

ANALYSE DER SERUMLIBERATION FETALER  
FIBRONEKTIN-VARIANTEN BEI PATIENTEN  
MIT PULMONALER HYPERTONIE MITTELS ELISA

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Michelle Roßberg

geboren am 01.06.1995 in Neuhaus am Rennweg

Gutachter:

1. apl. Prof. Dr. med. Marcus Franz, Jena
2. PD Dr. med. Alexander Pfeil, Jena
3. Prof. Dr. Dr. med. Christian Jung, Düsseldorf

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18.11.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>8</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen: Epidemiologie und Bedeutung.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Pulmonale Hypertonie.....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Definition und Epidemiologie .....	10
1.2.2 Klassifikation .....	11
1.2.3 Pathogenese .....	14
1.2.4 Symptomatik.....	18
1.2.5 Diagnostik.....	18
1.2.6 Therapie .....	19
<b>1.3 Die kardiale extrazelluläre Matrix.....</b>	<b>20</b>
1.3.1 Funktion und Struktur.....	20
1.3.2 Zell-Matrix-Interaktionen im Myokard.....	21
1.3.3 Myokardiales Remodelling .....	22
<b>1.4 Fibronektin.....</b>	<b>25</b>
1.4.1 Bedeutung und Spleißvarianten.....	25
1.4.2 Expression und Funktion von ED-A <sup>+</sup> - und ED-B <sup>+</sup> -Fibronektin.....	26
1.4.3 Reexpression fetaler Fibronektinvarianten im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen .....	27
1.4.4 Fetale Fibronektinvarianten als potenzielle Biomarker des pulmonalvaskulären Remodellings.....	30
<b>1.5 ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay.....</b>	<b>32</b>
<b>1.6 Zielstellung der Arbeit .....</b>	<b>34</b>
<b>2 Material.....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Verwendete Serum- und Gewebeproben.....</b>	<b>35</b>
2.1.1 Patienten mit pulmonaler Hypertonie unterschiedlicher ätiologischer Klassen.....	35
2.1.2 Humane Gewebeschnitte für immunhistochemische Untersuchungen .....	36
<b>2.2 Chemikalien, Materialien und Geräte.....</b>	<b>36</b>

---

<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Etablierung eines ELISAs zum Nachweis von ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin .....</b>	<b>40</b>
3.1.1	Grundprinzip des ED-B <sup>+</sup> -Fibronektin-ELISAs .....	40
3.1.2	Inkubationen, Verdünnungen und Waschschrte im ELISA .....	41
3.1.3	Standardreihe und Leerwert .....	41
3.1.4	Testung des geeigneten Primärantikörpers.....	42
3.1.5	Testung der geeigneten Probenverdünnung .....	43
3.1.6	Protokoll des finalen ED-B <sup>+</sup> -Fibronektin-ELISAs.....	43
<b>3.2</b>	<b>Immunfluoreszenz-Analysen zur Verifizierung der Antikörper-Spezifität für den ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-ELISA.....</b>	<b>44</b>
3.2.1	Grundlagen .....	44
3.2.2	Durchführung .....	45
3.2.3	Auswertung am Mikroskop .....	46
<b>3.3</b>	<b>ELISA zum Nachweis von ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin .....</b>	<b>46</b>
<b>3.4</b>	<b>Quantifizierung der Serumkonzentration von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie .....</b>	<b>47</b>
<b>3.5</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Etablierung eines ELISAs zum Nachweis von ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin .....</b>	<b>49</b>
4.1.1	Grundprinzip des ED-B <sup>+</sup> -Fibronektin-ELISAs .....	49
4.1.2	Testung des geeigneten Primärantikörpers.....	50
4.1.3	Testung der geeigneten Probenverdünnung .....	51
4.1.4	Kontrolle der Spezifität des ED-B <sup>+</sup> -Fibronektin-ELISAs .....	51
<b>4.2</b>	<b>Immunfluoreszenz-Detektion von ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin im Gewebe.....</b>	<b>52</b>
<b>4.3</b>	<b>Quantifizierung von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin in humanen Serumproben von Patienten mit pulmonaler Hypertonie.....</b>	<b>54</b>
4.3.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs mit pulmonaler Hypertonie.....	54
4.3.2	Quantifizierung von ED-A <sup>+</sup> - und ED-B <sup>+</sup> -Fibronektin im Serum.....	58
4.3.3	Korrelation der ED-A <sup>+</sup> - und ED-B <sup>+</sup> -Fibronektin-Konzentration zu klinischen, laborchemischen und echokardiografischen Parametern .....	61
4.3.4	Prädiktive Wertigkeit von ED-A <sup>+</sup> -Fibronektin für das Vorliegen einer pulmonalen Hypertonie .....	71

<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>72</b>
<b>5.1</b>	<b>Etablierung eines ELISAs zum Nachweis von ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin .....</b>	<b>72</b>
5.1.1	Vorarbeiten zur Etablierung eines ED-A <sup>+</sup> -Fibronektin-ELISAs.....	72
5.1.2	Etablierung eines nicht-kompetitiven, indirekten ED-B <sup>+</sup> -Fibronektin-ELISAs.....	73
5.1.3	Immunfluoreszenz-Analysen zur Verifizierung der Antikörper-Spezifität für den ED-B <sup>+</sup> -Fibronektin-ELISA.....	74
5.1.4	Sensitivität des neu etablierten ED-B <sup>+</sup> -Fibronektin-ELISAs .....	75
<b>5.2</b>	<b>Quantifizierung der Serumkonzentration von ED-A<sup>+</sup>- im Vergleich zu ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie .....</b>	<b>76</b>
5.2.1	Pulmonale Hypertonie als heterogene Erkrankung mit hoher Mortalität.....	76
5.2.2	Quantifizierung der Serumkonzentrationen von ED-A <sup>+</sup> - und ED-B <sup>+</sup> -Fibronektin in der Gesamtpopulation der Patienten mit pulmonaler Hypertonie .....	77
5.2.3	Quantifizierung der Serumkonzentration von ED-A <sup>+</sup> -Fibronektin in unterschiedlichen ätiologischen Subgruppen der pulmonalen Hypertonie .....	81
<b>5.3</b>	<b>Korrelation von ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin zu klinischen, laborchemischen und echokardiografischen Parametern.....</b>	<b>85</b>
5.3.1	Klinische Korrelationsanalysen.....	85
5.3.2	Laborchemische Korrelationsanalysen.....	87
5.3.3	Korrelationsanalysen zu echokardiografischen Parametern.....	90
<b>5.4</b>	<b>Limitationen der Konzentrationsbestimmungen von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin im Rahmen dieser Arbeit .....</b>	<b>93</b>
5.4.1	Limitationen des Patientenkollektivs .....	93
5.4.2	Messtechnische und untersuchungsmethodische Limitationen.....	94
<b>5.5</b>	<b>ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin als potenzieller Biomarker und Zielstruktur für antikörperbasierte Therapiekonzepte .....</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>100</b>
	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>102</b>
	<b>Anlagen .....</b>	<b>122</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>123</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>124</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>125</b>

## Abkürzungsverzeichnis

### Eigene Abkürzungen

**Anmerkung:** Bei Abkürzungen aus dem Englischen und Nichtübereinstimmung der Abkürzung mit der deutschen Definition wird zuerst die englische Bedeutung in kursiv und dahinter in Klammern die deutsche Bedeutung angegeben (\*).

$\alpha$	alpha
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
$\beta$	beta
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BMPR	<i>bone morphogenetic protein receptor</i>
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>
bzw.	beziehungsweise
cECM	<i>cardiac extracellular matrix</i>
CF	<i>cardiac fibroblasts</i>
cFn	zelluläres Fibronectin
CI	Konfidenzintervall
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomografie
CTEPH	<i>chronic thromboembolic pulmonary hypertension</i>
CVD	<i>cardiovascular disease(s)</i> (kardiovaskuläre Erkrankung(en)) *
Cy3	Cyanin 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
ED-A <sup>+</sup>	Extradomäne A
ED-A <sup>+</sup> -Fn	ED-A <sup>+</sup> -Fibronectin
ED-B <sup>+</sup>	Extradomäne B

ED-B <sup>+</sup> -Fn	ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ET	Endothelin
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FC	<i>functional class</i>
Fn	Fibronectin
g	Erdbeschleunigung = Gravitationsfeldstärke = 9,81 m/s <sup>2</sup>
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HZV	Herzzeitvolumen
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
K <sub>A</sub>	Affinitätskonstante
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase(n)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomografie
MyoFb	Myofibroblasten
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
NT-proBNP	<i>N-terminal pro-brain natriuretic peptide</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OD	optische Dichte
OR	<i>Odds Ratio</i>
p	<i>probability</i> (Wahrscheinlichkeit) *
PAH	pulmonalerterielle Hypertonie
PAP	<i>pulmonary arterial pressure</i> (pulmonalerterieller Druck) *
PAPm	<i>mean pulmonary arterial pressure</i> (mittlerer pulmonalerterieller Druck) *

---

PAWP	<i>pulmonary arterial wedge pressure</i> (pulmonalarterieller Verschlussdruck) *
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung) *
pFn	plasmatisches Fibronektin
PH	pulmonale Hypertonie
PVR	<i>pulmonary vascular resistance</i> (pulmonaler Gefäßwiderstand) *
RAA	<i>right atrial area</i> (rechtsatriale Fläche) *
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
RR	Blutdruck (nach Riva-Rocci)
SD	Standardabweichung
SIP	<i>small immunoprotein(s)</i>
Tab.	Tabelle
TAPSE	<i>tricuspid annular plane systolic excursion</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung) *
TGF- $\alpha$	<i>transforming growth factor-alpha</i> ( $\alpha$ )
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-beta</i> ( $\beta$ )
TIMP	<i>tissue inhibitors of matrix metalloproteinases</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TTE	transthorakale Echokardiografie
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell(s)</i> (glatte Gefäßmuskelzelle(n)) *
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation) *
IIICS	<i>type III homology connecting segment</i>
6MWD	<i>six-minute walking distance</i> (6-Minuten-Gehstrecke) *

## Einheiten

**Anmerkung:** Die Umrechnung in die jeweilige SI-Einheit (Internationales Einheitensystem) wird hinter den betreffenden Einheiten in eckigen Klammern angegeben.

°C	Grad Celsius	
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter	
g	Gramm	[1 g = 1 · 10 <sup>-3</sup> kg]
Gpt	Gigapartikel	[1 Gpt = 10 <sup>9</sup> Partikel]
kg	Kilogramm	
l	Liter	
m <sup>2</sup>	Quadratmeter	
M	Molar	[1 Molar = 1 mol / l]
mg	Milligramm	[1 mg = 1 · 10 <sup>-6</sup> kg]
min	Minute/n	
ml	Milliliter	[1 ml = 1 · 10 <sup>-3</sup> l]
µl	Mikroliter	[1 µl = 1 · 10 <sup>-6</sup> l]
mm	Millimeter	[1 mm = 1 · 10 <sup>-3</sup> m]
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule	[1 mmHg = 133,322 Pa]
mmol	Millimol	[1 mmol = 1 · 10 <sup>-3</sup> mol]
µmol	Mikromol	[1 µmol = 1 · 10 <sup>-6</sup> mol]
nm	Nanometer	[1 nm = 1 · 10 <sup>-9</sup> m]
pg	Pikogramm	[1 pg = 1 · 10 <sup>-15</sup> g]

## Zusammenfassung

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine ätiologisch und klinisch heterogene Erkrankungsgruppe, deren gemeinsames hämodynamisches Merkmal ein Anstieg des mittleren pulmonalarteriellen Drucks über 25 mmHg ist. Durch die rasche Progression der Erkrankung und unzureichende kausale Therapiestrategien ist die PH mit einer sehr schlechten Prognose und hohen Mortalitätsraten assoziiert. Pathogenetisch manifestiert sich die PH durch multifaktorielle Gewebsumbauprozesse in den pulmonalen Gefäßstrukturen sowie im Myokard, welche sich als vaskuläres und myokardiales *Remodelling* subsumieren lassen. Neben multiplen Veränderungen auf zellulärer Ebene vollzieht sich hierbei eine strukturelle und funktionelle Reorganisation der kardialen extrazellulären Matrix (cECM), welche die Reexpression fetaler Formen zellulärer Adhäsionsproteine wie Fibronektin (Fn) inkludiert. Es existieren verschiedene Fn-Molekülvarianten, da es durch alternatives *Splicing* der prä-mRNA zum Ein- oder Ausschluss sogenannter Extradomänen kommt, deren Expression sich in Abhängigkeit vom Entwicklungsstatus des Herzens verändert. Es liegt eine Überexpression in kritischen Phasen der Herz-Organogenese vor, während die genannten Spleißvarianten im gesunden, adulten Myokard nahezu nicht detektiert werden können. In Assoziation zu multiplen Herz-Kreislauf-Erkrankungen kommt es jedoch bei Erwachsenen zu einem Wiederauftreten der fetalen Fn-Varianten mit extrazellulärer Deposition und Liberation in die Zirkulation, wodurch sie sich als potenzielle Biomarker kardiovaskulärer Gewebsumbauprozesse oder therapeutische *Targets* eignen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die beiden funktionell bedeutsamen Fn-Varianten ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn, welche im Rattenmodell der induzierten pulmonalen Hypertonie interessante Regulationen zeigten, als mögliche Serumbiomarker bei PH-Patienten unterschiedlicher Ätiologie zu untersuchen. Hierbei ist die Analytik der zirkulierenden Proteinfraction für das Verständnis des Fn-Matrixumbaus essenziell. Ein *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) zum Nachweis von ED-A<sup>+</sup>-Fn wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe (AG) entwickelt und durch Untersuchungen an verschiedenen Patientenkollektiven wurde eine Hypothese zur zentralen Rolle von ED-A<sup>+</sup>-Fn für kardiovaskuläre *Remodelling*-Prozesse generiert. ED-B<sup>+</sup>-Fn ist hingegen aus der Tumorbilogie als Marker der entzündungsassoziierten Angiogenese und Stromaaktivierung bekannt, der Einfluss auf kardiovaskuläre Pathologien ist jedoch wenig exploriert, was unter anderem dem Fehlen kommerzieller *Tools* zur quantitativen Erfassung von ED-B<sup>+</sup>-Fn im Serum geschuldet ist. Die vorliegende Arbeit zentrierte sich daher auf die Etablierung eines bislang nicht verfügbaren ELISAs zur Detektion von ED-B<sup>+</sup>-Fn in humanen Serumproben. Es handelte sich hierbei um einen gelatinebasierten, nicht-kompetitiven, indirekten

ELISA, wobei die Detektion der Extradomäne-B<sup>+</sup> (ED-B<sup>+</sup>) durch den domänenspezifischen Antikörper C6 erfolgte. Im Anschluss wurden ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn unter Anwendung beider ELISA-Protokolle als potenzielle Serumbiomarker bei Patienten mit PH untersucht. Das im Zentrum der Arbeit stehende Studienkollektiv bestand aus 80 PH-Patienten unterschiedlicher ätiologischer Klassen nach ESC-Leitlinie 2015, denen 40 Kontrollpatienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko gegenübergestellt wurden.

Ein Gruppenvergleich der ELISA-Daten zwischen der Gesamtheit der PH-Patienten und den Kontrollen zeigte für die an PH erkrankten Patienten eine signifikant höhere Serumkonzentration von ED-A<sup>+</sup>-Fn ( $p = 0,001$ ), nicht jedoch von ED-B<sup>+</sup>-Fn ( $p = 0,722$ ). Bei differenzierter Betrachtung der ELISA-Daten in den ätiologisch verschiedenen PH-Klassen blieb eine signifikante Erhöhung der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumlevel gegenüber Kontrollen lediglich für die ätiologischen Klassen I (pulmonalarterielle Hypertonie;  $p = 0,032$ ), II (PH bei Linksherzerkrankung;  $p = 0,007$ ) und III (PH bei Lungenerkrankung;  $p = 0,001$ ) erhalten. Für die PH-Klasse IV (chronisch thrombembolische PH) zeigten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,156$ ). Weiterführend wurde geprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen den erhobenen ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumspiegeln und bereits etablierten, nichtinvasiven Methoden zur Diagnostik und Verlaufskontrolle der PH gibt. Hierbei konnte eine positive Korrelation zum Herzinsuffizienzmarker BNP ( $r = 0,310$ ;  $p = 0,002$ ), zum Inflammationsmarker Interleukin-6 ( $r = 0,370$ ;  $p = 0,005$ ) sowie zum echokardiografisch ermittelten systolischen pulmonalarteriellen Druck ( $r = 0,364$ ;  $p < 0,001$ ) nachgewiesen werden. Ein inverser Zusammenhang ergab sich mit der 6-Minuten-Gehstrecke ( $r = -0,275$ ;  $p = 0,020$ ). Um schlussendlich die prädiktive Wertigkeit von ED-A<sup>+</sup>-Fn zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer PH zu testen, wurde eine logistische Regressionsanalyse mit zehn potenziell relevanten Patientencharakteristika durchgeführt. Von jenen zehn Kovariaten konnte neben einer chronischen Niereninsuffizienz (OR = 8,866; CI = 1,779 – 44,187;  $p = 0,008$ ) und dem Inflammationsmarker CRP (OR = 1,194; CI = 1,011 – 1,410;  $p = 0,037$ ) lediglich ED-A<sup>+</sup>-Fn (OR = 1,045; CI = 1,011 – 1,080;  $p = 0,009$ ) als unabhängiger Prädiktor für das Vorhandensein einer PH identifiziert werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die erhobenen Befunde insbesondere ED-A<sup>+</sup>-Fn als vielversprechenden neuen Biomarker mit möglicher Bedeutung sowohl im Rahmen der initialen Diagnosestellung und ätiologischen Einordnung als auch zur Risikostratifizierung von PH-Patienten qualifizieren. Eine darüberhinausgehende Rolle als therapeutisches *Target* gilt es in weiteren Studien zu evaluieren. Das neu entwickelte ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISA-Protokoll konnte als valide Methode zur Detektion und Quantifizierung von ED-B<sup>+</sup>-Fn verifiziert werden und steht damit für eine breite Anwendung im Rahmen weiterführender Analysen zur Verfügung.

# 1 Einleitung

## 1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen: Epidemiologie und Bedeutung

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) stellen weltweit die Haupttodesursache und damit eine immense makroökonomische Belastung für die Gesundheitssysteme aller Länder dar. Fast 18 Millionen Menschen verstarben 2016 an CVD, was 31% aller weltweiten Todesfälle entspricht. 85% dieser Todesfälle sind ätiologisch auf Myokard- oder Zerebralinfarkte rückführbar (WHO 2017). Innerhalb der letzten zehn Jahre ist außerdem ein Anstieg der weltweiten Todesfälle durch CVD um circa 12,5% zu verzeichnen, was hauptsächlich durch den demografischen Wandel inklusive des konstanten Bevölkerungswachstums und der stetigen Alterung der Bevölkerung bedingt ist. Infolgedessen nimmt die absolute Zahl der CVD-Todesfälle in den meisten Regionen der Welt zu, obwohl die altersspezifische CVD-Mortalität sogar abnimmt (Joseph et al. 2017). Mindestens drei Viertel der Todesfälle durch CVD treten aufgrund mangelhafter Primär- und Sekundärprophylaxe sowie erschwertem Zugang zu wirksamen und gerechten Gesundheitsleistungen in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen auf (WHO 2017).

## 1.2 Pulmonale Hypertonie

### 1.2.1 Definition und Epidemiologie

Der Lungenkreislauf zeichnet sich physiologischerweise durch einen niedrigen intravaskulären Druck und einen geringen Gefäßwiderstand aus (Kovacs et al. 2009). Verschiedene Pathologien, welche mit einem Druckanstieg im Lungenkreislauf verbunden sind, werden unter dem Begriff pulmonale Hypertonie (PH) zusammengefasst. PH bezeichnet damit keine eigenständige Diagnose, sondern einen hämodynamischen Zustand, der durch einen Anstieg des mittleren pulmonalarteriellen Drucks (PAPm) von mindestens 25 mmHg gekennzeichnet ist, welcher in Ruhe mittels Rechtsherzkatheter erhoben wird (Hoepfer et al. 2013). Laut aktueller Datenlage beträgt der normale PAPm im Ruhezustand  $14 \pm 3$  mmHg mit einer oberen Normgrenze von 20 mmHg (Kovacs et al. 2009). Die klinische Relevanz eines PAPm zwischen 21 und 24 mmHg ist derzeit umstritten, sollte aber mindestens zur engmaschigen Überwachung der betroffenen Patienten führen (Hoepfer et al. 2013). Seit dem sechsten Weltsymposium für PH 2018 wird aufgrund erhöhter Mortalität und Morbidität bereits ab einem PAPm über 20 mmHg eine Neudefinition der PH mit herabgesetztem Schwellenwert vorgeschlagen (Simonneau et al. 2019), deren klinischer Mehrwert jedoch aufgrund des Risikos der Überdiagnostik mit folglich psychologischer Belastung der Patienten und möglicher Übertherapie kontrovers diskutiert wird (Gibbs und Torbicki 2019) und in weiteren prospektiven Studien evaluiert werden muss.

Mit einer geschätzten Prävalenz von 1% der Weltbevölkerung, die in der Altersgruppe der über 65-Jährigen bis auf 10% ansteigt, ist die PH ein erhebliches globales Gesundheitsproblem (Hoeper et al. 2016b). Hinsichtlich Inzidenz und Prävalenz gibt es zwischen den differenten ätiologischen PH-Klassen erhebliche Unterschiede. Die epidemiologische Datenlage ist deutlich konsistenter in Bezug auf die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH) und die chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) im Vergleich zu PH aufgrund von Linksherz- oder Lungenerkrankungen (Hoeper et al. 2017). 2014 betrug die Inzidenz für PAH in Deutschland beispielsweise 3,9 pro 1 Million Erwachsene und die Prävalenz 25,9 pro 1 Million Erwachsene. Die PAH-Inzidenz ist bei Frauen deutlich höher als bei Männern mit einem Geschlechterverhältnis von Frauen zu Männern von 4,3 : 1 (Walker et al. 2006), doch die geschätzte Fünf-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung wird laut REVEAL-Register mit 52% bei Männern und 62% bei Frauen eingestuft (Shapiro et al. 2012). Als potenzielle Ursachen dieser geschlechtsspezifischen Unterschiede kommen einerseits ein signifikant höherer PAPm bei Männern zum Diagnosezeitpunkt (Badesch et al. 2010) und andererseits ein verbessertes Ansprechen der Frauen auf die Behandlungsmöglichkeiten oder eine protektive Wirkung weiblicher Sexualhormone in Betracht (Mair et al. 2014). Das durchschnittliche Diagnosealter für PAH ist in Deutschland in den letzten Jahren stetig gestiegen und liegt derzeit bei 65 Jahren (Hoeper et al. 2016a). In fast allen Teilen der Welt sind jedoch Linksherz- und Lungenerkrankungen die Hauptgründe für die Entwicklung einer PH. Bezogen auf Deutschland kann angenommen werden, dass circa 50% der Patienten mit Linksherzerkrankungen im Verlauf eine PH entwickeln, was sich in etwa mit der Prävalenz der PH infolge von Lungenerkrankungen deckt. Der überwiegende Anteil betroffener Patienten lebt jedoch in Entwicklungsländern, in denen die Erkrankung zudem häufiger mit angeborenen Herzkrankheiten und schweren Infektionskrankheiten wie HIV oder Schistosomiasis in Verbindung gebracht wird und daher bereits vor dem 65. Lebensjahr klinisch in Erscheinung tritt (Hoeper et al. 2016b).

### 1.2.2 Klassifikation

Seit 1998 wird eine klinische Klassifikation der PH anhand zugrundeliegender pathogenetischer Mechanismen, hämodynamischer Merkmale und therapeutischem Management vorgenommen (Simonneau et al. 2013), welche zuletzt 2018 im Zuge des sechsten Weltsymposiums für PH in Nizza aktualisiert wurde (Simonneau et al. 2019). Nach dieser Einteilung werden fünf verschiedene PH-Klassen unterschieden (siehe Tab. 1). Klasse I bezeichnet die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH), welche hauptsächlich auf der Basis vaskulären *Remodellings* entsteht. Diese Subgruppe ist hämodynamisch durch das Vorliegen einer präkapillären PH charakterisiert und wird durch einen endexpiratorischen pulmonalarteriellen Verschlussdruck (PAWP)

≤ 15 mmHg sowie einen pulmonalen Gefäßwiderstand (PVR) > 3 Wood-Einheiten in Abwesenheit anderer Ursachen für präkapilläre PH definiert (Hoepfer et al. 2013, Galiè et al. 2016). Klasse II steht für die PH bei zugrundeliegenden Linksherzerkrankungen und wird hämodynamisch den postkapillären PH-Klassen zugeordnet, da es hierbei zu einem Rückstau des Blutes vom linken Herzen in die Lunge kommt (siehe Tab. 2). PH-Klasse III geht wiederum auf Lungenerkrankungen zurück (Galiè et al. 2016). Von den bisher genannten ätiopathogenetisch abzugrenzen ist die PH-Klasse IV, welche primär aufgrund Obstruktion der pulmonalen Gefäßstrukturen durch chronische Thrombembolien mit resultierenden Perfusionsdefiziten entsteht (Lang et al. 2013). Die PH-Klasse V schließt alle unklaren und multifaktoriell bedingten Formen ein. Die Einteilung nach ESC-*Guidelines* 2015 ist hinsichtlich klinischer, hämodynamischer und histopathologischer Merkmale mit der Nizza-Klassifikation von 2018 konform, sub-spezifiziert diese lediglich (Galiè et al. 2016).

**Tab. 1: Klassifikation der pulmonalen Hypertonie.** Adaptiert nach ESC-*Guidelines* 2015 (Galiè et al. 2016) und Nizza-Klassifikation 2018 (Simonneau et al. 2019).

<b>Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (PH)</b>	
<b>1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)</b>	
1.1 Idiopathisch	
1.2 Hereditär	1.2.1 BMPR2-Mutation 1.2.2 ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3 1.2.3 Unbekannt
1.3 Durch Medikamente oder Toxine verursacht	
1.4 Assoziiert mit...	1.4.1 Bindegewebserkrankungen 1.4.2 HIV-Infektion 1.4.3 Portaler Hypertension 1.4.4 Angeborenen Herzerkrankungen 1.4.5 Schistosomiasis
1.5 PAH-Langzeit-Responder für Kalziumkanalblocker	
<b>1' Pulmonale veno-okklusive Erkrankungen (PVOD) und / oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH)</b>	
1'.1 Idiopathisch	
1'.2 Hereditär	1'.2.1 EIF2AK4-Mutation 1'.2.2 Andere Mutationen
1'.3 Durch Medikamente, Toxine oder Strahlung verursacht	
1'.4 Assoziiert mit...	1'.4.1 Bindegewebserkrankungen 1'.4.2 HIV-Infektion
<b>1'' Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)</b>	
<b>2. Pulmonale Hypertonie infolge von Linksherzerkrankungen</b>	
2.1 PH aufgrund Herzinsuffizienz mit erhaltener LVEF	
2.2 PH aufgrund Herzinsuffizienz mit reduzierter LVEF	
2.3 Valvuläre Erkrankungen	

2.4 Angeborene / erworbene Linksherz-Einflusstrakt-/-Ausflusstrakt-Obstruktionen und angeborene Kardiomyopathien	
2.5 Angeborene / erworbene Pulmonalvenenstenose	
<b>3. Pulmonale Hypertonie infolge von Lungenerkrankungen und / oder Hypoxie</b>	
3.1 Obstruktive Lungenerkrankungen	
3.2 Restriktive Lungenerkrankungen	
3.3 Andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktivem und obstruktivem Muster	
3.4 Schlafbezogene Atemstörungen	
3.5 Alveoläre Hypoventilationsstörungen	
3.6 Chronische Höhenexposition	
3.7 Entwicklungsstörungen der Lunge	
<b>4. Chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) und andere pulmonalarterielle Obstruktionen</b>	
4.1 Chronisch thrombembolische PH	
4.2 Andere pulmonalarterielle Obstruktionen	4.2.1 Sarkom (hoch- oder mittelgradig) oder Angiosarkom
	4.2.2 Andere maligne Tumoren (renal, uterin, Keimzelltumoren des Hodens, weitere)
	4.2.3 Andere nichtmaligne Tumoren (Leiomyom des Uterus)
	4.2.4 Arteriitis ohne Bindegewebserkrankung
	4.2.5 Angeborene Pulmonalarterienstenose
	4.2.6 Parasiten (Hydatidose)
<b>5. Pulmonale Hypertonie mit unklarem und / oder multifaktoriellem Mechanismus</b>	
5.1 Hämatologische Erkrankungen: Chronische hämolytische Anämie, Myeloproliferative Erkrankungen	
5.2 Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, Pulmonale Langerhans-Zell-Histiozytose, Neurofibromatose	
5.3 Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeicherkrankheiten, Morbus Gaucher	
5.4 Andere Erkrankungen: Tumorbedingte Obstruktion, Fibrosierende Mediastinitis, Chronisches Nierenversagen, Segmentale PH	
5.5 Komplexe angeborene Herzkrankheiten	
<b>Abkürzungen:</b> ALK-1: <i>activin receptor-like kinase 1</i>   BMPR2: <i>bone morphogenetic protein receptor type 2</i>   CAV1: Caveolin 1   EIF2AK4: <i>eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4</i>   ENG: Endoglin   HIV: Humanes Immundefizienzvirus   KCNK3: <i>potassium channel subfamily K number 3</i>   LVEF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion   SMAD9: <i>mothers against decapentaplegic 9</i>	

**Tab. 2: Hämodynamische Einteilung der pulmonalen Hypertonie.** Adaptiert nach ESC-Guidelines 2015 (Galiè et al. 2016).

Definition	Hämodynamische Charakteristika	Klinische PH-Klassen (entsprechend Tab. 1)
<b>PH</b>	PAPm $\geq$ 25 mmHg	alle
<b>präkapilläre PH</b>	PAPm $\geq$ 25 mmHg PAWP $\leq$ 15 mmHg	1 Pulmonalarterielle Hypertonie 3 PH infolge Lungenerkrankungen 4 Chronisch thrombembolische PH 5 PH mit unklarem und / oder multifaktoriellem Mechanismus

<b>postkapilläre PH</b>	PAP <sub>m</sub> ≥ 25 mmHg PAWP > 15 mmHg	2 PH infolge Linksherzerkrankungen 5 PH mit unklarem und / oder multifaktoriellem Mechanismus
isolierte postkapilläre PH	DPG < 7 mmHg und / oder PVR ≤ 3 WU	
kombinierte prä- und postkapilläre PH	DPG ≥ 7 mmHg und / oder PVG > 3 WU	
<b>Abkürzungen:</b> DPG: <i>diastolic pressure gradient</i> (DPG = PAP <sub>diastolisch</sub> – PAWP <sub>mittel</sub> )   PAP <sub>m</sub> : <i>mean pulmonary arterial pressure</i>   PAWP: <i>pulmonary arterial wedge pressure</i>   PH: pulmonale Hypertonie   PVR: <i>pulmonary vascular resistance</i>   WU: <i>Wood units</i> (1 WU = 80 dyn · s · cm <sup>-5</sup> )		

Eine exakte diagnostische Einteilung der PH ist sowohl aus therapeutischer als auch aus prognostischer Sicht unerlässlich, da bei bestimmten PH-Formen wirksame Behandlungsoptionen bei anderen Formen ineffektiv oder gar nachteilig sein können (Hoepfer et al. 2017).

### 1.2.3 Pathogenese

Eine Vielzahl komplexer, heterogener pathologischer Entitäten sind an der Entstehung der PH beteiligt, welche jedoch alle durch obstruktive Umstrukturierungen der Lungengefäße mit resultierendem Anstieg des PAP und des PVR in einem progressiven Rechtsherzversagen als gemeinsamer Endstrecke resultieren. Dieser Krankheitsverlauf entsteht auf Basis einer Trias aus Vasokonstriktion, (Mikro-)Thrombosierung und pulmonalvaskulärem *Remodelling* (Huber et al. 2015, Rohm et al. 2017). Darüber hinaus ist die Hochregulation und perivaskuläre Infiltration von Entzündungszellen mitursächlich für die Entwicklung einer PH (siehe Abb. 1). Jahrzehntelange umfangreiche Studien zeigten, dass die komplexe Interaktion genetischer, epigenetischer und umweltbedingter Faktoren zu einer Dysregulation von Wachstumsfaktoren, Ionenkanälen, Hormonen und Zytokinen führt, die anschließend eine Kaskade von Signalwegen aktivieren, welche ihrerseits wiederum phänotypische Abnormalitäten vaskulärer Zellen verursachen (Huber et al. 2015, Humbert et al. 2019).

#### 1.2.3.1 Vasokonstriktion

Ein alleiniges Auftreten von Vasokonstriktion in Abwesenheit von Mikrothromben oder vaskulärem *Remodelling* kennzeichnet ein frühes, potenziell reversibles Erkrankungsstadium (Huber et al. 2015). Pathophysiologische Grundlage der Vasokonstriktion sind kardiopulmonale Reflexbögen, welche unter anderem durch Hypoxie (Euler-Liljestrand-Mechanismus) oder linksatriale Drucksteigerung (Hermo-Weiler-Reflex) getriggert werden (Arrigo und Huber 2013). Hypoxische Zustände führen über eine *Downregulation* zellulärer Kaliumkanalproteine zu einer Depolarisation glatter Gefäßmuskelzellen und einem Kalziumeinstrom nach intrazellulär, wodurch eine Vasokonstriktion in den Pulmonalarterien ausgelöst wird (Sommer et al.

2008). Hinzu kommt ein Ungleichgewicht vasoaktiver Faktoren zugunsten endogener vasokonstriktiver Mediatoren wie Endothelin-1 (ET-1) bei gleichzeitigem Mangel an essenziellen Vasodilatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklinen (Lai et al. 2014). Bei PAH-Patienten wurden im Vergleich zu Kontrollen erhöhte ET-1-Spiegel sowohl durch Deposition im Lungengewebe als auch in der Zirkulation nachgewiesen (Montani et al. 2007), deren Höhe mit der Schwere der pulmonalen Druckerhöhung korreliert (Rubens et al. 2001). Beweisend für das Defizit vasodilatativer Mediatoren wird bei PAH-Patienten eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO und Prostazyklinen sowie deren *Second Messengers* beobachtet, welche sowohl auf eine verminderte Syntheseleistung und Substratmangel als auch auf deren vorzeitigen Abbau zurückgeführt werden (Christman et al. 1992, Giaid und Saleh 1995).

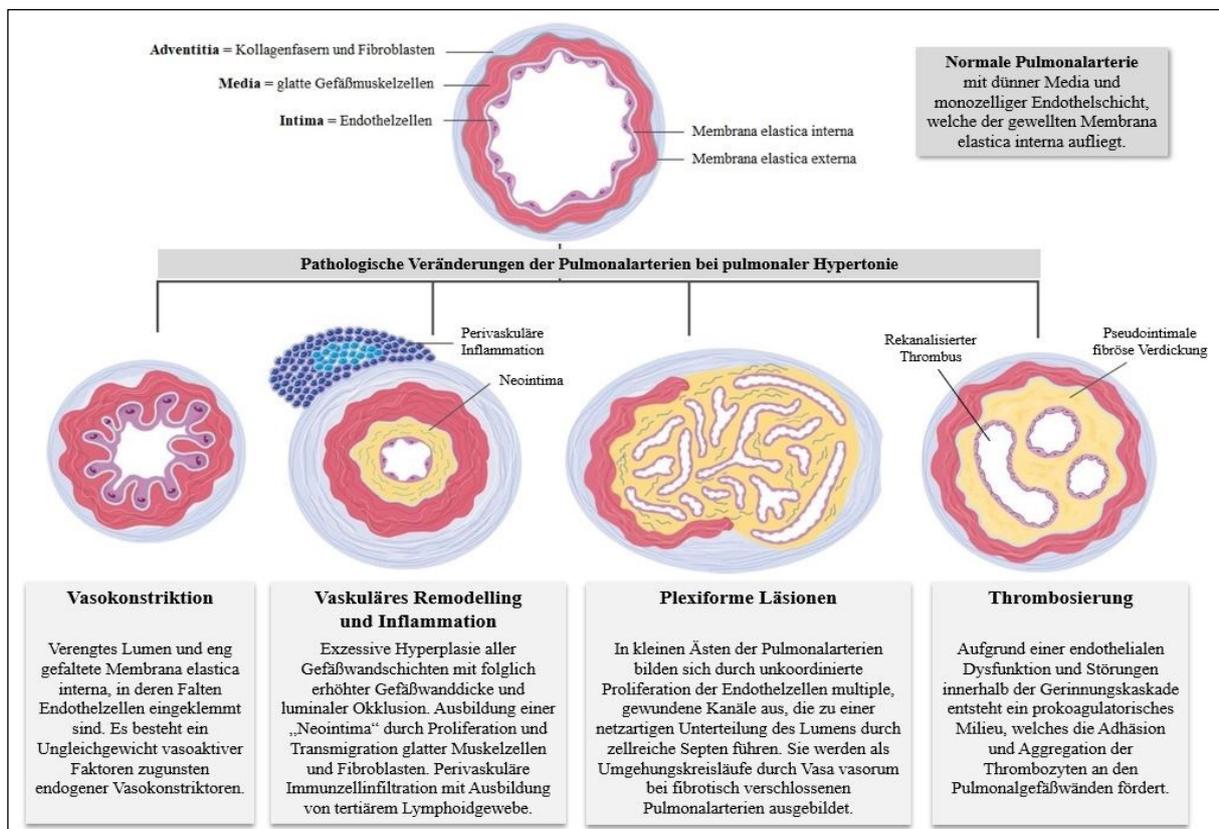
### 1.2.3.2 *In-situ-Thrombosierung*

Obwohl der Lungenkreislauf ein Niedrigdrucksystem mit Gefäßabschnitten mit regional niedrigen Flussraten ist, tritt eine *In-situ*-Thrombosierung unter physiologischen Bedingungen nicht auf, was darauf hindeutet, dass die gesunde Lunge über probate Mittel zur Verhinderung der intravaskulären Koagulation verfügt (Hoepfer et al. 1998). Im Rahmen der PH spielen Mikrothrombosen eine wichtige Rolle beim Fortschreiten der Erkrankung und treten insbesondere bei älteren Patienten mit langem Krankheitsverlauf auf (Huber et al. 2015). Zurückgeführt werden sie auf eine Dysfunktion der Endothelzellen und deren Interaktion mit Thrombozyten und Wachstumsfaktoren, wodurch ein prokoagulatorisches Milieu im Lungengefäßbett entsteht (Mandegar et al. 2004). In mehreren Studien wurden bei PH-Patienten verschiedene Koagulopathien wie ein Mangel an Protein C und S mit folglich reduzierter endogener Antikoagulation oder eine Erhöhung der Von-Willebrand-Faktor-Aktivität mit prokoagulatorischen Effekten nachgewiesen (Welsh et al. 1996, Hoepfer et al. 1998). Des Weiteren kommt es zur gesteigerten Freisetzung plättchenstimulierender Mediatoren wie Thrombin, Thromboxan-A<sub>2</sub> oder Serotonin. Möglicherweise werden durch diese homöostatischen Störungen innerhalb der Gerinnungskaskade die Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten an den Pulmonalgefäßwänden stimuliert, welche ihrerseits bereits durch die erhöhten intravasalen Drücke im Rahmen der PH vorgeschädigt sind. Die Thrombozytenaktivierung kann zur Thrombusbildung führen und spielt dadurch wiederum eine entscheidende Rolle bei der Stimulation der Vasokonstriktion und Zellproliferation, indem vasoaktive Substanzen und Mitogene freigesetzt werden. Defekte in Fibrinolyse-Kaskaden können diesen Prozess weiter aggravieren (Mandegar et al. 2004). Die Tatsache, dass Langzeittherapien mit oralen Antikoagulantien oder Prostazyklinen die Überlebensrate von PH-Patienten verbessern, unterstreicht die Beteiligung der *In-situ*-Thrombosierung am Entstehungsprozess der PH (Chaouat et al. 1996, Mandegar et al. 2004).

### 1.2.3.3 Pulmonalvaskuläres Remodelling

Der pathologische Umbau der Lungengefäßstrukturen ist gekennzeichnet durch ein komplexes Zusammenspiel von unkontrollierter Proliferation, Resistenz gegenüber Apoptose, somatischer Instabilität, verändertem Zellmetabolismus und klonaler Vermehrung und damit vermutlich der wichtigste Faktor in der Pathogenese der PH (Soubrier et al. 2013). Alle vaskulären Zelltypen, also Endothelzellen, glatte Muskelzellen und adventitielle Fibroblasten, sind an den *Remodelling*-Prozessen beteiligt. Schlussendlich kommt es dadurch zu einem exzessiven Zellwachstum in allen drei Gefäßwandschichten, wovon überwiegend arterielle, aber auch venöse pulmonale Gefäße betroffen sind (Tuder et al. 2013, Huber et al. 2015). Die Intima wird durch Akkumulation von Myofibroblasten (MyoFb) und extrazellulären Matrixproteinen zur sogenannten „Neointima“ umstrukturiert (Perros et al. 2005). Des Weiteren bilden sich durch unkoordiniert proliferierende Endothelzellen intraluminal plexiforme Läsionen aus, welche kleine, glomerulumartige Gefäßballen darstellen, die zu einer netzartigen Unterteilung des Lumens durch zellreiche Septen führen und als pathognomonisch für PAH gelten (Tuder et al. 1994, Huber et al. 2015). Obwohl der initiale Auslöser der Endothelveränderungen unbekannt ist, werden hämodynamische Scherkräfte, reaktive Sauerstoffspezies, Toxine und Entzündungsmediatoren als wichtige Modulatoren der endothelialen Dysfunktion anerkannt (Guignabert und Dorfmueller 2013). Die auffälligsten Veränderungen betreffen die Media der Pulmonalgefäße und sind durch ein Ungleichgewicht pro-proliferativer und apoptotischer Aktivitäten glatter Gefäßmuskelzellen, deren Transdifferenzierung zu MyoFb sowie deren Migration in die Endothelzellschicht charakterisiert. Innerhalb der Adventitia kommt es zu einer erhöhten Produktion von Matrixproteinen, einer Neovaskularisation der Vasa vasorum und einer erheblichen Immunzellinfiltration (Perros et al. 2005, Lai et al. 2014). Auf molekularer Ebene sind zahlreiche Transkriptions-, Ionenkanal- und Wachstumsfaktoren sowie Mitogene, Zytokine, Neurotransmitter und Viren in die vaskulären *Remodelling*-Prozesse involviert (Morrell et al. 2009, Guignabert und Dorfmueller 2013). Als zentraler Regulator in diesem Zusammenhang wurde der Rezeptor BMPR2 (*bone morphogenetic protein receptor type II*) identifiziert, welcher auf pulmonalen Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird. Nach Ligandenbindung an BMPR2 werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche die Apoptose und Zellalterung induzieren und somit einer überschießenden Zellproliferation entgegenwirken (Huber et al. 2015). Bei 70% der Patienten mit hereditärer PAH und bei bis zu 20% der Patienten mit idiopathischer PAH wurden *Loss-of-function*-Mutationen im BMPR2-Gen gefunden, welche die Expression von BMPR2 reduzieren und somit pro-proliferativ in den Zellzyklus eingreifen (Lane et al. 2000, Cogan et al. 2006). Die genannten Pathologien führen summativ zu exzessiver

Hyperplasie, erhöhter Gefäßwanddicke und luminaler Okklusion und sind damit substantielle Faktoren hinsichtlich Chronizität, Progression und Unheilbarkeit der PH (Huber et al. 2015).



**Abb. 1: Pathogenese der pulmonalen Hypertonie.** Adaptiert nach McLaughlin et al. (2015).

#### 1.2.3.4 Inflammation

Inflammatorische Prozesse, welche durch die Interaktion zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort ausgelöst werden, gehen ebenfalls in das pathobiologische Konzept der PH ein (Huber et al. 2015). Bei PAH-Patienten wurde sowohl innerhalb der Gefäßwand als auch perivaskulär eine Akkumulation von T- und B-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Monozyten und Plasmazellen beschrieben. Des Weiteren sind im Zusammenhang mit PH die zirkulierenden Fraktionen bestimmter Zytokine und Chemokine erhöht, was unter anderem mit einem schlechteren klinischen *Outcome* in Verbindung gebracht wird (Price et al. 2012). Eine Studie von Soon et al. unterstreicht die Wechselwirkung zwischen Entzündungsreaktion und BMPR2-Rezeptorstatus, da eine defekte BMPR2-Signalgebung die Produktion entzündlicher Zytokine wie Interleukin-6 und Interleukin-8 in glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien induzieren kann (Soon et al. 2015). Es ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, ob die beobachteten entzündlichen Veränderungen im Rahmen der PH pathogenetisch relevant sind oder reine Epiphänomene innerhalb der Krankheitsentwicklung darstellen (Guignabert und Dorfmueller 2013).

#### 1.2.4 Symptomatik

Klinisch präsentiert sich die PH mit einer unspezifischen Symptomatik, welche in erster Linie durch die progressive rechtsventrikuläre Dysfunktion aufgrund der Nachlasterrhöhung bedingt ist. Anfänglich sind die Symptome meist belastungsassoziiert, sodass ihr Auftreten in Ruhe als fortgeschrittenes Krankheitsstadium gewertet werden kann (Galiè et al. 2016). Die progrediente Dyspnoe ist das Kardinalsymptom jedweder Form der PH (Hoeper et al. 2017). Hinzu kommen meist Müdigkeit, Leistungsschwäche, Angina pectoris und Synkopen; in seltenen Fällen klagen die Betroffenen zusätzlich über trockenen Reizhusten oder belastungsinduzierte Übelkeit und Erbrechen. Der erhöhte rechtsventrikuläre Füllungsdruck im Verlauf mündet klinisch in klassischen Rechtsherzdekompensationszeichen wie Jugularvenenstauung, peripheren Ödemen, Aszites und abdominaler Distension (Galiè et al. 2016, Frost et al. 2019). Eine ähnliche Klinik charakterisiert jedoch auch eine Vielzahl weiterer kardiopulmonaler Erkrankungen, wodurch häufig eine lange Zeitspanne zwischen dem Auftreten erster Symptome und der endgültigen Diagnosestellung vergeht (Hoeper et al. 2017).

#### 1.2.5 Diagnostik

Die Diagnostik der PH basiert neben einer körperlichen Untersuchung auf verschiedenen apparativen Methoden und dient im Wesentlichen der Früherkennung und genauen Klassifikation der Erkrankung. Die körperliche Untersuchung von Patienten mit kompensierter PH zeigt oft keine Abnormalitäten; sicht- und tastbare linksparasternale Pulsationen, eine akzentuierte Pulmonaliskomponente des zweiten Herztons, ein systolisches Strömungsgeräusch mit *punctum maximum* links parasternal bei Trikuspidalklappeninsuffizienz, ein Diastolikum bei Pulmonalklappeninsuffizienz sowie eine Hepatomegalie gelten als Warnzeichen der Erkrankung (Galiè et al. 2016, Hoeper et al. 2017).

Die Basisdiagnostik in jedem Fall unklarer oder progressiver Belastungsdyspnoe sollte ein Elektrokardiogramm und eine Bestimmung des Herzinsuffizienzmarkers BNP beinhalten. Diese Untersuchungen sind zwar unspezifisch, haben jedoch bezüglich der PH eine hohe negative prädiktive Wertigkeit (Bonderman et al. 2011). Das wegweisende nichtinvasive Verfahren ist die transthorakale Echokardiografie (TTE), mithilfe derer dopplersonografisch der rechtsventrikuläre Druck und der PAP abgeschätzt werden können. Deutet die TTE-Untersuchung mit mindestens mittlerer Wahrscheinlichkeit auf eine PH hin, sollen laut Leitlinien Linksherz- und Lungenerkrankungen als Hauptursachen der PH mithilfe zusätzlicher Bewertung von Risikofaktoren, Blutgasanalytik, Thorax-Röntgenbild, hochauflösender CT oder kardialer MRT ausgeschlossen oder bestätigt werden. Ergeben sich hierdurch keine Hinweise auf Linksherz- oder Lungenerkrankungen, sollte zur Differentialdiagnostik zwischen PAH und CTEPH eine

Ventilations-Perfusions-Szintigrafie durchgeführt werden (Galiè et al. 2016, Kovacs et al. 2018). Letztendlich ist jedoch die Rechtsherzkatheteruntersuchung an einem spezialisierten Zentrum bislang für die Diagnosestellung der PH unerlässlich (Hoepfer et al. 2013). Sie ist erforderlich, um den Schweregrad der hämodynamischen Beeinträchtigung einzuschätzen, die Diagnose von PAH und CTEPH zu bestätigen und bei ausgewählten Patienten Vasoreaktivitätstests des Lungenkreislaufs durchzuführen, um *Vasoresponder* zu identifizieren, die von einer Behandlung mit Kalziumantagonisten profitieren können. Eine zusätzliche Linksherzkatheteruntersuchung sollte bei Patienten mit klinischen Risikofaktoren für Koronare Herzkrankheit (KHK) oder Herzinsuffizienz sowie echokardiografischen Anzeichen einer linksventrikulären Dysfunktion erwogen werden. Die Interpretation der invasiven Hämodynamik sollte in Zusammenschau mit der Klinik der Patienten und den Ergebnissen der apparativen Voruntersuchungen, insbesondere der TTE, erfolgen (Galiè et al. 2016).

### 1.2.6 Therapie

Der derzeitige Behandlungsalgorithmus basiert auf einer multiparametrischen Risikostratifizierung aller Patienten mit neu diagnostizierter PH, in welcher klinische, körperliche und rechtsventrikuläre Funktion mit hämodynamischen Messungen kombiniert werden, um einen Status mit niedrigem, mittlerem oder hohem Risiko entsprechend der erwarteten Ein-Jahres-Mortalität zu definieren (Galiè et al. 2019). Die Wirkmechanismen der unter 1.2.3 genannten vasoaktiven Mediatoren sowie deren Fehlregulation im Rahmen der PH bilden die Grundlage der aktuell verfügbaren PH-Therapeutika. Spezifische Medikamente stehen jedoch nur für die PAH und die CTEPH zur Verfügung; bezüglich der übrigen PH-Klassen ist die Therapie auf Symptomkontrolle und Behandlung der jeweiligen Grunderkrankung beschränkt (Franz et al. 2016, Galiè et al. 2016).

In Deutschland sind aktuell zehn Arzneimittel aus fünf verschiedenen Substanzklassen für die PAH-Therapie zugelassen, welche in Mono- oder Kombinationstherapie angewendet werden. Die Basistherapie besteht aus Endothelin-Rezeptorantagonisten wie Macitentan oder Bosentan, welche mit Phosphodiesterase-5-Hemmern wie Sildenafil oder alternativ Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase wie Riociguat kombiniert werden. Bei Hochrisikopatienten werden ergänzend intravenös Prostazyklin-Analoga wie Iloprost oder Prostazyklin-Rezeptoragonisten wie Selexipag verabreicht. PAH-Patienten, die während der Rechtsherzkatheteruntersuchung als *Vasoresponder* identifiziert werden, das heißt, bei denen durch Gabe von Kalziumkanalblockern ein Abfall des PAPm von mehr als 10 mmHg auf unter 40 mmHg erreicht werden kann, sollten mit hochdosierten Kalziumantagonisten wie Amlodipin behandelt werden (Galiè et al. 2016, Hoepfer et al. 2017). Symptomatisch ist eine Sauerstoffsupplementation im Fall einer

manifesten Hypoxämie indiziert; Diuretika werden bei bestehender Rechtsherzinsuffizienz zur Vermeidung und Reduktion von Ödemen herangezogen. In vielen fortgeschrittenen Krankheitsfällen kann bei erfolgloser medikamentöser Therapieeskalation eine Lungentransplantation erforderlich sein (Galiè et al. 2016). Mithilfe gezielter Rehabilitationsmaßnahmen und forcierter Physiotherapie kann die Leistungsfähigkeit, Lebensqualität und Herzfunktion von PH-Patienten verbessert werden (Ehlken et al. 2016), doch trotz den genannten Optionen gilt die PH nach wie vor als unheilbar und ist mit einer hohen Mortalitätsrate assoziiert, was die Notwendigkeit einer raschen Implementation wissenschaftlicher Fortschritte in die diagnostischen und therapeutischen Algorithmen unterstreicht (Humbert et al. 2019).

