

T. O. Hirche  
S. Loitsch  
C. Smaczny  
T. O. F. Wagner

## Neue Konzepte zur Pathophysiologie und Therapie der Mukoviszidose

*New Concepts of Pathophysiology and Therapy in Cystic Fibrosis*

### Zusammenfassung

Inzwischen hat die Mehrheit der an Mukoviszidose (syn.: Cystische Fibrose, CF) leidenden Patienten in Deutschland die Volljährigkeit erreicht. Mit zunehmendem Lebensalter steigt jedoch die Morbidität und der Anteil pulmonaler Komplikationen überproportional an. Auch durch weitere Optimierung der bestehenden symptomatischen Maßnahmen kann diese Entwicklung nicht verhindert werden, so dass dringender Bedarf an neuen, kausal-orientierten Therapieregimen besteht. In den vergangenen Jahren wurden die molekularbiologischen Grundlagen der CF-Erkrankung intensiv erforscht und das erworbene Wissen steht heute als Basis für die Entwicklung innovativer Behandlungsstrategien zur Verfügung. Während die Struktur des CF-Gens und seines Genprodukts *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) inzwischen gut verstanden erscheinen, wird die Funktion von CFTR in den Atemwegen weiterhin kontrovers diskutiert. Insbesondere ist weiter unklar, wie aus dem CFTR Defekt eine klinisch manifeste Lungenerkrankung resultiert. Dieser Beitrag gibt einen Überblick über gegenwärtig postulierte Hypothesen normaler und veränderter CFTR-Funktion und deren Folgen für die Homöostase endobronchialer Sekrete. Daraus abzuleitende neue therapeutische Ansätze werden diskutiert. Durch pharmakologische Korrektur der Ionenkanalfunktion von CFTR, bzw. durch Rekrutierung alternativer Ionenkanäle in einem frühen Krankheitsstadium könnte die Entstehung von irreversiblen Lungenveränderungen bei CF in Zukunft verhindert werden.

### Abstract

Today, the majority of cystic fibrosis (CF) patients treated in Germany have reached adulthood. However, with increasing age the morbidity and frequency of severe pulmonary complications continues to rise. Further optimization of conventional therapy alone will be insufficient to compensate for this development. In recent years, there has been impressive progress in our understanding of the molecular basis of the CF gene and its product, the *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR). This knowledge can now be applied to develop new therapeutic strategies. However, important questions remain to be solved, i. e., little is known about the pathways that link the malfunctioning of the CFTR protein with the observed clinical phenotype. This review briefly touches on CF genetics as it applies to lung disease and will focus on the current hypotheses of CFTR (dys)function and its impact on pulmonary fluid homeostasis. New treatment options that target the molecular basis of the disease will be discussed.

**Serienherausgeber: C. Witt, U. Costabel**

#### Institutsangaben

Schwerpunkt Pneumologie/Allergologie, Zentrum der Inneren Medizin I,  
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität

#### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Thomas O.F. Wagner · Pneumologie/Allergologie · Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität ·  
Theodor-Stern-Kai 7 · 60590 Frankfurt am Main · E-mail: t.wagner@em.uni-frankfurt.de

#### Bibliografie

Pneumologie 2005; 59: 811–818 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York  
DOI 10.1055/s-2005-91557  
ISSN 0934-8387

## Einleitung

Die Mukoviszidose (syn.: Cystische Fibrose, CF) stellt mit einer Häufigkeit von etwa 1 auf 2500 Geburten die häufigste autosomal rezessive und frühletale Erkrankung der westlichen Gesellschaft dar [1]. Noch vor wenigen Jahrzehnten verstarb die Mehrzahl der Patienten in den ersten Lebensjahren an den Folgen ausgeprägter Mangelernährung und rezidivierender bronchopulmonaler Infektionen. Durch konsequenten und frühzeitigen Einsatz symptom-orientierter Therapieregime konnte in den vergangenen Jahrzehnten der Gesundheitszustand der Patienten wesentlich verbessert und eine dramatische Zunahme der Lebenserwartung erreicht werden. Während 1980 das mittlere Lebensalter der CF-Patienten in Deutschland noch unter 10 Jahren betrug, ist die Lebenserwartung heute bereits weit in den Bereich des Erwachsenenalters fortgeschritten. Im Jahr 2003 erreichte die Mehrzahl der in Deutschland registrierten 6000 CF-Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 18,7 Jahren bereits die Volljährigkeit, wobei der Median der Überlebenswahrscheinlichkeit auf über 36 Jahre anstieg (Abb. 1) [2].

Während die Mangelernährung durch die Verfügbarkeit potenter rekombinanter Pankreasenzyme beherrschbar wurde, kann die Ausbildung der pulmonalen Veränderungen durch die bestehenden Behandlungskonzepte bisher nur verzögert werden. Weiterhin versterben über 80% der CF-Patienten an den Folgen respiratorischer Insuffizienz [3]. Da eine Angleichung von Lebensqualität und -erwartung der Betroffenen gegenüber Gesunden durch alleinige Optimierung konservativer Maßnahmen nicht möglich erscheint, besteht dringender Bedarf an neuen, kausal orientierten Behandlungskonzepten.

Der folgende Beitrag möchte einen Überblick über die molekularen Veränderungen geben, welche aus dem CF-Gendefekt resultieren. Dabei soll besonders auf den funktionellen Defekt des CF-Genprodukts, des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) eingegangen und die Auswirkungen auf die endobronchiale Homöostase dargestellt werden. Aus diesem Wissen ableitbare Therapiestrategien werden diskutiert. Bezüglich de-

taillierter Informationen zur klinischen Manifestation und etablierten Therapie der CF-Erkrankung, verweisen wir auf die aktuelle Literatur [4–6].

## Pathophysiologie

### CF-Gendefekt

Das CF-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosom 7 lokalisiert, umspannt ca. 250 kb und besteht aus 27 Exons, welche für ein membranständiges Protein aus 1480 Aminosäuren kodieren [7,8]. Bisher wurden 1388 unterschiedliche CF assoziierte Mutationen auf diesem Gen identifiziert und dem CF-Genetic Analysis Consortium gemeldet ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr), Abfragezeitpunkt: 30.06.2005). Trotz der großen Zahl an Mutationen wurden bei deutschen CF-Patienten nur 10 Mutationen mit einer Häufigkeit von >0,1% identifiziert (Tab. 1). Dabei stellt die sog.  $\Delta F508$ -Mutation mit 48,4% homozygoten und 16,6% heterozygoten Patienten die weitaus häufigste Veränderung dar, wobei sich regional/ethnisch deutlich abweichende Verteilungen ergeben können [2,9].

