

Carboanhydrasen IX und XII als Biomarker bei Patienten mit Pulmonaler Hypertonie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Jan Ewert
aus Wiesbaden

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik für Pneumologie und Internistische Intensivmedizin, Infektiologie,
Gastroenterologie, Nephrologie

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. Henning Gall

Gutachter: Prof. Dr. med. Till Keller

Tag der Disputation: 30.01.2025

Inhalt

1. EINLEITUNG	1
1.1 Physiologie der pulmonalen Zirkulation	1
1.2 Pulmonale Hypertonie.....	2
1.2.1 <i>Definition und Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie</i>	2
1.2.2 <i>Pathophysiologische und pathobiologische Veränderungen</i>	3
1.2.3 <i>Klinik der Pulmonalen Hypertonie</i>	6
1.2.4 <i>Diagnostik der Pulmonalen Hypertonie</i>	7
1.2.5 <i>Therapie der Pulmonalen Hypertonie</i>	7
1.3 Biomarker der Pulmonalen Hypertonie	9
1.3.1 <i>Definition und Überblick</i>	9
1.3.2 <i>Biomarker für Endotheliale Dysfunktion</i>	10
1.3.3 <i>Biomarker für Inflammation</i>	11
1.3.4 <i>Biomarker für niedriges Herzzeitvolumen und Hypoxie</i>	11
1.3.5 <i>Biomarker für myokardialen Stress</i>	12
2. CARBOANHYDRASEN IX UND XII UND IHRE POTENZIELLE BEDEUTUNG IN DER PATHOPHYSIOLOGIE DER PH	13
2.1 Definition	13
2.2 Einteilung der Carboanhydrasen	13
2.3 Funktion.....	13
2.4 Katalytisches Prinzip der Carboanhydrasen	15
2.5 Membrangebundene Carboanhydrasen IX und XII	17
2.5.1 <i>Carboanhydrase IX</i>	17
2.5.2 <i>Carboanhydrase XII</i>	17
2.6 Carboanhydrasen IX und XII bei verschiedenen Erkrankungen.....	18
2.6.1 <i>Studien zur Expression von CA IX und CA XII in verschiedenen Tumoren</i>	18
2.6.2 <i>Studien zu CA IX-Plasma-/Serumspiegeln</i>	18
2.6.3 <i>Studien zu CA XII-Plasma-/Serumspiegeln</i>	21
2.6.4 <i>HIF-1-α und CA IX-Expression bei IPAH</i>	23
2.7 Fragestellung und Ziele.....	24
3. MATERIAL UND METHODEN	26
3.1 Material für die immunhistochemische Untersuchung von Mäuselungen	27
3.2 Methoden zur Quantifizierung des CA IX- und CA XII-Gehalts im Lungengefäßsystem von Mäusen.....	28
3.2.1 <i>Auslösung hypoxischen pulmonalen Remodelings durch chronische Hypoxie</i>	28

3.2.2 Entnahme und Verarbeitung des Lungengewebes	28
3.2.3 Immunhistochemische Färbung der Schnitte auf CA IX bzw. CA XII	29
3.2.4 Auswertung der Schnitte mit Hilfe eines Mikroskops und einer Farberkennungs-Software	30
3.2.5 Statistik	31
3.3 Material für die Bestimmung der CA IX-Plasmaspiegel in Patientenproben	31
3.4 Methoden zur Bestimmung der CA IX-Plasmaspiegel in Patientenproben	32
3.4.1 Rechtsherzkatheter	32
3.4.2 Entnahme und Aufbewahrung der Plasmaproben	32
3.4.3 Datenerhebung und Messmethoden	33
3.4.4 Statistik	34
4. ERGEBNISSE	35
4.1 Expressionsprofil von CA IX und CA XII in den Lungen von Mäusen mit experimentell induzierter Pumonaler Hypertonie	35
4.1.1 CA IX	35
4.1.2 CA XII	37
4.2 CA IX-Plasmaspiegel bei Patienten mit PH	38
4.2.1 Basisdaten des Patientenkollektivs	38
4.2.2 Konzentrationsverteilung der Plasmaspiegel von CA IX	41
4.2.3 CA IX-Plasmaspiegel und Vergleich der untersuchten Gruppen	41
4.2.4 Diagnostische Güte der CA IX-Konzentrationen in der Diagnostik der PH	43
4.3 IPAH: Zusammenhang der CA IX-Plasmaspiegel mit klinischen Parametern	45
4.3.1 NYHA-Klassen	45
4.3.2 BNP-Spiegel	46
4.3.3 6-Minuten-Gehstrecke (6MWD)	46
4.3.4 Cardiac Index	47
4.3.5 Mittlerer pulmonal-arterieller Druck (mPAP)	48
4.3.6 Pulmonal vaskulärer Widerstand (PVR)	48
4.4 CTEPH: Zusammenhang der CA IX-Plasmaspiegel mit klinischen Parametern	49
4.4.1 NYHA-Klassen	49
4.4.2 BNP-Spiegel	50
4.4.3 6MWD	50
4.4.4 Cardiac Index	51
4.4.5 mPAP	51
4.4.6 PVR	52
4.5 Uni- und multivariate Überlebensanalyse	52
4.5.1 Gesamte IPAH-Gruppe	52

4.5.2	<i>IPAH-Gruppe unterteilt in Quartile nach CA IX-Plasmakonzentration</i>	53
4.5.3	<i>Gesamte CTEPH-Gruppe</i>	54
4.5.4	<i>CTEPH-Gruppe unterteilt nach CA IX-Plasmaspiegeln</i>	55
4.5.5	<i>Cox-Regressions-Analyse für die IPAH-Gruppe</i>	55
4.5.6	<i>Cox-Regressions-Analyse: CTEPH-Gruppe</i>	57
4.6	<i>Carboanhydrase XII</i>	58
4.6.1	<i>Kommerziell verfügbare ELISA-Kits</i>	58
4.6.2	<i>Versuch der Etablierung eines eigenen ELISA-Kits</i>	59
5.	DISKUSSION	61
5.1	<i>CA IX- und CA XII-Expression im Tiermodell</i>	61
5.2	<i>Mögliche Ursache für die nicht-signifikante Erhöhung der CAIX-Spiegel</i>	61
5.3	<i>Die Non-PH-Gruppe im Vergleich mit Kontrollgruppen anderer Studien</i>	62
5.4	<i>Mögliche Rolle der CA IX in der Pathophysiologie der PH</i>	63
5.4.1	<i>Überschneidungen mit malignen Erkrankungen</i>	63
5.4.2	<i>Warburg-Hypothese und Bedeutung der Carboanhydrase IX</i>	63
5.4.3	<i>Carboanhydrase IX als möglicher Biomarker für Hypoxie und Azidose des Lungengewebes</i>	64
5.4.4	<i>Rolle von CA IX beim Hypoxie-Signaling</i>	65
5.4.5	<i>Apoptose der Endothelzellen als Ursache für erhöhte CA IX-Plasmaspiegel</i>	65
5.5	<i>Ergebnisse im Kontext der klinischen Anwendung</i>	66
5.5.1	<i>Diagnostische Güte des CA IX-Plasmaspiegels in der Diagnostik der IPAH und der CTEPH</i>	66
5.5.2	<i>CA IX als möglicher prognostischer Biomarker</i>	66
5.5.3	<i>Analyse der Assoziation von CA IX-Plasmaspiegeln mit hämodynamischen und klinischen Parametern</i>	67
5.5.4	<i>Kein signifikanter Unterschied zwischen den NYHA-Klassen</i>	67
5.5.5	<i>Zusammenhang der CA IX-Plasmaspiegel mit BNP</i>	67
5.6	<i>Nächste Fragestellungen</i>	68
5.6.1	<i>CA IX-Plasmaspiegel als „Frühwarnsystem“ klinischer Verschlechterung</i>	68
5.6.2	<i>Vergleich der Spiegel in peripheren und zentralen Blutproben</i>	68
5.6.3	<i>Verlaufskontrollen der CA IX-Plasmaspiegel zur Therapie-Evaluation</i>	68
5.7	<i>Outlook / Therapeutische Möglichkeiten</i>	68
5.7.1	<i>Carboanhydrasehemmer Acetazolamid</i>	69
5.7.2	<i>Monoklonale Antikörper und die Möglichkeit der gezielten Carboanhydrase-Inhibition</i>	70
5.8	<i>Evaluation von Material und Methoden</i>	70
5.9	<i>Schlussfolgerung und Aussicht</i>	72

6. ZUSAMMENFASSUNG	74
7. SUMMARY	75
8. EXKURS: NINTEDANIB IN SEVERE PULMONARY HYPERTENSION, RICHTER ET. AL	76
9. VERZEICHNISSE.....	79
9.1 Abkürzungsverzeichnis	79
9.2 Abbildungsverzeichnis	81
9.3 Tabellenverzeichnis	82
9.4 Literaturverzeichnis	83
10. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	98
11. DANKSAGUNG	99
12. TABELLARISCHER LEBENS LAUF	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

1. Einleitung

1.1 Physiologie der pulmonalen Zirkulation

Die pulmonale Zirkulation weist hämodynamisch einige Unterschiede zum Körperkreislauf auf (Erdmann 2011, S. 310). Der systolische Blutdruck in den Lungenarterien (sPAP) liegt bei 20-25 mmHg, der diastolische Blutdruck (dPAP) bei 9-12 mmHg, der physiologische Mitteldruck (mPAP) liegt bei ca. 14 ± 3 mmHg, der obere Normwert liegt demnach bei 20 mmHg (Erdmann 2011, S. 311). Physiologisch ist mit steigendem Alter ein geringfügiger Anstieg des pulmonal arteriellen Drucks, insbesondere unter Belastung, zu beobachten (Erdmann 2011, S. 311). In den Lungenvenen beträgt der Blutdruck ca. 7 mmHg, im linken Vorhof ca. 6 mmHg. Ein weiterer hämodynamischer Parameter ist der transpulmonale Gradient (TPG), also die Differenz der mittleren Druckwerte an beiden Enden des pulmonalen Gefäßbettes, physiologisch beträgt dieser ≤ 12 mmHg, er wird berechnet aus mPAP minus dem linksatrialen Druck (Erdmann 2011, S. 311). Da der linksatriale Druck nur durch eine Linksherzkatheteruntersuchung ermittelt werden kann, wird im klinischen Alltag hauptsächlich der pulmonal-arterielle Verschlussdruck (PAWP; Pulmonary Arterial Wedge Pressure) ermittelt, der im Normalfall ≤ 15 mmHg beträgt (Erdmann 2011, S. 311). Der pulmonal vaskuläre Widerstand (PVR) wird hauptsächlich durch die kleinen pulmonalen Widerstandsgefäße, kleine Arterien und Arteriolen vom muskulären Typ, bestimmt. Normalerweise beträgt er < 3 (mmHg*min)/L (Wood-Einheiten, Wood-Units, WU) bzw. < 240 dyn*s/cm⁵ (Erdmann 2011, S. 311).

Da Lungengefäße sehr dehnbar sind und aktiv dilatieren, kann der PAP unter Belastung, trotz gesteigertem HZV und erhöhtem pulmonalen Blutfluss, konstant gehalten werden (Erdmann 2011, S. 311). Eine weitere Besonderheit der pulmonalen Gefäße liegt in der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion. Nimmt der alveoläre O₂-Partialdruck ab, kommt es zu einer lokalen Vasokonstriktion und Abnahme der Durchblutung in betroffenen prä- und postkapillären Lungengefäßen (Erdmann 2011, S. 311). Die Ursache für dieses Phänomen liegt in der pulmonal-arteriellen glatten Muskelzelle. Bei Hypoxie wird der K⁺-Auswärtsstrom gehemmt und die Zelle depolarisiert, es kommt zur einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit von L-Typ Ca-Kanälen. Der Anstieg der intrazellulären Ca-Konzentration und eine darauffolgende Ca-Sensitivierung verursachen eine Konstriktion der betroffenen Pulmonalarterien (Dunham-Snary et al. 2017).

1.2 Pulmonale Hypertonie

1.2.1 Definition und Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine schwere Erkrankung des Lungengefäßsystems (Hoeper et al. 2013). Die Pulmonale Hypertonie wird allgemein durch einen mittleren pulmonal-arteriellen Druck (mPAP) von ≥ 25 mmHg, gemessen in einer Rechtsherzkatheter-Untersuchung, definiert (Hoeper et al. 2013).

Auf dem 6. PH-Welt-Symposium 2018 wurden Änderungen in der Definition der Pulmonalen Hypertonie vorgeschlagen. Der Grenzwert für den mPAP wurde auf 20 mmHg gesetzt (Simonneau et al. 2019). Außerdem wird nun der PVR zur Diagnose der PH herangezogen. Daraus ergibt sich, dass bei einem mPAP ≥ 21 mmHg und einem PVR von ≥ 3 WU die Diagnose einer PH gestellt werden kann. Somit orientiert sich die neue Klassifikation am statistischen oberen Grenzwert für einen normalen mPAP. (Simonneau et al. 2019) Inwiefern die neue Klassifikation klinisch relevant ist, wird in der Wissenschaft lebhaft diskutiert (Kovacs and Olschewski 2019).

Eingeteilt wird die PH hämodynamisch in 3 Kategorien, die präkapilläre PH, die isoliert postkapilläre PH und die kombinierte prä- und postkapilläre PH, wie in Tabelle 1 dargestellt (Simonneau et al. 2019). Außerdem wird die PH klinisch in 5 Gruppen kategorisiert, diese Kategorien sind in Tabelle 2 dargestellt. Die präkapilläre PH wird durch einen mPAP >20 mmHg, einen PAWP ≤ 15 mmHg und einen PVR ≥ 3 WU definiert. Die isolierte postkapilläre Form wiederum durch einen mPAP >20 mmHg, einen PAWP ≥ 15 mmHg und einen PVR <3 WU. Die kombiniert prä- und postkapilläre PH wird im Unterschied zur isolierten postkapillären Form durch einen PVR ≥ 3 WU definiert (Simonneau et al. 2019).

Die Einteilung in die 5 klinischen Gruppen ist komplex, da die Gruppen noch weiter in Untergruppen eingeteilt werden (Simonneau et al. 2019). In der Gruppe 1 wird die Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) zusammengefasst. In Gruppe 2 findet man die PH-Formen, die auf eine Erkrankung des linken Herzens zurückgehen. In Gruppe 3 wiederum sind die PH-Formen eingeteilt, die durch Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie verursacht werden. Pulmonale Hypertonie der Gruppe 4 wird durch pulmonal-arterielle Verengungen ausgelöst. In dieser Gruppe ist auch die chronisch-thromboembolische PH (CTEPH) vertreten. Die 5. Gruppe enthält letztlich PH-Formen, die durch unklare oder multifaktorielle Mechanismen verursacht werden (Simonneau et al. 2019).

Tabelle 1: Einteilung der Pulmonalen Hypertonie (PH) nach der zugrundeliegenden Hämodynamik (modifiziert nach Simonneau et al. 2019)

Definition	Charakteristika	Klinische Gruppen [#]
Präkapilläre PH	mPAP >20 mmHg PAWP ≤15 mmHg PVR ≥3 WU	1,3,4 und 5
Isolierte postkapilläre PH	mPAP >20 mmHg PAWP >15 mmHg PVR <3 WU	2 und 5
Kombinierte prä- und postkapilläre PH	mPAP >20 mmHg PAWP >15 mmHg PVR ≥3 WU	2 und 5

mPAP: pulmonal-arterieller Mitteldruck, PAWP: pulmonal-arterieller Verschlussdruck, PVR: Pulmonal-
vaskulärer Widerstand; # siehe Tabelle 2

1.2.2 Pathophysiologische und pathobiologische Veränderungen

1.2.2.1 Ätiologie der PAH

Die allgemeine Definition der PH verdeckt die Tatsache, dass das Krankheitsbild sehr heterogen ist und es folglich eine Vielzahl an unterschiedlichen pathobiologischen Prozessen geben muss (Kumar et al. 2016). Am besten erforscht sind diese Veränderungen bei der pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) oder genauer, bei der idiopathischen pulmonal-arteriellen Hypertonie (IPAH) (Kumar et al. 2016).

Die Krankheit kann sich neben einer genetischen Disposition durch verschiedenste Mechanismen manifestieren (Erdmann 2011). Als erste Ursache sei hier die endotheliale Dysfunktion genannt. Durch diese kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen vasodilatierenden und vasokonstriktiven Mediatoren (z.B. einer verminderten Freisetzung von Prostacyclin und NO). Daraus resultiert eine Vasokonstriktion der Lungenstrombahn und ein gesteigerter mPAP und PVR (Erdmann 2011). An kleinen und mittelgroßen Arterien tritt neben der endothelialen Dysfunktion ein vaskuläres Remodeling auf. Hierbei handelt es sich um einen Umbau der Gefäßwand, der durch Inflammation, Hypoxie und metabolische Dysfunktionen ausgelöst wird. Beim Remodeling sind die Prozesse in den einzelnen Lagen der Gefäßwand gesondert zu betrachten (Stacher et al. 2012).

Tabelle 2: Aktuelle Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie (modifiziert nach Simonneau et al. 2019; Kovacs et al. 2016)

1 PAH
<ul style="list-style-type: none"> 1.1 idiopathisch 1.2 hereditär 1.3 durch Medikamente/Toxine 1.4 assoziiert mit <ul style="list-style-type: none"> 1.4.1 Bindegewebserkrankungen 1.4.2 HIV-Infektion 1.4.3 portaler Hypertension 1.4.4 angeborenen Herzfehlern 1.4.5 Schistosomiasis 1.5 PAH langzeitreagibel auf Calciumkanalblocker 1.6 Pulmonale veno-okklusive Erkrankung bzw. pulmonale kapilläre Hämangiomatose 1.7 Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
2 Pulmonale Hypertonie infolge von Linksherzerkrankungen
<ul style="list-style-type: none"> 2.1 linksventrikuläre systolische Dysfunktion 2.2 linksventrikuläre diastolische Dysfunktion 2.3 Klappenerkrankungen 2.4 angeborene/erworbene kardiovaskuläre Bedingungen, die zu postkapillärer PH führen
3 Pulmonale Hypertonie infolge von Lungenerkrankungen bzw. Hypoxie
<ul style="list-style-type: none"> 3.1 obstruktive Lungenerkrankung 3.2 restriktiver Lungenerkrankung 3.3 andere Lungenerkrankung mit gemischt restriktivem und obstruktivem Muster 3.4 Hypoxie ohne Lungenerkrankung 3.5 Entwicklungsstörungen der Lunge
4 Pulmonale Hypertonie infolge von Obstruktion der Pulmonalarterien
<ul style="list-style-type: none"> 4.1 chronisch thromboembolische PH 4.2. andere pulmonal-arterielle Obstruktion
5 PH mit unklarem bzw. multifaktoriellem Mechanismus
<ul style="list-style-type: none"> 5.1 hämatologische Erkrankungen 5.2 systemische Erkrankungen und metabolische Erkrankungen 5.3 andere (pulmonale thrombotische Mikroangiopathie, fibrosierende Mediastinitis, chronisches Nierenversagen mit/ohne Dialyse, segmentale pulmonale Hypertonie) 5.4 komplexe angeborene Herzfehler

1.2.2.2 Ätiologie der CTEPH

Die chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) ist in der 4. PH-Gruppe aufgeführt. Die pathologischen Veränderungen, die zur CTEPH führen, sind bedingt durch vernarbendes thromboembolisches Material und ein verändertes vaskuläres Remodeling (Ghofrani et al. 2013). Dieses Remodeling kann durch eine gestörte Angiogenese, eingeschränkte Fibrinolyse und endotheliale Dysfunktion ausgelöst oder verstärkt werden. Die CTEPH ist durch einen erhöhten pulmonalen Gefäßwiderstand, einen fortschreitenden pulmonalen Hypertonus und ein erhöhtes Risiko für Rechtsherzversagen charakterisiert (Kim et al. 2019).

1.2.2.3 Intima-Remodeling

In dieser Schicht kommt es zu einer gesteigerten Endothelzellproliferation, dies führt zu plexiformen Läsionen, also Endothelzellwucherungen. Außerdem häufen sich in der Intima Myofibroblasten an. Es kommt zur Vermehrung der extrazellulären Matrix, folglich zu einer Obliteration des Lumens der Pulmonalarterie (Tuder 2014; Erdmann 2011). Eine weitere wichtige Rolle spielt die frühe Apoptose der Endothelzellen. Diese führt dazu, dass die Entstehung von Endothelzellen, die resistent gegen Apoptose sind, gefördert wird. Dadurch könnten diese Zellen unkontrolliert proliferieren (Thompson and Rabinovitch 1996; Alastalo et al. 2011).

1.2.2.4 Media-Remodeling

Es kommt zur Hypertrophie der Media durch eine gesteigerte Proliferation von glatten Muskelzellen (Stacher et al. 2012). Physiologisch macht die Media 10-15% des Außendurchmessers einer normalen Pulmonalarterie aus, bei der IPAH erreicht sie Werte von 30-60% (Chazova et al. 1995). Die Hypertrophie der Media hat zwar durchaus eine wichtige Bedeutung für die Pathogenese der PH, allerdings kann man aus dem Ausmaß der Hypertrophie nur schwer ableiten, wie stark die Hypertonie ausgeprägt ist oder wie groß das Potenzial für das Ansprechen auf Vasodilatoren ist (Tuder 2014).

1.2.2.5 Adventitia-Remodeling

Die Adventitia der Blutgefäße dient dem Empfang, der Verarbeitung, Speicherung und Freisetzung von Regulatoren der Gefäßwandfunktion, außerdem wird sie als „Verletzungssensor“ bezeichnet (Stenmark et al. 2006). Den Hauptanteil der Adventitia machen Fibroblasten aus, allerdings zirkulieren auch Progenitorzellen, die sich zu glatten Muskelzellen oder Endothelzellen entwickeln können, somit trägt sie zu den pathophysiologischen Veränderungen der Gefäße bei (Hu et al. 2004; Torsney et al. 2005).

Physiologisch liegt der Anteil der Adventitia am Außendurchmesser bei 15%, bei Patienten mit IPAH kann der Anteil auf bis zu 28% steigen (Chazova et al. 1995).

1.2.2.6 Rolle der Inflammation bei der PAH

Die Beweise häufen sich, dass die Entzündung eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der PH und insbesondere der PAH spielt (Tuder 2014). Zwischen perivaskulären Entzündungen und pulmonalvaskulärem Remodeling besteht eine hohe Korrelation und eine statistisch signifikante Beziehung (Tuder 2014). Obwohl die Entzündung bei der PAH gut beschrieben wurde, blieb unklar, ob die Entzündung als Ursache oder Folge der PAH anzusehen ist. (Dorfmueller et al. 2003) In neueren Studien konnte bewiesen werden, dass die Entzündung eine Ursache für die PH ist, da sie einem geänderten Immunprozess und darauffolgend, einem vaskulären Remodeling vorausgeht (Tamosiuniene et al. 2011; Rabinovitch et al. 2014).

1.2.3 Klinik der Pulmonalen Hypertonie

Oft wird frühen Symptomen einer PH nicht genügend Bedeutung beigemessen, da sie nur leicht ausgeprägt und uncharakteristisch sind (Leschke et al. 2009). Das Leitsymptom der PH ist die Belastungsdyspnoe, hinzu kommen Erschöpfung bzw. Müdigkeit, Angina Pectoris, Synkopen und periphere Ödeme. Die wichtigsten Symptome und die relative Häufigkeit ihres Auftretens als erstes Symptom und des Vorhandenseins bei Diagnosestellung sind in Tabelle 3 aufgelistet. Das Ausmaß der Belastungsdyspnoe wurde von der WHO in 4 Klassen eingeteilt und entspricht größtenteils der NYHA-Klassifikation für Herzinsuffizienz (Leschke et al. 2009).

Tabelle 3: Beschwerden bei pulmonaler Hypertonie. In der Tabelle werden Häufigkeiten für typische Symptome der PH angegeben. Dabei wird unterschieden, wie häufig ein Symptom als erstes Symptom auftritt und wie häufig ein Symptom bei der Diagnose einer PH bereits vorhanden ist. (modifiziert nach Leschke et al. 2009)

Klinisches Symptom	Als erstes Symptom	Bei Diagnose
Luftnot bei Belastung	60%	98%
Müdigkeit	19%	73%
Thorakale Schmerzen	7%	47%
Schwächeanfälle	5%	41%
Synkope	8%	33%
Beinödeme	3%	37%
Herzpalpitationen	3%	33%

1.2.4 Diagnostik der Pulmonalen Hypertonie

Wenn bei einem Patienten im Rahmen körperlicher Untersuchung oder unspezifischer klinischer Tests, wie EKG oder Röntgen-Thorax, der Verdacht einer pulmonalen Hypertonie aufkommt, sollte mittels eines speziellen Algorithmus eine weitere Abklärung erfolgen. Der Algorithmus enthält neben nicht-invasiven Maßnahmen, wie Echokardiographie, Spiroergometrie und Biomarkern, auch invasive Verfahren, wie eine Rechtsherzkatheter-Untersuchung und ggf. einen Vasoreagibilitätstest (Galiè et al. 2009, Hoeper et al. 2010).

Die erste Stufe im Diagnose-Algorithmus bildet die Echokardiografie (Frost et al. 2019). Mit Hilfe dieser Untersuchung kann die Wahrscheinlichkeit ermittelt werden, dass eine PH vorliegt. Ausgewählte Hochrisiko-Patienten sollen dann sofort an ein PH-Expertenzentrum überwiesen werden. Liegt ein hohes oder mittleres Risiko für eine PH vor, sollte eine Ventilations-Perfusions-Szintigrafie erwogen werden. Zeigt diese einen auffälligen Befund, soll der Patient zur CTEPH-Diagnostik an ein PH-Zentrum weitergeleitet werden. Außerdem muss erforscht werden, ob bei dem Patienten die häufigsten Ursachen einer PH, nämlich Linksherz- und Lungenerkrankungen, vorliegen. Ist dies nicht der Fall, sollte die weitere Diagnostik und Therapie in einem PH-Expertenzentrum erfolgen. In diesem kann die PH durch eine Rechtsherzkatheter-Untersuchung diagnostiziert bzw. ausgeschlossen werden (Frost et al. 2019).

1.2.5 Therapie der Pulmonalen Hypertonie

1.2.5.1 Allgemeine Maßnahmen und supportive Therapie

Allgemein wird PH-Patienten empfohlen sich, im Rahmen ihrer Möglichkeiten und ohne Beschwerden auszulösen, zu bewegen. Bei trainierten Patienten konnte so ein verbesserter 6-Minuten-Lauftest (6MWD) und eine höhere Lebensqualität festgestellt werden (Grünig et al. 2016).

Eine Antikoagulation bei PAH-Patienten wird nicht generell empfohlen, verschiedene Registerdaten und Studien zeigten unterschiedliche Effekte durch die Antikoagulation. Diese Empfehlung betrifft jedoch nicht die Antikoagulation bei Vorhofflimmern oder Thromboembolien (Olsson et al. 2014). Die Anwendung von Diuretika ist bei einer dekompensierten Rechtsherzinsuffizienz indiziert, obwohl es an randomisierten Studien zum Nutzen mangelt, der Nutzen von Diuretika hat sich im klinischen Alltag jedoch bewährt (Cohn 2001; Galiè et al. 2016). Die Sauerstoffsättigung bei PAH-Patienten sollte bei >90% liegen. Eine Sauerstoffgabe über Nacht verbessert die Leistungsfähigkeit am Tag und die kardiale Repolarisation (Hildenbrand et al. 2012; Ulrich et al. 2015).

1.2.5.2 Medikamentöse Therapie der pulmonal arteriellen Hypertonie

Die gezielte Therapie der PAH wird durch eine Risikostratifizierung gesteuert, dabei werden die Patienten in eine niedrige, intermediäre oder hohe Risikoklasse eingeordnet. Die Auswahl der Kombinationstherapie richtet sich unter anderem nach diesen Risikoklassen (Galiè et al. 2016).

Zur Behandlung der PAH sind in Deutschland Medikamente aus den folgenden Substanzklassen zugelassen. Phosphodiesterase-5-Hemmer (Sildenafil, Tadalafil u.a.), lösliche-Guanylatcyclyase-Stimulatoren (Riociguat), Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (Ambrisentan, Bosentan) und Prostacyclin-Analoga (Iloprost, Epoprostenol, Treprostinil) (Hoepfer et al. 2016). Eine Sonderstellung nehmen Kalzium-Antagonisten (Nifedipin u.a.) ein, da sie nur einem kleinen Anteil der Patienten nutzen (Hoepfer et al. 2016).

1.2.5.3 Monoklonale Antikörper in der Therapie der PH

Bisher wurde für die Therapie der PH kein monoklonaler Antikörper zugelassen. Studien mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib erbrachten zwar vielversprechende Ergebnisse, allerdings wurde die Zulassung aufgrund des Auftretens von schweren Nebenwirkungen gestoppt (Ghofrani et al. 2010; Olschewski 2015).

