44 Carrabino S, Camani D, Livraghi A, et al. Dysregulated interleukin-8 secretion and NF-kappaB activity in human cystic fibrosis nasal epithelial cells. *J Cyst Fibros* 2006; 5: 113–119.
- 45 Iannitti RG, Napoli V, Oikonomou V, et al. IL1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent inflammation in murine and human cystic fibrosis. *Nat Commun* 2016; 7: 10791.
- 46 Nakamura H, Yoshimura K, McElvaney NG, et al. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest* 1992; 89: 1478–1484.
- 47 Bodas M, Vii N. The NF-kappaB signalling in cystic fibrosis lung disease: pathophysiology and therapeutic potential. *Disov Med* 2010; 9: 346–356.
- 48 Pressler T, Bohmova C, Conway S, et al. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection definition: EuroCareCF Working Group report. *J Cyst Fibros* 2011; 10: Suppl. 2, S75–S78.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit erfolgte die Bestimmung von proinflammatorischen Mediatoren im Sputum von CF-Patienten und deren Korrelation zum inflammatorischen und klinischen Phänotyp. Es konnte in einer repräsentativen Kohorte gezeigt werden, dass die Expression der untersuchten proinflammatorischen Mediatoren im Sputum sowohl eine Assoziation zum Pseudomonasstatus als auch zur Lungenfunktion der CF-Patienten aufweisen. Die vorliegende Studie konnte somit erstmals nachweisen, dass eine Infektion mit PA nicht nur mit einem Ungleichgewicht zwischen Proteasen (NE) und deren Inhibitoren (Elafin), sowie einer vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-8) und erhöhter Expression von TGF- β ₁ im Sputum einhergeht, sondern auch klinisch mit einer eingeschränkten Lungenfunktion korreliert. Weiterführend konnte durch diese Studie dargestellt werden, dass eine pulmonale PA-Infektion mit einer Aktivierung der NF κ B-Signalkaskade assoziiert ist und somit die Interaktion zwischen PA und NF κ B – Signalweg ein möglicher weiterer Trigger der chronischen pulmonalen Inflammation bei CF ist.

Die Ergebnisse unterstreichen daher die zentrale Bedeutung der PA-Infektion für die pulmonale Inflammation bei CF und zeigen auf, welchen wichtigen Stellenwert die frühzeitige Eradikation einer PA-Infektion für den Krankheitsverlauf der CF-Lungenerkrankung hat.

In großen Multizenterstudien konnte bereits gezeigt werden, dass Infektionen mit PA mit einer deutlichen Verschlechterung des klinischen Phänotyps und einer erhöhten Mortalität einhergehen (65, 74, 75). Während die Umsetzung einer frühen und aggressiven PA-Eradikationstherapie ein wesentlicher Grund für die gestiegene Lebenserwartung in den letzten zwei Dekaden ist, sind zahlreiche zugrundeliegende mechanistische Zusammenhänge zwischen der persistierenden Inflammationsreaktion und der daraus folgenden Destruktion des Lungengewebes im Rahmen der CF-Lungenerkrankung nicht verstanden.

Einige Studien untersuchten zwar bereits proinflammatorische Marker im Sputum von CF-Patienten (39, 71), allerdings gibt es bislang nur wenige Publikationen, die den Einfluss der PA-Infektion auf die pulmonale Inflammation bei CF untersuchten (76). So konnten Malhotra et al. mittels Untersuchung proinflammatorischer Zytokine in der BAL von 14 CF-Patienten zeigen, dass mukoide PA-Spezies im Vergleich zu nichtmukoiden PA-Spezies mit einer vermehrten Expression von proinflammatorischen Zytokinen einhergehen.

In den folgenden Abschnitten werden die in der Originalpublikation aufgeführten Ergebnisse diskutiert.

4.1 Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Zur Überprüfung der Repräsentativität des untersuchten Patientenkollektivs wurden die demographischen Daten unserer Kohorte mit den Daten des deutschen Mukoviszidoseregister verglichen (12). Hinsichtlich der Altersverteilung, der Geschlechterverteilung, der Lungenfunktion, der PA-Infektion sowie der Mutationsklassen konnte eine große Übereinstimmung mit den Daten des im Jahr 2019 6463 Patienten umfassenden Registers erzielt werden. Damit lag der Studie ein repräsentatives CF-Patientenkollektiv zugrunde.

4.2 Zusammenhang von PA-Infektion und Gleichgewicht von Proteasen und Antiproteasen im Sputum von CF-Patienten

Die pulmonale Inflammation und Fibrosierung bei CF ist gekennzeichnet durch eine vermehrte Expression von Proteasen und eine dadurch induzierte erhöhte proteolytische Aktivität. NE gilt als die wichtigste Protease für den Prozess der pulmonalen Inflammation in der CF-Lunge und als ein möglicher Biomarker zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs der CF-Lungenerkrankung. Eine erhöhte NE-Aktivität ist assoziiert mit dem vermehrten Auftreten von Bronchiektasen (77), einer Verschlechterung der Lungenfunktion (71) sowie einer Abnahme der Wirksamkeit antibiotischer Therapien bei pulmonalen Exazerbationen (78). Ferner wiesen Sly et al. einen Zusammenhang von hoher NE-Aktivität in der BAL und einer frühen Entwicklung struktureller Auffälligkeiten des Lungenparenchyms nach (77).