Der Krankheitswert der unterschiedlichen Mutationen im CF-Gen wird durch deren Auswirkung auf Transkription, Proteinbiosynthese und Funktionalität des Genprodukts CFTR, einem cAMP-abhängigen Chloridionenkanal auf der apikalen Zellmembran, bestimmt. Dabei können die verschiedenen Mutationen fünf CFTR-Defektklassen zugeordnet werden (Abb. 2). Mutationen der Klasse I verursachen einen vorzeitigen Abbruch der Transkription (sog. *stopp-* oder *nonsense*-Mutationen), wodurch instabile, verkürzte Proteine entstehen oder die CFTR-Proteinsynthese vollständig aufgehoben wird [10]. Die Mutationen der Klasse II bewirken eine fehlerhafte Aminosäurefolge (sog. Punkt- oder *missense*-Mutationen), welche zu veränderter Sekundär- und Tertiärstruktur bei der Proteinreifung führen. Die Zelle selbst erkennt den fehlerhaften Aufbau der Proteine und führt sie einem Abbau zu, noch ehe sie ihren Bestimmungsort auf der apikalen Zellmembran erreichen [11]. Die  $\Delta F508$ -Mutation gehört dieser Gruppe an, wobei sie eine Deletion von 3 Basenpaaren bewirkt,

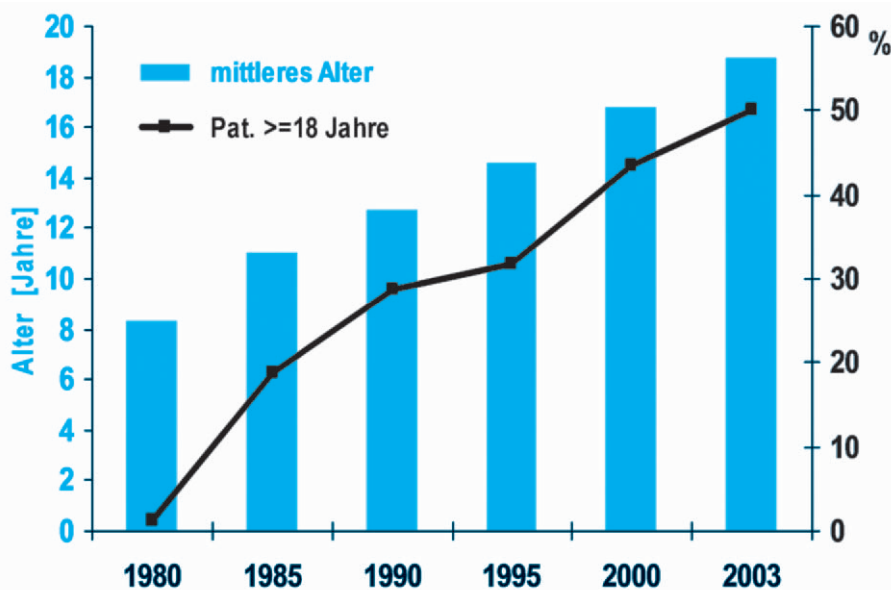


Abb. 1 Altersentwicklung der in Deutschland behandelten CF-Patienten von 1980 bis 2003 (mit freundlicher Genehmigung des Zentrums für Qualitätsmanagement im Gesundheitswesen, Ärztekammer Niedersachsen [2]).

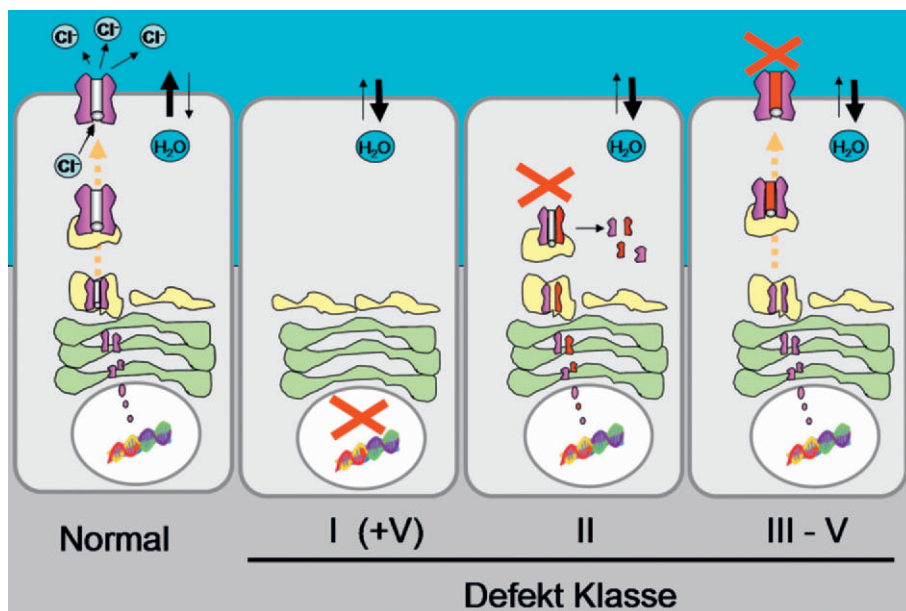


Abb. 2 Einteilung der CFTR-Mutationen in funktionelle Klassen. In der Wildtypzelle (Normal) wird das CF-Gen im Zellkern in mRNA umgeschrieben. Aus der mRNA wird im endoplasmatischen Retikulum CFTR synthetisiert, posttranslational modifiziert, und über den Golgiapparat zur apikalen Zellmembran transportiert. Dort dient CFTR als Kanal für Chloridionen und reguliert den extrazellulären Wasserhaushalt. Durch Mutation im CF-Gen wird die Transkription (Klasse I + V), Proteinbiosynthese (Klasse II) oder Funktion (Klasse III – V) des CFTR beeinträchtigt. Die Folge ist eine verminderte Sekretion von Chloridionen und freiem Wasser in den Extrazellulärraum.

Tab. 1 Verteilung und Klassifikation der 10 häufigsten CFTR Mutationen in Deutschland 2003 (modifiziert nach [2])

CFTR Mutation	identifizierte Mutationen	häufigste Mutationen							
		n	(%)	(%)	I	II	III	IV	V
					CFTR Mutationsklasse <sup>a</sup>				
$\Delta F508$	6593	65,8	88,0		X				
R553X	172	1,7	2,3	X					
G542X	160	1,6	2,1	X					
N1303K	154	1,5	2,0	X					
G551D	141	1,4	1,9			X			
R347P	100	1,0	1,3				X		
1717 -1G → A	61	0,6	0,8					X	
3849 + 10 Kb C → T	49	0,5	0,7	X					
W1282X	35	0,4	0,5	X					
R117H	25	0,3	0,4				X		
andere	524	5,1							
gesamt	n = 8014	79,9%	100%	7,6% <sup>b</sup>	88,0%	1,9%	1,7%	0,8%	

<sup>a</sup> Zur Einteilung der CFTR Mutationsklassen vergleiche Abb. 3.