Nintedanib, ein weiterer Tyrosinkinaseinhibitor, wurde daraufhin von uns in einer Studie untersucht. Allerdings konnte in dieser Studie keine Verbesserung der hämodynamischen Parameter und der Rechtsherzfunktion der Patienten festgestellt werden (Richter et al. 2018). Im Rahmen von Vorarbeiten zur vorliegenden Dissertation war ich an dieser Studie beteiligt, ausführlichere Informationen sind in einem Exkurs auf Seite 76 dargestellt.

1.2.5.4 Therapie der CTEPH

Für Patienten, die unter CTEPH leiden, ist die einzige kurative Therapie die Endarteriektomie, jedoch ist die CTEPH nur bei 63% operabel, bei 5-35% bleibt der Pulmonale Hypertonus trotz OP erhalten oder kehrt wieder (Ghofrani et al. 2013). Die Endarteriektomie ist ein komplizierter Eingriff, der das Prinzip verfolgt, vernarbtes thrombotisches Material zu entfernen und somit den Blutfluss in den betroffenen Pulmonalarterien zu normalisieren (Jenkins 2015).

Bei Patienten, die inoperabel waren oder bei denen die Endarteriektomie nicht erfolgreich war, konnte in der Phase-3-Studie CHEST-2 mit Riociguat eine Steigerung der Belastbarkeit (6MWD) und der Herzauswurfleistung festgestellt werden, NT-pro-BNP und mPAP sanken (Ghofrani et al. 2013).

1.3 Biomarker der Pulmonalen Hypertonie

1.3.1 Definition und Überblick

Der Begriff Biomarker wurde 1998 vom National Institute of Health als „ein Charakteristikum, das als Indikator normaler biologischer Prozesse, pathogener Prozesse oder pharmakologischer Antworten auf eine therapeutische Intervention objektiv gemessen und erhoben werden kann“ definiert (Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework 2001).

Damit ein Biomarker nützlich für den klinischen Alltag ist, muss er verlässlich, reproduzierbar, günstig und einfach zu interpretieren sein (Maron et al. 2016, p. 231). Momentan existiert kein für die PAH spezifischer diagnostischer Biomarker, die Liste an potenziellen Kandidaten wird aber stetig länger (Leuchte et al. 2016).

Als Prognose- und Verlaufsparemeter hat sich das das Brain Natriuretic Peptide (BNP) und das N-terminale Fragment des pro-BNP (NT-pro-BNP), das ein Nebenprodukt der BNP-Synthese darstellt, etabliert (McLaughlin et al. 2013; Hammerer-Lercher et al. 2001; Galiè et al. 2016).

Als vielversprechende diagnostische Biomarker seien an dieser Stelle die soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) und der Placental growth factor (PlGF) genannt (Tiede et al. 2015). Diese Marker werden aktuell noch erforscht, sie könnten allerdings die ersten diagnostischen Biomarker für die PH darstellen. In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Plasmaspiegel von sFlt-1 und PlGF bei Patienten mit unterschiedlichen PH-Formen signifikant erhöht waren. Für die Diagnose einer PH wies die Kombination von sFlt-1 und PlGF außerdem eine Sensitivität von 83,7% und eine Spezifität von 100% auf (Tiede et al. 2015).

Es sind Biomarker erforscht worden, die mit verschiedenen Aspekten der Pathophysiologie der PAH oder anderen Formen der PH korrelieren. Die möglichen Biomarker sind Indikatoren für endotheliale Dysfunktion, Inflammation, oxidativen Stress, Rechtsherzversagen oder pulmonal-arterielles Remodeling (Leuchte et al. 2016).

Das hauptsächliche Problem bei der Etablierung neuer Biomarker ist die mangelhafte Studienlage (Maron et al. 2016, p. 231).

1.3.2 Biomarker für Endotheliale Dysfunktion

Als möglicher Biomarker für eine endotheliale Dysfunktion wurden die Endotheline (ET) erforscht. Von besonderer Bedeutung für die pulmonale Hypertonie ist das ET-1, da es gehäuft in der Lunge vom Endothel produziert wird und einer der stärksten Vasokonstriktoren ist (Shao et al. 2011). In einer Studie wurde bei PAH-Patienten festgestellt, dass ET-1 erhöht war und ET-3 (Endothelin-3) erniedrigt (Montani et al. 2007). Aus diesen Werten wurde eine ET-1/ET-3-Ratio berechnet. Eine Erhöhung der ET-1/ET-3-Ratio ging mit einer schlechteren Prognose einher (McMahon and Bryan 2017). ET-Rezeptorblockade und NO-Konzentration verhalten sich reziprok zueinander, dies konnte auch in einer Studie gezeigt werden, in der die NO-Konzentration in der Ausatemluft, unter Therapie mit Endothelin-Rezeptorantagonisten, anstieg (Girgis et al. 2005). Die kombinierte Messung von NO und ET-1 bzw. ET-3 könnte also zum Monitoring einer Therapie mit Endothelin-Rezeptorantagonisten verwendet werden (McMahon and Bryan 2017).

Als weiterer Biomarker für endotheliale Dysfunktion wurde der von-Willebrand-Faktor (vWF) erforscht. Der vWF ist ein großes, von Endothelzellen und Megakaryozyten produziertes, Glykoprotein, das wichtig bei der Gerinnungsbildung ist. Seine Funktion besteht unter anderem darin, dass es den Faktor VII stabilisiert, aktiviert, an IIb/IIIa-Rezeptoren bindet und so Thrombozyten aktiviert und rekrutiert (Chin et al. 2003; Folsom et al. 1997; Ware et al. 2004). In einer Studie konnte eine Korrelation zwischen dem vWF-Spiegel und einem schlechteren Überleben von Patienten mit idiopathischer, familiärer und Appetitzügler-induzierter PH festgestellt werden (Kawut et al. 2005). In einer anderen Arbeit wurde eine Korrelation zwischen dem vWF-Spiegel und PAH, ausgelöst durch kongenitale Herzfehler, nachgewiesen (Lopes et al. 2011).

Mögliches Potential für die Nutzung als Biomarker wurde außerdem bei Angiotensin-1 und Angiotensin-2 vermutet, die antagonistisch die Vaskularisation und das Remodeling beeinflussen (Kümpers et al. 2010). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Angiotensin-2, nicht allerdings Angiotensin-1, mit der Krankheitsschwere korreliert (Kümpers et al. 2010).

Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) ist ein endogener Inhibitor der NO-Produktion (Anwar et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass durch Endothelschäden die Plasmakonzentration von ADMA erhöht wird. Diese erhöhte Plasmakonzentration bewirkt, dass die NO-Produktion gehemmt wird und somit der Gefäßtonus steigt. In der Studie wurde suggeriert, dass ADMA einen möglichen Biomarker für die Progression der PAH darstellen könnte (Zhang et al. 2015).

1.3.3 Biomarker für Inflammation

Interleukine, wie IL-1 und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) sind inflammatorische Zytokine und können das Überleben von Patienten mit PAH vorhersagen (Humbert et al. 1995; Soon et al. 2010; Maron et al. 2016). Außerdem wurden erhöhte Spiegel des Vascular endothelial growth factor (VEGF), plateled derived growth factor (PDGF), tranforming growth factor- β (TGF- β) und IL-6 nachgewiesen (Selimovic et al. 2009).

Einen weiteren Entzündungsmarker stellt das C-reaktive Protein (CRP) dar, dieses ist bei Patienten mit PAH und CTEPH erhöht und korreliert mit dem Überleben (Quarck et al. 2009). Nach Therapiebeginn und bei der CTEPH nach Endarteriektomie, konnte eine Normalisierung des Spiegels festgestellt werden. Diese Tatsache führt zu der Annahme, dass CRP als Biomarker für die Schwere der Erkrankung und die Wirksamkeit der Therapie bei PAH genutzt werden könnte (Quarck et al. 2009).

Bei PAH-Patienten wurden in Lungenbiopsien Infiltrate aus Makrophagen und Lymphozyten gefunden (Balabanian et al. 2002). Das Chemokin CX₃C Fraktalkin wird von Endothelzellen produziert und dient der Rekrutierung von Leukozyten (Balabanian et al. 2002). Die Besonderheit liegt darin, dass dieses Chemokin auch bei einer hohen Blutflussgeschwindigkeit Leukozyten fangen kann. Bei PAH-Patienten konnte eine erhöhte Expression dieser Chemokine festgestellt werden (Balabanian et al. 2002).

1.3.4 Biomarker für niedriges Herzzeitvolumen und Hypoxie

Der arterielle Kohlendioxid-Partialdruck (pCO₂) ist bei vielen IPAH-Patienten erniedrigt (M. M. Hoeper et al. 2007). In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass ein niedriger pCO₂ mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Da der pCO₂ einfach und wiederholt zu erheben ist, würde er sich als Biomarker eignen, um Aussagen über die Schwere der Erkrankung zu treffen (M. M. Hoeper et al. 2007).

Der Growth-differentiation factor (GDF-15) ist ein Zytokin, das bei Patienten mit akuten Lungenembolien und chronischem Linksherzversagen prognostische Informationen liefert (Nickel et al. 2008). Bei IPAH-Patienten konnten ebenfalls erhöhte GDF-15-Spiegel nachgewiesen werden. Der GDF-15-Spiegel korrelierte mit hämodynamischen Parametern und konnte, zusätzlich zu den hämodynamischen Parametern und NT-pro-BNP, prognostische Informationen liefern. Aus diesen Ergebnissen schließen die Autoren, dass GDF-15 als Biomarker für die IPAH Verwendung finden könnte (Nickel et al. 2008).

Osteopontin (OPN) ist ein Zytokin, das an der Pathogenese der IPAH beteiligt sein soll (Lorenzen et al. 2011). In einer Studie konnten bei IPAH-Patienten erhöhte OPN-Spiegel

nachgewiesen werden. Diese Spiegel korrelierten mit dem Überleben und der NYHA-Klassifikation. Die Resultate führten zu der Annahme, dass OPN ein möglicher Biomarker für die IPAH sein könnte (Lorenzen et al. 2011).

Harnsäure ist das Endprodukt des Purin-Abbaus und fällt unter hypoxischen Bedingungen, wie COPD oder chronischem Herzversagen, vermehrt im Gewebe an (Bendayan et al. 2003). Erhöhte Harnsäurespiegel, die bei Patienten mit PAH gemessen wurden, waren verbunden mit einer schlechteren Hämodynamik und einer erhöhten Mortalität (Nagaya et al. 1999).

1.3.5 Biomarker für myokardialen Stress

Bei Druck- oder Volumenbelastung werden von Kardiomyozyten die Peptidhormone Atriales-natriuretisches Peptid (ANP) und das Brain-natriuretische Peptid (BNP) freigesetzt, ANP wird hauptsächlich bei einer Dehnung des Vorhofs ausgeschüttet, während BNP eher bei einer ventrikulären Belastung ausgeschüttet wird (Maron et al. 2016, p. 233). Wie bereits erwähnt, ist der derzeit in der Klinik hauptsächlich verwendete serologische Parameter das BNP bzw. das NT-pro-BNP. Im Vergleich der COPD, in Verbindung mit einem Cor pulmonale, zur COPD ohne Cor pulmonale, wurden erhöhte BNP-Spiegel gemessen, weshalb sich BNP zur Unterscheidung zwischen kardial oder pulmonal bedingter Dyspnoe eigne (Bando et al. 1999; Morrison et al. 2002). NT-pro-BNP ist ein Nebenprodukt der BNP-Synthese und hat gegenüber BNP den Vorteil, dass es stabiler ist und eine akkuratere Analyse ermöglicht (Hammerer-Lercher et al. 2001).

Sowohl BNP als auch NT-pro-BNP korrelieren mit der NYHA-Klasse und dem 6MWD. Außerdem konnte eine Korrelation mit hämodynamischen Parametern festgestellt werden (Mauritz et al. 2011). Des Weiteren ist eine Senkung von NT-pro-BNP von >15%/Jahr mit einem verbesserten Überleben assoziiert (Mauritz et al. 2011). In weiteren Studien konnte festgestellt werden, dass NT-pro-BNP mit dem Behandlungserfolg korreliert (McLaughlin et al. 2010; Galiè et al. 2008).

Ein weiterer Biomarker ist kardiales Troponin T (Maron et al. 2016, p. 234). Bei myokardialen Schaden gelangt es vermehrt ins Blut, kann dort nachgewiesen werden und als Indikator für eine rechtsventrikuläre Dysfunktion bei PAH-Patienten genutzt werden (Maron et al. 2016, p. 234). Bei Patienten mit PAH und CTEPH korreliert der Troponin-T-Spiegel mit dem Überleben (Torbicki et al. 2003).

2. Carboanhydrasen IX und XII und ihre potenzielle Bedeutung in der Pathophysiologie der PH

2.1 Definition

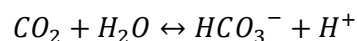
Die Carboanhydrasen (CA) wurden 1932 entdeckt, 10 Jahre später fand man heraus, dass in dem Enzym ein Zinkion enthalten ist (Berg et al. 2013, S. 270–271). Damit war die CA das erste bekannte Enzym, das ein Zinkion enthält. Die Reaktivität von Metallionen ist auf ihre positive Ladung zurückzuführen, sie können starke, aber instabile, Verbindungen aufbauen und zum Teil in unterschiedlichen Oxidationsstufen vorliegen. Zink liegt in biologischen Systemen allerdings nur in der Oxidationsstufe +2 vor, ein Zinkion ist immer an 4 Liganden gebunden. Bei der Carboanhydrase sind 3 der Koordinationsstellen durch Imidazolringe von 3 Histidinresten besetzt, die letzte Stelle von Wasser (Berg et al. 2013, S. 270–271).

2.2 Einteilung der Carboanhydrasen

Die Carboanhydrasen werden 5 Klassen zugeordnet, nämlich α , β , γ , δ und ζ (Frost and McKenna 2014, S. 10). Bei Säugetieren kommen nur CA der Klasse α vor. In der Klasse der α -CA wurden, Stand heute, 16 Isoenzyme entdeckt. Die Carboanhydrasen sind an unterschiedlichen Stellen der Zelle lokalisiert. Es gibt acht CA, die im Zytosol lokalisiert sind (CA I, CA II, CA III, CA VII, CA VIII, CA X, CA XI, CA XIII), zwei im Mitochondrium (CA VA, CA VB), eine CA, die von der Zelle sezerniert wird (CA VI), zwei CA, die über Glykosylphosphatidylinositol an der Zelle verankert sind (CA IV und CA XV) und drei Transmembranproteine (CA IX, CA XII, CA XIV). Die verschiedenen CA unterscheiden sich außerdem hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität (Frost and McKenna 2014, S. 10). Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Isoenzyme.

2.3 Funktion

Alle Carboanhydrasen katalysieren die gleiche Reaktion, die Hydrierung von Kohlenstoffdioxid (CO_2) (Frost and McKenna 2014, S. 10). Die Reaktionsgleichung lautet wie folgt:



Diese Reaktion erlaubt es den CA die intra- und extrazellulären Konzentrationen von CO_2 , H^+ und HCO_3^- zu regulieren. Bereits unkatalysiert ist diese Reaktion sehr schnell. Durch die CA kann die Reaktion allerdings bis zu 1 Millionen Mal pro Sekunde ablaufen (Frost and McKenna 2014, S. 10).

Die Carboanhydrasen haben im menschlichen Körper viele Funktionen (Frost and McKenna 2014, S. 10). Dazu gehören unter anderem Gasaustausch, Transport von CO_2 und HCO_3^- über Zellmembranen, Säure-Base-Ausgleich, Sekretion, Kalzifikation, Signalübertragung und Proliferation. Diese sehr unterschiedlichen Funktionen werden von spezifischen Isoformen der CA ausgeführt (Frost and McKenna 2014, S. 10).

Die wohl meistbekannte Funktion der CA liegt in der Ausscheidung von CO_2 (Frost and McKenna 2014, S. 10). Diese Funktion wird bei Säugetieren von den CA I und CA II ausgeführt, die sich im Zytosol der Erythrozyten befinden. CO_2 , das im Gewebe entsteht, diffundiert in die Erythrozyten und wird dort zur Transportform HCO_3^- hydriert. Das entstehende H^+ -Ion wird vom Hämoglobin gepuffert. In der Lunge geschieht die gegenteilige Reaktion, CO_2 wird frei, diffundiert über die Wasser-Gas-Grenze und kann abgeatmet werden (Frost and McKenna 2014, S. 10).

Außerdem sind die CA indirekt an der O_2 -Aufnahme und -Abgabe beteiligt (Behrends 2010, S. 252–253). In der Peripherie verlässt ein Teil des entstehenden HCO_3^- den Erythrozyten im Antiport mit einem Chloridion (Hamburger Shift). In der Folge wird der Erythrozyt angesäuert. Dadurch und durch eine gesteigerte CO_2 -Konzentration kommt es zur Abnahme der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins (Bohr-Effekt). Die Folge ist eine erleichterte O_2 -Abgabe an das Gewebe (Behrends 2010, S. 252–253).

In dieser Arbeit wurden die membrangebundenen CA IX und CA XII untersucht, daher gehe ich im Folgenden auf die Funktionen der membrangebundenen CA ein. Diese CA katalysieren die Hydrierung von CO_2 im Extrazellulärraum (Frost and McKenna 2014, S. 17–18). Die erste gefundene membrangebundene CA ist die CA IV, die über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden ist. Die CA IV wurde in Lunge, Niere, Herz, Gehirn, im Kapillarbett des Auges und in Erythrozyten nachgewiesen. In der Niere ist sie an der Bikarbonatresorption beteiligt. In der Retina sorgt die CA IV für einen Ausgleich des Säure-Base-Haushalts. Obwohl CA IV in der Retina nicht nachgewiesen werden konnte, wird diese Annahme aus der Tatsache hergeleitet, dass eine Mutation im CA IV-Gen zu einer Form der Retinitis pigmentosa führt (Frost and McKenna 2014, pp. 17–18).

Die am wenigsten erforschte CA ist die CA XIV (Frost and McKenna 2014, p. 19). Diese membrangebundene CA weist strukturelle Ähnlichkeiten zur CA XII auf. Es wird davon ausgegangen, dass es funktionelle Überlappungen von CA XIV und CA IV gibt, da sie im Tubulussystem der Niere benachbart nachgewiesen werden können. Außerdem konnte für die CA XIV nachgewiesen werden, dass sie bei chronischer Hypoxie in Muskeln und Erythrozyten aktiver ist, um das Säure-Base-Gleichgewicht aufrecht zu erhalten (Frost and McKenna 2014, p. 19). Auf die Funktionen der membrangebundenen

Carboanhydrasen IX und XII wird jeweils in einem gesonderten Kapitel eingegangen (s. Kapitel 2.5.).

2.4 Katalytisches Prinzip der Carboanhydrasen

Die Carboanhydrasen erreichen bei pH 8 ihre beinahe maximale Reaktionsgeschwindigkeit, nimmt der pH ab, sinkt auch die Geschwindigkeit (Berg et al. 2013, pp. 270–271). Der Mittelpunkt dieses Übergangs befindet sich bei pH 7, daher kam die Annahme, dass für die optimale Aktivität der Carboanhydrase eine Gruppe wichtig sei, die bei pH 7 ein Proton verliert ($pK_s=7$) und die in deprotoniertem Zustand effizienter an der Katalyse teilnimmt (Berg et al. 2013, pp. 270–271). Obwohl es einige Aminosäuren mit einem pK_s von 7 gibt, ist es wahrscheinlicher, dass das an Zink gebundene Wasser die gesuchte Gruppe ist (Berg et al. 2013, pp. 270–271). Der Umstand, dass das Wassermolekül an das positiv geladene, zinkhaltige Zentrum gebunden ist, verringert den pK_s (Wasser) von 15,7 auf 7 (Berg et al. 2013, pp. 270–271). Das führt dazu, dass viele Wassermoleküle bei einem neutralen pH ein Proton verlieren. Übrig bleiben zinkgebundene Hydroxidionen, die nun nukleophil genug sind, um Kohlendioxid anzugreifen. Um Kohlendioxid in die räumliche Nähe des zinkgebundenen Hydroxidions zu bringen, besitzt die Carboanhydrase einen hydrophoben Bereich zur Bindung von Kohlendioxid (Berg et al. 2013, pp. 270–271). Diese zweistufige Reaktion und die Regeneration sind in Abbildung 1 dargestellt.

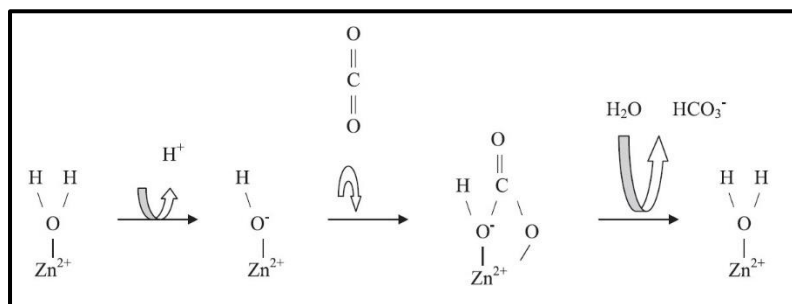


Abbildung 1 (Adeva-Andany et al. 2015) Zweistufiger Reaktionsmechanismus der Carboanhydrasen. Dargestellt ist das in Carboanhydrasen enthaltene Zink-Ion und das daran gebundene Wassermolekül. Nicht dargestellt sind die 3 Imidazolringe von 3 Histidinresten, die die restlichen Koordinationsstellen des Zinkions besetzen. Im ersten Schritt verliert das gebundene Wasser ein Wasserstoffproton, wird zum Hydroxidion und greift CO_2 an. Dabei entsteht ein Hydrogencarbonation und Wasser bindet erneut an das Zinkion.

Tabelle 4: (modifiziert nach Adeva-Andany et al. 2015) Isoenzyme der α -Carboanhydrasen. Dargestellt sind die bisher bekannten Carboanhydrasen, ihre katalytische Aktivität, die zelluläre Lokalisation, das Vorkommen in menschlichen Geweben, der Genlocus und Krankheiten, die mit den jeweiligen Carboanhydrasen assoziiert sind.

	Aktivität	Lokalisation	Vorkommen im menschlichen Gewebe	Gen	Angeborene Krankheiten
CA I	Mittel	Zytosol	Erythrozyten, Darm, Pankreas, Nebenniere	8q13-q22	Unwahrscheinlich
CA II	Hoch	Zytosol	Sehr weit verbreitet	8q22	Osteopetrose, Zerebrale Verkalkung, Azidose
CA III	Niedrig	Zytosol	Muskel, Erythrozyten	8q13-q22	
CA IV	Hoch	Plasmamembran	Gallengang, Pankreasausführungsgang, Niere, Lunge	17q23	
CA VA	Mittel	Mitochondrien	Leber	16q24.3	Hyperammonämie und Hyperlaktatämie
CA VB	>A	Mitochondrien	Pankreas, Speicheldrüsen, Niere, Muskel	Xp22.1	
CA VI	Niedrig		Exokrine Drüsen, Speichel	1p36.22-33	
CA VII		Zytosol	Speicheldrüsen, Gehirn	16q21-23	
CA IX		Plasmamembran	Magen, Darm, Pankreas, Gallengang	Undefiniert	
CA XII	Niedrig	Plasmamembran	Speicheldrüse, Pankreas, Niere, Kolon	15q22	Hyperchlorhidrose und Salzverlust
CA XIII	Mittel	Zytosol	Speicheldrüse, Testis, Ovar, Niere, Darm	8q21.2	
CA XIV	Mittel-niedrig	Plasmamembran		1q21	
CA XV			Kommt beim Menschen nicht vor	22q11.21	
CA VIII	Keine	Zytosol		8q	Zerebellare Ataxie und geistige Retardierung
CA X	Keine				
CA XI	Keine				

2.5 Membrangebundene Carboanhydrasen IX und XII

2.5.1 Carboanhydrase IX

Die CA IX ist ein Transmembranprotein, dessen aktives Zentrum sich im Extrazellulärraum (EZR) befindet, des Weiteren befindet sich im EZR eine Proteoglykan-ähnliche Domäne (Frost and McKenna 2014, p. 18). Ein transmembranärer Anteil verbindet den extrazellulären Anteilen mit dem Zytoplasma. Die CA IX liegt primär als Dimer vor, das über Disulfidbrücken miteinander verbunden ist (Frost and McKenna 2014, p. 18).

Eine erhöhte Expression von CA IX konnte in vielen humanen Tumoren nachgewiesen werden, in den korrespondierenden normalen Geweben hingegen nicht (Ivanov et al. 2001). In Nierenkrebszellen konnte durch die Hemmung der Carboanhydrasen mit Acetazolamid nachgewiesen werden, wie wichtig Carboanhydrasen für die Invasivität dieser Tumoren sind (Parkkila et al. 2000). Die genaue Rolle der CA in der Kanzerogenese ist nicht bekannt, es wurde aber nahegelegt, dass die membrangebunden CA IX und XII eine Ansäuerung des, den Tumor umgebenden, Gewebes verursachen und so Tumorwachstum und -ausbreitung fördern (Ivanov et al. 2001). In Studien wurde bewiesen, dass die CA IX in hypoxischen Regionen solider Tumoren exprimiert wird, außerdem haben Beobachtungen gezeigt, dass die CA IX unter hypoxischen Bedingungen in Zellkulturen exprimiert wird (Wykoff et al. 2000). Die CA IX könnte also eine wichtige Rolle bei der Anpassung von Tumoren an hypoxische Bedingungen spielen (Wykoff et al. 2000). Ein saurer extrazellulärer pH-Wert (pHe) spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Tumorerkrankungen, die CA IX könnte einen neutraleren pH_i aufrechterhalten und den pHe weiter absenken (Ivanov et al. 2001). Klinisch ist die CA IX nützlich, da die Expressionsauswertung in klinischen Proben sehr schnell, reproduzierbar und einfach ist (Juliette A. Loncaster et al. 2001). Das für CA IX codierende Gen heißt CA9, der Promotor dieses Gens wurde als HRE, also als Hypoxic Response Element, identifiziert (Wykoff et al. 2000). Die Expression der CA IX erstreckt sich neben den hypoxischen Gebieten im Tumor, auch auf andere Regionen (Olive et al. 2001). Aktiviert wird das HRE zusätzlich zur Hypoxie durch HIF-1 (Hypoxia inducible factor 1) (Wang and Semenza 1993).

2.5.2 Carboanhydrase XII

Die CA XII ist ebenfalls ein Transmembranprotein und ähnelt, von der Struktur her, der CA IX, allerdings kommt sie als Monomer vor und hat eine geringere katalytische Aktivität (Frost and McKenna 2014, p. 19). Das Gen, das für die CA XII kodiert heißt CA12 und befindet sich am Genlocus 15q22, es wird durch Hypoxie und zusätzlich durch

Östrogen induziert. In Analogie zum CA9-Gen ist auch das CA12-Gen ein Ziel des HIF-1. Analysen konnten zeigen, dass CA XII in Niere, Dickdarm, Lunge, Prostata, Ovarien, Endometrium, Brust und der basolateralen Membran von Darmepithelzellen vorkommt. Außerdem ist die CA XII in vielen Krebsformen (z.B. Nierenzellkarzinomen mit defektem VHL-Gen (von-Hippel-Lindau-Syndrom) und Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen) stark exprimiert und leistet ebenfalls einen Beitrag zu einem sauren Mikromillieu. Es konnte in vitro nachgewiesen werden, dass eine CA XII-Hemmung die Tumorzellmigration und -invasion hemmt (Battke et al. 2011). Neben der Expression in Tumorzellen, konnten erhöhte CA XII-Spiegel auch beim Glaukom und in atherosklerotischen Plaques festgestellt werden. Des Weiteren wird vermutet, dass die CA XII an der Bikarbonatresorption der Niere beteiligt ist (Frost and McKenna 2014, p. 19;).

2.6 Carboanhydrasen IX und XII bei verschiedenen Erkrankungen

2.6.1 Studien zur Expression von CA IX und CA XII in verschiedenen Tumoren

Da die CA IX und CA XII in vielen Krebsarten vermehrt exprimiert sind, werden sie als mögliche Biomarker in der Krebsdiagnostik diskutiert (Span et al. 2003). Eine Herangehensweise in den veröffentlichten Studien war der Nachweis einer erhöhten Expression im Tumorgewebe. Eine erhöhte CA IX-Expression im Tumorgewebe geht beispielsweise beim Mammakarzinom mit einem schlechteren Outcome einher, da erhöhte Werte eine Hypoxie anzeigen, die mit einem schlechteren Ansprechen auf die Therapie assoziiert ist (Span et al. 2003).

In einer weiteren Studie, in der die CA IX-Expression in neuroendokrinen Tumoren des Pankreas untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass die CA IX-Expression positiv mit der Größe des Tumors und negativ mit dem rezidivfreien Überleben korrelierte (Kim et al. 2018).