Hinsichtlich des Einflusses von PA auf die Expression und Aktivität der NE belegten in-vitro Experimente, dass inhalative und PA-sensitive Antibiotika einen inhibitorischen Effekt auf die NE-Aktivität haben (78). Diese Ergebnisse lassen somit eine stimulierende Wirkung von PA auf die NE-Aktivität vermuten. Die vermehrte Expression von NE geht mit einer vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie z.B. TGF- β_1 und einem vermehrten Abbau elastischer Fasern einher und führt konsekutiv zu einer weiteren Aktivierung proentzündlicher Prozesse und einer Stimulierung inflammatorischer Zellen (79). Die vermehrte Freisetzung von NE durch neutrophile Granulozyten und Elastinfragmente im Rahmen des gesteigerten proteolytischen Abbaus von elastischen Fasern ist auch bei anderen chronischen Lungenerkrankungen wie der pulmonalen Hypertonie (80) oder der nicht CF-assozierten Bronchiektasien pathognomonisch (81).

Wichtigster Inhibitor einer überschießenden NE-Aktivität ist Elafin, ein neutrophiler Serin-Protease-Inhibitor der primär in bronchialen Epithelzellen produziert wird und als bedeutender Gegenspieler der NE zur Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen proteolytischer und antiproteolytischer Aktivitäten in der Lunge fungiert (82, 83). *In vivo* konnte Elafin hauptsächlich unter inflammatorischen Bedingungen detektiert werden, hinweisend dass die Elafinexpression induzierbar ist (84). So zeigten unterschiedliche Studien bereits, dass die Elafinexpression durch proinflammatorische Stimuli wie Lipopolysaccharide (85) oder IL-1 β (86) hochreguliert werden kann. Ungeklärt sind jedoch die zugrundeliegenden Zusammenhänge zwischen Elafin und der pulmonalen Inflammation bei CF, darüber hinaus gibt es bislang keine Studien aus einem größeren CF-Kollektiv.

Die Bestimmung der Elafinkonzentration im Sputum unserer Kohorte zeigte eine deutlich verminderte Konzentration im Sputum PA-positiver CF-Patienten, hindeutend auf einen bisher unbekanntem suppressiven Effekt von PA auf die Elafinexpression *in vivo*. Guyot et al. konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass Elafin durch die NE selbst proteolytisch im Sputum von CF-Patienten abgebaut wird (84). Die erhöhte NE-Konzentration im Sputum von PA-positiven Patienten ist somit eine mögliche Begründung für die Elafin-Defizienz in der PA-positiven Subgruppe. Weiterführend scheint PA daher nicht nur wie aus Vorstudien bekannt die NE-Expression und -Aktivität zu beeinflussen, sondern auch eine Störung des Gleichgewichts zwischen NE und Elafin zu begünstigen.

Neben dem inhibitorischen Effekt auf die NE hat Elafin jedoch auch weitere wichtige zelluläre Funktionen. So ist bekannt, dass Elafin ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf die NF κ B-Signalkaskade hat, sowie die Aktivierung von TGF- β ₁ in Lungen hemmt (39, 83). Die Elafin-Defizienz scheint somit auch ein begünstigender Faktor für die vermehrte Induktion der NF κ B-Signalkaskade und die gesteigerte TGF- β ₁ vermittelte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine im Sputum PA-positiver Patienten zu sein und stellt folglich einen möglichen Trigger der pulmonalen Inflammation bei CF dar. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der funktionalen Rolle von Elafin in der pulmonalen Inflammation scheinen besonders vor dem Hintergrund einer möglichen therapeutischen Substitution sinnvoll. So ist beispielhaft die subkutane Injektion von Elafin zur Behandlung des pulmonalen arteriellen Hypertonus bereits Teil klinischer Studien.

4.3 Korrelation von PA-Infektion und der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine im Sputum von CF-Patienten

Die Infektion mit PA stellt als Trigger der pulmonalen Inflammation einen bekannten Risikofaktor für einen progressive Krankheitsverlauf bei CF dar (65, 87). Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellten eine signifikant gesteigerte Expression von Komponenten der NFκB-Signalkaskade sowie erhöhte Konzentrationen der proinflammatorisch wirksamen Interleukine (IL-1β/IL-8) im Sputum von PA-positiven CF-Patienten heraus. Unsere Studie bestärkt somit die durch *in vitro* Experimenten belegte Expressionserhöhung von IL-1β, IL-8 und gesteigerte NFκB-Aktivität in epithelialen IB3-1 Zellreihen und epithelialen nasalen CF-Zellen nach PA-Infektion (88). Darüber hinaus konnte in vorangegangenen Studien bereits im frühen Krankheitsverlauf eine gesteigerte NFκB-vermittelte Sekretion von IL-1β und IL-8 sowie eine Zunahme des Einstroms neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden (89).

Es ist zudem belegt, dass nicht nur eine PA-Infektion selbst, sondern darüber hinaus auch der fehlende, bzw. reduzierte inhibitorische Effekt des NE-Inhibitors Elafin auf die NFκB-Signalkaskade ein möglicher Auslöser der verstärkten IL-1β und IL-8 Expression ist (39). Ferner zeigen experimentelle Studien von Twigg et al., dass eine gesteigerte NE-Expression eine erhöhte IL-8 Expression induziert und es folglich zu einer Aktivierung einer durch neutrophile Granulozyten vermittelten Inflammationsreaktion kommt (40).