<sup>b</sup> Anteil der CFTR Mutationsklasse an den 10 häufigsten Mutationen [%]

welche für Phenylalanin in Position aa508 kodieren. Wesentliche Bedeutung für die Erkennung und den Abbau von fehlerhaftem CFTR durch die Zelle scheint das sog. Ubiquitin-Proteasom-System zu haben [12], für dessen Aufklärung eine amerikanisch/israelische Arbeitsgruppe 2004 den Nobelpreis für Chemie erhielt [13]. Bei den Defekten der Klassen III und IV wird ein ausgereiftes CFTR-Protein synthetisiert und in der apikalen Zellmembran eingelagert, dessen Funktionstüchtigkeit allerdings durch Mutation kritischer Domänen vermindert ist (zumeist *missense*-Mutationen). Bei Klasse III finden sich Mutationen im Bereich der zwei ATP-Bindungsstellen des CFTR-Proteins. Die Folge ist eine verminderte oder aufgehobene cAMP-vermittelte Regulation der Io-

nenkanalfunktion [14]. Bei der Klasse IV ist die Regulation der CFTR-Kanäle erhalten, jedoch wird deren Leitfähigkeit durch Mutationen in den transmembranösen Domänen behindert [15]. Mutationen der Klasse V bewirken (z.B. durch *frameshift*-Mutation) ein alternatives posttranskriptionelles Splicing, welches zur Synthese und Expression instabiler und/oder funktionell minderwertiger CFTR-Proteine beiträgt [16]. Kürzlich wurde vorgeschlagen, die Klasse V mit der Klasse I zu vereinigen, da aus beiden eine reduzierte mRNA-Synthese resultiert [17].

Wichtig ist, dass es sich bei der Klassifizierung der Mutationen letztlich nur um ein Verständnismodell handelt, wobei in der Realität spezifische Mutationen die Charakteristika mehrerer Klassen aufweisen können. Obwohl die unterschiedlichen Mutationsklassen keine direkte Aussage über den Verlauf der CF-Erkrankung gestatten, korreliert ein ausgeprägter Mangel an funktionstüchtigem CFTR (zumeist der Klassen I–III) mit der Ausbildung einer Pankreasinsuffizienz, während pankreassuffiziente Patienten in der Regel mindestens eine milde Mutation der Klassen IV oder V, mit vermutlich noch relevanter Menge an funktionstüchtigem CFTR-Protein aufweisen [18, 19]. Im Gegensatz zur Pankreasfunktion besteht für die Schwere der Lungenerkrankung in der Regel keine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp. Dieses Phänomen wird eindrücklich beim Vorliegen homozygoter  $\Delta F508$ -Mutationen verdeutlicht, deren Träger ein großes Spektrum unterschiedlicher Latenzzeiten und Schweregrade bei der Entstehung der Lungenerkrankung aufweisen [20]. Die mangelnde Korrelation bekannter Mutationen mit dem phänotypischen Krankheitsbild stützt die Vermutung der Bedeutung von Umweltfaktoren sowie des individuellen genetischen Hintergrunds. Letzterer wird derzeit intensiv auf der Suche nach sog. *modifier*-Genen erforscht [21]. Dabei handelt es sich um hypothetische Gene, welche einen modifizierenden Einfluss auf den Effekt der Mutationen im CF-Genlokus ausüben. Bisher wurden durch sog. *candidate selection* überwiegend *modifier*-Gene mit einer Bedeutung bei der pulmonalen Immunabwehr (z.B. Mannose binding lectin [MBL] Gen) [22] und Inflammation (Tumor necrose faktor alpha [TNF $\alpha$ ] Gen) [23] identifiziert, wobei eine verminderte *MBL*- bzw. erhöhte *TNF $\alpha$* -Transkription/Prö-

teinsynthese proportional zu der Schwere der pulmonalen Erkrankung war. Es besteht die Hoffnung, in Zukunft durch Einsatz genomweiter Screeningverfahren (z. B. Genarrays) bzw. globaler Protein-Expressionsanalysen (z. B. Proteomics) weitere Gene und Proteine mit modifizierenden Funktionen auf den CF-Erkrankungsverlauf zu identifizieren.

### CFTR-Pathie

Die CF-Erkrankung führt zu Veränderungen an phylogenetisch und funktionell unterschiedlichen Organsystemen. Allen gemeinsam ist jedoch die Expression von CFTR-Protein. Betroffen sind vor allem die Schweißdrüsen, das Pankreas, der Intestinaltrakt, die sekretorischen Geschlechtsorgane sowie die Atemwege. Letztere sind bei der Geburt von CF-Patienten normal angelegt und voll funktionsfähig. Auch histopathologisch lassen sich initial allenfalls diskret erweiterte Ausführungsgänge der submukösen Drüsen erkennen [24]. Dennoch ist die Beteiligung und Zerstörung der Lungen im Verlauf wesentlich verantwortlich für die vermehrte Morbidität und Mortalität der CF-Patienten. Charakteristisches Frühsymptom ist die Retention eines hochviskosen Mukus, welcher der Erkrankung den Namen *Mukoviszidose* gab. Der Sekretverhalt in den Atemwegen disponiert zu bakterieller Besiedelung und chronischer Inflammation, und es wird angenommen, dass sich diese Prozesse gegenseitig durch einen *circulus vitiosus* unterhalten und verstärken. Durch chronische Entzündung und episodische Infektexazerbationen kommt es zu einem Remodelling der Atemwege mit Ausbildung von schweren Bronchiektasen, emphysematöser Parenchymdestruktion und Ausbildung einer terminalen respiratorischen Insuffizienz (Abb. 3).

Während sowohl die genetischen Grundlagen als auch die pathophysiologische Endstrecke der CF-Lungenerkrankung inzwischen gut untersucht sind, wird das Phänomen des Übergangs eines molekularbiologischen CFTR-Defekts in eine klinisch manifeste Lungenerkrankung (Abb. 3, unterbrochene Linie) weiter-

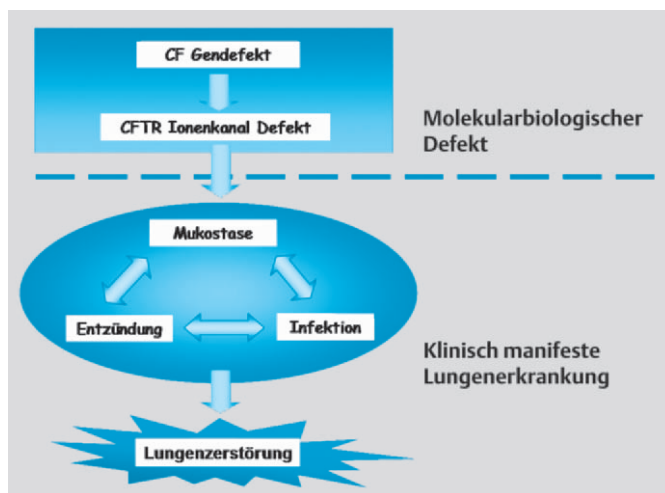


Abb. 3 Schema zur Pathophysiologie der CF-Lungenerkrankung. Die unterbrochene Linie markiert den Übergang des molekularbiologischen Defekts in eine histomorphologisch manifeste Organerkrankung.