## 1.3 Die kardiale extrazelluläre Matrix

### 1.3.1 Funktion und Struktur

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist ein zellarchitektonisch und funktionell komplexes Gerüst, das die Gewebestruktur und -dynamik aufrechterhält, zelluläre Mikroumgebungen organisiert und die Interaktion zwischen zellulären und azellulären Gewebebestandteilen reguliert. Durch mechanische, elektrische und chemische Zell-ECM-Wechselwirkungen wird die Weiterleitung intrazellulär generierter Signale über die Zellmembran hinaus sichergestellt und die Funktion und Aktivität umgebender Zellen beeinflusst (Valiente-Alandi et al. 2016). Die kardiale ECM (cECM) dient darüber hinaus als Reservoir für Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine (Howard und Baudino 2014), erfüllt eine Barrierefunktion gegen das Eindringen von Fremdproteinen, Bakterien oder Viren und unterstützt die Ernährung der Myozyten durch Erleichterung des Stoffaustauschs zwischen den Myozyten und zugehörigen Kapillaren.

Die Hauptkomponenten der gelartigen ECM-Grundsubstanz sind Glykosaminoglykane, Proteoglykane, Glykoproteine und Adhäsionsproteine wie Fibronectin (Fn) und Laminin; hinzu kommen faserige Anteile, die vorrangig durch Strukturproteine wie Kollagen und Elastin gebildet werden (Weber 1989). Der Großteil der Proteine der cECM wird unter physiologischen Bedingungen von kardialen Fibroblasten (CF) synthetisiert; verschiedene kardiale Pathologien können jedoch auch MyoFb, Neutrophile, Mastzellen und Makrophagen zur Herstellung und Sekretion von cECM-Komponenten befähigen (Bowers et al. 2010). Die Komponenten der cECM sind kein statisches Konstrukt, sondern stetigen Umbauzyklen unterworfen, welche von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität des Herzens sind (Li et al. 2018). Dieses Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der cECM wird hauptsächlich durch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und deren endogene Inhibitoren, den *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases* (TIMP), reguliert (Spinale 2007).

Durch Gewebeverletzungen wird die Expression zinkhaltiger MMP und folglich der Abbau der cECM erhöht, um die Wundheilung und Narbenbildung zu fördern. Eine übermäßige Degradation der cECM wird durch TIMP blockiert (Howard und Baudino 2014), deren Neusynthese unter anderem durch Zytokine wie Interleukin-6 unterstützt werden kann (Lotz und Guerne 1991).

Die externen Faktoren, welche Einfluss auf die Veränderung der kardialen Gewebestruktur und Mikroumgebung nehmen, werden im Laufe des Lebens zunehmend komplexer. Während die frühe kardiale Entwicklung hauptsächlich von der Integrität genetisch determinierter und unmittelbarer Umweltsignale wie maternalen Hormonen abhängig ist, wird das adulte Herz einer Vielzahl zirkulierender Effektormoleküle anderer Organsysteme ausgesetzt. Die cECM verändert im Zuge verschiedener Entwicklungsstadien nicht nur ihr morphologisches Erscheinungsbild, sondern auch ihre Funktion. Die in der cECM generierten Signale dienen im adulten Herzen vor allem der Aufrechterhaltung der Homöostase und der Anpassung an veränderte Anforderungen, während der Organogenese regulieren sie jedoch wichtige zelluläre Migrations- und Differenzierungsprozesse und koordinieren deren zeitlich korrekte Abfolge. Beispielhaft hierfür ist die Zusammensetzung der ECM auch ein wesentlicher Faktor für die epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Dies ist ein Prozess, der durch den Übergang von polarisierten Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften charakterisiert ist und insbesondere während der Embryonalentwicklung, aber auch in adulten Geweben reaktiv auf verschiedene pathologische Stimuli auftritt (Chen et al. 2017). In der Kardiogenese ist die EMT essenziell für die Valvulogenese und die Entwicklung der Herzsepten, welche ontogenetisch aus den Endokardkissen als lokale Erweiterungen der cECM hervorgehen. Nach Abschluss der Herzentwicklung wird die Expression vieler Gene, welche embryonale Organformationsprozesse steuern, herunterreguliert, sodass der großen Vielfalt fetaler cECM-Molekülvarianten eine deutlich geringere Anzahl im adulten Herzen gegenübersteht (Bowers et al. 2010). Im pathogenetischen Kontext multipler kardiovaskulärer Erkrankungen kommt es jedoch im adulten Herzgewebe zu einer übermäßigen Expansion der interstitiellen Matrix (Kong et al. 2014) und zu einer gesteigerten Reexpression fetaler Proteinvarianten verschiedener cECM-Komponenten wie beispielsweise dem Adhäsionsprotein Fn, was als myokardiales *Remodelling* gilt, auf das in den Abschnitten 1.3.3 und 1.4.3 gesondert eingegangen werden soll.

### **1.3.2 Zell-Matrix-Interaktionen im Myokard**

Die Interaktionen zwischen der cECM und verschiedenen kardialen Zelltypen sind für den Struktur- und Funktionserhalt des Herzens unerlässlich. Während die Integrität der cECM vorrangig durch Strukturproteine wie Kollagene und Elastin gewährleistet wird, dienen

Adhäsionsproteine wie Laminin oder Fibronectin der Verknüpfung verschiedener cECM-Komponenten untereinander sowie der cECM mit Kardiomyozyten und Fibroblasten (Bowers et al. 2010).

Diese Verbindung zwischen der extrazellulären Umgebung und dem Zytoskelett der Zellen geschieht vor allem über Integrine, welche heterodimere Transmembranrezeptoren mit jeweils einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit darstellen (Hynes 1992). Sie sind dauerhaft in der Zellmembran aller Zellen des kardiovaskulären Systems verankert und an der Regulation der Genexpression, der Zellproliferation und -differenzierung sowie der Apoptose beteiligt (Ross 2002). Die Signaltransduktion über Integrine kann bidirektional erfolgen, das heißt, dass einerseits eine Bindung von Integrinen an ECM-Mediatoren zu intrazellulären Effekten führen kann (*outside-in signalling*), umgekehrt jedoch die Kopplung intrazellulärer Rezeptoren an die zytoplasmatische Integrin-Domäne deren extrazelluläre Bindungsaktivität reguliert (*inside-out signalling*) (Giancotti und Ruoslahti 1999). Derart können sowohl externe als auch interne Signale die Zellmembranexpression, Konformation und Ligandenaffinität der Integrine beeinflussen (Bowers et al. 2010). Alternatives *Splicing* der mRNA und Heterodimerisierung verschiedener  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten erhöhen die Diversität möglicher Bindungspartner bei gleichzeitig hoher Spezifität der Integrine für die jeweiligen Liganden (de Melker und Sonnenberg 1999). Meist dienen Integrine als Rezeptoren für Kollagen, Laminin, Fibronectin und Thrombospondin sowie Tenascin-C, Osteopontin und Periostin (Humphries et al. 2006). Die Ligandenbindung initiiert eine Konformationsänderung, welche die Integrin-Heterodimere aktiviert. Da sie selbst keine enzymatische Aktivität besitzen, erfolgt die Signalübertragung durch rekrutierte Effektmoleküle wie beispielweise Tyrosinkinasen wie FAK oder GTPasen wie Rho oder Rac (Ross 2002).

Die zeitliche und räumliche Expression der Integrine verändert sich in Abhängigkeit verschiedener Entwicklungsstadien und ist wechselseitig mit der variablen cECM-Zusammensetzung abgestimmt (Bowers et al. 2010). Dem  $\beta_1$ -Integrin-Subtyp kommt hierbei eine Schlüsselrolle hinsichtlich seiner Wechselwirkungen mit embryonalen und adulten Formen von CF zu. Es wurde unter anderem nachgewiesen, dass embryonale CF die Myozytenproliferation durch Sekretion von Fibronectin, Kollagen und *Heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF) fördern, welche durch den  $\beta_1$ -Integrin-Rezeptor vermittelt wird. Adulte CF hingegen vermitteln die Myozytenhypertrophie über  $\beta_1$ -Integrine, was auf einen funktionellen Wechsel des Fibroblasten-Phänotyps und / oder der Integrin-Aktivierung hinweist (Ieda et al. 2009). Hieran wird beispielhaft die komplexe Feinmodulation von Zell-Matrix-Interaktionen im Myokard und deren Adaptation an sich verändernde Umwelтанforderungen deutlich (Bowers et al. 2010).

### 1.3.3 Myokardiales Remodelling

Myokardiales *Remodelling* bezeichnet die Adaptation zellulärer und extrazellulärer Kompartimente des Herzens an kardiale Schädigungen, mechanischen Stress und neurohumorale Stimuli. Im Zuge dessen kommt es sowohl zu Veränderungen der Kardiomyozyten und CF als auch zu einer strukturellen und funktionellen Reorganisation der cECM (Bowers et al. 2010, Franz et al. 2015a).

Die Herzmuskelzellen sind angesichts ihrer kontraktilen Aktivität und ihres zahlenmäßig großen Anteils an der Herzmasse als erste zelluläre Komponente in den Fokus der Forschung zum kardialen *Remodelling* gerückt (Cohn et al. 2000). Als Folge myokardialer Verletzungen verringert sich aufgrund von Apoptose, Nekrose und Autophagie die Anzahl funktionsfähiger Herzmuskelzellen, wodurch es zunächst zu einer Ausdünnung der Ventrikelwände kommt (Cao et al. 2009). Reaktiv hypertrophieren oder verlängern sich die verbliebenen Kardiomyozyten, um die ventrikuläre und septale Wandspannung zu reduzieren und das Herzzeitvolumen (HZV) nach dem Verlust kontraktilen Gewebes aufrechtzuerhalten (Anversa et al. 1991, Kehat und Molkentin 2010). Durch Induktion der Expression Hypertrophie-assoziiierter Gene können die Herzmuskelzellen zur Synthese kontraktiler Proteine angeregt werden, was zum Aufbau neuer Sarkomere und einer anschließenden Verdickung der Herzwände führt (Cohn et al. 2000).

Die CF, welche einen Großteil der cECM-Komponenten synthetisieren, nehmen ebenfalls eine zentrale Rolle hinsichtlich kardialer Gewebsumbauprozesse ein. Auf pathologische Stimuli reagieren die CF im Sinne einer Aktivierung, Proliferation und Transdifferenzierung zu MyoFb, was unter anderem zu Veränderungen der Sekretion von cECM-Proteinen führt (Valiente-Alandi et al. 2016). MyoFb stellen eine Zwischenform zwischen Fibroblasten und glatten Muskelzellen dar und entstehen vornehmlich aus residenten CF, aber auch Endothelzellen, Perizyten, epikardiale Epithelzellen und zirkulierende Progenitorzellen sind erwiesenermaßen Ursprungszellen, die durch endothelial- bzw. epithelial-mesenchymale Transition und Differenzierung zu MyoFb umgewandelt werden können (Kong et al. 2014). Die Transdifferenzierung wird unter anderem durch erhöhte mechanische Beanspruchung, Veränderungen der Matrixzusammensetzung, Induktion und Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie *transforming growth factor-beta* (TGF- $\beta$ ) und *platelet-derived growth factor* (PDGF) sowie RAAS-Aktivierung initiiert (Li et al. 2018). MyoFb enthalten große Mengen an ECM-Proteinen – darunter Kollagene, Fibronectin, Periostin, MMP und TIMP (Dostal et al. 2015). Die verstärkte Aktivität und funktionelle Zelltransformation der CF zu MyoFb ist daher bedeutsam für die Wundheilung und Narbenbildung nach myokardialen Schädigungen und damit durchaus physiologisch. Eine anhaltende MyoFb-Aktivität führt jedoch zu einer übermäßigen Synthese und Deposition von

ECM-Komponenten und letztendlich zur Gewebefibrosierung mitsamt Verdickung und Vernarbung des Bindegewebes. Dadurch kommt es einerseits zu Störungen der elektrophysiologischen Erregungsleitung mit einer Prädisposition für Arrhythmien (Kamkin et al. 2003) und andererseits zu einer Verringerung der Kapillardichte mit folglich reduzierter Sauerstoffdiffusion ins Gewebe, wodurch die betroffenen Zellen nekrotisch und apoptotisch zugrunde gehen (Howard und Baudino 2014, Valiente-Alandi et al. 2016).

Neben architektonischen Veränderungen ist die Reorganisation der cECM durch Wiederauftreten fetaler Molekülvarianten zellulärer Adhäsionsproteine wie Tenascin oder Fibronectin gekennzeichnet (Franz et al. 2015a, Zollinger und Smith 2017). Diese Proteinvarianten werden physiologischerweise überexprimiert in kritischen Phasen der Herzentwicklung, sind in gesunden, adulten Geweben nicht mehr nachweisbar und zeigen eine eindrucksvolle Reexpression im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen (Schwarzbauer 1991a, Gabler et al. 1996, Willems et al. 1996, Franz et al. 2010). Die fetale Fn-Spleißvariante ED-A<sup>+</sup>-Fn ist beispielsweise im Konzert mit TGF- $\beta$  ein Induktor der Transdifferenzierung verschiedener Zelltypen zu MyoFb (Li et al. 2018), woran die wechselseitige Beeinflussung verschiedener Faktoren an myokardialen Gewebsumstrukturierungen deutlich wird.

Neurohumorale Kaskaden vermitteln im gesunden Organismus zahlreiche Kompensationsmechanismen als Reaktion auf ein sinkendes HZV, sind jedoch auch maladaptiv an der Progression nachteiliger *Remodelling*-Prozesse beteiligt (Cohn et al. 2000). Beispielsweise agiert Angiotensin II als wichtiger Regulator des Blutdrucks und Wasserhaushalts nach pathologischen Einwirkungen auf das Myokard als bedeutsamer Mediator der belastungsinduzierten Proliferation und Hypertrophie. *In-vitro*-Studien konnten zeigen, dass mechanische Dehnung die Herzmuskelzellen zur autokrinen Freisetzung von Angiotensin II anregt (Sadoshima et al. 1993), welches wiederum die DNA-Synthese und Zellzahl der CF erhöht und die Proteinsynthese sowohl in CF als auch in Kardiomyozyten stimuliert (Sadoshima und Izumo 1993). Gleichmaßen erhöht Angiotensin II die Permeabilität der Koronararterien, wodurch die vermehrt produzierten Wachstumsfaktoren ins myokardiale Interstitium diffundieren können (Weber und Brilla 1991). Als Folge der erhöhten Angiotensin II-Spiegel steigt RAAS-vermittelt auch die Produktion von Aldosteron an, welches seinerseits die Kollagensynthese durch CF stimuliert und damit zum fibrotischen Umbau des Myokards beiträgt (Brilla et al. 1994).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass myokardiales *Remodelling* durch kompensatorische Mechanismen zunächst die Aufrechterhaltung der Herzfunktion unter veränderten Belastungsbedingungen gewährleistet, bei Persistenz der pathologischen Reize jedoch zur Organdysfunktion mit der klinischen Folge einer Herzinsuffizienz beiträgt (Ziffels et al. 2016).

## 1.4 Fibronektin

### 1.4.1 Bedeutung und Spleißvarianten

Fibronektin (Fn) ist ein ubiquitäres, strukturgebendes Adhäsionsprotein der ECM. Seine fundamentale Bedeutung basiert auf der Beteiligung an grundlegenden biologischen Prozessen wie Zelladhäsion und -migration, Aufrechterhaltung der Zellmorphologie, Organisation des Zytoskeletts, Blutstillung und Thrombusbildung sowie Zelldifferenzierung und onkogener Transformation (Schwarzbauer 1991b). Biochemisch ist Fn ein Heterodimer bestehend aus zwei nahezu identischen, stabförmigen Polypeptidketten, welche am C-terminalen Ende durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jedes Monomer ist aus drei homologen, sich wiederholenden Domänen zusammengesetzt, welche als *type I*, *type II* und *type III repeats* bezeichnet werden. Durch alternatives *Splicing* der prä-mRNA variiert die Zusammensetzung der Domänenstruktur, woraus verschiedene Fn-Varianten resultieren (Schwarzbauer 1991a). Es kommt dadurch zum Ein- oder Ausschluss sogenannter Extradomänen, von denen für Fn drei zu unterscheiden sind: *type III homology extra domain A* (ED-A<sup>+</sup>), *type III homology extra domain B* (ED-B<sup>+</sup>) und *type III homology connecting segment* (IIICS). Während die Typ III-Domänen ED-A<sup>+</sup> und ED-B<sup>+</sup> entweder komplett aus der prä-mRNA ausgeschnitten werden oder vollständig enthalten sind, kann die speziesspezifisch exprimierte IIICS-Domäne am C-terminalen Ende von Fn sowohl vollständig als auch partiell entfernt werden (Romberger 1997).

Die Inklusion der ED-A<sup>+</sup> und ED-B<sup>+</sup> ermöglicht auch die Differenzierung zwischen zellulärem (cFn) und plasmatischem Fn (pFn). Als unlösliches, fibrilläres Glykoprotein der ECM wird cFn unter anderem von Fibroblasten, Chondrozyten, Endothelzellen und Makrophagen synthetisiert und enthält die ED-A<sup>+</sup> und ED-B<sup>+</sup> in variablen Kombinationen. Demgegenüber befindet sich pFn, das von den Hepatozyten gebildet wird, als lösliche Disulfidverbindung im Zellplasma. Es enthält nicht die alternativ gespleißten ED-A<sup>+</sup> und ED-B<sup>+</sup> (Moretti et al. 2007, White et al. 2008). Die Expressionsniveaus der Spleißvarianten und ihre relativen Anteile verändern sich im Laufe der Entwicklung. ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn gelten als onkofetale Proteine, da sie einerseits während der Embryonalentwicklung wichtige Prozesse der Organogenese mitbeeinflussen und andererseits in Verbindung mit tumorösen und Wundheilungsprozessen deutlich reexprimiert werden (French-Constant 1995, Franz et al. 2010). Additiv zu den durch alternatives *Splicing* entstehenden Variationen wird Fn posttranslational durch Glykosylierung, Phosphorylierung, Sulfatierung und intramolekulare Disulfidbindungen modifiziert (Romberger 1997). Fn hat eine Vielzahl von Regionen und Domänen mit Affinitäten sowohl für ECM-Moleküle als auch für Zelloberflächenliganden und besitzt spezifische Bindungsstellen für die Interaktion mit Fibrin, Kollagen und Heparin sowie eine Zellbindungsregion (Schwarzbauer 1991a). Die

Adhäsion an verschiedene Zelltypen erfolgt vorrangig über Bindung des  $\alpha_1\beta_5$ -Integrin-Subtyps an die Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz (RGD-Sequenz) in der Zellbindedomäne von Fn (Romberger 1997). Die Wechselwirkung mit Integrin-Rezeptoren beeinflusst die strukturellen und mechanischen Eigenschaften der Matrix und das Verhalten der anhaftenden Zellen (Takagi 2004). Die Degradation von Fn erfolgt sowohl durch Matrix-Metalloproteinasen, im Speziellen MMP-2, sowie durch Autoproteolyse. Das Verständnis der Abbaumechanismen von Fn ist wichtig, da die Fn-Fragmente biologische Aktivitäten aufweisen, die sich von denen des intakten Moleküls unterscheiden (Steffensen et al. 2011).

#### 1.4.2 Expression und Funktion von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin

Wie bereits dargelegt, verändert sich die Expression von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn in Abhängigkeit verschiedener Entwicklungsstadien. In einem Mausmodell mit *Knockout* des Fn-Gens konnte dessen essenzielle Bedeutung für die Embryogenese gezeigt werden, da sich bei homozygot mutierten Allelen schwere Defekte in mesodermalen Geweben, der Neuralrohrbildung und der Herz- und Gefäßentwicklung verbunden mit einer frühen embryonalen Letalität zeigten (George et al. 1993). Eine gleichzeitige Deletion der ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn-Exons im Fn-Gen führte trotz unbeeinträchtigter Fn-Proteinexpression zu schweren Gefäßmissbildungen, vaskulären Blutungen sowie gestörter Plazenta-Angiogenese im murinen System und war ebenfalls embryonal letal (Astrof et al. 2007). Im Gegensatz dazu erschienen Mäuse nach alleiniger Ausschaltung von ED-A<sup>+</sup>-Fn oder ED-B<sup>+</sup>-Fn lebensfähig und fruchtbar und zeigten weitestgehend physiologische embryonale Gefäßstrukturen (Fukuda et al. 2002, Tan et al. 2004).

Während der Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems werden die genannten Spleißvarianten insbesondere im Bereich sich neu bildender Blutgefäße exprimiert; sie sind jedoch nach Abschluss dieser Vaskularisationsprozesse nicht mehr nachweisbar (Ffrench-Constant und Hynes 1989). Unter bestimmten Umständen wie Gewebereparatur, Gewebefibrosierung und Angiogenese wird jedoch im Erwachsenenalter das embryonale *Splicing*-Muster wiederhergestellt (White et al. 2008). In adulten Geweben unterliegen die Typ III-Domänen von Fn sowohl mechanischer als auch biochemischer Regulation und können durch erhöhte zelluläre Kontraktilität entfaltet oder durch Proteolyse aus der Matrix freigesetzt werden (Kelsh et al. 2014). Ein gut untersuchtes Beispiel für die adulte Reexpression fetaler Fn-Varianten ist die Wundheilung, bei der ein erhöhter Einschluss der ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Segmente in die mRNA der Zellen am Wundgrund detektiert werden konnte. Alternatives *Splicing* kann demzufolge während der Gewebereparatur als Mechanismus zur Erzeugung von Fn-Varianten dienen, welche funktionell besser für die Zellmigration und -proliferation geeignet sind (Ffrench-Constant et al. 1989). Die Lokalisation der ED-A<sup>+</sup> und ED-B<sup>+</sup> neben der zentralen Zellbindungsregion von Fn legt

ebenfalls nahe, dass diese Domänen möglicherweise die Wechselwirkungen zwischen der hier befindlichen RGD-Sequenz und  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin beeinflussen können (Schwarzbauer 1991a). ED-B<sup>+</sup>-Fn wird physiologischerweise nur in einigen Blutgefäßen der Eierstöcke und der Gebärmutter Schleimhaut exprimiert (Castellani et al. 1994). Zudem ist ED-B<sup>+</sup>-Fn als onkologischer Marker der Tumorangiogenese mit ausgeprägtem perivaskulärem Expressionsmuster bekannt. Die Akkumulation um neovaskuläre Strukturen wurde in zahlreichen Studien an verschiedenen Tumorentitäten wie beispielsweise Brust- oder Hirntumoren nachgewiesen (Kaczmarek et al. 1994, Castellani et al. 2002). Als zelluläre Hauptquellen des onkofetalen ED-B<sup>+</sup>-Fn wurden sowohl Tumor- als auch Endothelzellen identifiziert (Midulla et al. 2000). *Trigger* für die aberrante ED-B<sup>+</sup>-Fn-Synthese dieser Zelltypen scheinen TGF- $\beta_1$ , ET-1 und hohe Glukosespiegel zu sein (Khan et al. 2005b). Aufgrund der hier beschriebenen Arbeiten kann eine supportive Wirkung von ED-B<sup>+</sup>-Fn für das Gewebe-*Remodelling* und die Tumorprogression angenommen werden. Für zahlreiche nicht-tumoröse Krankheitsprozesse ließ sich ebenfalls eine Steigerung der ED-B<sup>+</sup>-Fn-Synthese verzeichnen, beispielsweise in Endothelzellen bei rheumatoider Arthritis, in Fibroblasten und MyoFb bei Morbus Dupuytren (Berndt et al. 1998) sowie in Glaskörperproben von Patienten mit diabetischer Retinopathie (Khan et al. 2004). Für ED-A<sup>+</sup>-Fn wird ebenfalls eine Reexpression im Rahmen multipler Pathologien beschrieben. Ylätupa et al. konnten auch für diese Spleißvariante eine signifikant erhöhte Serumkonzentration im Zusammenhang mit malignen Tumorerkrankungen nachweisen (Ylätupa et al. 1995). Des Weiteren konnten erhöhte ED-A<sup>+</sup>-Fn-Spiegel unter anderem im Plasma und in betroffenen Geweben von Patienten mit Psoriasis, rheumatoider Arthritis und Diabetes detektiert werden (White et al. 2008). Die wichtigste Bedeutung erlangt reexprimiertes ED-A<sup>+</sup>-Fn jedoch im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen, was im folgenden Abschnitt deutlich wird.

### **1.4.3 Reexpression fetaler Fibronektin-Varianten im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen**

Eine Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, Hypertonie oder Myokardinfarkte sind mit Veränderungen in der Komposition der cECM vergesellschaftet, welche unter anderem das Wiederauftreten fetaler Fn-Molekülvarianten beinhalten (Franz et al. 2010, Baldinger et al. 2011).

Besonders ED-A<sup>+</sup>-Fn ist diesbezüglich schon lang Gegenstand intensiver Forschungsanstrengungen. Nach pathologischen Einwirkungen auf das Herz wird die Expression von ED-A<sup>+</sup>-Fn hochreguliert, was unter anderem bedeutsam in verschiedenen Phasen der Infarktheilung ist. ED-A<sup>+</sup>-Fn wird initial von Immunzellen wie Makrophagen und T-Zellen synthetisiert und fungiert als endogener Ligand für den *Toll-like-Rezeptor* 4 (TLR-4), über den es wiederum die

Zytokinfreisetzung aus Mastzellen und T-Zellen stimuliert und damit die Entzündungsreaktion aggraviert (Gondokaryono et al. 2007, Franz et al. 2012). Die durch proinflammatorische Mediatoren erhöhte Gefäßpermeabilität im Infarktgebiet führt zur Extravasation von Plasmaproteinen wie pFn und Fibrinogen, welche im Bereich der Schädigung zunächst eine provisorische Matrix bilden. Die langfristige Reparatur des geschädigten Myokardgewebes hängt von der Rekrutierung und Aktivierung residenter CF ab, die nach Transformation in den MyoFb-Phänotyp für die Bildung einer kollagenbasierten Narbe sorgen (Frangogiannis 2017). Die Induktion der gesteigerten ED-A<sup>+</sup>-Fn-Synthese nach Myokardschädigung und die erhöhte Ablagerung nicht-fibrillärer Kollagentypen spielen in Kombination mit TGF- $\beta$  eine entscheidende Rolle bei jener Transdifferenzierung verschiedener Zelltypen zu MyoFb (Serini et al. 1998, Frangogiannis 2012). Ein ED-A<sup>+</sup>-Fn-*Knockout* führte in einem murinen Myokardinfarktmodell durch geringere Entzündungsaktivität, verminderte Transdifferenzierung zu MyoFb und abgeschwächte Fibrosierung der infarzierten Bereiche zu einem verbesserten Überleben und Abmilderung der nachteiligen *Remodelling*-Prozesse (Arslan et al. 2011). Die Involvierung von ED-A<sup>+</sup>-Fn in inflammatorische, fibrotische und (neo-)vaskuläre Prozesse wird zusätzlich gestützt durch ein Modell der chronischen Abstoßungsreaktion nach heterotoper Rattenherztransplantation von Franz und Mitarbeitern. Hier wurde gezeigt, dass die ED-A<sup>+</sup>-Fn-Expression räumlich zu Bereichen der Transplantatvaskulopathie und interstitiellen Fibrose assoziiert ist und mit zunehmendem Grad der Transplantatabstoßung ansteigt (Franz et al. 2011). Bestätigend konnte eine vollständige ED-A<sup>+</sup>-Fn-Defizienz im Mausmodell die mit einer chronischen Abstoßungsreaktion verbundene kardiale interstitielle Fibrose sogar verhindern (Booth et al. 2012).

ED-A<sup>+</sup>-Fn aktiviert neben MyoFb auch glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC), welche gemeinsam die vorherrschenden Zelltypen abstoßungsbedingter Entzündungsreaktionen darstellen. Sowohl MyoFb als auch VSMC stimulieren über einen positiven *Feedback*-Mechanismus die weitere Synthese von ED-A<sup>+</sup>-Fn und exprimieren  *$\alpha$ -smooth muscle actin* (ASMA), dessen Gehalt wiederum mit dem Grad der Abstoßungsreaktion korreliert. In Zusammenschau dieser Erkenntnisse konnte unsere AG eine Hypothese zur zentralen Rolle von ED-A<sup>+</sup>-Fn für die Induktion kardiovaskulärer *Remodelling*-Prozesse generieren (Franz et al. 2012). Die Migration und Proliferation von VSMC gilt ebenfalls als Schlüsselfaktor für die Pathogenese der Atherosklerose. Die Ansammlung von VSMC führt in Verbindung mit der exzessiven Sekretion extrazellulärer Matrixproteine – einschließlich Fn und seiner Spleißvarianten – zur Bildung fibröser Plaques, welche unbehandelt die betroffenen Gefäßlumen progredient verengen (Dzau et al. 2002, Astrof und Hynes 2009). Innerhalb atherosklerotischer Läsionen konnte vor allem eine

Expression von ED-A<sup>+</sup>-Fn detektiert werden (Glukhova et al. 1989), deren Auswirkungen auf den Progress der Erkrankung jedoch kontrovers erscheinen.

Im Vergleich zu den weitreichenden Untersuchungen zu ED-A<sup>+</sup>-Fn existieren bislang nur wenige Studien zur Bedeutung der ED-B<sup>+</sup>-Fn-Spleißvariante für kardiovaskuläre *Remodelling*-Prozesse. Konkordant zur bereits dargelegten Relevanz für onkologische Vorgänge wird kardiovaskulär reexprimiertem ED-B<sup>+</sup>-Fn ein funktioneller Beitrag zur entzündungsassoziierten Angiogenese zugeschrieben (Astrof et al. 2007). Die Entwicklung der arteriellen Hypertonie scheint abhängig von deren Ätiologie ebenfalls mit einem Wiederauftreten von ED-B<sup>+</sup>-Fn verbunden zu sein. Samuel et al. konnten 1991 erstmals die Akkumulation fetaler Fn-mRNAs an einem Rattenmodell der durch Drucküberlastung induzierten Herzhypertrophie nachweisen. In diesem Experiment reicherten sich bereits am ersten Tag nach Stenosierung der *Aorta ascendens* die mRNAs von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn in der gesamten Media der Herzkranzgefäße und in den Fokusbereichen des Myokards an. Die VSMC der Koronararterien gelten hierbei als Hauptproduzenten der fetalen Fn-Varianten (Samuel et al. 1991). Gesteigerte mRNA-Spiegel von ED-B<sup>+</sup>-Fn zeigten sich ebenfalls in einem Rattenmodell der Mineralokortikoid-induzierten Hypertonie (Mamuya und Brecher 1992) und im Myokard von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (Gabler et al. 1996). Des Weiteren ist mit einem Antikörper (AK), welcher gegen ED-B<sup>+</sup>-Fn gerichtet ist, die spezifische Markierung atherosklerotischer Läsionen sowohl im murinen als auch im humanen System möglich. ED-B<sup>+</sup>-Fn könnte daher als potenzielles *Target* für eine antikörperbasierte molekulare Plaque-Bildgebung dienen (Matter et al. 2004). Innerhalb atherosklerotischer Gefäßläsionen konnte zudem eine Korrelation der ED-B<sup>+</sup>-Fn-Konzentration zur Größe der Plaques und eine räumliche Assoziation der ED-B<sup>+</sup>-Immunreaktivität zu Makrophageninfiltraten detektiert werden. Zugehörige *In-vitro*-Experimente zeigten, dass murine VSMC die ED-B<sup>+</sup>-Fn-Synthese nach Behandlung mit Angiotensin II und TGF- $\alpha$  signifikant erhöhten. Möglicherweise führt also eine Aktivierung der VSMC durch Entzündungsmediatoren oder Makrophagen zu einer verstärkten ED-B<sup>+</sup>-Fn-Expression in atherosklerotischen Plaques (Dietrich et al. 2007). Laut aktuellem Forschungsstand ist somit auch von einer Beteiligung von ED-B<sup>+</sup>-Fn an der Pathogenese verschiedener Herz-Kreislauf-Erkrankungen auszugehen, deren funktioneller Bedeutung jedoch weiterer Aufklärung bedarf.

#### **1.4.4 Fetale Fibronektin-Varianten als potenzielle Biomarker des pulmonalvaskulären Remodellings**

Zell-Matrix-Interaktionen sind wesentliche Regulatoren der Lungenentwicklung, insbesondere der Verzweigung der Atemwege und der Alveolarisation. Als einer der Hauptbestandteile der pulmonalen ECM ist Fn vielseitig in fetale Lungenreifungsprozesse und die damit verbundene

Differenzierung alveolärer Epithelzellen involviert (Arai et al. 1997). Bereits 1986 konnte mittels Immunoblot auch im Lungengewebe ein ontogenetischer Wechsel des Fn-Isotyps beschrieben werden: Während im adulten Lungengewebe überwiegend pFn detektiert wurde, überwog cFn in fetalen Gewebeproben (Sekiguchi et al. 1986). Vergleichende Untersuchungen des *Splicing*-Musters der Fn-prä-mRNA in fetalen, gesunden adulten und tumorös veränderten Lungengeweben zeigten, dass ED-A<sup>+</sup>-Fn unabhängig von ontogenetischen oder onkogenen Stadien konstitutiv in der Lunge exprimiert wurde, während ED-B<sup>+</sup>-Fn ausschließlich in fetalen und tumorösen Gewebeproben nachgewiesen werden konnte (Oyama et al. 1990). Experimente von Maniscalco et al. zeigten, dass Fn nach alveolären Epithelschädigungen den Übergang der Typ-II-Pneumozyten in die teilungsunfähigen, gasaustauschenden Typ-I-Pneumozyten fördert. Dieser phänotypische Wechsel ist von einer erhöhten Fn-Gentranskription und Induktion sowohl der ED-A<sup>+</sup>- als auch ED-B<sup>+</sup>-Fn-mRNA begleitet (Maniscalco et al. 1996). Wie im Abschnitt 1.4.3 bereits dargelegt, ist ED-A<sup>+</sup>-Fn maßgeblich an der Differenzierung von Fibroblasten zu MyoFb beteiligt, welche bei anhaltender Aktivierung durch übermäßige Produktion von ECM-Komponenten eine Gewebefibrosierung hervorrufen können (Serini et al. 1998). Diese ungenügende MyoFb-Aktivität liegt beispielsweise der Pathogenese der idiopathischen Lungenfibrose zugrunde, bei der die exzessive Ablagerung von ECM-Proteinen unaufhaltsam in einem respiratorischen Versagen resultiert (White et al. 2003).

Neben den beschriebenen Veränderungen auf Gewebeebene der Lunge gibt es starke Evidenz, dass Fn und dessen fetale Molekülvarianten ebenso in pulmonalvaskuläre Krankheitsprozesse – einschließlich der Pathogenese der PH – eingebunden sind. Beispielsweise explorierten Berg et al., dass die Genexpression extrazellulärer Matrixproteine wie Fn durch alveoläre Hypoxie und dadurch bedingte pulmonale Vasokonstriktion und Hypertonie erhöht wird (Berg et al. 1998). Bestätigend konnten in atherosklerotisch veränderten Lungenarterien von Patienten mit ungeklärter PH im Bereich der verdickten Neointima sowohl immunhistochemisch als auch durch *In-situ*-Hybridisierung erhöhte Expressionslevel von cFn, Kollagen Typ I und weiteren ECM-Proteinen nachgewiesen werden (Botney et al. 1992). Die Abfolge struktureller Gefäßwandveränderungen im Rahmen der PH wird durch eine Reihe phänotypischer *Switches* der VSMC begleitet. Zunächst führt die Differenzierung der VSMC aus Vorläuferzellen zur verstärkten Muskularisierung peripherer Lungenarterien, welche normalerweise nur eine sehr dünne Media aufweisen. Durch anhaltende Hypertrophie und Hyperplasie der VSMC sowie Akkumulation spezifischer ECM-Proteine wird die Media betroffener Gefäße progredient verdickt. Schlussendlich entwickeln sich okklusive intimale Läsionen aufgrund Endothelzellproliferation, Rekrutierung von Entzündungszellen und VSMC-Migration aus der Media in die

Intima (Jones et al. 1997). Mehrere Studien *in vivo* und in der Zellkultur, in denen die Interaktionen zwischen einer erhöhten Fn-Expression, VSMC-Migration und Neointima-Formation untersucht wurden, legen nahe, dass eine gesteigerte Fn-Synthese die VSMC-Migration in subendotheliale Gefäßwandschichten fördert. In Tierversuchen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass im Zuge der inflammatorischen Reaktion nach Herztransplantation der Aufbau eines subendothelialen Fn-Gradienten der Neointima-Bildung in den Koronararterien vorausgeht (Clausell et al. 1993). Umgekehrt konnte durch Unterdrückung der Zytokin-vermittelten Fn-Synthese oder durch Hemmung der VSMC- und T-Zell-Wechselwirkungen mit Fn die Ausbildung einer Neointima und die damit verbundene Koronararteriopathie abgeschwächt werden (Clausell et al. 1994, Molossi et al. 1995). Immunhistochemisch konnte auch in Gewebebiopsien der Lungengefäße von Patienten mit PH eine Fn-Akkumulation in der endothelialen ECM nachgewiesen werden, welche mit der Ausprägung der Mediahypertrophie und dem Schweregrad der Erkrankung korrelierte (Jones et al. 1997). Die pathogenetischen Grundlagen der PH wurden im Hinblick auf Veränderungen der ECM und der Fibrose-assoziierten Genexpression auch von Franz et al. in einem Rattenmodell der Monocrotalin-induzierten PH untersucht. Hierbei konnte eine Überexpression speziell der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Spleißvariante in pathologisch veränderten Lungengefäßstrukturen mit erhöhten Serumspiegeln und einem Anstieg des systolischen rechtsventrikulären Drucks korreliert werden (Franz et al. 2016).

Ausgehend von der Aufklärung der funktionellen Bedeutung von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn im gesunden und erkrankten Organismus ist darüber hinaus die Einschätzung ihrer Eignung als potenzielle Biomarker notwendig, um ihren klinischen Nutzen zu verifizieren. Beispielhaft sei hier angeführt, dass mithilfe eines von unserer AG etablierten ELISA-Protokolls für herzinsuffiziente Patienten bereits eine signifikant höhere Liberation von ED-A<sup>+</sup>-Fn ins Serum im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen werden konnte. Insbesondere für die ischämische Genese, also die KHK als Grundlage der Kardiomyopathie, konnte ED-A<sup>+</sup>-Fn als unabhängiger Prädiktor für das Vorliegen der Erkrankung identifiziert werden (Ziffels et al. 2016).

Die vielversprechenden Vorarbeiten prädestinieren die fokussierten Fn-Spleißvarianten perspektivisch auch als Zielstrukturen antikörperbasierter Diagnose- und Therapieverfahren. Eine sichere und spezifische Detektion der Proteine wird durch *small immunoproteins* (SIP) ermöglicht (Bird et al. 1988). SIP-F8 ist ein derartiger monoklonaler Antikörper, der spezifisch gegen ED-A<sup>+</sup>-Fn gerichtet ist. Basierend auf dem zuvor beschriebenen Rattenmodell der chronischen Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation konnten bereits diagnostische Agenzien (Fluoreszenzfarbstoffe, Radionuklide) oder Zytokine mithilfe von SIP-F8 als Vehikel direkt an den Ort von Vaskulopathie und Fibrose transportiert werden (Franz et al. 2011, Franz et al. 2013,

Franz et al. 2015b). ED-B<sup>+</sup>-Fn stellt diesbezüglich einen der am besten charakterisierten Marker der tumorösen Neoangiogenese dar. In Kooperationsarbeit der AGs Neri und Zardi sind in den vergangenen Jahren über 30 Derivate des Anti-ED-B<sup>+</sup>-Fn-AK L19 (SIP-L19) entwickelt und sowohl im Tiermodell als auch im humanen System getestet worden (Carnemolla et al. 1996, Villa et al. 2008). L19 wurde beispielsweise zur gezielten Abgabe des Zytokins Interleukin-2 als fusioniertes L19-IL2-Protein in an verschiedenen Tumorentitäten erkrankten Mäusen verwendet, was zu einer signifikanten Verbesserung der therapeutischen Wirksamkeit von Interleukin-2 führte (Carnemolla et al. 2002). In Bezug auf die PH wäre eine prospektive klinische Implementation fetaler Fn-Spleißvarianten als *Carrier* für Arzneimittel oder immunszintigrafische Diagnostika ebenfalls wünschenswert.

## 1.5 ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

Ein *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ist ein sensitives und spezifisches immunologisches Nachweisverfahren zur quantitativen Bestimmung von antigenen Proteinen durch spezifische Antikörper an einer festen Phase. Der ELISA ist der Nachfolger des *Radioimmunoassays* und wurde 1971 simultan und unabhängig von den AGs Engvall / Perlmann in Schweden und van Weemen / Schuurs in den Niederlanden entwickelt (Engvall und Perlmann 1971, van Weemen und Schuurs 1971). Heutzutage gilt der ELISA als Routinemethode in medizinischen Laboratorien weltweit und findet breite Anwendung im Rahmen multipler diagnostischer Fragestellungen. Anstelle radioaktiven Materials, das zuvor zur Detektion in *Assays* eingesetzt wurde, werden im ELISA enzymatisch gekoppelte Antikörper zur Markierung der zu quantifizierenden Substanz eingesetzt (Lequin 2005). Die Enzyme katalysieren eine Farbreaktion, welche photometrisch analysiert und semiquantitativ ausgewertet werden kann. Die Intensität der entstehenden Extinktionen verhält sich in einem linearen Bereich direkt proportional zur Konzentration der getesteten Substanzen. Die quantitative Auswertung wird letztendlich durch eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen des jeweiligen Analyten möglich. Antikörperaffinität und -avidität bestimmen die Sensitivität und Spezifität des ELISAs.

Methodisch kann man abhängig vom Antigen-Epitop, der Antigen-Immobilisation und der Verfügbarkeit spezifischer Antikörper mehrere ELISA-Formate unterscheiden. Im direkten ELISA ist bereits der Antikörper, welcher spezifisch mit dem nachzuweisenden Antigen interagiert, enzymatisch markiert (Lin 2015a). Demgegenüber reagiert im indirekten ELISA zunächst ein Antigen-spezifischer Primärantikörper mit dem Antigen, während erst ein daran bindender Sekundärantikörper mit einem katalytischen Enzym konjugiert ist. Hierdurch wird eine Signalamplifikation erreicht, nachteilig kommt es jedoch auch zu vermehrter Kreuzreaktivität mit

dem Sekundärantikörper (Lin 2015b). In beiden Verfahren kann das Antigen entweder durch passive Adsorption selbst an die stationäre Phase gebunden werden oder ein sogenannter *coating antibody* immobilisiert das interessierende Antigen auf der Mikrotiterplatte. Letzteres wird als *Sandwich-ELISA* bezeichnet, welcher eine erhöhte Sensitivität ermöglicht und üblicherweise angewendet wird, wenn das nachzuweisende Antigen in geringen Mengen vorliegt, seine physikochemischen Eigenschaften keine ausreichende Haftung an der festen Phase ermöglichen oder die Proben mehr als ein Protein enthalten (Konstantinou 2017).

Des Weiteren wird zwischen kompetitiven und nicht-kompetitiven *Immunoassays* differenziert. Im kompetitiven ELISA liegt der Antikörper im Unterschuss vor; das Antigen unbekannter Konzentration aus der Probe muss deshalb mit einem strukturell ähnlichen, enzymgebundenen Analyten, dessen Konzentration bekannt ist, um die begrenzten Bindungsstellen am immobilisierten Antikörper konkurrieren. Je mehr Antigen in der zu untersuchenden Probe vorhanden ist, desto mehr Antikörperbindungsstellen werden vom Proben-Antigen anstelle des markierten Kompetitor-Antigens besetzt und desto schwächer fällt das Farbsignal aus. Die gemessene Extinktion verhält sich also umgekehrt proportional zur Konzentration des Proben-Antigens (Kohl und Ascoli 2017). Ein nicht-kompetitiver ELISA folgt dem Prinzip des beschriebenen *Sandwich-ELISAs* und erfordert daher mindestens zwei gleichzeitig zugängliche Antikörperbindungsstellen am Analyten. Nachdem das Antigen an den fixierten *coating antibody* gebunden hat, wird eine bestimmte Menge eines weiteren, markierten Antikörpers im Überschuss hinzugegeben, welcher seinerseits an ein anderes Epitop des untersuchten Antigens bindet. Nachdem sich alle möglichen Antigen-Antikörper-Komplexe ausgebildet haben, werden durch Waschung des Testsystems die noch in der Lösung befindlichen, ungebundenen Antikörper entfernt. Das Signal der Nachweisreaktion ist hierbei folglich direkt proportional zur Konzentration (Weller 1992).

## 1.6 Zielstellung der Arbeit

Für die Erforschung der Relevanz fetaler Fn-Varianten für das (rechts-)ventrikuläre und pulmonalvaskuläre *Remodelling* im Rahmen der PH ist die Analytik der in die Zirkulation freigesetzten Proteinfraction essenziell. Besonders im Hinblick auf deren Bedeutung als potenzielle Biomarker oder *Targets* antikörperbasierter Diagnose- und Therapieverfahren ist es notwendig zu überprüfen, ob sich eine gesteigerte Gewebeexpression auch in erhöhten Serumspiegeln manifestiert. Voraussetzung hierfür ist ein zuverlässiges und reproduzierbares Nachweisverfahren, um die im Serum zirkulierende Menge der betreffenden Proteine zu quantifizieren und mit den Gewebeexpressionsdaten zu korrelieren.

Unter Anwendung eines von unserer AG entwickelten ELISAs konnte für verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen sowohl im humanen System als auch im Tiermodell bereits eine signifikante Serumliberation von ED-A<sup>+</sup>-Fn nachgewiesen werden. Die Untersuchung der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Konzentration im Serum von PH-Patienten ist bislang allerdings nicht erfolgt. Der Einfluss der ED-B<sup>+</sup>-Fn-Spleißvariante auf die Pathogenese der PH ist insgesamt nur unzureichend exploriert, was unter anderem dem Fehlen kommerzieller *Ready-to-use*-Kits zur quantitativen Erfassung der Serumpräsenz des Proteins geschuldet ist.

Aufgrund dessen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Teilaspekte untersucht werden:

- *Etablierung eines bislang nicht verfügbaren ELISA-Protokolls zur spezifischen Detektion von ED-B<sup>+</sup>-Fn in humanen Serumproben*
- *Analyse der Serumkonzentration von ED-A<sup>+</sup>-Fn und ED-B<sup>+</sup>-Fn bei 80 Patienten mit PH unterschiedlicher ätiologischer Klassen im Vergleich zu 40 Kontrollpatienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risikoprofil mittels ELISA*
- *Korrelation der erhobenen ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn-Serumspiegel zu klinischen, laborchemischen und echokardiografischen Parametern als bereits etablierte, nichtinvasive Methoden zur Diagnostik und Verlaufskontrolle der PH*
- *Evaluation der prädiktiven Wertigkeit von ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn für das Vorliegen einer PH*

## 2 Material

### 2.1 Verwendete Serum- und Gewebeproben

Das für die vorliegende Arbeit genutzte humane Probenmaterial wurde im Voraus aus einem Patientenkollektiv des Universitätsklinikums Jena gewonnen und untersucht. Klinikinternen und internationalen Standards entsprechend wurden die Blutproben unmittelbar nach deren Entnahme bei  $2383 \times g$  für 25 min zentrifugiert und der Überstand nach *Snap-Freezing* in flüssigem Stickstoff bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.1.1 Patienten mit pulmonaler Hypertonie unterschiedlicher ätiologischer Klassen

In das im Zentrum dieser Arbeit stehende Patientenkollektiv wurden 31 männliche Patienten und 49 weibliche Patientinnen mit PH unterschiedlicher ätiologischer Klassen integriert, welche sich an der Klinik für Innere Medizin I, Abteilung für Kardiologie, des Universitätsklinikums Jena in Behandlung befanden. Für die Untersuchungen im beschriebenen Umfang lag selbstverständlich ein positives Votum der zuständigen Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena vor (Registrierungsnummer: 4732-03/16; 11. April 2016). Die Probengewinnung erfolgte nach ausführlicher Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Patienten in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki (World Medical Association 2013) und den aktuellen *Good-clinical-practice-Guidelines* (European Medicines Agency 2018). Für vergleichende Analysen wurden zusätzlich 40 Kontrollpersonen mit erhöhtem kardiovaskulärem Risikoprofil aus selbiger Klinik untersucht, bei denen zuvor invasiv eine KHK ausgeschlossen wurde (Montalescot et al. 2013). Weitere Ausschlusskriterien für das Kontrollkollektiv waren maligne Tumor- oder Autoimmunerkrankungen, Hyperthyreose, Infektionen, periphere arterielle Verschlusskrankheit, eine Lungenembolie oder ein Schlaganfall in der Anamnese und die Einnahme von Immunsuppressiva.

Sowohl die 80 PH-Patienten als auch die 40 Kontrollpersonen wurden hinsichtlich klinischer und funktioneller Parameter umfassend charakterisiert. Für detaillierte Angaben zu den Studienkollektiven einschließlich kardiovaskulärer Risikofaktoren und Medikation sei an dieser Stelle auf Tab. 12 und Tab. 13 im Abschnitt 4.3.1 verwiesen. Neben Blutentnahmen zur Bestimmung kardiologischer Routinelaborparameter wurden die Studienpopulationen einer transthorakalen Echokardiografie (TTE) und einem sechsminütigen Gehtest unterzogen. Das Serum wurde unter Verwendung spezieller *low binding tubes* (Protein LoBind Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und nach sofortigem Schockfrost in flüssigem Stickstoff bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, um die Proteindegradation möglichst gering zu halten. Aus demselben Grund wurden auch wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen weitestgehend vermieden.

### 2.1.2 Humane Gewebeschnitte für immunhistochemische Untersuchungen

Zur Validierung der Spezifität der im Rahmen der ELISA-Protokollentwicklung verwendeten Primärantikörper, welche sich spezifisch gegen ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn richten, erfolgten immunhistochemische Analysen unter Verwendung humanen Gewebematerials. Zu diesem Zweck kamen – auch unter Berücksichtigung ethischer Gesichtspunkte – bereits vorhandene Gewebeproben historischer Kollektive unserer AG zum Einsatz. Dabei handelt es sich zum einen um myokardiales Gewebe rechter Vorhoföhren und zum anderen um Gewebe von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Da die entsprechenden Befunde lediglich der methodischen Validierung dienen, werden die zugehörigen Patientenkollektive in der Arbeit nicht weiter ausgeführt. Die entsprechenden Studienprotokolle und Ethikvoten liegen in der AG vor und können bei Bedarf jederzeit vorgelegt werden.

## 2.2 Chemikalien, Materialien und Geräte

Im Folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien, Chemikalien und Geräte tabellarisch aufgeführt. Tab. 3 gibt einen Überblick über die Antikörper, Enzyme und Fn-Standardsubstanzen, welche für die ELISAs und / oder die Immunhistochemie (IHC) verwendet wurden. Sämtliche weiteren genutzten Reagenzien werden in Tab. 4 und die zugehörigen Pufferlösungen in Tab. 5 angegeben. Die Verbrauchsmaterialien sind in Tab. 6 angeführt. Die benutzten Geräte sind in Tab. 7 und die entsprechende Software in Tab. 8 gelistet.