Die Expression von CA XII im Tumorgewebe wurde außerdem in einer Studie zu invasiven Mammakarzinomen nachgewiesen (Watson et al. 2003). Die Autoren konnten außerdem feststellen, dass eine erhöhte CA XII-Expression im Tumorgewebe mit einer besseren Prognose assoziiert ist (Watson et al. 2003).

2.6.2 Studien zu CA IX-Plasma-/Serumspiegeln

Eine weitere Herangehensweise ist die Bestimmung der CA-Spiegel im Blut. Hierbei werden in den Studien verschiedene Materialien verwendet. Die meisten Studien nutzen das Blutserum, während in anderen Studien Blutplasma untersucht wurde. Auch die

Endpunkte der Studien unterscheiden sich. Einige Studien vergleichen die CA-Spiegel von Kranken mit dem von Gesunden. Andere Studien untersuchten ein Kollektiv erkrankter Patienten, um eine Korrelation mit dem Therapieansprechen oder dem Überleben der Patienten festzustellen. Die Erkrankungen, die in diesen Studien untersucht wurden, sind zum größten Teil onkologische Erkrankungen. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Studien ist in Tabellen 5 und 6 dargestellt.

In einer Studie zum Mammakarzinom konnte keine Korrelation der Serum-CA IX-Werte mit dem Outcome der Patienten festgestellt werden (Schütze et al. 2013).

In einer weiteren Studie zu Mammakarzinomen wurden unter anderem Baseline-Werte bestimmt (Brown-Glaberman et al. 2016). Diese Werte zeigten eine signifikante Erhöhung der CA IX-Spiegel bei metastasiertem Mammakarzinom (MBC; metastatic breast cancer) im Gegensatz zur gesunden Vergleichsgruppe und Patientinnen mit einem lokal fortgeschrittenen Mammakarzinom (LABC; Locally advanced breast cancer) (Brown-Glaberman et al. 2016).

Eine Arbeit zum Zervixkarzinom konnte weder eine Korrelation der präoperativ erhobenen CA IX-Serumspiegel mit der intratumoralen CA IX-Expression noch mit anderen klinisch-pathologischen Variablen feststellen (Woelber et al. 2011).

Beim Ovarialkarzinom ist bekannt, dass CA IX im Tumor vermehrt exprimiert wird (Woelber et al. 2010). Eine Studie zu den CA IX-Serumspiegeln bei Ovarialkarzinom-Patienten konnte allerdings keine Korrelation der CA IX-Spiegel mit dem Therapieansprechen oder dem Überleben der Patienten zeigen (Woelber et al. 2010).

In einer Studie zum Vulvakarzinom wird beschrieben, dass erhöhte CA IX-Serumspiegel mit einer erhöhten intratumoralen Expression und einer schlechteren Prognose korrelieren (Kock et al. 2011).

In einer Studie zum HELLP-Syndrom konnte eine signifikante Erhöhung der CA IX-Serumspiegel bei den Erkrankten festgestellt werden (Mentese et al. 2018).

Eine Studie zum Prostatakarzinom, in der sowohl lokale Prostatakarzinome (HRLPC; High-risk localized prostate cancer), als auch kastrations-resistente Prostatakarzinome (CRPC; castration-resistant prostate cancer) untersucht wurden, konnte bei den HRLPC keine Korrelation der CA IX-Serumspiegel mit dem Auftreten eines Rezidivs feststellen (Smith et al. 2016). Bei Patienten mit einem CRPC korrelierten die CA IX-Serumspiegel, mit dem Gesamtüberleben. Allerdings konnte keine signifikante Veränderung der Spiegel durch die Chemotherapie festgestellt werden (Smith et al. 2016).

Bei Patienten mit testikulären Keimzelltumoren (TGCT; testicular germ cell tumor) konnte festgestellt werden, dass die CA IX-Serumspiegel im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht waren (Kalavska et al. 2016).

In einer Studie zu CA IX-Serumspiegeln bei Patienten mit Lungenkrebs wurden Patienten mit Karzinomen verschiedener Subtypen eingeschlossen (Plattenepithelkarzinom (n=7), Adenokarzinom (n=26), NSCLC (n=10) und unbekanntem pathologischen Typs (n=4)) (Cheng et al. 2015). Als Kontrolle diente eine Kohorte von 31 gesunden Patienten. Die Studie kommt zu dem Ergebnis, dass sich die CA IX-Serumspiegel der Erkrankten signifikant von den Spiegeln der Gesunden unterscheiden. Außerdem wurden signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen pathologischen Subtypen festgestellt (Cheng et al. 2015).

Die Ergebnisse einer Studie, in der die CA IX-Spiegel bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) erhoben wurden, besagten, dass erhöhte CA IX-Werte mit einem schlechteren Überleben der Patienten einhergehen (M Ilie et al. 2010). Eine weitere Studie zum NSCLC untersuchte die CA IX-Serumspiegel in Kombination mit Osteopontin und dem vascular endothelial growth factor (VEGF) (Ostheimer et al. 2014). In der Studie sollte herausgefunden werden, ob mit Hilfe dieser Marker für Hypoxie, eine Aussage über die Strahlensensibilität der Tumoren getroffen werden kann, allerdings konnte keine Korrelation zwischen dem Behandlungserfolg und den CA IX-Spiegeln festgestellt werden. Ein Ergebnis der Studie war allerdings, dass CA IX und VEGF korrelierten (Ostheimer et al. 2014).

In zwei voneinander unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass die CA IX-Serumspiegel bei Patienten mit klarzelligem Nierenkarzinomen (CCRCC), gegenüber den Spiegeln bei nichtklarzelligem Nierenkarzinomen (Non-CCRCC), signifikant erhöht sind (Takacova et al. 2013; Zhou et al. 2010).

Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom (LARC; locally advanced rectal cancer) konnte ein signifikanter Anstieg der CA IX-Serumspiegel nach der neoadjuvanten Chemotherapie (NACT), im Vergleich zur Baseline-Messung, festgestellt werden (Hektoen et al. 2015). Nach der Radiochemotherapie (RCT) stiegen die Werte weiter an. Vier Wochen nach Abschluss der RCT wurden Werte gemessen, die den Baseline-Werten wieder stark ähnelten (Evaluation). Das wichtigste Ergebnis dieser Studie war, dass eine Steigerung der CA IX-Spiegel nach NACT von ≥ 224 pg/ml (Δ NACT) mit einem signifikant verbesserten progressionsfreien Überleben einher geht (Hektoen et al. 2015).

In einer Studie zu CA IX-Serumspiegeln bei Hepatozellulärem Karzinom (HCC) und Leberzirrhose konnten bei HCC-Patienten signifikant erhöhte CA IX-Spiegel gemessen werden (Finkelmeier et al. 2018). Bei Patienten im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium wurden ebenfalls signifikant erhöhte Werte festgestellt. Hohe Serumkonzentrationen gingen mit einem erhöhten Sterblichkeitsrisiko einher. Die CA IX-Serumspiegel bei Patienten mit Leberzirrhose unterschieden sich nicht signifikant von HCC-Patienten. Bei Leberzirrhose-Patienten korrelierten hohe Werte mit dem Auftreten von portalem Hypertonus und Ösophagusvarizen (Finkelmeier et al. 2018).

Bei Patienten mit einem Magenkarzinom konnten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöhte CA IX-Plasmaspiegel festgestellt werden (Fidan et al. 2013). Des Weiteren wurden bei Patienten mit metastasiertem Magenkarzinom im Vergleich zum nicht-metastasierten Karzinom erhöhte CA IX-Spiegel gemessen (metastasiert: $227,1 \pm 273,5$ vs. Nicht-metastasiert: $147,4 \pm 144,1$, $p < 0,05$) (Fidan et al. 2013).

In einer Studie zu Kopf-Hals-Tumoren korrelierten hohe CA IX-Werte mit einem kürzeren Gesamtüberleben, allerdings konnte mit Hilfe der Werte keine Vorhersage über das Therapieansprechen auf eine Radiotherapie getätigt werden (Rosenberg et al. 2016).

In einer Studie zum CA IX-Plasmaspiegel bei Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom zeigte sich, dass Patienten, die unter einem Mundhöhlenkarzinom leiden, signifikant erhöhte CA IX-Serumspiegel aufwiesen (Yang et al. 2014).

2.6.3 Studien zu CA XII-Plasma-/Serumspiegeln

Im Gegensatz zur CA IX sind für die CA XII nur wenige Studien veröffentlicht worden, in denen die Serumspiegel erhoben wurden. Indizien für den diagnostischen Nutzen der CA XII zeigte eine Studie, in der die CA XII-Serumspiegel von Patienten mit Bronchialkarzinom im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht waren (Kobayashi et al. 2012).

Tabelle 5: Arbeiten zu verschiedenen malignen Erkrankungen, in denen Carboanhydrase-Serum- bzw.-Plasmaspiegel erhoben wurden. Dargestellt sind jeweils die untersuchte Erkrankung, die Publikation und verwendete Probenart (Plasma oder Serum), außerdem die erhobenen Spiegel bei Erkrankten und, falls vorhanden, bei der gesunden Vergleichsgruppe. Angegeben wird der Mittelwert, falls vorhanden die Standardabweichung, alternativ und mit Stern gekennzeichnet der Median mit IQR und wenn angegeben, die Spannweite der Messwerte. Außerdem ist, falls vorhanden, das Signifikanzniveau angegeben. Fortsetzung in Tabelle 6.

Maligne Erkrankung	Publikation (Verwendete Proben)	Mittlere CA IX-Konzentration (pg/ml) ±Standardabweichung (n=Anzahl Probanden) (Spannbreite der Messwerte)		Signifikanz -niveau
		Gesund	Erkrankt	
Mammakarzinom	(Schütze et al. 2013) (Serum)	199 (n=48) (26-1133)	296 (n=140) (56-1500)	NS
	(Brown-Glaberman et al. 2016) (Heparin oder ACD-Plasma)	20,5 (n=10) (8,8-41,2)	LABC: 34 (n=57) MBC: 90,7 (n=23)	P<0,001
Zervixkarzinom	(Woelber et al. 2011) (Serum)		104 (n=46) (23-499)	
Ovarialkarzinom	(Woelber et al. 2010) (Serum)		269 (n=37) (104-1202)	
Vulvakarzinom	(Kock et al. 2011) (Serum)		237 (n=31) (56-879)	
HELLP-Syndrom	(Mentese et al. 2018) (Serum)	1,10* (n=30) (IQR=0,78-1,39)	1,59* (n=23) (IQR=0,948-45,30)	P=0.008
Prostatakarzinom	(Smith et al. 2016) (Plasma)	HRLPC (Mit Rezidiv): 147* (n=48) (60-1061) (Ohne Rezidiv): 114* (n=20) (38-1293) CRPC vor Chemotherapie: 148* (38-1086); nachher: 116* (21-893) (n=20)		
Keimzelltumor des Hodens (TGCT)	(Kalavska et al. 2016) (Serum)	249,6±100 (n=35)	405,2±90,1 (n=83)	P=0,007
Lungenkrebs	(Cheng et al. 2015) (Serum)	56,54* (n=31) (IQR=41,83- 94,18)	290,1* (n=47) (IQR=215,53- 550,24)	P<0,001
NSCLC	(M Ilie et al. 2010) (Heparinplasma)	2,48 (n=58) (0-16,65)	45,4 (n=209) (0-372,89)	P<0,001
	(Ostheimer et al. 2014) (EDTA- Plasma)		105 (n=55) (22-420)	

LABC: Lokal-fortgeschrittenes Mammakarzinom; MBC: Metastasiertes Mammakarzinom; HRLPC: lokal begrenztes Prostatakarzinom; CRPC: kastrationsresistentes Prostatakarzinom; *: Median

Tabelle 6: Arbeiten zu verschiedenen malignen Erkrankungen, in denen Carboanhydrase-Serum- bzw.-Plasmaspiegel erhoben wurden. Fortsetzung von Tabelle 5.

Maligne Erkrankung	Publikation (Verwendete Proben)	Mittlere CA IX-Konzentration (pg/ml) ±Standardabweichung, (n=Anzahl Probanden) (Spannbreite der Messwerte)		Signifikanz-niveau
		Gesund	Erkrankt	
Klarzelliges Nierenkarzinom	(Zhou et al. 2010) (Serum)	CCRCC: 126,1 (n=18) Non-CCRCC: 2,1 (n=14)		P=0,013
	(Takacova et al. 2013) (Serum)	CCRCC: 209,22 (n=57) Non-CCRCC: 28,78 (n=13)		P=0,002
Lokal fortgeschrittenes Rektumkarzinom	(Hektoen et al. 2015) (Serum)	Erstmessung: 63 (n=66) (17-591) Post-NACT: 213 (n=66) Post-CRT: 309 (n=54) Evaluation: 80 (n=50)		
Hepatozelluläres Karzinom (HCC) und Leberzirrhose	(Finkelmeier et al. 2018) (Serum)	41 (n=43) (5-169)	HCC: 370* (n=215) (10-5080) Zirrhose: 482* (n=65) (11-1921)	P<0,01
Magenkarzinom	(Fidan et al. 2013) (EDTA-Plasma)	47,3 ±32,2 (n=34)	182,5 ±212,4 (n=50)	P<0,0001
Kopf-Hals-Tumoren	(Rosenberg et al. 2016) (Serum)	Komplette Remission: 74,04 (n=16) (0-393,72) Persistierend: 153,91 (n=32) (0-1933,4)		NS
Mundhöhlenkarzinom	(Yang et al. 2014) (EDTA-Plasma)	41,98±28,57 (n=100)	85,37±67,65 (n=191)	P<0,001

NACT: Neoadjuvante Chemotherapie; CRT: Radiochemotherapie; HCC: Hepatozelluläres Karzinom; CCRCC: Klarzelliges Nierenkarzinom; *: Median

2.6.4 HIF-1-α und CA IX-Expression bei IPAH

In einer Veröffentlichung, in der die Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1-α (Hypoxia Inducible-Factor-1-α) in der Pathophysiologie der Pulmonalen Hypertonie untersucht wurde, konnte festgestellt werden, dass sowohl der HIF-1-α als auch die CA IX, in den Endothelzellen der Lungenarterien und den plexiformen Läsionen von Patienten mit IPAH, im Vergleich mit gesunden Probanden, vermehrt exprimiert wurden (Fijalkowska et al. 2010).

2.7 Fragestellung und Ziele

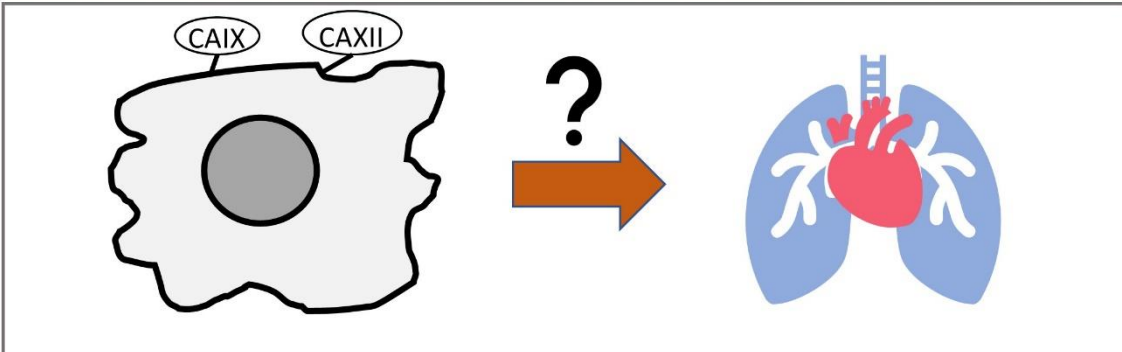
In der vorliegenden Arbeit soll überprüft werden, ob die CA IX und die CA XII mögliche neue Biomarker zur Diagnose und Prognose der Pulmonalen Hypertonie darstellen.

Beim ersten Teil der vorliegenden Arbeit handelt es sich um einen Vergleich zweier Mäusepopulationen. Eine Population wurde einer Hypoxie ausgesetzt. Dieser Aufbau induziert bei den Mäusen eine artifizielle pulmonale Hypertonie. Die andere Population wurde bei Normoxie gehalten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von CA IX und CA XII mittels eines immunhistochemischen Verfahrens ermittelt. Die Auswertung dieser Ergebnisse soll die Fragestellung beantworten, ob Mäuse, die an einer künstlich herbeigeführten PH leiden, eine erhöhte Expression von CA IX und CA XII in den Lungen aufweisen.

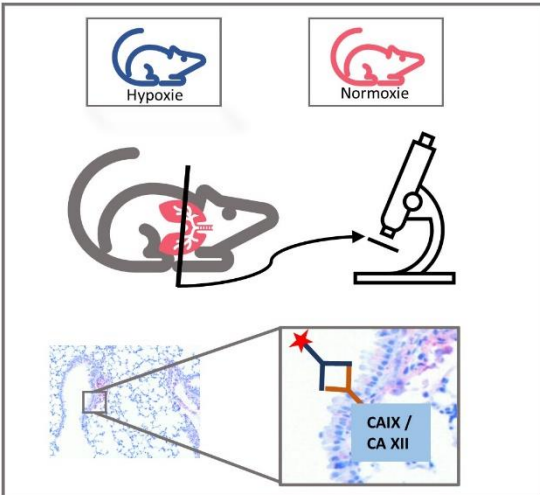
Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Spiegel der frei zirkulierenden Carboanhydrase IX bei Patienten mit IPAH und CTEPH bestimmt. Die PH geht, wie auch Krebserkrankungen, mit dysregulierten Umbauvorgängen einher, daher die Annahme, dass die CA IX bei der PH vermehrt im Serum zu finden sein könnte. Die Etablierung eines Biomarkers für die PH ist wünschenswert, um nicht-invasiv Aussagen über die Schwere der Erkrankung, den Erkrankungsverlauf und das Ansprechen auf die Therapie treffen zu können. Dafür wurde ein Baseline-Wert der CA IX-Plasmaspiegel bei Patienten bestimmt, die an IPAH oder CTEPH leiden. Bei der Auswertung ist interessant, ob die Werte im Vergleich zur gesunden Non-PH-Gruppe erhöht sind, ob sich die Werte zwischen den PH-Klassen unterscheiden und ob sie mit anderen klinisch-pathologischen Parametern (NYHA-Klasse, 6-MWD, BNP, Cardiac Index, PVR) und dem Überleben korrelieren. In der vorliegenden Studie wurde also retrospektiv untersucht, ob die CA IX als Biomarker zur Diagnostik und Bestimmung des Schweregrads der PH geeignet ist.

Central Illustration: CA IX und CA XII als mögliche Biomarker für Pulmonale Hypertonie

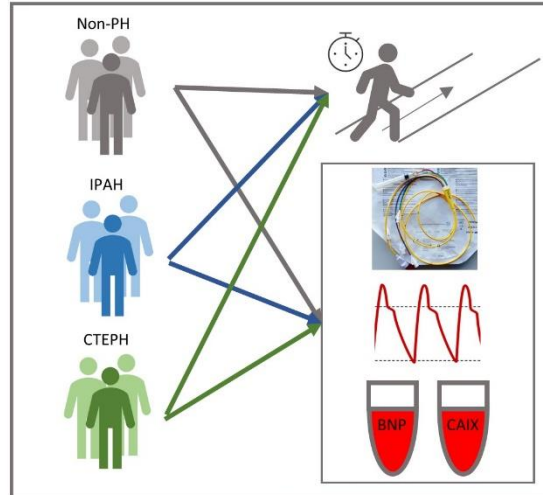
CA IX und CA XII wird bei verschiedenen malignen Erkrankungen exprimiert. Bedeutung für die Pulmonale Hypertonie?



Tiermodell: Immunhistochemie



CA IX-Spiegel bei PH-Patienten



?

?

Abbildung 2 Central Illustration: Fragestellung und Inhalt der Studie

3. Material und Methoden

Ein Teil der vorliegenden Arbeit ist die Auswertung des CA IX- und CA XII-Gehalts in Mäuselungen. Hierfür wurde bei Mäusen experimentell eine pulmonale Hypertonie erzeugt. Die Lungen der Mäuse wurden dann immunhistochemisch mit CA IX- bzw. CA XII-Antikörpern eingefärbt. Daraufhin wurden die Proben lichtmikroskopisch untersucht und die Intensität der Färbung mittels eines Computerprogramms ausgewertet. Als Vergleich diente eine Kohorte von Mäusen, die unter normalen Voraussetzungen gehalten wurden.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte die Messung von CA IX-Spiegeln in Blutproben von Patienten. Aufgrund der Tatsache, dass es uns nicht möglich war, einen stabilen ELISA zu etablieren und die kommerziellen ELISA-Kits in unseren Probemessungen keine reproduzierbaren Ergebnisse erbrachten, konnten wir die CA XII-Spiegel in den Blutproben der Patienten nicht messen.

Die Patienten, die in dieser Studie eingeschlossen wurden, wurden alle in der Ambulanz für pulmonale Hypertonie der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Gießen mittels Rechtsherzkatheter-Untersuchung auf das Vorliegen einer PH untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden Blutproben aus der A. pulmonalis entnommen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Blutproben wurden im Rahmen von Ersttestungen entnommen. Das Diagnosekriterium für eine Pulmonale Hypertonie war hierbei ein mPAP ≥ 25 mmHg. Des Weiteren wurden die Patienten nach der jeweiligen Form der Erkrankung ausgewählt. Für diese Arbeit wurden Patienten mit IPAH und CTEPH herangezogen. Außerdem wurden Blutproben von Patienten analysiert, bei denen in der Ersttestung keine PH festgestellt wurde (mPAP < 25 mmHg). Diese Patienten dienen als Kontrollgruppe und sind im Folgenden als „Non-PH-Gruppe“ bezeichnet.

3.1 Material für die immunhistochemische Untersuchung von Mäuselungen

Tabelle 7: Material für die immunhistochemische Untersuchung von Mäuselungen

Material	Hersteller
Antikörper	CA IX -Anti-mouse, rat, human / Rabbit polyclonal, Proteintech, Rosemont, IL; USA CA XII -Anti-mouse, rat, human / Rabbit polyclonal, Proteintech, Rosemont, IL; USA
Xylol	
Ethanol	
Wasserstoffperoxid	
Proteinase K	
TBS-Tris-Puffer (pH 7,2)	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Rodent Block M	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Renaissance Background Reducing Diluent/PD905L	Biocare medical, Pacheco, CA, USA
ZytoChem-Plus AP Polymer-Kit	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Vulcan Fast Red Chromogen Kit 2,	Biocare medical, Pacheco, CA, USA
Hämatoxylin	
Mikroskop Leica DM 6000B	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland

3.2 Methoden zur Quantifizierung des CA IX- und CA XII-Gehalts im Lungengefäßsystem von Mäusen

3.2.1 Auslösung hypoxischen pulmonalen Remodelings durch chronische Hypoxie

Bei C57-BL/6-Mäusen wurde pulmonales Remodeling durch eine chronische Hypoxie ausgelöst (Schermuly et al. 2005; Weissmann et al. 2003). Dabei wurden die Mäuse in Boxen für 35 Tage bei konstanten 10% O₂ und bei 22-24°C gehalten. Die Hypoxie wurde durch eine autoregulatorische Kontrolleinheit (model 4010, O₂controller, Labotect; Göttingen, Germany) konstant aufrechterhalten. Das entstehende CO₂ wurde durch Atemkalk entfernt. Entstehende Feuchtigkeit wurde durch Kondensation in einem Kühlsystem entfernt. Die Vergleichsgruppe der Mäuse wurde in ähnlichen Kammern gehalten, allerdings unter Normoxie bei 21% O₂ (Schermuly et al. 2005; Weissmann et al. 2003).

3.2.2 Entnahme und Verarbeitung des Lungengewebes

Nach der Messung der hämodynamischen Parameter und der Entnahme von Blutproben werden Abdomen und Thorax der Mäuse geöffnet (Schermuly et al. 2005; Weissmann et al. 2003). Daraufhin werden die Herzventrikel eröffnet und das Blut entfernt, außerdem werden die Lungen mit Kochsalzlösung gespült, um Blutreste zu entfernen. Der linke Lungenflügel wird anschließend in 3,5-3,7% Formalin für die histologische Untersuchung fixiert. Auf die Fixation folgen die Dehydratation und die Einbettung in Paraffin, diese Arbeitsschritte werden mithilfe eines Gewebeeinbettungsautomaten durchgeführt (siehe Abbildung 3). Im nächsten Schritt werden aus den Paraffinblöcken mit einem Mikrotom 3 µm dicke Schnitte angefertigt (siehe Abbildung 4). Darauf folgt die immunhistochemische Färbung der Schnitte (Schermuly et al. 2005; Weissmann et al. 2003).



Abbildung 3 Leica ASP300S: Gewebeeinbettungsautomat



Abbildung 4 Leica Mikrotom

3.2.3 Immunhistochemische Färbung der Schnitte auf CA IX bzw. CA XII

Die in Paraffin eingebetteten Schnitte werden mittels Xylol deparaffinisiert (Schermuly et al. 2005; Weissmann et al. 2003). Daraufhin werden die Schnitte in einer Serie von Bädern, die in absteigender Konzentration Ethanol und in aufsteigender Konzentration destilliertes Wasser enthalten, rehydriert. Zur Antigendemaskierung werden die Schnitte in einer speziellen Lösung (Rodent Decloaker, Biocare medical, Pacheco, CA, USA) gekocht. Um die gewebeigene Peroxidase-Aktivität zu unterdrücken, werden die Schnitte mit 15%igem Wasserstoffperoxid behandelt. Darauf folgt die Behandlung der Schnitte mit Proteinase K, zur Zerstörung der Verbindungen zwischen Proteinen, dieser Schritt dient einer verbesserten Antigendemaskierung. Daraufhin erfolgt die Blockierung der endogenen IgG-Antikörper (Rodent Block M, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland). Der nächste Schritt besteht in einer Inkubation mit dem primären Antikörper (CA IX (bzw. CA XII)-Anti-mouse, rat, human / Rabbit polyclonal, Proteintech, Rosemont, IL; USA) über Nacht. Die Antikörper-Lösung wird in einem Medium verdünnt, die Hintergrundfärbung blockiert (Renaissance Background Reducing Diluent/PD905L, Biocare medical, Pacheco, CA, USA). Auf die Inkubation folgt die Farbentwicklung mit einem Gemisch aus Sekundärintikörpern, Alkalischer Phosphatase (ZytoChem-Plus AP Polymer-Kit, Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) und dem Substrat (Vulcan Fast Red Chromogen Kit 2, Biocare medical, Pacheco, CA, USA). Zum Schluss werden die Schnitte noch mit Hämatoxylin gegengefärbt (Schermuly et al. 2005; Weissmann et al. 2003). Exemplarisch sind die Bäder für die immunhistochemische Färbung in Abbildung 5 dargestellt.



Abbildung 5 Bäder für die immunhistochemische Färbung

3.2.4 Auswertung der Schnitte mit Hilfe eines Mikroskops und einer Farberkennungs-Software

Die Lungenschnitte wurden mit Hilfe eines Mikroskops (Mikroskop Leica DM 6000B, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) komplett durchmustert und fotografiert. Über ein Computerprogramm kann die Farbintensität und die gefärbte Fläche der Bilder analysiert werden. Für die Analyse wurde das halbautomatische Programm Leica Qwin V3 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) verwendet. Die erforderlichen Arbeitsschritte bei der Durchmusterung des Präparates sind: Weißabgleich, um unspezifische Hintergrundfärbungen herauszurechnen, die Bestimmung eines Referenzpunktes, also die Stelle im Präparat mit der intensivsten Färbung und daraufhin die schrittweise Messung der Farbintensität des gesamten Präparates (M. Reinhardt 2018). Am Ende der Messung erzeugt das Programm ein Excel-Tabellendokument mit vier Messwerten. Scoring, Scoring %, Area % und Score Value %. Scoring beschreibt hierbei die gemessene Intensität der Färbung, bei Scoring % wird die gemessene Färbintensität, also das Scoring, mit dem Referenzpunkt ins Verhältnis gesetzt (M. Reinhardt 2018). Die Formel lautet hierbei: $\text{Scoring \%} = (\text{Scoring} \times 100) / \text{Referenzwert}$, dadurch erhält man die relative Färbintensität (M. Reinhardt 2018). Area % beschreibt die gesamte gefärbte Fläche in Relation zur Fläche des Präparates, die Formel hierfür lautet $\text{Area \%} = (\text{gefärbte Gesamtfläche} \times 100) / \text{Gesamtfläche des Präparates}$ (M. Reinhardt 2018). Der wichtigste Wert ist „Score Value %“, dieser ergibt sich aus der Formel: $\text{Scoring \%} \times (\text{Area \%} / 100)$ (M. Reinhardt 2018). Daher gibt dieser Wert die relative Färbintensität normiert auf die gefärbte Fläche und die Gesamtfläche des Präparates an (M. Reinhardt 2018). Ist also der „Scoring Value %“ statistisch signifikant erhöht, so kann davon ausgegangen werden, dass auch die Expression des gemessenen Targets signifikant erhöht ist (M. Reinhardt 2018). Das Equipment, also Mikroskop, Kamera und Computer sind in Abbildung 6 gezeigt.