hin kontrovers diskutiert. Ein histomorphologisches Charakteristikum der Atemwege ist deren Auskleidung mit zilienträgendem sekretorischem Epithel. Aufgabe der Zilien ist, den von submukösen Drüsen und Becherzellen produzierten Mukus aufzulagern (sog. Gelpase) und durch aktiven, konzertierten Flimmerschlag nach aboral zu transportieren. Es wird angenommen, dass es sich hierbei um eine wesentliche mechanische Komponente der angeborenen, körpereigenen Abwehr handelt, da inhierte Fremdkörper, Schadstoffe oder Mikroorganismen in der Gelpase gebunden und durch mukoziliäre Clearance aus der Lunge entfernt werden [25]. In diesem Modell kommt der Flüssigkeitsphase, welche die Zilien umgibt (sog. Solphase; engl.: periciliary liquid layer, PCL) wesentliche funktionelle Bedeutung zu. Die PCL trägt die auf ihr schwimmende Gelpase und ermöglicht durch niedrige Viskosität den Zilienschlag gegen einen nur geringen Widerstand (Abb. 4a) [26].

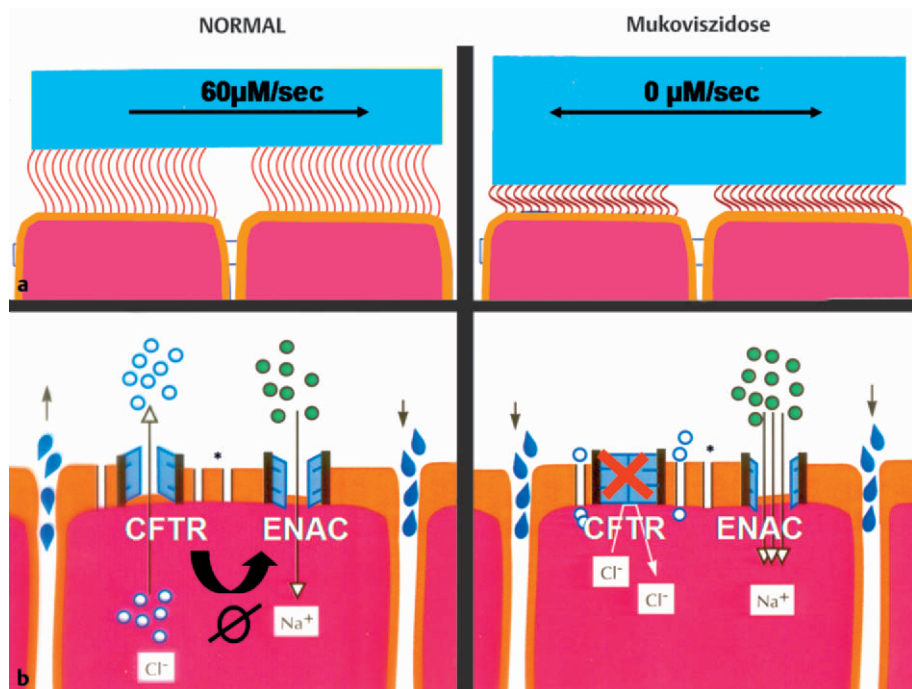


Abb. 4 Zellmodell der low volume Hypothese. a, Im Vergleich zum Gesunden ist die PCL bei der Mukoviszidose vermindert. Die visköse Gelpase sinkt bis auf das Atemwegsepithel ab und behindert den Zilienschlag. Es resultiert eine endobronchiale Mukostase. b, Beim Gesunden transportiert das CFTR-Protein Chloridionen vom Zytosol in die PCL, Wasser folgt passiv nach. Eine weitere Aufgabe von CFTR ist die Inhibition von ENaC, wodurch die Rückresorption von Natriumionen und Wasser reduziert wird. Der Mukoviszidose liegt ein (funktioneller) Verlust von CFTR zugrunde. In der Bilanz überwiegt die Resorption von Ionen und Wasser und es kommt zu einer isotonen Dehydrierung der PCL. (\*) symbolisiert weitere alternative Ionenkanäle (z. B. CaCC, ClC-2).



Während initial postuliert wurde, dass der CFTR-Defekt die Produktion einer primär abnormal viskösen Gelphase bedingt (sog. *abnormal gland*-Hypothese) [27,28], setzt sich inzwischen international die Annahme durch, dass dem CFTR-Protein entscheidende Bedeutung bei Aufbau und Homöostase der Solphase zukommt [29]. Danach erfüllt das CFTR-Protein zwei wesentliche Aufgaben (Abb. 4b): Über seine Funktion als Ionenkanal in der apikalen, lumenwärts gerichteten Zellmembran werden Chloridionen aktiv aus der Zelle transportiert und in die Solphase abgegeben. Der entstehende osmotische Gradient bewirkt den passiven Nachstrom von freiem Wasser in den Extrazellulärraum. Weiterhin wird dem CFTR-Protein eine Rolle als Regulator für alternative Ionenkanäle zugeschrieben, wobei eine besondere Bedeutung in der Inhibierung von Kanälen mit gegenläufiger Funktion gesehen wird. Der am besten untersuchte Kanal, welcher vom CFTR-Protein reguliert/inhibiert wird, ist der sog. epitheliale Natriumkanal (ENaC) [30]. Dieser pumpt Natriumionen aktiv von der Solphase in das Zytosol, wodurch eine Rückresorption von freiem Wasser bewirkt wird. Somit wird das Volumen und die Homöostase der Solphase durch einen Regelkreis aus Sekretion und Resorption von Ionen gewahrt, welcher durch das CFTR-Protein kontrolliert wird.

Die sog. *low volume* Hypothese, welche wesentlich auf die Arbeiten von R. Boucher zurückgeht, postuliert, dass der CFTR-Defekt bei verminderter Sekretion und enthemmter Rückresorption von Ionen eine negative Flüssigkeitsbilanz im Extrazellulärraum bewirkt [31]. Die Folge ist eine isotone Dehydrierung mit relativem Verlust der Solphase, bei gleichzeitig erhöhter Viskosität der Gelphase. Letztere sinkt in den perizilären Raum ab und behindert den Zilienschlag. Da eine verminderte mukoziliäre Clearance durch alternative mechanische Abwehrmechanismen (z. B. vermehrte Hustenstöße) nur unvollständig kompensiert werden kann, resultiert eine Mukostase bzw. -retention. Diese prädisponiert zur Besiedelung mit Bakterien und der Ausbildung einer chronischen Infektion und Inflammation [25].