Die Auswertung unserer Daten konnte darüber hinaus eine Assoziation zwischen Sputumkonzentrationen von IL-1β/IL-8 und dem klinischen Phänotyp der CF-Patienten nachweisen. So korrelierten erhöhte Konzentrationen von IL-1β und IL-8 mit einer eingeschränkten Lungenfunktion. Dieser Zusammenhang unterstreicht nicht nur die Bedeutung der PA-Infektion auf den klinischen Krankheitsverlauf, sondern auch die Möglichkeit und Notwendigkeit zur Untersuchung neuer therapeutische Ansätze hinsichtlich der Reduktion einer überschießenden Inflammation. In ersten Untersuchungsansätzen zur Hemmung von IL-1β mittels IL-1β-Rezeptor-Antagonist (Anakinra) konnte bereits eine Verbesserung der Inflammation-vermittelten Entzündungsreaktion in humanen CF-Bronchialepithelzellen nachgewiesen werden (90). Diese vielversprechenden Ergebnisse waren schließlich Anstoß zu einer aktuell durchgeführten klinischen Phase 2 Studie (91).

Neben der Korrelation zwischen der Sputumkonzentration von IL-1β und IL-8 und dem klinischen Phänotyp, zeigte sich in unserer Datenauswertung auch eine starke positive Korrelation zwischen beiden Interleukinen untereinander. Carrabino et al. belegten anhand

vorheriger Untersuchungen, dass PA exponierte nasale CF-Epithelzellen nach IL-1 β -Stimulation mit einem deutlichen Anstieg der IL-8-Expression reagieren (92).

Dies stellt somit einen möglichen Erklärungsansatz für die starke Korrelation beider Zytokine in unserer Kohorte dar.

Unsere Studie konnte sowohl eine Assoziation zwischen der Infektion mit PA und einer vermehrter Genexpression von Mediatoren der NF κ B-Signalkaskade, als auch mit einer gesteigerten Expression von den proinflammatorisch wirksamen Zytokinen IL-1 β und IL-8 nachweisen.

4.4 Korrelation von PA und TGF- β ₁-Sputumkonzentration

Im Rahmen unserer Studie gelang erstmals der Nachweis einer Assoziation zwischen PA-Besiedlung und hoher TGF- β ₁-Konzentration im Sputum von CF-Patienten. Eine Aussage, ob die Besiedlung mit PA jedoch ursächlich für die Konzentrationserhöhung ist oder die chronische Inflamationsreaktion mit erhöhten TGF- β ₁-Sputumspiegeln die Besiedlung begünstigt, lässt sich anhand unserer Daten nicht abschließend beurteilen. Dennoch legen unterschiedliche Studien nahe, dass PA eine Aktivierung der TGF- β ₁-Signalkaskade induziert und somit zu einer vermehrten Expression von TGF- β ₁ führt. So konnten Yang et al. zeigen, dass in gesunden Bronchialepithelzellen das PA-Flaggelin die Erhöhung der TGF- β ₁-Expression vermittelt (93). Ferner deuten aktuelle Untersuchungen darauf hin, dass PA über die Freisetzung eines Proteins (PA3611) eine vermehrte TGF- β ₁-Sekretion verursacht (94). Eine unmittelbare Interaktion zwischen PA und Induktion von TGF- β ₁ in den Lungen von CF-Patienten gilt daher als wahrscheinlich.

4.5 Korrelation von TGF- β ₁-Sputumkonzentration zum klinischen und inflammatorischen Phänotyp

Neben der CFTR-Mutation selbst, wird der Krankheitsverlauf bei CF auch maßgeblich von modifizierenden Genen und Wachstumsfaktoren beeinflusst (6). Insbesondere dem pleiotropen Zytokin TGF- β ₁ wird im Zusammenhang der CF-Lungenerkrankung eine besondere Bedeutung zugesprochen. So ist TGF- β ₁ sowohl an der Regulation der Zelldifferenzierung und Apoptose, als auch an der Inflamationsantwort und Fibrosierung von chronischen Lungenerkrankungen beteiligt (49).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals in einem großen CF-Kollektiv die TGF- β ₁-Konzentrationen im Sputum bestimmt und mit dem klinischen und inflammatorischen Phänotyp korreliert. Wir konnten zeigen, dass eine erhöhte TGF β ₁-Sputumkonzentration nicht nur

klinisch mit einer PA-Infektion und einer eingeschränkten Lungenfunktion assoziiert ist, sondern auch mit dem Ausmaß der pulmonalen Inflammation korreliert. So stellte sich darüber hinaus eine deutliche positive Korrelation zwischen TGF- β_1 -Konzentration und Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-8 heraus, hinweisend auf eine relevante modulierende Wirkung von TGF- β_1 im Prozess der pulmonalen Inflammation bei CF.

Eine mögliche Rolle von TGF- β_1 als Sputumbiomarker zur Verlaufsbeurteilung der pulmonalen Inflammation bei CF ist somit denkbar.