Abbildung 6 Mikroskop, Kamera und Computer zur Auswertung der Schnitte

3.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung und Aufarbeitung der Ergebnisse wurde mit Hilfe der Programme Excel (Microsoft GmbH, München) und Graphpad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Berechnet wurde jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) des zuvor beschriebenen „Score value %“. Die beiden Versuchsgruppen wurden mittels Welch-Test verglichen und die Ergebnisse in einem Balkendiagramm dargestellt.

3.3 Material für die Bestimmung der CA IX-Plasmaspiegel in Patientenproben

Tabelle 8: Material für die Bestimmung der CA IX Plasmaspiegel in Patientenproben

Material	Hersteller
Human Carbonic Anhydrase IX Quantikine ELISA Kit	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
Multipipette E3	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Research Plus Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Photometer Infinite M200Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotina 46RS	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

3.4 Methoden zur Bestimmung der CA IX-Plasmaspiegel in Patientenproben

3.4.1 Rechtsherzkatheter

In der Ambulanz für Pulmonale Hypertonie des Universitätsklinikums Gießen wird der Rechtsherzkatheter mittels Seldinger-Technik eingebracht. Unter Ultraschallkontrolle wird im Regelfall die rechte Vena jugularis interna punktiert. Dazu wird die Umgebung steril abgedeckt und das Punktionsgebiet ausgiebig desinfiziert. Daraufhin wird eine Lokalanästhesie durchgeführt und die Vena jugularis interna punktiert. Durch die Punktionskanüle wird ein Draht eingebracht, der als Schiene für die daraufhin eingebrachte Schleuse dient. Nach Einbringung der Schleuse wird der Katheter vorbereitet. Für die Untersuchung wird ein mehrlumiger Swan-Ganz-Katheter mit 7 French-Außendurchmesser verwendet. An der Spitze befindet sich ein Ballon, der die Einschwemmung in das Stromgebiet der Lunge erleichtert. Sobald sich der Katheter in der Vena cava superior befindet, wird der Ballon rasch gefüllt und der Katheter zügig vorgeschoben. Dabei werden die abgeleiteten Druckkurven ständig kontrolliert. Anhand dieser Kurven kann die Lokalisation des Katheters bestimmt werden. Wenn der Katheter das rechte Atrium und den rechten Ventrikel passiert hat, wird der Katheter mit aufgeblasenem Ballon vorsichtig in die Verschlussposition gebracht. Dabei wird der Pulmonalarterienast komplett verschlossen. In dieser Position wird der pulmonalarterielle Verschlussdruck (engl. pulmonary arterial wedge pressure, PAWP) bestimmt, der eine Einschätzung des linksatrialen Drucks ermöglicht. Anschließend wird der Ballon entblockt und der Katheter ein Stück zurückgezogen, um einen akzidentiellen Verschluss des Gefäßes zu verhindern. Daraufhin erfolgen Blutgasanalysen und Messungen verschiedener hämodynamischer Parameter, die der Diagnosestellung dienen.

3.4.2 Entnahme und Aufbewahrung der Plasmaproben

Die Entnahme der Blutproben erfolgt im Anschluss an die erste Messung der hämodynamischen Parameter und der ersten Entnahme von Blut zur Blutgasanalyse. Zur Blutentnahme wird der lange Schenkel des Katheters verwendet, somit wird das Blut aus dem Pulmonalarterienast gewonnen, in dem auch der pulmonalarterielle Druck gemessen wird. Die verwendeten Blutentnahmesysteme sind S-Monovetten der Firma Sarstedt. Es werden EDTA, Citrat- und T-Röhrchen (enthalten Aprotinin) abgenommen. Anschließend werden die Blutproben auf Eis zwischengelagert, bevor sie zentrifugiert werden. Nach der Zentrifugation wird das Plasma abpipettiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße aus Polypropylen verteilt. Die Reaktionsgefäße werden mit der

Untersuchungsnummer gekennzeichnet und bei -80°C eingefroren, bis sie zur Untersuchung herangezogen werden.

3.4.3 Datenerhebung und Messmethoden

Mithilfe einer Übersichtstabelle, in der die Untersuchungsnummern einer Diagnose zugeordnet sind, wurden Proben herausgesucht, denen entweder eine IPAH, eine CTEPH oder ein „Ausschluss einer PH“ zugeordnet wurde. Die Proben wurden ohne Kenntnis weiterer Patientendetails zufällig ausgewählt. Im Nachhinein mussten einige Proben aus der Studie ausgeschlossen werden. Die Ausschlusskriterien waren diagnostizierte Krebsleiden jeglicher Art und vorherige Katheter-Untersuchungen am Universitätsklinikum Gießen. Die Proben wurden aus den Tiefkühlschränken entnommen, schonend auf Eis aufgetaut und in Aliquoten wieder eingefroren, um die Proben für weitere Untersuchungen in gleichbleibender Qualität aufzubewahren. Zur quantitativen Untersuchung der Plasmaproben wurden Sandwich-ELISA-Kits (Human Carbonic Anhydrase IX Quantikine ELISA Kit) der Firma R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) verwendet. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Kurz zusammengefasst wurden die Proben auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht, als Vergleich diente eine Standard-Verdünnungsreihe mit einem festgelegten CA IX-Gehalt. Die Mikrotiterplatte wurde herstellerseitig mit einem monoklonalen Antikörper gegen CA IX behandelt. Anschließend wurde zu Proben und Standard ein CA IX-Konjugat gegeben, das einen polyklonalen Antikörper enthält. An diesen Antikörper ist Meerrettichperoxidase gebunden. Im folgenden Schritt wurde Substratlösung dazu gegeben. Nach einer festgelegten Inkubationszeit von 30 Minuten wurden 2 N Schwefelsäure hinzugefügt, um die Reaktion zu stoppen. Mittels Photometer wurde daraufhin die Färbung der einzelnen Proben quantifiziert und die Konzentration berechnet. In Abbildung 7 ist das verwendete ELISA-Kit der Firma R&D Systems dargestellt. In Abbildung 8 ist der Tecan Infinite M200 Plattenreader gezeigt, der als Photometer dient.



Abbildung 7 R&D Systems Quantikine ELISA Human Carbonic Anhydrase IX



Abbildung 8 Tecan Infinite M200 Plattenreader

3.4.4 Statistik

Die Standardkurve der Proteinkonzentration im ELISA wurde mittels 4-Parameter-Logistik-Regressionsanalyse des Kurvenanpassungsprogramms der Webseite „mycurvefit.com“ berechnet. Daraufhin wurden die Konzentrationen der Proben in Microsoft Excel (Microsoft GmbH, München) berechnet. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse wurde mit dem Programm Graphpad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Eine Ausnahme bildet die Cox-Überlebensanalyse, diese wurde mit Hilfe des Programms IBM SPSS Statistics (IBM, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Die Auswertung der nicht-normalverteilten Plasmakonzentrationen wird durch den Median und den jeweiligen Interquartilsabstand dargestellt. Im Folgenden wurden die CA IX-Spiegel logarithmiert, um eine Normalverteilung zu erreichen und die logarithmierten Plasmaspiegel der CTEPH-, IPAH- und Kontrollgruppe wurden mittels oneway-ANOVA miteinander verglichen.

Mittels ROC-Kurve und Youden-Index wurde ein Cut-Off für die diagnostischen Gütekriterien Sensitivität und Spezifität bestimmt. Außerdem erfolgte die Analyse der Assoziation der logarithmierten CA IX-Spiegel mit klinischen und hämodynamischen Parametern. Hierfür wurde der Korrelationskoeffizient Pearsons r verwendet.

Des Weiteren wurden Überlebensanalysen durchgeführt. Hierfür erstellten wir Kaplan-Meier-Kurven. Einerseits wurden die IPAH- und CTEPH-Gruppe im Ganzen in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt, andererseits wurden beide Gruppen, nach der Höhe der CA IX-Plasmaspiegel, in Quartile eingeteilt und diese Quartile miteinander verglichen. Zum Vergleich der Quartile wurden der Log-rank-Test nach Mantel-Cox und der Logrank-Test für den Trend herangezogen.

Eine weitere Überlebensanalyse, die durchgeführt wurde, ist die multivariate Cox-Regressionsanalyse. In diese Analyse gehen mehrere Variablen ein, in unserem Fall sind diese der CA IX-Plasmaspiegel, mPAP, PVR, CI, 6MWD, BNP-Spiegel, Alter und Geschlecht. Die Ergebnisse der Cox-Regressionsanalyse sind sogenannte „Hazard-ratios“, die den Einfluss der Variablen auf das Eintreten eines Ereignisses beschreiben, im vorliegenden Fall ist dies der Tod. Überprüft wurde, ob die CA IX-Spiegel auch in dieser multivariaten Analyse als Prädiktor für das Überleben bestätigt werden können.

4. Ergebnisse

4.1 Expressionsprofil von CA IX und CA XII in den Lungen von Mäusen mit experimentell induzierter Pulmonaler Hypertonie

Für die Untersuchung der Expression von CA IX und CA XII im Lungengewebe von Mäusen wurden 10 Versuchstiere unter hypoxischen Bedingungen gehalten, um eine artifizielle pulmonale Hypertonie zu erzeugen. Als Vergleich dienten bei CA IX 9 Mäuse (bei CA XII 10 Mäuse), die unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden.

4.1.1 CA IX

Bei der Auswertung der immunohistochemischen Färbung der Schnitte mit Antikörpern gegen CA IX konnte mittels Welch-Test keine signifikante Erhöhung der Intensität in der Hypoxie-Gruppe festgestellt werden ($p=0,43$). Allerdings zeigt sich bei Betrachtung des Balkendiagramms mit Fehlerbalken in Abbildung 9a ein Trend in Richtung einer Erhöhung des CA IX-Gehalts im Lungengewebe in der Hypoxie-Gruppe. Der Mittelwert des Score Value in % beträgt bei der Normoxie-Gruppe 0,87, der SEM beträgt 0,24. In der Hypoxie-Gruppe beträgt der Mittelwert 1,1 und der SEM 0,13.

In Abbildung 9b ist ein Ausschnitt aus einem Lungenschnitt der Normoxie-Gruppe dargestellt, in diesem Ausschnitt ist eine Pulmonalarterie markiert. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 9c ein Ausschnitt aus der Hypoxie-Gruppe dargestellt, ebenfalls mit markierter Pulmonalarterie. Der Vergleich der Schnitte soll exemplarisch zeigen, dass die Gefäßwände in der Hypoxie-Gruppe verdickt erscheinen.

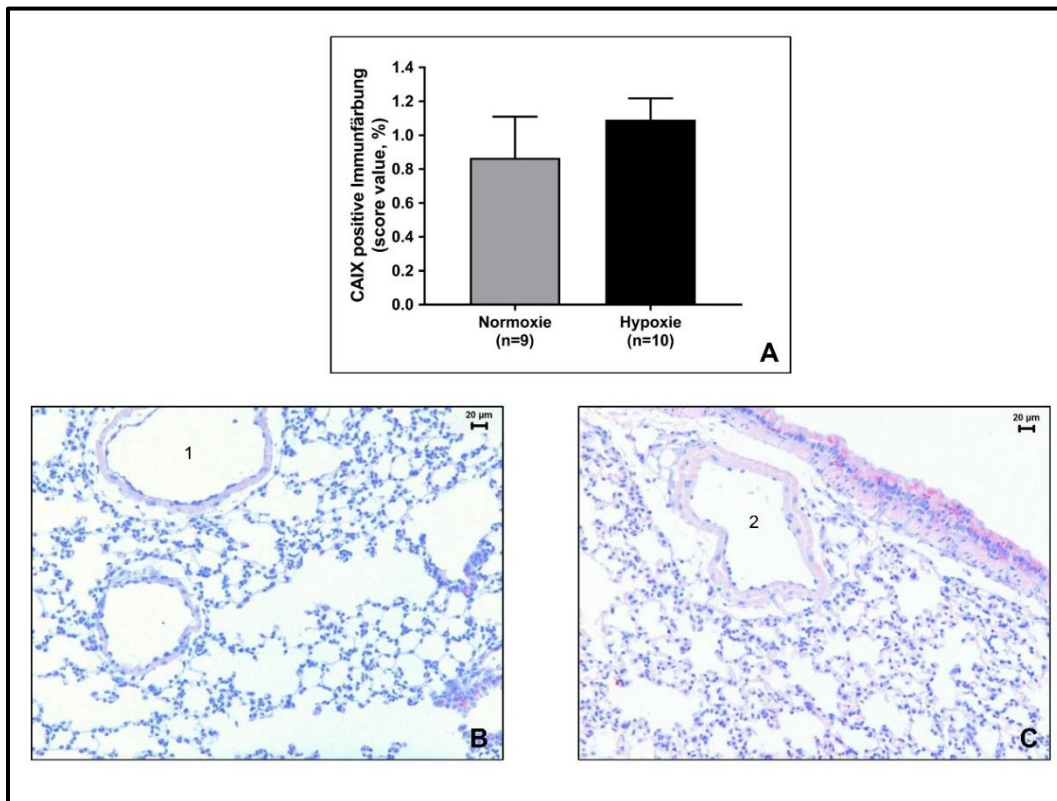


Abbildung 9 Immunhistochemische Färbung von Mäuselungen mit Antikörpern gegen CA IX; A: Balkendiagramm, Vergleich der Scoring-Ergebnisse in der Normoxie- und Hypoxie-Gruppe, Darstellung des Mittelwerts und des Standardfehlers (SEM) des Score Values in % durch Fehlerbalken, in der Normoxie-Gruppe beträgt der Mittelwert 0,87, der SEM 0,24, in der Hypoxie-Gruppe beträgt der Mittelwert 1,1, der SEM 0,13; B: exemplarische Darstellung eines Lungenausschnitts unter Normoxie-Bedingungen; C: exemplarische Darstellung eines Lungenausschnitts unter Hypoxie-Bedingungen; 1: Pulmonalarterie unter Normoxie-Bedingungen; 2: Verdickt erscheinende Pulmonalarterie unter Hypoxie-Bedingungen

4.1.2 CA XII

Bei der Auswertung der Schnitte, die mit Antikörpern gegen CA XII immunhistochemisch gefärbt wurden, konnte ebenfalls zwar keine statistisch signifikante Erhöhung des CA XII-Gehalts festgestellt werden, allerdings erscheint in der Auswertung mittels Welch-Test ein etwas deutlicherer Trend in Richtung eines erhöhten Gehalts an CA XII in der Hypoxie-Gruppe ($p=0,15$). Der Mittelwert des Score Value in % beträgt in der Normoxie-Gruppe 0,31, der SEM beträgt 0,07, in der Hypoxie-Gruppe beträgt der Mittelwert 0,49 und der SEM 0,1. Das Balkendiagramm mit Fehlerbalken ist in Abbildung 10a dargestellt. In Abbildung 10b ist exemplarisch ein Anschnitt einer Pulmonalarterie eines Lungenpräparates der Normoxie-Gruppe gezeigt. Abbildung 10c zeigt eine Pulmonalarterie aus der Hypoxie-Gruppe.

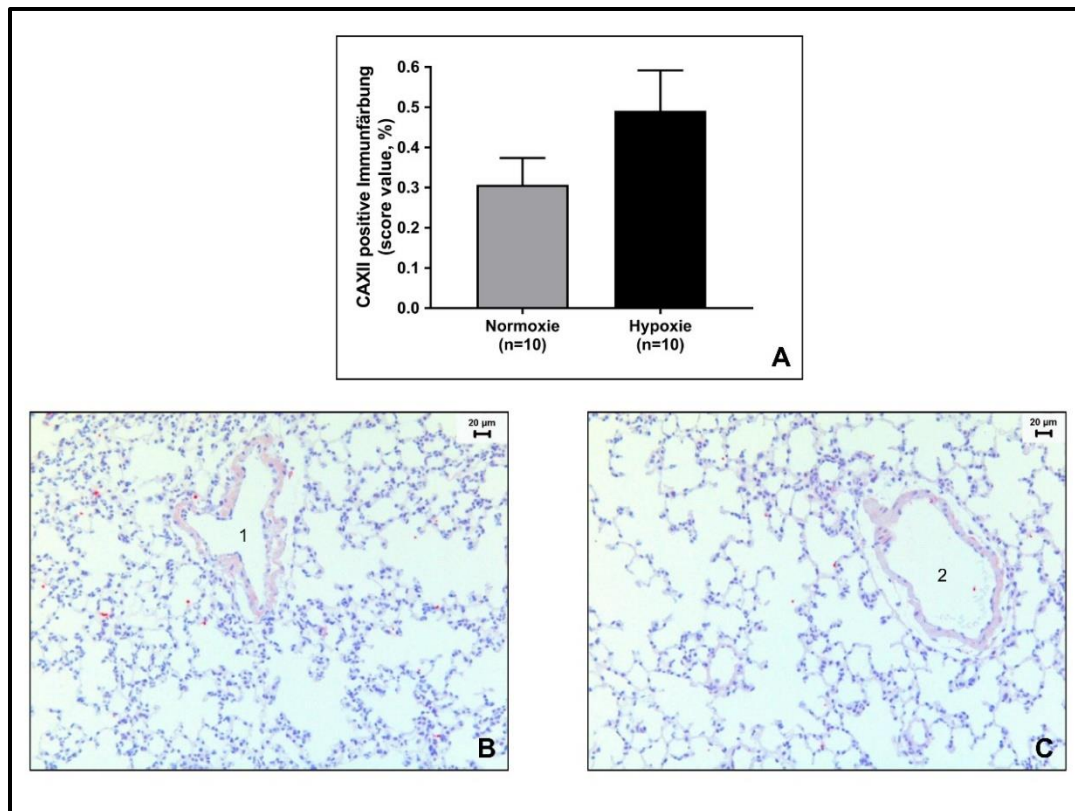


Abbildung 10 Immunhistochemische Färbungen von Mäuselungen mit Antikörpern gegen CA XII; A: Balkendiagramm, Vergleich der Scoring-Ergebnisse in der Normoxie- und Hypoxie-Gruppe, Darstellung des Mittelwerts und des Standardfehlers (SEM) des Score Values in % durch Fehlerbalken, in der Normoxie-Gruppe beträgt der Mittelwert 0,31, der SEM 0,07, in der Hypoxie-Gruppe beträgt der Mittelwert 0,49 und der SEM 0,1; B: exemplarische Darstellung eines Lungenausschnitts unter Normoxie-Bedingungen; C: exemplarische Darstellung eines Lungenausschnitts unter Hypoxie-Bedingungen; 1: Pulmonalarterie unter Normoxie-Bedingungen; 2: Pulmonalarterie unter Hypoxie-Bedingungen

4.2 CA IX-Plasmaspiegel bei Patienten mit PH

4.2.1 Basisdaten des Patientenkollektivs

Für die Bestimmung der CA IX-Plasmaspiegel wurden insgesamt 177 Plasmaproben untersucht. Davon sind 30 Proben der Non-PH-Gruppe zuzuordnen, also Proben von Patienten, bei denen in der Rechtsherzkatheter-Untersuchung eine PH ausgeschlossen werden konnte. 147 Proben wurden bei Patienten entnommen, bei denen entweder eine IPAH oder eine CTEPH diagnostiziert wurde. In der IPAH-Gruppe wurden 73 Patientenproben untersucht, in der CTEPH-Gruppe 74. Die Patienten der IPAH-Gruppe waren im Durchschnitt (Mittelwert \pm SD) $52,8 \pm 17,5$ Jahre alt. Kein Patient der IPAH-Gruppe konnte der NYHA-Klasse 1 zugeordnet werden, 12 Patienten der NYHA-Klasse II, 48 Patienten der NYHA-Klasse III und 9 Patienten der NYHA-Klasse IV. Das Durchschnittsalter der CTEPH-Patienten betrug $66,9 \pm 11,4$ Jahre. In der CTEPH-Gruppe konnte ebenfalls kein Patient der NYHA-Klasse 1 zugeordnet werden, 13 Patienten der NYHA-Klasse II, 38 Patienten der NYHA-Klasse III und 7 Patienten der NYHA-Klasse IV. Die Patienten der Non-PH-Gruppe waren im Durchschnitt $65,2 \pm 10,7$ Jahre alt. Die Altersverteilung ist in Abbildung 11a dargestellt. In der IPAH-Gruppe befinden sich 60,3% Frauen und 39,7% Männer. In der CTEPH-Gruppe 51,35% Frauen und 48,65% Männer. In die Non-PH-Gruppe wurden 50% Männer und 50% Frauen eingeschlossen, wie in Abbildung 11b zu erkennen ist.

Des Weiteren wurden retrospektiv funktionelle (6MWD) und hämodynamische Parameter (mPAP, HI, PVR), sowie BNP recherchiert. Dabei wurden nur die Daten beachtet, die in direktem zeitlichem Zusammenhang mit der Rechtsherz-Katheter-Untersuchung stehen. Die BNP-Spiegel wurden aus Blutproben ermittelt, die im Rahmen der gleichen Rechtsherzkatheter-Untersuchung abgenommen wurden, in der auch das Blut für die Erhebung der CA IX-Plasmaspiegel abgenommen wurde. Die recherchierten Werte für alle Patienten, exklusive der Non-PH-Gruppe, sind in Tabelle 9 aufgeführt. Eine Unterteilung in die jeweiligen Entitäten erfolgt in Tabelle 10.

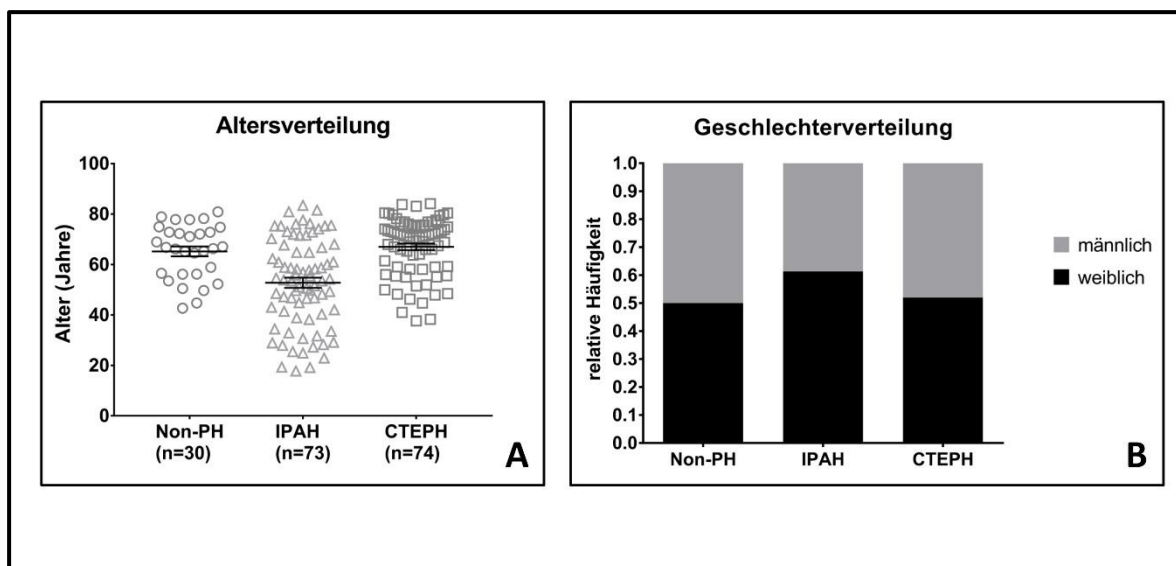


Abbildung 11 A: Darstellung der Altersverteilung in der untersuchten Kohorte, unterteilt in IPAH, CTEPH und Non-PH (Kontrollgruppe), als Streudiagramm, Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken, in der Non-PH-Gruppe (n=30) beträgt das Durchschnittsalter (\pm SD) 65,2 \pm 10,7, in der IPAH-Gruppe 52,8 \pm 17,5, in der CTEPH-Gruppe 66,9 \pm 11,4 Jahre; B: Darstellung der Geschlechterverteilung der einzelnen Gruppen, die IPAH-Gruppe besteht zu 60,3% aus Frauen und zu 39,7% aus Männern. In der CTEPH-Gruppe sind es 51,35% Frauen und 48,65% Männer. In der Non-PH-Gruppe 50% Männer und 50% Frauen.

Tabelle 9: Häodynamische (mPAP, HI, PVR), funktionelle Parameter (6MWD) und BNP der IPAH- und CTEPH-Gruppe zusammengenommen inklusive Einheit, N= Anzahl der erhobenen Werte, Darstellung von Median mit IQR bei nicht-normalverteilten Parametern oder Mittelwert mit Standardabweichung (SD) bei normalverteilten Parametern

Gesamtes Patientenkollektiv (n=147)				
Parameter	Einheit	N	Median oder Mittelwert	IQR oder SD
6-MWT	m	121	MW: 327	SD: 122,1
mPAP	mmHg	147	MW: 45	SD: 12,3
BNP	pg/ml	103	MED: 219	IQR: 348
HI	(l/min)/m ²	143	MW: 2,3	SD: 0,6
PVR	dyn * sek /cm ⁵	147	MED: 709	IQR: 534

Tabelle 10: Hämodynamische (mPAP, HI, PVR), funktionelle Parameter (6MWD) und BNP unterteilt in IPAH-, CTEPH und Non-PH-Gruppe inklusive Einheit, N= Anzahl der erhobenen Werte, Darstellung von Median mit IQR bei nicht-normalverteilten Parametern oder Mittelwert mit Standardabweichung (SD) bei normalverteilten Parametern

IPA H (n=73)				
Parameter	Einheit	N	Median oder Mittelwert	IQR oder SD
6-MWT	m	63	MW: 317	SD: 129,6
mPAP	mmHg	73	MW: 49,2	SD: 13,5
BNP	pg/ml	63	MED: 181	IQR: 399
HI	(l/min)/m ²	71	MW: 2,2	SD: 0,6
PVR	dyn * sek /cm ⁵	73	MED: 847	IQR: 552,15
CTEPH (n=74)				
Parameter	Einheit	N	Median oder Mittelwert	IQR oder SD
6-MWT	m	58	MW: 337,9	SD: 114,7
mPAP	mmHg	74	MW: 40,9	SD: 9,5
BNP	pg/ml	40	MED: 225	IQR: 313
HI	(l/min)/m ²	72	MW: 2,3	SD: 0,6
PVR	dyn * sek /cm ⁵	74	MED: 571,5	IQR: 397,5
Non-PH (n=30)				
Parameter	Einheit	N	Median oder Mittelwert	IQR oder SD
6-MWT	m	16	MW: 297,8	SD: 151,1
mPAP	mmHg	30	MW: 18,9	SD: 3,7
BNP	pg/ml	14	MED: 52,5	IQR: 166,5
HI	(l/min)/m ²	23	MW: 2,8	SD: 0,7
PVR	dyn * sek /cm ⁵	30	MED: 149,45	IQR: 118,1

4.2.2 Konzentrationsverteilung der Plasmaspiegel von CA IX

Die Ergebnisse zeigen, dass die Plasmaspiegel von CA IX, über alle Gruppen, also inklusive der Non-PH-Gruppe, linksverteilt sind. Die Konzentrationen reichen von einem Mindestwert von 6,8 pg/ml bis zu einem Maximalwert von 773,3 pg/ml, der Median liegt bei 88,9 pg/ml, der IQR beträgt 110,9. Die Verteilung ist als Histogramm in Abbildung 12 dargestellt.

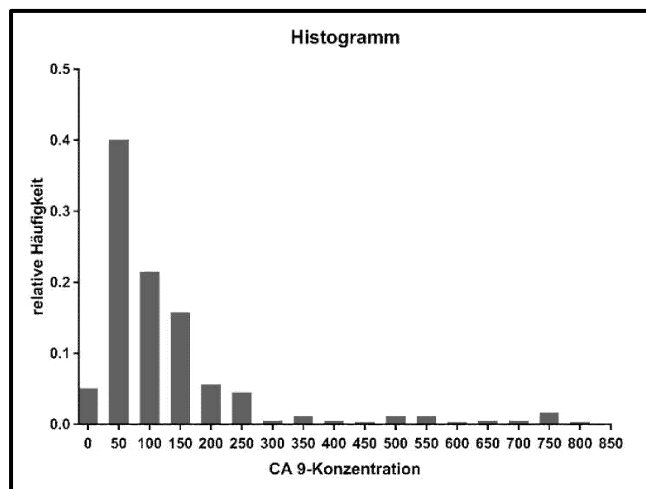


Abbildung 12 Linksverteilung der CA IX-Plasmakonzentrationen dargestellt in einem Histogramm, auf der x-Achse wird die CA IX-Konzentration in Schritten von 50 pg/ml aufgetragen, die y-Achse zeigt die relative Häufigkeit, mit der die CA IX-Konzentration in einem der Abschnitte liegt.