### Therapiekonzepte zur Wiederherstellung der pulmonalen Homöostase bei CF

Obwohl es sich bei den gegenwärtigen Therapieansätzen zur Unterbrechung des *circulus vitiosus* von Obstruktion, Infektion und Inflammation um rein symptomatische Ansätze handelt, besteht doch kein Zweifel daran, dass der dramatische Anstieg der Lebenserwartung bei CF Patienten in den vergangenen Jahrzehnten auf diese Therapieansätze zurückzuführen ist. Wie neue Studien zeigen, kann die rekombinant hergestellte Dornase alpha (Pulmozyme®) nicht nur die Viskosität des Sputums durch enzymatischen Abbau von hochmolekularer DNA (aus Neutrophilenzerfall) vermindern, sondern auch die Rate an Atemwegsinfektionen reduzieren und die chronische Inflammation der Atemwege verzögern [32–34]. Der Einsatz von Antibiotika ist nur sinnvoll, wenn bereits eine Infektion eingetreten ist. Studien zur prophylaktischen Dauertherapie mit Staphylokokken-wirksamen Antibiotika bei CF-Patienten zeigten zwar prospektiv eine reduzierte Besiedelung der Atemwege mit Staphylokokkus aureus, prädisponierten jedoch zu frühzeitiger Besiedelung mit *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) und blieben letztlich ohne klinischen Nutzen für die Patienten [35,36]. Die bei der

Mehrzahl der erwachsenen Patienten auftretende Besiedelung mit *P. aeruginosa* kann auch durch optimierten Einsatz verfügbarer Antibiotika bisher nicht eradiziert werden [37,38]. Infolge chronischer Infektion und Inflammation kommt es zu einem irreversiblen Remodelling und schließlich zu einer Zerstörung der Atemwege. Bei Ausbildung einer respiratorischen Insuffizienz stellt eine Lungentransplantation die *ultima ratio* dar [39].

Eine kausal-orientierte CF-Therapie müsste deutlich vor der Entstehung klinisch manifester Veränderungen einsetzen, d. h. sie sollte bereits im Bereich der molekularbiologischen Veränderungen aktiv sein. In der gegenwärtigen Forschung lassen sich drei potenziell geeignete Behandlungsstrategien unterscheiden:

- Reparatur des Gendefekts
- Rescue von CFTR-Produktion und/oder Funktion
- sowie Modifikation alternativer Ionenkanäle.

#### Reparatur des Gendefekts

Seit Entdeckung des CFTR-Gens 1989 wurde die Möglichkeiten einer postpartalen Genreparatur durch Transfektion erkrankter Zellen propagiert. Da der pulmonale Phänotyp bei der CF-Erkrankung im Vordergrund steht und CFTR im Bereich der Atemwege von lumenwärts gerichteten Zellen exprimiert wird, stellt der Gentransfer über Aerosole ein attraktives Behandlungskonzept dar. Wesentliche Bedingung eines erfolgreichen Transfers ist die Verfügbarkeit geeigneter Vektoren. Bisher konnte insbesondere nach Transfektion mit adenoviralen Vektoren eine CFTR-Genexpression an ausdifferenzierten CF-Zellkulturen [40], sowie *in vivo* im Bereich der oberen [41] und unteren [42] CF-Atemwege gezeigt werden. Eine Vielzahl klinischer Studien wies aber als wesentliche Hürden eine mangelnde Transfektionseffizienz und Wirkdauer, sowie teilweise erhebliche entzündliche Reaktionen im Empfängergewebe nach [43]. Bei dauerhafter Anwendung wird die Transfektionseffizienz durch Bildung spezifischer Antikörper weiter reduziert [44,45]. Ein möglicher Ausweg könnte in der Verwendung von adeno-assoziierten Viren [46], oder nicht-viralen Vektoren [47,48] bestehen, welche mit einer deutlich geringeren immunologischen/entzündlichen Wirtsreaktion einhergehen. Auch die vektor-freie Applikation kompakterer DNA befindet sich in klinischer Erprobung [49].

Die fetale Gentherapie [50,51] sowie der Einsatz von Stammzellen [52] eröffnet attraktive Behandlungsmöglichkeiten, allerdings müssen in diesem Sektor neben den technischen Herausforderungen auch erhebliche ethische Bedenken berücksichtigt werden.

#### Rescue von CFTR-Produktion/-Funktion

Ziel dieses Ansatzes ist es, den Defekt im CF-Gen durch pharmakologische Aktivierung endogener CFTR-Produktion bzw. Funktion auszugleichen. Die nachfolgenden Therapiekonzepte bauen unmittelbar auf den oben vorgestellten CFTR-Defektklassen I–V auf.

Mit den so genannten *Korrektoren* wird versucht, mutationsbedingte Fehler bei der Transkription, Synthese oder dem intrazellulären Transport von CFTR-Protein auszugleichen. In einer Reihe von experimentellen und klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass der vorzeitige Abbruch der Transkription bei (Stopp-)mutationen der Klasse I durch Aminoglycoside wie z. B.

Gentamicin (topisch oder systemisch) verhindert werden kann [53,54]. Bei Defekten der Klasse II, insbesondere aufgrund von  $\Delta F508$ -Mutationen, wird bereits synthetisiertes CFTR von der Zelle als fehlerhaft erkannt und über das Ubiquitin-Proteasom System abgebaut. Durch Hemmung dieses Abbaus, z.B. mittels Phenylbutyraten, könnte eine vermehrte Expression von mutiertem CFTR erreicht werden [55,56]. Messungen an isolierten Membranen lassen vermuten, dass exprimiertes CFTR eine signifikante Restfunktion entfalten und somit die CF-Erkrankung günstig beeinflussen könnte [57]. Besonderes Interesse fand in jüngster Zeit die in Currymischungen enthaltene Substanz Curcumin, welche als Inhibitor der Ubiquitin-Ligase (Enzym E3) die Poliubiquitylation und den nachfolgenden Abbau von  $\Delta F508$  CFTR reduzieren kann [58]. In einer Studie am CF-Mausmodell konnte die gestörte Chloridionenleitfähigkeit durch Curcumin teilweise wiederhergestellt werden [59]. Diese günstigen Ergebnisse konnten allerdings durch eine unabhängige Nachfolgestudie nicht bestätigt werden [60]. Derzeit wird die Wirksamkeit und Sicherheit von Curcumin in einer klinischen Phase-II-Studie untersucht.