**Tab. 3: Antikörper, Enzyme und Fibronektin-Standards für ELISA und Immunhistochemie**

BC-1 (0,74 mg/ml), S-FN4	Sirius Biotech S.r.L., Genua, Italien
C6 (1,037 mg/ml), S-FN12	
ED-A <sup>+</sup> -Fn (0,53 mg/ml)	
ED-B <sup>+</sup> -Fn (0,37 mg/ml)	
Esel-anti-Maus, Biotin-konjugiert (1,2 mg/ml)	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
IST-6 (0,593 mg/ml), S-FN9	Sirius Biotech S.r.L., Genua, Italien
IST-9 (0,2 mg/ml), S-FN5	
Streptavidin, Cy3-konjugiert (0,5 mg/ml)	Southern Biotech, Birmingham, USA
Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (1,0 mg/ml)	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
<b>Abkürzungen:</b> Cy3: Cyanin 3   Fn: Fibronektin	

**Tab. 4: Weitere Reagenzien**

Aceton (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Antikörperverdünnungslösung mit Hintergrund-reduzierenden Komponenten	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
DAKO Biotin Blocking System	
DAKO Pen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Dinatriumphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerol-Gelatine	
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	
Nagellack, klar	Essence, Frankfurt, Deutschland
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) 0,5 M	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff (N <sub>2</sub> ), flüssig	Linde AG, München, Deutschland
TMB One™	Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dänemark
Trizma® Base	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA
Trizma® Hydrochlorid (Trizma® HCl)	
Tween 20	
VECTASHIELD® Eindeckmedium mit DAPI	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
<b>Anmerkungen:</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, ein Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von DNA</li> <li>▪ TMB One™ = chromogenes Substrat, das 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid enthält</li> <li>▪ Trizma® = Tris (kurz für Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), ein Bestandteil von Tris-gepufferter Salzlösung (TBS, siehe Tab. 5)</li> <li>▪ Tween 20 = Handelsname von Polysorbat 20</li> </ul>	

**Tab. 5: Pufferlösungen**

10 x PBS	80 g NaCl 11,1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 g KCl 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 l dH <sub>2</sub> O
1 x PBS	100 ml 10 x PBS ad 1 l dH <sub>2</sub> O
1 x PBS-Tween	1 l 1 x PBS 1 ml Tween
1 x TBS	2,25 g Trizma <sup>®</sup> Base 17,125 g Trizma <sup>®</sup> HCl 21,95 g NaCl ad 2,5 l dH <sub>2</sub> O
1 x TBS-Tween	1 l 1 x TBS 1 ml Tween
<b>Abkürzungen:</b> dH <sub>2</sub> O: destilliertes Wasser   HCl: Hydrochlorid   KCl: Kaliumchlorid   KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : Kaliumdihydrogenphosphat   NaCl: Natriumchlorid   Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : Dinatriumhydrogenphosphat   PBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung   TBS: Tris-gepufferte Salzlösung	

**Tab. 6: Verbrauchsmaterialien**

Deckgläser (24 x 50 mm)	Gerhard Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Eiswanne	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Falcons (20 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Inkubationskammer für Objektträger	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland
Objektträger, Polysine-beschichtet	Gerhard Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Pasteurpipetten (3 ml)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen	
Protein LoBind Tubes (2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reagenzreservoirs (60 ml)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
96 Well ELISA Mikrotiterplatten, PS, Microlon <sup>™</sup> , flat bottom, high binding	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
<b>Abkürzungen:</b> ELISA: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>   PS: Polystyrol	

**Tab. 7: Geräte**

Axioplan 2 Imaging Forschungsmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Eppendorf-Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 100 µl und 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (cLSM) LSM 510	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Kühl- und Gefrierschrankskombination	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Magnet-Heizrührgerät	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mehrkanalpipette (300 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Micro Centrifuge SD Tisch-Zentrifuge	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milli-Q® Wasseraufbereitungsanlage	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tecan Infinite Pro Microplate Reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA

**Tab. 8: Software**

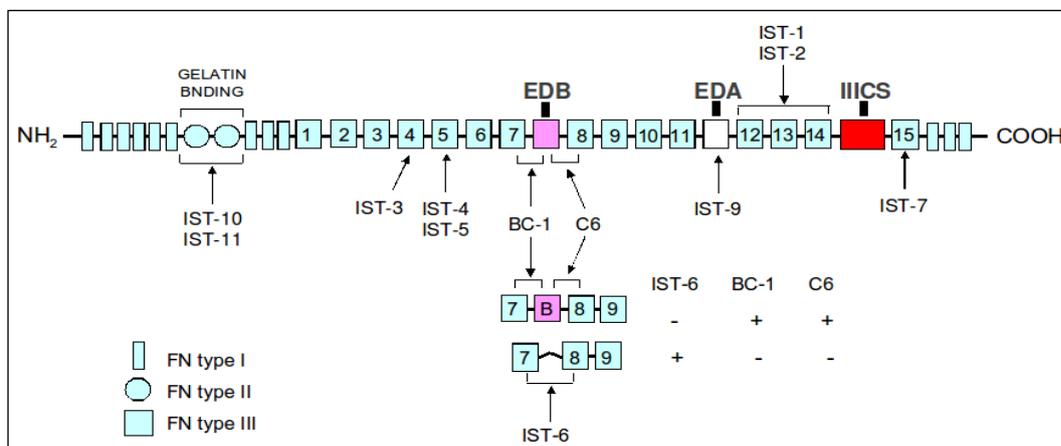
Axio Vision Rel. 4.8.2 Software	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
LSM 510 Rel. 3.2 Software	
Magellan 5 Software	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SPSS Statistics Software (Version 25)	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland

## 3 Methoden

### 3.1 Etablierung eines ELISAs zum Nachweis von ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin

#### 3.1.1 Grundprinzip des ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-ELISAs

Ein *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ist ein sensitives und spezifisches Verfahren zum qualitativen Nachweis und zur Quantifizierung von Antigenen oder Antikörpern, welches schnell und ohne großen technischen Aufwand realisierbar ist (Konstantinou 2017). Ein ELISA zur Detektion der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Spleißvariante wurde bereits im Voraus von unserer AG etabliert (Ziffels et al. 2016), auf den im Abschnitt 3.3 kurz eingegangen wird. Dieses Protokoll wurde hinsichtlich Inkubationsdauer und Verdünnungsschritten orientierend für den im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISA herangezogen. Für jenen ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISA wurde das Prinzip eines nicht-kompetitiven, indirekten *Sandwich*-ELISAs angewendet, da hierdurch eine höhere Sensitivität insbesondere bei kleinen, zu messenden Antigenkonzentrationen erreichbar ist (Konstantinou 2017). Aufgrund der Gelatinebindedomäne am N-Terminus von Fn konnten herkömmliche, gelatinebeschichtete Mikrotiterplatten (Tab. 6) als feste Phase verwendet werden (Selmer et al. 1984). Da die Gelatinebindedomäne jedoch konstitutiver Bestandteil des Fn-Moleküls und nicht spezifisch für ED-B<sup>+</sup>-Fn ist, musste die anschließende Detektion mit einem Antikörper hoher Spezifität für ebendiese Extradomäne erfolgen. Dies wurde durch die domänenspezifischen, monoklonalen Maus-Antikörper C6 und BC-1 (Tab. 3) realisiert, welche jeweils an ein Epitop der Typ III-Domänen 7 (BC-1) bzw. 8 (C6) von Fn binden – jedoch ausschließlich dann, wenn die ED-B<sup>+</sup> im Fn-Molekül enthalten ist (Bindungsstellen im Fn-Molekül: siehe Abb. 2). Ist die ED-B<sup>+</sup> durch alternatives *Splicing* aus dem Fn-Molekül entfernt, ist durch eine Konformationsänderung der Epitope eine Bindung von BC-1 bzw. C6 nicht möglich (Carnemolla et al. 1992, Ventura et al. 2010).



**Abb. 2: Fibronektin-Molekülstruktur und Bindungsstellen domänenspezifischer Antikörper.**  
(Quelle: Sirius Biotech S.r.L., Genua, Italien; [www.sirius-biotech.com](http://www.sirius-biotech.com))

Der gebundene Primärantikörper wurde durch den affinitätsgereinigten, biotinylierten Sekundärantikörper Esel-anti-Maus-IgG (Tab. 3) nachgewiesen, welcher nur minimale Kreuzreaktivität mit anderen Spezies aufweist. Im Anschluss folgte ein Inkubationsschritt mit Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (Tab. 3). Aufgrund der hohen Affinität von Streptavidin zu Biotin wird bei diesem Aufbau des Nachweissystems eine Signalamplifikation erreicht, da jede der vier Untereinheiten des Streptavidins mit sehr hoher Affinität ( $K_A \sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$ ) je ein Molekül Biotin binden kann (Chalet und Wolf 1964, Wilchek und Bayer 1988) und jeder biotinylierte Sekundärantikörper mehrere Biotin-*Tags* aufweist. Durch Zugabe des Substrats TMB One™ (Tab. 4), welches als Chromogen für die Peroxidase fungiert, kommt es zu einem Farbumschlag des Testsystems. Die Intensität der entstehenden Färbung korreliert mit der enthaltenen ED-B<sup>+</sup>-Fn-Konzentration und kann in Abhängigkeit von der Zeit photometrisch gemessen werden.

### 3.1.2 Inkubationen, Verdünnungen und Waschschrte im ELISA

Sämtliche Inkubationsschritte des ELISA-Protokolls erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, für eine Stunde in der feuchten Kammer unter Raumtemperatur. Soweit nicht gesondert erwähnt, wurden die Inkubationen mit jeweils 100 µl der entsprechenden Verdünnungslösung (siehe Tab. 9) in je einem Well der Mikrotiterplatte durchgeführt. Unmittelbar vor dem Auftragen auf die Mikrotiterplatte wurden die Reagenzien unter Anwendung des Vortex-Genie 2 (Tab. 7) gründlich durchmischt. Im Anschluss an jede Inkubationszeit erfolgten drei Waschschrte mit je 300 µl 1 x PBS-Tween (Tab. 5) mithilfe einer Mehrkanalpipette (Tab. 7). Zwischen den einzelnen Waschschrten wurde die Mikrotiterplatte auf Zellstoffpapier ausgeklopft. Als Lösungsmittel für die Probenverdünnung und die Anfertigung der Standardkonzentrationsreihe diente 1 x PBS (Tab. 5).

**Tab. 9: Verwendete Verdünnungen im ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin-ELISA**

Antikörper / Enzym	Verdünnung
C6	1 : 750
BC-1	1 : 75
Esel-anti-Maus, Biotin-konjugiert	1 : 10.000
Streptavidin-Horseradish-Peroxidase	1 : 330

### 3.1.3 Standardreihe und Leerwert

Notwendig für eine Quantifizierung der im ELISA ermittelten ED-B<sup>+</sup>-Fn-Messwerte ist die Korrelation zu einer bekannten Konzentration des Proteins. Eine solche Standardkonzentrationsreihe wurde auf jeder Mikrotiterplatte mitgeführt, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu unterschiedlichen Messzeitpunkten zu gewährleisten. Für die Standardreihe wurde reines

ED-B<sup>+</sup>-Fn (Tab. 3) in den Konzentrationen 1,7; 0,963; 0,546; 0,309; 0,175; 0,0993 und 0,0563 µg/ml gewählt. Da eine geringfügige Interaktion des reinen Lösungsmittels mit den einzelnen Versuchskomponenten nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde 1 x PBS ohne Hinzugabe einer Probe als Leerwert (Blank) auf jeder Mikrotiterplatte mitgeführt. Die Extinktion des reinen Lösungsmittels wurde in der Auswertung von den Extinktionswerten der gemessenen Proben subtrahiert. Sowohl die Konzentrationsbestimmungen in den Leerwertkontrollen und der Standardreihe als auch in sämtlichen Proben erfolgten als Doppelbestimmung. Aus beiden Extinktionswerten einer Probe wurde der Mittelwert für weitere Berechnungen genutzt.

### 3.1.4 Testung des geeigneten Primärantikörpers

Die für den ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISA genutzten Primärantikörper C6, BC-1 und IST-6 (Tab. 3) wurden freundlicherweise durch den langjährigen Kooperationspartner unserer AG, Prof. Dr. Luciano Zardi, zur Verfügung gestellt bzw. über die Firma Sirius Biotech S.r.L., Genua, Italien, kommerziell erworben. Erste Testungen der Primärantikörper im ELISA orientierten sich hinsichtlich Standardreihe und Antikörperverdünnung am bereits etablierten ED-A<sup>+</sup>-Fn-ELISA (Ziffels et al. 2016). Als Standardkonzentrationsreihe wurde ED-B<sup>+</sup>-Fn wie unter 3.1.3 beschrieben in sieben unterschiedlichen Verdünnungsstufen aufgetragen. Zur Überprüfung der Detektionsfähigkeit der AK im humanen und murinen System wurden zusätzlich für jeden getesteten Primärantikörper eine humane und eine murine Probe in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen mitgeführt, welche aus dem unter 2.1.1 beschriebenen Kollektiv (human) bzw. historischen Kollektiven (murin) unserer AG stammten. Zur anfänglichen Exploration wurden alle Primärantikörper (C6, BC-1, IST-6) in einer Konzentration von 1 : 200 aufgetragen. Die dadurch generierten Messwerte dienten als Orientierung für die nachfolgend erläuterte Einzeltestung der AK.

#### 3.1.4.1 C6 als Primärantikörper

C6 ist ein hochaffiner, monoklonaler AK (Maus-IgG1), der eine spezifische Fn-Sequenz mittels ELISA, IHC und Western Blot erkennt, die auf der Typ III-Domäne 8 (unmittelbar neben der ED-B<sup>+</sup>) lokalisiert ist. Diese Sequenz ist normalerweise im Fn-Molekül maskiert, wird jedoch durch den Einschluss der ED-B<sup>+</sup> zugänglich (Balza et al. 2009). C6 wurde sowohl an der Standardreihe als auch an mehreren humanen Serumproben in den Konzentrationen 1 : 200, 1 : 500 und 1 : 1000 getestet, um die optimale Verdünnung für den ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISA zu evaluieren.

#### 3.1.4.2 BC-1 als Primärantikörper

BC-1 ist ebenfalls ein monoklonaler AK (Maus-IgG1), welcher an ein Epitop der Typ III-Domäne 7 von Fn bindet, wenn die ED-B<sup>+</sup> im Molekül enthalten ist (Carnemolla et al. 1992). Neben C6 kam somit auch BC-1 als potenzieller Primärantikörper für den neu zu etablierenden

ELISA infrage. Zu diesem Zweck wurden sowohl die Standardreihe als auch mehrere Serumproben des PH-Kollektivs mit BC-1 in den Konzentrationen 1 : 50, 1 : 75 und 1 : 100 inkubiert.

#### 3.1.4.3 IST-6 als Primärantikörper

Im Gegensatz zu den genannten Antikörpern C6 und BC-1 bindet das Paratop des monoklonalen AK IST-6 (Maus-IgG1) zwar ebenfalls an ein Epitop der Typ III-Domänen 7 und 8 von Fn, jedoch nur dann, wenn die ED-B<sup>+</sup> durch alternatives *Splicing* aus dem Molekül entfernt wurde (Carnemolla et al. 1992). Da IST-6 somit lediglich ED-B<sup>+</sup>-freies Fn detektiert, eignete sich dieser AK als Negativkontrolle für die durchgeführten Untersuchungen.

#### 3.1.5 Testung der geeigneten Probenverdünnung

Um die optimale Probenverdünnung zur Bestimmung der Konzentration von ED-B<sup>+</sup>-Fn in humanen Serumproben von Patienten mit PH (siehe Abschnitt 3.4) zu testen, wurden Proben aus dem unter 2.1.1 beschriebenen Kollektiv in den Konzentrationen 1 : 2, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 60, 1 : 80 und 1 : 100 auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Die Proben wurden mit C6 als Primärantikörper in einer Konzentration von 1 : 750 inkubiert. Zusätzlich wurde die unter 3.1.3 erläuterte Standardreihe mitgeführt, um die Probenverdünnung für nachfolgende Messungen so zu wählen, dass die gemessenen Extinktionen innerhalb der Spanne liegen, welche durch die Standardreihe abgedeckt wird. Nur dann kann die Standardkurve als Kalibrierung für die Messwerte genutzt werden.

#### 3.1.6 Protokoll des finalen ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-ELISAs

Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte *Assay* folgt dem Prinzip eines indirekten, nicht-kompetitiven *Sandwich*-ELISAs. Für das *Capturing* des Zielmoleküls Fn wurde zunächst eine Mikrotiterplatte mit Gelatine (Tab. 4) beschichtet. Hierfür wurden 0,25 g Gelatine in 50 ml 1 x PBS mithilfe des Magnet-Heizrührgeräts (Tab. 7) unter leichter Erwärmung vollständig gelöst. Diese Lösung wurde auf eine 96 Well ELISA-Platte (Bindekapazität 600 ng/cm<sup>2</sup>, Tab. 6) mit jeweils 300 µl pro Well aufgetragen. Im Anschluss folgte eine Inkubation in der feuchten Kammer für 20 Stunden unter Raumtemperatur. Nach diesem und jedem weiteren Inkubationsschritt wurde das Testsystem gewaschen wie unter 3.1.2 erläutert. Der nächste Schritt bestand in der einstündigen Inkubation der Proben, für die jeweils 50 µl der zu untersuchenden Probe in ein Well pipettiert wurden. Ebenso wurde auf jeder Mikrotiterplatte die unter 3.1.3 beschriebene Standardreihe mitgeführt. Da bei einer Immobilisation des gesuchten Antigens durch Gelatine anstelle eines *coating antibodies* die Blockierung noch offener Bindungsstellen entfiel, konnte nach einem weiteren Waschschrift direkt der Primärantikörper aufgetragen werden. Die im Folgenden beschriebenen Inkubationsschritte erfolgten alle mit jeweils 100 µl der verdünnten Lösung pro Well wie unter 3.1.2 beschrieben. Die Detektion des gebundenen ED-B<sup>+</sup>-Fn erfolgte

mithilfe einer 1 : 750-verdünnten Lösung des monoklonalen Antikörpers C6, welcher spezifisch an ein Epitop der Typ III-Domäne 8 von Fn bindet. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einer 1 : 10.000 verdünnten Lösung des hochaffinen Sekundärantikörpers Esel-anti-Maus-Biotin. Es folgte eine 40-minütige Inkubation mit 1 : 330 verdünnter Streptavidin-*Horseradish*-Peroxidase-Lösung. Danach wurde TMB One™ als Substrat und Chromogen für die Peroxidase hinzugegeben und die Mikrotiterplatte im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Hierbei kam es zu einem sichtbaren Farbumschlag des Testsystems von farblos nach blau, der im zeitlichen Verlauf zunahm. Bei einer entsprechenden Farbintensität abhängig von der Zeit wurde die enzymatisch katalysierte Reaktion nach etwa 10 bis 15 min durch Zugabe von 0,5 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Tab. 4) abgestoppt. Aufgrund der Verschiebung des pH-Werts erfolgte bei diesem Schritt ein erneuter Farbumschlag von blau nach gelb. Der Zeitpunkt des Reaktionsstopps durch Schwefelsäure wurde so gewählt, dass sich zwar eine zur Detektion ausreichende Farbintensität in der Standardreihe und den Proben entwickeln konnte, jedoch noch deutliche Farbunterschiede der inkubierten Reagenzien erkennbar waren. Eine zu lange Inkubationsdauer erhöht die Rate unspezifischer Reaktionen zwischen den einzelnen Versuchskomponenten. Die Extinktionen (= optische Dichten) der entstandenen Färbungen wurden anschließend mit dem Tecan Infinite Pro Microplate Reader (Tab. 7) bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm photometrisch analysiert und mithilfe der Magellan 5 Software (Tab. 8) semiquantitativ ausgewertet. Die Intensität der gemessenen Extinktionen verhielt sich in einem linearen Bereich direkt proportional zur in der jeweiligen Probe enthaltenen ED-B<sup>+</sup>-Fn-Konzentration. Das hier beschriebene Gelatine-ELISA-Protokoll wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Standardprotokoll zur Messung der ED-B<sup>+</sup>-Fn-Konzentration in den Serumproben genutzt.

## **3.2 Immunfluoreszenz-Analysen zur Verifizierung der Antikörper-Spezifität für den ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-ELISA**

### **3.2.1 Grundlagen**

Die im ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISA genutzten Primärantikörper C6, BC-1 und IST-6 wurden zusätzlich in der IHC getestet, um ihre Spezifität für die Detektion der ED-B<sup>+</sup> in einem alternativen Verfahren zu verifizieren. Die IHC ist eine Methode, mit der Antigene in Gewebeschnitten mithilfe markierter AK sichtbar gemacht werden können. Sind die AK mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, spricht man von Immunfluoreszenz. Ähnlich wie im ELISA bindet in der hier durchgeführten Variante ein Primärantikörper an ein Epitop des Antigens im Gewebeschnitt, während ein biotinylierter Sekundärantikörper eine andere Bindungsstelle des Primärantikörpers

erkennt. Um das Vorhandensein im Präparat sichtbar zu machen, bindet enzymmarkiertes Streptavidin an das Biotin des Sekundärantikörpers (*Labelled* (Strept-)Avidin-Biotin-Methode). Der Nachweis der Fluoreszenz erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskop, welches die Fluorochrome durch Licht einer spezifischen Wellenlänge anregt (Ramos-Vara 2005). Um die Expression von ED-B<sup>+</sup>-Fn in myokardialem Gewebe zu untersuchen, wurden die unter 2.1.2 genannten Gewebeschnitte humaner rechter Vorhofohren genutzt. Da ED-B<sup>+</sup>-Fn wie unter 1.4.2 dargelegt hauptsächlich als Marker der Tumorneoangiogenese gilt, wurden als Positivkontrolle die ebenfalls unter 2.1.2 angeführten Gewebeschnitte von Plattenepithelkarzinomen verwendet.

### 3.2.2 Durchführung

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche standen bereits fertige Kryo-Gewebeschnitte zur Verfügung, sodass die Aufbereitung des humanen Gewebes (Kryokonservierung, Kryoschneiden und Fixierung auf Polysine-beschichteten Objektträgern) entfiel. Vor dem Auftragen des nächsten Reagenzes wurden die Objektträger (Tab. 6) jeweils dreifach in 1 x TBS-Tween (Tab. 5) gewaschen. Zu Beginn wurden die Kryoschnitte der Methanol-Aceton-Fixierung unterzogen, wofür sie 30 Sekunden in -20°C kaltes Methanol (Tab. 4) und anschließend 9 min in -20°C kaltes Aceton (Tab. 4) eingetaucht wurden. Danach wurde zwischen den jeweils drei Gewebeschnitten pro Objektträger mittels DAKO Pen (Tab. 4) eine hydrophobe Barriere aufgetragen, um die einzelnen Schnitte mit unterschiedlichen Primärantikörper-Verdünnungen inkubieren zu können und die mitgeführte Negativkontrolle nicht zu verunreinigen. Die folgenden Arbeitsschritte wurden in einer feuchten Inkubationskammer (Tab. 6) durchgeführt, um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden. Zur Absättigung endogenen Biotins wurden die Schnitte zunächst 30 min mit einem Tropfen Avidin-*Solution* und anschließend 30 min mit einem Tropfen Biotin-*Solution* (DAKO Biotin Blocking System, Tab. 4) inkubiert. Im Anschluss wurden die Primärantikörper C6, BC-1 und IST-6 (Tab. 3) in den in Tab. 10 ersichtlichen Verdünnungen aufgetragen und die Schnitte über Nacht bei 4°C gelagert. Auf die Negativkontrollen wurden statt einem Primärantikörper die reine Antikörperverdünnungslösung mit Hintergrund-reduzierenden Komponenten (Tab. 4) aufgetragen, um einen Spezifitätsnachweis der Primärantikörper durchzuführen. Am Folgetag schloss sich eine 45-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper Esel-anti-Maus-Biotin (Tab. 3) an. In einem letzten Schritt wurde Streptavidin-Cy3 (Tab. 3) für 45 min auf die Schnitte aufgetragen. Der letzte Waschgang wurde zuerst zweimal mit 1 x TBS (Tab. 5) und anschließend einmal mit dH<sub>2</sub>O durchgeführt. Zur Mikroskopie und Konservierung wurden die Objektträger schlussendlich mit dem VECTASHIELD® Eindeckmedium mit DAPI (Tab. 4) eingedeckt, mit klarem Nagellack (Tab. 4) fixiert und bis zur Auswertung in Dunkelheit bei -20°C gelagert. Durch das enthaltene DAPI

erfolgt zusätzlich eine Markierung der DNA in den Zellkernen. Die Verdünnungen des Primär- und Sekundärantikörpers sowie von Streptavidin-Cy3 wurden mit der Antikörperverdünnungslösung mit Hintergrund-reduzierenden Komponenten angefertigt. Pro Schnitt wurden jeweils 100 µl der entsprechenden Verdünnungslösung aufgetragen. Mit Ausnahme der nächtlichen Inkubation bei 4°C in der Kühlkammer erfolgten alle Schritte bei Raumtemperatur.

**Tab. 10: Verwendete Verdünnungen in der Immunfluoreszenz**

Antikörper / Enzym	Verdünnung
C6	1 : 100 und 1 : 150
BC-1	1 : 100 und 1 : 150
IST-6	1 : 20 und 1 : 30
Esel-anti-Maus, Biotin-konjugiert	1 : 200
Streptavidin, Cyanin 3-konjugiert	1 : 200

### 3.2.3 Auswertung am Mikroskop

Zur semiquantitativen Detektion der Gewebeexpression von ED-B<sup>+</sup>-Fn wurden von jedem Gewebeschnitt sechs nicht überlappende, repräsentative Bilder mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 (Tab. 7) erzeugt. Unter Anwendung der LSM 510 Rel. 3.2 Software (Tab. 8) wurde die Anzahl roter Pixel (Cyanin 3) ermittelt und daraus der relative Anteil der angefärbten Fläche in Prozent berechnet. Zur Auswertung wurde der Mittelwert der sechs Bilder bestimmt. Um die unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu eliminieren, wurden zusätzlich zwei Bilder der für jeden Primärantikörper mitgeführten Negativkontrolle angefertigt. Die Mittelwerte der Negativkontrolle wurden von den Mittelwerten der Schnitte mit den jeweiligen Primärantikörpern subtrahiert. Die digitalen Aufnahmen wurden mit dem Axioplan 2 Imaging Mikroskop (Tab. 7) und der zugehörigen Axio Vision Rel. 4.8.2 Software (Tab. 8) erstellt.

### 3.3 ELISA zum Nachweis von ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin

Zur spezifischen Messung der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Konzentration in humanen Serumproben stand ein in unserer AG bereits etabliertes ELISA-Protokoll zur Verfügung. Da dieser ELISA ebenfalls ein indirekter, nicht-kompetitiver *Assay* ist, welcher hinsichtlich verwendeter Reagenzien, Inkubationsdauern und Verdünnungsschritten dem unter 3.1 ausführlich protokollierten ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISA sehr ähnelt, wird an dieser Stelle auf Details zur Methodik verzichtet. Für eine Darstellung der Einzelschritte sei auf die vorhergehenden Abschnitte sowie die Originalpublikation von Ziffels et al. verwiesen (Ziffels et al. 2016). Das *Capturing* von Fn erfolgte ebenfalls mittels Gelatine. Als Standardreihe wurde ED-A<sup>+</sup>-Fn (Tab. 3) in den Konzentrationen 3,0; 1,7; 0,97;

0,559; 0,319; 0,18 und 0,104  $\mu\text{g/ml}$  genutzt. Da Gelatine unabhängig von der Molekülvariante Bestandteil des Fn-Moleküls ist, musste die anschließende Detektion mit einem AK erfolgen, dessen Paratop sich spezifisch gegen die ED-A<sup>+</sup> in cFn richtet. Als Primärantikörper diente der monoklonale Maus-AK IST-9 (IgG1, Tab. 3), welcher spezifisch an die ED-A<sup>+</sup> bindet (siehe Abb. 2). Im Anschluss wurde zuerst für eine Stunde der hochaffine, biotinylierte Esel-anti-Maus-AK (Tab. 3) und danach für 40 min Streptavidin-*Horseradish*-Peroxidase (Tab. 3) hinzugegeben. Die Verdünnung der verwendeten Reagenzien ist in Tab. 11 aufgelistet. Die beschriebenen Versuchsschritte dienten als Standardprotokoll für die Messung der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Konzentration in den Serumproben.

**Tab. 11: Verwendete Verdünnungen im ED-A<sup>+</sup>-Fibronectin-ELISA**

Antikörper / Enzym	Verdünnung
IST-9	1 : 200
Esel-anti-Maus, Biotin-konjugiert	1 : 10.000
Streptavidin- <i>Horseradish</i> -Peroxidase	1 : 330

### 3.4 Quantifizierung der Serumkonzentration von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie

Mithilfe der unter 3.1 und 3.3 beschriebenen ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISAs wurden die ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn-Konzentrationen in humanen Serumproben von Patienten mit PH quantitativ bestimmt. Die verwendeten Seren stammten von 80 PH-Patienten, welche unter 2.1.1 bzw. 4.3.1 umfassend charakterisiert werden. Um die potenzielle Erhöhung der Serumlevel fetaler Fn-Varianten bei PH-Patienten zu evaluieren, wurden die beiden ELISAs vergleichsweise an einem Kontrollkollektiv mit 40 Patienten mit anderweitig erhöhtem kardiovaskulärem Risiko durchgeführt, welches ebenfalls unter 2.1.1 beschrieben wird. Die Serumproben wurden jeweils als Doppelbestimmung in zwei verschiedenen Konzentrationen (1 : 20 und 1 : 40) auf die Mikrotiterplatte aufgetragen und entsprechend Abschnitt 3.1.2 inkubiert. Nach Durchführung der ELISA-Protokolle wurde die optische Dichte (OD) der Proben mithilfe des Tecan Infinite Microplate Readers bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen. Zur Kalibrierung der Messwerte und zur Vergleichbarkeit der Daten unterschiedlicher Messzeitpunkte wurde auf jeder Mikrotiterplatte eine Standardkonzentrationsreihe mit reinem ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn mitgeführt wie unter 3.1.3 bzw. 3.3 erläutert. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen und technische Fehler auszuschließen, wurden sowohl der ED-A<sup>+</sup>- als auch der ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISA an ausgewählten Serumproben an unterschiedlichen Versuchstagen wiederholt und die Extinktionswerte miteinander verglichen.

### 3.5 Statistik

Die Darstellung der quantitativen Bestimmungen von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn in humanen Serumproben erfolgte als Mittelwert bzw. Median und zugehöriger Standardabweichung im Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2016 (Microsoft Office Professional Plus 2016, Tab. 8). Mit selbigem Programm erfolgten auch die Ermittlung und grafische Darstellung der Standardkurve sowie der zugehörigen Funktionsgeraden. Die zur Charakterisierung der Studienkollektive angegebenen Mittelwerte der klinischen und hämodynamischen Parameter sowie die Mediane der Laborparameter inklusive der jeweils zugehörigen Standardabweichungen wurden ebenfalls mit Microsoft Excel 2016 errechnet.

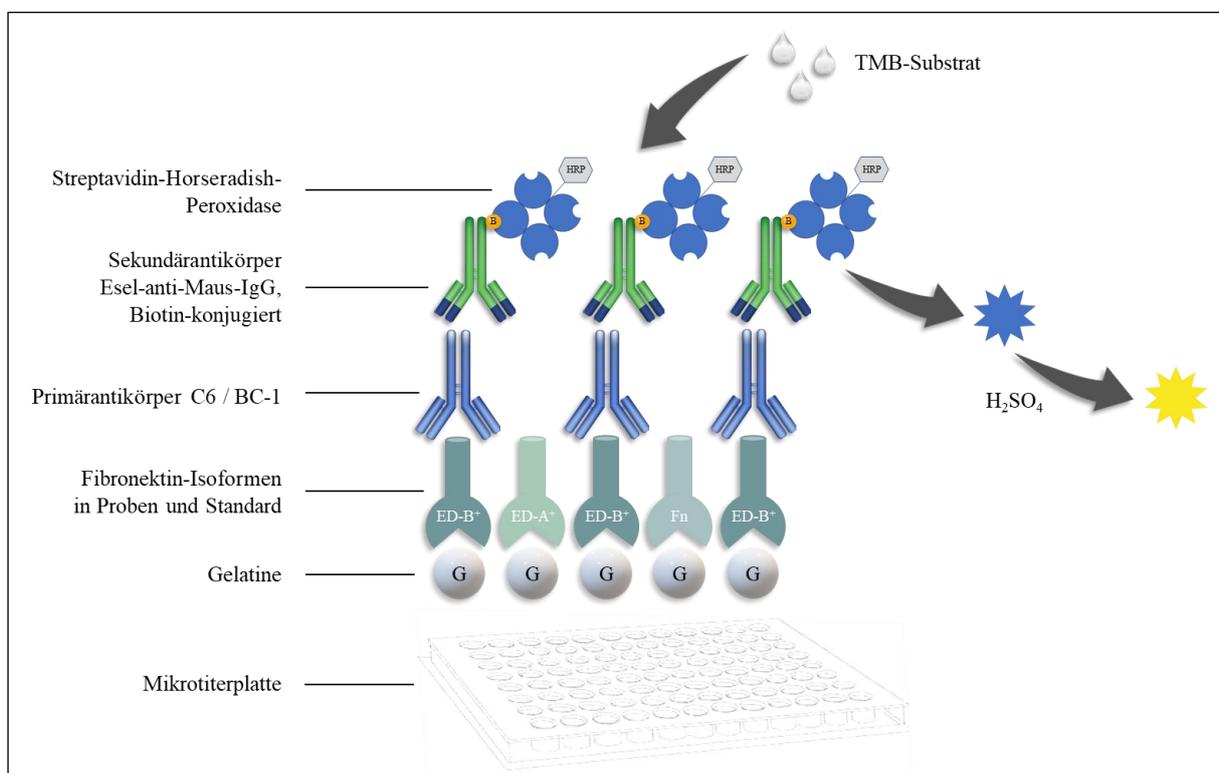
Für die statistische Auswertung der Daten sowie zur Darstellung von Zusammenhängen verschiedener Parameter wurde das Programm SPSS Statistics (Version 25, Tab. 8) der Firma IBM benutzt. Zur Ermittlung der Signifikanz von Mittelwertsunterschieden wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test bei zwei zu vergleichenden Gruppen und der Kruskal-Wallis-Test bei mehreren zu vergleichenden Gruppen angewendet. Die Zusammenhänge zwischen der ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn-Konzentration und diversen anderen Parametern wurden durch bivariate Spearman-Korrelationsanalysen untersucht. Um die prädiktive Wertigkeit fetaler Fn-Varianten für das Vorliegen einer PH zu testen, wurde eine logistische Regressionsanalyse (Rückwärtselimination nach Wald) unter Einschluss potenziell relevanter Patientencharakteristika (Kovariaten) durchgeführt. Wenn nicht gesondert angegeben, wurde ein Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit unterhalb 5%, also einem p-Wert  $< 0,05$ , als statistisch signifikant angenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung eines ELISAs zum Nachweis von ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin

#### 4.1.1 Grundprinzip des ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin-ELISAs

Für den zu etablierenden ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISA wurde das Prinzip eines nicht-kompetitiven, indirekten ELISAs verwendet. Aufgrund der Gelatinebindedomäne am N-Terminus von Fn (vgl. Abb. 2) wurden die Mikrotiterplatten zum *Capturing* von Fn anfänglich mit Gelatine beschichtet. Die anschließende Detektion der ED-B<sup>+</sup> erfolgte durch die domänenspezifischen Antikörper C6 bzw. BC-1. Der gebundene Primärantikörper wurde durch den hochspezifischen, affinitäts-gereinigten Sekundärantikörper Esel-anti-Maus-Biotin nachgewiesen. Eine anschließende Inkubation mit Streptavidin-*Horseradish*-Peroxidase ermöglichte aufgrund der hohen Affinität von Streptavidin zu Biotin eine Signalamplifikation. Die Zugabe von TMB One<sup>TM</sup> katalysierte eine Farbreaktion, welche photometrisch analysiert und semiquantitativ ausgewertet wurde. Zur Generierung einer Standardreihe diente reines ED-B<sup>+</sup>-Fn; eine Standardkonzentrationsreihe wurde auf jeder Mikrotiterplatte mitgeführt, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu unterschiedlichen Messzeitpunkten zu gewährleisten. Das Grundprinzip des neu etablierten ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISAs ist schematisch in Abb. 3 dargestellt.

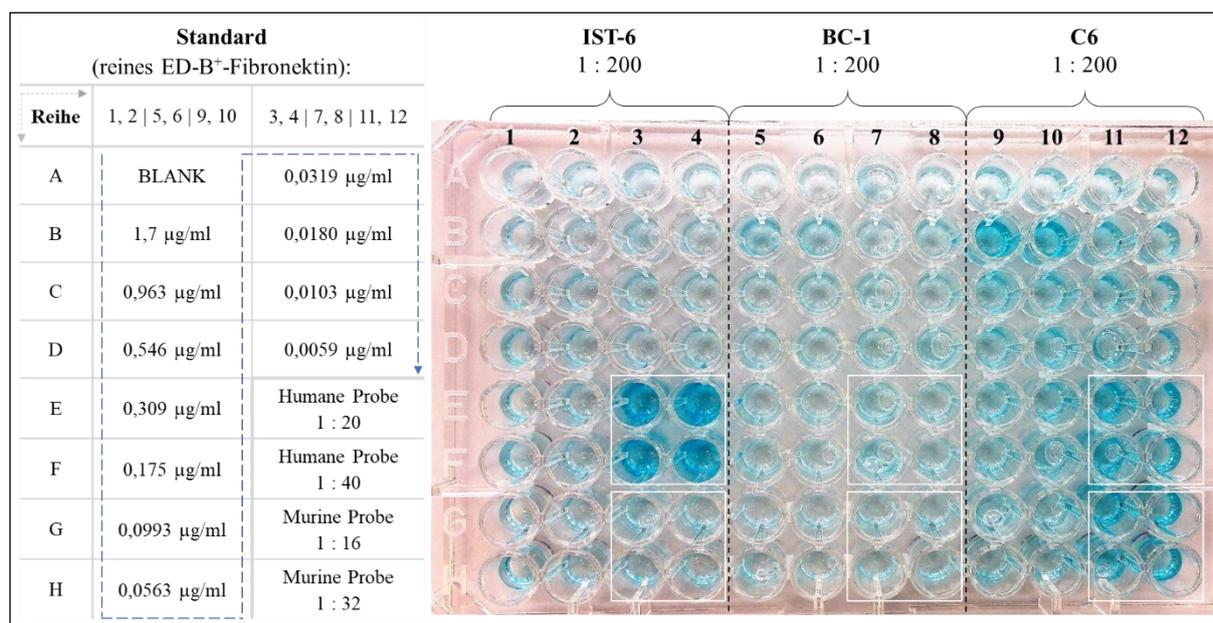


**Abb. 3: Schematischer Aufbau des ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin-ELISAs.**

**Abkürzungen:** B: Biotin | ED-A<sup>+</sup>: Extradomäne A | ED-B<sup>+</sup>: Extradomäne B | Fn: Fibronectin | G: Gelatine | H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Schwefelsäure | HRP: *Horseradish*-Peroxidase | IgG: Immunglobulin G

#### 4.1.2 Testung des geeigneten Primärantikörpers

Die für den ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISA genutzten Primärantikörper C6, BC-1 und IST-6 wurden freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. Luciano Zardi bereitgestellt bzw. über die Firma Sirius Biotech S.r.L., Genua, Italien, erworben. Erste Testungen der Primärantikörper wurden entsprechend den Herstellerangaben und auf Grundlage des bereits etablierten ED-A<sup>+</sup>-Fn-ELISAs mit einer Verdünnung von jeweils 1 : 200 durchgeführt. Zur parallelen Evaluation der Detektionsfähigkeit der AK im humanen und murinen System wurden zusätzlich zur unter 3.1.3 beschriebenen Standardreihe für jeden Primärantikörper eine humane Serumprobe aus dem unter 2.1.1 charakterisierten PH-Kollektiv und eine murine Kontrollprobe aus bereits abgeschlossenen Tierversuchen der eigenen AG mitgeführt (siehe Abb. 4). Für die Testung der Primärantikörper wurde der ELISA wie unter 3.1.6 beschrieben durchgeführt.

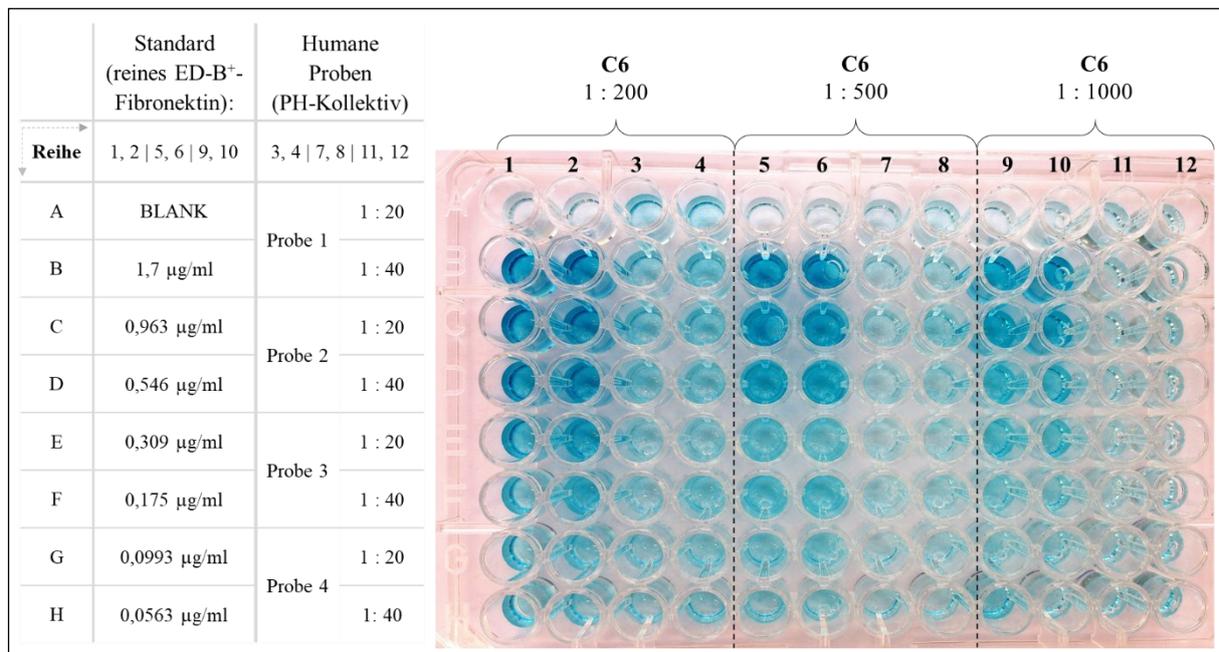


**Abb. 4: Testung der Primärantikörper für den ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin-ELISA.**

Für jeden Primärantikörper (IST-6, BC-1 und C6) wurde eine Standardreihe inklusive Leerkontrolle (BLANK) sowie eine humane und eine murine Probe aufgetragen. Der blaue Pfeil kennzeichnet das Auftrag-Schema des ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin-Standards. Die oberen weißen Quadrate kennzeichnen die mitgeführte humane Probe, die unteren weißen Quadrate die murine Probe.

Wie aus Abb. 4 ersichtlich kann durch IST-6 kein ED-B<sup>+</sup>-Fn-Capturing erfolgen, da IST-6 lediglich ED-B<sup>+</sup>-freies Fn detektiert. Für die Etablierung des ELISAs standen folglich BC-1 und C6 als Primärantikörper zur Verfügung, welche ED-B<sup>+</sup>-spezifisch an Fn binden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden im Anschluss für C6 und BC-1 Einzeltestungen mit modifizierten Verdünnungen ausgetestet. Hierbei zeigte sich, dass eine sichere Detektion von ED-B<sup>+</sup>-Fn sowohl mit BC-1 als auch mit C6 möglich ist, die Extinktionswerte bei BC-1 jedoch wesentlich

schwächer ausfielen als bei C6. Von BC-1 wären aufgrund dessen wesentlich höhere Antikörperkonzentrationen nötig, um verwertbare Messergebnisse zu erzielen. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher C6 als Primärantikörper genutzt, dessen optimale Verdünnung nach umfassender Evaluation auf 1 : 750 festgelegt wurde (siehe Abb. 5).



**Abb. 5:** Testung der geeigneten Verdünnung des Primärantikörpers C6.

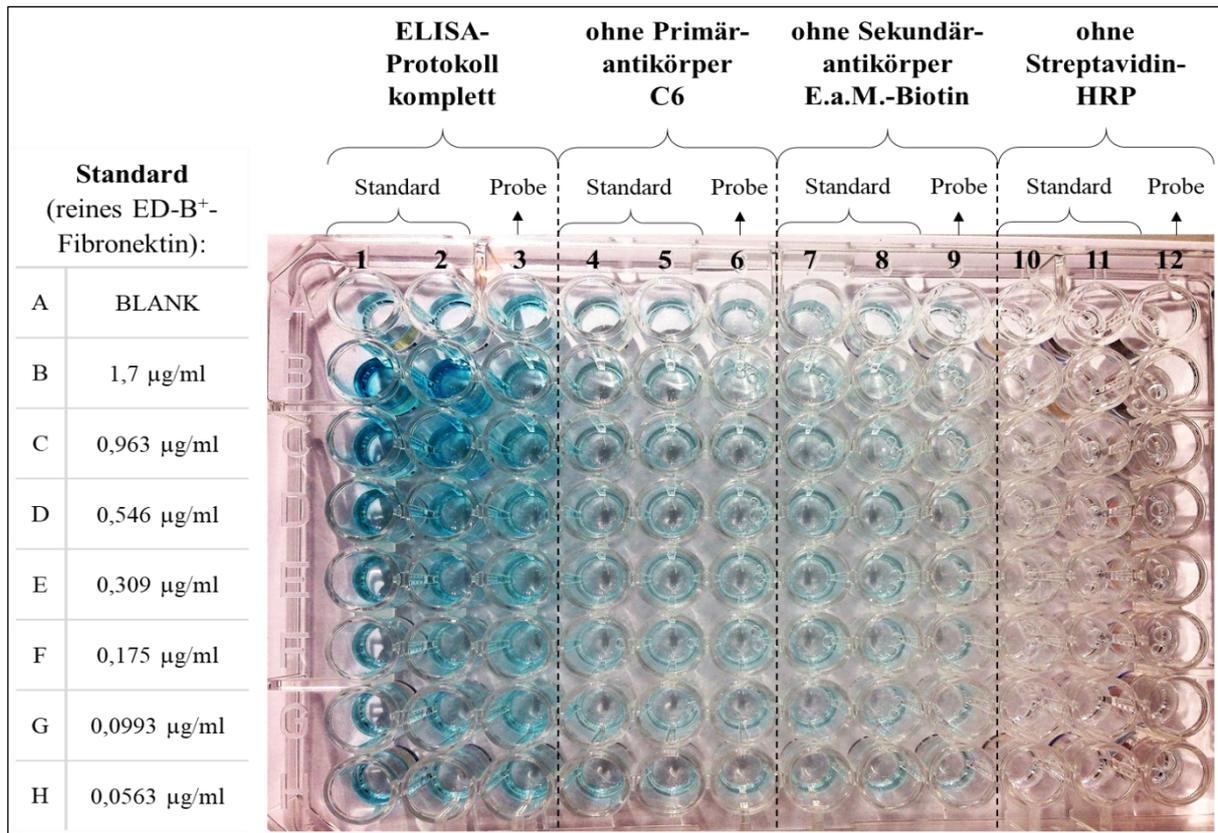
#### 4.1.3 Testung der geeigneten Probenverdünnung

Im Anschluss wurde die Testung der geeigneten Probenverdünnung mit C6 als Primärantikörper in einer Verdünnung von 1 : 750 und unter Mitführung der unter 3.1.3 beschriebenen Standardreihe vorgenommen. Die Serumproben aus dem unter 2.1.1 beschriebenen PH-Kollektiv wurden in den Konzentrationen 1 : 2, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 60, 1 : 80 und 1 : 100 verdünnt. Anhand der Spanne der Extinktionen der Standardreihe wurde die Verdünnung der Serumproben für nachfolgende Messungen auf 1 : 20 und 1 : 40 festgelegt. Trotz des höheren Materialverbrauchs wurde jede Probe der vorliegenden Arbeit in den beiden angegebenen Verdünnungsstufen und jeweils als Doppelbestimmung gemessen, um eine höhere Messgenauigkeit zu gewährleisten.

#### 4.1.4 Kontrolle der Spezifität des ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-ELISAs

Um die Spezifität des ELISAs mit Gelatinebeschichtung und Detektion über den ED-B<sup>+</sup>-Fn-spezifischen Antikörper C6 zu verifizieren und unspezifische Kreuzreaktionen zwischen den Einzelkomponenten des ELISA-Protokolls auszuschließen, wurde ein modifizierter ELISA durchgeführt, bei dem jeweils eine Komponente des etablierten Versuchsaufbaus entfernt

wurde. Aus Abb. 6 ist ersichtlich, dass es bei Verzicht auf den Primärantikörper C6 oder den Sekundärantikörper Esel-anti-Maus-Biotin zwar zu geringfügigen unspezifischen Reaktionen zwischen den verbleibenden Versuchskomponenten kam, sich jedoch ausschließlich bei einem vollständigen Aufbau des ELISA-Protokolls mit allen notwendigen Reagenzien ein relevantes verdünnungsabhängiges Farbsignal entwickeln konnte. Für jeden Versuchsaufbau wurden die Standardreihe und vier humane Proben aus dem unter 2.1.1 beschriebenen Patientenkollektiv (jeweils untereinander 1 : 20 und 1 : 40 verdünnt) aufgetragen.



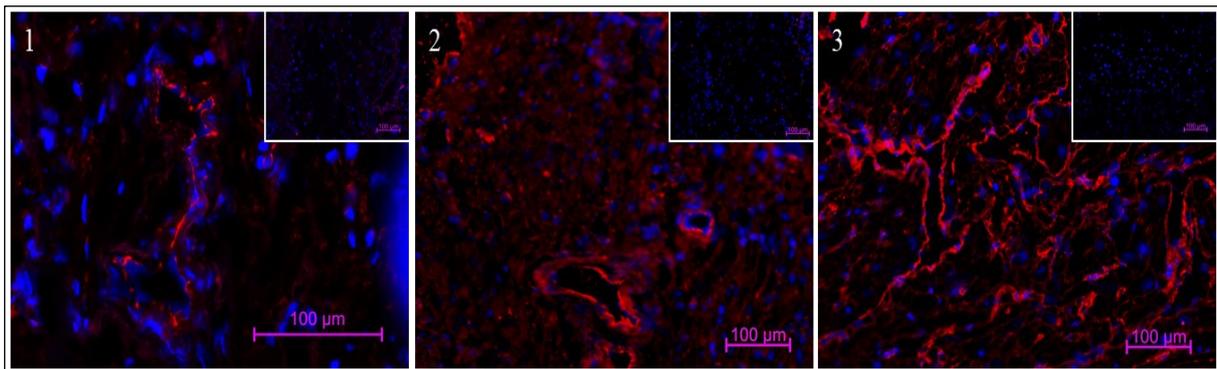
**Abb. 6:** Testung der Einzelkomponenten des ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-ELISAs auf Kreuzreaktivität. **Abkürzungen:** E.a.M.-Biotin: Esel-anti-Maus-Biotin | HRP: *Horseradish*-Peroxidase

## 4.2 Immunfluoreszenz-Detektion von ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin im Gewebe

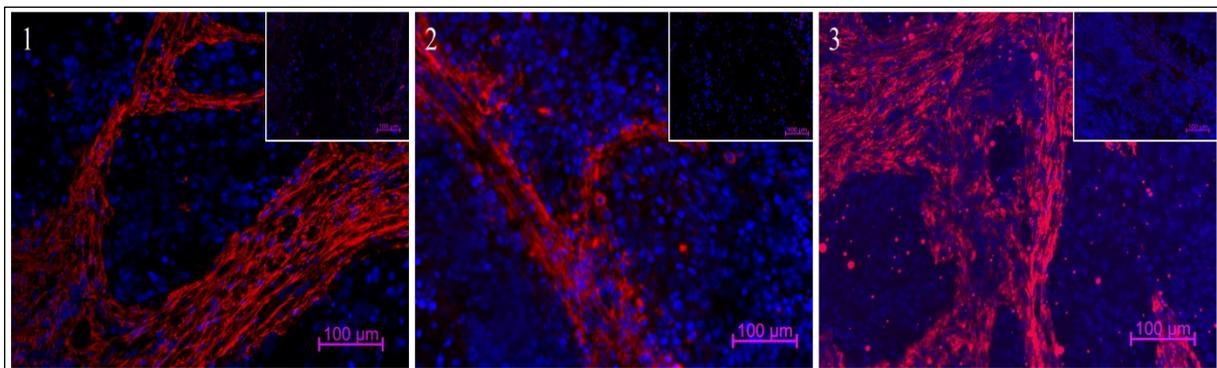
Um die Spezifität der Primärantikörper C6, BC-1 und IST-6 für ED-B<sup>+</sup>-Fn (C6, BC-1) bzw. ED-B<sup>+</sup>-freies Fn (IST-6) im Gewebe zu überprüfen, wurde eine Immunfluoreszenzmarkierung als Positivkontrolle für den neu entwickelten ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISA durchgeführt wie unter 3.2 beschrieben. Die hierfür genutzten Kryoschnitte werden unter 2.1.2 charakterisiert. Die genannten Primärantikörper haben hierbei zunächst an die jeweilige Fn-Variante im Gewebeschnitt gebunden und wurden anschließend vom Sekundärantikörper Esel-anti-Maus-Biotin detektiert. Durch fluoreszenzmarkiertes Streptavidin (Streptavidin-Cy3) konnte die Antigen-Antikörper-

Reaktion im Präparat sichtbar gemacht werden. Repräsentative Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 erstellt. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ unter Anwendung der LSM 510 Rel. 3.2 Software. Für jeden getesteten Primärantikörper wurde zusätzlich eine Negativkontrolle mitgeführt, welche statt dem Primärantikörper lediglich mit der reinen Antikörperverdünnungslösung mit Hintergrund-reduzierenden Komponenten inkubiert wurde.