Ebenso wird dem Einfluss von TGF- β_1 als *genetic modifier* im Zusammenhang pathobiologischer Vorgänge der CF-Lungenerkrankung eine besondere Bedeutung zugesprochen. So konnte beispielsweise belegt werden, dass TGF- β_1 über eine Inhibition der CFTR-Expression in primären humanen Bronchialepithelzellen von NonCF-Individuen den Mechanismus der CFTR-Biogenese moduliert (55). Ferner wurde im Tiermodell demonstriert, dass TGF- β_1 die inflammatorischen Prozesse in der Lunge von Influenza A-infizierten CFTR-heterozygoten Mäusen durch eine gesteigerte Expression von IL-6 und Alveolarmakrophagen moduliert (95).

Im Zusammenhang mit der pulmonalen Inflammation bei CF gibt es bisher nur vereinzelte Publikationen mit kleinen Kohorten, die den Einfluss von TGF- β_1 auf den inflammatorischen und klinischen Phänotyp untersucht haben. Die Korrelation von TGF- β_1 -Konzentrationen (im Plasma) und klinischen Parametern sind in der Literatur bisher uneinheitlich beschreiben; die Aussagekraft ist somit eingeschränkt. So konnten Schwarz et al. in einer Subgruppe von Patienten mit stark eingeschränkter Lungenfunktion (FEV1 in % < 40) erhöhte TGF- β_1 -Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe im Plasma nachweisen (96), wohingegen eine zweite Studie mit einem Patientenkollektiv von 24 CF-Patienten (Genotyp: F508del homozygot) keine Korrelation zwischen der TGF- β_1 -Plasmakonzentration und klinischen Parametern detektierte (97). Studien, in denen TGF- β_1 -Spiegel in der BAL von Kindern und Jugendlichen bestimmt wurden, konnten eine Assoziation von erhöhten TGF- β_1 -Konzentrationen mit einer eingeschränkten funktionellen Residualkapazität (FRC) in der Lungenfunktion (98) sowie mit pulmonalen Exazerbationen (99) nachweisen. Eickmeier et al. untersuchten erstmals TGF- β_1 -Konzentrationen im Sputum von CF-Patienten und gesunden Kontrollen und wiesen neben einer erhöhten TGF- β_1 -Konzentration in der Gruppe der CF-Patienten auch eine positive Korrelation zu den proinflammatorischen Zytokinen IL-8 und Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) nach (97). In Zusammenschau unserer eigenen Ergebnisse und den Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen ist aufgrund der deutlichen Korrelation von TGF- β_1 und proinflammatorischen Mediatoren eine wesentliche Beteiligung der TGF- β_1 -Signalkaskade an der pulmonalen Inflammation bei CF sehr wahrscheinlich.

Aufgrund der Verfügbarkeit von TGF- β_1 -Inhibitoren, die für andere Indikationen wie die idiopathische Lungenfibrose bereits therapeutischer Standard sind (Pirfenidon®), ist die zukünftige, vertiefende Untersuchung zum Verständnis des Einflusses von TGF- β_1 auf das Inflammationsgeschehen bei CF ein vielversprechendes Forschungsgebiet. Ferner konnte im Zellkulturmodell bereits gezeigt werden, dass hohe TGF- β_1 Konzentrationen, wie sie in der CF-Lunge vorliegen, die Wirksamkeit von neuen CFTR-Modulatoren abschwächen (58). Eine Inhibition von TGF- β_1 stellt somit eine interessante therapeutische Option dar - nicht nur zur Eindämmung der pulmonalen Inflammation, sondern auch zur Steigerung der Wirksamkeit von sog. CFTR-Modulatoren.

3.6 Limitationen der Studie

Diese Studie weist trotz vieler relevanter Ergebnisse auch einige Limitationen auf. Sowohl aus humanen, als auch murinen Studien ist bekannt, dass die Dauer der chronischen PA Infektion sich auf das Inflammationsgeschehen der CF-Lunge auswirkt (100, 101). Die vorliegende Arbeit hat jedoch keine Differenzierung hinsichtlich der Infektionsdauer mit PA vorgenommen, sondern nur den aktuellen PA-Status zum Zeitpunkt der Probenentnahme berücksichtigt. Ferner ist die Sputummenge interindividuell sehr unterschiedlich gewesen, so dass nicht alle durchgeführten Messungen mit der gleichen Probenanzahl erfolgen konnte. Für die weitere Einordnung des Einflusses einer Substitution von Elafin bzw. einer Inhibition von TGF β_1 auf die inflammatorische Antwort in der CF-Lunge wären vertiefende Zellkulturversuche hilfreich und werden aufbauend auf den vorliegenden Ergebnissen in Zukunft durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführt.