Durch Einsatz sog. *Potentiatoren* soll die verminderte Aktivität bzw. Chloridionenleitfähigkeit des membranständigen CFTR Proteins der Defektklassen III – IV (beziehungsweise der korrigierten Klasse II) wiederhergestellt werden. Bisher identifizierte Potentioren beinhalten Flavonoidderivate (z.B. Genistein) [61], sowie Phosphodiesterase-Inhibitoren [62], welche den CFTR-Kanal durch Erhöhung intrazellulärer cAMP Spiegel aktivieren. Bei der Suche nach wirksamen Potentioren wird besondere Hoffnung auf sog. *high-throughput screening* Programme gelegt. Dabei werden unter Verwendung von Analyseautomaten eine große Zahl von Wirkstoffen oder chemisch verwandten Substanzen mit isolierten Zellen mit CFTR-Defekt inkubiert. Anschließend können z.B. Veränderungen zellulärer CFTR-Funktion, Entzündungsmarker, oder die Adhäsion von Bakterien analysiert werden [63]. Im Rahmen eines von der amerikanischen Cystic Fibrosis Foundation (CFF) geförderten Pilotprojektes konnten aus vier Millionen gescreenten Substanzen mehrere sog. *compounds* identifiziert werden, welche *in vitro* die Ionenleitfähigkeit von  $\Delta F508$ -CFTR günstig beeinflussten [64]. Studien zur klinischen Wirksamkeitstestung sind in Vorbereitung (vgl. [www.cff.org/research/](http://www.cff.org/research/)).

### Modifikation alternativer Ionenkanäle

Da neben dem CFTR-Protein auch ein Reihe alternativer Ionenkanäle an der Regulation der PCL beteiligt sind, erscheint eine pharmakologische Einflussnahme auf deren Funktion ein gangbarer Weg, um den CFTR-Defekt zu kompensieren.

Attraktiv erscheint die Hemmung des oben beschriebenen ENaC-Kanals, wodurch die exzessive Rückresorption von Natriumionen und freiem Wasser aus der PCL verhindert werden könnte. Als Beleg für die Richtigkeit dieses Ansatzes lassen sich Patienten mit sog. *Pseudohypaldosteronismus* anführen: Sie weisen infolge eines endogenen ENaC-Defektes ein vermehrtes PCL-Volumen sowie eine gesteigerte mukoziliäre Clearance auf [65]. Im Gegensatz dazu entwickeln gentechnisch modifizierte Mäuse mit ENaC-Überexpression CF ähnliche Lungenveränderungen mit vermindertem PCL Volumen und Retention eines hochviskösen Mukus [66]. Ein relativ spezifischer ENaC-Hemmer steht mit

Amilorid, einer bisher als Kalium-sparendes Diuretikum verwendeten Substanz, zur Verfügung. Während die ENaC-inhibierende Wirkung von Amilorid *in vitro* gesichert ist, kommen die bisherigen klinischen Studien mit inhaliertem Amilorid zu unterschiedlichen Ergebnissen, insbesondere eine kontrollierte Phase-III-Studie konnte keinen klinisch messbaren Nutzen für die behandelten Patienten nachweisen [67]. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Wirksamkeit von Amilorid *in vivo* sind die zu geringe Potenz und kurze Halbwertszeit (20–30 min), so dass derzeit intensiv an der Entwicklung chemisch modifizierter bzw. optimierter ENaC Inhibitoren geforscht wird [29,68]. Inzwischen wurden eine Reihe von alternativen Chloridkanälen entdeckt, deren pharmakologische Stimulation evtl. den defekten (cAMP-aktivierten) CFTR-Kanal kompensieren könnte. Dabei handelt es sich um Chloridkanäle, welche durch Spannung (sog. ClC-2), Volumen (sog. VRAC), oder Calciumionen (sog. CaCC) reguliert werden [69]. Zurzeit befinden sich verschiedene *in vitro* aktive Stimulatoren dieser Kanäle in der klinischen Prüfung (z.B. SPI-8811, Moli1901) [70,71]. Besondere Hoffnung wird in jüngster Zeit auch auf die Stimulation von zellmembran-ständigen Purinrezeptoren (P2Y2) gesetzt. Die bisher beschriebenen Effekte der P2Y2 Liganden (z.B. uridine-5'-triphosphate [UTP]) beinhalten die Stimulation von CaCC bei gleichzeitiger Hemmung des ENaC [72,73], vermehrte Muzinsekretion [74], erhöhte Zilienschlagfrequenz [75], sowie eine vermehrte Surfactantproduktion durch Alveolar Typ-II-Zellen [76]. Ein metabolisch stabilisierter, synthetischer P2Y2-Agonist, Denufosal (INS 37217) befindet sich derzeit in klinischer Prüfung [77].

Abschließend soll die Möglichkeit Ionenkanal-unabhängiger Hydrierung der PCL durch Inhalation osmotisch aktiver Substanzen Erwähnung finden. Am besten wurde bisher hypertones Kochsalz untersucht [78,79], die Zulassung einer inhalativen Präparation mit 7% NaCl (w/v in H<sub>2</sub>O) steht in den USA unmittelbar bevor. Wirkprinzip ist eine Flüssigkeitsverschiebung vom Epithel in das Atemwegslumen, um die isotonen Verhältnisse der PCL wieder herzustellen. Dieser Effekt ist aber nur von kurzer Dauer, da NaCl aktiv von den Epithelzellen rückresorbiert wird (insbesondere vor dem Hintergrund enthemmter ENaC-Funktion bei CF) [80]. Eine Steigerung der Inhalationsfrequenz wird jedoch aufgrund Reizung der Atemwege sowie einem hohen zeitlichen Inhalationsaufwand erfahrungsgemäß von den Patienten nicht toleriert. Eine Alternative stellen kationische (z.B. Kalium) oder anionische (z.B. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) Osmolyte dar, welche von den Atemwegszellen nicht resorbiert werden [29]. Weitere, nicht-ionische Osmolyte, welche bisher in Studien untersucht wurden, sind die Zuckersubstanzen Mannitol und Xylitol [81], sowie der Zuckerpolymer Dextran [82,83]. Interessanterweise konnte für Dextran *in vitro* auch eine Reduzierung der Bindung von *P. aeruginosa* an respiratorisches Epithel gezeigt werden [84]. Allen untersuchten Osmolytika ist gemeinsam, dass sie sich zur Inhalation eignen, unbegrenzt verfügbar und kostengünstig sind, sowie eine gute Verträglichkeit aufweisen.

### Ausblick

Mit zunehmendem Lebensalter der CF-Patienten wird der Anteil pulmonaler Komplikationen in Zukunft überproportional zunehmen. Dieses Phänomen kann durch alleinige Optimierung beste-

hender Therapieelemente nicht verhindert werden. Insbesondere in den 90er-Jahren ist es durch beispielhaften Einsatz multidisziplinärer Forschung gelungen, die molekularen Grundlagen der CF-Erkrankung zu verstehen. Dieses Wissen steht jetzt als Basis für die Entwicklung innovativer Behandlungsstrategien zur Verfügung. Ziel für das beginnende 21. Jahrhundert muss sein, einen Paradigmenwechsel von der symptomatischen hin zu einer kausalen Therapie zu erreichen. Die CF-Gentherapie stellt weiterhin den alleinigen kurativen Ansatz und somit das Fernziel der Therapie dar. Es ist aber damit zu rechnen, dass das vorgestellte Konzept der funktionellen bzw. pharmakologischen CFTR-Korrektur bereits mittelfristig besondere Bedeutung erlangen wird. Auch eine Differenzierung des Patientenkollektivs nach Gen- bzw. CFTR-Defekten könnte in Zukunft die Entwicklung von verbesserten, individualisierten Behandlungskonzepten ermöglichen.