Die repräsentativen Immunfluoreszenz-Aufnahmen mit C6, BC-1 und IST-6 und die jeweils zugehörige Negativkontrolle sind in Abb. 7 im Gewebe humaner rechter Vorhofohren und in Abb. 8 in humanem Tumorgewebe dargestellt. Durch Markierung mit Streptavidin-Cy3 ist ED-B<sup>+</sup>-Fn bzw. ED-B<sup>+</sup>-freies Fn rot dargestellt. Die DNA der Zellkerne ist durch DAPI blau angefärbt. Die kleinen Bildausschnitte in der oberen rechten Ecke repräsentieren die Aufnahmen der jeweiligen Negativkontrolle ohne Primärantikörper. Die Bilder wurden mittels Axioplan 2 Imaging und der zugehörigen Axio Vision Rel. 4.8.2 Software erstellt.



**Abb. 7: Immunfluoreszenz-Detektion von ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin in humanen rechten Vorhofohren.** Dargestellt ist die Immunfluoreszenzmarkierung mit Cyanin 3 (rot) von ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin mit C6 (1) und BC-1 (2) als Primärantikörper sowie von ED-B<sup>+</sup>-freiem Fibronektin mit IST-6 (3) als Primärantikörper in einer 20-fachen Vergrößerung.



**Abb. 8: Immunfluoreszenz-Detektion von ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin im Tumorgewebe.** Dargestellt ist die Immunfluoreszenzmarkierung mit Cyanin 3 (rot) von ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin mit C6 (1) und BC-1 (2) als Primärantikörper sowie von ED-B<sup>+</sup>-freiem Fibronektin mit IST-6 (3) als Primärantikörper in einer 20-fachen Vergrößerung.

Wie unter 1.4.1 beschrieben, ist die ED-B<sup>+</sup>-Fn-Spleißvariante in gesunden adulten Geweben nahezu nicht nachweisbar. Konkordant hierzu ist aus Abb. 7 (1) und Abb. 7 (2) ersichtlich, dass ED-B<sup>+</sup>-Fn in adultem myokardialen Gewebe nur in geringer Ausprägung detektierbar war. Die zwar geringe, aber dennoch vorhandene Expression lässt sich beispielweise dadurch erklären, dass die Gewebeschnitte von Patienten stammten, welche bereits kardial vorerkrankt waren und sich aufgrund einer KHK und / oder einer Aortenklappenstenose einem chirurgischen Eingriff unterziehen mussten. Erwartungsgemäß zeigte sich in Abb. 7 (3) eine stärkere Expression von Fn, welches nicht die ED-B<sup>+</sup> enthält. Dies belegt das ubiquitäre Vorhandensein von Fn als Adhäsionsprotein der ECM. Aus Abb. 8 geht hervor, dass es im Tumorgewebe zu einer sehr starken Expression sowohl von ED-B<sup>+</sup>-Fn (Abb. 8 (1) und (2)) als auch von ED-B<sup>+</sup>-freiem Fn (Abb. 8 (3)) kam. Dies beweist die vielfach vorbeschriebene Bedeutung von ED-B<sup>+</sup>-Fn als Marker der Tumorangiogenese (vgl. Abschnitt 1.4.2). Die immunhistochemischen Analysen konnten sowohl im myokardialen als auch im Tumorgewebe die spezifische Bindung der Antikörper an die jeweiligen Fn-Spleißvarianten sicherstellen. In keiner der Negativkontrollen wurde ein Farbsignal generiert. Die verwendeten Primärantikörper waren somit für die Etablierung des ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISAs geeignet.

### **4.3 Quantifizierung von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin in humanen Serumproben von Patienten mit pulmonaler Hypertonie**

Die ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn-Konzentrationen in den Serumproben von Patienten mit PH unterschiedlicher ätiologischer Klassen sowie in den Serumproben des Kontrollkollektivs wurden im Rahmen dieser Arbeit unter Anwendung der unter 3.1 und 3.3 beschriebenen ELISA-Protokolle im Hinblick auf Assoziationen zu klinischen, laborchemischen und echokardiografischen Daten der Patienten untersucht. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob den genannten fetalen Fn-Molekülvarianten eine prädiktive Wertigkeit zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer PH zukommt.

#### **4.3.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs mit pulmonaler Hypertonie**

Eine Übersicht über die Basischarakteristika der Studienkollektive zum Zeitpunkt der venösen Blutentnahme einschließlich klinischer Parameter, Komorbiditäten, Medikation und Laborparameter ist in Tab. 12 für die Gesamtheit der PH-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe und in Tab. 13 differenziert für die ätiologisch verschiedenen PH-Klassen im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt. Tab. 14 veranschaulicht die relevanten echokardiografischen Parameter der Studienkollektive.

**Tab. 12: Charakteristika der Studiengruppen: Vergleich der Gesamtheit der PH-Patienten mit der Kontrollgruppe**

	Kontrollgruppe (n = 40)	PH-Patienten (n = 80)	p-Wert
<b>Klinische Parameter</b>			
Alter (Jahre)	66 ± 7	71 ± 13	< 0,001
Männliches Geschlecht (%)	33	39	n.s.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,9 ± 4,7	28,6 ± 6,0	n.s.
Systolischer Blutdruck (mmHg)	146 ± 31	143 ± 25	n.s.
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	81 ± 16	81 ± 14	n.s.
Funktionelle Klasse	1,5 ± 0,6	2,6 ± 0,8	< 0,001
<b>Komorbiditäten (%)</b>			
Arterielle Hypertonie	95	83	n.s.
Koronare Herzkrankheit / Infarkt	0	26	0,001
Hypertensive Herzkrankheit	59	50	n.s.
Vorhofflimmern	18	49	0,002
Lungenerkrankungen	5	44	< 0,001
COPD	3	24	0,004
Lungenfibrose	0	11	0,031
Chronische Niereninsuffizienz, d.h. GFR < 50 ml/min	8	49	< 0,001
Hyperlipidämie	85	57	0,002
Diabetes mellitus	20	49	0,002
Adipositas, d.h. BMI > 30 kg/m <sup>2</sup>	43	38	n.s.
Autoimmunerkrankungen	0	16	0,009
Nikotinabusus	29	52	n.s.
<b>Medikation (%)</b>			
ASS	25	19	n.s.
Betablocker	63	64	n.s.
ACE-Inhibitoren / Sartane	85	76	n.s.
Kalziumantagonisten	25	27	n.s.
Diuretika	45	80	< 0,001
Statine	38	60	0,022
Prednisolon	0	12	0,025
Inhalative Glukokortikoide	5	23	0,001
<b>Laborparameter</b>			
BNP (pg/ml)	34 ± 70	190 ± 584	< 0,001
CRP (mg/l)	2,0 ± 2,6	5,0 ± 17,5	< 0,001
Interleukin-6 (pg/ml)	1,9 ± 2,1	4,0 ± 7,4	< 0,001
Kreatinin (µmol/l)	71 ± 16	100 ± 50	< 0,001
LDL (mmol/l)	3,5 ± 1,0	2,6 ± 1,0	< 0,001

Fortsetzung Tab. 12:

Hämoglobin (mmol/l)	8,8 ± 0,8	8,0 ± 1,4	0,001
Leukozyten (Gpt/l)	7,0 ± 1,4	7,2 ± 2,2	n.s.
Thrombozyten (Gpt/l)	237 ± 48	232 ± 76	n.s.
Alle Werte dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung oder Prozentangaben. Laborparameter dargestellt als Median ± Standardabweichung. <b>Abkürzungen:</b> ACE: <i>Angiotensin-converting enzyme</i>   ASS: <i>Acetylsalicylsäure</i>   BMI: <i>Body Mass Index</i>   BNP: <i>brain natriuretic peptide</i>   COPD: <i>chronic obstructive pulmonary disease</i>   CRP: <i>C-reaktives Protein</i>   GFR: <i>glomeruläre Filtrationsrate</i>   LDL: <i>low-density lipoprotein</i>   n: <i>Anzahl</i>   n.s.: <i>nicht signifikant</i>   PH: <i>pulmonale Hypertonie</i>			

Tab. 13: Charakteristika der Studiengruppen: Differenzierte Betrachtung einzelner ätiologischer PH-Klassen und der Kontrollgruppe

	Kontrolle	PH I	PH II	PH III	PH IV	PH II + III	p-Wert*
n	40	13	30	11	12	14	
<b>Klinische Parameter</b>							
Alter (Jahre)	66 ± 7	66 ± 12	76 ± 8	59 ± 22	71 ± 12	76 ± 8	0,015
Männliches Geschlecht (%)	33	15	37	45	50	50	n.s.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,9 ± 4,7	29,0 ± 8,4	27,9 ± 3,9	25,9 ± 7,5	30,6 ± 5,2	29,9 ± 6,5	n.s.
Systolischer Blutdruck (mmHg)	146 ± 31	134 ± 17	156 ± 31	142 ± 22	143 ± 20	135 ± 26	n.s.
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	81 ± 16	78 ± 8	80 ± 14	85 ± 9	83 ± 16	79 ± 20	n.s.
Funktionelle Klasse	1,5 ± 0,6	2,6 ± 0,8	2,6 ± 0,7	2,4 ± 1,1	2,3 ± 0,7	2,8 ± 0,7	n.s.
<b>Komorbiditäten (%)</b>							
Arterielle Hypertonie	95	77	93	70	83	77	n.s.
Koronare Herzkrankheit / Infarkt	0	15	33	36	0	36	n.s.
Hypertensive Herzkrankheit	59	27	70	27	17	71	0,002
Vorhofflimmern	18	8	73	45	17	64	< 0,001
Lungenerkrankungen	5	54	10	91	25	86	< 0,001
COPD	3	8	10	50	17	57	0,002
Lungenfibrose	0	15	0	20	0	36	0,006
Chronische Niereninsuffizienz, d.h. GFR < 50 ml/min	8	23	59	36	36	71	n.s.
Hyperlipidämie	85	36	57	60	75	54	n.s.
Diabetes mellitus	20	31	60	90	25	36	0,009
Adipositas, d.h. BMI > 30 kg/m <sup>2</sup>	43	40	30	33	36	58	n.s.
Autoimmunerkrankungen	0	38	7	27	0	21	0,037
Nikotinabusus	29	20	63	33	60	67	n.s.

Fortsetzung Tab. 13:

Medikation (%)							
ASS	25	17	21	20	0	36	n.s.
Betablocker	63	38	90	40	42	73	0,002
ACE-Inhibitoren / Sartane	85	62	86	60	75	82	n.s.
Kalziumantagonisten	25	31	28	30	8	36	n.s.
Diuretika	45	92	83	60	67	91	n.s.
Statine	38	54	76	40	50	55	n.s.
Prednisolon	0	15	3	40	0	15	0,022
Inhalative Glukokortikoide	5	38	7	50	8	36	0,013
Laborparameter							
BNP (pg/ml)	34 ± 70	104 ± 82	325 ± 678	326 ± 469	117 ± 87	285 ± 731	< 0,001
CRP (mg/l)	2,0 ± 2,6	3,7 ± 10,7	5,5 ± 21,0	7,6 ± 12,9	2,6 ± 5,8	8,4 ± 22,0	n.s.
Interleukin-6 (pg/ml)	1,9 ± 2,1	4,6 ± 9,4	10,0 ± 8,4	10,7 ± 9,6	3,5 ± 1,8	3,6 ± 3,0	n.s.
Kreatinin (µmol/l)	71 ± 16	70 ± 44	123 ± 59	100 ± 24	86 ± 40	103 ± 47	0,019
LDL (mmol/l)	3,5 ± 1,0	2,4 ± 1,0	2,4 ± 1,0	2,9 ± 1,0	2,9 ± 0,9	2,8 ± 1,2	n.s.
Hämoglobin (mmol/l)	8,8 ± 0,8	8,0 ± 1,5	7,3 ± 1,2	8,4 ± 1,0	9,5 ± 1,4	7,9 ± 1,6	0,014
Leukozyten (Gpt/l)	7,0 ± 1,4	6,0 ± 2,4	7,6 ± 1,7	7,7 ± 1,6	7,4 ± 1,8	6,6 ± 3,4	n.s.
Thrombozyten (Gpt/l)	237 ± 48	232 ± 51	224 ± 82	303 ± 63	297 ± 73	193 ± 70	0,012
Alle Werte dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung oder Prozentangaben. Laborparameter dargestellt als Median ± Standardabweichung. * p-Wert zwischen den einzelnen ätiologischen PH-Klassen. <b>Abkürzungen:</b> ACE: <i>Angiotensin-converting enzyme</i>   ASS: Acetylsalicylsäure   BMI: <i>Body Mass Index</i>   BNP: <i>brain natriuretic peptide</i>   COPD: <i>chronic obstructive pulmonary disease</i>   CRP: C-reaktives Protein   GFR: glomeruläre Filtrationsrate   LDL: <i>low-density lipoprotein</i>   n: Anzahl   n.s.: nicht signifikant   PH: pulmonale Hypertonie <b>Anmerkung:</b> PH I: pulmonalarterielle Hypertonie   PH II: pulmonale Hypertonie infolge von Linksherzerkrankungen   PH III: pulmonale Hypertonie infolge von Lungenerkrankungen   PH IV: chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie							

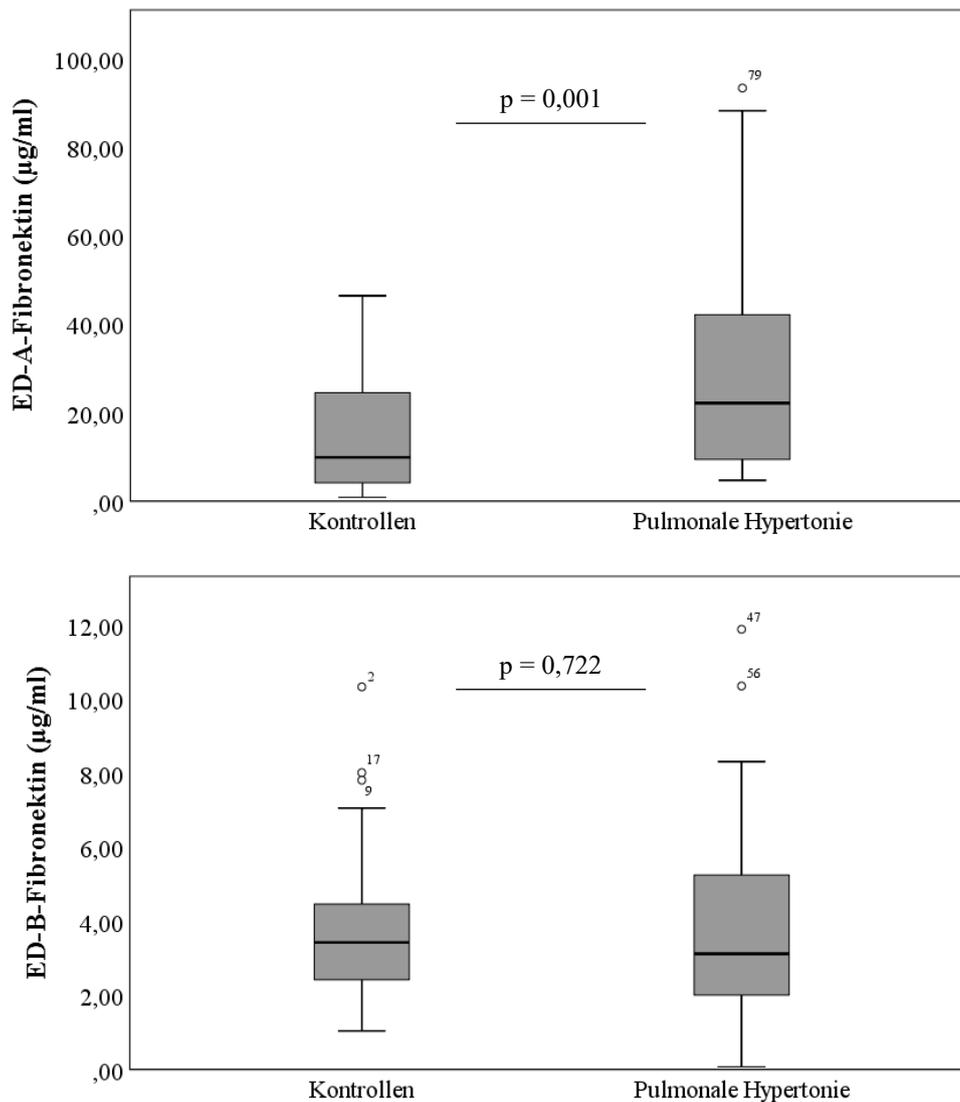
Tab. 14: Echokardiografische Parameter der Studiengruppen

Parameter	Kontrolle	PH <sub>gesamt</sub>	p-Wert*	PH I	PH II	PH III	PH IV	PH II + III	p-Wert**
PAP <sub>sys</sub> (mmHg)	21 ± 4	55 ± 18	< 0,001	59 ± 22	52 ± 16	57 ± 22	50 ± 20	56 ± 16	n.s.
TAPSE (mm)	(25; n=1)	17 ± 5	n.s.	22 ± 5	15 ± 3	19 ± 7	18 ± 3	16 ± 4	0,049
RAA (cm <sup>2</sup> )	15 ± 2	25 ± 10	< 0,001	21 ± 8	28 ± 10	20 ± 9	22 ± 5	31 ± 14	n.s.
RVEDd (mm)	35 ± 2	45 ± 8	< 0,001	41 ± 9	46 ± 7	47 ± 10	44 ± 7	49 ± 9	n.s.
IVSd (mm)	11,9 ± 2,3	12,3 ± 2,5	n.s.	11,9 ± 3,0	12,9 ± 2,8	13,1 ± 1,7	11,2 ± 1,9	11,5 ± 2,1	n.s.
EF (%)	68 ± 7	58 ± 11	< 0,001	63 ± 7	56 ± 13	63 ± 9	60 ± 6	52 ± 12	0,050
Alle Werte dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. * p-Wert zwischen Kontrolle und PH <sub>gesamt</sub> .   ** p-Wert zwischen den einzelnen ätiologischen PH-Klassen. <b>Abkürzungen:</b> EF: Ejektionsfraktion   IVSd: interventrikuläre Septumdicke diastolisch   n.s.: nicht signifikant   PAP <sub>sys</sub> : systolischer pulmonalarterieller Druck   PH: pulmonale Hypertonie   RAA: rechtsatriale Fläche   RVEDd: rechtsventrikulärer enddiastolischer Durchmesser   TAPSE: <i>tricuspid annular plane systolic excursion</i>									

Die 80 PH-Patienten waren repräsentativ für die generelle ätiologische Verteilung der PH, da der Großteil der PH-Erkrankungen auf dem Boden einer Linksherzpathologie entsteht und entsprechend auch die meisten Patienten ( $n = 30$ ) dieser Studiengruppe (PH II) angehörten. Erwartungsgemäß zeigten sich hinsichtlich der funktionellen Klasse (FC), welche das NYHA-Äquivalent der PH darstellt, signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen und dem PH-Kollektiv ( $p < 0,001$ ), nicht jedoch zwischen den einzelnen PH-Gruppen untereinander ( $p = 0,573$ ). Die Analyse der Komorbiditäten zeigte zwischen den Kontrollen und der Gesamtheit der PH-Patienten signifikante Mittelwertsunterschiede bezüglich des Vorhandenseins von KHK ( $p = 0,001$ ), Vorhofflimmern ( $p = 0,002$ ), Lungenerkrankungen ( $p < 0,001$ ), COPD ( $p = 0,004$ ), Lungenfibrose ( $p = 0,031$ ), chronischer Niereninsuffizienz ( $p < 0,001$ ), Hyperlipidämie ( $p = 0,002$ ), Diabetes mellitus ( $p = 0,002$ ) und Autoimmunerkrankungen ( $p = 0,009$ ). Von den genannten Komorbiditäten zeigte sich im PH-Kollektiv stets ein höherer Krankheitsanteil im Vergleich zur Kontrollgruppe; eine Ausnahme bildete lediglich die Hyperlipidämie, welche vermehrt die Kontrollpatienten betraf. Bezüglich der Pharmakotherapie wies das gesamte PH-Kollektiv eine signifikant höhere Medikation mit Diuretika (80%;  $p < 0,001$ ), Statinen (60%;  $p = 0,022$ ), Prednisolon (12%;  $p = 0,025$ ) und inhalativen Glukokortikoiden (23%;  $p = 0,001$ ) gegenüber der Kontrollgruppe auf. Die Analyse der echokardiografischen Daten zeigte zwischen den Kontrollen und der Gesamtheit der PH-Patienten ebenfalls statistisch signifikante Unterschiede (vgl. Tab. 14). Aufgrund der erhöhten Rechtsherzbelastung wiesen die PH-Patienten insgesamt höhere Messwerte des systolischen pulmonalarteriellen Drucks ( $p < 0,001$ ), der rechtsatrialen Fläche ( $p < 0,001$ ) und des rechtsventrikulären enddiastolischen Durchmessers ( $p < 0,001$ ) auf. Die Ejektionsfraktion war in der PH-Patientengruppe gegenüber den Kontrollen signifikant erniedrigt ( $p < 0,001$ ). Da für einzelne Parameter nur Werte von einem Teil der Patienten- und Kontrollgruppe vorlagen, unterlag die Auswertung einigen Limitationen und die Aussagekraft der betreffenden Ergebnisse ist dementsprechend eingeschränkt.

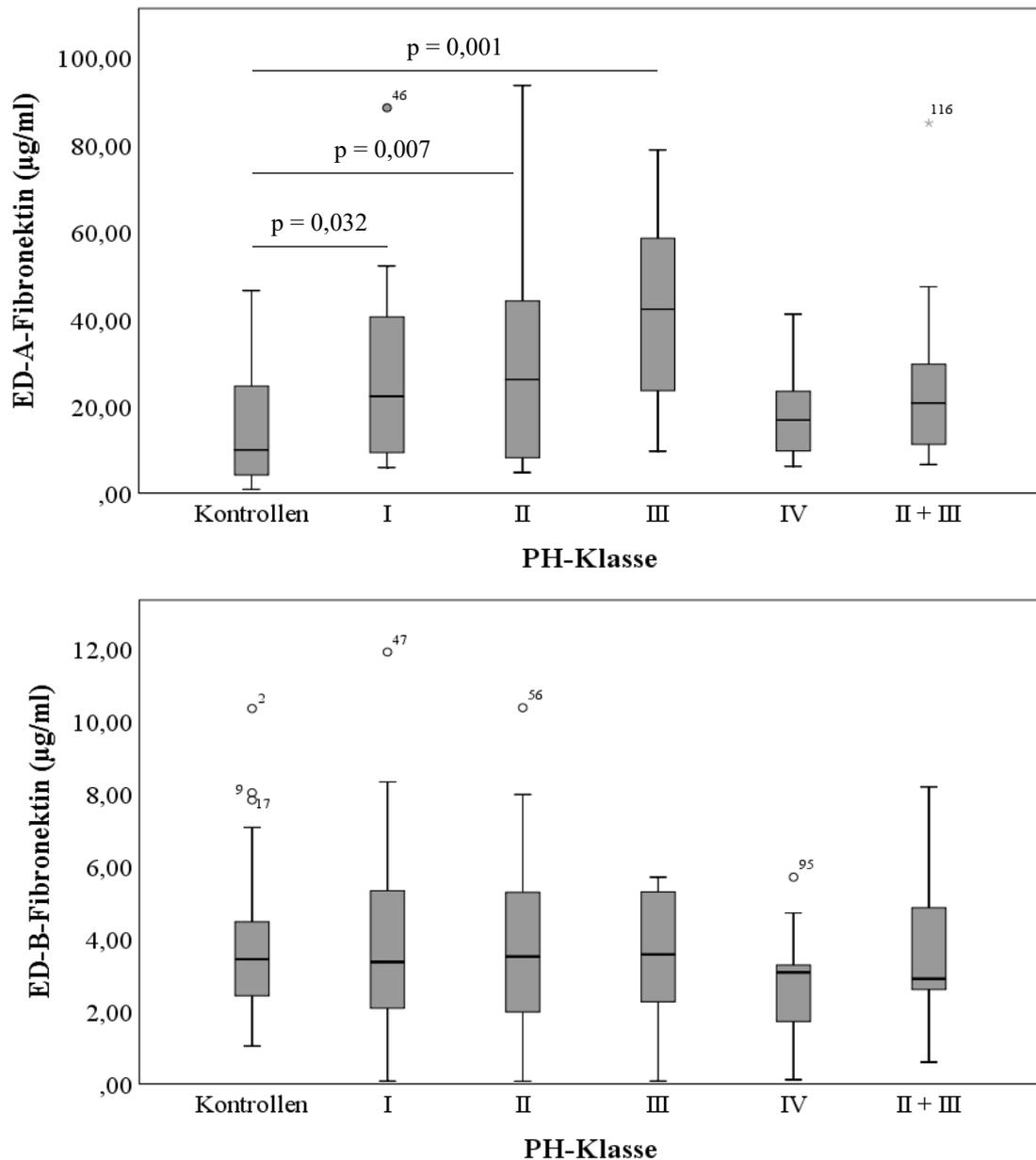
#### 4.3.2 Quantifizierung von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin im Serum

Zur Evaluation der Wertigkeit von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn als klinisch relevante Biomarker der PH wurden zunächst die Serumexpressionslevel der genannten Spleißvarianten im Kontroll- und dem gesamten PH-Kollektiv ermittelt. Die Analyse der zugehörigen ELISA-Daten ist in Abb. 9a für ED-A<sup>+</sup>-Fn und in Abb. 9b für ED-B<sup>+</sup>-Fn dargestellt. Aus Abb. 9a geht hervor, dass die an PH-erkrankten Patienten eine signifikant höhere Serumkonzentration ( $p = 0,001$ ) von ED-A<sup>+</sup>-Fn ( $22,2 \pm 23,3 \mu\text{g/ml}$ ) aufwiesen als die Kontrollen ( $9,9 \pm 13,0 \mu\text{g/ml}$ ). Die Serumkonzentration von ED-B<sup>+</sup>-Fn zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,722$ ) zwischen Patienten- ( $3,1 \pm 2,4 \mu\text{g/ml}$ ) und Kontrollgruppe ( $3,4 \pm 2,2 \mu\text{g/ml}$ ) wie aus Abb. 9b ersichtlich.



**Abb. 9: ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin-Serumkonzentration der Patienten mit pulmonaler Hypertonie im Vergleich zur Kontrollgruppe.** In Abb. 9a (oben) ist der Median der ED-A<sup>+</sup>-Fibronectin-Serumkonzentration aller Patienten ( $22,2 \pm 23,3 \mu\text{g/ml}$ ) im Vergleich zum Median der Kontrollgruppe ( $9,9 \pm 13,0 \mu\text{g/ml}$ ) mit dem entsprechenden oberen und unteren Quartil dargestellt. In Abb. 9b (unten) ist der Median der ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin-Serumkonzentration aller Patienten ( $3,1 \pm 2,4 \mu\text{g/ml}$ ) im Vergleich zum Median der Kontrollgruppe ( $3,4 \pm 2,2 \mu\text{g/ml}$ ) mit dem entsprechenden oberen und unteren Quartil dargestellt. Die Signifikanzen (p) wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests erhoben.

Für ein detaillierteres Verständnis der Regulation von ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn im Hinblick auf die verschiedenen Entstehungsmechanismen der PH wurden die jeweiligen Serumexpressionslevel innerhalb der ätiologisch differierten PH-Klassen gesondert analysiert. Eine signifikante Erhöhung der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumspiegel gegenüber Kontrollen blieb lediglich für die ätiologischen PH-Klassen I ( $22,2 \pm 24,3 \mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,032$ ), II ( $26,1 \pm 26,7 \mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,007$ ) und III ( $42,2 \pm 22,2 \mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,001$ ) erhalten. Für die PH-Klasse IV ( $16,8 \pm 11,1 \mu\text{g/ml}$ ) zeigten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,156$ ) zur Kontrollgruppe (siehe Abb. 10a).



**Abb. 10: ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin-Serumkonzentration der Subgruppen des PH-Kollektivs im Vergleich zur Kontrollgruppe.** In Abb. 10a (oben) sind die Mediane der ED-A<sup>+</sup>-Fibronectin-Serumkonzentration der PH-Klasse I ( $22,2 \pm 24,3 \mu\text{g/ml}$ ), II ( $26,1 \pm 26,7 \mu\text{g/ml}$ ), III ( $42,2 \pm 22,2 \mu\text{g/ml}$ ) und IV ( $16,8 \pm 11,1 \mu\text{g/ml}$ ) jeweils im Vergleich zum Median der Kontrollgruppe ( $9,9 \pm 13,0 \mu\text{g/ml}$ ) mit den entsprechenden oberen und unteren Quartilen dargestellt. In Abb. 10b (unten) sind die Mediane der ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin-Serumkonzentration der PH-Klasse I ( $3,4 \pm 3,3 \mu\text{g/ml}$ ), II ( $3,5 \pm 2,5 \mu\text{g/ml}$ ), III ( $3,6 \pm 2,0 \mu\text{g/ml}$ ) und IV ( $3,1 \pm 1,6 \mu\text{g/ml}$ ) jeweils im Vergleich zum Median der Kontrollgruppe ( $3,4 \pm 2,2 \mu\text{g/ml}$ ) mit den entsprechenden oberen und unteren Quartilen dargestellt. Die Signifikanzen (p) wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests erhoben. | **Abkürzung:** PH: pulmonale Hypertonie

Aus Abb. 10b geht hervor, dass sich hinsichtlich der ED-B<sup>+</sup>-Fn-Serumspiegel der ätiologisch unterschiedlichen Subgruppen sowohl für die PH-Klasse I ( $3,4 \pm 3,3 \mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,817$ ), II ( $3,5 \pm 2,5 \mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,940$ ), III ( $3,6 \pm 2,0 \mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,872$ ) als auch IV ( $3,1 \pm 1,6 \mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,178$ ) keine signifikanten Unterschiede zum Kontrollkollektiv ( $3,4 \pm 2,2 \mu\text{g/ml}$ ) ergaben.

### 4.3.3 Korrelation der ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-Konzentration zu klinischen, laborchemischen und echokardiografischen Parametern

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen den mittels ELISA erhobenen ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn-Serumspiegeln und klinischen, laborchemischen und echokardiografischen Messwerten gibt, welche aktuell zur Diagnostik und Verlaufskontrolle der PH angewendet werden. Die Korrelationen beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf die gesamte Studienpopulation (Kontrollen und PH-Patienten jedweder Ätiologie). Da die meisten Parameter nicht von allen Studienteilnehmern vorlagen, ist für jede Korrelation gesondert die Anzahl der Probanden (n) angegeben, welche in die Analyse einbezogen wurden. Die transthorakalen Echokardiografien wurden dankenswerterweise von ärztlichen Mitarbeitern der Klinik für Innere Medizin I, Abteilung für Kardiologie, des Universitätsklinikums Jena durchgeführt.

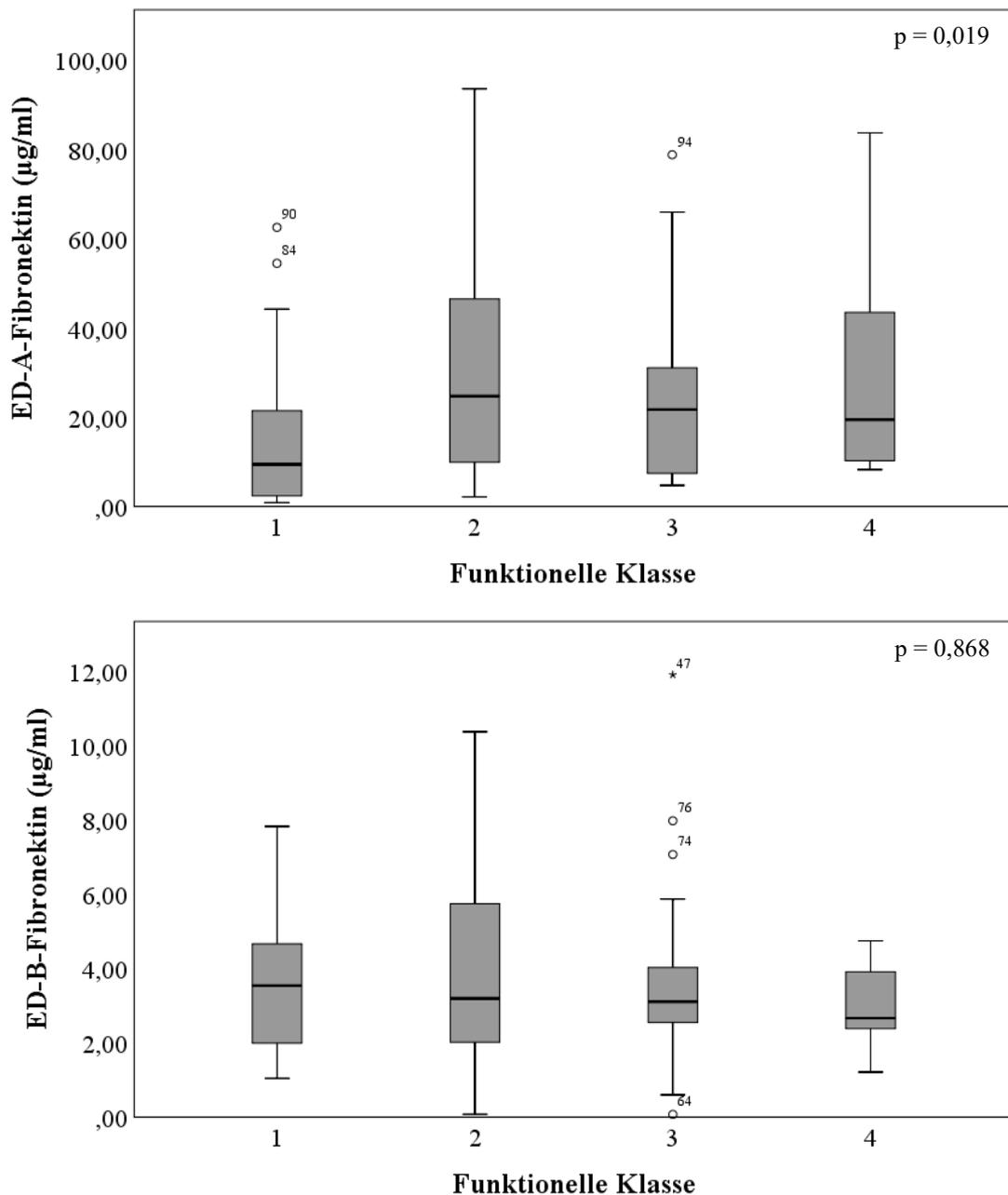
#### 4.3.3.1 Klinische Korrelationsanalysen

Um den klinischen Schweregrad der PH zu eruieren und die Auswirkungen der Erkrankung auf die Alltagskompetenz der Patienten objektivierbar zu machen, werden sowohl die Einteilung in funktionelle Klassen (FC) als auch der 6-Minuten-Gehtest herangezogen.

Die FC kennzeichnet die progrediente Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit im Alltag durch die PH-Erkrankung. Die Korrelation der ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration der Patienten zu der zum Zeitpunkt der venösen Blutentnahme vorliegenden FC (Grad 1 bis 4) ist in Abb. 11 dargestellt. Im Gesamtkollektiv (n = 102) konnten signifikante Unterschiede der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentrationen in Bezug zur FC festgestellt werden (p = 0,019). Die höchste ED-A<sup>+</sup>-Fn-Konzentration im Serum wiesen die Studienteilnehmer auf, welche der FC 2 ( $24,7 \pm 25,1 \mu\text{g/ml}$ ) zugeordnet wurden; die niedrigste ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration wiesen Studienteilnehmer mit FC 1 ( $9,5 \pm 18,1 \mu\text{g/ml}$ ) auf (siehe Abb. 11a). Bezüglich den ED-B<sup>+</sup>-Fn-Serumspiegeln konnten keine signifikanten Unterschiede (p = 0,868) zwischen den Patienten verschiedener funktioneller Klassen (n = 98) gezeigt werden (siehe Abb. 11b).

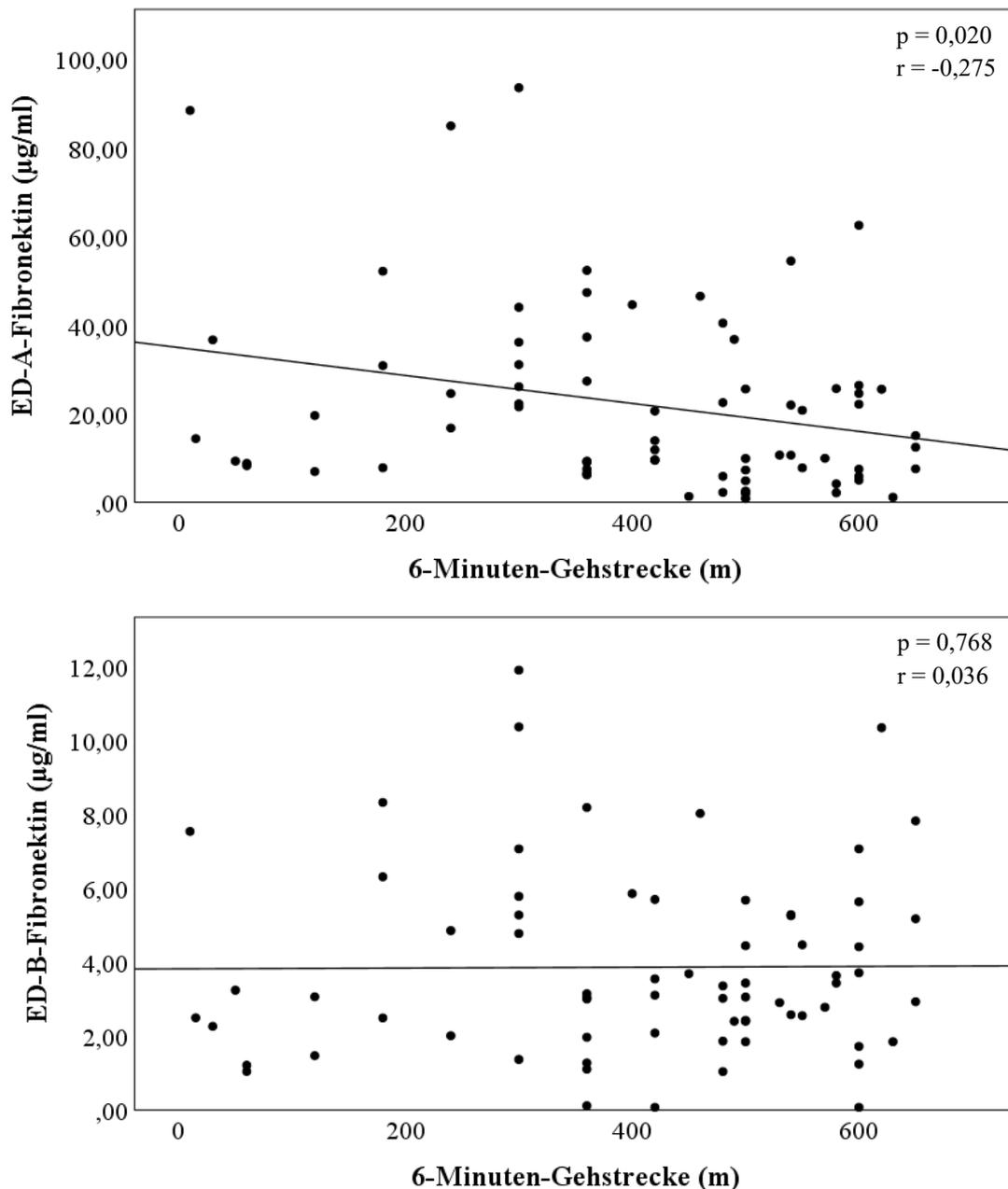
Ergänzend zur Graduierung der FC ist der 6-Minuten-Gehtest ein simples, standardisiertes Verfahren, um die Einschränkung der Belastbarkeit durch die PH zu objektivieren. Daher erfolgte eine Spearman-Korrelationsanalyse der mittels ELISA ermittelten ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn-Serumspiegel zur 6-Minuten-Gehstrecke (6MWD) innerhalb des gesamten Studienkollektivs. Die entsprechende grafische Darstellung ist in Abb. 12a für ED-A<sup>+</sup>-Fn (n = 72) und in Abb. 12b für ED-B<sup>+</sup>-Fn (n = 69) gegeben. Aus Abb. 12a wird ersichtlich, dass es zwischen der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration und der 6MWD einen signifikanten inversen Zusammenhang (p = 0,020; r = -0,275) gab. Dementsprechend konnten Probanden mit niedrigen ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumspiegeln im sechsminütigen Gehtest im Mittel eine weitere Strecke zurücklegen als Probanden mit

höheren ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumspiegeln. Die Korrelation zwischen ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin im Serum und der 6MWD zeigte hingegen keine signifikante Dependenz ( $p = 0,768$ ;  $r = 0,036$ ), wie in Abb. 12b deutlich wird.



**Abb. 11: ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin-Serumkonzentration in Bezug zur funktionellen Klasse.**

In Abb. 11a (oben) sind die Mediane der ED-A<sup>+</sup>-Fibronectin-Serumkonzentration des gesamten Studienkollektivs ( $n = 102$ ) in Abhängigkeit von der funktionellen Klasse ( $9,5 \pm 18,1$  µg/ml in FC1;  $24,7 \pm 25,1$  µg/ml in FC 2;  $21,7 \pm 17,6$  µg/ml in FC 3;  $19,4 \pm 26,3$  µg/ml in FC 4) mit den entsprechenden oberen und unteren Quartilen dargestellt. In Abb. 11b (unten) sind die Mediane der ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin-Konzentration des gesamten Studienkollektivs ( $n = 98$ ) in Abhängigkeit von der funktionellen Klasse ( $3,5 \pm 1,7$  µg/ml in FC1;  $3,2 \pm 2,6$  µg/ml in FC 2;  $3,1 \pm 2,3$  µg/ml in FC 3;  $2,7 \pm 1,3$  µg/ml in FC 4) mit den entsprechenden oberen und unteren Quartilen dargestellt. Die Signifikanzen ( $p$ ) wurden anhand des Kruskal-Wallis-Tests erhoben. | **Abkürzung:** FC: funktionelle Klasse



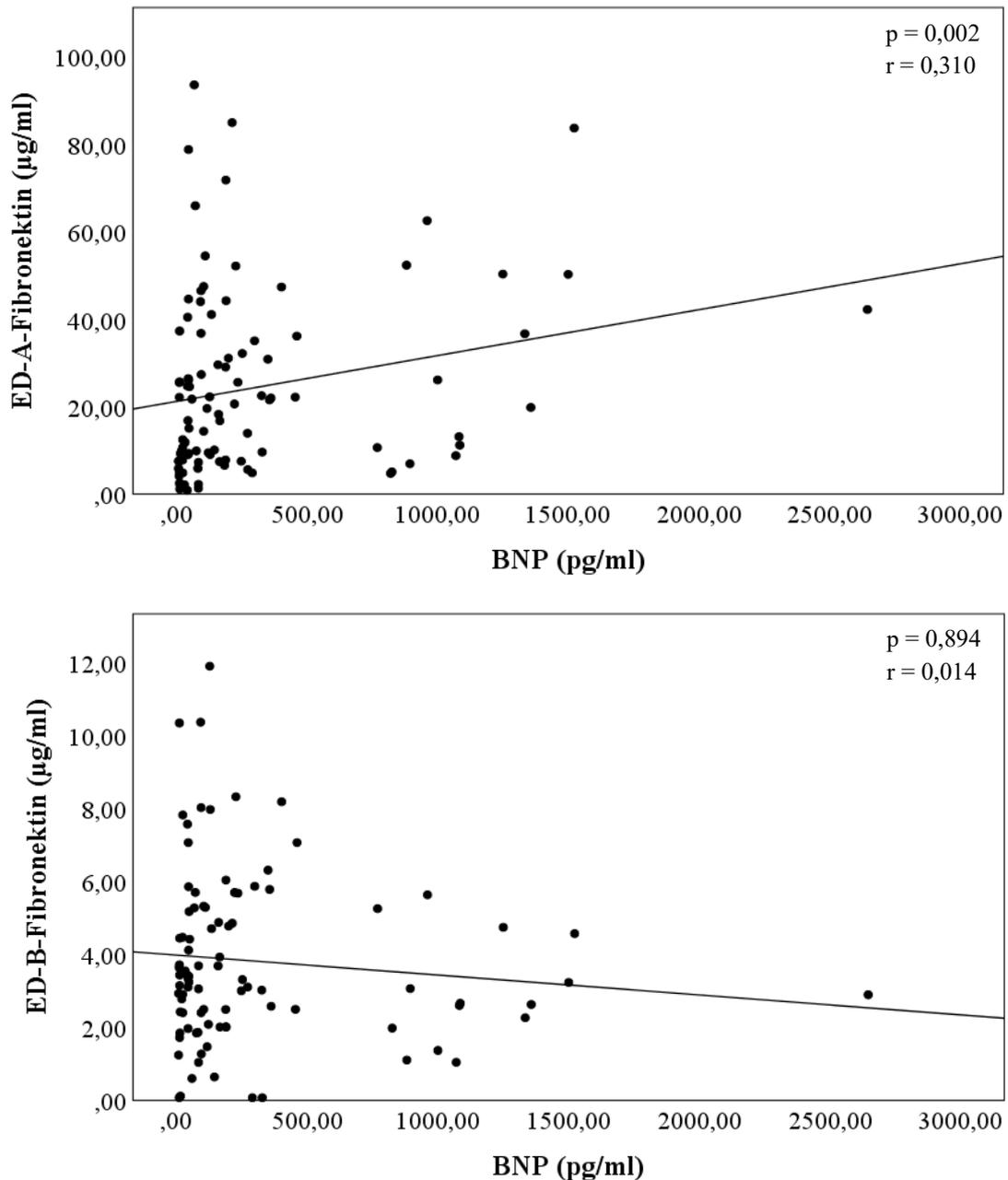
**Abb. 12: Korrelation der ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-Serumkonzentration zur 6-Minuten-Gehstrecke.** Dargestellt sind die Korrelationsanalysen der ED-A<sup>+</sup>- (Abb. 12a, oben) bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-Serumkonzentrationen (µg/ml) (Abb. 12b, unten) zur 6-Minuten-Gehstrecke (m) für die gesamte Studienpopulation (ED-A<sup>+</sup>: n = 72; ED-B<sup>+</sup>: n = 69) in Streudiagrammen. Die Signifikanzen (p) und Korrelationskoeffizienten (r) wurden nach Spearman berechnet.

#### 4.3.3.2 Laborchemische Korrelationsanalysen

Laborparametrisch wurden mögliche Zusammenhänge zwischen der ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration und dem Herzinsuffizienzmarker BNP sowie den Inflammationsmarkern CRP und Interleukin-6 (IL-6) untersucht.

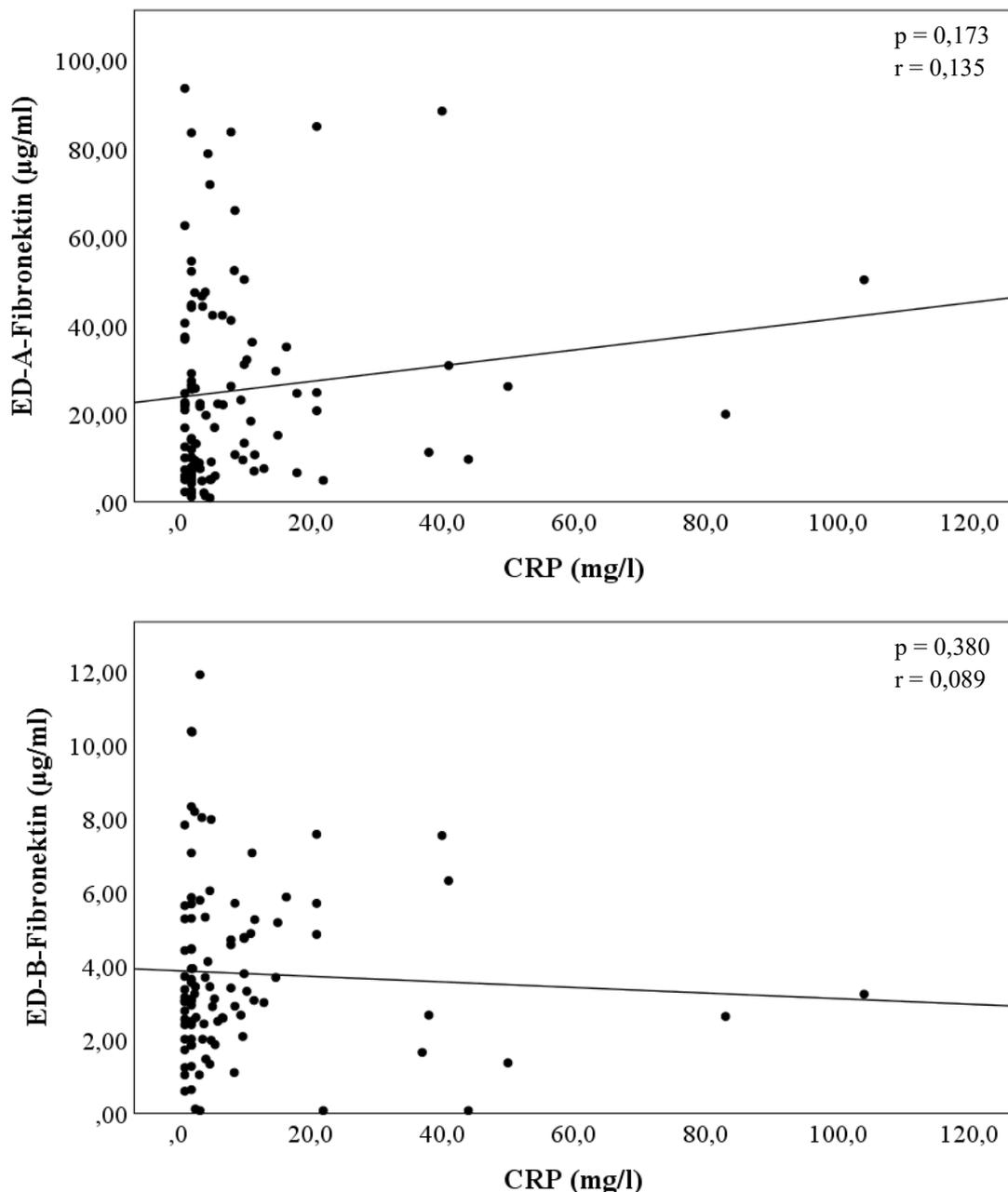
Die Spearman-Korrelationsanalyse der Serumspiegel von BNP zu ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn ist in Abb. 13 dargestellt. Abb. 13a zeigt, dass eine signifikante positive Korrelation (p = 0,002;

$r = 0,310$ ) der Serumexpressionslevel von BNP und ED-A<sup>+</sup>-Fn ( $n = 97$ ) nachgewiesen werden konnte. Die Patienten mit höheren BNP-Werten präsentierten sich im Mittel auch mit höheren ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumspiegeln. Selbige Korrelationsanalyse für BNP und ED-B<sup>+</sup>-Fn ( $n = 93$ ) erbrachte hingegen keinen signifikanten Zusammenhang ( $p = 0,894$ ;  $r = 0,014$ ) der beiden Laborparameter (siehe Abb. 13b).