5. Literaturverzeichnis

- 1 Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2003 Feb 22;361(9358):681-9.
- 2 Zolin A, Orenti A, Naehrlich L, van Rens J et al. ECFSPR Annual Report 2019.
- 3 Konstan MW, Hilliard KA, Norvell TM, Berger M. Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Aug;150(2):448-54.
- 4 Castellani C, Assael BM. Cystic fibrosis: a clinical view. *Cell Mol Life Sci*. 2017 Jan;74(1):129-140.
- 5 World Health Organization Chronic Diseases and Health Promotion Human Genetics Programme. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis: report of a joint meeting of WHO/ECFTN/ICF(M)A/ECFS, Genoa, Italy, 19 June 2002. Geneva, Switzerland: Human Genetics Programme, Chronic Diseases and Health Promotion, World Health Organization, c2004.
- 6 Cutting GR. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet*. 2015 Jan;16(1):45-56.
- 7 Scotet V, L'Hostis C, Férec C. The Changing Epidemiology of Cystic Fibrosis: Incidence, Survival and Impact of the *CFTR* Gene Discovery. *Genes (Basel)*. 2020;11(6):589.
- 8 Grody WW, Desnick RJ. Cystic fibrosis population carrier screening: here at last--are we ready? *Genet Med*. 2001 Mar-Apr;3(2):87-90.
- 9 Dodge JA, Morison S, Lewis PA, Coles EC, Geddes D, Russell G, Littlewood JM, Scott MT. Incidence, population, and survival of cystic fibrosis in the UK, 1968-95. UK Cystic Fibrosis Survey Management Committee. *Arch Dis Child*. 1997 Dec;77(6):493-6.
10. Nährlich L, Burkhart M, Wiese B. Deutsches Mukoviszidose Register, Berichtsband 2016. https://www.muko.info/fileadmin/user_upload/angebote/qualitaetsmanagement/register/berichtsband_2016.pdf (Letzter Zugriff: 03.11.2017).
- 11 Stern M et al. Deutsches Mukoviszidose Register -Berichtsband 1996 https://www.muko.info/fileadmin/user_upload/angebote/qualitaetsmanagement/register/berichtsbaende/qualitaetssicherung_mukoviszidose_1996.pdf (Letzter Zugriff: 10.04.1997).
- 12 Nährlich L, Burkhart M, Wiese B. Deutsches Mukoviszidose Register, Berichtsband 2019 https://www.muko.info/fileadmin/user_upload/angebote/qualitaetsmanagement/register/berichtsbaende/berichtsband_2019.pdf (Letzter Zugriff:10.06.2020).
- 13 Dodge JA, Lewis PA, Stanton M, Wilsher J. Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *Eur Respir J*. 2007 Mar;29(3):522-6.

- 14 Fanconi, G., Uehlinger, E., Knauer, C. Das Coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibrose und Bronchiektasen. *Wien. med. Wschr.* 1936, 753.
- 15 Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science.* 1989 Sep 8;245(4922):1073-80.
- 16 Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 2005 May 12;352(19):1992-2001.
- 17 <https://cftr2.org/>
- 18 <http://www.genet.sickkids.on.ca/>
- 19 Boyle MP, De Boeck K. A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *Lancet Respir Med.* 2013 Apr;1(2):158-63.
- 20 Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.* 1993 Jul 2;73(7):1251-4.
- 21 Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir Med.* 2016 Aug;4(8):e37-e38.
- 22 De Boeck K, Zolin A, Cuppens H, Olesen HV, Viviani L. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2014 Jul;13(4):403-9.
- 23 Penque D, Mendes F, Beck S, Farinha C, Pacheco P, Nogueira P, Lavinha J, Malhó R, Amaral MD. Cystic fibrosis F508del patients have apically localized CFTR in a reduced number of airway cells. *Lab Invest.* 2000 Jun;80(6):857-68.
- 24 Wang F, Zeltwanger S, Hu S, Hwang TC. Deletion of phenylalanine 508 causes attenuated phosphorylation-dependent activation of CFTR chloride channels. *J Physiol.* 2000 May 1;524 Pt 3:637-48.
- 25 Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, Houck SA, Cai Z, Peters KW, Hong JS, Pollard HB, Guggino WB, Balch WE, Skach WR, Cutting GR, Frizzell RA, Sheppard DN, Cyr DM, Sorscher EJ, Brodsky JL, Lukacs GL. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell.* 2016 Feb 1;27(3):424-33.
- 26 Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1993 Oct 28;329(18):1308-13.
- 27 Knowles MR, Stutts MJ, Spock A, Fischer N, Gatzky JT, Boucher RC. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science.* 1983 Sep 9;221(4615):1067-70.
- 28 Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J.* 2004 Jan;23(1):146-58.