4.2.3 CA IX-Plasmaspiegel und Vergleich der untersuchten Gruppen

Die CA IX-Plasmakonzentrationen, die in den IPAH-, CTEPH- und Non-PH-Untergruppen erhoben wurden, wurden erst logarithmiert und anschließend mittels one-way-ANOVA verglichen. Abbildung 13 zeigt die Verteilung der logarithmierten CA IX-Konzentrationen. In Tabelle 11 sind die statistischen Kennzahlen der CA IX-Plasmakonzentrationen, unterteilt in die IPAH, CTEPH- und Non-PH-Gruppe, aufgeführt. Dabei sind die Werte immer in pg/ml angegeben. Abbildung 14 zeigt ein Streudiagramm, in dem die CA IX-Plasmaspiegel in der IPAH-, CTEPH- und Non-PH-Gruppe mit Median und IQR dargestellt sind.

Mittels one-way-ANOVA konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den logarithmierten CA IX-Konzentrationen der verschiedenen Gruppen (IPAH, CTEPH und Non-PH) festgestellt werden, das Signifikanzniveau (p) beträgt 0,1540.

Auch im multiplen Vergleichstest (Dunnnett's-Test) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen IPAH- bzw. CTEPH-Gruppe und der, als Kontrollgruppe dienenden, Non-PH-Gruppe festgestellt werden. Beim Vergleich der IPAH-Gruppe mit der Non-PH-Gruppe ist $p=0,1303$. Vergleicht man die CTEPH-Gruppe mit der Non-PH-Gruppe ist $p=0,1329$.

Im Anschluss wurden die Sensitivität und Spezifität mittels ROC-Kurve und Youden-Index ermittelt.

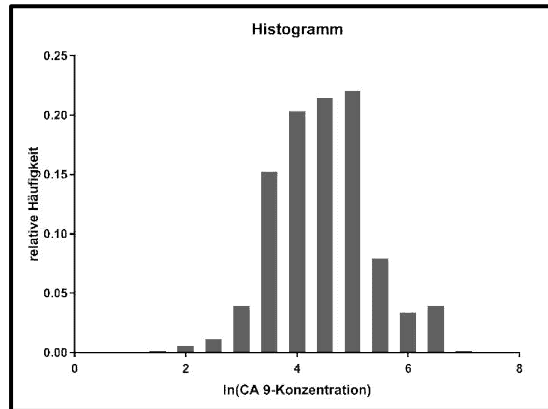


Abbildung 13 Darstellung der Normalverteilung der logarithmierten CA IX-Konzentrationen. Auf der x-Achse ist der natürliche Logarithmus der CA IX-Konzentration in Zweierschritten aufgetragen, auf der y-Achse die relative Häufigkeit in Schritten von 0,05.

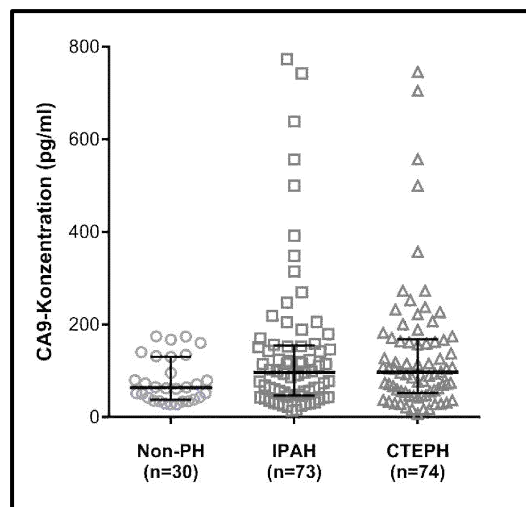


Abbildung 14 Darstellung der CA IX-Plasmakonzentrationen unterteilt in IPAH, CTEPH und Non-PH in pg/ml als Streudiagramm und Darstellung des jeweiligen Medians und des IQR durch Fehlerbalken. In der Non-PH-Gruppe beträgt der Median 63,1, der IQR beträgt 93, in der IPAH-Gruppe beträgt der Median 96, der IQR 108,4, in der CTEPH-Gruppe beträgt der Median 96,8, der IQR 115,4.

Tabelle 11: Statistische Kennzahlen (Median, Minimum, Maximum und IQR) der erhobenen CA IX-Plasmaspiegel (in pg/ml) der einzelnen Untergruppen (IPAH, CTEPH, Non-PH), n=Anzahl der untersuchten Proben in der jeweiligen Gruppe

IPAH(n=73)	pg/ml	CTEPH (n=74)	pg/ml	Non-PH (n=30)	pg/ml
Median	96	Median	96,8	Median	63,1
Minimum	13,4	Minimum	6,8	Minimum	27,2
Maximum	773,3	Maximum	745,6	Maximum	174,6
IQR	108,4	IQR	115,4	IQR	93

4.2.4 Diagnostische Güte der CA IX-Konzentrationen in der Diagnostik der PH

Eine der Fragen, die in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden sollen, ist die Frage, ob mit Hilfe des CA IX-Plasmaspiegels eine IPAH bzw. CTEPH diagnostiziert werden kann. Um diese Frage zu beantworten, werden die Plasmaspiegel, die in der IPAH- bzw. CTEPH-Gruppe erhoben wurden, mit den Plasmaspiegeln der Kontrollgruppe (Non-PH-Gruppe) verglichen. Die pulmonale Hypertonie im Allgemeinen wird durch das Vorliegen eines mPAP von mindestens 25 mmHg definiert. Für die genaue Messung des mPAP ist jedoch eine invasive Rechtsherzkatheter-Untersuchung notwendig. Von Interesse ist also, ob sich durch die Höhe des CA IX-Plasmaspiegels, der mit einer einfachen Blutentnahme bestimmt werden kann, eine Aussage darüber treffen lässt, ob ein Proband möglicherweise unter Pulmonaler Hypertonie leiden könnte. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ist es notwendig, die kontinuierliche Variable „CA IX-Plasmaspiegel“ in eine binäre Variable umzuwandeln, nämlich „erkrankt“ und „gesund“. Hierfür muss ein Schwellenwert des CA IX-Plasmaspiegels bestimmt werden, ab dem ein Proband als „erkrankt“ bezeichnet werden kann. Anschließend können Sensitivität und Spezifität für diesen Schwellenwert bestimmt werden. Um den Schwellenwert zu finden, kann die „Receiver Operating Characteristic“-Kurve, kurz ROC-Kurve, und Youne’s J herangezogen werden. Um eine ROC-Kurve zu generieren, werden die Sensitivitäten und Spezifitäten für mehrere Werte eines kontinuierlichen Tests tabellarisch dargestellt. Daraus entsteht eine Liste aus vielen CA IX-Plasmakonzentrationen mit ihrer Spezifität und Sensitivität, die dann in einem Punktdiagramm dargestellt werden, die y-Achse zeigt dabei die Sensitivität (Richtig-positiv-Rate und die x-Achse zeigt 1-Spezifität (Falsch-positiv-Rate). Die diagnostische Güte eines Tests wird durch die Area under the curve (AUC) bestimmt, ein Test mit einer AUC

von 0,5 kann nicht unterscheiden, ob eine Erkrankung vorliegt oder nicht. Ein Test mit einer AUC von 1 könnte im Gegensatz dazu perfekt zwischen „erkrankt“ und „gesund“ unterscheiden. Ein Test mit einer AUC von 1 würde mit einer Sensitivität und Spezifität von 100% einhergehen (Hoo et al. 2017).

Die ROC-Kurve für CA IX-Plasmaspiegel bei Patienten mit IPAH ist in Abbildung 15 dargestellt. Die Area under the curve beträgt 0,6068, bei einem 95%-CI von 0,4938 bis 0,7199 und einem p-Wert von 0,0894. Die ROC-Kurve für CA IX-Plasmaspiegel bei Patienten mit CTEPH ist in Abbildung 16 dargestellt. Hier beträgt die Area under the curve 0,6284, bei einem 95%-CI von 0,5174 bis 0,7393 und einem p-Wert von 0,0409.

Der nächste Schritt besteht in der Bestimmung des Schwellen-CA IX-Plasmaspiegels, ab dem ein Proband als „erkrankt“ definiert werden würde. Für diesen Schwellenwert wird der Wert herangezogen, der mit der bestmöglichen Kombination aus Sensitivität und Spezifität verbunden ist, in der ROC-Kurve stellt der Punkt, der der linken oberen Ecke am nächsten kommt, den bestmöglichen Schwellenwert dar. Dieser Punkt wird auch Youden Index oder Youden's J genannt (Hoo et al. 2017).

Als Schwellenwert für die IPAH-Gruppe wurde 82,86 pg/ml errechnet, dieser ist mit einer Sensitivität von 54,79% und einer Spezifität von 70% verbunden.

Für die CTEPH-Gruppe wurde der Schwellenwert 82,43 pg/ml errechnet, dieser ist mit einer Sensitivität von 56,76 und ebenfalls mit einer Spezifität von 70% verbunden.

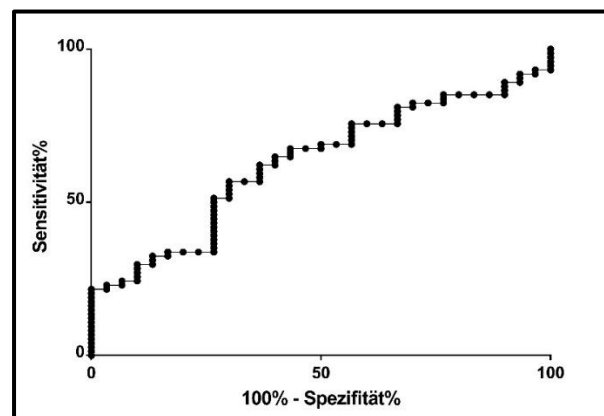


Abbildung 15 zeigt die Receiver Operating Characteristics (ROC) Kurve für CA IX-Plasmaspiegel in der IPAH-Gruppe. Die Punkte stellen unterschiedliche CA IX-Plasmaspiegel dar. Auf der y-Achse wird die Sensitivität in % und auf der x-Achse 100-Spezifität in % angegeben. Die Area under the curve beträgt 0,6068. Der Schwellen-CA IX-Spiegel, ab dem eine Person als „erkrankt“ gilt wurde mit Hilfe von Youden's J bestimmt und liegt bei 82,86 pg/ml. Damit verbunden ist eine Sensitivität von 54,79% und eine Spezifität von 70%.

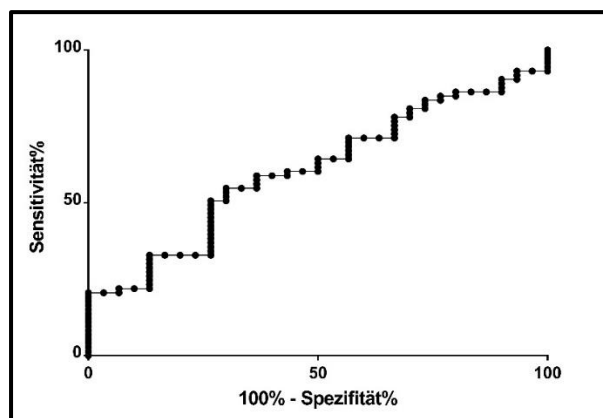


Abbildung 16 zeigt die Receiver Operating Characteristics (ROC) Kurve für CA IX-Plasmaspiegel in der CTEPH-Gruppe. Die Punkte stellen unterschiedliche CA IX-Plasmaspiegel dar. Auf der y-Achse wird die Sensitivität in % und auf der x-Achse 100-Spezifität in % angegeben. Die Area under the curve beträgt 0,6284. Der Schwellen-CA IX-Spiegel, ab dem eine Person als „erkrankt“ gilt wurde mit Hilfe von Youden’s J bestimmt und liegt bei 82,43 pg/ml. Damit verbunden ist eine Sensitivität von 56,76% und eine Spezifität von 70%.

4.3 IPAH: Zusammenhang der CA IX-Plasmaspiegel mit klinischen Parametern

4.3.1 NYHA-Klassen

Mittels Kruskal-Wallis-Test wurde ermittelt, ob sich die CA IX-Plasmaspiegel zwischen den NYHA-Klassen unterscheiden. Abbildung 17 zeigt das Streudiagramm der CA IX-Konzentration bei Patienten mit IPAH, im Diagramm sind die CA IX-Plasmaspiegel unterteilt nach NYHA-Klassen dargestellt, des Weiteren sind Median und IQR mit Hilfe von Fehlerbalken dargestellt. In Tabelle 12 sind die statistischen Kennzahlen für die IPAH-Gruppe, aufgeteilt nach NYHA-Klassen, aufgeführt. Der im Kruskal-Wallis-Test errechnete p-Wert beträgt 0,2467 und somit unterscheiden sich die CA IX-Plasmaspiegel zwischen den NYHA-Klassen nicht signifikant ($p > 0,05$).

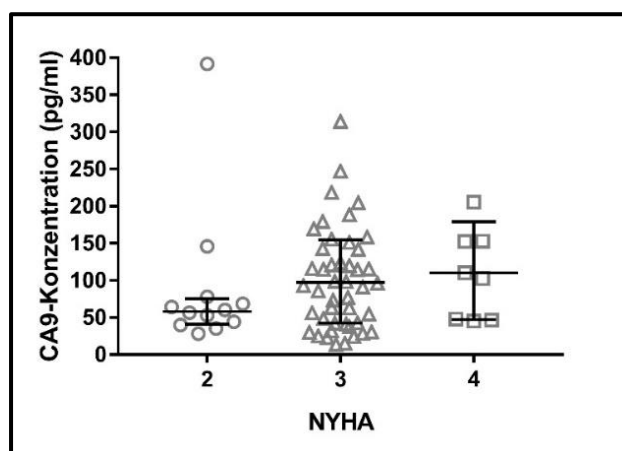


Abbildung 17 IPAH: Streudiagramm zur Darstellung der CA IX-Plasmaspiegel (in pg/ml) unterteilt nach NYHA-Klassen 2,3 und 4. Kein Patient wurde in die NYHA-Klasse 1 eingeordnet. Die Punkte stellen dabei die einzelnen erhobenen CA IX-Plasmaspiegel dar, die Fehlerbalken stellen den Median und den jeweiligen IQR dar. Es zeigt sich im Kruskal-Wallis-Test kein signifikanter Unterschied der Spiegel zwischen den NYHA-Klassen ($p = 0,247$).

Tabelle 12: Einteilung der Patienten in der IPAH-Gruppe nach NYHA-Klassen (n= Personenanzahl in der jeweiligen Klasse) und tabellarische Darstellung der statistischen Parameter Median, Minimum, Maximum und IQR für die erhobenen CA IX-Plasmaspiegel in pg/ml.

NYHA II (n=12)	pg/ml	NYHA III (n=48)	pg/ml	NYHA IV (n=9)	pg/ml
Median	58,21	Median	97,13	Median	110
Minimum	28,2	Minimum	13,43	Minimum	45,13
Maximum	391,9	Maximum	638,4	Maximum	773,3
IQR	34,66	IQR	112,1	IQR	131,84

4.3.2 BNP-Spiegel

Um die Korrelation zwischen den CA IX-Plasmaspiegeln und BNP-Spiegeln auszuwerten, wurden die CA IX-Plasmaspiegel logarithmiert und der Korrelationskoeffizient (Pearsons r) herangezogen. Pearsons r beträgt in der IPAH-Gruppe 0,3964 (95%-Konfidenzintervall 0,1164 - 0,618) und ist damit grenzwertig nicht relevant, da kleiner als 0,4. Die Korrelation ist jedoch auf einem Niveau von 0,007 signifikant ($p < 0,05$). Die Regressionsgerade für die IPAH-Gruppe ist in Abbildung 18 dargestellt.

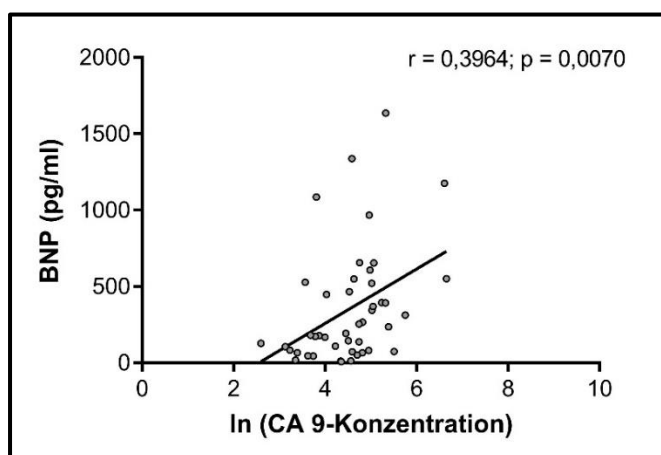


Abbildung 18 IPAH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von $\ln(\text{CA IX})$ mit dem BNP-Spiegel. Pearsons r beträgt in der IPAH-Gruppe 0,3964 (95%-Konfidenzintervall 0,1164 - 0,618) und ist damit nicht relevant, da kleiner als 0,4. Die Korrelation ist auf einem Niveau von 0,007 signifikant ($p < 0,05$).

4.3.3 6-Minuten-Gehstrecke (6MWD)

Um zu überprüfen, ob $\ln(\text{CA IX})$ mit der 6MWD korreliert, wurde ebenfalls Pearsons r bestimmt und ein Streudiagramm mit Regressionsgerade erstellt. Das Streudiagramm für die IPAH-Gruppe ist in Abbildung 19 dargestellt. Pearsons r beträgt für die IPAH-

Gruppe $-0,3385$ (95%-Konfidenzintervall $-0,5505$ bis $-0,08551$). Das Signifikanzniveau liegt bei $0,0100$. Der Zusammenhang ist zwar statistisch signifikant ($p < 0,05$), allerdings nicht relevant, da $r > -0,4$)

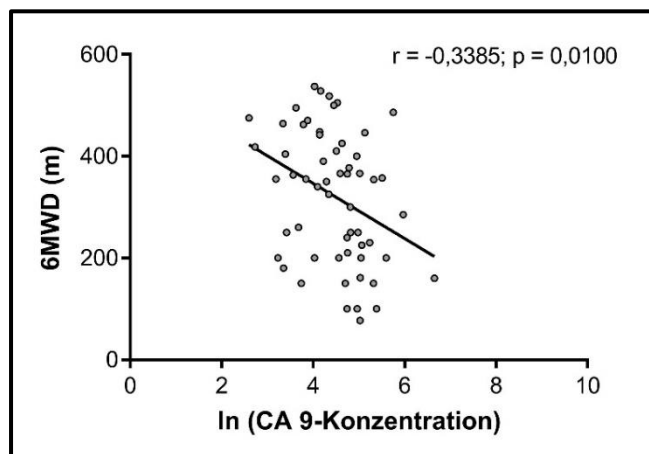


Abbildung 19 IPAH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von $\ln(\text{CA IX})$ mit der 6MWD. Pearsons r beträgt in der IPAH-Gruppe $-0,3385$ (95%-Konfidenzintervall $-0,5505$ bis $-0,08551$) und ist damit nicht relevant, da kleiner als $0,4$. die Korrelation ist auf einem Niveau von $0,01$ signifikant ($p < 0,05$).

4.3.4 Cardiac Index

In der IPAH-Gruppe konnten wir keine signifikante Korrelation zwischen den CA IX-Plasmaspiegeln und dem Cardiac Index feststellen. Der Korrelationskoeffizient Pearsons r beträgt für diese Gruppe $-0,2253$ (95%-Konfidenzintervall $-0,4357$ bis $0,008471$). Das Signifikanzniveau beträgt $0,0589$ und somit größer als $0,05$. Das Streudiagramm mit Regressionsgerade ist in Abbildung 20 dargestellt.

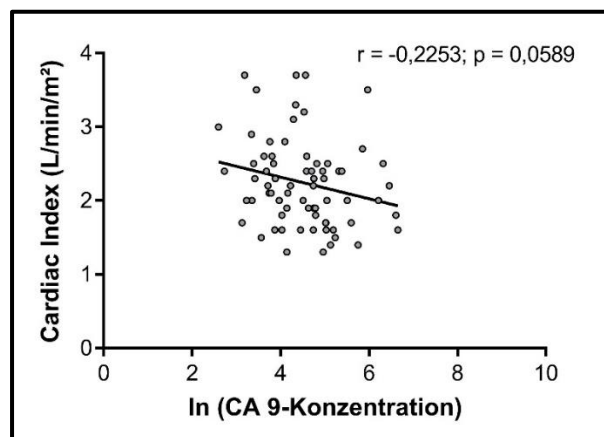


Abbildung 20 IPAH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von $\ln(\text{CA IX})$ mit dem Cardiac Index. Pearsons r beträgt in der IPAH-Gruppe $-0,2253$ (95%-Konfidenzintervall $-0,4357$ bis $0,008471$) und ist damit nicht relevant, da kleiner als $0,4$. die Korrelation ist auf einem Niveau von $0,0589$ nicht signifikant ($p > 0,05$).

4.3.5 Mittlerer pulmonal-arterieller Druck (mPAP)

In der IPAH-Gruppe beträgt Pearsons r $-0,02728$ für den Zusammenhang zwischen $\ln(\text{CA IX})$ und den mPAP (95%-Konfidenzintervall $-0,2557$ bis $0,2041$). P beträgt $0,8188$. Somit liegt keine signifikante Korrelation vor. Das Streudiagramm mit Regressionsgerade ist in Abbildung 21 dargestellt.

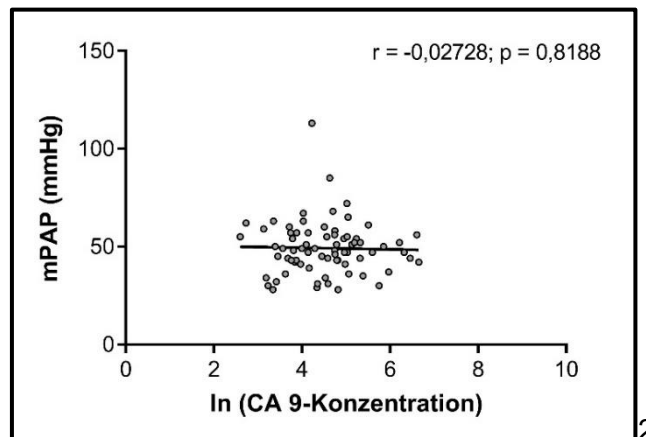


Abbildung 21 IPAH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von $\ln(\text{CA IX})$ mit dem mPAP. Pearsons r beträgt in der IPAH-Gruppe $-0,02728$ (95%-Konfidenzintervall $-0,2557$ bis $0,2041$) und ist damit nicht relevant, da kleiner als $0,4$. Die Korrelation ist auf einem Niveau von $0,8188$ nicht signifikant ($p > 0,05$).

4.3.6 Pulmonal vaskulärer Widerstand (PVR)

In der IPAH-Gruppe liegt Pearsons r bei $-0,005334$ (95%-Konfidenzintervall $-0,2351$ bis $0,225$), p beträgt $0,9643$. Es liegt also keine Korrelation zwischen den CA IX-Plasmaspiegeln und dem PVR vor. Das Streudiagramm mit Regressionsgerade ist in Abbildung 22 dargestellt.

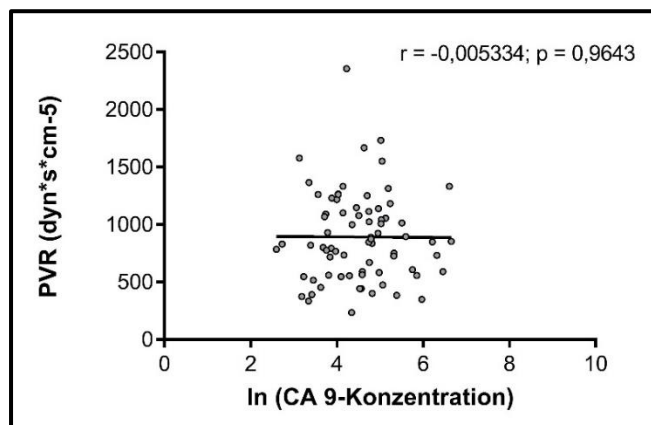


Abbildung 22 IPAH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von $\ln(\text{CA IX})$ mit dem PVR. Pearsons r beträgt in der IPAH-Gruppe $-0,005334$ (95%-Konfidenzintervall $-0,2351$ bis $0,225$) und ist damit nicht relevant, da kleiner als $0,4$. Die Korrelation ist auf einem Niveau von $0,9643$ nicht signifikant ($p > 0,05$).

4.4 CTEPH: Zusammenhang der CA IX-Plasmaspiegel mit klinischen Parametern

4.4.1 NYHA-Klassen

Mittels Kruskal-Wallis-Test wurde ermittelt, ob sich die CA IX-Plasmaspiegel zwischen den NYHA-Klassen unterscheiden. Abbildung 23 zeigt das Streudiagramm der CA IX-Konzentration bei Patienten mit CTEPH, unterteilt nach NYHA-Klassen, dargestellt sind die Einzelwerte, außerdem Median und IQR. In Tabelle 13 sind die statistischen Kennzahlen für die CTEPH-Gruppe, aufgeteilt nach NYHA-Klassen, aufgeführt. Der im Kruskal-Wallis-Test errechnete p-Wert beträgt 0,0722 und somit unterscheiden sich die CA IX-Plasmaspiegel zwischen den NYHA-Klassen nicht signifikant ($p > 0,05$).

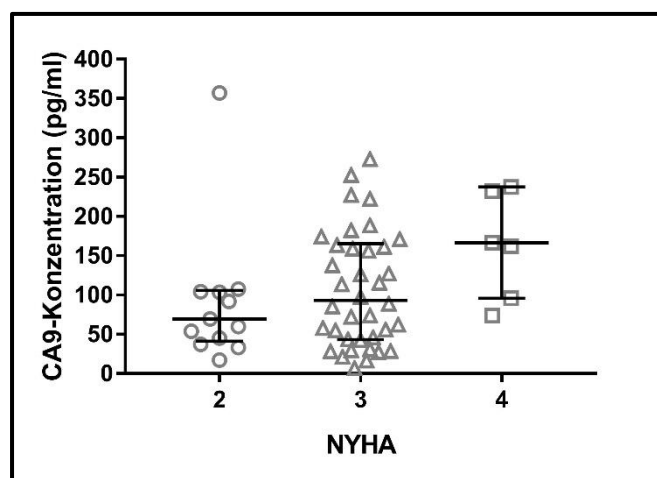


Abbildung 23 CTEPH: Streudiagramm zur Darstellung der CA IX-Plasmaspiegel (in pg/ml) unterteilt nach NYHA-Klassen 2,3 und 4. Kein Patient wurde in die NYHA-Klasse 1 eingeordnet. Die Punkte stellen dabei die einzelnen erhobenen CA IX-Plasmaspiegel dar, die Fehlerbalken stellen den Median und den jeweiligen IQR dar. Es zeigt sich im Kruskal-Wallis-Test kein signifikanter Unterschied der Spiegel zwischen den NYHA-Klassen ($p=0,0722$).

Tabelle 13: Einteilung der Patienten in der CTEPH-Gruppe nach NYHA-Klassen (n = Personenanzahl in der jeweiligen Klasse) und tabellarische Darstellung der statistischen Parameter Median, Minimum, Maximum und IQR für die erhobenen CA IX-Plasmaspiegel in pg/ml.

NYHA II (n=13)	pg/ml	NYHA III (n=38)	pg/ml	NYHA IV (n=7)	pg/ml
Median	69,5	Median	93,25	Median	166,6
Minimum	17,06	Minimum	6,827	Minimum	73,81
Maximum	556,9	Maximum	499,9	Maximum	704,8
IQR	64	IQR	122	IQR	141,54

4.4.2 BNP-Spiegel

Um die Korrelation zwischen den CA IX-Plasmaspiegeln und BNP-Spiegeln zu bestimmen, wurde ebenfalls der CA IX-Plasmaspiegel logarithmiert und Pearsons r berechnet. In der CTEPH-Gruppe beträgt Pearsons r 0,4335 (95%-Konfidenzintervall 0,1117 bis 0,673). P beträgt 0,0104. Es besteht daher eine relevante ($r > 0,4$) und statistisch signifikante Korrelation ($p < 0,05$) zwischen $\ln(\text{CA IX})$ und dem BNP-Spiegel. In Abbildung 24 ist das Streudiagramm mit Regressionsgerade für die CTEPH-Gruppe dargestellt.

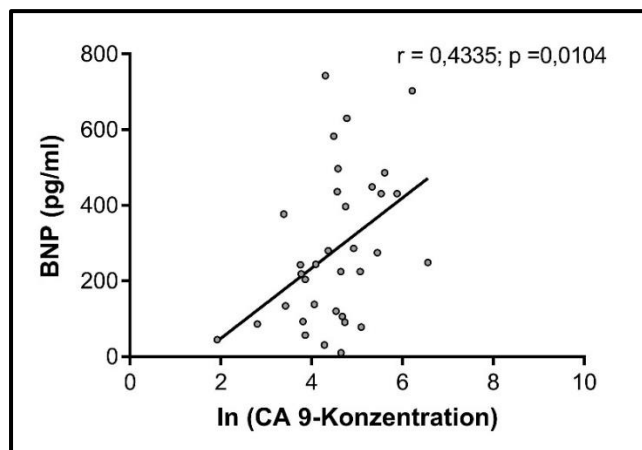


Abbildung 24 CTEPH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von $\ln(\text{CA IX})$ mit dem BNP-Spiegel. Pearsons r beträgt in der CTEPH-Gruppe 0,4335 (95%-Konfidenzintervall 0,1117 bis 0,673) und ist damit relevant, da größer als 0,4. Die Korrelation ist auf einem Niveau von 0,0104 signifikant ($p < 0,05$).