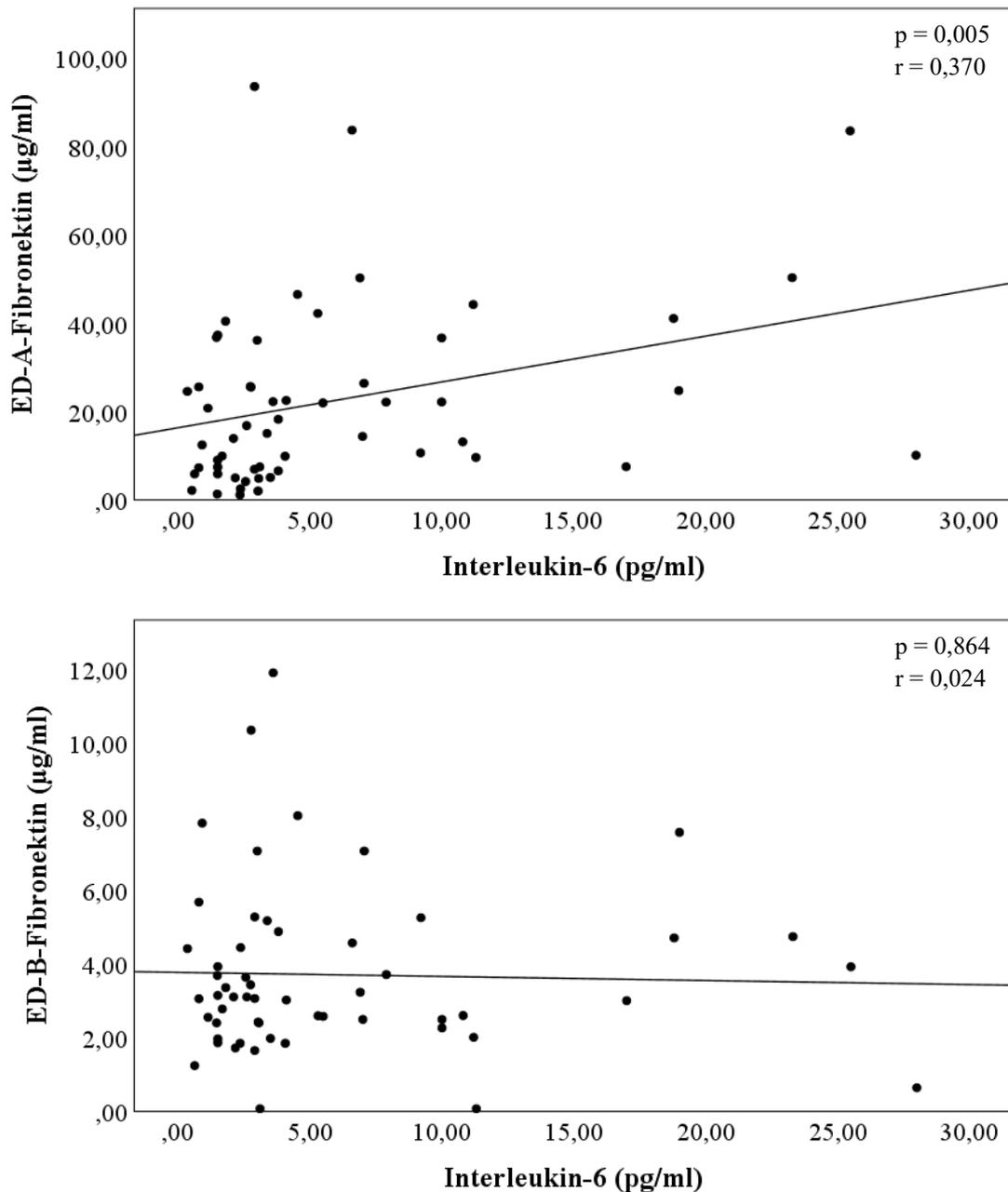


**Abb. 13: Korrelation der Serumkonzentration von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin zu BNP.** Dargestellt sind die Korrelationsanalysen der Serumkonzentrationen von ED-A<sup>+</sup>- (Abb. 13a, oben) bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin (µg/ml) (Abb. 13b, unten) zu BNP (pg/ml) für die gesamte Studienpopulation (ED-A<sup>+</sup>:  $n = 97$ ; ED-B<sup>+</sup>:  $n = 93$ ) in Streudiagrammen. Die Signifikanzen ( $p$ ) und Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) wurden nach Spearman berechnet. | **Abkürzung:** BNP: *brain natriuretic peptide*

Aufgrund der diskutierten Bedeutung inflammatorischer Prozesse für die Pathogenese der PH (vgl. Abschnitt 1.2.3.4) wurden die Serumlevel von ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn ebenfalls zu denen der Entzündungsmarker CRP (siehe Abb. 14) und IL-6 (siehe Abb. 15) korreliert. Hinsichtlich der Serumkonzentration von CRP konnte im Studienkollektiv sowohl in Bezug auf ED-A<sup>+</sup>-Fn ( $p = 0,173$ ;  $r = 0,135$ ;  $n = 104$ ; siehe Abb. 14a) als auch auf ED-B<sup>+</sup>-Fn ( $p = 0,380$ ;  $r = 0,089$ ;  $n = 100$ ; siehe Abb. 14b) kein signifikanter Zusammenhang hergestellt werden.



**Abb. 14: Korrelation der Serumkonzentration von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin zu CRP.** Dargestellt sind die Korrelationsanalysen der Serumkonzentrationen von ED-A<sup>+</sup>- (Abb. 14a, oben) bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin (µg/ml) (Abb. 14b, unten) zu CRP (mg/l) für die gesamte Studienpopulation (ED-A<sup>+</sup>:  $n = 104$ ; ED-B<sup>+</sup>:  $n = 100$ ) in Streudiagrammen. Die Signifikanzen ( $p$ ) und Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) wurden nach Spearman berechnet. | **Abkürzung:** CRP: C-reaktives Protein



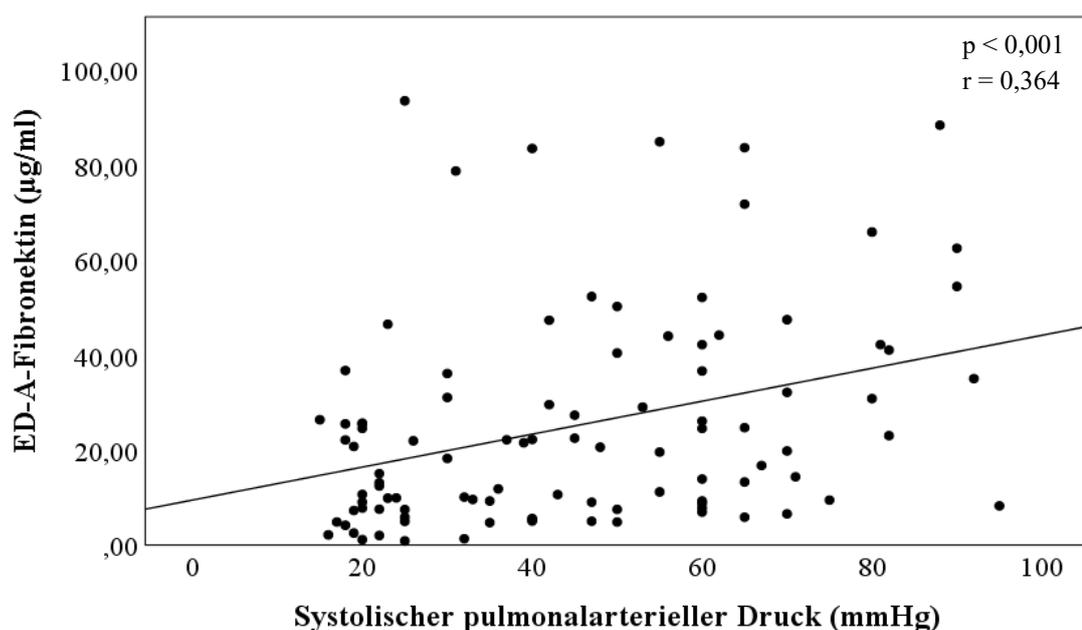
**Abb. 15: Korrelation der Serumkonzentration von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin zu Interleukin-6.** Dargestellt sind die Korrelationsanalysen der Serumkonzentrationen von ED-A<sup>+</sup>- (Abb. 15a, oben) bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin (µg/ml) (Abb. 15b, unten) zu Interleukin-6 (pg/ml) für die gesamte Studienpopulation (ED-A<sup>+</sup>: n = 56; ED-B<sup>+</sup>: n = 55) in Streudiagrammen. Die Signifikanzen (p) und Korrelationskoeffizienten (r) wurden nach Spearman berechnet.

Aus Abb. 15a ist zu entnehmen, dass im Gesamtkollektiv (n = 56) zwischen den Serumspiegeln von ED-A<sup>+</sup>-Fn und IL-6 eine signifikante positive Korrelation (p = 0,005; r = 0,370) nachgewiesen werden konnte. Patienten mit höheren Serumkonzentrationen von IL-6 wiesen im Mittel ebenfalls höhere ED-A<sup>+</sup>-Fn-Messwerte auf. Die Korrelation der Serumspiegel von ED-B<sup>+</sup>-Fn und IL-6 innerhalb der gesamten Studienpopulation (n = 55) zeigte hingegen keine signifikanten Ergebnisse (p = 0,864; r = 0,024; siehe Abb. 15b).

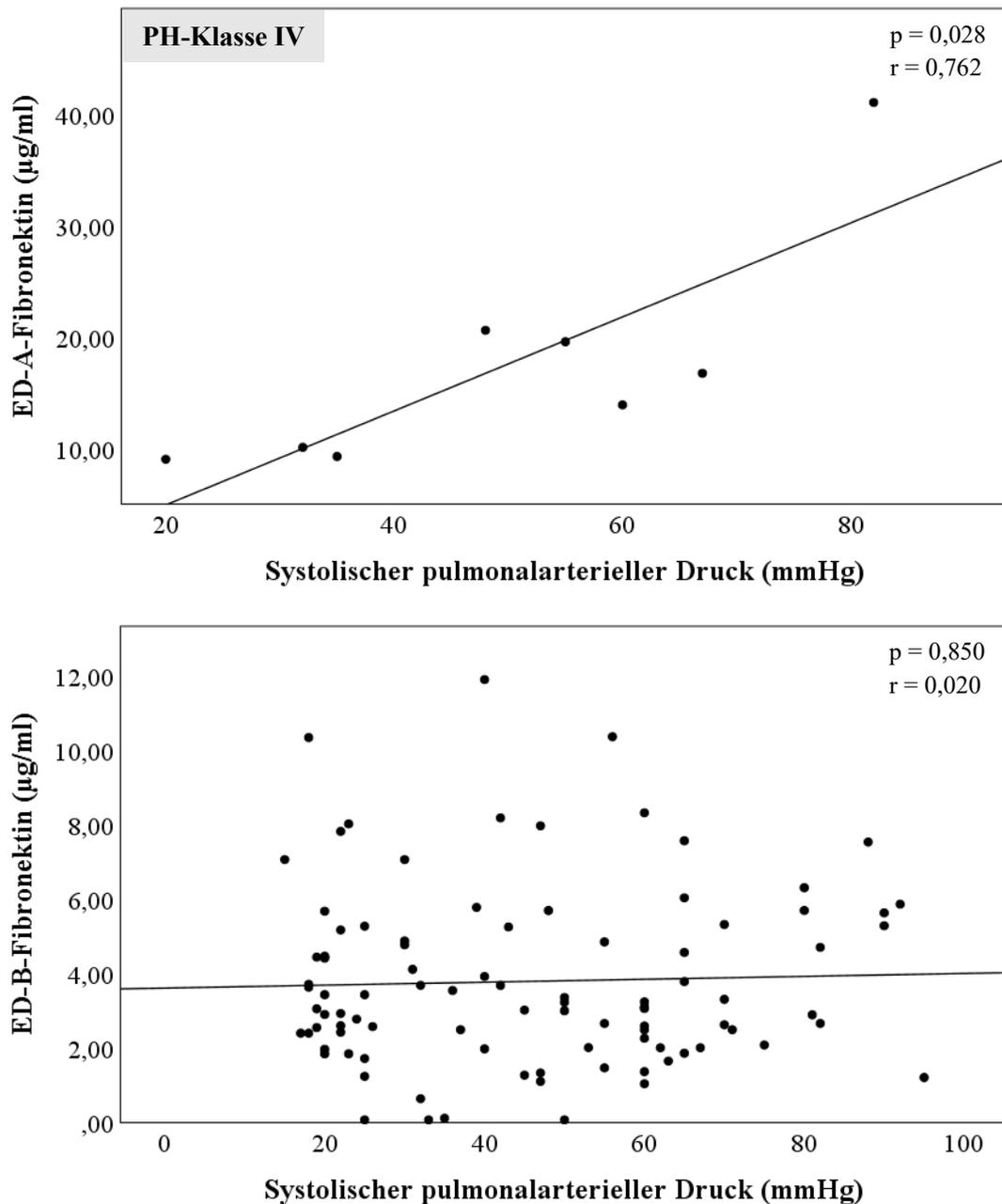
#### 4.3.3.3 Korrelationsanalysen zu echokardiografischen Parametern

Im Folgenden werden die Spearman-Korrelationen von ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn zu verschiedenen echokardiografischen Parametern beschrieben, da die TTE das wegweisende nichtinvasive Diagnoseverfahren der PH darstellt (vgl. Abschnitt 1.2.5). Konkret wurden Zusammenhänge zwischen den genannten Fn-Spleißvarianten und dem systolischen PAP, der TAPSE und der rechtsatrialen Fläche untersucht, da diese für die initiale Diagnostik, Verlaufsbeurteilung und Schweregradeinschätzung der PH besonders relevant sind.

Eine Erhöhung des PAP über 25 mmHg ist die hämodynamische Definitionsgrundlage einer PH-Erkrankung. Die durchgeführte Dependenzanalyse von ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn und dem systolischen PAP ist in Abb. 16 dargestellt. Hierbei konnte unter Einbezug des gesamten Studienkollektivs (n = 98) zwischen der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration und dem dopplersonografisch ermittelten systolischen PAP ein signifikanter positiver Zusammenhang ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,364$ ) aufgezeigt werden. Patienten mit vergleichsweise hohen ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumspiegeln wiesen im Mittel einen höheren systolischen PAP auf als Patienten mit niedrigeren ED-A<sup>+</sup>-Fn-Konzentrationen im Serum (siehe Abb. 16a). Selbige Korrelationsanalyse wurde ebenfalls gesondert für die ätiologisch differenten PH-Klassen durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen ED-A<sup>+</sup>-Fn im Serum und dem systolischen PAP lediglich in PH-Klasse IV ( $p = 0,028$ ;  $r = 0,762$ ; siehe Abb. 16b). Die Aussagekraft letztgenannter Korrelation ist jedoch durch die geringe Probandenanzahl (n = 8) limitiert. Eine signifikante Korrelation zwischen der ED-B<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration und dem systolischen PAP konnte nicht nachgewiesen werden ( $p = 0,850$ ;  $r = 0,020$ ; n = 94) wie aus Abb. 16c hervorgeht.



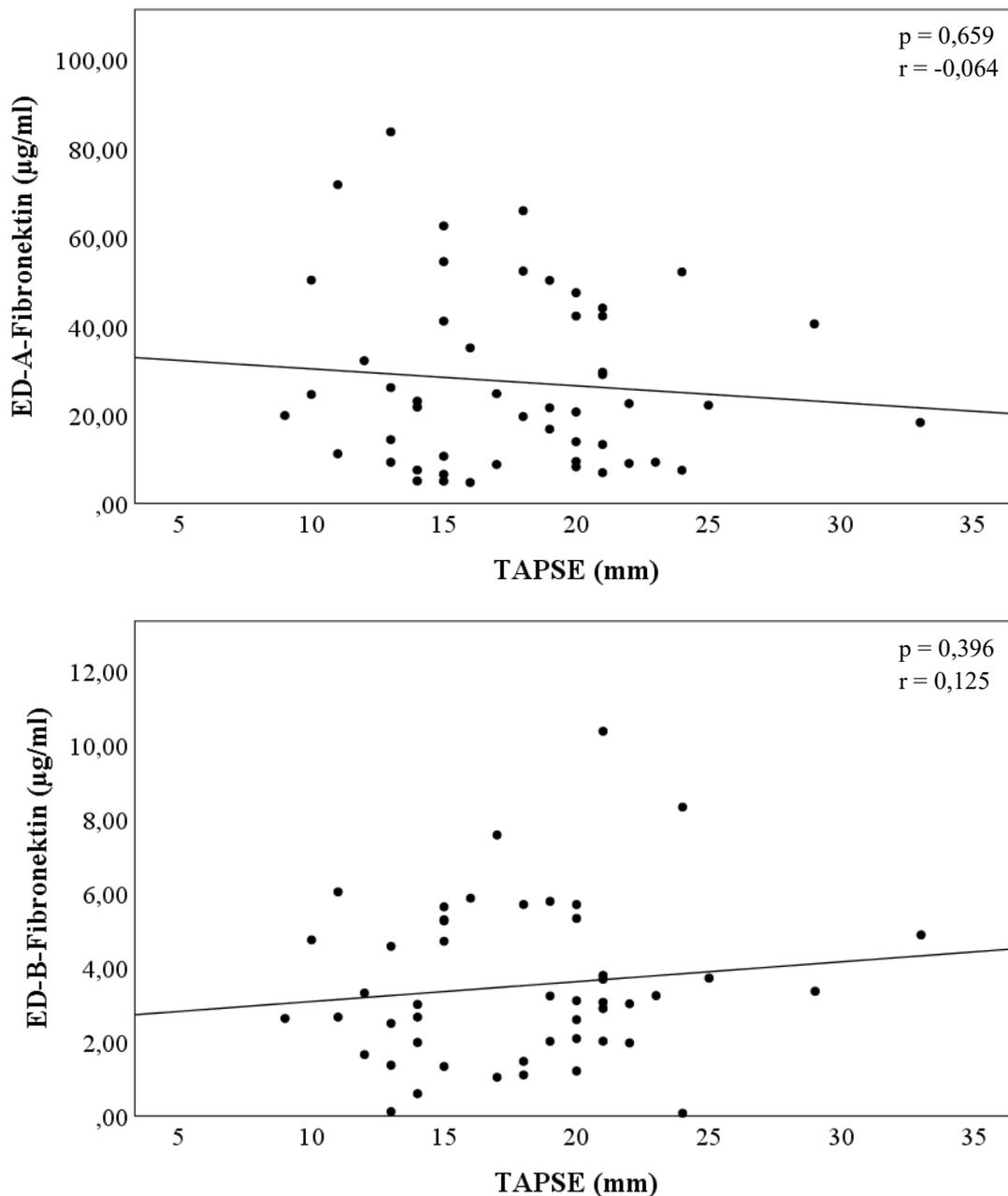
**Abb. 16a:** Korrelation der ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin-Serumkonzentration zum systolischen pulmonalarteriellen Druck. Legende: siehe Folgeblatt



**Abb. 16: Korrelation der ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-Serumkonzentration zum systolischen pulmonalarteriellen Druck.** Dargestellt sind die Korrelationsanalysen der ED-A<sup>+</sup>- (Abb. 16a, Seite 67) bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-Serumkonzentrationen ( $\mu\text{g/ml}$ ) (Abb. 16c, unten) zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (mmHg) für die gesamte Studienpopulation (ED-A<sup>+</sup>:  $n = 98$ ; ED-B<sup>+</sup>:  $n = 94$ ) sowie die Korrelationsanalyse der ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin-Serumkonzentrationen ( $\mu\text{g/ml}$ ) zum systolischen pulmonalarteriellen Druck (mmHg) innerhalb der PH-Klasse IV ( $n = 8$ ; Abb. 16b, oben) in Streudiagrammen. Die Signifikanzen ( $p$ ) und Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) wurden nach Spearman berechnet. | **Abkürzung:** PH: pulmonale Hypertonie

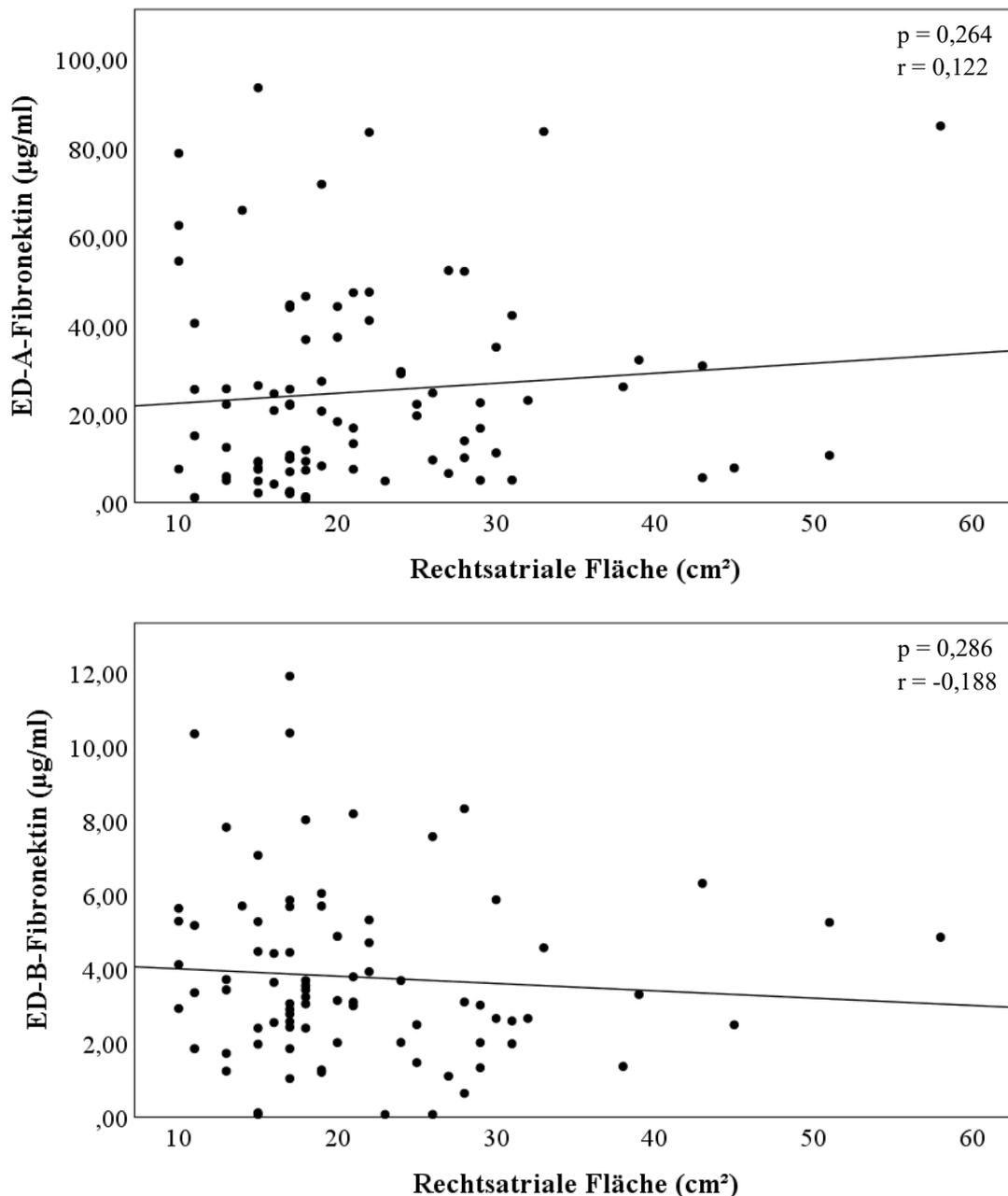
Des Weiteren wurden mögliche Zusammenhänge zwischen der ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration und der echokardiografisch ermittelten TAPSE untersucht. Die TAPSE erfasst die Auslenkung des Trikuspidalklappenanusulus während Systole und Diastole und kann zur quantitativen Beurteilung der Rechtsherzfunktion herangezogen werden. Eine herabgesetzte

Auslenkung der Trikuspidalringebene spricht für eine eingeschränkte Kontraktilität des rechten Ventrikels. Die zugehörigen Spearman-Korrelationsanalysen sind in Abb. 17 dargestellt. Für die TAPSE konnten im Gesamtkollektiv sowohl in Bezug zu ED-A<sup>+</sup>-Fn ( $p = 0,659$ ;  $r = -0,064$ ;  $n = 50$ ; siehe Abb. 17a) als auch in Bezug zu ED-B<sup>+</sup>-Fn ( $p = 0,396$ ;  $r = 0,125$ ;  $n = 48$ ; siehe Abb. 17b) keine signifikanten Korrelationen nachgewiesen werden.



**Abb. 17: Korrelation der ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-Serumkonzentration zur TAPSE.** Dargestellt sind die Korrelationsanalysen der ED-A<sup>+</sup>- (Abb. 17a, oben) bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-Serumkonzentrationen (µg/ml) (Abb. 17b, unten) zur TAPSE (mm) für die gesamte Studienpopulation (ED-A<sup>+</sup>:  $n = 50$ ; ED-B<sup>+</sup>:  $n = 48$ ) in Streudiagrammen. Die Signifikanzen ( $p$ ) und Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) wurden nach Spearman berechnet. | **Abkürzung:** TAPSE: *tricuspid annular plane systolic excursion*

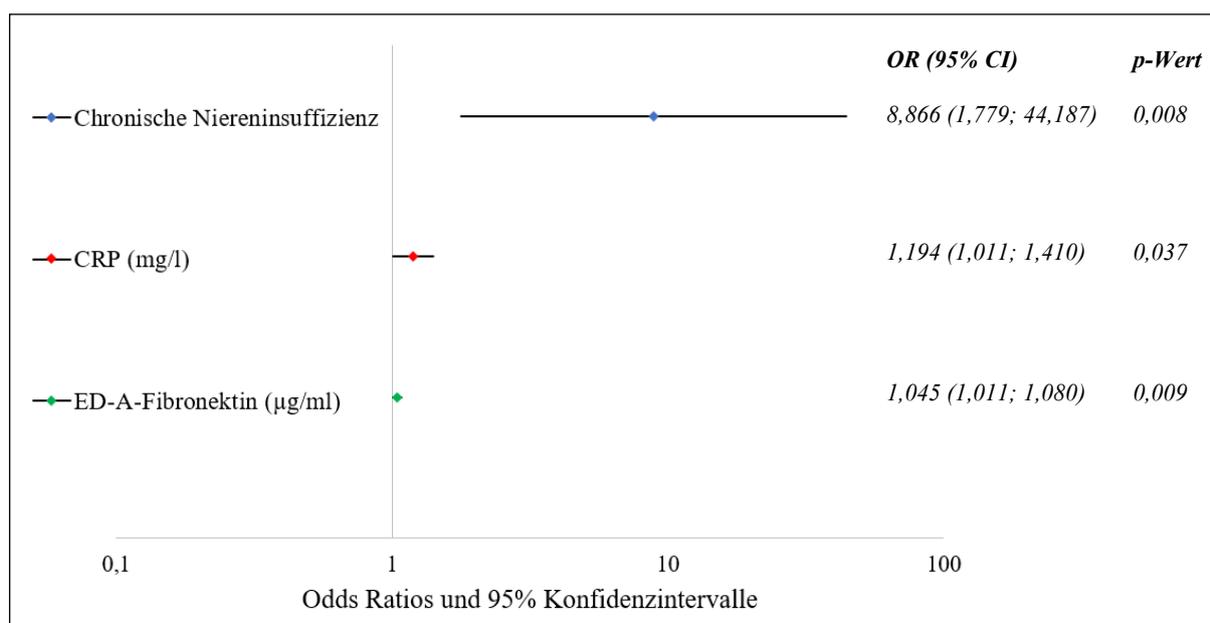
Eine Vergrößerung des rechten Vorhofs als Adaptation an die erhöhte Druck- und Volumenbelastung des rechten Herzens gilt echokardiografisch als indirektes Zeichen für das Vorliegen einer PH. Die im Gesamtkollektiv durchgeführten Korrelationsanalysen zwischen den Messwerten der rechtsatrialen Fläche und den fetalen Fn-Spleißvarianten erbrachten jedoch weder für ED-A<sup>+</sup>-Fn ( $p = 0,264$ ;  $r = 0,122$ ;  $n = 86$ ; siehe Abb. 18a) noch für ED-B<sup>+</sup>-Fn ( $p = 0,286$ ;  $r = -0,118$ ;  $n = 83$ ; siehe Abb. 18b) statistisch signifikante Ergebnisse.



**Abb. 18: Korrelation der ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin-Serumkonzentration zur rechtsatrialen Fläche.** Dargestellt sind die Korrelationsanalysen der ED-A<sup>+</sup>- (Abb. 18a, oben) bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin-Serumkonzentrationen (µg/ml) (Abb. 18b, unten) zur rechtsatrialen Fläche (cm<sup>2</sup>) für die gesamte Studienpopulation (ED-A<sup>+</sup>:  $n = 86$ ; ED-B<sup>+</sup>:  $n = 83$ ) in Streudiagrammen. Die Signifikanzen ( $p$ ) und Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) wurden nach Spearman berechnet.

#### 4.3.4 Prädiktive Wertigkeit von ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin für das Vorliegen einer pulmonalen Hypertonie

Aufgrund signifikanter klinischer Unterschiede zwischen den Patientenkollektiven, die in die vorliegende Arbeit aufgenommen wurden (vgl. Abschnitt 4.3.1, Tab. 12 und Tab. 13), wurden weitere Analysen durchgeführt, um mögliche Störfaktoren zu identifizieren. Da sich für die ED-B<sup>+</sup>-Fn-Spleißvariante keinerlei statistisch signifikante Korrelationen zu den untersuchten Parametern ergaben (vgl. Abschnitt 4.3.3), beziehen sich die nachfolgenden Ausführungen lediglich auf ED-A<sup>+</sup>-Fn. Um die prädiktive Wertigkeit der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration für die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer PH zu testen, wurde eine binär logistische Regressionsanalyse durchgeführt. In diese wurden zehn unabhängige Variablen (Kovariaten) inkludiert, welche im Vergleich zwischen den Kontrollen und der Gesamtheit der PH-Patienten signifikante Unterschiede zeigten ( $p < 0,1$ ) und überdies als klinisch relevant eingeschätzt wurden. Dies waren im Speziellen: Alter, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, KHK, Vorhofflimmern, COPD, chronische Niereninsuffizienz, CRP, Statintherapie sowie ED-A<sup>+</sup>-Fn. Unter den genannten Kovariaten konnte nach Rückwärtselimination nach Wald neben einer chronischen Niereninsuffizienz (Wald: 7,090; OR: 8,866; 95% CI: 1,779 – 44,187;  $p = 0,008$ ) und dem Inflammationsmarker CRP (Wald: 4,347; OR: 1,194; 95% CI: 1,011 – 1,410;  $p = 0,037$ ) lediglich ED-A<sup>+</sup>-Fn (Wald: 6,757; OR: 1,045; 95% CI: 1,011 – 1,080;  $p = 0,009$ ) als unabhängiger Prädiktor für das Vorliegen einer PH identifiziert werden. Der zugehörige Forest-Plot ist in Abb. 19 dargestellt.



**Abb. 19: Binär logistische Regressionsanalyse zur Identifikation unabhängiger Prädiktoren für das Vorliegen einer pulmonalen Hypertonie.** Methode: Rückwärtselimination nach Wald. | **Abkürzungen:** CI: Konfidenzintervall | CRP: C-reaktives Protein | OR: Odds Ratio

## 5 Diskussion

### 5.1 Etablierung eines ELISAs zum Nachweis von ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin

Die Reexpression fetaler *Splicing*-Varianten zellulärer Adhäsionsproteine wie Fn im Rahmen der krankheitsassoziierten Reorganisation der cECM ist für zahlreiche kardiale Krankheitsentitäten umfangreich vorbeschrieben (Schwarzbauer 1991a, Gabler et al. 1996, Franz et al. 2010, Baldinger et al. 2011). Klinische Bedeutsamkeit erlangen die fetalen Fn-Varianten hierbei einerseits als potenzielle Biomarker zur Diagnostik und Verlaufsbeurteilung der Erkrankungen und andererseits als Zielstrukturen für antikörperbasierte Therapiekonzepte (Matter et al. 2004, Tan et al. 2004, Rybak et al. 2007a, Franz et al. 2013). Zusätzlich zur vielfältig untersuchten Deposition im erkrankten Gewebe ist die sichere Quantifizierung der Serumkonzentration der betreffenden Moleküle unabdingbar, um sie prospektiv in praxistaugliche und weitreichend verfügbare diagnostische und therapeutische Algorithmen zu integrieren. Eine Herausforderung hierbei ist, dass die Gewebeexpression fetaler Fn-Varianten die Serumkonzentration selbiger mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Vielfaches übersteigt, da lediglich ein geringer Anteil des deponierten ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn in den Systemkreislauf freigesetzt wird. In Bezug auf die vorliegende Arbeit benötigten wir daher eine spezifische und sensitive Nachweismethode als Basis der Untersuchungen zur Regulation der fetalen *Splicing*-Formen ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn im Serum von PH-Patienten. Dieses Verfahren sollte sowohl eine Detektion sehr geringer Proteinmengen ermöglichen als auch die unspezifische Bindung anderer Proteine, insbesondere weiterer Fn-Varianten, ausschließen. Aufgrund der schnellen und relativ einfachen Durchführbarkeit und dem geringen technischen Aufwand entschieden wir uns hierbei für einen ELISA.

#### 5.1.1 Vorarbeiten zur Etablierung eines ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin-ELISAs

Da ein *Testkit* zur spezifischen Detektion von ED-B<sup>+</sup>-Fn nicht kommerziell verfügbar war und ist, stellte die Etablierung eines eigenen ELISA-Protokolls eine unabdingbare Voraussetzung für die Umsetzung unserer Zielstellung dar. Hierbei profitierten wir von den umfangreichen ED-A<sup>+</sup>-Fn-Vorarbeiten unserer AG, welche 2016 einen neuartigen ELISA zur Quantifizierung von im Serum zirkulierendem ED-A<sup>+</sup>-Fn entwickelte (Ziffels et al. 2016). Dieser basiert auf der bereits 1984 publizierten methodischen Überlegung, dass das *Capturing* des Fn-Moleküls aufgrund der Gelatinebindedomäne an dessen N-terminalem Ende mittels gelatinebeschichteter Mikrotiterplatten möglich ist (Selmer et al. 1984). Anfang der 1990er Jahre wurde durch monoklonale Antikörper die spezifische Detektion der ED-A<sup>+</sup> in cFn sowohl via Immunoblot (Vartio et al. 1987) als auch via ELISA (Ylätupa et al. 1993) erfolgreich durchgeführt. Im optimierten gelatinebasierten ED-A<sup>+</sup>-Fn-ELISA unserer AG wird IST-9, dessen Paratop

spezifisch an die ED-A<sup>+</sup> in cFn bindet, als Primärantikörper zur Detektion genutzt (Carnemolla et al. 1987, Ziffels et al. 2016). Mit jenem nicht-kompetitiven, indirekten *Sandwich*-ELISA stand ein praktikables und reproduzierbares Protokoll zur Quantifizierung von ED-A<sup>+</sup>-Fn in Körperflüssigkeiten zur Verfügung. In weiteren Bemühungen zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität des Assays wurde ein alternatives ELISA-Protokoll getestet, in dem die initiale Plattenbeschichtung anstatt mit Gelatine mit dem polyklonalen AK IST-2, der die in allen Fn-Varianten enthaltenen Fragmente 12 – 14 (siehe Abb. 2) bindet, erfolgte. Zur anschließenden Detektion wurde hierbei ebenfalls der ED-A<sup>+</sup>-Fn-spezifische monoklonale AK IST-9 verwendet (Ospel 2016). Da Gelatine selbst ein Gemisch aus denaturierten Kollagenen darstellt und Kollagen wiederum als ubiquitär im Körper vorhandener Bestandteil der ECM zahlreiche Bindungsstellen auch für andere Moleküle aufweist (Ricard-Blum 2011), sollte mit dem Ersatz von Gelatine durch IST-2 bereits im ersten Schritt eine selektive Bindung von Fn erreicht werden. In vergleichenden Analysen der beiden Verfahren wurden jedoch mit dem bewährten gelatinebasierten Ansatz deutlich verwertbarere Messergebnisse als mit dem IST-2-IST-9-Ansatz erzielt, der offenbar nur einen Bruchteil des in den Serumproben enthaltenen ED-A<sup>+</sup>-Fn detektieren konnte. Ursächlich hierfür könnte die Architektur des Fn-Moleküls und damit verbundene sterische Behinderungen sein (Ospel 2016). IST-2 bindet die Typ III-Domänen 12 – 14, welche räumlich im Molekül direkt neben der ED-A<sup>+</sup> lokalisiert sind, sodass eine parallele Besetzung der Bindungsstellen durch IST-2 und IST-9 möglicherweise blockiert wird (Schwarzbauer 1991b). Aufgrund der zuvor hinreichenden Verifizierung diente das in unserer AG entwickelte Gelatine-IST-9-ELISA-Protokoll einerseits als Standardprotokoll zur Quantifizierung der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Konzentration in den Serumproben der PH-Patienten und andererseits durch die strukturelle Ähnlichkeit von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn als methodische Richtlinie für die Neuetablierung des ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISAs.

### 5.1.2 Etablierung eines nicht-kompetitiven, indirekten ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-ELISAs

Der erste in der Literatur beschriebene ELISA zur Quantifizierung von ED-B<sup>+</sup>-Fn im Plasma wurde 1999 unter Verwendung des monoklonalen AK BC-1 durchgeführt (Claudepierre et al. 1999). Fast zeitgleich mit der hier vorliegenden Arbeit konnten Arnold et al. unter Anwendung indirekter ELISAs auf Kollagenbasis ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn im Urin nachweisen (Arnold et al. 2016). Wir etablierten zur Detektion von ED-B<sup>+</sup>-Fn einen gelatinebasierten, nicht-kompetitiven, indirekten *Sandwich*-ELISA, da hiermit die sensitivere Messung erwartungsgemäß kleiner Proteinkonzentrationen möglich ist (Konstantinou 2017). Um eine Standardkurve mit einem linearen Konzentrationsbereich zu generieren, die zur Quantifizierung unbekannter Proben verwendet werden kann, wurde kommerziell erhältliches gereinigtes ED-B<sup>+</sup>-Fn als

Standardprotein verwendet. Letzteres wird aus WI38VA-Zellen (SV40-transformierte Fibroblasten) gewonnen, deren Fn-Molekül zu fast 100% die alternativ gespleißte ED-B<sup>+</sup> enthält (Zardi et al. 1987, Carnemolla et al. 1989). In einem weiteren Schritt wird dieses aus den WI38VA-Zellen gewonnene Fn mittels Säulenaffinitätschromatografie an IST-6-Sepharose gereinigt. Da IST-6 nur ED-B<sup>+</sup>-freies Fn erkennt (Carnemolla et al. 1992), ist von einer Entfernung aller Fn-Moleküle ohne ED-B<sup>+</sup> und somit einer hohen Reinheit auszugehen.

Die Grundvoraussetzung für den ELISA war die Verfügbarkeit von Antikörpern mit hoher Spezifität gegen die ED-B<sup>+</sup> von Fn. Auf Grundlage der unter 3.1.4 dargelegten Testungen entschieden wir uns für den domänenspezifischen monoklonalen Maus-AK C6, welcher nur dann ein Epitop der Typ III-Domäne 8 von Fn bindet, wenn die ED-B<sup>+</sup> im Fn-Molekül enthalten ist (Balza et al. 2009, Ventura et al. 2010). Im Anschluss wurde ein hochaffiner, biotinylierter Esel-anti-Maus-AK als Sekundärantikörper hinzugegeben, der zur Reduktion von Kreuzreaktionen mit Proteinen aus verschiedenen Säugetieren adsorbiert wurde und für den in zahlreichen früheren Testungen unserer AG eine zusätzliche Signalamplifikation nachgewiesen werden konnte (Ziffels et al. 2016). Um falsch-positive Ergebnisse durch unspezifische Bindungen zwischen dem Sekundärantikörper und endogenen humanen Immunglobulinen auszuschließen, wurden mehrere Serumproben des unter 4.3.1 charakterisierten PH-Kollektivs zusätzlich zum vollständigen Versuchsaufbau in einem modifizierten ELISA-Protokoll getestet, in dem auf den primären Antikörper C6 verzichtet wurde. Hierbei war unabhängig von der Serumkonzentration nach ansonsten identisch durchgeführtem Protokoll kein relevantes Farbsignal detektierbar, sodass von einer hochspezifischen Reaktivität des Sekundärantikörpers ausschließlich gegenüber dem Primärantikörper C6 ausgegangen werden konnte.

### **5.1.3 Immunfluoreszenz-Analysen zur Verifizierung der Antikörper-Spezifität für den ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-ELISA**

Neben den dargestellten Bemühungen zur Optimierung der Sensitivität des *Assays* erfolgten Untersuchungen zur Validierung der Spezifität der für den ELISA verwendeten Antikörper an humanem Gewebematerial (myokardiales Gewebe rechter Vorhoföhren und neoplastisches Gewebe von Kopf-Hals-Tumoren). Hierbei konnte mittels Immunfluoreszenzmarkierung im Vergleich zur Negativkontrolle unter Verzicht auf den primären Antikörper eine spezifische Detektion des im Gewebe deponierten Zielantigens bewiesen werden. Dies ist von Bedeutung vor dem Hintergrund, dass die Detektion fetaler Matrixproteinvarianten wie Fn und Tenascin-C unter Verwendung domänenspezifischer Antikörper aufgrund der hohen Diversität der Expression von *Splicing*-Formen methodisch anspruchsvoll ist. Aufgrund dessen konnte vom Vorhandensein verschiedener Fn-Varianten im Herzen nicht zwingend auf eine Reaktivität der von uns

verwendeten Antikörper im humanen myokardialen Gewebe rückgeschlossen werden. Auch für chronisch-inflammatorische Pathologien konnten – beispielsweise im Vergleich zu neoplastischen Pathologien – unterschiedliche Reaktivitäten der entsprechenden Antikörper nachgewiesen werden, obwohl das zugehörige Zielantigen mutmaßlich exprimiert war (Franz et al. 2010).

In Zusammenschau der immunhistochemischen Befunde stellt sich natürlich die Frage, warum bei relevanter Expression von ED-B<sup>+</sup>-Fn im Myokardgewebe der rechten Vorhoföhren in unseren Serummessungen keine relevanten Veränderungen nachweisbar waren. Dies kann zum einen daran liegen, dass die Liberation des gut nachweisbaren ED-A<sup>+</sup>-Fn aus den Lungengefäßen erfolgt und diese potenziell kein ED-B<sup>+</sup>-Fn exprimieren, oder aber, dass die Quelle des ED-A<sup>+</sup>-Fn der bei PH hämodynamisch belastete rechte Ventrikel ist und die in unserem immunhistochemischen Referenzkollektiv verwendeten Proben rechtsatrialen Ursprungs waren und einem differenten Patientenkollektiv entstammten (KHK und / oder Aortenklappenstenose – historisches Kollektiv der AG). Unterstützend für diese Überlegungen konnten in ähnlichen Projekten unserer AG unterschiedliche Gewebeexpressionsmuster von ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn in verschiedenen Bereichen des Myokards bzw. im Myokard- im Vergleich zum Lungengewebe nachgewiesen werden (Bendz 2020). Zweifelsohne wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung von Lungen- statt Myokardgewebe naheliegend gewesen, diese kam jedoch aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit humanen Lungengewebes nicht infrage. Dies ist dadurch begründet, dass die Entnahme von Lungenbiopsien nicht zum diagnostischen Algorithmus zur Abklärung des Verdachts auf PH gehört und eine Entnahme zu rein wissenschaftlichen Zwecken selbstverständlich ethisch nicht vertretbar ist.

#### **5.1.4 Sensitivität des neu etablierten ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-ELISAs**

Die Sensitivität des ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISAs wurde anhand der etablierten und reproduzierbaren Standardkurve bewertet und mit anderen *Assays* zur Detektion von Fn verglichen. Problematisch hierbei ist, dass sich die meisten in der Literatur verfügbaren ELISA-Daten auf eine Quantifizierung von Fn im Allgemeinen oder pFn beziehen, nicht jedoch auf ED-B<sup>+</sup>-Fn, wodurch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse eingeschränkt wird. Die untere Nachweisgrenze des von uns etablierten ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISAs betrug 0,2 µg/ml, wohingegen der bereits erwähnte ELISA von Arnold et al. ED-B<sup>+</sup>-Fn bis zu niedrigen Pikogrammkonzentrationen nachweisen konnte (Arnold et al. 2016). Neben methodischen Unterschieden muss hierbei jedoch bedacht werden, dass die Messung von ED-B<sup>+</sup>-Fn in unterschiedlichen Biofluiden (Serum *versus* Urin) erfolgte, was sich möglicherweise auf die Detektionsgrenzen auswirkt. Der von Selmer et al. publizierte *Sandwich*-ELISA konnte bei gleicher Gelatinebeschichtung mit 5000 µg/ml mit einer unteren

Nachweisgrenze von 0,001 µg/ml eine 200-fach höhere Sensitivität erzielen (Selmer et al. 1984). Jedoch sei darauf verwiesen, dass hierbei pFn quantifiziert wurde, wodurch die deutlich höhere Sensitivität möglicherweise auf der Art der Detektion und einer stärkeren Affinität zwischen Antigen und Antikörper beruht. Letztendlich konnte die Sensitivität des neu etablierten ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISAs in Bezug auf die gemessene Konzentration und die tatsächliche Serumkonzentration des Proteins nicht überprüft werden, da kein spezifisches Testsystem mit einer bekannten hohen Sensitivität zum Vergleich zur Verfügung stand.

Um zukünftig einen breiten wissenschaftlich-klinischen Einsatz des ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISAs und die Detektion niedrigerer Serumkonzentrationen zu ermöglichen, sollten Maßnahmen zur Erhöhung der Sensitivität ergriffen werden. Aus Vorarbeiten der eigenen AG ist bekannt, dass mit einer höher konzentrierten Gelatinebeschichtung (1,0% oder 2,0% statt 0,5%) keine verbesserte Sensitivität erreichbar ist, da Proben mit derselben Fn-Konzentration in vergleichenden Messungen mit 0,5% Gelatine bei der photometrischen Auswertung die stärkste Extinktion zeigten (Ziffels 2013). Die Option einer veränderten Plattenbeschichtung im Sinne eines Ersatzes von Gelatine durch domänenspezifische Antikörper wurde auch bereits in Betracht gezogen (Ospel 2016). Da sich die Gelatinebindedomäne am N-terminalen Ende des Fn-Moleküls und damit in deutlicher Entfernung zur ED-A<sup>+</sup> bzw. ED-B<sup>+</sup> befindet (siehe Abb. 2), sinkt die Sensitivität der hier genutzten ELISAs mit steigender Degradation in den Serumproben. Durch einen Antikörper, welcher räumlich näher an den genannten Domänen bindet, würde zwar einerseits die Wahrscheinlichkeit falsch-negativer Ergebnisse aufgrund von Proteinfragmentierung sinken, andererseits könnte die Bindungsstelle des Detektionsantikörpers teilweise oder vollständig blockiert werden (Schwarzbauer 1991b, Steffensen et al. 2011). Eine weitere mögliche Option zur Sensitivitätssteigerung wäre der Austausch des Primärantikörpers. Der von uns verwendete Antikörper C6 ist zwar hochaffin, erkennt jedoch ein Epitop auf der Typ III-Domäne 8 von Fn, welche der ED-B<sup>+</sup> direkt nachgeschaltet ist (Balza et al. 2009). Mit der zukünftigen Entwicklung eines Antikörpers, welcher sich – wie IST-9 im Fall von ED-A<sup>+</sup>-Fn – direkt gegen die gesuchte Domäne richtet, könnten gegebenenfalls sensitivere Messergebnisse erzielt werden.

## **5.2 Quantifizierung der Serumkonzentration von ED-A<sup>+</sup>- im Vergleich zu ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie**

### **5.2.1 Pulmonale Hypertonie als heterogene Erkrankung mit hoher Mortalität**

Die PH ist eine klinisch heterogene Erkrankungsgruppe mit hoher Prävalenz, welche aufgrund unzureichender Kausaltherapien mit einer schlechten Prognose assoziiert ist und als unheilbar gilt. Aufgrund der progredienten Rechtsherzinsuffizienz als wesentlichem Mortalitätsfaktor

bleiben die therapeutischen Optionen für viele Patienten auf eine Symptomkontrolle oder Behandlung der Grunderkrankung beschränkt (Franz et al. 2016, Galiè et al. 2016). Darüber hinaus ist die Diagnosestellung aufgrund einer unspezifischen klinischen Symptomatik diffizil und kann nur durch invasive hämodynamische Messungen im Rahmen einer Rechtsherzkatheteruntersuchung endgültig bestätigt werden (Hoepfer et al. 2013). Während die vasokonstriktiven und thrombembolischen Pathogenesemechanismen einerseits bereits umfassend charakterisiert wurden und andererseits medikamentös gezielt beeinflussbar sind, steht die Forschung bezüglich pathologischem *Remodelling* noch am Anfang (Tarone et al. 2014). Trotz vielversprechender Ansätze sind hierfür aufgrund der Komplexität sich wechselseitig beeinflussender Faktoren bisher keine wirksamen Therapieformen bekannt, sodass diese dysfunktionalen Gewebsumstrukturierungen gegenwärtig die prognoselimitierenden Faktoren der PH sind.

Aus den dargelegten Problemen entstand die Motivation der vorliegenden Arbeit, konkret die Identifizierung und Evaluation neuer Biomarker des pulmonalvaskulären und / oder rechtsventrikulären myokardialen *Remodellings*. Die fetalen Fn-Varianten ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn standen hierbei aufgrund ihrer bereits umfangreich thematisierten Bedeutung im Rahmen pathologischer ECM-Umbauprozesse im Fokus. Im Hinblick auf eine mögliche klinische Implementation erhofften wir uns, einen Beitrag zur nichtinvasiven Differentialdiagnostik der PH sowie zur frühzeitigen Abschätzung der Individualprognose Betroffener zu leisten und perspektivisch relevante *Targets* für antikörperbasierte Therapiestrategien zu identifizieren.

### **5.2.2 Quantifizierung der Serumkonzentrationen von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin in der Gesamtpopulation der Patienten mit pulmonaler Hypertonie**

Zur Ersteinschätzung einer möglichen krankheitsassoziierten Expressionssteigerung der fetalen Fn-Varianten ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn erfolgte die Quantifizierung derer Serumkonzentrationen bei PH-Patienten im Vergleich zum Kontrollkollektiv.