Für die Kliniker besteht eine wichtige Aufgabe darin, aus einer zunehmend umfangreichen Pipeline experimenteller Therapieansätze geeignete Kandidaten zu selektionieren und deren Wirksamkeit und Verträglichkeit bei CF-Patienten durch klinische Prüfung zu sichern. Um die benötigten kontrollierten, multizentrischen Studien auch in Deutschland und Europa durchführen zu können, erscheint es dringend notwendig, kompetente CF-Behandlungseinrichtungen zu einem Forschungsverbund zusammenzuschließen, ähnlich wie es in den USA mit dem Therapeutics Development Network (TDN) der CFF in den vergangenen Jahren geschehen ist.

## Literatur

- 1 Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003; 361: 681 – 689
- 2 Stern M, Sens B, Wiedemann B et al. Qualitätssicherung Mukoviszidose - Überblick über den Gesundheitszustand der Patienten in Deutschland 2003. Zentrum für Qualitätsmanagement im Gesundheitswesen Hannover, www.muco.info, 2004
- 3 Hirche TO, Smaczny C, Mallinckrodt C von et al. Pulmonale Manifestation der Mukoviszidose im Erwachsenenalter. *Dtsch Arztebl* 2003; 100: 264 – 270
- 4 Davies PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis: State of the Art. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1229 – 1256
- 5 Reinhardt D, Goetz M, Kraemer RH (Hrsg). *Cystische Fibrose*. Berlin: Springer, 2001
- 6 Kerem E, Conway S, Elborn S et al. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros* 2005; 4: 7 – 26
- 7 Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073 – 1080
- 8 Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059 – 1065
- 9 European respiratory society. *European lung white book* 2003. *ERSJ* 2003; 1: pp. 89 – 95
- 10 Tsui LC, Durie P. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Hosp Pract* 1997; 32: 115 – 134
- 11 Ward CL, Kopito RR. Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem* 1994; 269: 25710 – 25718
- 12 Ward CL, Omura S, Kopito RR. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 1995; 83: 121 – 127
- 13 Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 2003; 426: 895 – 899
- 14 Anderson MP, Welsh MJ. Regulation by ATP and ADP of CFTR chloride channels that contain mutant nucleotide-binding domains. *Science* 1992; 257: 1701 – 1704
- 15 Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS et al. Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl-channels with altered pore properties. *Nature* 1993; 362: 160 – 164
- 16 Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D et al. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem* 1999; 274: 21873 – 21877
- 17 Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F et al. Cystic fibrosis. In: Sciver CL, Sly WS, Valle D (Hrsg). *The molecular and metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 2001: pp. 5121 – 5188
- 18 Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. *N Engl J Med* 1993; 329: 1308 – 1313
- 19 Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 1995; 29: 777 – 807
- 20 Kerem E, Corey M, Kerem BS et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis – analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med* 1990; 323: 1517 – 1522
- 21 Davies JC, Griesenbach U, Alton E. Modifier genes in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2005; 39: 383 – 391
- 22 Garred P, Pressler T, Madsen HO et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1999; 104: 431 – 437
- 23 Hull J, Thomson AH. Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis. *Thorax* 1998; 53: 1018 – 1021
- 24 Chow CW, Landau LI, Taussig LM. Bronchial mucous glands in the newborn with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr* 1982; 139: 240 – 243
- 25 Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 2002; 109: 571 – 577
- 26 Matsui H, Randell SH, Peretti SW et al. Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces. *J Clin Invest* 1998; 102: 1125 – 1131
- 27 Jayaraman S, Joo NS, Reitz B et al. Submucosal gland secretions in airways from cystic fibrosis patients have normal [Na(+)] and pH but elevated viscosity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 8119 – 8123
- 28 Joo NS, Irokawa T, Wu JV et al. Absent secretion to vasoactive intestinal peptide in cystic fibrosis airway glands. *J Biol Chem* 2002; 277: 50710 – 50715
- 29 Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 2004; 23: 146 – 158
- 30 Voilley N, Galibert A, Bassilana F et al. The amiloride-sensitive Na+ channel: from primary structure to function. *Comp Biochem Physiol Physiol* 1997; 118: 193 – 200
- 31 Matsui H, Grubb BR, Tarran R et al. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 1998; 95: 1005 – 1015
- 32 Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH et al. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med* 1994; 331: 637 – 642
- 33 Quan JM, Tiddens HA, Sy JP et al. A two-year randomized, placebo-controlled trial of dornase alfa in young patients with cystic fibrosis with mild lung function abnormalities. *J Pediatr* 2001; 139: 813 – 820
- 34 Ratjen F, Paul K, Koningsbruggen S van et al. DNA concentrations in BAL fluid of cystic fibrosis patients with early lung disease: influence of treatment with dornase alpha. *Pediatr Pulmonol* 2005; 39: 1 – 4
- 35 Smyth A, Walters S. Prophylactic antibiotics for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 2: CD001912
- 36 Ratjen F, Comes G, Paul K et al. Effect of continuous antistaphylococcal therapy on the rate of *P. aeruginosa* acquisition in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2001; 31: 13 – 16
- 37 Breen L, Aswani N. Elective versus symptomatic intravenous antibiotic therapy for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2001; 4: CD002767
- 38 Doring G, Conway SP, Heijerman HG et al. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* 2000; 16: 749 – 767
- 39 Mallinckrodt C von, Smaczny C, Hirche TO et al. Lungtransplantation bei Mukoviszidose. *Atemw Lungentrkrh* 2005; 31: 64 – 70
- 40 Johnson LG, Boyles SE, Wilson J et al. Normalization of raised sodium absorption and raised calcium-mediated chloride secretion by adenovirus-mediated expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in primary human cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 1377 – 1382