4.4.3 6MWD

In der CTEPH-Gruppe konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen $\ln(\text{CA IX})$ und der 6MWD festgestellt werden. Pearsons r beträgt -0,05314 (95%-Konfidenzintervall -0,3189 bis 0,2203) und p beträgt 0,7055. In Abbildung 25 ist das Streudiagramm und die Regressionsgerade dargestellt.

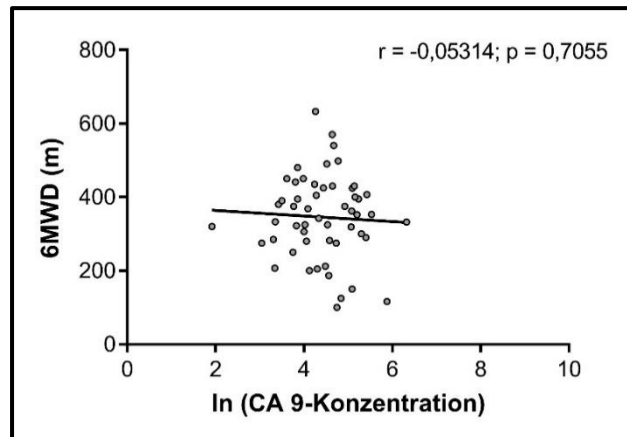


Abbildung 25 CTEPH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von $\ln(\text{CA IX})$ mit der 6MWD. Pearsons r beträgt in der CTEPH-Gruppe $-0,05314$ (95%-Konfidenzintervall $-0,3189$ bis $0,2203$) und ist damit nicht relevant, da kleiner als $0,4$. Die Korrelation ist auf einem Niveau von $0,7055$ nicht signifikant ($p > 0,05$).

4.4.4 Cardiac Index

In der CTEPH-Gruppe konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden. Spearmans r beträgt $-0,006465$ (95%-Konfidenzintervall $-0,2378$ bis $0,2255$), p beträgt $0,957$. Das Streudiagramm und die Regressionsgerade sind in Abbildung 26 dargestellt.

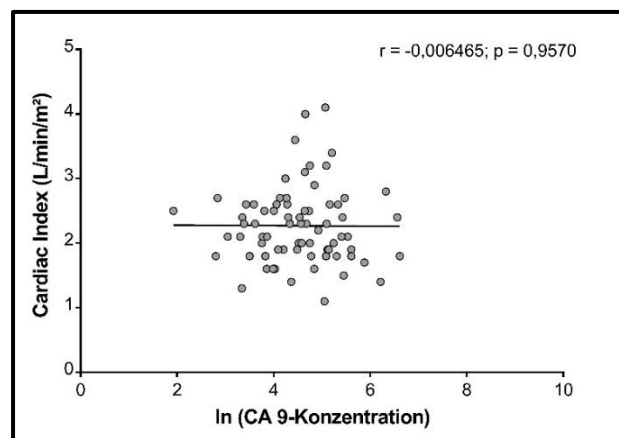


Abbildung 26 CTEPH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von $\ln(\text{CA IX})$ mit dem Cardiac Index. Pearsons r beträgt in der CTEPH-Gruppe $-0,006465$ (95%-Konfidenzintervall $-0,2378$ bis $0,2255$) und ist damit nicht relevant, da kleiner als $0,4$. Die Korrelation ist auf einem Niveau von $0,9570$ nicht signifikant ($p > 0,05$).

4.4.5 mPAP

In der CTEPH-Gruppe konnte keine Korrelation zwischen $\ln(\text{CA IX})$ und dem mPAP festgestellt werden. Spearmans r beträgt $0,09922$ (95%-Konfidenzintervall $-0,1323$ bis $0,3205$), p beträgt $0,4003$. In Abbildung 27 ist das Streudiagramm und die Regressionsgerade dargestellt.

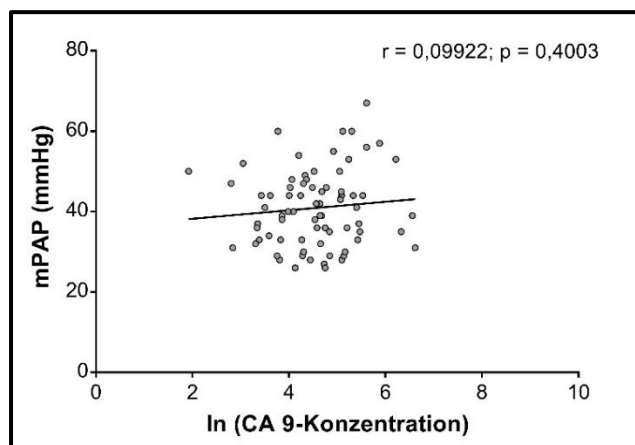


Abbildung 27 CTEPH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von $\ln(\text{CA IX})$ mit dem mPAP. Pearsons r beträgt in der CTEPH-Gruppe 0,09922 (95%-Konfidenzintervall -0,1323 bis 0,3205) und ist damit nicht relevant, da kleiner als 0,4. Die Korrelation ist auf einem Niveau von 0,4003 nicht signifikant ($p > 0,05$).

4.4.6 PVR

Es konnte keine Korrelation zwischen $\ln(\text{CA IX})$ und dem PVR festgestellt werden. Spearmans r beträgt -0,11 (95%-Konfidenzintervall -0,3317 bis 0,1232), p beträgt 0,3543. In Abbildung 28 ist das Streudiagramm und die Regressionsgerade dargestellt.

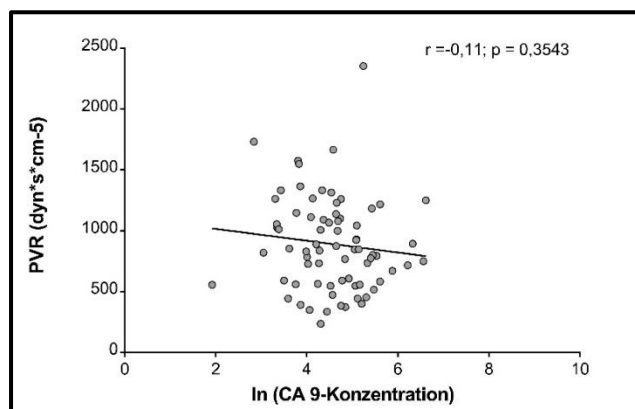


Abbildung 28 CTEPH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von $\ln(\text{CA IX})$ mit dem PVR. Pearsons r beträgt in der CTEPH-Gruppe -0,11 (95%-Konfidenzintervall -0,3317 bis 0,1232) und ist damit nicht relevant, da kleiner als 0,4. Die Korrelation ist auf einem Niveau von 0,3543 nicht signifikant ($p > 0,05$).

4.5 Uni- und multivariate Überlebensanalyse

4.5.1 Gesamte IPAH-Gruppe

In die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der IPAH-Gruppe gingen 35 Todesfälle und 37 zensierte Daten von Patienten ein, die zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch lebten. Zensierte Daten sind in der Abbildung als senkrechter Strich dargestellt. Das mediane

Überleben in der IPAH-Gruppe beträgt 2141 Tage. Die Kaplan-Meier-Kurve ist in Abbildung 29 dargestellt.

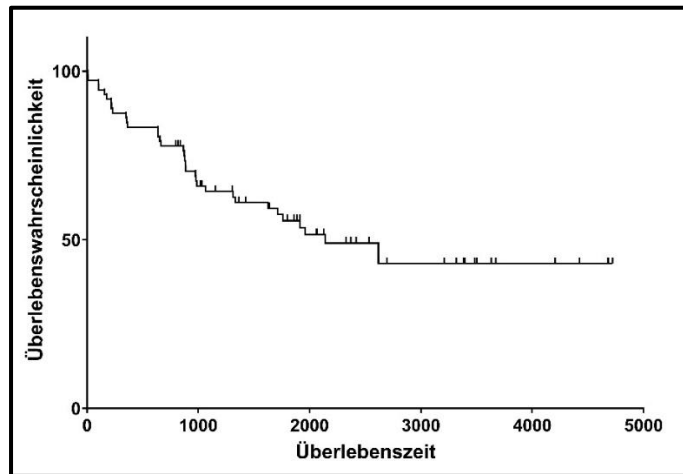


Abbildung 29 Kaplan-Meier-Kurve: IPAH-Gruppe; Überlebenszeit in Tagen, Überlebenswahrscheinlichkeit in %. In die Analyse gingen 35 Todesfälle und 37 zensierte Daten ein, die durch einen senkrechten Strich dargestellt sind. Das mediane Überleben in der IPAH-Gruppe beträgt 2141 Tage.

4.5.2 IPAH-Gruppe unterteilt in Quartile nach CA IX-Plasmakonzentration

Für eine genauere Analyse der Überlebenszeit, je nach CA IX-Plasmaspiegel, wurden die CA IX-Konzentrationen in 4 Quartile unterteilt. Daraufhin wurden die Überlebenszeiten in den einzelnen Quartilen miteinander verglichen. Hierfür wurde der Log-rank-Test nach Mantel-Cox und der Logrank-Test für den Trend herangezogen. In das erste Quartil wurden 5 Todesfälle und 14 zensierte Daten eingeordnet, das mediane Überleben des ersten Quartils konnte nicht definiert werden, in das zweite Quartil wurden 8 Todesfälle und 9 zensierte Daten eingeordnet, das mediane Überleben betrug 1712 Tage, in das dritte Quartil wurden 9 Todesfälle und 9 zensierte Daten eingeordnet, das mediane Überleben betrug 1912 Tage und in das vierte Quartil fielen 13 Todesfälle und 5 zensierte Daten, das mediane Überleben in diesem Quartil betrug 881 Tage. Die Kaplan-Meier-Kurve ist in Abbildung 30 dargestellt.

Im Mantel-Cox-Test ergibt sich für die IPAH-Gruppe ein Unterschied zwischen den Quartilen mit einem χ^2 von 9,58, dieser ist auf einem Niveau von $p=0,0225$ signifikant. Im Logrank-Test für den Trend ergibt sich ein χ^2 von 8,456, p beträgt 0,0036, somit ist der Unterschied zwischen den Gruppen auch in diesem Test signifikant.

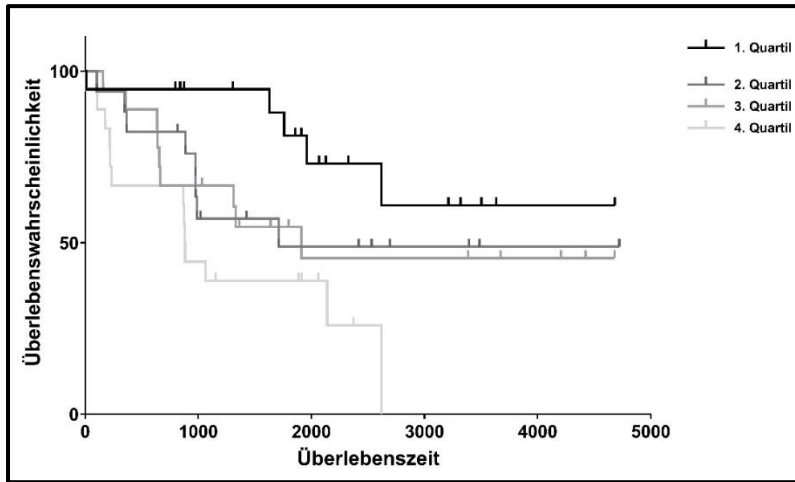


Abbildung 30 Kaplan-Meier-Kurve: IPAH-Gruppe, eingeteilt in Quartile nach CA IX-Plasmakonzentration. 1. Quartil (5 Todesfälle und 14 zensierte Daten), medianes Überleben: nicht definiert; 2. Quartil (8 Todesfälle und 9 zensierte Daten), medianes Überleben 1712 Tage; 3. Quartil (9 Todesfälle und 9 zensierte Daten), medianes Überleben 1912 Tage; 4. Quartil (13 Todesfälle und 5 zensierte Daten), medianes Überleben 881 Tage. Mantel-Cox-Test: $\chi^2=9,58$, $p=0,0225$; Logrank-Test für den Trend: $\chi^2=8,456$, $p=0,0036$.

4.5.3 Gesamte CTEPH-Gruppe

In die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der CTEPH-Gruppe gingen 20 Todesfälle und 54 zensierte Daten von Patienten ein, die zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch lebten. Zensierte Daten sind als senkrechter Strich dargestellt. Die mediane Überlebenszeit in dieser Gruppe beträgt 3278 Tage. Die Kaplan-Meier-Kurve für die CTEPH-Gruppe ist in Abbildung 31 dargestellt.

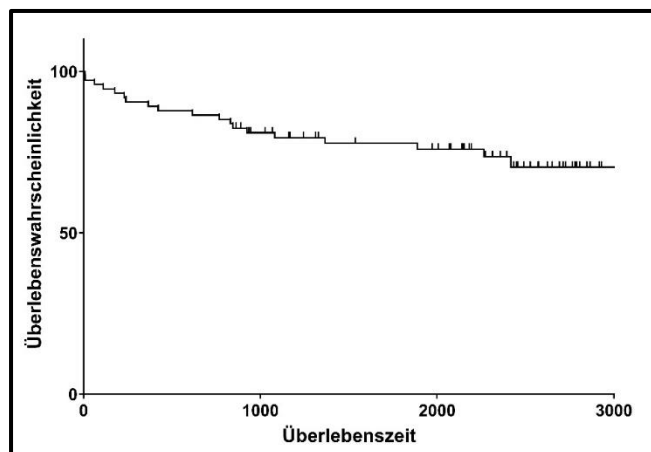


Abbildung 31 Kaplan-Meier-Kurve: CTEPH-Gruppe; Überlebenszeit in Tagen, Überlebenswahrscheinlichkeit in %. In die Analyse gingen 20 Todesfälle und 54 zensierte Daten ein, die zensierten Daten sind durch einen senkrechten Strich dargestellt. Das mediane Überleben in der CTEPH-Gruppe beträgt 3278 Tage.

4.5.4 CTEPH-Gruppe unterteilt nach CA IX-Plasmaspiegeln

Die CTEPH-Gruppe wurde ebenfalls nach CA IX-Plasmaspiegel in 4 Quartile unterteilt und die Überlebenszeiten der Quartile miteinander verglichen. Hierfür wurde ebenfalls der Log-rank-Test nach Mantel-Cox und der Logrank-Test für den Trend herangezogen. In das erste Quartil wurden 2 Todesfälle und 16 zensierte Daten eingeordnet, das mediane Überleben des ersten Quartils konnte nicht definiert werden, in das zweite Quartil wurden 5 Todesfälle und 14 zensierte Daten eingeordnet, das mediane Überleben konnte auch in diesem Quartil nicht definiert werden, in das dritte Quartil wurden 6 Todesfälle und 13 zensierte Daten eingeordnet, das mediane Überleben betrug 3278 Tage und in das vierte Quartil wurden 7 Todesfälle und 11 zensierte Daten einsortiert, das mediane Überleben in diesem Quartil konnte ebenfalls nicht definiert werden. Die Kaplan-Meier-Kurve ist in Abbildung 32 dargestellt.

Im Mantel-Cox-Test ergibt sich für die CTEPH-Gruppe ein Unterschied zwischen den Gruppen mit einem Chi^2 von 4,285, dieser ist bei einem p-Wert von 0,2323 nicht signifikant. Im Logrank-Test für den Trend ergibt sich ein Chi^2 von 3,843, p beträgt 0,05, somit ist der Unterschied zwischen den Gruppen in diesem Test ebenfalls nicht signifikant.

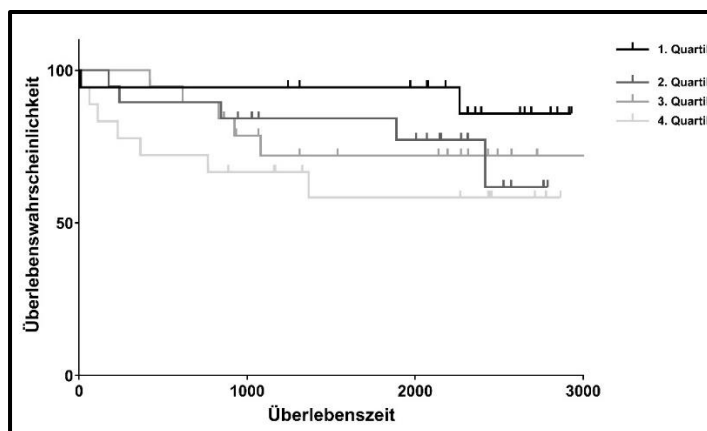


Abbildung 32 Kaplan-Meier-Kurve: CTEPH-Gruppe, eingeteilt in Quartile nach CA IX-Plasmakonzentration. 1. Quartil (2 Todesfälle und 16 zensierte Daten), medianes Überleben: nicht definiert; 2. Quartil (5 Todesfälle und 14 zensierte Daten), medianes Überleben: nicht definiert; 3. Quartil (6 Todesfälle und 13 zensierte Daten), medianes Überleben 3278 Tage; 4. Quartil (7 Todesfälle und 11 zensierte Daten), medianes Überleben: nicht definiert. Mantel-Cox-Test: $\text{Chi}^2= 4,285$, $p=0,2323$, nicht signifikant; Logrank-Test für den Trend: $\text{Chi}^2=3,843$, $p= 0,05$, nicht signifikant

4.5.5 Cox-Regressions-Analyse für die IPAH-Gruppe

Die Cox-Regressions-Analyse wurde verwendet, um zu überprüfen, ob der CA IX-Plasmaspiegel auch in einer multivariaten Analyse des Überlebens als relevanter Parameter standhält. Für die Analyse der IPAH-Gruppe waren 24 (32,9%) Todesfälle

und 29 (39,7%) zensierte Daten verfügbar, 20 Fälle (27,4%) wurden aufgrund von fehlenden Daten nicht verwendet. Die Kovariaten stellen der CA IX-Plasmaspiegel, mPAP, PVR, CI, 6MWD, BNP, Alter und Geschlecht dar. In der Analyse wird deutlich, dass der CA IX-Plasmaspiegel in der IPAH-Gruppe einen starken Prädiktor darstellt. Er bleibt auch nach dem Ausschließen der schwächeren Kovariaten (PVR, CI, BNP, Alter und Geschlecht) mit einer Hazard Ratio von 1,007 (95%-Konfidenzintervall 1,003 bis 1,001) und einer Signifikanz von $<0,001$ erhalten. Ähnlich stark ist der mPAP mit einer Hazard Ratio von 1,070 (95%-Konfidenzintervall 1,034 bis 1,107) und einer Signifikanz von ebenfalls $<0,001$. Die 6MWD stellt sich ebenfalls als starker Prädiktor mit einer Hazard ratio von 0,996 (95%-Konfidenzintervall 0,993 bis 1,000) auf einem Signifikanzniveau von 0,037 dar. In Tabelle 14 wird der schrittweise Ausschluss der schwächeren Kovariaten mit der jeweiligen Hazard Ratio, dem dazugehörigen 95%-Konfidenzintervall und der Signifikanz dargestellt.

Tabelle 14: Cox-Regressionsanalyse der IPAH-Gruppe: Die Tabelle soll verdeutlichen, wie schrittweise die schwächeren Kovariaten ausgeschlossen werden, bis am Ende die 3 stärksten Kovariaten übrigbleiben. In diesem Fall sind es mPAP, die 6-Minute-Walk-Distance und der CA IX-Plasmaspiegel. Dargestellt wird die Hazard Ratio für die jeweilige Kovariate, das dazugehörige 95%-Konfidenzintervall und das Signifikanzniveau.

Schritt	Kovariate	Signifikanz	Hazard Ratio (HR)	95,0% Konfidenzinterv. für HR	
				Untere Grenze	Obere Grenze
Schritt 1	Age	0,334	1,022	0,978	1,067
	sex	0,309	0,563	0,186	1,702
	mPAP	0,086	1,069	0,991	1,153
	PVR	0,772	1,000	1,000	1,000
	CI	0,663	0,969	0,843	1,115
	BNP	0,522	1,000	0,999	1,002
	6min-Walk	0,196	0,997	0,993	1,001
	CA IX	0,003	1,006	1,002	1,009
Schritt 2	Age	0,326	1,022	0,978	1,068
	sex	0,281	0,550	0,185	1,633
	mPAP	0,000	1,079	1,034	1,125
	CI	0,296	0,954	0,873	1,042
	BNP	0,533	1,000	0,999	1,002
	6min-Walk	0,204	0,997	0,993	1,001
	CA IX	0,003	1,005	1,002	1,009
	Schritt 3	Age	0,177	1,028	0,988
sex		0,363	0,649	0,255	1,648
mPAP		<0,001	1,081	1,036	1,128
CI		0,277	0,953	0,873	1,040
6min-Walk		0,212	0,997	0,994	1,001
CA IX		0,002	1,006	1,002	1,009
Schritt 4		Age	0,252	1,023	0,984
	mPAP	<0,001	1,079	1,034	1,125
	CI	0,410	0,966	0,888	1,049
	6min-Walk	0,114	0,997	0,993	1,001
	CA IX	0,002	1,006	1,002	1,009
Schritt 5	Age	0,298	1,020	0,982	1,060
	mPAP	<0,001	1,083	1,039	1,128
	6min-Walk	0,090	0,997	0,993	1,001
	CA IX	0,002	1,006	1,002	1,009
Schritt 6	mPAP	<0,001	1,070	1,034	1,107
	6min-Walk	0,037	0,996	0,993	1,000
	CA IX	<0,0001	1,007	1,003	1,010

4.5.6 Cox-Regressions-Analyse: CTEPH-Gruppe

Bei der Anwendung der Cox-Regressions-Analyse der CTEPH-Gruppe fällt auf, dass die CA IX-Spiegel in dieser Gruppe eine schwächere Kovariate darstellen, sie stellen keinen signifikanten Prädiktor dar, im letzten Schritt, in dem der CA IX-Plasmaspiegel noch in der Analyse enthalten ist, beträgt die Hazard Ratio 0,972, bei einem 95%-Konfidenzintervall von 0,926 bis 1,02, das Signifikanzniveau liegt bei 0,243. Da das 95%-Konfidenzintervall um 1 herum liegt und keine signifikante Risikoänderung durch eine Erhöhung der CA IX-Plasmaspiegel zu erwarten ist, stellt dieser in der vorliegenden Arbeit keinen Prädiktor für das Überleben in der CTEPH-Gruppe dar.

Tabelle 15: Cox-Regressionsanalyse der CTEPH-Gruppe: Wiederum schrittweiser Ausschluss der schwächeren Kovariaten, bis am Ende die 3 stärksten Kovariaten übrigbleiben. In diesem Fall sind es mPAP,

der Cardiac Index und der BNP-Spiegel. Dargestellt wird die Hazard Ratio für die jeweilige Kovariate, das dazugehörige 95%-Konfidenzintervall und das Signifikanzniveau.

		Signifikanz	Hazard Ratio (HR)	95,0% Konfidenzinterv. für HR	
				Untere	Obere
Schritt 1	Age	0,789	0,975	0,808	1,176
	sex	0,150	17,409	0,357	849,398
	mPAP	0,028	0,747	0,576	0,970
	PVR	0,280	1,008	0,993	1,023
	CI	0,018	1,973	1,126	3,456
	BNP	0,044	1,008	1,000	1,016
	6min-Walk	0,470	0,995	0,980	1,009
	CA IX	0,132	0,959	0,908	1,013
Schritt 2	sex	0,142	18,355	0,377	893,617
	mPAP	0,028	0,746	0,575	0,968
	PVR	0,246	1,009	0,994	1,023
	CI	0,018	1,969	1,122	3,453
	BNP	0,045	1,008	1,000	1,016
	6min-Walk	0,491	0,995	0,983	1,008
	CA IX	0,138	0,960	0,909	1,013
	sex	0,076	34,314	0,688	1710,481
Schritt 3	mPAP	0,042	0,757	0,579	0,990
	PVR	0,356	1,007	0,992	1,022
	CI	0,024	1,956	1,090	3,509
	BNP	0,044	1,008	1,000	1,016
	CA IX	0,163	0,962	0,911	1,016
	sex	0,111	17,381	0,521	579,616
	mPAP	0,033	0,830	0,699	0,985
	CI	0,023	1,656	1,074	2,553
Schritt 4	BNP	0,033	1,009	1,001	1,016
	CA IX	0,243	0,972	0,926	1,020
	sex	0,120	4,259	0,684	26,516
	mPAP	0,041	0,848	0,724	0,993
	CI	0,001	1,361	1,126	1,645
	BNP	0,061	1,006	1,000	1,013
	mPAP	0,061	0,873	0,757	1,007
	CI	0,001	1,290	1,105	1,507
Schritt 6	BNP	0,095	1,006	0,999	1,012

4.6 Carboanhydrase XII

4.6.1 Kommerziell verfügbare ELISA-Kits

Ursprünglich war neben der Bestimmung der CA IX-Plasmaspiegel die Bestimmung der CA XII-Plasmaspiegel geplant. Für die Bestimmung der Spiegel wurden alle zu der Zeit verfügbaren, kommerziellen ELISA-Kits getestet (1. SED079Hu Carbonic Anhydrase XII ELISA-Kit, Cloud Clone Corp., Houston, Texas, USA; 2. CA 12 ELISA-Kit (Human), AVIVA Systems Biology, San Diego, Kalifornien, USA, Catalog-Number: OKEH02509). Allerdings erbrachten diese ELISA-Kits, bei Durchführung nach Herstellerangaben, bei uns keine reliablen und reproduzierbaren Ergebnisse. Nach frustraner Testung aller verfügbaren Kits, versuchten wir die Etablierung eines eigenen ELISA-Tests. Allerdings konnten wir keinen ELISA-Test entwerfen, der verlässlich die CA XII-Konzentration bestimmen konnte. Mögliche Fehlerquellen wie Inkompatibilität der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper konnten durch die Verwendung adäquater Antikörper

ausgeschlossen werden. Wir vermuten, dass eine Kreuzreaktivität mit anderen Antigenen vorliegt und noch kein wirklich zuverlässiger Nachweis der CA XII-Plasmaspiegel möglich ist. Dafür spricht, dass eine Pubmed-Recherche keine Ergebnisse zeigt, die die Suchbegriffe „Carbonic anhydrase 12“ in Kombination mit „Elisa“, „Serum“ oder „Plasma“ enthalten (Stand 07/23).

4.6.2 Versuch der Etablierung eines eigenen ELISA-Kits:

Verwendete Protokoll-Vorlage: Abnova Sandwich ELISA Protocol for matched Antibody pair (Abnova, Taipeh, Taiwan)

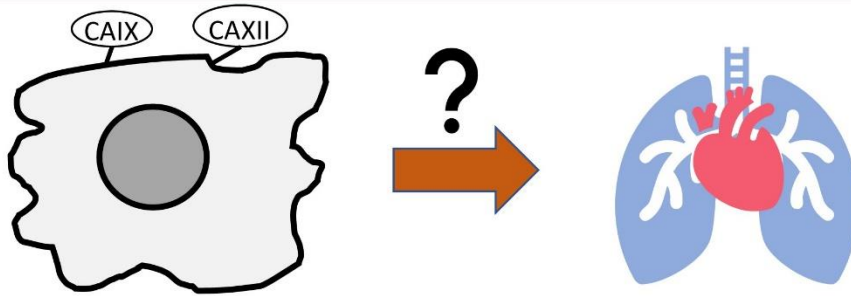
Verwendete Antikörper: 1. CA12 (Human) Matched Antibody Pair (Abnova, Taipeh, Taiwan) → Capture antibody: mouse monoclonal anti-CA12. Detection antibody: rabbit purified polyclonal anti-CA12 2. Sekundär-Antikörper: Goat anti-Rabbit IgG (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, USA)

Verwendeter Standard: Recombinant Human Carbonic Anhydrase XII Protein (RnDSystems, Minneapolis, Minnesota, USA)

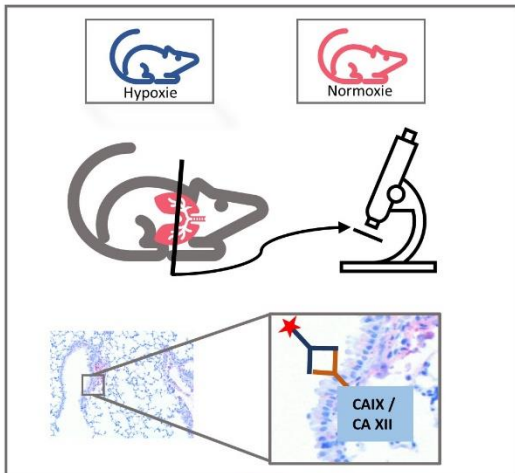
Der erste Versuch wurde exakt nach der Protokoll-Vorlage für ELISA-Kits durchgeführt, die von Abnova zur Verfügung gestellt wird. Bei diesem Versuch konnten jedoch nur sehr schwache Signale erzeugt werden, die wir für eine Auswertung nicht verwenden konnten. Nach Anpassung des Protokolls, wie einer verlängerten Inkubationszeit und einer verlängerten Einwirkungszeit des Substrats, erhielt man Signale im Plattenreader. Leider waren die Ergebnisse nicht reproduzierbar, in mehreren Versuchsreihen und mit verschiedenen Standards, konnte in der Verdünnungsreihe kein Signal erzeugt werden, das stärker war als die Negativkontrolle.