#### *5.2.2.1 Signifikant erhöhte ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin-Serumkonzentration bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie im Vergleich zum Kontrollkollektiv*

Bezüglich ED-A<sup>+</sup>-Fn konnten in der Gesamtpopulation der PH-Patienten signifikant höhere Serumspiegel als in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis korreliert mit multiplen Voruntersuchungen zu ED-A<sup>+</sup>-Fn, welche dessen ausgeprägte Expressionssteigerung im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen belegen. An dieser Stelle sei insbesondere auf das bereits erwähnte Rattenmodell der Monocrotalin-induzierten PH unserer AG verwiesen, welches die ED-A<sup>+</sup>-Fn-Reexpression konkret mit der PH verknüpft und dessen mögliche Bedeutung als Serumbiomarker der Erkrankung unterstreicht. Die hierbei signifikant erhöhte ED-A<sup>+</sup>-Fn-Gewebedeposition bei Ratten mit induzierter PH ging auch mit erhöhten Serumspiegeln

einher (Franz et al. 2016). Diese Erkenntnisse konnten durch die vorliegende Arbeit erstmals im humanen System bestätigt werden.

Während für die PH bislang nur wenig dezidierte Studien vorliegen, ist die Atherosklerose ein ausführlicher untersuchter Prozess, für den eine Reexpression von ED-A<sup>+</sup>-Fn belegt werden konnte. In gesunden Arterienwänden kann kein ED-A<sup>+</sup>-Fn nachgewiesen werden, doch innerhalb atherosklerotischer Läsionen kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Gesamt-Fn sowie zur Expression von ED-A<sup>+</sup>-Fn (Glukhova et al. 1989). ED-A<sup>+</sup>-Fn ist hierbei mit einem quantitativen Anstieg atherosklerotischer Läsionen und einem erhöhten Makrophagengehalt in den Plaques assoziiert (Doddapattar et al. 2015). Des Weiteren spielt ED-A<sup>+</sup>-Fn eine entscheidende Rolle im Rahmen nachteiliger *Remodelling*-Prozesse nach Myokardinfarkt (Arslan et al. 2011) und scheint prothrombotische Effekte zu haben (Chauhan et al. 2008). Neben Herz-Kreislauf-Pathologien ist eine gesteigerte ED-A<sup>+</sup>-Fn-Expression auch für entzündliche Hauterkrankungen (McFadden et al. 2011), rheumatoide Arthritis (Voskuyl et al. 1998) oder mehrere Neoplasien (Ylätupa et al. 1995, Rybak et al. 2007b) beschrieben.

All diesen Erkrankungen – einschließlich der PH – ist eine ausgeprägte inflammatorische Komponente gemein. Immunologisch ist die ED-A<sup>+</sup> von Fn mittlerweile als *damage-associated molecular pattern* (DAMP) anerkannt, welches fibroentzündliche Erkrankungen durch Aktivierung des *Toll-like-Rezeptors* 4 (TLR-4) perpetuiert (Okamura et al. 2001, Kelsh-Lasher et al. 2017). Primär wird ED-A<sup>+</sup>-Fn vermutlich von T-Lymphozyten und Makrophagen resynthetisiert. Durch Bindung an den TLR-4 wird die Transkription profibrotischer Gene induziert und Immunzellen wie Mastzellen oder T-Zellen werden zur Freisetzung von MMPs und proinflammatorischen Mediatoren angeregt (Gondokaryono et al. 2007, McFadden et al. 2011). Die Liberation von Zytokinen führt anschließend zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Entzündungszellen. ED-A<sup>+</sup>-Fn kann also verschiedene immunmodulatorische Kaskaden induzieren, deren Zielzellen im Rahmen positiver *Feedback-Loops* selbst ED-A<sup>+</sup>-Fn freisetzen und damit die Entzündungsreaktion chronifizieren (McFadden et al. 2011). Ähnliche Rückkopplungsmechanismen lassen sich auch auf andere Zelltypen übertragen: ED-A<sup>+</sup>-Fn ist beispielsweise an der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu MyoFb und der Aktivierung von VSMC beteiligt, welche im aktivierten Zustand die weitere Synthese von ED-A<sup>+</sup>-Fn stimulieren (Serini et al. 1998, Franz et al. 2012). Die pathophysiologische Relevanz dieser Regelkreise verdeutlichen experimentelle Modelle der Lungenfibrose (Muro et al. 2008), der allergeninduzierten Atemwegsfibrose (Kohan et al. 2011) oder der chronischen Abstoßungsreaktion nach Allotransplantation (Booth et al. 2012, Franz et al. 2012), bei denen eine ED-A<sup>+</sup>-Fn-Defizienz in einer deutlich abgeschwächten Gewebefibrosierung resultiert.

Die Reexpression von ED-A<sup>+</sup>-Fn tritt offenbar in Assoziation mit inflammatorischen oder autoimmun vermittelten Erkrankungen auf, deren histopathologisches Korrelat eine übersteigerte Gewebefibrose und fehlregulierte Entzündungsreaktion ist, welche den Übergang in ein chronisches Krankheitsstadium fördern. Ausgehend von der physiologischen Beteiligung von ED-A<sup>+</sup>-Fn an der Regulation von Zelladhäsion und -differenzierung (Xia und Culp 1995, Serini et al. 1998), Wundheilung (Ffrench-Constant et al. 1989, Muro et al. 2003), Gerinnung (Chauhan et al. 2008, Maurer et al. 2015) oder Inflammation (Kelsh et al. 2014, Lemańska-Perek und Adamik 2019) scheint es vor allem die Persistenz der durch ED-A<sup>+</sup>-Fn vermittelten Signale zu sein, welche in einem pathologischen Gewebe-*Remodelling* konvergieren.

Ebendieser Prozess liegt auch dem komplexen Umbau der Lungengefäße im Rahmen der PH zugrunde. Die durch ED-A<sup>+</sup>-Fn aktivierten MyoFb und VSMC akkumulieren und führen durch die übermäßige Ablagerung von ECM-Komponenten zu einer exzessiven Hyperplasie aller Gefäßwandschichten. Die dadurch progrediente luminale Okklusion ist die histologische Grundlage der PAP-Erhöhung und Auslöser der klinischen Symptomatik der Erkrankung (Huber et al. 2015, Franz et al. 2016). Zusätzlich zu den Veränderungen der Lungengefäßarchitektur wird die Pathogenese der PH durch inflammatorische Prozesse mitbeeinflusst. Auf Gewebeebene konnte bei PAH-Patienten sowohl innerhalb der Gefäßwand als auch perivaskulär eine erhebliche Immuneinfiltration nachgewiesen werden. Darüber hinaus sind in der Zirkulation von PH-Patienten erhöhte Zytokin- und Chemokinspiegel nachweisbar (Perros et al. 2005, Price et al. 2012). Die beschriebenen Vorarbeiten liefern somit einige plausible Erklärungsansätze für die von uns erhobene erhöhte Serumliberation von ED-A<sup>+</sup>-Fn im Rahmen der PH.

#### *5.2.2.2 Fehlende Unterschiede der ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin-Serumkonzentration bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie im Vergleich zum Kontrollkollektiv*

Anders als für ED-A<sup>+</sup>-Fn zeigten sich bezüglich der ED-B<sup>+</sup>-Fn-Serumlevel keine signifikanten Unterschiede zwischen PH- und Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis spiegelt den Konsens des Großteils der Voruntersuchungen zu ED-B<sup>+</sup>-Fn wider. Zwar gibt es auch einige Hinweise auf eine Beteiligung von ED-B<sup>+</sup>-Fn an kardiovaskulären Erkrankungen (Samuel et al. 1991, Gabler et al. 1996, Matter et al. 2004), im überwiegenden Anteil der in der Literatur verfügbaren Daten wird ED-B<sup>+</sup>-Fn jedoch als Marker der neoplastischen Transformation im Tumorgewebe beschrieben (Midulla et al. 2000, Petrini et al. 2017). Zardi et al. haben 1987 die ED-B<sup>+</sup> erstmals vollständig sequenziert und gezeigt, dass der Prozentsatz der Fn-mRNA-Moleküle, die das ED-B<sup>+</sup>-codierende Exon enthalten, in transformierten Zellen gegenüber gesunden Körperzellen deutlich erhöht ist. Sie konnten das alternative *Splicing* der mRNA als Adaptationsmechanismus transformierter Zellen identifizieren, um flexibel und reversibel Diversität zu erzeugen,

ohne dass neue Gene exprimiert werden müssen (Zardi et al. 1987). Mittlerweile sind erhöhte ED-B<sup>+</sup>-Fn-Expressionslevel sowohl in den Primärläsionen als auch in den Metastasen multipler solider Tumorerkrankungen nachgewiesen, einschließlich Glioblastom (Ohnishi et al. 1998), Mammakarzinom (Kaczmarek et al. 1994), nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom (Khan et al. 2005a), kolorektalem Karzinom (Pujuguet et al. 1996) oder Kopf-Hals-Tumoren (Birchler et al. 2003). Hierbei umgibt ED-B<sup>+</sup>-Fn entweder proangiogene Gefäße oder zeigt ein gemischtes Verteilungsmuster zwischen stromalen und perivaskulären Strukturen (Menrad und Menssen 2005). Hinsichtlich der funktionellen Bedeutung gibt es starke Evidenz, dass Tumorzellen ED-B<sup>+</sup>-Fn exprimieren, um Endothelzellen zu rekrutieren, welche wiederum durch Neovaskularisation die Tumormasse mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen (Castellani et al. 1994).

Im Zentrum dieser Kaskade steht der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), dessen Expression durch ED-B<sup>+</sup>-Fn deutlich gesteigert wird (Khan et al. 2005b). Über VEGF könnte sich eine Verbindung von ED-B<sup>+</sup>-Fn zur PAH ergeben. Die im Zuge der PAH auftretenden plexiformen Läsionen beruhen auf einer unkontrollierten Gefäßaussprossung von Endothelzellen in das Lumen kleiner dilatierter Pulmonalarterien und können als Resultat eines frustranen Neovaskularisationsversuchs betrachtet werden (Tuder et al. 1994). VEGF wird nicht nur in den plexiformen Läsionen überexprimiert (Hirose et al. 2000, Tuder et al. 2001), sondern bei PAH-Patienten konnten auch zirkulatorisch erhöhte VEGF-Spiegel nachgewiesen werden (Eddahibi et al. 2000, Papaioannou et al. 2009). Es ist empfehlenswert, diesen möglichen Zusammenhang zukünftig an einem größeren Patientenkollektiv mit PAH zu testen.

#### 5.2.2.3 Vergleich der Expressionsmuster von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronektin

Im Vergleich der beiden Fn-*Splicing*-Varianten wird deutlich, dass zwar sowohl ED-A<sup>+</sup>- als auch ED-B<sup>+</sup>-Fn in Verbindung mit neoplastischen und entzündlichen Pathologien reexprimiert werden können, dabei jedoch unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen. Während die ED-A<sup>+</sup>-Fn-Synthese vorrangig von Immunzellen, MyoFb und VSMC stimuliert wird und kennzeichnend für nichtmaligne, chronisch-inflammatorische oder autoimmun vermittelte Erkrankungen ist (McFadden et al. 2011, Franz et al. 2012), gelten Tumor- und Endothelzellen als Hauptproduzenten von ED-B<sup>+</sup>-Fn, das spezifisch im Zusammenhang mit (Neo-)Angiogenese auftritt (Midulla et al. 2000). Da dysregulierte Angiogenese ein Schlüsselmechanismus ist, der sowohl der Tumorprogression als auch chronischen Entzündungen zugrunde liegt (Khan et al. 2005b), gibt es einige Schnittstellen zwischen der Reexpression von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn. Entzündungsreaktionen und Angiogenese sind synergistisch miteinander verbunden. Vorrangig getriggert durch Hypoxie werden die Zellen, welche lokal die Entzündungsreaktion vermitteln, zur gesteigerten Synthese von Wachstumsfaktoren und angiogenen Mediatoren angeregt. Diese

wirken proliferativ auf vaskuläre Endothelzellen, welche die Bildung neuer Gefäße induzieren. In reverser Form unterstützt die Angiogenese die Persistenz der Entzündung, indem Sauerstoff und Nährstoffe für den Stoffwechselbedarf der Immunzellen bereitgestellt werden (Carmeliet 2005, Costa et al. 2007). Eine entscheidende Rolle in der Initiierung jener proangiogener und inflammatorischer Kaskaden spielt TGF- $\beta$ , welcher die Synthese beider Fn-*Splicing*-Formen induzieren kann (Balza et al. 1988, Borsi et al. 1990).

Obwohl an der Pathogenese der PH sowohl Entzündung als auch Angiogenese beteiligt sind, konnte in den von durchgeführten Messungen lediglich ED-A<sup>+</sup>, nicht jedoch ED-B<sup>+</sup>-Fn in relevanter Konzentration im Serum der PH-Patienten detektiert werden. Eine wahrscheinliche Ursache für diesen Sachverhalt ist, dass ED-B<sup>+</sup>-Fn restriktiv in neu gebildeten Blutgefäßen exprimiert wird und nicht in chronisch-inflammatorisch veränderten. Des Weiteren kommt auch die Theorie infrage, dass es im Rahmen der PH zwar zu einer Gewebedeposition, aber nicht zu einer Serumliberation von ED-B<sup>+</sup>-Fn kommt. Wie unter 5.1.3 bereits erwähnt, könnten die Quelle des im Serum nachweisbaren ED-A<sup>+</sup>-Fn die Lungengefäße sein, die potenziell kein ED-B<sup>+</sup>-Fn exprimieren.

### **5.2.3 Quantifizierung der Serumkonzentration von ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin in differenten ätiologischen Subgruppen der pulmonalen Hypertonie**

Die ätiologische Einteilung in die PH-Klassen I bis V ist von großer praktischer Bedeutung, da sie sich sowohl in ihren Therapieoptionen als auch in ihrer Prognose deutlich voneinander unterscheiden (Hoepfer et al. 2017). Die separate Quantifizierung der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration in jeder der differenten Klassen des PH-Kollektivs erfolgte daher mit dem Ziel, potenzielle Konzentrationsunterschiede in Assoziation zu verschiedenen Pathogenesemechanismen zu erfassen.

Die Subgruppenanalyse zeigte, dass erhöhte ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumspiegel im Vergleich zu den Kontrollen nur für die ätiologischen Klassen I (PAH), II (PH infolge von Linksherzerkrankungen) und III (PH infolge von Lungenerkrankungen) nachgewiesen werden konnten. Für die Klasse IV (CTEPH) ergaben sich hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv. Im Hinblick auf die Ätiopathogenese der verschiedenen PH-Klassen erscheint das von uns erhobene Ergebnis logisch, da das pathophysiologische Korrelat der Klassen I, II und III primäres (I) oder sekundäres (II, III) vaskuläres *Remodelling* durch Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstands ist. In Klasse IV zeigt sich hingegen keine relevante Gefäßwandverdickung, sondern es handelt sich im Wesentlichen um gesunde Gefäße, welche durch äußere Einflussfaktoren thrombosieren (Huber et al. 2015, Rose-Jones und McLaughlin 2015).

### 5.2.3.1 Pulmonalarterielle Hypertonie (I)

Die PAH stellt die am wenigsten prävalente und mit einer durchschnittlichen Ein-Jahres-Mortalität von 15% prognostisch ungünstigste Subgruppe der PH dar (Peacock et al. 2007, Rose-Jones und McLaughlin 2015). Dies kann teilweise auf die schwierige und dadurch häufig verzögerte Diagnosestellung aufgrund der zahlreichen Überschneidungen mit anderen PH-Klassen zurückgeführt werden (Ryan et al. 2012). Insbesondere für die PAH wäre also die Identifikation valider Biomarker zur sicheren Differentialdiagnostik dringend notwendig. Obwohl bereits eine Vielzahl von Mediatoren untersucht wurde, gibt es aktuell keinen spezifischen Marker für die PAH oder pulmonalvaskuläres *Remodelling*. Derzeit sind BNP und NT-proBNP die einzigen Biomarker, welche in der klinischen Routinepraxis Anwendung finden. Diese sind jedoch unspezifisch bei Myokardschädigungen erhöht und weisen tendenziell eine hohe Variabilität auf (Galiè et al. 2016).

In Bezug auf die Pathogenese der PAH steht die intrinsische distale Vaskulopathie mit Hypertrophie aller Arterienwandschichten und verstärkter Vasokonstriktion der Lungenarterien im Vordergrund (Archer und Rich 2000). Zusätzlich ist jedoch auch der Verlust präkapillärer Arterien und die perivaskuläre Immuneinfiltration nicht vernachlässigbar (Humbert et al. 2019). Laut aktuellem Forschungsstand geht man davon aus, dass zwar genetische Faktoren für die Entwicklung einer PAH prädisponieren, jedoch erst ein zusätzlicher *Trigger*, wie beispielsweise eine Infektion, den Beginn der aktiven Krankheit vermittelt (Farber und Loscalzo 2004, Huber et al. 2015). Da ED-A<sup>+</sup>-Fn erwiesenermaßen ein Marker für chronisch-inflammatorische Prozesse ist, ist es durchaus denkbar, dass die von uns gemessenen erhöhten ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumspiegel bei PAH-Patienten die entzündliche Mitreaktion der Gefäßumgebung widerspiegeln. Darüber hinaus unterstreicht dies die potenzielle Bedeutung von ED-A<sup>+</sup>-Fn im Rahmen von *Targeted-Therapy*-Konzepten. Zwar stehen für die PAH spezifische medikamentöse Therapieoptionen zur Verfügung, diese sind jedoch aufgrund ihrer systemischen Wirkungen mit einem hohen Nebenwirkungspotenzial verbunden (Rose-Jones und McLaughlin 2015).

### 5.2.3.2 Pulmonale Hypertonie infolge von Linksherz- (II) oder Lungenerkrankungen (III)

Die höchsten ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumspiegel fanden wir in den PH-Klassen II und III. In diesen beiden Studiengruppen wurden jedoch auch summativ die meisten Patienten eingeschlossen. Die PH infolge von Linksherzpathologien (II) ist die häufigste Form der PH, deren Prävalenz mit der Schwere der Grunderkrankung zunimmt (Maeder et al. 2017). Dieser postkapilläre Subtyp der PH entwickelt sich reaktiv aufgrund des Blutrückstaus in die Lungengefäße infolge chronisch erhöhter linksatrialer Drücke. Diese rein mechanische Stauungskomponente kann im Krankheitsverlauf weitere Mechanismen vermitteln, welche zu pulmonaler Vasokonstriktion,

verminderter NO-Verfügbarkeit, erhöhter Endothelin-Expression und damit sekundärem vasculärem *Remodelling* führen (Fang et al. 2012, Vachiéry et al. 2013, Galiè et al. 2016). Bezüglich der PH-Klasse II kommt eine Beeinflussung der von uns gemessenen ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration durch kardiale Komorbiditäten in Betracht. Ziffels et al. konnten beispielsweise deutlich erhöhte ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumlevel bei Patienten mit Herzinsuffizienz im Vergleich zu gesunden Probanden nachweisen (Ziffels et al. 2016). Auch im Rahmen der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit fanden sich erhöhte ED-A<sup>+</sup>-Fn-Plasmaspiegel, welche sogar als Prädiktor für das Restenoserisiko nach endovaskulärer Revaskularisation identifiziert werden konnten (Pupek et al. 2018). Folglich kann bei relevanten kardiovaskulären Vorerkrankungen nicht sicher auf den Ursprung des zirkulatorisch nachweisbaren ED-A<sup>+</sup>-Fn geschlossen werden.

Die PH-Klasse III tritt am häufigsten infolge von COPD oder interstitiellen Lungenerkrankungen auf (Seeger et al. 2013, Galiè et al. 2016). Das Endstadium dieser Erkrankungen ist eine irreversible Lungenfibrose, an deren Entstehung und Progress ED-A<sup>+</sup>-Fn entscheidend beteiligt ist. ED-A<sup>+</sup>-Fn ist essenziell für die Aktivierung und Transformation pulmonaler Fibroblasten zu MyoFb via TGF- $\beta$  und wird in räumlicher Assoziation zu Bereichen mit aktiver Fibrogenese im Lungengewebe deponiert (Kuhn und McDonald 1991, Muro et al. 2008). Dieselben Beobachtungen konnten auch auf die Allergen-induzierte Atemwegsfibrose übertragen werden (Kohan et al. 2011). Ob ED-A<sup>+</sup>-Fn hierbei lediglich im Gewebe abgelagert wird oder auch eine Liberation in die Zirkulation stattfindet, ist derzeit nicht bekannt. Dennoch kann in Bezug auf die von uns durchgeführten Messungen in PH-Klasse III eine Mitbeeinflussung der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration durch die zugrundeliegenden pulmonalen Pathologien nicht sicher ausgeschlossen werden. Ebenfalls muss erwähnt werden, dass es Hinweise darauf gibt, dass ED-A<sup>+</sup>-Fn auch unabhängig von pathologischen *Remodelling*-Prozessen in der Lunge exprimiert wird, da die mRNA von ED-A<sup>+</sup>-Fn konstitutiv sowohl in fetalem, gesunden adultem als auch neoplastisch verändertem Lungengewebe nachgewiesen werden konnte (Oyama et al. 1990).

#### 5.2.3.3 Chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie (IV)

Die PH-Klasse IV repräsentiert die Formen der PH, welche das Ergebnis rezidivierender pulmonaler thrombembolischer Ereignisse sind (Rose-Jones und McLaughlin 2015). Es ist die einzige PH-Klasse, die mittels pulmonaler Endarteriektomie (PEA) und damit ohne Lungentransplantation heilbar ist (Ryan et al. 2011). In Bezug auf die CTEPH wäre daher die Etablierung von *Therapy-Surveillance*-Markern interessant, welche die mögliche Reversibilität pulmonaler Gefäßwandveränderungen als Ansprechen auf die Therapien repräsentieren.

Die Pathogenese der PH-Klasse IV unterscheidet sich grundlegend von der anderer Subtypen der PH. Es handelt sich im Wesentlichen um eine persistierende Obstruktion der (proximalen)

Lungenstrombahn nach wiederholter Einschwemmung von Thromben. Definitionsgemäß können die betroffenen pulmonalen Gefäße trotz einer über mindestens drei Monate suffizient durchgeführten Antikoagulation nicht ausreichend rekanalisiert werden (Hoepfer et al. 2014, Olsson et al. 2014). Lösen sich die Emboli weder durch endogene Fibrinolyse noch durch medikamentöse Antikoagulantien auf, werden sie zu fibrösem Narbengewebe umstrukturiert. Diese intravasalen Narbenformationen führen zur Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstands und in der Folge zu mikrovaskulären Läsionen und vaskulärem *Remodelling* in den nicht-okkludierten Teilen der Lungenstrombahn (Delcroix et al. 2013, Lang et al. 2013). Primär liegt also keine Pathologie der pulmonalen Gefäße vor, sondern die Gefäße werden durch rezidivierende Thrombembolien von intraluminal geschädigt. Sowohl der pathologische Umbau der Gefäßwand als auch die begleitende Immunreaktion sind erst Spätfolgen der Erkrankung und nicht so stark ausgeprägt wie in den PH-Klassen I bis III. Da ED-A<sup>+</sup>-Fn möglicherweise vor allem die inflammatorische Komponente der Erkrankung widerspiegelt, könnte dies ein möglicher Erklärungsansatz für die nicht erhöhte ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration der CTEPH-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen in unseren Messungen sein.

Ein weiterer interessanter Aspekt in Bezug auf die PH-Klasse IV ist, dass es Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gibt, welche ED-A<sup>+</sup>-Fn eine prothrombotische Aktivität zuschreiben. Die ED-A<sup>+</sup>-Fn-Isoform fehlt physiologischerweise im Plasma, ist jedoch in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten vorhanden und bei zahlreichen Krankheitszuständen zirkulatorisch nachweisbar, die mit einem erhöhten Thromboserisiko assoziiert sind (White und Muro 2011). Mäuse mit konstitutivem Einschluss der ED-A<sup>+</sup> in das Fn-Molekül entwickelten unter arterieller Scherbelastung schneller okklusive Thromben und waren anfälliger für Lungenembolien als Wildtyp-Mäuse (Chauhan et al. 2008). Zusätzlich scheint ED-A<sup>+</sup>-Fn in die postischämische Thrombo-Inflammation involviert zu sein, was sich beispielweise negativ auf das *Outcome* nach einem Schlaganfall auswirkt (Dhanesha et al. 2019).

Obwohl die molekularen Mechanismen für die prothrombotische Wirkung von ED-A<sup>+</sup>-Fn derzeit nicht ausreichend aufgeklärt sind, gibt es starke Evidenz, dass ED-A<sup>+</sup>-Fn die Zelladhäsion wirksamer fördert als Fn ohne die ED-A<sup>+</sup> (Manabe et al. 1997). Am ehesten führt der Einschluss der ED-A<sup>+</sup> zu einer globalen Konformationsänderung im Fn-Molekül, die eine verstärkte Wechselwirkung zwischen den Integrin-Rezeptoren auf Thrombozyten und Fn vermittelt (White et al. 2008). Da (Mikro-)Thrombosierung auch ein wesentlicher Pathogenesefaktor der übrigen PH-Klassen ist, sind diese Erkenntnisse generell für die Aufklärung der funktionellen Bedeutung von ED-A<sup>+</sup>-Fn im Rahmen der PH relevant. In Bezug auf die CTEPH ist es empfehlenswert, die ED-A<sup>+</sup>-Fn-Konzentration zukünftig an einem größeren Patientenkollektiv zu

bestimmen. Zur Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der Gerinnungskaskade durch ED-A<sup>+</sup>-Fn sollten die Bestimmungen bevorzugt im Plasma durchgeführt werden.

### **5.3 Korrelation von ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin zu klinischen, laborchemischen und echokardiografischen Parametern**

Die folgenden Ausführungen beziehen sich lediglich auf ED-A<sup>+</sup>-Fn. Im Ergebnisteil dieser Arbeit wurden zwar der Vollständigkeit halber immer die Befunde beider *Splicing*-Varianten gezeigt, hinsichtlich ED-B<sup>+</sup>-Fn konnten jedoch keine signifikanten Ergebnisse erhoben werden.

#### **5.3.1 Klinische Korrelationsanalysen**

##### *5.3.1.1 Assoziation der ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin-Serumkonzentration zur funktionellen Klasse*

In Bezug auf die funktionelle Klasse (FC) konnten tendenziell höhere ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentrationen mit steigender Alltagsbeeinträchtigung der Patienten erhoben werden. Die höchsten ED-A<sup>+</sup>-Fn-Spiegel zeigten sich jedoch nicht in FC 4, sondern in FC 2, was potenziell auch auf die niedrige Patientenzahl in FC 4 zurückzuführen sein könnte. In der Literatur sind bisher keine Studien verfügbar, welche die ED-A<sup>+</sup>-Fn-Konzentration im Serum von PH-Patienten untersucht haben. Ähnliche Arbeiten, die den Zusammenhang zwischen der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Expression bzw. -Liberation und dem Stadium verschiedener Erkrankungen beurteilt haben, lieferten kontroverse Ergebnisse. Frühere Arbeiten unserer AG konnten beispielweise einen signifikanten Anstieg der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Expression im Gewebe mit zunehmendem Grad der chronischen Abstoßungsreaktion in Herz-Allotransplantaten der Ratte nachweisen (Franz et al. 2011). Für Patienten mit Herzinsuffizienz unterschiedlicher Ätiologie zeigte sich für die ischämische Kardiomyopathie eine signifikant positive Korrelation der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumspiegel mit steigender NYHA-Klasse; für die dilatative Kardiomyopathie ergab sich hingegen eine inverse Korrelation mit abnehmenden ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentrationen mit steigendem NYHA-Stadium (Ziffels et al. 2016). Auch in Bezug auf die Atherosklerose sind höhere ED-A<sup>+</sup>-Fn-Konzentrationen in den Plaques asymptomatischer Patienten beschrieben (van Keulen et al. 2007). Daneben liegen Studien vor, die gleichbleibende ED-A<sup>+</sup>-Fn-Spiegel in verschiedenen Krankheitsstadien erheben konnten, beispielsweise bei mehreren gastrointestinalen Tumorerkrankungen (Warawdekar et al. 2006).

Diese Vorarbeiten implizieren, dass die ED-A<sup>+</sup>-Fn-Expression differenziert für verschiedene Krankheitsstadien und -ätiologien betrachtet werden sollte. Wenn man aufgrund der konsistenten Datenlage von einer Beteiligung von ED-A<sup>+</sup>-Fn an inflammatorischen und ECM-Remodelling-Prozessen ausgeht, ist eine zunehmende Erhöhung der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Konzentration im

Gewebe bzw. der Zirkulation mit Progress der PH durchaus logisch. Hierfür sprechen auch die zahlreichen positiven *Feedback-Loops*, in denen ED-A<sup>+</sup>-Fn die weitere Synthese von ED-A<sup>+</sup>-Fn stimuliert und die Gewebeentzündung und -fibrose dadurch chronifiziert und perpetuiert (McFadden et al. 2011, Franz et al. 2012). Für zahlreiche andere Biomarker wie Osteopontin (Lorenzen et al. 2011), CRP (Quarck et al. 2009), Bilirubin (Takeda et al. 2010), Endoglin (Malhotra et al. 2013), C-terminales-pro-Endothelin-1 (Silva Marques et al. 2013) oder TIMP-1 (Tiede et al. 2016) ist auch in Bezug auf die PH bereits eine signifikant positive Korrelation mit der FC nachgewiesen. Insgesamt soll jedoch auch darauf verwiesen werden, dass die FC die subjektiv eingeschätzte Beeinträchtigung durch die PH im Alltag repräsentiert (Taichman et al. 2009), welche nicht zwingend mit den histopathologischen Befunden korreliert.

#### 5.3.1.2 Signifikant negative Korrelation der ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin-Serumkonzentration zur 6-Minuten-Gehstrecke

Objektiver als mit der FC kann die Belastungstoleranz von PH-Patienten mit dem 6-Minuten-Gehtest eingeschätzt werden. Dies ist ein submaximaler Belastungstest, welcher aufgrund seiner simplen, kostengünstigen und gut reproduzierbaren Durchführbarkeit sowohl in der klinischen Praxis als auch in wissenschaftlichen Studien zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs und des Therapieansprechens bei PH verwendet wird (Miyamoto et al. 2000, Demir und Küçükoğlu 2015). In unseren Messungen zeigte sich eine signifikant negative Korrelation zwischen der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration und der 6-Minuten-Gehstrecke (6MWD). Da die 6MWD in Bezug auf die PH ein anerkannter Surrogatparameter der Krankheitsschwere ist, kann ED-A<sup>+</sup>-Fn hiermit ebenfalls als adäquater Repräsentant der Alltagsbelastbarkeit betroffener Patienten vorgeschlagen werden. Inverse Zusammenhänge mit der 6MWD konnten auch bereits für die Inflammationsmarker CRP (Quarck et al. 2009) und Osteopontin (Lorenzen et al. 2011), den Herzinsuffizienzmarker BNP (Malhotra et al. 2013) und das ECM-Protein Tenascin-C (Rohm et al. 2017) bestätigt werden. Darüber hinaus wurden für etablierte klinische und hämodynamische Parameter wichtige Zusammenhänge mit der 6MWD nachgewiesen. Miyamoto et al. zeigten beispielsweise, dass die 6MWD mit steigender FC proportional abnimmt und signifikant positiv mit dem HZV und der maximalen Sauerstoffaufnahme sowie signifikant negativ mit dem rechtsatrialen Druck korreliert (Miyamoto et al. 2000). Ergänzend berichteten Savarese et al. in einer umfangreichen Metaanalyse über eine inverse Beziehung zwischen Veränderungen der 6MWD und dem Lungengefäßwiderstand (Savarese et al. 2012). Bezüglich der prognostischen Aussagekraft der 6MWD liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. Obwohl einige Studien die Bedeutung der 6MWD für das *Outcome* von PH-Patienten infrage stellen (Macchia et al. 2007, Gabler et al. 2012, Savarese et al. 2012), weist der überwiegende Anteil verfügbarer

Daten auf eine prognostische Relevanz des Ausgangswerts bzw. von Veränderungen der 6MWD im Krankheitsverlauf oder nach Einleitung spezifischer Therapien hin (Galiè et al. 2009, McGoon et al. 2013, Farber et al. 2015, Huang et al. 2015, Zelniker et al. 2018). Die von uns durchgeführte logistische Regressionsanalyse konnte auch ED-A<sup>+</sup>-Fn als unabhängigen Prädiktor für das Vorliegen einer PH identifizieren. Inwiefern ED-A<sup>+</sup>-Fn zukünftig zur Risikostratifizierung von PH-Patienten genutzt werden kann, muss noch spezifiziert werden.

### 5.3.2 Laborchemische Korrelationsanalysen

#### 5.3.2.1 Signifikant positive Korrelation der ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin- zur BNP-Serumkonzentration

BNP bzw. NT-proBNP sind aktuell die einzigen Biomarker, die in der klinischen Praxis zur Diagnostik und Verlaufsbeurteilung der PH genutzt werden (Galiè et al. 2016). BNP bzw. NT-proBNP liefern wichtige prognostische Informationen für die initiale Diagnosestellung und Risikobewertung (Leuchte et al. 2006, Warwick et al. 2008, Fritz et al. 2013), die Krankheitsentwicklung (Nagaya et al. 2000, Leuchte et al. 2007, Mauritz et al. 2011, Benza et al. 2015) und das Therapieansprechen von PH-Patienten (Nagaya et al. 2002, Park et al. 2004, Galiè et al. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals eine signifikant positive Korrelation der Serumspiegel von ED-A<sup>+</sup>-Fn und BNP bei PH-Patienten nachgewiesen werden.

Interessanterweise postulieren mehrere Studien eine wechselseitige funktionelle Beeinflussung von BNP und Fn. Ogawa et al. legen nahe, dass Fn über Integrin-vermittelte Signalwege die BNP-Gentranskription und -Sekretion aus ventrikulären Myozyten stimuliert (Ogawa et al. 2000). Weiterführend ist erwiesen, dass Fn die BNP-induzierte cGMP-Produktion in humanen CF erhöht, was eine Vasorelaxation und eine Hemmung der VSMC-Proliferation nach sich zieht (Huntley et al. 2006, Chen et al. 2013). Umgekehrt inhibiert BNP die TGF- $\beta$ -induzierte Zellproliferation und Fn-Produktion humaner CF und wirkt damit möglicherweise als intrinsischer antifibrotischer Kompensator, um eine Umgestaltung des Herzens unter pathologischen Bedingungen zu verhindern (Kapoun et al. 2004). Die geschilderten Sachverhalte beziehen sich jedoch auf Fn im Allgemeinen und nicht speziell auf ED-A<sup>+</sup>-Fn.

Die von uns erhobene Korrelation der Serumkonzentrationen von BNP und ED-A<sup>+</sup>-Fn ergänzt die zahlreichen Vorarbeiten mit anderen PH-relevanten Biomarkern, in denen beispielsweise Zusammenhänge zwischen BNP und Tenascin-C (Rohm et al. 2017), Osteopontin (Lorenzen et al. 2011) und Bilirubin (Takeda et al. 2010) aufgezeigt wurden. Überdies wird die herausragende Bedeutung von BNP bzw. NT-proBNP als PH-Biomarker durch deren Korrelation mit klinischen Parametern wie der FC und der 6MWD (Mauritz et al. 2011, Malhotra et al. 2013) oder hämodynamischen Kenngrößen wie PAPm, PVR, HZV und rechtsatrialem Druck (Nagaya et al. 2000, Fijalkowska et al. 2006) unterstrichen.

BNP wird infolge übermäßiger Dehnung der Kardiomyozyten aus den Ventrikeln freigesetzt und gilt als Standardherzinsuffizienzmarker. In Bezug auf die PH reflektiert BNP die rechtsventrikuläre Drucküberlastung infolge des erhöhten PAP (Nagaya et al. 1998). Problematisch hierbei ist, dass BNP zwar sehr sensitiv, aber unspezifisch für die PH ist (Galiè et al. 2016) und eine BNP-Erhöhung ein bereits fortgeschrittenes Krankheitsstadium repräsentiert, während leicht symptomatische und frühe Formen nicht sicher detektiert werden können (Malhotra et al. 2013). Hierzu sei erwähnt, dass in unseren Messungen Patienten der PH-Klasse II die höchsten mittleren BNP-Spiegel aufwiesen. Eine Beeinflussung der gemessenen BNP-Serumkonzentration durch zugrundeliegende Linksherzpathologien kann daher nicht ausgeschlossen werden. Diesbezüglich könnte ED-A<sup>+</sup>-Fn BNP überlegen sein, da es durch seine profibrotischen und prothrombotischen Eigenschaften direkt mit der Pathogenese der PH verknüpft und potenziell früher im Krankheitsverlauf nachweisbar ist. Obwohl es starke Evidenz für eine Beteiligung von ED-A<sup>+</sup>-Fn an den rechtsventrikulären und pulmonalvaskulären *Remodelling*-Prozessen im Rahmen der PH gibt, können diese maladaptiven Veränderungen auch bei zahlreichen anderen kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet werden. Zukünftig ist daher aufgrund der Komplexität und Heterogenität der Pathogenese der PH am ehesten ein Multibiomarker-*Panel* empfehlenswert, das eine höhere Spezifität gewährleistet und bestenfalls eine Differenzierung der ätiologischen Klassen erlaubt (McGlinchey und Johnson 2014).

#### 5.3.2.2 Fehlende Korrelation der ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin- zur CRP-Serumkonzentration

Die bereits vorbeschriebene erhöhte Serumkonzentration des Inflammationsmarkers CRP bei PH-Patienten (Quarck et al. 2009, Malhotra et al. 2013) konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In Vorarbeiten konnten aus der CRP-Serumkonzentration sogar Korrelationen zu klinischen und hämodynamischen Parametern und prognostische Informationen zu Morbidität und Mortalität von PAH- oder CTEPH-Patienten abgeleitet werden (Quarck et al. 2009, Foris et al. 2013, Malhotra et al. 2013). Zusätzlich zur anerkannten Rolle als *Bystander* entzündlicher Prozesse konnten Wynants et al. die funktionelle Bedeutung von CRP bei CTEPH konkretisieren. Sie zeigten, 1.) dass CRP lokal von VSMC und Endothelzellen in durch CTEPH-veränderten Lungenarterien produziert wird und, 2.) dass CRP die mitogene Aktivität von VSMC, die Adhäsion entzündlicher Zellen an Endothelzellen und die lokale Produktion vasokonstriktiver und prothrombotischer Mediatoren erhöht (Wynants et al. 2012). In Bezug auf die unterschiedliche Ätiopathogenese der PH konstatierten Mirna et al., dass die Linksherzinsuffizienz den größten Einfluss auf inflammatorische und *Remodelling*-Prozesse zu haben scheint (Mirna et al. 2020). Konkordant dazu wiesen in unseren Messungen Patienten der PH-Klasse II die höchste CRP-Serumkonzentration auf.

Eine Korrelation der ED-A<sup>+</sup>-Fn- zur CRP-Serumkonzentration konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Frühere Studien haben gezeigt, dass CRP mit hoher Affinität an Fn bindet und dies bevorzugt bei niedrigem pH-Wert, wie er im Fall von Entzündungen vorliegt (Salonen et al. 1984). Darüber hinaus verbessert CRP die Adhäsion von Monozyten an Fn und stimuliert die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen (Ullah et al. 2020). Die Gültigkeit dieser Zusammenhänge für ED-A<sup>+</sup>-Fn wurde bislang nicht geprüft. Beide Proteine tragen zwar mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Inflammation im Pathogenese-konzept der PH bei, scheinen aber intra- und interindividuellen Regulationen zu unterliegen. Hierbei sollte auch beachtet werden, dass die von uns durchgeführten Serummessungen lediglich Momentaufnahmen repräsentieren, die Entzündungsreaktion jedoch keinen linearen Prozess im Krankheitsverlauf darstellt. Kurzzeitige *Peaks* der Entzündungsaktivität, die am ehesten durch CRP repräsentiert werden, müssen nicht zwangsweise mit den chronisch-inflammatorischen Veränderungen korrelieren, an denen ED-A<sup>+</sup>-Fn mutmaßlich beteiligt ist. Darüber hinaus ist ungewiss, wie sich die pulmonalen (peri-)vaskulären Entzündungsprozesse in der Zirkulation abbilden (Man et al. 2008). Ebenfalls ist bislang nicht geklärt, ob die inflammatorischen Prozesse Ursache oder Folge der *Remodelling*-Vorgänge bei PH sind (Guignabert und Dorfmueller 2013). Letztendlich sind weder CRP noch ED-A<sup>+</sup>-Fn lungenspezifisch und für beide Marker ist eine Erhöhung ihrer Serumkonzentration bei verschiedenen kardiovaskulären, neoplastischen und entzündlichen Erkrankungen nachgewiesen, welche ebenfalls als *Bias* infrage kommen.

#### 5.3.2.3 Signifikant positive Korrelation der ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin- zur IL-6-Serumkonzentration

Eine Überexpression von Interleukin-6 (IL-6) ist sowohl bei PAH-Patienten (Humbert et al. 1995, Selimovic et al. 2009) als auch in PAH-Tiermodellen (Miyata et al. 1995, Bhargava et al. 1999) nachgewiesen. Hohe IL-6-Serumspiegel sind dabei mit einer ausgeprägteren klinischen Symptomatik (Matura et al. 2015) und einer erhöhten Mortalität (Soon et al. 2010, Heresi et al. 2014) assoziiert. Belastbare Gründe hierfür finden sich in zahlreichen Nachweisen der funktionellen Bedeutung von IL-6 für das pulmonalvaskuläre *Remodelling*. Steiner et al. zeigten, dass Mäuse mit transgener Überexpression von IL-6 bereits unter Normoxie eine spontane PH mit deutlichen vaskulären Veränderungen und perivaskulärer Immunzellinfiltration entwickeln, welche unter hypoxischen Verhältnissen noch deutlich aggraviert wird (Steiner et al. 2009). Umgekehrt zeigten sich IL-6-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen teilweise resistent gegenüber Hypoxie-induzierter PH. Ein IL-6-*Knockout* ging dabei mit einem erniedrigten rechtsventrikulären Druck, einer verminderten rechtsventrikulären Hypertrophie und einer geringeren Rekrutierung entzündlicher Zellen in der Lunge einher (Savale et al. 2009). Hypoxie induziert die vermehrte Freisetzung von IL-6 aus pulmonalarteriellen Endothelzellen und

VSMC, wodurch wiederum über Th17-Zellen und Makrophagen die Aktivierung, Proliferation und Migration von VSMC stimuliert wird (Hashimoto-Kataoka et al. 2015, Maston et al. 2018). Des Weiteren induziert IL-6 die Transdifferenzierung humaner Lungenfibroblasten in MyoFb (Zhong et al. 2005). Als molekulare Basis der genannten Regulationen gilt die Fähigkeit von IL-6, die Proteinexpression des BMPR2 zu unterdrücken, dessen Defizienz als Kernelement des Umbaus der Lungengefäße anerkannt ist (Brock et al. 2009). Prins et al. unterstrichen die Bedeutung von IL-6 speziell für das rechtsventrikuläre *Remodelling*, indem sie eine Korrelation zirkulierender IL-6-Spiegel mit der Schwere der rechtsventrikulären Dysfunktion aufzeigten (Prins et al. 2018). 2018 wurde bereits eine offene Phase II-Studie zur Bewertung der Wirksamkeit des IL-6-Antikörpers Tocilizumab bei PAH-Patienten initiiert, deren Ergebnisse aktuell jedoch noch ausstehen (Hernández-Sánchez et al. 2018).

Unsere Messungen fügen diesen Vorarbeiten die Erkenntnis hinzu, dass bei PH-Patienten eine signifikant positive Korrelation der ED-A<sup>+</sup>-Fn- zur IL-6-Serumkonzentration besteht. Dieser Zusammenhang bekräftigt – in Verbindung mit der dargelegten Bedeutung von IL-6 für die PH – die Notwendigkeit der weiteren Aufklärung der Mechanismen, mit denen ED-A<sup>+</sup>-Fn zum pulmonalvaskulären und rechtsventrikulären *Remodelling* beiträgt. Bislang liegen keine weiteren Studien mit Korrelation der ED-A<sup>+</sup>-Fn- zur IL-6-Serumkonzentration zum Vergleich vor. Für Tenascin-C konnte aber bereits nachgewiesen werden, dass Tenascin-C via TLR-4 die IL-6-Expression in synovialen Fibroblasten und kardialen MyoFb steigert (Midwood et al. 2009, Maqbool et al. 2016). Da ED-A<sup>+</sup>-Fn ebenfalls den TLR-4 aktivieren und damit die Produktion proinflammatorischer Zytokine induzieren kann (Gondokaryono et al. 2007), ist eine ähnliche Funktion auch für ED-A<sup>+</sup>-Fn denkbar. Darüber hinaus gibt es über VSMC und MyoFb zahlreiche Schnittpunkte zwischen IL-6 und ED-A<sup>+</sup>-Fn.

### 5.3.3 Korrelationsanalysen zu echokardiografischen Parametern

#### 5.3.3.1 Signifikant positive Korrelation der ED-A<sup>+</sup>-Fibronectin-Serumkonzentration zum systolischen pulmonalarteriellen Druck

Da die Erhöhung des PAP die Definitionsgrundlage der PH darstellt (Simonneau et al. 2019), ist die nachgewiesene positive Korrelation zwischen der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration und dem systolischen PAP möglicherweise die wichtigste Erkenntnis der vorliegenden Arbeit. Die plausibelste Erklärung für die Kausalität dieser Korrelation liegt in der Nachlaststeigerung für den rechten Ventrikel durch den erhöhten PAP begründet. Durch den resultierenden mechanischen Stress werden maladaptive rechtsventrikuläre *Remodelling*-Prozesse induziert, welche unter anderem die Aktivierung und Proliferation von CF, die Differenzierung von CF zu MyoFb und die übermäßige cECM-Akkumulation beinhalten (Wang et al. 2003). Eine Beteiligung von

ED-A<sup>+</sup>-Fn an den genannten Vorgängen ist umfangreich vorbeschrieben. Darüber hinaus gibt es direkte Beweise, dass eine erhöhte kardiale Druckbelastung eine verstärkte ED-A<sup>+</sup>-Fn-Expression triggert (Samuel et al. 1991). Der Zusammenhang zwischen ED-A<sup>+</sup>-Fn im Serum und einem erhöhten rechtsventrikulären systolischen Druck als Surrogat des systolischen PAP konnte zuvor im Tiermodell der Monocrotalin-induzierten PH nachgewiesen werden (Franz et al. 2016). Im humanen System liefert die vorliegende Arbeit den ersten Beweis der Korrelation zwischen ED-A<sup>+</sup>-Fn und dem systolischen PAP in Bezug auf die PH, doch für andere kardiovaskuläre Pathologien wie beispielsweise die ischämische Kardiomyopathie ist selbiger Zusammenhang bereits belegt (Ziffels et al. 2016).

Die geschilderten Sachverhalte unterstreichen die Eignung von ED-A<sup>+</sup>-Fn als zukünftigen Biomarker der PH. Zwar kann die Erkrankung meist auch mittels TTE kostengünstig und nicht-invasiv diagnostiziert werden (Galiè et al. 2016), jedoch muss bedacht werden, dass die Aussagekraft der TTE von der Erfahrung des Untersuchenden abhängt und der tatsächliche PAP dadurch teilweise über- oder unterschätzt wird (Fisher et al. 2009). Insbesondere die sichere Diagnostik der postkapillären PH, also der PH infolge von Linksherzerkrankungen, erweist sich mit der TTE allein als schwierig, wodurch diese PH-Klasse häufig unterdiagnostiziert wird (Constantinescu et al. 2013, Doutreleau et al. 2016). Die Genauigkeit der TTE ist auch bei Patienten mit fortgeschrittenen Atemwegserkrankungen stark eingeschränkt, was die Diagnostik in PH-Klasse III verkompliziert (Arcasoy et al. 2003). Darüber hinaus stellt die PH ein globales Gesundheitsproblem mit hoher Prävalenz in ressourcenschwachen Gebieten dar (Hoepfer et al. 2016b). In Entwicklungsländern mit schlechteren medizinisch-technischen Rahmenbedingungen und mangelnder flächendeckender Verfügbarkeit der Echokardiografie wäre ein simpler *Point-of-Care-Test* daher eine sinnvolle diagnostische Alternative. Da der systolische PAP neben ED-A<sup>+</sup>-Fn auch mit diversen anderen PH-relevanten Biomarkern korreliert (Dolenc et al. 2014, Rohm et al. 2017, Mirna et al. 2020), soll hier nochmals der Ansatz eines Multibiomarker-*Panels* als Alternativ- oder Zusatzuntersuchung sowohl zum *Screening* und zur ätiologischen Einordnung als auch zur Verlaufsbeurteilung der PH bekräftigt werden.

#### 5.3.3.2 Fehlende Korrelation der ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin-Serumkonzentration zur TAPSE

Die TAPSE misst die longitudinale Verkürzung des rechten Ventrikels durch Exkursion der Trikuspidalringebene zwischen Enddiastole und Endsystole und wird als echokardiografisches Korrelat der rechtsventrikulären Funktion herangezogen. Je kleiner die TAPSE, desto wahrscheinlicher ist eine systolische Dysfunktion mit eingeschränkter Kontraktilität des rechten Herzens (Cordina et al. 2019). Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass die TAPSE bei PH-Patienten stark mit der rechtsventrikulären Ejektionsfraktion (Sato et al. 2013) und mehreren PH-

relevanten Biomarkern (Prins et al. 2018, Mirna et al. 2020) korreliert. Des Weiteren hat die TAPSE hohe prognostische Relevanz für PH-Patienten, wobei eine erniedrigte TAPSE mit einer höheren FC assoziiert ist (Corciova und Arsenescu-Georgescu 2012) und als Mortalitätsprädiktor gilt (Forfia et al. 2006, Mazurek et al. 2017). Ferner kann durch Änderungen der TAPSE das Therapieansprechen von PH-Patienten bewertet werden (Shelburne et al. 2019). Entgegen der vielversprechenden Vorbefunde konnte in unseren Messungen kein Zusammenhang zwischen der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration und der TAPSE erhoben werden. Dies ist mutmaßlich auf die niedrige Probandenzahl zurückführbar. Von insgesamt 120 untersuchten Patienten lag der TAPSE-Wert nur von 53 Personen und davon nur von einer Person der Kontrollgruppe vor, sodass potenziell signifikante Zusammenhänge zwischen den Parametern durch unvollständige Daten in unserer Erhebung verdeckt sein könnten. Zusätzlich soll erwähnt werden, dass der Großteil der verfügbaren Daten zur Eruiierung der TAPSE im Rahmen der PH mit PAH-Patienten erhoben wurde, während in dieser Arbeit ein PH-Kollektiv mit unterschiedlichen Ätiologien betrachtet wurde, von denen lediglich 11% PAH-Patienten waren. Außerdem wurden die TTE und die Serummessung der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Konzentration nicht zeitgleich durchgeführt und repräsentieren nur Momentaufnahmen, während das rechtsventrikuläre *Remodelling* einen dynamischen Krankheitsprozess darstellt. Unterstützend hierfür legen vorherige Studien nahe, dass die rechtsventrikuläre Leistung nicht zwingend durch den Grad der Drucküberlastung determiniert wird (Giusca et al. 2016) und der Zeitpunkt der Verschlechterung der TAPSE im Verhältnis zum Einsetzen des Rechtsherzversagens schlecht definierbar ist (Hardziyenka et al. 2006). Interessanterweise ließ sich in einer ähnlich angelegten Studie auch für Tenascin-C, das wie ED-A<sup>+</sup>-Fn an der krankheitsassoziierten Umgestaltung der cECM beteiligt ist, bei PH-Patienten ebenfalls kein Zusammenhang zur TAPSE erheben (Rohm et al. 2017). Dies deutet darauf hin, dass ED-A<sup>+</sup>-Fn möglicherweise ein selektiver Indikator des pulmonalvaskulären – und nicht des rechtsventrikulären – *Remodellings* ist und direkt aus den pathologisch veränderten pulmonalen Gefäßen liberiert wird.