- 29 Knowles M, Gatz J, Boucher R. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1981 Dec 17;305(25):1489-95.
- 30 Naehrlich L, Stuhmann-Spangenberg M, Barbeno J, Bargoni J, Blankenstein O, Bremer W, et al. S2-Konsensus-Leitlinie „Diagnose der Mukoviszidose“ (AWMF 026-023) unter Federführung der Gesellschaft für Pädiatrischen Pneumologie http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/026-023IS_2k_Diagnose_der_Mukoviszidose_2013-07.pdf (Letzter Zugriff: 06/2013).
- 31 Donaldson SH, Bennett WD, Zeman KL, Knowles MR, Tarran R, Boucher RC. Mucus clearance and lung function in cystic fibrosis with hypertonic saline. *N Engl J Med.* 2006 Jan 19;354(3):241-50.
- 32 Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros.* 2015 Jul;14(4):419-30.
- 33 Muhlebach MS, Stewart PW, Leigh MW, Noah TL. Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Jul;160(1):186-91.
- 34 Nichols DP, Chmiel JF. Inflammation and its genesis in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2015 Oct;50 Suppl 40: S39-56.
- 35 Kurbatova P, Bessonov N, Volpert V, Tiddens HA, Cornu C, Nony P, Caudri D; CRESim Working Group. Model of mucociliary clearance in cystic fibrosis lungs. *J Theor Biol.* 2015 May 7;372:81-8.
- 36 Kelly E, Greene CM, McElvaney NG. Targeting neutrophil elastase in cystic fibrosis. *Expert Opin Ther Targets.* 2008 Feb;12(2):145-57.
- 37 Downey DG, Bell SC, Elborn JS. Neutrophils in cystic fibrosis. *Thorax.* 2009 Jan;64(1):81-8.
- 38 Koller DY, Urbanek R, Götz M. Increased degranulation of eosinophil and neutrophil granulocytes in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 Aug;152(2):629-33.
- 39 Taggart C, Coakley RJ, Grealley P, Canny G, O'Neill SJ, McElvaney NG. Increased elastase release by CF neutrophils is mediated by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Jan;278(1):L33-41.
- 40 Twigg MS, Brockbank S, Lowry P, FitzGerald SP, Taggart C, Weldon S. The Role of Serine Proteases and Antiproteases in the Cystic Fibrosis Lung. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:293053.
- 41 Scott A, Weldon S, Taggart CC. SLPI and elafin: multifunctional antiproteases of the WFDC family. *Biochem Soc Trans.* 2011 Oct;39(5):1437-40.
- 42 Boncoeur E, Roque T, Bonvin E, Saint-Criq V, Bonora M, Clement A, Tabary O, Henrion-Caude A, Jacquot J. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator controls lung proteasomal degradation and nuclear factor-kappaB activity in conditions of oxidative stress. *Am J Pathol.* 2008 May;172(5):1184-94.

- 43 Joseph T, Look D, Ferkol T. NF-kappaB activation and sustained IL-8 gene expression in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelial cells stimulated with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Mar;288(3):L471-9.
- 44 Bodas M, Vij N. The NF-kappaB signaling in cystic fibrosis lung disease: pathophysiology and therapeutic potential. *Discov Med*. 2010 Apr;9(47):346-56.
- 45 Singh H, Sen R, Baltimore D, Sharp PA. A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature*. 1986 Jan 9-15;319(6049):154-8.
- 46 Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002 Oct;2(10):725-34.
- 47 Jacquot J, Tabary O, Le Rouzic P, Clement A. Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(9):1703-15.
- 48 Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997 Apr 10;336(15):1066-71.
- 49 Rubtsov YP, Rudensky AY. TGF beta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(6):443-453.
- 50 Bartram U, Speer CP. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. *Chest*. 2004;125(2):754-765.
- 51 Eickmeier O, Boom Lv, Schreiner F, et al. Transforming growth factor β 1 genotypes in relation to TGF β 1, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha in induced sputum and blood in cystic fibrosis. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013:913135.
- 52 Arkwright PD, Laurie S, Super M, Pravica V, Schwarz MJ, Webb AK, Hutchinson IV. TGF-beta(1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 2000 Jun;55(6):459-62.
- 53 Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, Fargo D, Xu A, Dunn JM, Darrah RJ, Dorfman R, Sandford AJ, Corey M, Zielenski J, Durie P, Goddard K, Yankaskas JR, Wright FA, Knowles MR; Gene Modifier Study Group. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005 Oct 6;353(14):1443-53.
- 54 Sun H, Harris WT, Kortyka S, et al. Tgf-beta downregulation of distinct chloride channels in cystic fibrosis-affected epithelia. *PLoS One*. 2014;9(9): e106842.
- 55 Snodgrass SM, Cihil KM, Cornuet PK, Myerburg MM, Swiatecka-Urban A. Tgf- β 1 inhibits Cftr biogenesis and prevents functional rescue of Δ F508-Cftr in primary differentiated human bronchial epithelial cells. *PLoS One*. 2013;8(5):e63167.
- 56 Davies JC. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Paediatr Respir Rev*. 2002;3(2):128-134.
- 57 Zolin A, Naehrlich L, van Rens Jet al. ECFSPR Annual Report 2015.

https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-images/workinggroups/ecfs-patient-registry/2015_At_A_Glance_Guide_Nov2017.pdf (Date last updated and accessed: Nov 2017).

- 58 Jacques I, Derelle J, Weber M, Vidailhet M. Pulmonary evolution of cystic fibrosis patients colonized by *Pseudomonas aeruginosa* and/or *Burkholderia cepacia*. *Eur J Pediatr*. 1998 May;157(5):427-31.
- 59 Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005;352: 1992– 2001.
- 60 Bals R, Weiner DJ, Wilson JM. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest*. 1999;103:303-307.
- 61 Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(11):1209-1223.
- 62 Schmitt-Grohé S, Lentze MJ, Henker J. Zystische Fibrose (Mukoviszidose). *Pädiatrie*. 2014;1289-1301.
- 63 Luan X, Campanucci VA, Nair M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* triggers CFTR-mediated airway surface liquid secretion in swine trachea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(35):12930-12935.
- 64 Pier GB. CFTR mutations and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Curr Opin Microbiol*. 2002;5(1):81-86.
- 65 Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2002;34(2):91-100.
- 66 Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Mar;69(3):89-95.
- 67 Jagger KS, Robinson DL, Franz MN, Warren RL. Detection by enzyme-linked immunosorbent assays of antibody specific for *Pseudomonas* proteases and exotoxin A in sera from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 1982 Jun;15(6):1054-8.
- 68 Sagel SD, Chmiel JF, Konstan MW. Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2007 Aug 1;4(4):406-17.
- 69 Oriano M, Terranova L, Sotgiu G, Saderi L, Bellofiore A, Retucci M, Marotta C, Gramegna A, Miglietta D, Carnini C, Marchisio P, Chalmers JD, Aliberti S, Blasi F. Evaluation of active neutrophil elastase in sputum of bronchiectasis and cystic fibrosis patients: A comparison among different techniques. *Pulm Pharmacol Ther*. 2019 Dec;59:101856.
- 70 Chalmers JD, Moffitt KL, Suarez-Cuartin G, Sibila O, Finch S, Furrrie E, Dicker A, Wrobel K, Elborn JS, Walker B, Martin SL, Marshall SE, Huang JT, Fardon TC. Neutrophil Elastase Activity Is Associated with Exacerbations and Lung Function Decline in Bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 May 15;195(10):1384-1393.