Central Illustration: CA IX und CAXII als mögliche Biomarker für Pulmonale Hypertonie

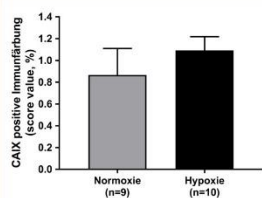
CA IX und CAXII wird bei verschiedenen malignen Erkrankungen exprimiert. Bedeutung für die Pulmonale Hypertonie?



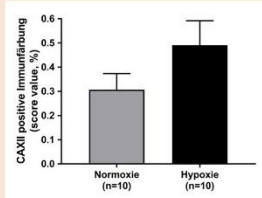
Tiermodell: Immunhistochemie



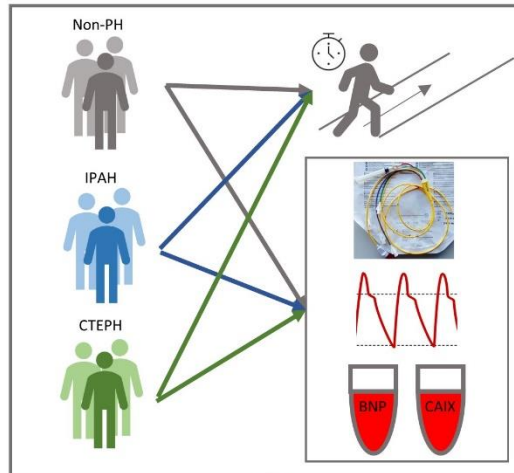
CA IX: Nicht signifikanter Trend zu erhöhter CA IX-Expression in der Hypoxie-Gruppe (p=0,43)



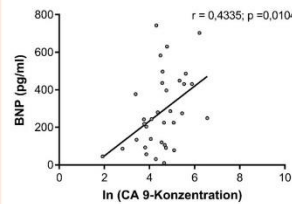
CA XII: Nicht signifikanter Trend zu erhöhter CA IX-Expression in der Hypoxie-Gruppe (p=0,15)



CA IX-Spiegel bei PH-Patienten



Signifikanter Zusammenhang des CAIX-Spiegels mit dem BNP-Spiegel bei CTEPH (p=0,01)



Signifikanter Zusammenhang des CAIX-Spiegels mit dem Überleben bei IPAH: p=0,02 (CTEPH: p=0,23)

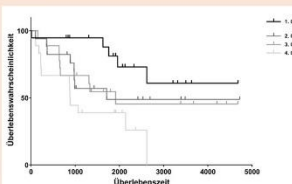


Abbildung 33 Central Illustration: Fragestellung, durchgeführte Arbeiten, wichtigste Ergebnisse

5. Diskussion

Unter der Fragestellung, ob Carboanhydrasen bei Patienten mit Pulmonaler Hypertonie in erhöhter Konzentration im Blut nachgewiesen werden können, untersuchten wir die CAIX-Plasmaspiegel im Blut von Patienten mit IPAH und CTEPH, führten Korrelationsanalysen mit verschiedenen hämodynamischen Parametern und Überlebensanalysen durch. In der IPAH-Gruppe zeigte sich hierbei ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem erhöhten CA IX-Spiegel und einer kürzeren Überlebenszeit.

Um herauszufinden, ob eine Pulmonale Hypertonie außerdem mit einer erhöhten Expression von CA IX (bzw. CA XII) im Lungengewebe einhergeht, wurde mittels Immunhistochemie untersucht, ob sich bei Mäusen, bei denen artifiziell eine PH ausgelöst wurde, eine erhöhte Expression von CAIX bzw. CAXII zeigt. In dieser Untersuchung zeigte sich tatsächlich ein Trend hin zu einer erhöhten pulmonal-vaskulären CA IX-Expression, die Ergebnisse sind jedoch nicht statistisch signifikant.

5.1 CA IX- und CA XII-Expression im Tiermodell

In der vorliegenden Arbeit wurden Lungen von Mäusen immunhistochemisch untersucht, bei denen ein Hypoxie-bedingtes Gefäß-Remodeling und damit eine artifizielle pulmonale Hypertonie erzeugt wurde. Eine signifikante Erhöhung der CA IX- bzw. CA XII-Expression konnten wir nicht nachweisen, jedoch einen Trend hin zu einer vermehrten Expression in den Lungen von Mäusen, die einer Hypoxie ausgesetzt waren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die CA IX und CA XII unter Hypoxie-Bedingungen (nicht signifikant) vermehrt exprimiert wird. Nicht ersichtlich ist jedoch, ob CA IX bzw. CA XII eine Rolle in der Induktion von Hypoxie-bedingten Gefäßveränderungen einnimmt und somit an der Entstehung der artifiziellen pulmonalen Hypertonie beteiligt ist.

5.2 Mögliche Ursache für die nicht-signifikante Erhöhung der CAIX-Spiegel

Wir konnten in der vorliegenden Studie keine statistisch signifikante Erhöhung der Carboanhydrase-IX-Spiegel bei Patienten mit IPAH und CTEPH im Vergleich mit der Kontrollgruppe feststellen, jedoch ist ein Trend hin zu einer Erhöhung sichtbar geworden. In der IPAH-Gruppe beträgt der Median 96 pg/ml, der IQR beträgt 108,4 pg/ml. In der CTEPH-Gruppe beträgt der Median 96,8 pg/ml, der IQR 115,4 pg/ml. In der Non-PH-Gruppe beträgt der Median 63,1 pg/ml, der IQR beträgt 93 pg/ml. Eine Ursache für die nicht-signifikante Erhöhung der CA IX-Plasmaspiegel könnte die Tatsache darstellen, dass in dieser Arbeit die lösliche Form der CA IX untersucht wurde. Die CA IX liegt in

zwei Formen vor, in der Zell-gebundenen Form als Transmembranprotein und in einer löslichen Form (Závada et al. 2003). In einer Arbeit zu Nierenzellkarzinomen wurde zwar in-vitro in Tumor-Zelllinien eine relativ hohe CA IX-Konzentration festgestellt, in Blutplasma-Proben war jedoch die Konzentration ungefähr 1000-mal niedriger (Závada et al. 2003). Außerdem variierte die Konzentration stark und korrelierte nicht mit der Tumorgröße. Als wahrscheinlichster Grund, dass die CA IX überhaupt in einer löslichen Form vorliegt, wird eine proteolytische Abspaltung des extrazellulären Teils der CA IX gesehen (Závada et al. 2003).

5.3 Die Non-PH-Gruppe im Vergleich mit Kontrollgruppen anderer Studien

Die CA IX-Plasmaspiegel der Non-PH-Gruppe weisen einen Mittelwert von 78,6 (Standardabweichung 48,7) und einen Median von 63,1 (IQR 93) auf.

Einige Studien zu CA IX-Plasmaspiegeln bei Krebserkrankungen haben als Vergleichsgruppe gesunde Probanden herangezogen. Die Plasma- bzw. Serumspiegel unterscheiden sich zwischen den Studien deutlich. Die Autoren einer Studie zu Lungenkrebs-Erkrankungen erhoben in der Kontroll-Gruppe Serum-CA IX-Spiegel mit einem Median von 56,54 pg/ml (IQR=41,83-94,18) (Cheng et al. 2015). In einer Studie zum NSCLC von Ilie et al. wurde in der Kontroll-Gruppe ein Mittelwert von 2,48 pg/ml (Spannweite 0-16,65) gemessen, diese Arbeitsgruppe verwendete Heparin-Plasma für die Untersuchung (M Ilie et al. 2010). Schütze et al. geben den Mittelwert der Kontroll-Gruppe in einer Studie zum Mammakarzinom mit 199 pg/ml (Spannweite 26-1133) an (Schütze et al. 2013). In dieser Studie wurde Serum zur Analyse verwendet. In einer weiteren Arbeit zum Mammakarzinom von Brown-Glaberman et al. beträgt der Mittelwert 20,5 pg/ml (Spannweite 8,8-41,2) (Brown-Glaberman et al. 2016). In einer Arbeit zum Keimzelltumor des Hodens von Kalavska et al. betrug der Mittelwert des Plasmaspiegels in der Kontroll-Gruppe 249,6 (Standardabweichung: 100) (Kalavska et al. 2016). In einer Studie zum HELLP-Syndrom wurden in der Kontroll-Gruppe sehr niedrige Werte mit einem Median von 1,10 pg/ml (IQR=0,78-1,39) festgestellt (Mentese et al. 2018).

Im Vergleich zu den erwähnten Studien liegen die CA IX-Plasmaspiegel der Non-PH-Gruppe im Mittelfeld. Ein gutes Zeichen, da in den erwähnten Studien periphervenöses Blut herangezogen wurde, wir verwendeten für die vorliegende Arbeit pulmonalarterielles Blut. In zukünftigen Arbeiten wird zu überprüfen sein, inwiefern sich die CA IX-Plasmaspiegel in peripher-venösem und pulmonal-arteriellem Blut unterscheiden.

5.4 Mögliche Rolle der CA IX in der Pathophysiologie der PH

5.4.1 Überschneidungen mit malignen Erkrankungen

Die IPAH wird durch endotheliale Dysfunktion, ein Ungleichgewicht zwischen vasodilatativen und vasokonstriktiven Mediatoren mit einer folgenden Vasokonstriktion und ein vaskuläres Remodeling ausgelöst (Erdmann 2011). Unklar ist bislang, ob die CA IX an den pathophysiologischen Prozessen bei der Entstehung der IPAH beteiligt ist. Das vaskuläre Remodeling bei der IPAH ist vergleichbar mit dysregulierten Prozessen, die ursächlich für verschiedene Krebserkrankungen sind. Beim vaskulären Remodeling bei der IPAH muss zwischen den einzelnen Gefäßschichten unterschieden werden, Haupttreiber der Gefäßveränderungen sind Inflammation, Hypoxie und metabolische Dysfunktion (Stacher et al. 2012). Funktionen der Carboanhydrasen sind unter anderem ein Säure-Base-Ausgleich, Signalübertragung und Proliferationsprozesse (Frost and McKenna 2014, p. 10). Nicht verwunderlich ist also, dass sich viele Studien mit der Rolle der Carboanhydrasen bei malignen Erkrankungen beschäftigen. Die genaue Rolle von Carboanhydrasen bei der Kanzerogenese ist bislang ungeklärt, es wird vermutet, dass die membrangebundenen CA IX und XII eine Ansäuerung des, den Tumor umgebenden, Gewebes verursachen und so Tumorwachstum und -ausbreitung fördern, da ein saurer extrazellulärer pH-Wert eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Tumorerkrankungen spielt, außerdem könnten Carboanhydrasen eine wichtige Rolle bei der Anpassung von Tumoren an hypoxische Bedingungen spielen. (Pastorekova et al. 2019)

5.4.2 Warburg-Hypothese und Bedeutung der Carboanhydrase IX

Die Warburg-Hypothese wurde ursprünglich 1923 vom Nobelpreisträger Otto H. Warburg postuliert und besagt, dass Tumorzellen durch eine irreversible Schädigung von Mitochondrien entstünden (Vaupel and Multhoff 2021). Begründet wurde diese Annahme dadurch, dass in Tumorgeweben vermehrt Glucose zu Lactat umgesetzt wurde, somit eine anaerobe Glykolyse ablaufen müsse, obwohl genügend Sauerstoff für eine aerobe Glykolyse vorhanden wäre, Warburg postulierte, dass dieser Mechanismus der universelle Grund für die Onkogenese sei. Im Laufe der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts mehrten sich die Hinweise darauf, dass die anaerobe Glykolyse eine zentrale Rolle bei der metabolischen Umstellung in malignen Zellen darstellt, allerdings sei die Ursache für die Entstehung von malignen Zellen weitaus vielfältiger und wird durch Aktivierung von Onkogenen, Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Hochregulation von Signalwegen ausgelöst (Vaupel and Multhoff 2021).

Die Rolle der Carboanhydrase IX (und II) im Voranschreiten der malignen Entartung ist am ehesten eine unterstützende Funktion. Das in der Zelle entstandene Lactat wird aus

der Krebszelle transportiert, diese Transportprozesse werden unter anderem durch Umwandlung von, in den Stoffwechselprozessen entstehendem, CO₂ zu H⁺ und O₂ durch die Carboanhydrasen begünstigt. Die entstehende extrazelluläre Ansäuerung wird als wichtiger Bestandteil des Tumorwachstums betrachtet (Vaupel and Multhoff 2021).

5.4.3 Carboanhydrase IX als möglicher Biomarker für Hypoxie und Azidose des Lungengewebes

Lee et al. haben in einer Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die CA IX bei einem akutem Lungenschaden, der mit einer Azidose einhergeht, an Gefäßreparaturprozessen beteiligt sein könnte, da sie nachweisen konnten, dass die CA IX in pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen notwendig ist, um in einer azidotischen Stoffwechsellage für einen stabilen pH zu sorgen, der für eine Angiogenese notwendig ist (Lee et al. 2018).

Eine Azidose entsteht bei der PH aus einer Aneinanderreihung von Umständen (Oishi and Fineman 2016). Die pulmonale Hypertonie führe zu einer Zunahme des rechtsventrikulären enddiastolischen Drucks und Volumens, dadurch komme es zu einem Shift des Kammerseptums zur linken Kammer. Dies führe zu einer Abnahme des linksventrikulären enddiastolischen Drucks und des Schlagvolumens. Ein erniedrigter Auswurf ist die Folge. Es kommt zu einer Abnahme der peripheren Sauerstoffversorgung mit metabolischer Azidose. Der reduzierte pulmonale Blutfluss führt zu einer vermehrten Totraumventilation, was eine respiratorische Azidose begünstigt. Eine gesteigerte Vasokonstriktion ist die Folge. Durch eine vermehrte Dehnung der Lungengefäße und durch perivaskuläre Ödeme kommt es zu einer Obstruktion der kleinen und großen Atemwege mit weiterer Zunahme des Ventilations-Perfusions-Mismatches und einer Abnahme der Compliance. Es entsteht ein Kreislauf aus Hypoxämie, Hyperkapnie und Azidose, der unbehandelt zu Rechtsherzversagen und Tod führt. Daher ist eine Vermeidung von Hypoxie und Azidose auch von fundamentaler Bedeutung in der Therapie von Patienten mit PH (Oishi and Fineman 2016).

In der vorliegenden Arbeit konnte zwar kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe des CA IX-Plasmaspiegels und hämodynamischen Parametern festgestellt werden, jedoch konnten wir feststellen, dass ein erhöhter Plasmaspiegel (in der IPAH-Gruppe) mit einem schlechteren Überleben einhergeht. Möglicherweise zeigt der CA IX-Plasmaspiegel eine Veränderung im Mikrogefäßsystem der Lunge an, bevor sich die Änderungen in klinischen oder hämodynamischen Parametern zeigen. Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste in zukünftigen Arbeiten untersucht werden, ob sich bei Patienten mit einem erhöhten CA IX-Plasmaspiegel im Verlauf eine

Verschlechterung der Hämodynamik einstellt, da in dieser Arbeit nur Blutproben und hämodynamische Parameter herangezogen wurden, die von der ersten Rechtsherzkatheter-Untersuchung stammen und keine Proben aus Verlaufskontrollen untersucht wurden.

5.4.4 Rolle von CA IX beim Hypoxie-Signaling

Der Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) nimmt eine Schlüsselrolle in der Sauerstoff-Homöostase ein, die Aktivität von HIF-1 wird durch Hypoxie ausgelöst und aktiviert wiederum die Gentranskription, indem es an das Hypoxia Response Element (HRE) bindet (Semenza 2014). Dadurch werden Proteine, wie beispielsweise VEGF, PGF, EPO, Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2 vermehrt exprimiert. Als Folge dessen wird die Gewebevaskularisation und Sauerstoffverteilung positiv beeinflusst (Semenza 2014).

Auch im Promoter des CA IX-Gens ist ein HRE nachgewiesen worden, CA IX wird durch diesen Umstand bei Hypoxie vermehrt exprimiert (Kaluz et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit geht ein höherer CA IX-Plasmaspiegel mit einer verkürzten Überlebenszeit einher. CA IX wird durch Hypoxie vermehrt exprimiert, daher lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die CA IX eine Gewebehypoxie anzeigt, die wiederum die Überlebenszeit negativ beeinflusst. Die Höhe der CA IX-Spiegel korreliert in dieser Arbeit nicht mit der Krankheitsschwere, allerdings könnte CA IX einen zusätzlichen prognostischen Parameter liefern. Um den Zusammenhang zwischen Carboanhydrasen, Gewebehypoxie und Prognose der Erkrankung genauer zu erforschen, sollte in zukünftigen Arbeiten der Zusammenhang zwischen CA IX-Spiegeln und etablierten Biomarkern für Gewebehypoxie untersucht werden.

5.4.5 Apoptose der Endothelzellen als Ursache für erhöhte CA IX-Plasmaspiegel

Einer der wichtigsten pathologischen Prozesse in der Pathophysiologie der IPAH ist die Endothelneubildung mit Entstehung plexiformer Läsionen (Erdmann 2011). Ursache ist eine vermehrte Apoptose der Endothelzellen und folglich die Entwicklung einer Apoptose-Resistenz und unkontrollierter Endothelneubildung. Bei der Carboanhydrase IX handelt es sich um ein Transmembranprotein. Daher könnte die gesteigerte Apoptose des Endothels der Pulmonalarterien zu einer erhöhten Nachweisbarkeit im pulmonal-venösen Blut führen. Zu begründen wäre diese Annahme damit, dass ein wichtiger Teil der Apoptose in der proteolytischen Spaltung von Proteinen besteht (Solary et al. 1998). Durch diese proteolytische Spaltung kommt es am wahrscheinlichsten zu einer Nachweisbarkeit der löslichen Form von CA IX im Blut (Závada et al. 2003).

5.5 Ergebnisse im Kontext der klinischen Anwendung

Die Diagnostik der Pulmonalen Hypertonie beinhaltet verschiedene apparative Untersuchungen, wie Lungenfunktionstestungen, Echokardiographie, Spiroergometrie und verschiedene bildgebende Verfahren, wie Ventilations-Perfusion-Szintigrafie, MRT- oder Kontrastmittel-CT-Untersuchungen (Galiè et al. 2016). Zur definitiven Diagnosestellung ist allerdings zwingend eine Rechtsherzkatheter-Untersuchung erforderlich. Es gibt bisher keinen etablierten Biomarker zur Diagnostik der Pulmonalen Hypertonie. Um die Herzbelastung zu objektivieren, wird BNP bzw. NT-pro-BNP bestimmt (Maron et al. 2016, p. 233). Primäres Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines neuen Biomarkers zur Diagnostik der PH. Die diagnostische Güte ist allerdings eher schwach. Es ergeben sich jedoch Hinweise darauf, dass die CA IX-Spiegel in der Prognostik der PH eine Rolle spielen könnten, da ein erhöhter CA IX-Spiegel in der untersuchten Population in der IPAH-Gruppe signifikant mit einem schlechteren Überleben einhergeht. Vielversprechend ist ebenso die Korrelation mit BNP. In der untersuchten Patientenpopulation ergibt sich in der CTEPH-Gruppe eine relevante, statistisch signifikante Korrelation, in der IPAH-Gruppe ist die Korrelation zwar signifikant, jedoch nicht relevant.

5.5.1 Diagnostische Güte des CA IX-Plasmaspiegels in der Diagnostik der IPAH und der CTEPH

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Diagnose einer IPAH die Sensitivität mit 54,79% und die Spezifität mit 70% berechnet, die Sensitivität für die Diagnose einer CTEPH bei 56,76%, die Spezifität mit ebenfalls 70%. Damit ist die diagnostische Güte in der untersuchten Patientenpopulation eher schwach und aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist eine Bestimmung des CA IX-Spiegels allein nicht ausreichend, um eine PH zu diagnostizieren oder sogar invasive Untersuchungen zu ersetzen. In zukünftigen Arbeiten wird zu untersuchen sein, ob eine Kombination mit anderen Parametern zu einer Erhöhung der Sensitivität und Spezifität führen kann.

5.5.2 CA IX als möglicher prognostischer Biomarker

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit nachweisen, dass in der IPAH-Gruppe ein höherer CA IX-Spiegel mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Für diese Analyse zogen wir die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse heran. Dafür wurden die Patienten, unterteilt nach der jeweiligen Diagnose und nach der Höhe des CA IX-Spiegels in Quartile eingeteilt und anschließend die einzelnen Quartile miteinander verglichen. Die Berechnung ergab statistisch signifikante Unterschiede der Überlebenszeiten, dabei ging die Einordnung in ein höheres Quartil mit einem schlechteren Überleben einher.

Der CA IX-Spiegel hielt in der IPAH-Gruppe auch einer multivariaten Cox-Regressions-Analyse stand.

5.5.3 Analyse der Assoziation von CA IX-Plasmaspiegeln mit hämodynamischen und klinischen Parametern

Untersucht wurde auch der Zusammenhang der CA IX-Plasmaspiegel mit den hämodynamischen Parametern mPAP, PVR und dem CI. In der vorliegenden Arbeit konnte weder in der IPAH- noch in der CTEPH-Gruppe ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit diesen Parametern festgestellt werden.

5.5.4 Kein signifikanter Unterschied zwischen den NYHA-Klassen

Es konnte weder in der IPAH- noch in der CTEPH-Gruppe ein signifikanter Unterschied der CA IX-Plasmaspiegel zwischen den NYHA-Klassen festgestellt werden. Jedoch lässt sich in beiden Gruppen der Trend feststellen, dass die Einstufung in eine höhere NYHA-Klasse mit einer Erhöhung des Spiegels einhergeht. In der untersuchten Patientenpopulation sind keine Patienten vertreten, die in NYHA-Klasse 1 einzuordnen wären und vergleichsweise wenige Patienten der NYHA-Klasse 4 vertreten, diese Tatsache könnte die statistisch berechneten Unterschiede zwischen den Klassen schwächen.

5.5.5 Zusammenhang der CA IX-Plasmaspiegel mit BNP

Bei der Analyse der Assoziation von CA IX-Plasmaspiegeln mit den BNP-Plasmaspiegeln ist auffällig, dass in der IPAH-Gruppe eine statistisch signifikante, jedoch nicht relevante Korrelation festgestellt werden konnte. In der CTEPH-Gruppe lässt sich sogar eine statistisch signifikante und auch relevante Korrelation zwischen den CA IX- und BNP-Plasmaspiegeln feststellen. BNP stellt einen etablierten Biomarker für die Belastung des Herzens dar (Maron et al. 2016, p. 233). In zukünftigen Arbeiten ist zu überprüfen, ob ein Zusammenhang von CA IX-Plasmaspiegeln mit der Ausprägung einer Herzinsuffizienz bzw. einer Belastung des Herzens besteht.

5.6 Nächste Fragestellungen

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergeben sich neue Fragestellungen, die in weiteren Arbeiten zu untersuchen wären. Eine Auswahl ist in den folgenden Abschnitten aufgeführt.

5.6.1 CA IX-Plasmaspiegel als „Frühwarnsystem“ klinischer Verschlechterung

Interessant wäre eine prospektive Studie, bei der in Verlaufskontrollen die CA IX-Spiegel bestimmt werden, um zu erkennen, ob dieser die Möglichkeit einer Früherkennung klinischer Verschlechterung bietet. Auch wenn die erhobenen Spiegel nicht mit den, zum Zeitpunkt der Blutentnahme erhobenen, klinischen und hämodynamischen Parametern korreliert, wäre denkbar, dass bei den Patienten in Folgeuntersuchungen eine Verschlechterung eintritt, da sich in dieser Arbeit in der IPAH-Gruppe ein Zusammenhang eines hohen CA IX-Spiegels mit einem schlechteren Überleben zeigte.

5.6.2 Vergleich der Spiegel in peripheren und zentralen Blutproben

Interessant wäre außerdem ein Vergleich von CA IX-Spiegeln im zentralen und peripheren Blut. Dieser Vergleich würde Erkenntnisse liefern, ob die lösliche Form der CA IX ubiquitär in gleicher Konzentration messbar ist oder in pulmonalerteriellen Blutproben in erhöhter bzw. verminderter Konzentration vorliegt. Durch diese Untersuchung ließe sich genauer differenzieren, ob es im Lungengefäßsystem vermehrt zur Freisetzung von CA IX kommt. Sollten sich die CA IX-Spiegel in zentralen und peripheren Blutproben nicht unterscheiden, würden einfache Blutentnahmen ausreichen, um den CA IX-Spiegel in weiteren Studien zu untersuchen.

5.6.3 Verlaufskontrollen der CA IX-Plasmaspiegel zur Therapie-Evaluation

Interessant wäre des Weiteren, ob sich die CA IX-Plasmaspiegel zur Therapie-Evaluation eignen könnten. Dafür könnten die Spiegel bei Patienten mit verschiedenen Therapieregimen erhoben werden und in Kontrolluntersuchungen wiederum der CA IX-Plasmaspiegel bestimmt werden. Interessant wäre, ob eine Verschlechterung des Patienten und damit die Notwendigkeit einer Änderung des Therapieregimes mit einer Erhöhung der Spiegel einhergehen würde. Ziel dieser Studie würde in der Erleichterung von Kontrolluntersuchungen liegen, da wiederholte Rechtsherzkatheter-Untersuchungen zur Therapie-Evaluation vermieden werden könnten.

5.7 Outlook / Therapeutische Möglichkeiten

Es gibt bisher keine kausale Therapie für die IPAH, die bisher etablierten Therapieansätze zielen darauf ab, die Progression der Erkrankung zu verlangsamen und

die Symptome zu lindern (Galiè et al. 2016). Die Lebensqualität von Patienten mit IPAH konnte zwar durch diese Therapien verbessert werden, jedoch ist die IPAH weiterhin eine schwere, unheilbare Krankheit, weshalb es von Interesse ist, neue Therapieansätze zu finden.

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass wir in der IPAH-Gruppe nachweisen konnten, dass erhöhte CA IX-Plasmaspiegel mit einer verkürzten Überlebenszeit einhergehen. Die Frage nach den Ursachen für diese Ergebnisse bleibt jedoch offen. Wir konnten keine Korrelation der CA IX-Spiegel mit hämodynamischen Parametern feststellen. In der IPAH-Gruppe bestand außerdem keine relevante Korrelation mit BNP, weshalb auch eine vermehrte Herzbelastung als Ursache unwahrscheinlich ist. Sollte sich in weiteren Untersuchungen reproduzieren lassen, dass erhöhte CA IX-Plasmaspiegel mit einem schlechteren Überleben einhergehen, könnte in zukünftigen Studien die Möglichkeit einer Carboanhydrasen-Hemmung bei nachgewiesener Erhöhung der CA IX-Plasmaspiegel untersucht werden.

5.7.1 Carboanhydrasehemmer Acetazolamid

Acetazolamid ist ein Carboanhydrasehemmer, der als erstes effektives Diuretikum bei der Behandlung der Herzinsuffizienz eingesetzt wurde, bevor Mitte der 1950er-Jahre die Behandlung von Hydrocephalus und Glaukomerkrankungen zu wichtigeren Anwendungsgebieten wurde (Swenson 2014).

Ein weiteres Einsatzgebiet für Acetazolamid stellt die Höhenkrankheit dar. Es konnte gezeigt werden, dass die hämodynamischen Änderungen, die durch eine hypobare Hypoxie ausgelöst werden, durch Acetazolamid vermindert werden (Parati et al. 2013).

Acetazolamid zeigt bei der pulmonalen Hypertonie eine protektive, antiinflammatorische Wirkung. Dieser Effekt wird durch eine Inhibition von Makrophagen und durch eine metabolische Azidose ausgelöst. In Untersuchungen zur, durch Hypoxie ausgelösten, PH zeigt Acetazolamid außerdem einen vorteilhaften Effekt (Hudalla et al. 2019).