#### 5.3.3.3 *Fehlende Korrelation der ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin-Serumkonzentration zur rechtsatrialen Fläche*

Ein weiterer Indikator der Schwere der Rechtsherzinsuffizienz bei PH-Patienten ist die echokardiografisch ermittelte rechtsatriale Fläche (RAA) (Raymond et al. 2002, Lang et al. 2005), wobei ein Wert über 18 cm<sup>2</sup> als pathologisch gilt (Rudski et al. 2010). Bezüglich der PH konnten im Vorfeld signifikante Korrelationen der RAA zu klinischen Parametern wie der 6MWD (Zafir et al. 2007), verschiedenen Biomarkern (Rohm et al. 2017, Mirna et al. 2020) als auch der TAPSE (Forfia et al. 2006) nachgewiesen werden. Außerdem gilt die Vergrößerung der

RAA zum Diagnosezeitpunkt und im Verlauf der Erkrankung als Prädiktor für ein negatives *Outcome* bei PH-Patienten (Bustamante-Labarta et al. 2002, Raymond et al. 2002, Austin et al. 2015). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wiesen die PH-Patienten ebenfalls eine signifikant größere RAA im Vergleich zum Kontrollkollektiv auf. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen der RAA und der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration nachgewiesen werden.

Eine krankheitsassoziierte Reexpression von ED-A<sup>+</sup>-Fn im rechten Vorhof mit räumlicher Assoziation zu Bereichen mit interstitieller Fibrose konnte zuvor von unserer AG für Patienten mit KHK oder Aortenklappenstenose nachgewiesen werden (Franz et al. 2010, Baldinger et al. 2011). Vermutlich wird das im rechten Vorhof exprimierte ED-A<sup>+</sup>-Fn nicht in die Zirkulation freigesetzt oder unterliegt krankheitsspezifischen Regulationen. Des Weiteren muss bedacht werden, dass die RAA signifikant von Alter, Geschlecht, Körperoberfläche und Trainingszustand abhängt (Grünig et al. 2013). In unseren Messungen wurden jedoch die Ist-Werte der RAA zur ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration korreliert ohne Berücksichtigung dieser potenziell beeinflussenden Faktoren. Weitere mögliche Ursachen der nicht nachweisbaren Korrelation wie beispielsweise die niedrige Probandenanzahl, die nicht zeitgleiche Durchführung der TTE und des ELISAs oder die selektive Bedeutung von ED-A<sup>+</sup>-Fn als Biomarker des pulmonalvaskulären *Remodellings* wurden bereits unter 5.3.3.2 detailliert erläutert, sodass diese an dieser Stelle nicht erneut angeführt werden.

## **5.4 Limitationen der Konzentrationsbestimmungen von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fibronectin im Rahmen dieser Arbeit**

Um eine hohe Sensitivität und Spezifität der generierten Messergebnisse zu erzielen und deren bestmögliche Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden verschiedene Maßnahmen ergriffen, die in den vorangegangenen Abschnitten umfangreich ausgeführt wurden. Dennoch unterlag die Bestimmung der Serumkonzentrationen von ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn im Rahmen dieser Arbeit einigen Limitationen, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen und auf die daher im Folgenden detaillierter eingegangen werden soll.

### **5.4.1 Limitationen des Patientenkollektivs**

Zuerst ist erwähnenswert, dass die statistischen Tests die Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe, aber vor allem zwischen den einzelnen ätiologischen PH-Klassen aufgrund der geringen Probandenanzahl mutmaßlich unterschätzen. Dies wird zusätzlich aggraviert, indem einzelne verglichene Parameter nur von einem Teil des Studienkollektivs vorlagen. Des Weiteren ist eine gewisse Heterogenität in Bezug auf die klinischen Charakteristika von Kontrollen und PH-Patienten auffällig. Obwohl die Kontrollgruppe nicht aus gesunden Probanden, sondern

ebenfalls aus älteren, kardial vorerkrankten Menschen bestand, präsentierten sich die PH-Patienten tendenziell mit einem höherem kardiovaskulären Risikoprofil. Dies drückt sich nicht nur in einer verminderten Leistungsfähigkeit im Sinne einer erhöhten FC, sondern auch in einer Mehrbelastung durch relevante Komorbiditäten aus. Eine Beteiligung von ED-A<sup>+</sup>- und / oder ED-B<sup>+</sup>-Fn an zahlreichen systemischen Erkrankungen wie Atherosklerose (Matter et al. 2004, Babaev et al. 2008, Santovito und Weber 2015), arterieller Hypertonie (Takasaki et al. 1992, Farhadian et al. 1995, Sabri et al. 1995), Diabetes mellitus (Roy et al. 1996, Kanters et al. 2001, White et al. 2008) oder rheumatoider Arthritis (Berndt et al. 1998, Voskuyl et al. 1998, Mehta et al. 2018) ist in der Literatur umfangreich vorbeschrieben. Überdies ist das Alter aufgrund der großen Altersspanne innerhalb der Studienpopulation (21 bis 92 Jahre) und der signifikant jüngeren Kontrollgruppe als möglicher *Confounder* zu berücksichtigen. Es ist bekannt, dass es mit steigendem Lebensalter zu einem exponentiellen Anstieg von pFn kommt. Diese altersabhängige Überproduktion wird als mögliche Kompensation der abnehmenden Qualität der Zelladhäsionseigenschaften des von seneszenten Fibroblasten sezernierten Fn diskutiert (Labat-Robert et al. 1981). Darüber hinaus scheint auch das alternative *Splicing* des Fn-Gens mit dem Alter und einigen altersassoziierten Pathologien zu variieren (Labat-Robert und Chevalier 1991). Bei der Quantifizierung der ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration im Rahmen dieser Arbeit wurde die altersabhängige Dynamik der genannten *Splicing*-Formen nicht berücksichtigt. Folglich wird für zukünftige Studien mit einer größeren Probandenanzahl ein *Matching* der Patientengruppen anhand ihres Alters und ihrer Vorerkrankungen vorgeschlagen, um die angeführten Fehlerquellen zu vermeiden.

## 5.4.2 Messtechnische und untersuchungsmethodische Limitationen

### 5.4.2.1 Unspezifische Bindungen und Kreuzreaktivität

Standardmäßig binden im ersten Schritt eines ELISAs Antigen oder Antikörper durch passive Adsorption an eine Mikrotiterplatte (Stevens et al. 1995); stattdessen wurden die Platten in den hier genutzten Protokollen zur Quantifizierung von ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn mit Gelatine beschichtet. Da die Kollagenbindedomäne in sämtlichen Fn-Isoformen exprimiert wird (Selmer et al. 1984) und die beschriebenen ELISAs somit mit einer unspezifischen Bindung beginnen, muss die Sensitivität der Methode trotz darauffolgender Nutzung ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-spezifischer Primärantikörper kritisch diskutiert werden. Durch Konkurrenz um die vorhandenen Bindungsstellen führt eine starke Ungleichverteilung der Fn-Isoformen in der zu quantifizierenden Probe zur kompetitiven Hemmung durch die im Überschuss vorhandene Isoform, wodurch ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn-Moleküle in den betreffenden Serumproben nicht ausreichend binden und detektiert werden könnten. Ebenfalls denkbar ist eine Bindung anderer Serumbestandteile mit

Affinität zu Kollagenen an Gelatine als *Capturing*-Substanz, wodurch weniger Bindungsstellen für die betreffenden Fn-Spleißvarianten zur Verfügung stehen würden. Ein Teil der Kollagen-Bindungspartner wie Thrombozyten oder Gerinnungsfaktoren ist zwar durch die Verwendung von Serum statt Plasma eliminiert, jedoch ist beispielsweise auch die Bindung von Serumalbumin an Kollagen beschrieben (Meltzer und Silberberg 1988).

Insbesondere beim indirekten ELISA muss auch die Möglichkeit unspezifischer Bindungen und Kreuzreaktivitäten aufgrund der größeren Anzahl notwendiger Versuchskomponenten bedacht werden (Konstantinou 2017). Zur Bewertung der Spezifität des neu etablierten ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISAs wurden drei modifizierte Protokolle durchgeführt, bei denen jeweils ein Reagenz des vollständigen ELISAs entfernt wurde. Unter Anwendung der modifizierten Protokolle konnte zwar nur bei vollständigem Versuchsaufbau ein starkes Farbsignal generiert werden, doch auch bei Verzicht auf den Primär- bzw. Sekundärantikörper war eine zwar deutlich schwächere, aber dennoch vorhandene Extinktion eruiert. Hierdurch ist von einer geringfügigen unspezifischen Interaktion der einzelnen Reagenzien auszugehen, welche die anhand der optischen Dichte gemessene Serumkonzentration von ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn tendenziell überschätzen oder sogar zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnte. Ein gegenläufiger Effekt könnte durch den Sekundärantikörper zustande kommen. Durch die Notwendigkeit eines Sekundärantikörpers lässt sich im indirekten ELISA zwar eine Signalamplifikation erreichen, jedoch wird auch ein höheres Hintergrundsignal erzeugt und möglicherweise das gesamte Nettosignal verringert (Lin 2015b).

#### 5.4.2.2 Adhäsivität von Fibronektin und Instabilität seiner Spleißvarianten

Eine weitere mögliche Fehlerquelle ergibt sich durch die Adhäsivität von Fn selbst. Zwar bindet die Kollagenbindedomäne weitaus stärker an denaturiertes Kollagen (Gelatine) als an natives Kollagen (Engvall und Ruoslahti 1977), doch durch die Vielzahl von Domänen für die Interaktion mit zellulären und azellulären Komponenten könnte sich Fn potenziell auch unspezifisch mit den zur Probenverdünnung genutzten *Tubes*, (nicht beschichteten Bereichen) der Mikrotiterplatte oder den im ELISA verwendeten Antikörpern vernetzen. Detaillierte Untersuchungen der Kollagenbindedomäne mittels *Radioimmunoassay* haben ergeben, dass Fn nicht nur an weitere ECM-Proteine, sondern auch an Serumproteine wie Albumin bindet (Engvall et al. 1978). Folglich würde einerseits eine Bindung an Albumin die Detektion von ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn im gelatinebasierten ELISA verhindern und andererseits muss eine systematische Beeinflussung der Messergebnisse durch schwankende Serumalbuminspiegel bedacht werden. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Adsorption von Fn an Polystyroloberflächen durch deren Hydrophobie und Hydrophilie beeinflusst wird und eine Konkurrenz mit anderen Serumproteinen um

die Bindung an jenen Oberflächen auftritt (Klebe et al. 1981, Grinnell und Feld 1982). Wenn Fn mit Serumproteinen wie  $\alpha_1$ -Antitrypsin,  $\alpha_2$ -Makroglobulin oder Albumin um die Adsorption an Polystyroloberflächen konkurriert, wird die Adsorption beider Proteine verringert (Curtis und Forrester 1984). In Bezug auf die vorliegende Arbeit wurden präventiv zur Lagerung und Vorbereitung der Reagenzien ausschließlich spezielle *low binding tubes* benutzt, welche durch eine hydrophile Polymerbeschichtung die Probenbindung an die *Tube*-Oberfläche erheblich minimieren. Die Interaktion von Fn mit humanen Serumkomponenten und anderen Kunststoffoberflächen während der Durchführung der ELISAs kann dadurch jedoch nicht suffizient verhindert werden.

Ein weiterer diskutabler Aspekt ist die Instabilität der untersuchten Fn-Spleißvarianten. Eine zusätzliche Typ III-Homologieeinheit oder alternativ gespleißte Sequenz kann im Fn-Molekül signifikante Auswirkungen auf die Substratbindungseigenschaften und die Zelladhäsion vermitteln (Lewandowska et al. 1988). Weiterführende Arbeiten hierzu konnten zeigen, dass sowohl die Inklusion der ED-A<sup>+</sup> als auch der ED-B<sup>+</sup> die Zelladhäsion von Fn zusätzlich verstärken (Xia und Culp 1995, Chen und Culp 1996). Darüber hinaus fanden Zardi et al. heraus, dass der Einschluss der ED-B<sup>+</sup> das Fn-Molekül anfälliger für proteolytischen Verdau macht (Zardi et al. 1987). Zusätzlich muss die permanente Degradation von Fn durch seine autokatalytische Eigenschaft und Matrix-Metalloproteinasen bedacht werden (Steffensen et al. 2011). Es gibt sogar Evidenz, dass ED-A<sup>+</sup>-Fn infolge pathologischer *Remodelling*-Prozesse bereits *in vivo* in einer fragmentierten Form in den Blutkreislauf sezerniert wird (Warawdekar et al. 2006). All diese Faktoren erschweren die sichere und reproduzierbare Quantifizierung von ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn mittels ELISA.

#### 5.4.2.3 Art, Alter und Asservierung der Proben und Reagenzien

Für die Quantifizierung via ELISA scheint es entscheidend, ob die Fn-Spleißvarianten in Serum oder Plasma detektiert werden. Für die hier dargelegten Untersuchungen standen lediglich Serumproben zur Verfügung; mehrere Publikationen belegen jedoch eine höhere ED-A<sup>+</sup>-Fn-Konzentration im Plasma als im Serum (Boccardo et al. 1986, Ylätupa et al. 1993). Dies ist wahrscheinlich auf die Bindung von Fn an Fibrin im Rahmen der Blutgerinnung zurückzuführen (Engvall et al. 1978, Ylätupa et al. 1993), welches bei der Gewinnung von Serum entfernt wird. Des Weiteren wird Fn sehr leicht durch Proteasen abgebaut, wenn es nicht – wie im Plasma – durch Proteaseinhibitoren geschützt wird (Selmer et al. 1984).

Für eine exakte Datenerhebung sind ebenfalls Alter und Asservierung der Proben entscheidend. Bereits Selmer et al. publizierten erhebliche Unterschiede in der messbaren pFn-Konzentration in Abhängigkeit von der Probenlagerung, wobei in deren Gelatine-ELISA nach fünf Tagen nur

noch weniger als 1% des ursprünglichen Fn-Gehalts detektiert werden konnte (Selmer et al. 1984). Studien zur Lagerung von gefrorenen Plasma- und Serumproben zeigten zudem, dass die ED-A<sup>+</sup>-Fn-Konzentration bei Lagerung bei -20°C deutlich schneller abnahm als bei -70°C (Ylätupa et al. 1993). Diese Abnahme scheint neben der Temperatur auch abhängig von der Dauer des Einfrierens. Hierzu liegen einerseits Daten vor, die ein konstantes Absinken des Fn-Gehalts im zeitlichen Verlauf darlegen (Ylätupa et al. 1993), und andererseits Studien, die einen unvorhersehbaren und variablen Verlust mit der Zeit annehmen (Boccardo et al. 1986).

Aufgrund des retrospektiven Studiendesigns war in der hier vorliegenden Arbeit keine Einflussnahme auf die initiale Probengewinnung und -lagerung möglich. Da der Zeitraum der Patientenrekrutierung mehrere Jahre umfasste, variierte entsprechend auch die Lagerungszeit der verwendeten Serumproben. Des Weiteren wurden durch die mehrfache Durchführung beider Fn-ELISA-Protokolle zur Methodvalidierung sowohl die Patientenproben als auch das für die Standardreihe genutzte ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn unterschiedlich oft aufgetaut und wieder eingefroren. Die Serumproben und die Fn-Standards wurden stets im Kühlschrank langsam aufgetaut, im aufgetauten Zustand auf Eis gelagert und unmittelbar nach deren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die für die ELISAs verwendeten Fn-Standards sowie die Primär- und Sekundärantikörper wurden direkt nach Erhalt aliquotiert, um wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen zu vermindern und das Risiko von Kontaminationen beim Pipettieren zu minimieren. Dennoch ließ sich in vergleichenden Messungen (erstmalig aufgetauter Fn-Standard und Antikörper *versus* zwei- bzw. dreifach aufgetauter Fn-Standard und Antikörper) feststellen, dass die Extinktionswerte der Standardreihe und der Serumproben mit der Anzahl der Auftauzyklen progredient abnahmen. Dies bestätigt die Beobachtung von Boccardo und Mitarbeitern, dass wiederholtes Einfrieren und Auftauen aufgrund der Präzipitation während des Auftauens zu einer signifikanten Reduktion des ED-A<sup>+</sup>-Fn-Gehalts in gefrorenen Plasmaproben führt (Boccardo et al. 1986).

Vor diesem Hintergrund scheint es inadäquat, die Konzentration von ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn in frischen Proben mit länger gelagerten Proben zu vergleichen. Die geschilderten Zusammenhänge implizieren, dass nach mehrjähriger Asservierung Messwerte generiert werden, die nicht zuverlässig die tatsächliche *In-vivo*-Konzentration wiedergeben. Eine Quantifizierung der ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn-Konzentration zu diagnostischen Zwecken sollte daher zukünftig direkt nach der Probengewinnung und im Rahmen prospektiver Studiendesigns realisiert werden. Insbesondere da beide ELISAs innerhalb der eigenen AG entwickelt wurden und es sich beim ED-B<sup>+</sup>-Fn-ELISA um ein neu etabliertes Protokoll handelt, sollte deren Intra- und Inter-*Assay*-Präzision an weiteren Kollektiven mit einheitlich asservierten Proben validiert werden.

## 5.5 ED-A<sup>+</sup>-Fibronektin als potenzieller Biomarker und Zielstruktur für antikörperbasierte Therapiekonzepte

Perspektivisch ist die Etablierung valider *Screening*-Marker zur schnellen und sicheren Initialdiagnostik der PH wünschenswert. Umfangreiche Vorarbeiten legen bereits die multifaktorielle Beteiligung von ED-A<sup>+</sup>-Fn an verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen nahe (Tan et al. 2004, Arslan et al. 2011, Booth et al. 2012, Pupek et al. 2018). In Bezug auf die PH konnte die anhand eines murinen PH-Modells unserer AG beschriebene erhöhte ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumliberation (Franz et al. 2016) im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch im humanen System bestätigt werden. Zusätzlich konnte die Serumkonzentration von ED-A<sup>+</sup>-Fn als unabhängiger Prädiktor für das Vorliegen einer PH identifiziert werden, was dessen potenzielle Eignung für die initiale Diagnosestellung und Abschätzung der Individualprognose von PH-Patienten unterstreicht.

Ergänzend zur Erforschung neuer Biomarker ist aufgrund der deutlich eingeschränkten Lebensqualität und der hohen Mortalität eine Verbesserung der therapeutischen Optionen für PH-Patienten erstrebenswert, welche idealerweise über eine Symptomkontrolle hinaus eine Heilung der Erkrankung ermöglichen. Hierzu ist es vonnöten, gezielt in die Entstehungsmechanismen der pathologischen *Remodelling*-Prozesse einzugreifen. Ein praktischer Aspekt hierbei ist, dass ED-A<sup>+</sup>-Fn in starker räumlicher Assoziation zu (neo-)vaskulären Strukturen exprimiert wird (Villa et al. 2008, Franz et al. 2010) und damit leicht zugänglich für intravasal applizierte diagnostische oder therapeutische Agenzien ist. Da die Pathogenese der PH wesentlich durch pulmonalvaskuläre Veränderungen und perivaskuläre Immuneinfiltration geprägt ist (Huber et al. 2015, McLaughlin et al. 2015), könnte durch ED-A<sup>+</sup>-Fn direkt und lokal das pathologisch veränderte Gewebe adressiert werden.

Eine Schlüsselrolle in der Entwicklung solcher *Targeted-Therapy*-Konzepte nehmen *small immunoproteins* (SIP) ein. Hierbei handelt es sich um humane, einkettige Polypeptide, welche rekombinant durch kovalente Verbindung der variablen (antigenbindenden) Regionen eines monoklonalen Antikörpers hergestellt werden. Die hohe Affinität und Spezifität der Antikörper für die zugehörigen Antigene bleibt hierbei in einem wesentlich kleineren Molekül erhalten, welches zudem durch fehlende Komplementaktivierung nicht zytotoxisch wirken kann (Bird et al. 1988). Mit SIP-F8 ist ein ED-A<sup>+</sup>-Fn-spezifischer Antikörper für die molekulare Bildgebung von Gefäßstrukturen verfügbar (Villa et al. 2008). Dieser wurde weitreichend in der Tumorforschung genutzt, wobei SIP-F8 die exakte Differenzierung sowohl zwischen neoplastischen und inflammatorischen Pathologien als auch zwischen benignen und malignen Tumorsubtypen ermöglicht (Rybak et al. 2007b, Schliemann et al. 2009, Berndt et al. 2010). In Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen wurde SIP-F8 beispielsweise zur Visualisierung atherosklerotischer

Plaques (Fiechter et al. 2011) oder der chronischen Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation (Franz et al. 2010) angewendet.

In modernen Diagnostik- und Therapieverfahren kann durch Kopplung der SIP mit bioaktiven *Payloads* wie Arzneimitteln, Zytokinen oder Radionukliden eine höhere Selektivität für bestimmte Gewebe bei verringerter Systemtoxizität erreicht werden (Wu und Senter 2005, Casi und Neri 2012). Immunzytokine sind derartige biopharmazeutische Proteine, welche die Krankheitsspezifität bestimmter Antikörper mit den immunmodulatorischen Eigenschaften von Zytokinen fusionieren und dadurch einen hohen Stellenwert in der Behandlung von kanzerösen, chronisch-inflammatorischen und autoimmunen Erkrankungen erreicht haben (Bootz und Neri 2016). Da ED-A<sup>+</sup>-Fn als großes Glykoprotein mit einer langen Halbwertszeit stabil in der ECM abgelagert wird, ist es ausgezeichnet als Zielstruktur für Immunzytokine geeignet (Franz et al. 2014). Vaskuläres *Targeting* von ED-A<sup>+</sup>-Fn durch Konjugation von F8 mit Interleukinen, Zytostatika oder Photosensibilisatoren konnte an mehreren Tumorentitäten bereits eine präzisere Akkumulation der Wirkstoffe in der tumorösen Mikrovaskulatur und damit eine gesteigerte Therapieeffizienz erreichen (Frey et al. 2010, Perrino et al. 2014, Acker et al. 2016, Ziffels et al. 2019). Derart vielversprechende Ergebnisse sind offenbar auch auf kardiovaskuläre Pathologien übertragbar, denn das Prinzip einer SIP-F8-basierten gezielten Abgabe von antiinflammatorischen und antiproliferativen Zytokinen an die Gefäßwand konnte von unserer AG erfolgreich an einem heterotopen Rattenherztransplantationsmodell demonstriert werden (Franz et al. 2013, Franz et al. 2015b). Da die mit Allotransplantat-Vaskulopathie verbundenen histopathologischen Gefäßveränderungen im Wesentlichen denen bei der PH entsprechen (Suzuki et al. 2010, Franz et al. 2016), sollten ähnliche Experimente zukünftig auch an im Rahmen der PH veränderten Lungengefäßen durchgeführt werden.

In Zusammenschau der zahlreichen Vorarbeiten mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist die Eignung von ED-A<sup>+</sup>-Fn sowohl als Biomarker als auch als potentes *Target* für antikörperbasierte Diagnose- und Therapiestrategien definitiv möglich. Bezüglich der PH muss jedoch das experimentelle Wissen auf diesem Gebiet zunächst erweitert und konkretisiert werden, bevor perspektivisch eine klinische Implementation denkbar ist.

## 6 Schlussfolgerungen

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stand die Analyse der Serumkonzentrationen der fetalen Fn-Varianten ED-A<sup>+</sup>- und ED-B<sup>+</sup>-Fn bei Patienten mit PH. Hierbei wurden sowohl Konzentrationsunterschiede in Abhängigkeit von der Ätiologie der PH als auch mögliche Assoziationen zu bereits zur Diagnostik und Verlaufskontrolle der PH angewandten klinischen, laborchemischen und echokardiografischen Parametern untersucht. Die Bestimmung der Serumkonzentrationen erfolgte mittels ELISA, wobei im Fall von ED-A<sup>+</sup>-Fn auf ein bereits in unserer AG entwickeltes Protokoll zurückgegriffen werden konnte; für die Bestimmung von ED-B<sup>+</sup>-Fn wurde ein neues ELISA-Protokoll etabliert.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- *Durch die Verwendung von C6 als Detektionsantikörper gelang die Etablierung eines bislang nicht verfügbaren, nicht-kompetitiven, indirekten ELISAs zur spezifischen Detektion von ED-B<sup>+</sup>-Fn in humanem Serum. Eine Übertragbarkeit des ELISAs auf das murine System ist aufgrund der Kreuzreaktivität der Antikörper hochwahrscheinlich, muss jedoch noch experimentell verifiziert werden.*
- *Patienten mit PH wiesen eine im Vergleich zu Patienten mit anderweitig kardiovaskulär erhöhtem Risikoprofil eine höhere Serumkonzentration von ED-A<sup>+</sup>-Fn, nicht jedoch von ED-B<sup>+</sup>-Fn auf. Hierdurch wird einerseits deutlich, dass die krankheitsassoziierte Reexpression fetaler Fn-Varianten unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegt und andererseits wird ED-A<sup>+</sup>-Fn als potenzieller Biomarker des pulmonalvasculären und myokardialen Remodellings identifiziert.*
- *Bei separater Analyse der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentrationen in den differenten ätiologischen Subgruppen der PH wiesen lediglich die PH-Klassen I (PAH), II (PH infolge einer Linksherzerkrankung) und III (PH infolge einer Lungenerkrankung) erhöhte ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumspiegel im Vergleich zum Kontrollkollektiv auf, nicht jedoch die PH-Klasse IV (CTEPH). Die Bestimmung von ED-A<sup>+</sup>-Fn im Serum ist somit perspektivisch zur ätiologischen Einteilung der PH geeignet. Im Hinblick auf die unterschiedliche Pathophysiologie der PH-Klassen wird hierdurch die Bedeutung von ED-A<sup>+</sup>-Fn für chronisch-inflammatorische Prozesse, im Speziellen für das pulmonalvasculäre Remodelling, unterstrichen.*

- *Innerhalb des Gesamtkollektivs bestand eine signifikant positive Korrelation der ED-A<sup>+</sup>-Fn-Serumkonzentration zum Herzinsuffizienzmarker BNP, zum Inflammationsmarker Interleukin-6 und zum echokardiografisch ermittelten systolischen pulmonalarteriellen Druck. Des Weiteren ergab sich ein inverser Zusammenhang mit der 6-Minuten-Gehstrecke. Diese Ergebnisse qualifizieren ED-A<sup>+</sup>-Fn als potenziellen Biomarker für die Erstdiagnostik und Verlaufsbeurteilung der PH sowie als valides Surrogat der Alltagskompetenz der Patienten.*
- *ED-A<sup>+</sup>-Fn konnte als unabhängiger Prädiktor für das Vorliegen einer PH identifiziert werden, wodurch erneut dessen Eignung für die initiale Diagnosestellung und Abschätzung der Individualprognose von PH-Patienten nahegelegt werden kann.*
- *ED-A<sup>+</sup>-Fn wird krankheitsspezifisch in starker räumlicher Assoziation zu vaskulären Strukturen im Gewebe reexprimiert und in die Zirkulation liberiert und eignet sich aufgrund dessen hervorragend als Zielstruktur für intravasal applizierte diagnostische oder therapeutische Agenzien. Da mit SIP-F8 bereits ein ED-A<sup>+</sup>-Fn-spezifischer monoklonaler Antikörper zur Verfügung steht, könnte zeitnah mit der Testung von Targeted-Therapy-Konzepten für die PH begonnen werden.*
- *Für weiterführende Studien zur Thematik ist es empfehlenswert, ein größeres Patientenkollektiv zu untersuchen und die Serummessungen der ED-A<sup>+</sup>- bzw. ED-B<sup>+</sup>-Fn-Konzentration parallel oder in kurzem zeitlichen Abstand zur Probenentnahme durchzuführen, um Messfehler durch die Degradation der Proteine zu minimieren.*

## Literatur-und Quellenverzeichnis

- Acker G, Palumbo A, Neri D, Vajkoczy P, Czabanka M. 2016. F8-SIP mediated targeted photodynamic therapy leads to microvascular dysfunction and reduced glioma growth. *J Neurooncol*, 129 (1):33-38.
- Anversa P, Olivetti G, Capasso JM. 1991. Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 68 (14):7d-16d.
- Arai H, Hirano H, Mushiake S, Nakayama M, Takada G, Sekiguchi K. 1997. Loss of EDB+ fibronectin isoform is associated with differentiation of alveolar epithelial cells in human fetal lung. *Am J Pathol*, 151 (2):403-412.
- Arcasoy SM, Christie JD, Ferrari VA, Sutton MS, Zisman DA, Blumenthal NP, Pochettino A, Kotloff RM. 2003. Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension in patients with advanced lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 167 (5):735-740.
- Archer S, Rich S. 2000. Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research "Work in progress". *Circulation*, 102 (22):2781-2791.
- Arnold SA, Loomans HA, Ketova T, Andl CD, Clark PE, Zijlstra A. 2016. Urinary oncofetal ED-A fibronectin correlates with poor prognosis in patients with bladder cancer. *Clin Exp Metastasis*, 33 (1):29-44.
- Arrigo M, Huber LC. 2013. Eponyms in cardiopulmonary reflexes. *Am J Cardiol*, 112 (3):449-453.
- Arslan F, Smeets MB, Riem Vis PW, Karper JC, Quax PH, Bongartz LG, Peters JH, Hoefler IE, Doevendans PA, Pasterkamp G, de Kleijn DP. 2011. Lack of fibronectin-EDA promotes survival and prevents adverse remodeling and heart function deterioration after myocardial infarction. *Circ Res*, 108 (5):582-592.
- Astrof S, Hynes RO. 2009. Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis*, 12 (2):165-175.
- Astrof S, Crowley D, Hynes RO. 2007. Multiple cardiovascular defects caused by the absence of alternatively spliced segments of fibronectin. *Dev Biol*, 311 (1):11-24.
- Austin C, Alassas K, Burger C, Safford R, Pagan R, Duello K, Kumar P, Zeiger T, Shapiro B. 2015. Echocardiographic assessment of estimated right atrial pressure and size predicts mortality in pulmonary arterial hypertension. *Chest*, 147 (1):198-208.
- Babaev VR, Porro F, Linton MF, Fazio S, Baralle FE, Muro AF. 2008. Absence of regulated splicing of fibronectin EDA exon reduces atherosclerosis in mice. *Atherosclerosis*, 197 (2):534-540.
- Badesch DB, Raskob GE, Elliott CG, Krichman AM, Farber HW, Frost AE, Barst RJ, Benza RL, Liou TG, Turner M, Giles S, Feldkircher K, Miller DP, McGoon MD. 2010. Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest*, 137 (2):376-387.
- Baldinger A, Brehm BR, Richter P, Bossert T, Gruen K, Hekmat K, Kosmehl H, Neri D, Figulla HR, Berndt A, Franz M. 2011. Comparative analysis of oncofetal fibronectin and tenascin-C expression in right atrial auricular and left ventricular human cardiac tissue from patients with coronary artery disease and aortic valve stenosis. *Histochem Cell Biol*, 135 (5):427-441.
- Balza E, Borsi L, Allemanni G, Zardi L. 1988. Transforming growth factor beta regulates the levels of different fibronectin isoforms in normal human cultured fibroblasts. *FEBS Lett*, 228 (1):42-44.
- Balza E, Sassi F, Ventura E, Parodi A, Fossati S, Blalock W, Carnemolla B, Castellani P, Zardi L, Borsi L. 2009. A novel human fibronectin cryptic sequence unmasked by the insertion of the angiogenesis-associated extra type III domain B. *Int J Cancer*, 125 (4):751-758.

- Bendz P. 2020. Analyse der Reexpression fetaler Molekülvarianten von Fibronectin und Tenascin-C im Rattenmodell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie: Potentielle Bedeutung als diagnostische Marker und therapeutisches Target [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Benza RL, Miller DP, Foreman AJ, Frost AE, Badesch DB, Benton WW, McGoon MD. 2015. Prognostic implications of serial risk score assessments in patients with pulmonary arterial hypertension: a Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL) analysis. *J Heart Lung Transplant*, 34 (3):356-361.
- Berg JT, Breen EC, Fu Z, Mathieu-Costello O, West JB. 1998. Alveolar hypoxia increases gene expression of extracellular matrix proteins and platelet-derived growth factor-B in lung parenchyma. *Am J Respir Crit Care Med*, 158 (6):1920-1928.
- Berndt A, Borsi L, Luo X, Zardi L, Katenkamp D, Kosmehl H. 1998. Evidence of ED-B+ fibronectin synthesis in human tissues by non-radioactive RNA in situ hybridization. Investigations on carcinoma (oral squamous cell and breast carcinoma), chronic inflammation (rheumatoid synovitis) and fibromatosis (Morbus Dupuytren). *Histochem Cell Biol*, 109 (3):249-255.
- Berndt A, Kollner R, Richter P, Franz M, Voigt A, Berndt A, Borsi L, Giavazzi R, Neri D, Kosmehl H. 2010. A comparative analysis of oncofetal fibronectin and tenascin-C incorporation in tumour vessels using human recombinant SIP format antibodies. *Histochem Cell Biol*, 133 (4):467-475.
- Bhargava A, Kumar A, Yuan N, Gewitz MH, Mathew R. 1999. Monocrotaline induces interleukin-6 mRNA expression in rat lungs. *Heart Dis*, 1 (3):126-132.
- Birchler MT, Milisavljevic D, Pfaltz M, Neri D, Odermatt B, Schmid S, Stoeckli SJ. 2003. Expression of the extra domain B of fibronectin, a marker of angiogenesis, in head and neck tumors. *Laryngoscope*, 113 (7):1231-1237.
- Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M. 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 242 (4877):423-426.
- Boccardo F, Guarneri D, Zanardi S, Castellani P, Borsi L, Zardi L. 1986. Fibronectin concentration in the plasma of patients with malignant and benign breast disease. *Cancer Lett*, 33 (3):317-323.
- Bonderman D, Wexberg P, Martischnig AM, Heinzl H, Lang MB, Sadushi R, Skoro-Sajer N, Lang IM. 2011. A noninvasive algorithm to exclude pre-capillary pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 37 (5):1096-1103.
- Booth AJ, Wood SC, Cornett AM, Dreffs AA, Lu G, Muro AF, White ES, Bishop DK. 2012. Recipient-derived EDA fibronectin promotes cardiac allograft fibrosis. *J Pathol*, 226 (4):609-618.
- Bootz F, Neri D. 2016. Immunocytokines: a novel class of products for the treatment of chronic inflammation and autoimmune conditions. *Drug Discov Today*, 21 (1):180-189.
- Borsi L, Castellani P, Risso AM, Leprini A, Zardi L. 1990. Transforming growth factor-beta regulates the splicing pattern of fibronectin messenger RNA precursor. *FEBS Lett*, 261 (1):175-178.
- Botney MD, Kaiser LR, Cooper JD, Mecham RP, Parghi D, Roby J, Parks WC. 1992. Extracellular matrix protein gene expression in atherosclerotic hypertensive pulmonary arteries. *Am J Pathol*, 140 (2):357-364.
- Bowers SL, Banerjee I, Baudino TA. 2010. The extracellular matrix: at the center of it all. *J Mol Cell Cardiol*, 48 (3):474-482.

- Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. 1994. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol*, 26 (7):809-820.
- Brock M, Trenkmann M, Gay RE, Michel BA, Gay S, Fischler M, Ulrich S, Speich R, Huber LC. 2009. Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circ Res*, 104 (10):1184-1191.
- Bustamante-Labarta M, Perrone S, De La Fuente RL, Stutzbach P, De La Hoz RP, Torino A, Favaloro R. 2002. Right atrial size and tricuspid regurgitation severity predict mortality or transplantation in primary pulmonary hypertension. *J Am Soc Echocardiogr*, 15 (10 Pt 2):1160-1164.
- Cao DJ, Gillette TG, Hill JA. 2009. Cardiomyocyte autophagy: remodeling, repairing, and reconstructing the heart. *Curr Hypertens Rep*, 11 (6):406-411.
- Carmeliet P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438 (7070):932-936.
- Carnemolla B, Borsi L, Zardi L, Owens RJ, Baralle FE. 1987. Localization of the cellular-fibronectin-specific epitope recognized by the monoclonal antibody IST-9 using fusion proteins expressed in *E. coli*. *FEBS Lett*, 215 (2):269-273.
- Carnemolla B, Leprini A, Allemanni G, Saginati M, Zardi L. 1992. The inclusion of the type III repeat ED-B in the fibronectin molecule generates conformational modifications that unmask a cryptic sequence. *J Biol Chem*, 267 (34):24689-24692.
- Carnemolla B, Balza E, Siri A, Zardi L, Nicotra MR, Bigotti A, Natali PG. 1989. A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors. *J Cell Biol*, 108 (3):1139-1148.
- Carnemolla B, Neri D, Castellani P, Leprini A, Neri G, Pini A, Winter G, Zardi L. 1996. Phage antibodies with pan-species recognition of the oncofoetal angiogenesis marker fibronectin ED-B domain. *Int J Cancer*, 68 (3):397-405.
- Carnemolla B, Borsi L, Balza E, Castellani P, Meazza R, Berndt A, Ferrini S, Kosmehl H, Neri D, Zardi L. 2002. Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood*, 99 (5):1659-1665.
- Casi G, Neri D. 2012. Antibody-drug conjugates: basic concepts, examples and future perspectives. *J Control Release*, 161 (2):422-428.
- Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L. 1994. The fibronectin isoform containing the ED-B oncofoetal domain: a marker of angiogenesis. *Int J Cancer*, 59 (5):612-618.
- Castellani P, Borsi L, Carnemolla B, Biro A, Dorcaratto A, Viale GL, Neri D, Zardi L. 2002. Differentiation between high- and low-grade astrocytoma using a human recombinant antibody to the extra domain-B of fibronectin. *Am J Pathol*, 161 (5):1695-1700.
- Chaiet L, Wolf FJ. 1964. The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by streptomycetes. *Arch Biochem Biophys*, 106:1-5.
- Chaouat A, Weitzenblum E, Higenbottam T. 1996. The role of thrombosis in severe pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 9 (2):356-363.
- Chauhan AK, Kisucka J, Cozzi MR, Walsh MT, Moretti FA, Battiston M, Mazzucato M, De Marco L, Baralle FE, Wagner DD, Muro AF. 2008. Prothrombotic effects of fibronectin isoforms containing the EDA domain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28 (2):296-301.
- Chen CN, Watson G, Zhao L. 2013. Cyclic guanosine monophosphate signalling pathway in pulmonary arterial hypertension. *Vascul Pharmacol*, 58 (3):211-218.
- Chen T, You Y, Jiang H, Wang ZZ. 2017. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. *J Cell Physiol*, 232 (12):3261-3272.

- Chen W, Culp LA. 1996. Adhesion mediated by fibronectin's alternatively spliced ED<sub>B</sub> (EIIIB) and its neighboring type III repeats. *Exp Cell Res*, 223 (1):9-19.
- Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. 1992. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 327 (2):70-75.
- Claudepierre P, Allanore Y, Belec L, Larget-Piet B, Zardi L, Chevalier X. 1999. Increased Ed-B fibronectin plasma levels in spondyloarthropathies: comparison with rheumatoid arthritis patients and a healthy population. *Rheumatology (Oxford)*, 38 (11):1099-1103.
- Clausell N, Molossi S, Rabinovitch M. 1993. Increased interleukin-1 beta and fibronectin expression are early features of the development of the postcardiac transplant coronary arteriopathy in piglets. *Am J Pathol*, 142 (6):1772-1786.
- Clausell N, Molossi S, Sett S, Rabinovitch M. 1994. In vivo blockade of tumor necrosis factor-alpha in cholesterol-fed rabbits after cardiac transplant inhibits acute coronary artery neointimal formation. *Circulation*, 89 (6):2768-2779.
- Cogan JD, Pauciulo MW, Batchman AP, Prince MA, Robbins IM, Hedges LK, Stanton KC, Wheeler LA, Phillips JA, 3rd, Loyd JE, Nichols WC. 2006. High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 174 (5):590-598.
- Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. 2000. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 35 (3):569-582.
- Constantinescu T, Magda SL, Niculescu R, Mincu RI, Zaharia D, Toma CL, Cinteza M, Bogdan MA. 2013. New Echocardiographic Tehniques in Pulmonary Arterial Hypertension vs. Right Heart Catheterization - A Pilot Study. *Maedica (Buchar)*, 8 (2):116-123.
- Corciova FC, Arsenescu-Georgescu C. 2012. Prognostic factors in pulmonary hypertension. *Maedica (Buchar)*, 7 (1):30-37.
- Cordina RL, Playford D, Lang I, Celermajer DS. 2019. State-of-the-Art Review: Echocardiography in Pulmonary Hypertension. *Heart Lung Circ*, 28 (9):1351-1364.
- Costa C, Incio J, Soares R. 2007. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis*, 10 (3):149-166.
- Curtis AS, Forrester JV. 1984. The competitive effects of serum proteins on cell adhesion. *J Cell Sci*, 71:17-35.
- de Melker AA, Sonnenberg A. 1999. Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *Bioessays*, 21 (6):499-509.
- Delcroix M, Vonk Noordegraaf A, Fadel E, Lang I, Simonneau G, Naeije R. 2013. Vascular and right ventricular remodelling in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 41 (1):224-232.
- Demir R, Küçükoğlu MS. 2015. Six-minute walk test in pulmonary arterial hypertension. *Anatol J Cardiol*, 15 (3):249-254.
- Dhanesha N, Chorawala MR, Jain M, Bhalla A, Thedens D, Nayak M, Doddapattar P, Chauhan AK. 2019. Fn-EDA (Fibronectin Containing Extra Domain A) in the Plasma, but Not Endothelial Cells, Exacerbates Stroke Outcome by Promoting Thrombo-Inflammation. *Stroke*, 50 (5):1201-1209.
- Dietrich T, Perlitz C, Licha K, Stawowy P, Atrott K, Tachezy M, Meyborg H, Stocker C, Grafe M, Fleck E, Schirner M, Graf K. 2007. ED-B fibronectin (ED-B) can be targeted using a novel single chain antibody conjugate and is associated with macrophage accumulation in atherosclerotic lesions. *Basic Res Cardiol*, 102 (4):298-307.

- Doddapattar P, Gandhi C, Prakash P, Dhanesha N, Grumbach IM, Dailey ME, Lentz SR, Chauhan AK. 2015. Fibronectin Splicing Variants Containing Extra Domain A Promote Atherosclerosis in Mice Through Toll-Like Receptor 4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35 (11):2391-2400.
- Dolenc J, Šebeštjen M, Vrtovec B, Koželj M, Haddad F. 2014. Pulmonary hypertension in patients with advanced heart failure is associated with increased levels of interleukin-6. *Biomarkers*, 19 (5):385-390.
- Dostal D, Glaser S, Baudino TA. 2015. Cardiac fibroblast physiology and pathology. *Compr Physiol*, 5 (2):887-909.
- Doutreleau S, Canuet M, Enache I, Di Marco P, Lonsdorfer E, Oswald-Mammoser M, Charloux A. 2016. Right Heart Hemodynamics in Pulmonary Hypertension - An Echocardiography and Catheterization Study. *Circ J*, 80 (9):2019-2025.
- Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. 2002. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med*, 8 (11):1249-1256.
- Eddahibi S, Humbert M, Sediame S, Chouaid C, Partovian C, Maître B, Teiger E, Rideau D, Simonneau G, Sitbon O, Adnot S. 2000. Imbalance between platelet vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in pulmonary hypertension. Effect of prostacyclin therapy. *Am J Respir Crit Care Med*, 162 (4 Pt 1):1493-1499.
- Ehlken N, Lichtblau M, Klose H, Weidenhammer J, Fischer C, Nechwatal R, Uiker S, Halank M, Olsson K, Seeger W, Gall H, Rosenkranz S, Wilkens H, Mertens D, Seyfarth HJ, Opitz C, Ulrich S, Egenlauf B, Grunig E. 2016. Exercise training improves peak oxygen consumption and haemodynamics in patients with severe pulmonary arterial hypertension and inoperable chronic thrombo-embolic pulmonary hypertension: a prospective, randomized, controlled trial. *Eur Heart J*, 37 (1):35-44.
- Engvall E, Perlmann P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8 (9):871-874.
- Engvall E, Ruoslahti E. 1977. Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int J Cancer*, 20 (1):1-5.
- Engvall E, Ruoslahti E, Miller EJ. 1978. Affinity of fibronectin to collagens of different genetic types and to fibrinogen. *J Exp Med*, 147 (6):1584-1595.
- European Medicines Agency. 2018. Guideline good clinical practice.
- Fang JC, DeMarco T, Givertz MM, Borlaug BA, Lewis GD, Rame JE, Gomberg-Maitland M, Murali S, Frantz RP, McGlothlin D, Horn EM, Benza RL. 2012. World Health Organization Pulmonary Hypertension group 2: pulmonary hypertension due to left heart disease in the adult--a summary statement from the Pulmonary Hypertension Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 31 (9):913-933.
- Farber HW, Loscalzo J. 2004. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 351 (16):1655-1665.
- Farber HW, Miller DP, McGoon MD, Frost AE, Benton WW, Benza RL. 2015. Predicting outcomes in pulmonary arterial hypertension based on the 6-minute walk distance. *J Heart Lung Transplant*, 34 (3):362-368.
- Farhadian F, Contard F, Corbier A, Barrieux A, Rappaport L, Samuel JL. 1995. Fibronectin expression during physiological and pathological cardiac growth. *J Mol Cell Cardiol*, 27 (4):981-990.
- Ffrench-Constant C. 1995. Alternative splicing of fibronectin-Many different proteins but few different functions. *Exp Cell Res*, 221 (2):261-271.
- Ffrench-Constant C, Hynes RO. 1989. Alternative splicing of fibronectin is temporally and spatially regulated in the chicken embryo. *Development*, 106 (2):375-388.

- Ffrench-Constant C, Van de Water L, Dvorak HF, Hynes RO. 1989. Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J Cell Biol*, 109 (2):903-914.
- Fiechter M, Frey K, Fugmann T, Kaufmann PA, Neri D. 2011. Comparative in vivo analysis of the atherosclerotic plaque targeting properties of eight human monoclonal antibodies. *Atherosclerosis*, 214 (2):325-330.
- Fijalkowska A, Kurzyna M, Torbicki A, Szewczyk G, Florczyk M, Pruszczyk P, Szturmowicz M. 2006. Serum N-terminal brain natriuretic peptide as a prognostic parameter in patients with pulmonary hypertension. *Chest*, 129 (5):1313-1321.
- Fisher MR, Forfia PR, Chamera E, Houston-Harris T, Champion HC, Girgis RE, Corretti MC, Hassoun PM. 2009. Accuracy of Doppler echocardiography in the hemodynamic assessment of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 179 (7):615-621.
- Forfia PR, Fisher MR, Mathai SC, Houston-Harris T, Hennes AR, Borlaug BA, Chamera E, Corretti MC, Champion HC, Abraham TP, Girgis RE, Hassoun PM. 2006. Tricuspid annular displacement predicts survival in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 174 (9):1034-1041.
- Foris V, Kovacs G, Tscherner M, Olschewski A, Olschewski H. 2013. Biomarkers in pulmonary hypertension: what do we know? *Chest*, 144 (1):274-283.
- Frangogiannis NG. 2012. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol Rev*, 92 (2):635-688.
- Frangogiannis NG. 2017. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest*, 127 (5):1600-1612.
- Franz M, Neri D, Berndt A. 2012. Chronic cardiac allograft rejection: critical role of ED-A(+) fibronectin and implications for targeted therapy strategies. *J Pathol*, 226 (4):557-561.
- Franz M, Jung C, Lauten A, Figulla HR, Berndt A. 2015a. Tenascin-C in cardiovascular remodeling: potential impact for diagnosis, prognosis estimation and targeted therapy. *Cell Adh Migr*, 9 (1-2):90-95.
- Franz M, Berndt A, Grun K, Richter P, Kosmehl H, Neri D, Gummert J, Figulla HR, Brehm BR, Renner A. 2011. Expression of extra domain A containing fibronectin in chronic cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*, 30 (1):86-94.
- Franz M, Brehm BR, Richter P, Gruen K, Neri D, Kosmehl H, Hekmat K, Renner A, Gummert J, Figulla HR, Berndt A. 2010. Changes in extra cellular matrix remodelling and re-expression of fibronectin and tenascin-C splicing variants in human myocardial tissue of the right atrial auricle: implications for a targeted therapy of cardiovascular diseases using human SIP format antibodies. *J Mol Histol*, 41 (1):39-50.
- Franz M, Grun K, Betge S, Rohm I, Ndongson-Dongmo B, Bauer R, Schulze PC, Lichtenauer M, Petersen I, Neri D, Berndt A, Jung C. 2016. Lung tissue remodelling in MCT-induced pulmonary hypertension: a proposal for a novel scoring system and changes in extracellular matrix and fibrosis associated gene expression. *Oncotarget*, 7 (49):81241-81254.
- Franz M, Hilger I, Grun K, Kossatz S, Richter P, Petersen I, Jung C, Gummert J, Figulla HR, Kosmehl H, Neri D, Berndt A, Renner A. 2013. Selective imaging of chronic cardiac rejection using a human antibody specific to the alternatively spliced EDA domain of fibronectin. *J Heart Lung Transplant*, 32 (6):641-650.
- Franz M, Doll F, Grun K, Richter P, Kose N, Ziffels B, Schubert H, Figulla HR, Jung C, Gummert J, Renner A, Neri D, Berndt A. 2015b. Targeted delivery of interleukin-10 to chronic cardiac allograft rejection using a human antibody specific to the extra domain A of fibronectin. *Int J Cardiol*, 195:311-322.
- Franz M, Matusiak-Bruckner M, Richter P, Grun K, Ziffels B, Neri D, Maschek H, Schulz U, Pfeil A, Jung C, Figulla HR, Gummert J, Berndt A, Renner A. 2014. De novo expression of fetal ED-A(+) fibronectin and B (+) tenascin-C splicing variants in

- human cardiac allografts: potential impact for targeted therapy of rejection. *J Mol Histol*, 45 (5):519-532.
- Frey K, Schliemann C, Schwager K, Giavazzi R, Johannsen M, Neri D. 2010. The immunocytokine F8-IL2 improves the therapeutic performance of sunitinib in a mouse model of renal cell carcinoma. *J Urol*, 184 (6):2540-2548.
- Fritz JS, Blair C, Oudiz RJ, Dufton C, Olschewski H, Despain D, Gillies H, Kawut SM. 2013. Baseline and follow-up 6-min walk distance and brain natriuretic peptide predict 2-year mortality in pulmonary arterial hypertension. *Chest*, 143 (2):315-323.
- Frost A, Badesch D, Gibbs JSR, Gopalan D, Khanna D, Manes A, Oudiz R, Satoh T, Torres F, Torbicki A. 2019. Diagnosis of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 53 (1).
- Fukuda T, Yoshida N, Kataoka Y, Manabe R, Mizuno-Horikawa Y, Sato M, Kuriyama K, Yasui N, Sekiguchi K. 2002. Mice lacking the EDB segment of fibronectin develop normally but exhibit reduced cell growth and fibronectin matrix assembly in vitro. *Cancer Res*, 62 (19):5603-5610.
- Gabler NB, French B, Strom BL, Palevsky HI, Taichman DB, Kawut SM, Halpern SD. 2012. Validation of 6-minute walk distance as a surrogate end point in pulmonary arterial hypertension trials. *Circulation*, 126 (3):349-356.
- Gabler U, Berndt A, Kosmehl H, Mandel U, Zardi L, Muller S, Stelzner A, Katenkamp D. 1996. Matrix remodelling in dilated cardiomyopathy entails the occurrence of oncofetal fibronectin molecular variants. *Heart*, 75 (4):358-362.
- Galiè N, Manes A, Negro L, Palazzini M, Bacchi-Reggiani ML, Branzi A. 2009. A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J*, 30 (4):394-403.
- Galiè N, Channick RN, Frantz RP, Grunig E, Jing ZC, Moiseeva O, Preston IR, Pulido T, Safdar Z, Tamura Y, McLaughlin VV. 2019. Risk stratification and medical therapy of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, 53 (1).
- Galiè N, Olschewski H, Oudiz RJ, Torres F, Frost A, Ghofrani HA, Badesch DB, McGoon MD, McLaughlin VV, Roecker EB, Gerber MJ, Dufton C, Wiens BL, Rubin LJ. 2008. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation*, 117 (23):3010-3019.
- Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M. 2016. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*, 37 (1):67-119.
- George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO. 1993. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*, 119 (4):1079-1091.
- Giaid A, Saleh D. 1995. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 333 (4):214-221.
- Giancotti FG, Ruoslahti E. 1999. Integrin signaling. *Science*, 285 (5430):1028-1032.
- Gibbs JSR, Torbicki A. 2019. Proposed new pulmonary hypertension definition: is 4 mm(Hg) worth re-writing medical textbooks? *Eur Respir J*, 53 (3).
- Giusca S, Popa E, Amzulescu MS, Ghiorghiu I, Coman IM, Popescu BA, Delcroix M, Voigt JU, Ginhina C, Jurcut R. 2016. Is Right Ventricular Remodeling in Pulmonary

- Hypertension Dependent on Etiology? An Echocardiographic Study. *Echocardiography*, 33 (4):546-554.
- Glukhova MA, Frid MG, Shekhonin BV, Vasilevskaya TD, Grunwald J, Saginati M, Koteliansky VE. 1989. Expression of extra domain A fibronectin sequence in vascular smooth muscle cells is phenotype dependent. *J Cell Biol*, 109 (1):357-366.
- Gondokaryono SP, Ushio H, Niyonsaba F, Hara M, Takenaka H, Jayawardana ST, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. 2007. The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via toll-like receptor 4. *J Leukoc Biol*, 82 (3):657-665.
- Grinnell F, Feld MK. 1982. Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *J Biol Chem*, 257 (9):4888-4893.
- Grünig E, Henn P, D'Andrea A, Claussen M, Ehlken N, Maier F, Naeije R, Nagel C, Prange F, Weidenhammer J, Fischer C, Bossone E. 2013. Reference values for and determinants of right atrial area in healthy adults by 2-dimensional echocardiography. *Circ Cardiovasc Imaging*, 6 (1):117-124.
- Guignabert C, Dorfmüller P. 2013. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *Semin Respir Crit Care Med*, 34 (5):551-559.
- Hardziyenka M, Campian ME, de Bruin-Bon HA, Michel MC, Tan HL. 2006. Sequence of echocardiographic changes during development of right ventricular failure in rat. *J Am Soc Echocardiogr*, 19 (10):1272-1279.
- Hashimoto-Kataoka T, Hosen N, Sonobe T, Arita Y, Yasui T, Masaki T, Minami M, Inagaki T, Miyagawa S, Sawa Y, Murakami M, Kumanogoh A, Yamauchi-Takahara K, Okumura M, Kishimoto T, Komuro I, Shirai M, Sakata Y, Nakaoka Y. 2015. Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112 (20):E2677-2686.
- Heresi GA, Aytekin M, Hammel JP, Wang S, Chatterjee S, Dweik RA. 2014. Plasma interleukin-6 adds prognostic information in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, 43 (3):912-914.
- Hernández-Sánchez J, Harlow L, Church C, Gaine S, Knightbridge E, Bunclark K, Gor D, Bedding A, Morrell N, Corris P, Toshner M. 2018. Clinical trial protocol for TRANSFORM-UK: A therapeutic open-label study of tocilizumab in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ*, 8 (1):2045893217735820.
- Hirose S, Hosoda Y, Furuya S, Otsuki T, Ikeda E. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension. *Pathol Int*, 50 (6):472-479.
- Hoeper MM, Sosada M, Fabel H. 1998. Plasma coagulation profiles in patients with severe primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 12 (6):1446-1449.
- Hoeper MM, Huscher D, Pittrow D. 2016a. Incidence and prevalence of pulmonary arterial hypertension in Germany. *Int J Cardiol*, 203:612-613.
- Hoeper MM, Madani MM, Nakanishi N, Meyer B, Cebotari S, Rubin LJ. 2014. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med*, 2 (7):573-582.
- Hoeper MM, Ghofrani HA, Grünig E, Klose H, Olschewski H, Rosenkranz S. 2017. Pulmonary Hypertension. *Dtsch Arztebl Int*, 114 (5):73-84.
- Hoeper MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, Jing ZC, Gibbs JS. 2016b. A global view of pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med*, 4 (4):306-322.
- Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, Langleben D, Manes A, Satoh T, Torres F, Wilkins MR, Badesch DB. 2013. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 62 (25 Suppl):D42-50.
- Howard CM, Baudino TA. 2014. Dynamic cell-cell and cell-ECM interactions in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 70:19-26.