- 71 Sagel SD, Wagner BD, Anthony MM, Emmett P, Zemanick ET. Sputum biomarkers of inflammation and lung function decline in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Nov 1;186(9):857-65.
- 72 DeBoer EM, Swiercz W, Heltshe SL, Anthony MM, Szeffler P, Klein R, Strain J, Brody AS, Sagel SD. Automated CT scan scores of bronchiectasis and air trapping in cystic fibrosis. *Chest*. 2014;145(3):593-603.
- 73 Waters VJ, Stanojevic S, Sonneveld N, Klingel M, Grasemann H, Yau YC, Tullis E, Wilcox P, Freitag A, Chilvers M, Ratjen FA. Factors associated with response to treatment of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2015;14(6):755-62.
- 74 Nixon GM, Armstrong DS, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Robertson CF, Grimwood K. Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2001 May;138(5):699-704.
- 75 Hendry J, Elborn JS, Nixon L, Shale DJ, Webb AK. Cystic fibrosis: inflammatory response to infection with *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur Respir J* 1999;14:435–438.
- 76 Malhotra S, Hayes D Jr, Wozniak DJ. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and regional inflammation in the cystic fibrosis lung. *J Cyst Fibros*. 2019 Nov;18(6):796-803.
- 77 Sly PD, Gangell CL, Chen L, Ware RS, Ranganathan S, Mott LS, Murray CP, Stick SM. Risk factors for bronchiectasis in children with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2013;368(21):1963–70.
- 78 Hector A, Kappler M, Griese M., In vitro inhibition of neutrophil elastase activity by inhaled anti-*Pseudomonas* antibiotics used in cystic fibrosis patients. *Mediators Inflamm* 2010;2010:809591.
- 79 Tojais NF, Cao A, Lai YJ, Wang L, Chen PI, Alcazar MAA, de Jesus Perez VA, Hopper RK, Rhodes CJ, Bill MA, Sakai LY, Rabinovitch M. Codependence of Bone Morphogenetic Protein Receptor 2 and Transforming Growth Factor- β in Elastic Fiber Assembly and Its Perturbation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37(8):1559-1569.
- 80 Nickel NP, Spiekerkoetter E, Gu M, Li CG, Li H, Kaschwich M, Diebold I, Hennigs JK, Kim KY, Miyagawa K, Wang L, Cao A, Sa S, Jiang X, Stockstill RW, Nicolls MR, Zamanian RT, Bland RD, Rabinovitch M. Elafin Reverses Pulmonary Hypertension via Caveolin-1-Dependent Bone Morphogenetic Protein Signalling. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191(11):1273-86.
- 81 Chalmers JD, Moffitt KL, Suarez-Cuartin G, Sibila O, Finch S, Furrie E, Dicker A, Wrobel K, Elborn JS, Walker B, Martin SL, Marshall SE, Huang JT, Fardon TC. Neutrophil Elastase Activity Is Associated with Exacerbations and Lung Function Decline in Bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 May 15;195(10):1384-1393. doi: 10.1164/rccm.201605-1027OC. PMID: 27911604; PMCID: PMC5443898.