- <sup>41</sup> Zabner J, Couture LA, Gregory RJ et al. Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 1993; 75: 207–216
- <sup>42</sup> Crystal RG, McElvaney NG, Rosenfeld MA et al. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet* 1994; 8: 42–51
- <sup>43</sup> Ferrari S, Griesenbach U, Geddes DM et al. Immunological hurdles to lung gene therapy. *Clin Exp Immunol* 2003; 132: 1–8
- <sup>44</sup> Yang Y, Li Q, Ertl HC et al. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol* 1995; 69: 2004–2015
- <sup>45</sup> Zabner J, Ramsey BW, Meeker DP et al. Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1996; 97: 1504–1511
- <sup>46</sup> Moss RB, Rodman D, Spencer LT et al. Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* 2004; 125: 509–521
- <sup>47</sup> Brzoska M, Langer K, Coester C et al. Incorporation of biodegradable nanoparticles into human airway epithelium cells-in vitro study of the suitability as a vehicle for drug or gene delivery in pulmonary diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318: 562–570
- <sup>48</sup> Ziady AG, Davis PB, Konstan MW. Non-viral gene transfer therapy for cystic fibrosis. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3: 449–458
- <sup>49</sup> Konstan MW, Davis PB, Wagener JS et al. Compacted DNA nanoparticles administered to the nasal mucosa of cystic fibrosis subjects are safe and demonstrate partial to complete cystic fibrosis transmembrane regulator reconstitution. *Hum Gene Ther* 2004; 15: 1255–1269
- <sup>50</sup> Luton D, Oudrhiri N, de Lagausie P et al. Gene transfection into fetal sheep airways in utero using guanidinium-cholesterol cationic lipids. *J Gene Med* 2004; 6: 328–336
- <sup>51</sup> Keswani SG, Crombleholme TM. Gene transfer to the tracheobronchial tree: implications for fetal gene therapy for cystic fibrosis. *Semin Pediatr Surg* 2004; 13: 44–52
- <sup>52</sup> Grove JE, Lutzko C, Priller J et al. Marrow-derived cells as vehicles for delivery of gene therapy to pulmonary epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 645–651
- <sup>53</sup> Howard M, Frizzell RA, Bedwell DM. Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med* 1996; 2: 467–469
- <sup>54</sup> Clancy JP, Bebok Z, Ruiz F et al. Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1683–1692
- <sup>55</sup> Zeitlin PL, Diener-West M, Rubenstein RC et al. Evidence of CFTR function in cystic fibrosis after systemic administration of 4-phenylbutyrate. *Mol Ther* 2002; 6: 119–126
- <sup>56</sup> Powell K, Zeitlin PL. Therapeutic approaches to repair defects in deltaF508 CFTR folding and cellular targeting. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 1395–1408
- <sup>57</sup> Pasyk EA, Foskett JK. Mutant (delta F508) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl-channel is functional when retained in endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 12347–12350
- <sup>58</sup> Zeitlin P. Can curcumin cure cystic fibrosis? *N Engl J Med* 2004; 351: 606–608
- <sup>59</sup> Egan ME, Pearson M, Weiner SA et al. Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* 2004; 304: 600–602
- <sup>60</sup> Song Y, Sonawane ND, Salinas D et al. Evidence against the rescue of defective DeltaF508-CFTR cellular processing by curcumin in cell culture and mouse models. *J Biol Chem* 2004; 279: 40629–40633
- <sup>61</sup> Illek B, Zhang L, Lewis NC et al. Defective function of the cystic fibrosis-causing missense mutation G551D is recovered by genistein. *Am J Physiol* 1999; 277: C833–C839
- <sup>62</sup> Kelley TJ, Thomas K, Milgram LJ et al. In vivo activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutant deltaF508 in murine nasal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2604–2608
- <sup>63</sup> Galiotta LV, Jayaraman S, Verkman AS. Cell-based assay for high-throughput quantitative screening of CFTR chloride transport agonists. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: C1734–C1742
- <sup>64</sup> Lee T. Scientific report-Seventeenth annual north american cystic fibrosis conference. online: [www.cysticfibrosismedicine.com](http://www.cysticfibrosismedicine.com). 2003
- <sup>65</sup> Kerem E, Bistrizter T, Hanukoglu A et al. Pulmonary epithelial sodium-channel dysfunction and excess airway liquid in pseudohypoadosteronism. *N Engl J Med* 1999; 341: 156–162
- <sup>66</sup> Mall M, Grubb BR, Harkema JR et al. Increased airway epithelial Na<sup>+</sup> absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med* 2004; 10: 487–493
- <sup>67</sup> Graham A, Hasani A, Alton EW et al. No added benefit from nebulized amiloride in patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1993; 6: 1243–1248
- <sup>68</sup> Hirsh AJ, Sabater JR, Zamurs A et al. Evaluation of second generation amiloride analogs as therapy for cystic fibrosis lung disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 929–938
- <sup>69</sup> Nilius B, Droogmans G. Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand* 2003; 177: 119–147
- <sup>70</sup> Cuppoletti J, Tewari KP, Sherry AM et al. Activation of human ClC-2 Cl-channels: implications for cystic fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27: 896–900
- <sup>71</sup> Zeitlin PL, Boyle MP, Guggino WB et al. A phase I trial of intranasal Moli1901 for cystic fibrosis. *Chest* 2004; 125: 143–149
- <sup>72</sup> Benali R, Pierrot D, Zahm JM et al. Effect of extracellular ATP and UTP on fluid transport by human nasal epithelial cells in culture. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10: 363–368
- <sup>73</sup> Mall M, Wissner A, Gonska T et al. Inhibition of amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> absorption by extracellular nucleotides in human normal and cystic fibrosis airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 755–761
- <sup>74</sup> Lethem MI, Dowell ML, Scott M van et al. Nucleotide regulation of goblet cells in human airway epithelial explants: normal exocytosis in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9: 315–322
- <sup>75</sup> Morse DM, Smullen JL, Davis CW. Differential effects of UTP, ATP, and adenosine on ciliary activity of human nasal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C1485–C1497
- <sup>76</sup> Gobran LI, Xu ZX, Lu Z et al. P2u purinoceptor stimulation of surfactant secretion coupled to phosphatidylcholine hydrolysis in type II cells. *Am J Physiol* 1994; 267: L625–L633
- <sup>77</sup> Deterding R, Retsch-Bogart G, Milgram L et al. Safety and tolerability of denufosal tetrasodium inhalation solution, a novel P2Y2 receptor agonist: results of a phase 1/phase 2 multicenter study in mild to moderate cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2005; 39: 339–348
- <sup>78</sup> Robinson M, Hemming AL, Regnis JA et al. Effect of increasing doses of hypertonic saline on mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 1997; 52: 900–903
- <sup>79</sup> Ballmann M, Hardt H von der. Hypertonic saline and recombinant human DNase: a randomised cross-over pilot study in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2002; 1: 35–37
- <sup>80</sup> Tarran R, Grubb BR, Parsons D et al. The CF salt controversy: in vivo observations and therapeutic approaches. *Mol Cell* 2001; 8: 149–158
- <sup>81</sup> Zabner J, Seiler MP, Launsbach JL et al. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 11614–11619
- <sup>82</sup> Feng W, Garrett H, Speert DP et al. Improved clearability of cystic fibrosis sputum with dextran treatment in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 710–714
- <sup>83</sup> Bryan R, Feldman M, Jawetz SC et al. The effects of aerosolized dextran in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *J Infect Dis* 1999; 179: 1449–1458
- <sup>84</sup> Barghouthi S, Guerdoud LM, Speert DP. Inhibition by dextran of *Pseudomonas aeruginosa* adherence to epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1788–1793