- Huang J, Mehta S, Mura M. 2015. Early decline in six-minute walk distance from the time of diagnosis predicts clinical worsening in pulmonary arterial hypertension. *Respiration*, 89 (5):365-373.
- Huber LC, Bye H, Brock M. 2015. The pathogenesis of pulmonary hypertension--an update. *Swiss Med Wkly*, 145:w14202.
- Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D. 1995. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 151 (5):1628-1631.
- Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, Dorfmüller P, Klinger JR, Nicolls MR, Olschewski AJ, Pullamsetti SS, Schermuly RT, Stenmark KR, Rabinovitch M. 2019. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *Eur Respir J*, 53 (1).
- Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. 2006. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*, 119 (Pt 19):3901-3903.
- Huntley BK, Sandberg SM, Noser JA, Cataliotti A, Redfield MM, Matsuda Y, Burnett JC, Jr. 2006. BNP-induced activation of cGMP in human cardiac fibroblasts: interactions with fibronectin and natriuretic peptide receptors. *J Cell Physiol*, 209 (3):943-949.
- Hynes RO. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69 (1):11-25.
- Ieda M, Tsuchihashi T, Ivey KN, Ross RS, Hong TT, Shaw RM, Srivastava D. 2009. Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. *Dev Cell*, 16 (2):233-244.
- Jones PL, Cowan KN, Rabinovitch M. 1997. Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease. *Am J Pathol*, 150 (4):1349-1360.
- Joseph P, Leong D, McKee M, Anand SS, Schwalm JD, Teo K, Mentz A, Yusuf S. 2017. Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1: The Epidemiology and Risk Factors. *Circ Res*, 121 (6):677-694.
- Kaczmarek J, Castellani P, Nicolo G, Spina B, Allemanni G, Zardi L. 1994. Distribution of oncofetal fibronectin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int J Cancer*, 59 (1):11-16.
- Kamkin A, Kiseleva I, Isenberg G, Wagner KD, Gunther J, Theres H, Scholz H. 2003. Cardiac fibroblasts and the mechano-electric feedback mechanism in healthy and diseased hearts. *Prog Biophys Mol Biol*, 82 (1-3):111-120.
- Kanters SD, Banga JD, Algra A, Frijns RC, Beutler JJ, Fijnheer R. 2001. Plasma levels of cellular fibronectin in diabetes. *Diabetes Care*, 24 (2):323-327.
- Kapoun AM, Liang F, O'Young G, Damm DL, Quon D, White RT, Munson K, Lam A, Schreiner GF, Protter AA. 2004. B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. *Circ Res*, 94 (4):453-461.
- Kehat I, Molkentin JD. 2010. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation*, 122 (25):2727-2735.
- Kelsh-Lasher RM, Ambesi A, Bertram C, McKeown-Longo PJ. 2017. Integrin  $\alpha 4\beta 1$  and TLR4 Cooperate to Induce Fibrotic Gene Expression in Response to Fibronectin's EDA Domain. *J Invest Dermatol*, 137 (12):2505-2512.
- Kelsh R, You R, Horzempa C, Zheng M, McKeown-Longo PJ. 2014. Regulation of the innate immune response by fibronectin: synergism between the III-1 and EDA domains. *PLoS One*, 9 (7):e102974.

- Khan ZA, Cukiernik M, Gonder JR, Chakrabarti S. 2004. Oncofetal fibronectin in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45 (1):287-295.
- Khan ZA, Caurtero J, Barbin YP, Chan BM, Uniyal S, Chakrabarti S. 2005a. ED-B fibronectin in non-small cell lung carcinoma. *Exp Lung Res*, 31 (7):701-711.
- Khan ZA, Chan BM, Uniyal S, Barbin YP, Farhangkhoe H, Chen S, Chakrabarti S. 2005b. EDB fibronectin and angiogenesis -- a novel mechanistic pathway. *Angiogenesis*, 8 (3):183-196.
- Klebe RJ, Bentley KL, Schoen RC. 1981. Adhesive substrates for fibronectin. *J Cell Physiol*, 109 (3):481-488.
- Kohan M, Muro AF, Bader R, Berkman N. 2011. The extra domain A of fibronectin is essential for allergen-induced airway fibrosis and hyperresponsiveness in mice. *J Allergy Clin Immunol*, 127 (2):439-446.e431-435.
- Kohl TO, Ascoli CA. 2017. Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Cold Spring Harb Protoc*, 2017 (7):pdb.prot093740.
- Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. 2014. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci*, 71 (4):549-574.
- Konstantinou GN. 2017. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol*, 1592:79-94.
- Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H. 2009. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur Respir J*, 34 (4):888-894.
- Kovacs G, Dumitrescu D, Barner A, Greiner S, Grunig E, Hager A, Kohler T, Kozlik-Feldmann R, Kruck I, Lammers AE, Mereles D, Meyer A, Meyer J, Pabst S, Seyfarth HJ, Sinning C, Sorichter S, Stahler G, Wilkens H, Held M. 2018. Definition, clinical classification and initial diagnosis of pulmonary hypertension: Updated recommendations from the Cologne Consensus Conference 2018. *Int J Cardiol*, 272s:11-19.
- Kuhn C, McDonald JA. 1991. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol*, 138 (5):1257-1265.
- Labat-Robert J, Chevalier X. 1991. [Fibronectin, aging and related pathologies]. *C R Seances Soc Biol Fil*, 185 (3):121-126.
- Labat-Robert J, Potazman JP, Derouette JC, Robert L. 1981. Age-dependent increase of human plasma fibronectin. *Cell Biol Int Rep*, 5 (10):969-973.
- Lai YC, Potoka KC, Champion HC, Mora AL, Gladwin MT. 2014. Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome. *Circ Res*, 115 (1):115-130.
- Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Phillips JA, 3rd, Loyd JE, Nichols WC, Trembath RC. 2000. Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet*, 26 (1):81-84.
- Lang IM, Pesavento R, Bonderman D, Yuan JX. 2013. Risk factors and basic mechanisms of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a current understanding. *Eur Respir J*, 41 (2):462-468.
- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MS, Stewart WJ. 2005. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*, 18 (12):1440-1463.

- Lemańska-Perek A, Adamik B. 2019. Fibronectin and its soluble EDA-FN isoform as biomarkers for inflammation and sepsis. *Adv Clin Exp Med*, 28 (11):1561-1567.
- Lequin RM. 2005. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem*, 51 (12):2415-2418.
- Leuchte HH, Baumgartner RA, Nounou ME, Vogeser M, Neurohr C, Trautnitz M, Behr J. 2006. Brain natriuretic peptide is a prognostic parameter in chronic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 173 (7):744-750.
- Leuchte HH, El Nounou M, Tuerpe JC, Hartmann B, Baumgartner RA, Vogeser M, Muehling O, Behr J. 2007. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and renal insufficiency as predictors of mortality in pulmonary hypertension. *Chest*, 131 (2):402-409.
- Lewandowska K, Kaetzel CS, Zardi L, Culp LA. 1988. Binding characteristics of complementary fibronectin fragments on artificial substrata. *FEBS Lett*, 237 (1-2):35-39.
- Li L, Zhao Q, Kong W. 2018. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Matrix Biol*, 68-69:490-506.
- Lin AV. 2015a. Direct ELISA. *Methods Mol Biol*, 1318:61-67.
- Lin AV. 2015b. Indirect ELISA. *Methods Mol Biol*, 1318:51-59.
- Lorenzen JM, Nickel N, Krämer R, Golpon H, Westerkamp V, Olsson KM, Haller H, Hoepfer MM. 2011. Osteopontin in patients with idiopathic pulmonary hypertension. *Chest*, 139 (5):1010-1017.
- Lotz M, Guerne PA. 1991. Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J Biol Chem*, 266 (4):2017-2020.
- Macchia A, Marchioli R, Marfisi R, Scarano M, Levantesi G, Tavazzi L, Tognoni G. 2007. A meta-analysis of trials of pulmonary hypertension: a clinical condition looking for drugs and research methodology. *Am Heart J*, 153 (6):1037-1047.
- Maeder MT, Schoch OD, Kleiner R, Joerg L, Weilenmann D, Swiss Society For Pulmonary H. 2017. Pulmonary hypertension associated with left-sided heart disease. *Swiss Med Wkly*, 147:w14395.
- Mair KM, Johansen AK, Wright AF, Wallace E, MacLean MR. 2014. Pulmonary arterial hypertension: basis of sex differences in incidence and treatment response. *Br J Pharmacol*, 171 (3):567-579.
- Malhotra R, Paskin-Flerlage S, Zamanian RT, Zimmerman P, Schmidt JW, Deng DY, Southwood M, Spencer R, Lai CS, Parker W, Channick RN, Morrell NW, Elliott CG, Yu PB. 2013. Circulating angiogenic modulatory factors predict survival and functional class in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ*, 3 (2):369-380.
- Mamuya WS, Brecher P. 1992. Fibronectin expression in the normal and hypertrophic rat heart. *J Clin Invest*, 89 (2):392-401.
- Man SF, Xing L, Connett JE, Anthonisen NR, Wise RA, Tashkin DP, Zhang X, Vessey R, Walker TG, Celli BR, Sin DD. 2008. Circulating fibronectin to C-reactive protein ratio and mortality: a biomarker in COPD? *Eur Respir J*, 32 (6):1451-1457.
- Manabe R, Ohe N, Maeda T, Fukuda T, Sekiguchi K. 1997. Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment. *J Cell Biol*, 139 (1):295-307.
- Mandegar M, Fung YC, Huang W, Remillard CV, Rubin LJ, Yuan JX. 2004. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res*, 68 (2):75-103.
- Maniscalco WM, Watkins RH, Campbell MH. 1996. Expression of fibronectin mRNA splice variants by rabbit lung in vivo and by alveolar type II cells in vitro. *Am J Physiol*, 271 (6 Pt 1):L972-980.

- Maqbool A, Spary EJ, Manfield IW, Ruhmann M, Zuliani-Alvarez L, Gamboa-Esteves FO, Porter KE, Drinkhill MJ, Midwood KS, Turner NA. 2016. Tenascin C upregulates interleukin-6 expression in human cardiac myofibroblasts via toll-like receptor 4. *World J Cardiol*, 8 (5):340-350.
- Maston LD, Jones DT, Giermakowska W, Resta TC, Ramiro-Diaz J, Howard TA, Jernigan NL, Herbert L, Maurice AA, Gonzalez Bosc LV. 2018. Interleukin-6 trans-signaling contributes to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Pulm Circ*, 8 (3):2045894018780734.
- Matter CM, Schuler PK, Alessi P, Meier P, Ricci R, Zhang D, Halin C, Castellani P, Zardi L, Hofer CK, Montani M, Neri D, Luscher TF. 2004. Molecular imaging of atherosclerotic plaques using a human antibody against the extra-domain B of fibronectin. *Circ Res*, 95 (12):1225-1233.
- Matura LA, Ventetuolo CE, Palevsky HI, Lederer DJ, Horn EM, Mathai SC, Pinder D, Archer-Chicko C, Bagiella E, Roberts KE, Tracy RP, Hassoun PM, Girgis RE, Kawut SM. 2015. Interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  are associated with quality of life-related symptoms in pulmonary arterial hypertension. *Ann Am Thorac Soc*, 12 (3):370-375.
- Maurer E, Schaff M, Receveur N, Bourdon C, Mercier L, Nieswandt B, Dubois C, Jandrot-Perrus M, Goetz JG, Lanza F, Gachet C, Mangin PH. 2015. Fibrillar cellular fibronectin supports efficient platelet aggregation and procoagulant activity. *Thromb Haemost*, 114 (6):1175-1188.
- Mauritz GJ, Rizopoulos D, Groepenhoff H, Tiede H, Felix J, Eilers P, Bosboom J, Postmus PE, Westerhof N, Vonk-Noordegraaf A. 2011. Usefulness of serial N-terminal pro-B-type natriuretic peptide measurements for determining prognosis in patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardiol*, 108 (11):1645-1650.
- Mazurek JA, Vaidya A, Mathai SC, Roberts JD, Forfia PR. 2017. Follow-up tricuspid annular plane systolic excursion predicts survival in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ*, 7 (2):361-371.
- McFadden JP, Basketter DA, Dearman RJ, Kimber IR. 2011. Extra domain A-positive fibronectin-positive feedback loops and their association with cutaneous inflammatory disease. *Clin Dermatol*, 29 (3):257-265.
- McGlinchey N, Johnson MK. 2014. Novel serum biomarkers in pulmonary arterial hypertension. *Biomark Med*, 8 (8):1001-1011.
- McGoon MD, Benza RL, Escribano-Subias P, Jiang X, Miller DP, Peacock AJ, Pepke-Zaba J, Pulido T, Rich S, Rosenkranz S, Suissa S, Humbert M. 2013. Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. *J Am Coll Cardiol*, 62 (25 Suppl):D51-59.
- McLaughlin VV, Shah SJ, Souza R, Humbert M. 2015. Management of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 65 (18):1976-1997.
- Mehta BB, Sharma S, Vasishta RK, Sen RK, Sharma A, Luthra-Guptasarma M. 2018. Blocking osteopontin-fibronectin interactions reduce extracellular fibronectin deployment and arthritic immunopathology. *Int Immunopharmacol*, 55:297-305.
- Menrad A, Menssen HD. 2005. ED-B fibronectin as a target for antibody-based cancer treatments. *Expert Opin Ther Targets*, 9 (3):491-500.
- Midulla M, Verma R, Pignatelli M, Ritter MA, Courtenay-Luck NS, George AJ. 2000. Source of oncofetal ED-B-containing fibronectin: implications of production by both tumor and endothelial cells. *Cancer Res*, 60 (1):164-169.
- Midwood K, Sacre S, Piccinini AM, Inglis J, Trebaul A, Chan E, Drexler S, Sofat N, Kashiwagi M, Orend G, Brennan F, Foxwell B. 2009. Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med*, 15 (7):774-780.

- Mirna M, Rohm I, Jirak P, Wernly B, Bätz L, Paar V, Kretzschmar D, Hoppe UC, Schulze PC, Lichtenauer M, Jung C, Franz M. 2020. Analysis of Novel Cardiovascular Biomarkers in Patients With Pulmonary Hypertension (PH). *Heart Lung Circ*, 29 (3):337-344.
- Miyamoto S, Nagaya N, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Fujita M, Nakanishi N, Miyatake K. 2000. Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing. *Am J Respir Crit Care Med*, 161 (2 Pt 1):487-492.
- Miyata M, Sakuma F, Yoshimura A, Ishikawa H, Nishimaki T, Kasukawa R. 1995. Pulmonary hypertension in rats. 2. Role of interleukin-6. *Int Arch Allergy Immunol*, 108 (3):287-291.
- Molossi S, Elices M, Arrhenius T, Diaz R, Coulber C, Rabinovitch M. 1995. Blockade of very late antigen-4 integrin binding to fibronectin with connecting segment-1 peptide reduces accelerated coronary arteriopathy in rabbit cardiac allografts. *J Clin Invest*, 95 (6):2601-2610.
- Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A, Bugiardini R, Crea F, Cuisset T, Di Mario C, Ferreira JR, Gersh BJ, Gitt AK, Hulot JS, Marx N, Opie LH, Pfisterer M, Prescott E, Ruschitzka F, Sabate M, Senior R, Taggart DP, van der Wall EE, Vrints CJ, Zamorano JL, Achenbach S, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Dean V, Deaton C, Erol C, Fagard R, Ferrari R, Hasdai D, Hoes AW, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Lancellotti P, Linhart A, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Sirnes PA, Tamargo JL, Tendera M, Torbicki A, Wijns W, Windecker S, Knuuti J, Valgimigli M, Bueno H, Claeys MJ, Donner-Banzhoff N, Erol C, Frank H, Funck-Brentano C, Gaemperli O, Gonzalez-Juanatey JR, Hamilos M, Hasdai D, Husted S, James SK, Kervinen K, Kolh P, Kristensen SD, Lancellotti P, Maggioni AP, Piepoli MF, Pries AR, Romeo F, Ryden L, Simoons ML, Sirnes PA, Steg PG, Timmis A, Wijns W, Windecker S, Yildirir A, Zamorano JL. 2013. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*, 34 (38):2949-3003.
- Montani D, Souza R, Binkert C, Fischli W, Simonneau G, Clozel M, Humbert M. 2007. Endothelin-1/endothelin-3 ratio: a potential prognostic factor of pulmonary arterial hypertension. *Chest*, 131 (1):101-108.
- Moretti FA, Chauhan AK, Iaconcig A, Porro F, Baralle FE, Muro AF. 2007. A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived. *J Biol Chem*, 282 (38):28057-28062.
- Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, McMurtry IF, Stenmark KR, Thistlethwaite PA, Weissmann N, Yuan JX, Weir EK. 2009. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 54 (1 Suppl):S20-31.
- Muro AF, Chauhan AK, Gajovic S, Iaconcig A, Porro F, Stanta G, Baralle FE. 2003. Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *J Cell Biol*, 162 (1):149-160.
- Muro AF, Moretti FA, Moore BB, Yan M, Atrasz RG, Wilke CA, Flaherty KR, Martinez FJ, Tsui JL, Sheppard D, Baralle FE, Toews GB, White ES. 2008. An essential role for fibronectin extra type III domain A in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 177 (6):638-645.
- Nagaya N, Ando M, Oya H, Ohkita Y, Kyotani S, Sakamaki F, Nakanishi N. 2002. Plasma brain natriuretic peptide as a noninvasive marker for efficacy of pulmonary thromboendarterectomy. *Ann Thorac Surg*, 74 (1):180-184; discussion 184.
- Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Kakishita M, Fukushima K, Okano Y, Nakanishi N, Miyatake K, Kangawa K. 2000. Plasma brain

- natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation*, 102 (8):865-870.
- Nagaya N, Nishikimi T, Okano Y, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, Kuribayashi S, Hamada S, Kakishita M, Nakanishi N, Takamiya M, Kunieda T, Matsuo H, Kangawa K. 1998. Plasma brain natriuretic peptide levels increase in proportion to the extent of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 31 (1):202-208.
- Ogawa E, Saito Y, Harada M, Kamitani S, Kuwahara K, Miyamoto Y, Ishikawa M, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Nakagawa O, Masuda I, Kishimoto I, Nakao K. 2000. Outside-in signalling of fibronectin stimulates cardiomyocyte hypertrophy in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 32 (5):765-776.
- Ohnishi T, Hiraga S, Izumoto S, Matsumura H, Kanemura Y, Arita N, Hayakawa T. 1998. Role of fibronectin-stimulated tumor cell migration in glioma invasion in vivo: clinical significance of fibronectin and fibronectin receptor expressed in human glioma tissues. *Clin Exp Metastasis*, 16 (8):729-741.
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF, 3rd. 2001. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, 276 (13):10229-10233.
- Olsson KM, Meyer B, Hinrichs J, Vogel-Claussen J, Hoepfer MM, Cebotari S. 2014. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Dtsch Arztebl Int*, 111 (50):856-862.
- Ospel J. 2016. Analyse der Serumkonzentration von ED-A<sup>+</sup>Fibronectin bei Patienten mit ischämischer, dilatativer und hypertensiver Kardiomyopathie [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Oyama F, Hirohashi S, Shimosato Y, Titani K, Sekiguchi K. 1990. Oncodevelopmental regulation of the alternative splicing of fibronectin pre-messenger RNA in human lung tissues. *Cancer Res*, 50 (4):1075-1078.
- Papaioannou AI, Zakyntinos E, Kostikas K, Kiropoulos T, Koutsokera A, Ziogas A, Koutroumpas A, Sakkas L, Gourgoulialis KI, Daniil ZD. 2009. Serum VEGF levels are related to the presence of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. *BMC Pulm Med*, 9:18.
- Park MH, Scott RL, Uber PA, Ventura HO, Mehra MR. 2004. Usefulness of B-type natriuretic peptide as a predictor of treatment outcome in pulmonary arterial hypertension. *Congest Heart Fail*, 10 (5):221-225.
- Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJ, Caballero L, Stewart S. 2007. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, 30 (1):104-109.
- Perrino E, Steiner M, Krall N, Bernardes GJ, Pretto F, Casi G, Neri D. 2014. Curative properties of noninternalizing antibody-drug conjugates based on maytansinoids. *Cancer Res*, 74 (9):2569-2578.
- Perros F, Dorfmueller P, Humbert M. 2005. Current insights on the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Semin Respir Crit Care Med*, 26 (4):355-364.
- Petrini I, Barachini S, Carnicelli V, Galimberti S, Modeo L, Boni R, Sollini M, Erba PA. 2017. ED-B fibronectin expression is a marker of epithelial-mesenchymal transition in translational oncology. *Oncotarget*, 8 (3):4914-4921.
- Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmueller P, Huertas A, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Humbert M. 2012. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest*, 141 (1):210-221.
- Prins KW, Archer SL, Pritzker M, Rose L, Weir EK, Sharma A, Thenappan T. 2018. Interleukin-6 is independently associated with right ventricular function in pulmonary arterial hypertension. *J Heart Lung Transplant*, 37 (3):376-384.
- Pujuguet P, Hammann A, Moutet M, Samuel JL, Martin F, Martin M. 1996. Expression of fibronectin ED-A<sup>+</sup> and ED-B<sup>+</sup> isoforms by human and experimental colorectal

- cancer. Contribution of cancer cells and tumor-associated myofibroblasts. *Am J Pathol*, 148 (2):579-592.
- Pupek M, Krzyżanowska-Gołąb D, Kotschy D, Witkiewicz W, Kwiatkowska W, Kotschy M, Kałnik-Prastowska I. 2018. Time-dependent changes in extra-domain A-fibronectin concentration and relative amounts of fibronectin-fibrin complexes in plasma of patients with peripheral arterial disease after endovascular revascularisation. *Int Wound J*, 15 (4):649-659.
- Quarck R, Nawrot T, Meyns B, Delcroix M. 2009. C-reactive protein: a new predictor of adverse outcome in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 53 (14):1211-1218.
- Ramos-Vara JA. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 42 (4):405-426.
- Raymond RJ, Hinderliter AL, Willis PW, Ralph D, Caldwell EJ, Williams W, Ettinger NA, Hill NS, Summer WR, de Boisblanc B, Schwartz T, Koch G, Clayton LM, Jöbsis MM, Crow JW, Long W. 2002. Echocardiographic predictors of adverse outcomes in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 39 (7):1214-1219.
- Ricard-Blum S. 2011. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3 (1):a004978.
- Rohm I, Grun K, Muller LM, Kretzschmar D, Fritzenwanger M, Yilmaz A, Lauten A, Jung C, Schulze PC, Berndt A, Franz M. 2017. Increased Serum Levels of Fetal Tenascin-C Variants in Patients with Pulmonary Hypertension: Novel Biomarkers Reflecting Vascular Remodeling and Right Ventricular Dysfunction? *Int J Mol Sci*, 18 (11).
- Romberger DJ. 1997. Fibronectin. *Int J Biochem Cell Biol*, 29 (7):939-943.
- Rose-Jones LJ, McLaughlin VV. 2015. Pulmonary hypertension: types and treatments. *Curr Cardiol Rev*, 11 (1):73-79.
- Ross RS. 2002. The extracellular connections: the role of integrins in myocardial remodeling. *J Card Fail*, 8 (6 Suppl):S326-331.
- Roy S, Cagliero E, Lorenzi M. 1996. Fibronectin overexpression in retinal microvessels of patients with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37 (2):258-266.
- Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, Hoeffken G. 2001. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest*, 120 (5):1562-1569.
- Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, Hua L, Handschumacher MD, Chandrasekaran K, Solomon SD, Louie EK, Schiller NB. 2010. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*, 23 (7):685-713; quiz 786-688.
- Ryan JJ, Rich S, Archer SL. 2011. Pulmonary endarterectomy surgery--a technically demanding cure for WHO Group IV Pulmonary Hypertension: requirements for centres of excellence and availability in Canada. *Can J Cardiol*, 27 (6):671-674.
- Ryan JJ, Thenappan T, Luo N, Ha T, Patel AR, Rich S, Archer SL. 2012. The WHO classification of pulmonary hypertension: A case-based imaging compendium. *Pulm Circ*, 2 (1):107-121.
- Rybak JN, Trachsel E, Scheuermann J, Neri D. 2007a. Ligand-based vascular targeting of disease. *ChemMedChem*, 2 (1):22-40.
- Rybak JN, Roesli C, Kaspar M, Villa A, Neri D. 2007b. The extra-domain A of fibronectin is a vascular marker of solid tumors and metastases. *Cancer Res*, 67 (22):10948-10957.
- Sabri A, Farhadian F, Contard F, Samuel JL, Rappaport L. 1995. Fibronectin expression in the cardiovascular system. *Herz*, 20 (2):118-126.

- Sadoshima J, Izumo S. 1993. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res*, 73 (3):413-423.
- Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. 1993. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*, 75 (5):977-984.
- Salonen EM, Vartio T, Hedman K, Vaehri A. 1984. Binding of fibronectin by the acute phase reactant C-reactive protein. *J Biol Chem*, 259 (3):1496-1501.
- Samuel JL, Barrieux A, Dufour S, Dubus I, Contard F, Koteliensky V, Farhadian F, Marotte F, Thiery JP, Rappaport L. 1991. Accumulation of fetal fibronectin mRNAs during the development of rat cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *J Clin Invest*, 88 (5):1737-1746.
- Santovito D, Weber C. 2015. Fibronectin extradomain A: balancing atherosclerotic plaque burden and stability. *Thromb Haemost*, 114 (1):4.
- Sato T, Tsujino I, Oyama-Manabe N, Ohira H, Ito YM, Sugimori H, Yamada A, Takashina C, Watanabe T, Nishimura M. 2013. Simple prediction of right ventricular ejection fraction using tricuspid annular plane systolic excursion in pulmonary hypertension. *Int J Cardiovasc Imaging*, 29 (8):1799-1805.
- Savale L, Tu L, Rideau D, Izziki M, Maitre B, Adnot S, Eddahibi S. 2009. Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respir Res*, 10 (1):6.
- Savarese G, Paolillo S, Costanzo P, D'Amore C, Cecere M, Losco T, Musella F, Gargiulo P, Marciano C, Perrone-Filardi P. 2012. Do changes of 6-minute walk distance predict clinical events in patients with pulmonary arterial hypertension? A meta-analysis of 22 randomized trials. *J Am Coll Cardiol*, 60 (13):1192-1201.
- Schliemann C, Wiedmer A, Pedretti M, Szczepanowski M, Klapper W, Neri D. 2009. Three clinical-stage tumor targeting antibodies reveal differential expression of oncofetal fibronectin and tenascin-C isoforms in human lymphoma. *Leuk Res*, 33 (12):1718-1722.
- Schwarzbauer JE. 1991a. Alternative splicing of fibronectin: three variants, three functions. *Bioessays*, 13 (10):527-533.
- Schwarzbauer JE. 1991b. Fibronectin: from gene to protein. *Curr Opin Cell Biol*, 3 (5):786-791.
- Seeger W, Adir Y, Barberà JA, Champion H, Coghlan JG, Cottin V, De Marco T, Galiè N, Ghio S, Gibbs S, Martinez FJ, Semigran MJ, Simonneau G, Wells AU, Vachiéry JL. 2013. Pulmonary hypertension in chronic lung diseases. *J Am Coll Cardiol*, 62 (25 Suppl):D109-116.
- Sekiguchi K, Klos AM, Hirohashi S, Hakomori S. 1986. Human tissue fibronectin: expression of different isotypes in the adult and fetal tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 141 (3):1012-1017.
- Selimovic N, Bergh CH, Andersson B, Sakiniene E, Carlsten H, Rundqvist B. 2009. Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 34 (3):662-668.
- Selmer J, Eriksen H, Clemmensen I. 1984. Native and degraded fibronectin: new immunological methods for distinction. *Scand J Clin Lab Invest*, 44 (1):57-63.
- Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, Gabbiani G. 1998. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol*, 142 (3):873-881.
- Shapiro S, Traiger GL, Turner M, McGoon MD, Wason P, Barst RJ. 2012. Sex differences in the diagnosis, treatment, and outcome of patients with pulmonary arterial hypertension enrolled in the registry to evaluate early and long-term pulmonary arterial hypertension disease management. *Chest*, 141 (2):363-373.

- Shelburne NJ, Parikh KS, Chiswell K, Shaw LK, Sivak J, Arges K, Tomfohr J, Velazquez EJ, Kisslo J, Samad Z, Rajagopal S. 2019. Echocardiographic Assessment of Right Ventricular Function and Response to Therapy in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Cardiol*, 124 (8):1298-1304.
- Silva Marques J, Martins SR, Calisto C, Gonçalves S, Almeida AG, de Sousa JC, Pinto FJ, Diogo AN. 2013. An exploratory panel of biomarkers for risk prediction in pulmonary hypertension: emerging role of CT-proET-1. *J Heart Lung Transplant*, 32 (12):1214-1221.
- Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R. 2019. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 53 (1).
- Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. 2013. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 62 (25 Suppl):D34-41.
- Sommer N, Dietrich A, Schermuly RT, Ghofrani HA, Gudermann T, Schulz R, Seeger W, Grimminger F, Weissmann N. 2008. Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur Respir J*, 32 (6):1639-1651.
- Soon E, Crosby A, Southwood M, Yang P, Tajsic T, Toshner M, Appleby S, Shanahan CM, Bloch KD, Pepke-Zaba J, Upton P, Morrell NW. 2015. Bone morphogenetic protein receptor type II deficiency and increased inflammatory cytokine production. A gateway to pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 192 (7):859-872.
- Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, Trembath RC, Jennings S, Barker L, Nicklin P, Walker C, Budd DC, Pepke-Zaba J, Morrell NW. 2010. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 122 (9):920-927.
- Soubrier F, Chung WK, Machado R, Grunig E, Aldred M, Geraci M, Loyd JE, Elliott CG, Trembath RC, Newman JH, Humbert M. 2013. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 62 (25 Suppl):D13-21.
- Spinale FG. 2007. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*, 87 (4):1285-1342.
- Steffensen B, Chen Z, Pal S, Mikhailova M, Su J, Wang Y, Xu X. 2011. Fragmentation of fibronectin by inherent autolytic and matrix metalloproteinase activities. *Matrix Biol*, 30 (1):34-42.
- Steiner MK, Syrkina OL, Kolliputi N, Mark EJ, Hales CA, Waxman AB. 2009. Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ Res*, 104 (2):236-244, 228p following 244.
- Stevens PW, Hansberry MR, Kelso DM. 1995. Assessment of adsorption and adhesion of proteins to polystyrene microwells by sequential enzyme-linked immunosorbent assay analysis. *Anal Biochem*, 225 (2):197-205.
- Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Nagai R. 2010. Characteristics of chronic rejection in heart transplantation: important elements of pathogenesis and future treatments. *Circ J*, 74 (2):233-239.
- Taichman DB, McGoon MD, Harhay MO, Archer-Chicko C, Sager JS, Murugappan M, Chakinali MM, Palevsky HI, Gallop R. 2009. Wide variation in clinicians' assessment of New York Heart Association/World Health Organization functional class in patients with pulmonary arterial hypertension. *Mayo Clin Proc*, 84 (7):586-592.
- Takagi J. 2004. Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins. *Biochem Soc Trans*, 32 (Pt3):403-406.

- Takasaki I, Chobanian AV, Mamuya WS, Brecher P. 1992. Hypertension induces alternatively spliced forms of fibronectin in rat aorta. *Hypertension*, 20 (1):20-25.
- Takeda Y, Takeda Y, Tomimoto S, Tani T, Narita H, Kimura G. 2010. Bilirubin as a prognostic marker in patients with pulmonary arterial hypertension. *BMC Pulm Med*, 10:22.
- Tan MH, Sun Z, Opitz SL, Schmidt TE, Peters JH, George EL. 2004. Deletion of the alternatively spliced fibronectin EIIIA domain in mice reduces atherosclerosis. *Blood*, 104 (1):11-18.
- Tarone G, Balligand JL, Bauersachs J, Clerk A, De Windt L, Heymans S, Hilfiker-Kleiner D, Hirsch E, Iaccarino G, Knoll R, Leite-Moreira AF, Lourenco AP, Mayr M, Thum T, Tocchetti CG. 2014. Targeting myocardial remodelling to develop novel therapies for heart failure: a position paper from the Working Group on Myocardial Function of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail*, 16 (5):494-508.
- Tiede SL, Wassenberg M, Christ K, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F, Ghofrani HA, Gall H. 2016. Biomarkers of tissue remodeling predict survival in patients with pulmonary hypertension. *Int J Cardiol*, 223:821-826.
- Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF. 1994. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol*, 144 (2):275-285.
- Tuder RM, Archer SL, Dorfmueller P, Erzurum SC, Guignabert C, Michelakis E, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Morrell NW. 2013. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 62 (25 Suppl):D4-12.
- Tuder RM, Chacon M, Alger L, Wang J, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Cool CD, Bishop AE, Geraci M, Semenza GL, Yacoub M, Polak JM, Voelkel NF. 2001. Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J Pathol*, 195 (3):367-374.
- Ullah N, Ma FR, Han J, Liu XL, Fu Y, Liu YT, Liang YL, Ouyang H, Li HY. 2020. Monomeric C-reactive protein regulates fibronectin mediated monocyte adhesion. *Mol Immunol*, 117:122-130.
- Vachiéry JL, Adir Y, Barberà JA, Champion H, Coghlan JG, Cottin V, De Marco T, Galiè N, Ghio S, Gibbs JS, Martinez F, Semigran M, Simonneau G, Wells A, Seeger W. 2013. Pulmonary hypertension due to left heart diseases. *J Am Coll Cardiol*, 62 (25 Suppl):D100-108.
- Valiente-Alandi I, Schafer AE, Blaxall BC. 2016. Extracellular matrix-mediated cellular communication in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 91:228-237.
- van Keulen JK, de Kleijn DP, Nijhuis MM, Busser E, Velema E, Fijnheer R, van der Graaf Y, Moll FL, de Vries JP, Pasterkamp G. 2007. Levels of extra domain A containing fibronectin in human atherosclerotic plaques are associated with a stable plaque phenotype. *Atherosclerosis*, 195 (1):e83-91.
- van Weemen BK, Schuurs AH. 1971. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett*, 15 (3):232-236.
- Vartio T, Laitinen L, Narvanen O, Cutolo M, Thornell LE, Zardi L, Virtanen I. 1987. Differential expression of the ED sequence-containing form of cellular fibronectin in embryonic and adult human tissues. *J Cell Sci*, 88 ( Pt 4):419-430.
- Ventura E, Sassi F, Parodi A, Balza E, Borsi L, Castellani P, Carnemolla B, Zardi L. 2010. Alternative splicing of the angiogenesis associated extra-domain B of fibronectin regulates the accessibility of the B-C loop of the type III repeat 8. *PLoS One*, 5 (2):e9145.

- Villa A, Trachsel E, Kaspar M, Schliemann C, Somnavilla R, Rybak JN, Rosli C, Borsi L, Neri D. 2008. A high-affinity human monoclonal antibody specific to the alternatively spliced EDA domain of fibronectin efficiently targets tumor neo-vasculature in vivo. *Int J Cancer*, 122 (11):2405-2413.
- Voskuyl AE, Emeis JJ, Hazes JM, van Hogezaand RA, Biemond I, Breedveld FC. 1998. Levels of circulating cellular fibronectin are increased in patients with rheumatoid vasculitis. *Clin Exp Rheumatol*, 16 (4):429-434.
- Walker AM, Langleben D, Korelitz JJ, Rich S, Rubin LJ, Strom BL, Gonin R, Keast S, Badesch D, Barst RJ, Bourge RC, Channick R, Frost A, Gaine S, McGoon M, McLaughlin V, Murali S, Oudiz RJ, Robbins IM, Tapson V, Abenhaim L, Constantine G. 2006. Temporal trends and drug exposures in pulmonary hypertension: an American experience. *Am Heart J*, 152 (3):521-526.
- Wang J, Chen H, Seth A, McCulloch CA. 2003. Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285 (5):H1871-1881.
- Warawdekar UM, Zingde SM, Iyer KS, Jagannath P, Mehta AR, Mehta NG. 2006. Elevated levels and fragmented nature of cellular fibronectin in the plasma of gastrointestinal and head and neck cancer patients. *Clin Chim Acta*, 372 (1-2):83-93.
- Warwick G, Thomas PS, Yates DH. 2008. Biomarkers in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 32 (2):503-512.
- Weber KT. 1989. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol*, 13 (7):1637-1652.
- Weber KT, Brilla CG. 1991. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*, 83 (6):1849-1865.
- Weller MG. 1992. Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzymimmunoassays (ELISAs) am Beispiel der Bestimmung von Triazinherbiziden.
- Welsh CH, Hassell KL, Badesch DB, Kressin DC, Marlar RA. 1996. Coagulation and fibrinolytic profiles in patients with severe pulmonary hypertension. *Chest*, 110 (3):710-717.
- White ES, Muro AF. 2011. Fibronectin splice variants: understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models. *IUBMB Life*, 63 (7):538-546.
- White ES, Lazar MH, Thannickal VJ. 2003. Pathogenetic mechanisms in usual interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol*, 201 (3):343-354.
- White ES, Baralle FE, Muro AF. 2008. New insights into form and function of fibronectin splice variants. *J Pathol*, 216 (1):1-14.
- Wilchek M, Bayer EA. 1988. The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Anal Biochem*, 171 (1):1-32.
- Willems IE, Arends JW, Daemen MJ. 1996. Tenascin and fibronectin expression in healing human myocardial scars. *J Pathol*, 179 (3):321-325.
- World Medical Association. 2013. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310 (20):2191-2194.
- Wu AM, Senter PD. 2005. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol*, 23 (9):1137-1146.
- Wynants M, Quarck R, Ronisz A, Alfaro-Moreno E, Van Raemdonck D, Meyns B, Delcroix M. 2012. Effects of C-reactive protein on human pulmonary vascular cells in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 40 (4):886-894.
- Xia P, Culp LA. 1995. Adhesion activity in fibronectin's alternatively spliced domain EDa (EIIIA): complementarity to plasma fibronectin functions. *Exp Cell Res*, 217 (2):517-527.

- Ylätupa S, Partanen P, Haglund C, Virtanen I. 1993. Competitive enzyme immunoassay for quantification of the cellular form of fibronectin (EDAcFN) in blood samples. *J Immunol Methods*, 163 (1):41-47.
- Ylätupa S, Haglund C, Mertaniemi P, Vahtera E, Partanen P. 1995. Cellular fibronectin in serum and plasma: a potential new tumour marker? *Br J Cancer*, 71 (3):578-582.
- Zafir N, Zingerman B, Solodky A, Ben-Dayana D, Sagie A, Sulkes J, Mats I, Kramer MR. 2007. Use of noninvasive tools in primary pulmonary hypertension to assess the correlation of right ventricular function with functional capacity and to predict outcome. *Int J Cardiovasc Imaging*, 23 (2):209-215.
- Zardi L, Carnemolla B, Siri A, Petersen TE, Paolella G, Sebastio G, Baralle FE. 1987. Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon. *EMBO J*, 6 (8):2337-2342.
- Zelniker TA, Huscher D, Vonk-Noordegraaf A, Ewert R, Lange TJ, Klose H, Dumitrescu D, Halank M, Held M, Gall H, Pittrow D, Hoepfer MM, Frankenstein L. 2018. The 6MWT as a prognostic tool in pulmonary arterial hypertension: results from the COMPERA registry. *Clin Res Cardiol*, 107 (6):460-470.
- Zhong H, Belardinelli L, Maa T, Zeng D. 2005. Synergy between A2B adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 32 (1):2-8.
- Ziffels B. 2013. Etablierung eines ELISAs zum Nachweis von humanem und murinem ED-A<sup>+</sup>-Fibronectin. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Ziffels B, Grotsch A, Al-Bayati L, Neri D. 2019. Targeted delivery of calreticulin to ED-A fibronectin leads to tumor-growth retardation. *J Biotechnol*, 290:53-58.
- Ziffels B, Ospel J, Grun K, Neri D, Pfeil A, Fritzenwanger M, Figulla HR, Jung C, Berndt A, Franz M. 2016. Detection of Soluble ED-A(+) Fibronectin and Evaluation as Novel Serum Biomarker for Cardiac Tissue Remodeling. *Dis Markers*, 2016:3695454.
- Zollinger AJ, Smith ML. 2017. Fibronectin, the extracellular glue. *Matrix Biol*, 60-61:27-37.

### Internetquellen:

- Sirius Biotech S.r.L. [cited 2019 03.03]; available from: <http://www.sirius-biotech.com/products-services/antibodies/>
- WHO. Media centre – fact sheet. Cardiovascular diseases (CVDs) 2017 [cited 2019 27.02.]; available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

---

## Anlagen

### Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b>	Klassifikation der pulmonalen Hypertonie .....	12
<b>Tab. 2:</b>	Hämodynamische Einteilung der pulmonalen Hypertonie.....	13
<b>Tab. 3:</b>	Antikörper, Enzyme und Fibronectin-Standards für ELISA und Immunhistochemie .....	36
<b>Tab. 4:</b>	Weitere Reagenzien.....	37
<b>Tab. 5:</b>	Pufferlösungen .....	38
<b>Tab. 6:</b>	Verbrauchsmaterialien .....	38
<b>Tab. 7:</b>	Geräte .....	39
<b>Tab. 8:</b>	Software .....	39
<b>Tab. 9:</b>	Verwendete Verdünnungen im ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin-ELISA .....	41
<b>Tab. 10:</b>	Verwendete Verdünnungen in der Immunfluoreszenz.....	46
<b>Tab. 11:</b>	Verwendete Verdünnungen im ED-A <sup>+</sup> -Fibronectin-ELISA.....	47
<b>Tab. 12:</b>	Charakteristika der Studiengruppen: Vergleich der Gesamtheit der PH- Patienten mit der Kontrollgruppe .....	55
<b>Tab. 13:</b>	Charakteristika der Studiengruppen: Differenzierte Betrachtung einzelner ätiologischer PH-Klassen und der Kontrollgruppe .....	56
<b>Tab. 14:</b>	Echokardiografische Parameter der Studiengruppen .....	57

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Pathogenese der pulmonalen Hypertonie .....	17
<b>Abb. 2:</b>	Fibronectin-Molekülstruktur und Bindungsstellen domänenspezifischer Antikörper .....	40
<b>Abb. 3:</b>	Schematischer Aufbau des ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin-ELISAs .....	49
<b>Abb. 4:</b>	Testung der Primärantikörper für den ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin-ELISA.....	50
<b>Abb. 5:</b>	Testung der geeigneten Verdünnung des Primärantikörpers C6.....	51
<b>Abb. 6:</b>	Testung der Einzelkomponenten des ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin-ELISAs auf Kreuzreaktivität.....	52
<b>Abb. 7:</b>	Immunfluoreszenz-Detektion von ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin in humanen rechten Vorhoföhren .....	53
<b>Abb. 8:</b>	Immunfluoreszenz-Detektion von ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin im Tumorgewebe.....	53
<b>Abb. 9:</b>	ED-A <sup>+</sup> - und ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin-Serumkonzentration der Patienten mit pulmonaler Hypertonie im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	59
<b>Abb. 10:</b>	ED-A <sup>+</sup> - und ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin-Serumkonzentration der Subgruppen des PH- Kollektivs im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	60
<b>Abb. 11:</b>	ED-A <sup>+</sup> - und ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin-Serumkonzentration in Bezug zur funktionellen Klasse .....	62
<b>Abb. 12:</b>	Korrelation der ED-A <sup>+</sup> - und ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin-Serumkonzentration zur 6- Minuten-Gehstrecke .....	63
<b>Abb. 13:</b>	Korrelation der Serumkonzentration von ED-A <sup>+</sup> - und ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin zu BNP .....	64
<b>Abb. 14:</b>	Korrelation der Serumkonzentration von ED-A <sup>+</sup> - und ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin zu CRP .....	65
<b>Abb. 15:</b>	Korrelation der Serumkonzentration von ED-A <sup>+</sup> - und ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin zu Interleukin-6 .....	66
<b>Abb. 16:</b>	Korrelation der ED-A <sup>+</sup> - und ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin-Serumkonzentration zum systolischen pulmonalarteriellen Druck .....	67
<b>Abb. 17:</b>	Korrelation der ED-A <sup>+</sup> - und ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin-Serumkonzentration zur TAPSE.....	69
<b>Abb. 18:</b>	Korrelation der ED-A <sup>+</sup> - und ED-B <sup>+</sup> -Fibronectin-Serumkonzentration zur rechtsatrialen Fläche.....	70
<b>Abb. 19:</b>	Binär logistische Regressionsanalyse zur Identifikation unabhängiger Prädiktoren für das Vorliegen einer pulmonalen Hypertonie .....	71

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: apl. Prof. Dr. Marcus Franz, apl. Prof. Dr. Alexander Berndt und Dr. Katja Grün,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

---

Ort, Datum

---

Michelle Roßberg

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg zur Promotion begleitet und in mannigfaltiger Weise unterstützt haben.

Mein erster Dank gebührt Prof. Dr. Marcus Franz (Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Jena), welcher mir durch die Bereitstellung des Themas die Möglichkeit zur Promotion in seiner Arbeitsgruppe eröffnete. Als mein Doktorvater hat er den Entstehungsprozess dieser Arbeit mit viel Engagement geleitet und vollumfänglich unterstützt. Auch über die Dissertation hinaus konnte ich von seiner konstruktiven Beratung, den gebotenen Chancen und vielfältigen Herausforderungen in persönlicher sowie beruflicher Hinsicht sehr profitieren.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Alexander Berndt (Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Jena), dessen langjährige wissenschaftliche Erfahrung insbesondere für den praktischen Teil dieser Arbeit stets eine hilfreiche Unterstützung für mich war.

Ein besonders herzlicher Dank gilt Dr. Katja Grün (AG Kardiovaskuläres Remodelling, Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Jena), welche mit schier unendlicher Geduld und Optimismus sowohl den praktischen als auch den theoretischen Teil dieser Arbeit begleitet und richtungsweisend beeinflusst hat. Sie war mir im Rahmen der mehrjährigen Zusammenarbeit jederzeit eine zuverlässige, kompetente und freundschaftliche Ansprechpartnerin.

An dieser Stelle möchte ich auch Annett Schmidt und Linda-Marlen Müller für die freundliche Einarbeitung in die Laborarbeit und zahlreiche methodische Tipps danken.

Einen weiteren großen Dank richte ich an das Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) Jena. Durch die Gewährung eines Promotionsstipendiums sowie die Aufnahme in das Graduierten-Programm wurde ich bei der Anfertigung dieser Arbeit sowohl fachlich als auch finanziell enorm unterstützt.

Prof. Dr. P. Christian Schulze (Direktor der Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Jena) danke ich für die Möglichkeit, alle experimentellen Arbeiten im Zuge meiner Promotion in den Laborräumlichkeiten seiner Klinik durchführen zu können.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Luciano Zardi (Sirius Biotech S.r.L., Genua) für die Bereitstellung der Antikörper zur Etablierung des ELISAs.

Nicht zuletzt bin ich meiner Familie unendlich dankbar für das entgegengebrachte Vertrauen und die beständige Unterstützung in Bezug auf meine Promotion und mein gesamtes Studium. Durch ihren Rückhalt und Zuspruch konnte ich meine bisherigen Ziele verwirklichen. Ihnen widme ich diese Arbeit.