- 82 Zani ML, Nobar SM, Lacour SA, Lemoine S, Boudier C, Bieth JG, Moreau T. Kinetics of the inhibition of neutrophil proteinases by recombinant elafin and preelafin (trappin-2) expressed in *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem*. 2004 Jun;271(12):2370-8.
- 83 Hilgendorff A, Parai K, Ertsey R, Jain N, Navarro EF, Peterson JL, Tamosiuniene R, Nicolls MR, Starcher BC, Rabinovitch M, Bland RD. Inhibiting lung elastase activity enables lung growth in mechanically ventilated newborn mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184(5):537-46.
- 84 Guyot N, Butler MW, McNally P, Weldon S, Greene CM, Levine RL, O'Neill SJ, Taggart CC, McElvaney NG. Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis. *J Biol Chem* 2008;283(47):32377-85.
- 85 Simpson AJ, Cunningham GA, Porteous DJ, Haslett C, Sallenave JM. Regulation of adenovirus-mediated elafin transgene expression by bacterial lipopolysaccharide. *Hum Gene Ther*. 2001 Jul 20;12(11):1395-406.
- 86 Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gauldie J. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994 Dec;11(6):733-41.
- 87 Aebi C, Bracher R, Liechti-Gallati S, Tschäppeler H, Rüdberg A, Kraemer R.; The age at onset of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis-prognostic significance. *Eur J Pediatr*. 1995;154(9 Suppl 4):S69-73.
- 88 Borgatti M, Bezzerri V, Mancini I, Nicolis E, Dehecchi MC, Lampronti I, Rizzotti P, Cabrini G, Gambari R. Induction of IL-6 gene expression in a CF bronchial epithelial cell line by *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on transcription factors belonging to the Sp1 superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;357(4):977-83.
- 89 Bodas M, Vij N. The NF-kappaB signalling in cystic fibrosis lung disease: pathophysiology and therapeutic potential. *Discov Med* 2010;9(47):346-56.
- 90 Iannitti RG, Napolioni V, Oikonomou V, De Luca A, Galosi C, Pariano M, MassiBenedetti C, Borghi M, Puccetti M, Lucidi V, Colombo C, Fiscarelli E, Lass-Flörl C, Majo F, Cariani L, Russo M, Porcaro L, Ricciotti G, Ellemunter H, Ratclif L, De Benedictis FM, Talesa VN, Dinarello CA, van de Veerdonk FL, Romani L. IL1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent inflammation in murine and human cystic fibrosis. *Nat Commun* 2016;7:10791.
- 91 <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03925194>
- 92 Carrabino S, Carpani D, Livraghi A, Di Cicco M, Costantini D, Copreni E, Colombo C, Conese M. Dysregulated interleukin-8 secretion and NF-kappaB activity in human cystic fibrosis nasal epithelial cells. *J Cyst Fibros* 2006;5(2): 113-9.
- 93 Yang JJ, Wang DD, Sun TY. Flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* induces transforming growth factor beta 1 expression in normal bronchial epithelial cells through

- mitogen activated protein kinase cascades. *Chin Med J (Engl)*. 2011 Feb;124(4):599-605. PMID: 21362288.
- 94 Shu, Chen, Chen, Lin, Du, Deng, Wei, Cao, Yan, Shen, Feng. *Pseudomonas aeruginosa* secreted protein PA3611 promotes bronchial epithelial cells epithelial-mesenchymal transition through TGF- β 1 inducing p38/miRNA/NF- κ B pathway. *bioRxiv* 2020.10.14.339044.
- 95 Woods PS, Tazi MF, Chesarino NM, Amer AO, Davis IC. TGF- β -induced IL-6 prevents development of acute lung injury in influenza A virus-infected F508del CFTR-heterozygous mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Jun 1;308(11):L1136-44.
- 96 Schwarz KB, Rosensweig J, Sharma S, Jones L, Durant M, Potter C, Narkewicz MR. Plasma markers of platelet activation in cystic fibrosis liver and lung disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003 Aug;37(2):187-91.
- 97 Eickmeier O, Boom Lv, Schreiner F, Lentze MJ, NGampolo D, Schubert R, Zielen S, Schmitt-Grohé S. Transforming growth factor β 1 genotypes in relation to TGF β 1, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha in induced sputum and blood in cystic fibrosis. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:913135.
- 98 Peterson-Carmichael SL, Harris WT, Goel R, Noah TL, Johnson R, Leigh MW, Davis SD. Association of lower airway inflammation with physiologic findings in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2009 May;44(5):503-11.
- 99 Harris WT, Muhlebach MS, Oster RA, Knowles MR, Noah TL. Transforming growth factor- β 1 in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2009 Nov;44(11):1057-64.
- 100 Pressler T, Bohmova C, Conway S, Dumcius S, Hjelte L, Høiby N, Kollberg H, Tümmler B, Vavrova V. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection definition: EuroCareCF Working Group report. *J Cyst Fibros*. 2011 Jun;10 Suppl 2:S75-8.
- 101 Facchini M, De Fino I, Riva C, Bragonzi A. Long term chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway infection in mice. *J Vis Exp*. 2014 Mar 17;(85):51019.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Zusammenfassung	Seite
Abbildung 1: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses einer PA-Besiedlung auf den den Kreislauf der chronischen Inflammation bei CF	7
Einleitung	
Abbildung 2: Übersicht der CFTR-Mutationsklassen	10
Abbildung 3: Klinischer Phänotyp bei CF	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Auswirkung der CFTR-Dysfunktion	13
Abbildung 5: Charakteristik der pulmonalen Inflammation bei CF	15
Abbildung 6: Häufigkeiten von chronischen Lungeninfektionen	17
Originalpublikation	
Table 1: Demographics of study population	20
Figure 1: Assessment of NE concentrations and elafin concentrations in sputum of CF patients	25
Figure 2: IL1 β and IL8 concentrations in sputum of CF patients	26
Figure 3: IL1 β and IL8 concentrations related to FEV ₁ values	26
Figure 4: Pearson correlation between IL1 β and IL8 concentrations in sputum of CF patients	26
Figure 5: Assessment of sputum TGF- β ₁ concentrations in CF patients by specific TGF β ₁ -ELISA	27
Figure 6: Spearman correlation between concentrations of sputum TGF- β ₁ and IL1 β and IL8	27
Figure 7: Gene expression of NF- κ B signalling cascade mediators in CF sputum	28
Figure 8: Spearman correlations between level of IL8 and quantitative mRNA expression of p50 and p65	28
Figure 9: Simplified presentation of the vicious circle of chronic inflammation in CF	30