Der akute Effekt von Acetazolamid auf die Hämodynamik bei Patienten mit Pulmonaler Hypertonie wurde in einer weiteren Studie untersucht (Lichtblau et al. 2021). In dieser randomisierten, Placebo-kontrollierten, doppelverblindeten Crossover-Studie atmeten Patienten mit IPAH und CTEPH entweder Umgebungsluft oder wurden für 15 Minuten einer Hypoxie ausgesetzt. Außerdem wurde den Patienten 500 mg Acetazolamid bzw. ein Placebo (NaCl) verabreicht. Anschließend wurden PVR, weitere hämodynamische Parameter und der Sauerstoffgehalt im Blut und im Gehirn gemessen. Bei den Patienten, die weiterhin Umgebungsluft atmeten, konnte, im Vergleich mit der Placebogruppe,

keine Veränderung der hämodynamischen Parameter festgestellt werden. Bei Patienten, die einer Hypoxie ausgesetzt wurden, konnte jedoch, im Vergleich zur Placebogruppe, eine Erniedrigung des PVR festgestellt werden. Die Studienautoren können aufgrund dieser Ergebnisse keinen direkten vasodilatatorischen Effekt von Acetazolamid nachweisen. Die langfristigen Wirkungen von Acetazolamid müssen weiter untersucht werden. (Lichtblau et al. 2021)

5.7.2 Monoklonale Antikörper und die Möglichkeit der gezielten Carboanhydrase-Inhibition

Die Carboanhydrasen IX und XII sind Hoffnungsträger für die Entwicklung neuer Ansätze in der Krebstherapie, da sie membranständig sind und eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern, die an ihre extrazellulären katalytischen Domänen binden, sehr vielversprechend sei. Für die CA IX wurde der monoklonale Antikörper mAbG250 entwickelt, der für therapeutische und diagnostische Zwecke verwendet werden könnte (Oosterwijk-Wakka et al. 2013).

Der Antikörper 6A10, ein spezifischer Agonist für die CA XII kann die katalytische Aktivität dieser blockieren und könnte als mögliche Therapie bei CA XII-exprimierenden Tumoren oder anderen mit CA XII assoziierten Krankheiten eingesetzt werden (Battke et al. 2011).

Ein weiterer Antikörper gegen die CA XII, nämlich 4AG4, blockiert ebenfalls die katalytische Aktivität. Außerdem konnte in Versuchen gezeigt werden, dass durch den Antikörper das Wachstum von Zellen eines Adenokarzinoms der Lunge in vitro gehemmt wurde (Uda et al. 2019).

5.8 Evaluation von Material und Methoden

Es wurden in der vorliegenden Arbeit die Proben von 147 Patienten, exklusive Vergleichsgruppe, eingeschlossen, damit handelt es sich um eine große Kohorte. Ein wichtiges Merkmal der Studie ist die Analyse von Blut aus einer Pulmonalarterie. Vorteilhaft ist diese Entnahmestelle, da die Erhebung der hämodynamischen Parameter im gleichen Gebiet stattfindet. Unserer Kenntnis nach sind wir die ersten, die die CA IX-Plasmaspiegel von IPAH- und CTEPH-Patienten in Blutproben aus der Pulmonalarterie untersucht haben. Ein Nachteil besteht darin, dass die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen einer peripheren Blutentnahme unklar ist. Damit ein Biomarker die Diagnostik bzw. Prognostik erleichtern kann, sollte er einfach zu erheben sein. Es wäre also in zukünftigen Studien zu überprüfen, ob die CA IX-Spiegel im zentralen Blut mit den Spiegeln im peripheren Blut übereinstimmen bzw. korrelieren.

Es handelt sich bei der vorliegenden Arbeit um eine monozentrische Studie. Dies ist einerseits ein Nachteil, allerdings durch die Homogenität von Prozeduren und Proben auch ein großer Vorteil für die Fragestellung dieser Studie.

Ein großer Vorteil dieser Arbeit ist, dass die prozentual hohe Verfügbarkeit von zusätzlichen Parametern der Patienten, wie beispielsweise 6MWD und BNP, eine zusätzliche Bewertung der erhobenen Plasmaspiegel erlaubt.

Zusätzlich zur Erhebung von CA IX-Plasmaspiegeln untersuchten wir in einem Tiermodell die Lungen von Mäusen auf die Expression von CA IX und CA XII, mit Hilfe dieses Versuchs konnten wir wichtige Zusatzinformationen erlangen, da sich ein Trend in Richtung einer erhöhten Expression in den veränderten Pulmonalgefäßen bei experimentell induzierter PH und somit ein Hinweis auf eine Beteiligung von Carboanhydrasen an den Umbauprozessen der Lunge zeigte.

Bei der Non-PH-Gruppe, die für die vorliegende Arbeit ausgesucht wurde, sind Vor- und Nachteile hervorzuheben. Der wichtigste Vorteil ist, dass in dieser Gruppe ebenfalls Blutproben aus einer Pulmonalarterie vorgenommen wurden, somit konnte verhindert werden, dass das Blut aus der Pulmonalarterie das bei der PH-Gruppe abgenommen wurde, mit peripherem Blut einer Non-PH-Gruppe verglichen werden muss. Der Nachteil der Non-PH-Gruppe ist, dass es sich nicht um gesunde Patienten handelt, sondern um Patienten, bei denen eine PH mittels Rechtsherzkatheter-Untersuchung ausgeschlossen werden konnte. Allerdings zeigten diese Patienten zuvor Symptome, die die Durchführung einer Rechtsherzkatheter-Untersuchung rechtfertigten. Die zugrundeliegenden Erkrankungen in der Non-PH-Gruppe sind COPD, Lungenfibrose, Lungenemphysem, KHK, Sarkoidose, systemische Sklerose und OSAS. Dass die Patienten der Non-PH-Gruppe nicht vollkommen gesund sind, ist jedoch nicht zu vermeiden, da eine Rechtsherzkatheter-Untersuchung mit Blutentnahme bei gesunden Probanden nicht zu rechtfertigen ist.

Wir untersuchten in der vorliegenden Studie nur IPAH- und CTEPH-Patienten. In zukünftigen Untersuchungen sollten die Carboanhydrase-Plasmaspiegel auch in anderen PH-Subgruppen erhoben werden.

Die Proben weisen eine unterschiedlich lange Lagerdauer auf, da zwischen den Untersuchungen teilweise mehrere Jahre liegen. Allerdings wurden die Proben bei -80°C gelagert, wodurch eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der Proben erreicht wird. Außerdem wurden Proben der Patienten sämtlicher Gruppen im Mittel ähnlich lang tiefgefroren.

Eigentlich sollte in dieser Studie auch die Carboanhydrase XII untersucht werden, leider war es nicht möglich mit kommerziellen ELISA-Kits oder mit selbst gestalteten Kits eine reliable Messung vorzunehmen. Hierdurch kam der Verdacht auf, dass bei ELISA-Kits, die die lösliche Form von CA XII verlässlich nachweisen, noch Entwicklungsbedarf besteht.

5.9 Schlussfolgerung und Aussicht

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung der Carboanhydrasen, insbesondere CA IX und CAXII, für die pulmonale Hypertonie. Untersucht wurden Patienten mit IPAH und CTEPH. Bisher konnte eine vermehrte Expression von Carboanhydrasen bereits bei diversen malignen Erkrankungen nachgewiesen werden. Die Annahme, dass CA bei der PH eine Rolle spielen könnten, ergibt sich aus dem Umstand, dass zwischen der Pathophysiologie der PH und diversen Krebserkrankungen Parallelen bestehen. Unter anderem bestehen diese in einer dysregulierten Angiogenese und einer herunterregulierten Apoptose.

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass die Höhe des CA IX-Plasmaspiegels in der IPAH-Gruppe signifikant negativ mit der Überlebenszeit korreliert. Eine Erhöhung des CA IX-Spiegels geht mit einer niedrigeren Überlebenszeit einher. Umso spannender wird es, wenn man bedenkt, dass weder eine statistisch signifikante Korrelation mit den hämodynamischen Parametern noch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen NYHA-Klassen nachgewiesen werden konnte. Die Carboanhydrase IX könnte also unabhängig von der aktuell vorliegenden hämodynamischen Situation und der Belastbarkeit des Patienten eine Aussage zur Prognose ermöglichen. Sicher ist diese Arbeit allein nicht ausreichend, um dem CA IX-Spiegel eine Bedeutung in der Prognose der IPAH bzw. CTEPH zuzuweisen. Weitere Arbeiten müssen folgen, um diese Hypothese zu bekräftigen oder zu widerlegen.

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit keine statistisch signifikante Erhöhung der CA IX-Plasmaspiegel feststellen, jedoch zeichnet sich ein deutlicher Trend in Richtung erhöhter CA IX-Spiegel ab. Unklar ist, ob die Carboanhydrase IX an der Entstehung der Pulmonalen Hypertonie beteiligt ist oder ob eine vermehrte Nachweisbarkeit eher als Folge der Veränderungen des Lungengefäßsystems zu beurteilen ist.

Die diagnostische Güte für die Diagnose einer IPAH und CTEPH ist eher gering. In zukünftigen Arbeiten wird zu überprüfen sein, ob eine Kombination mit anderen Parametern zu einer Erhöhung der Sensitivität und Spezifität führen kann.

Die beschriebene signifikante Korrelation mit den BNP-Spiegeln in der CTEPH-Gruppe führt zu der Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen erhöhten CA IX-Serumspiegel und einer Belastung des Herzens besteht. Auch dieser Zusammenhang sollte weitere Untersuchungen nach sich ziehen. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse sollte in künftigen Arbeiten überprüft werden, ob eine Erhöhung der CA IX-Plasmaspiegel bei Patienten mit Herzinsuffizienz bzw. Herzversagen eine Rolle in der Prognostik spielen könnte. Die CA IX sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden, da sie einen vielversprechenden Biomarker für die Prognostik und einen Angriffspunkt für eine gezielte Therapie der pulmonalen Hypertonie und anderer pulmonaler und kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen könnte.

6. Zusammenfassung

Hintergrund: Die pulmonale Hypertonie ist eine schwere Erkrankung des Lungengefäßsystems, für die keine kausale Therapie existiert. Die Diagnostik ist sehr aufwendig und die Diagnose muss durch eine Rechtsherzkatheter-Untersuchung gesichert werden. Zur Vereinfachung der Diagnostik ist es erstrebenswert Biomarker zu etablieren. Bei der pulmonalen Hypertonie bestehen Ähnlichkeiten zu Krebserkrankungen, da, unter anderem, fehlerhafte Proliferation und Hypoxie eine Rolle bei der Entstehung der Erkrankung spielen.

Hypothese: Carboanhydrasen sind bei einigen Krebserkrankungen vermehrt nachweisbar und an der Aufrechterhaltung eines sauren pH beteiligt. Bei Hypoxie sind sie hochreguliert. Sie stellen daher interessante Kandidaten für die Etablierung eines Biomarkers für die PH dar. Wir überprüften in der vorliegenden Arbeit, ob CA IX-Spiegel bei IPAH- und CTEPH-Patienten im Vergleich zu einer Non-PH-Gruppe erhöht sind und ob sich die Spiegel zur Diagnostik und Prognostik eignen. Des Weiteren wurde untersucht, ob in Lungengefäßen von Mäusen, bei denen durch Hypoxie ein Gefäßremodeling ausgelöst wurde, vermehrt CA IX- bzw. CA XII nachgewiesen werden kann.

Methoden: Das Plasma von 74 CTEPH- und 73 IPAH-Patienten wurde mittels ELISA auf die CA IX-Konzentration hin untersucht, außerdem wurden Korrelationsanalysen mit hämodynamischen und klinischen Parametern und eine Überlebensanalyse durchgeführt. Im Tiermodell wurden Lungen von Mäusen, bei denen eine PH durch Hypoxie ausgelöst wurde, mit Hilfe immunhistochemischer Methoden auf die Expression von CA IX und CA XII untersucht.

Ergebnisse: In der vorliegenden Arbeit konnte in der IPAH-Gruppe ein Zusammenhang zwischen einem hohen CA IX-Plasmaspiegel und einer verkürzten Überlebenszeit festgestellt werden. Es zeigte sich außerdem ein Trend in Richtung erhöhter CA IX-Spiegel bei Patienten mit IPAH und CTEPH. Des Weiteren konnten wir in der CTEPH-Gruppe eine statistisch signifikante Korrelation der CA IX-Spiegel mit den BNP-Spiegeln feststellen. Ein Zusammenhang zwischen CA IX-Spiegel und hämodynamischen Parametern ließ sich nicht nachweisen. Im Tiermodell konnte ein Trend in Richtung erhöhter CA IX-Expression bei Mäusen festgestellt werden, bei denen eine experimentelle PH ausgelöst wurde.

Fazit: Bemerkenswert ist der Zusammenhang zwischen einem erhöhten CA IX-Spiegel und einem verschlechterten Überleben in der IPAH-Gruppe. Die Bedeutung der CA IX-Spiegel für die Prognostik sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Die festgestellte Korrelation mit dem BNP-Spiegel sollte ebenfalls weiter untersucht werden.

7. Summary

Background: Pulmonary hypertension is a severe disease of the pulmonary circulation with no specific causal therapy available. Diagnosis is complex, and confirmation requires right heart catheterization. Establishing biomarkers would simplify diagnosis. Pulmonary hypertension shares similarities with cancer, as faulty proliferation and hypoxia play a role in its development.

Hypothesis: Carbonic anhydrases are involved in maintaining an acidic pH in cancer and are upregulated in hypoxia, making them interesting candidates for establishing a biomarker for pulmonary hypertension (PH). Plasma levels of carbonic anhydrases are elevated in several cancer entities. This study aimed to investigate whether CA IX levels are elevated in IPAH and CTEPH patients compared to a Non-PH group and whether these levels are suitable for diagnosis and prognosis. Additionally, the study examined whether increased CA IX and CA XII expression could be detected in the lung vessels of mice with hypoxia-induced vascular remodeling.

Methods: Plasma samples from 74 CTEPH and 73 IPAH patients were analyzed using ELISA to determine CA IX concentrations. Correlation analyses with hemodynamic and clinical parameters and survival analysis were performed. In the animal model, lungs from mice with hypoxia-induced PH were examined using immunohistochemical methods to assess CA IX and CA XII expression.

Results: This study found a correlation between high plasma CA IX levels and shortened survival in the IPAH group. There was also a trend towards elevated CA IX levels in patients with IPAH and CTEPH. Additionally, a statistically significant correlation was observed between CA IX levels and BNP levels in the CTEPH group. No association between CA IX levels and hemodynamic parameters was found. In the animal model, a trend towards increased CA IX expression was observed in mice with experimental PH.

Conclusion: The association between elevated CA IX levels and worsened survival in the IPAH group is noteworthy. The significance of CA IX levels for prognosis should be further investigated. The observed correlation with BNP levels should also be explored in future studies.

8. Exkurs: Nintedanib in severe pulmonary hypertension, Richter et. al

1. Hintergrund

Der Grund für die Untersuchung des Tyrosinkinase-Inhibitors Nintedanib bei Patienten mit PH war, dass eine Therapie mit Imatinib in der Phase-3-Studie eine gute Wirksamkeit gezeigt hat. Von entscheidender Bedeutung sei hierbei die Hemmung des platelet-derived-growth-factor-Rezeptors (PDGFR). Allerdings wurde der Antrag auf Zulassung wegen schwerer Komplikationen zurückgezogen.

Nintedanib hemmt eine Vielzahl von Tyrosinkinasen, hauptsächlich PDGFR, VEGF (vascular endothelial growth factor), fibroblast growth factor-Rezeptoren und Src-Kinasen. Für die Behandlung der idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF) ist Nintedanib zugelassen und zeigt ein akzeptables Nebenwirkungsprofil.

2. Material und Methoden

In der Studie wurden die Effekte von Nintedanib in einem Tiermodell und bei vier Patienten mit schwerer PAH beobachtet und mit Patienten, die unter IPF leiden, verglichen. Das Tiermodell bestand aus Ratten, bei denen eine artifizielle PH, durch die Gabe von Sugen-5146 und darauffolgender Hypoxie, ausgelöst wurde. Einem Teil der Tiere wurde 50 mg/kg/d Nintedanib verabreicht, zum Vergleich diente eine Gruppe von Tieren, die stattdessen ein Placebo erhielt. Bei den Ratten wurden daraufhin der rechtsventrikuläre systolische Druck (RVSP), der Cardiac Index (CI) und der „total pulmonary vascular resistance index“ (TPVRI), also ein Index, der den pulmonalen Gefäßwiderstand widerspiegelt, bestimmt. Die Formel für die Berechnung des TPVRI wurde von Savai et al. (2014) beschrieben und lautet: $TPVRI = RVSP / CI$. Der RVSP wird in mmHG angegeben und CI bedeutet „Cardiac Index“, dieser gibt eine Auskunft über die Herzauswurfleistung (Cardiac Output, CO; ml/min) pro 100 Gramm Körpergewicht. Außerdem wurde die Lunge der Tiere histomorphometrisch analysiert und verschiedene Marker für endotheliale Schäden (platelet/endothelial cell adhesion molecule-1, P-Selectin und E-Selectin) mittels ELISA bestimmt. Bei den Patienten handelt es sich um 3 Patienten mit schwerer IPAH und einen Patienten mit PAH, assoziiert mit einer kongenitalen Herzerkrankung. Einer der Patienten wurde von Imatinib auf Nintedanib umgestellt. Bei den Patienten wurden vor der Therapie mit Nintedanib und 6-9 Monate nach Beginn der Therapie Rechtsherzkatheter-Untersuchungen durchgeführt. Außerdem wurde bei 2 Patienten 3 Monate nach Ende der Nintedanib-Therapie eine weitere

RHK-Untersuchung durchgeführt. In den Untersuchungen wurden hämodynamische Parameter erhoben und ebenfalls die Marker für endotheliale Schäden analysiert.

3. Ergebnisse

Bei den Ratten ergab sich durch Auslösung einer artifiziellen PAH eine Erhöhung des rechtsventrikulären systolischen Drucks (RVSP) und des „total pulmonary vascular resistance index“ (TPVRI), der Cardiac Index nahm ab. In der histomorphometrischen Untersuchung zeigte sich eine erhöhte Anzahl von vollständig muskularisierten peripheren Lungengefäßen und ein erhöhter Anteil von vollständig oder teilweise okkludierten Pulmonalarterien. Weder die hämodynamischen Parameter noch die histologischen Veränderungen wurden durch die Therapie mit Nintedanib signifikant verändert. Die erhobenen Marker für Endothelschäden zeigten inkonsistente Ergebnisse.

Bei allen 4 Patienten mit PAH zeigte sich unter der Nintedanib-Therapie eine Abnahme des Cardiac Index (CI), bei 3 Patienten zeigte sich außerdem eine Erhöhung des pulmonal-vaskulären Widerstandes (PVR). 3 Monate nach Absetzen der Nintedanib-Therapie zeigte sich bei beiden Teilnehmern der Follow-Up-Untersuchung eine Umkehr der PVR-Erhöhung, bei einem außerdem ein Anstieg des CI. Bei Patienten, die Nintedanib bei IPF über 6-12 Monate erhalten, zeigten sich diese hämodynamischen Veränderungen nicht. Die Marker für Endothelschäden zeigten, bis auf P-Selectin bei einem Patienten, keine signifikante Erhöhung.

4. Diskussion

In dieser Studie konnte durch Nintedanib keine Verbesserung der hämodynamischen Parameter im Tiermodell erreicht werden. Bei Patienten mit PAH konnte sogar eine Verschlechterung der hämodynamischen Parameter beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Ergebnissen, die mit Imatinib erreicht wurden. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Beobachtung ist, dass Nintedanib VEGF-Rezeptoren blockiert, dies ist bei Imatinib nicht der Fall. Diese VEGF-Rezeptorblockade führt eventuell zu einer endothelialen Dysfunktion und einem Verlust der vaskulären Integrität. Außerdem erhöht Nintedanib im Tiermodell möglicherweise die Toxizität von Sugen-5416, einem VEGF-Hemmstoff. Eine weitere Überlegung war, dass Nintedanib möglicherweise einen Endothelschaden durch eine gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies hervorruft, diese Beobachtung wurde bei Dasatinib gemacht. Allerdings konnte keine Erhöhung der Biomarker für endotheliale Schäden festgestellt werden. Zu beachten ist, dass die Aussagekraft der Studie begrenzt ist, da es sich um eine kleine Anzahl von Probanden handelte, die außerdem an sehr schwerer PAH

leiden. Bei Patienten mit IPF konnte keine Verschlechterung einer begleitenden PH beobachtet werden. Dies könnte entweder daran liegen, dass diese Patienten nicht unter einer schweren PH leiden oder daran, dass verschiedene Mechanismen zugrunde liegen.

9. Verzeichnisse

9.1 Abkürzungsverzeichnis

6-MWD	6-minute walk distance
A	Arteria
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
ANP	Atriales-natriuretisches Peptid
AUC	area under the curve, Area under the curve
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i> , Brain natriuretic peptide
Ca	Calcium
CA	Carboanhydrase
CI	Cardiac Index
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
CTEPH	Chronisch thromboembolische Hypertonie
dPAP	systolischer pulmonaler Druck
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ET	Endotheline
EZR	Extrazellulärraum
GDF-15	Growth-differentiation factor
H ⁺	Wasserstoffion
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonation
HELLP	Haemolysis, elevated liver enzymes und low platelet count
HIF-1- α	Hypoxia inducible factor-1- α
HRE	Hypoxic Response Element
HZV	Herzzeitvolumen
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPAH	Idiopathische pulmonalerielle Hypertonie
IQR	Interquartilsabstand, Interquartilsabstand
K ⁺	Kaliumion
ln	Natürlicher Logarithmus
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	mittlerer pulmonaler Druck
NACT	Neoadjuvante Chemotherapie
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	non-small-cell lung cancer
NT-pro-BNP	N-terminales pro brain natriuretic peptide
NYHA	New York Heart Association
O ₂	Sauerstoff
PAH	Pulmonalerielle Hypertonie
PAWP	pulmonary arterial wedge pressure
pCO ₂	arterieller Kohlendioxid-Partialdruck
PDGF	platelet derived growth factor
pg	Pikogramm
PH	Pulmonale Hypertonie
pHe	Extrazellulärer pH-Wert
pHi	Intrazellulärer pH-Wert
PIGF	Placental growth factor
PVR	pulmonal vaskulärer Widerstand
RCT	Radiochemotherapie

ROC	Receiver Operating Characteristics
SD	Standardabweichung
SEM.....	Standardfehler, Standardfehler
sFlt-1	soluble fms-like tyrosine kinase 1
sPAP	systolischer pulmonaler Druck
TGCT.....	testicular germ cell tumor
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
TPG	Transpulmonaler Gradient
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WHO.....	Weltgesundheitsorganisation
WU	Wood Units

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Zweistufiger Reaktionsmechanismus der Carboanhydrasen	15
Abbildung 2 Central Illustration: Fragestellung und Inhalt der Studie	25
Abbildung 3 Leica ASP300S: Gewebereinbettungsautomat	28
Abbildung 4 Leica Mikrotom	29
Abbildung 5 Bäder für die immunhistochemische Färbung	30
Abbildung 6 Mikroskop, Kamera und Computer zur Auswertung der Schnitte	31
Abbildung 7 R&D Systems Quantikine ELISA Human Carbonic Anhydrase IX	34
Abbildung 8 Tecan Infinite M200 Plattenreader	34
Abbildung 9 Immunhistochemische Färbung von Mäuselungen mit Antikörpern gegen CA IX	36
Abbildung 10 Immunhistochemische Färbungen von Mäuselungen mit Antikörpern gegen CA XII	37
Abbildung 11 A: Darstellung der Altersverteilung in der untersuchten Kohorte B: Darstellung der Geschlechterverteilung der einzelnen Gruppen.....	39
Abbildung 12 Linksverteilung der CA IX-Plasmakonzentrationen dargestellt in einem Histogramm	41
Abbildung 13 Darstellung der Normalverteilung der logarithmierten CA IX-Konzentrationen.	42
Abbildung 14 Darstellung der CA IX-Plasmakonzentrationen unterteilt in IPAH, CTEPH und Non-PH in pg/ml als Streudiagramm	42
Abbildung 15 zeigt die Receiver Operating Characteristics (ROC) Kurve für CA IX-Plasmaspiegel in der IPAH-Gruppe	44
Abbildung 16 zeigt die Receiver Operating Characteristics (ROC) Kurve für CA IX-Plasmaspiegel in der CTEPH-Gruppe.....	45
Abbildung 17 IPAH: Streudiagramm zur Darstellung der CA IX-Plasmaspiegel (in pg/ml) unterteilt nach NYHA-Klassen 2,3 und 4.....	45
Abbildung 18 IPAH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von $\ln(\text{CA IX})$ mit dem BNP-Spiegel	46
Abbildung 19 IPAH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von $\ln(\text{CA IX})$ mit der 6MWD	47
Abbildung 20 IPAH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von $\ln(\text{CA IX})$ mit dem Cardiac Index.....	47
Abbildung 21 IPAH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von $\ln(\text{CA IX})$ mit dem mPAP	48

Abbildung 22 IPAH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von ln(CA IX) mit dem PVR.....	48
Abbildung 23 CTEPH: Streudiagramm zur Darstellung der CA IX-Plasmaspiegel (in pg/ml) unterteilt nach NYHA-Klassen 2,3 und 4.....	49
Abbildung 24 CTEPH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von ln(CA IX) mit dem BNP-Spiegel	50
Abbildung 25 CTEPH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von ln(CA IX) mit der 6MWD.....	51
Abbildung 26 CTEPH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von ln(CA IX) mit dem Cardiac Index.....	51
Abbildung 27 CTEPH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von ln(CA IX) mit dem mPAP	52
Abbildung 28 CTEPH: Streudiagramm mit Regressionsgerade für die Assoziation von ln(CA IX) mit dem PVR.....	52
Abbildung 29 Kaplan-Meier-Kurve: IPAH-Gruppe.....	53
Abbildung 30 Kaplan-Meier-Kurve: IPAH-Gruppe, eingeteilt in Quartile nach CA IX-Plasmakonzentration.....	54
Abbildung 31 Kaplan-Meier-Kurve: CTEPH-Gruppe	54
Abbildung 32 Kaplan-Meier-Kurve: CTEPH-Gruppe, eingeteilt in Quartile nach CA IX-Plasmakonzentration.....	55
Abbildung 33 Central Illustration: Fragestellung, durchgeführte Arbeiten, wichtigste Ergebnisse	60

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Pulmonalen Hypertonie (PH) nach der zugrundeliegenden Hämodynamik (modifiziert nach Simonneau et al. 2019).....	3
Tabelle 2: Aktuelle Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie (modifiziert nach Simonneau et al. 2019; Kovacs et al. 2016).....	4
Tabelle 3: Beschwerden bei pulmonaler Hypertonie (modifiziert nach Leschke et al. 2009)	6
Tabelle 4: Isoenzyme der α -Carboanhydrasen (modifiziert nach Adeva-Andany et al. 2015).	16
Tabelle 5: Arbeiten zu verschiedenen malignen Erkrankungen, in denen Carboanhydrase-Serum- bzw.- Plasmaspiegel erhoben wurden. Fortsetzung in Tabelle 6.	22

Tabelle 6: Arbeiten zu verschiedenen malignen Erkrankungen, in denen Carboanhydrase-Serum- bzw.- Plasmaspiegel erhoben wurden. Fortsetzung von Tabelle 5.....	23
Tabelle 7: Material für die immunhistochemische Untersuchung von Mäuselungen	27
Tabelle 8: Material für die Bestimmung der CA IX Plasmaspiegel in Patientenproben.	31
Tabelle 9: Hämodynamische (mPAP, HI, PVR), funktionelle Parameter (6MWD) und BNP-Spiegel der IPAH- und CTEPH-Gruppe zusammengenommen	39
Tabelle 10: Hämodynamische (mPAP, HI, PVR), funktionelle Parameter (6MWD) und BNP unterteilt in IPAH-, CTEPH und Non-PH-Gruppe.....	40
Tabelle 11: Statistische Kennzahlen (Median, Minimum, Maximum und IQR) der erhobenen CA IX-Plasmaspiegel (in pg/ml) der einzelnen Untergruppen (IPAH, CTEPH, Non-PH)	43
Tabelle 12: Einteilung der Patienten in der IPAH-Gruppe nach NYHA-Klassen (n= Personenanzahl in der jeweiligen Klasse) und tabellarische Darstellung der statistischen Parameter Median, Minimum, Maximum und IQR für die erhobenen CA IX-Plasmaspiegel in pg/ml.	46
Tabelle 13: Einteilung der Patienten in der CTEPH-Gruppe nach NYHA-Klassen (n= Personenanzahl in der jeweiligen Klasse) und tabellarische Darstellung der statistischen Parameter Median, Minimum, Maximum und IQR für die erhobenen CA IX-Plasmaspiegel in pg/ml.	49
Tabelle 14: Cox-Regressionsanalyse der IPAH-Gruppe.....	57
Tabelle 15: Cox-Regressionsanalyse der CTEPH-Gruppe:	57

9.4 Literaturverzeichnis

Adeva-Andany, María M.; Fernández-Fernández, Carlos; Sánchez-Bello, Rocío; Donapetry-García, Cristóbal; Martínez-Rodríguez, Julia (2015): The role of carbonic anhydrase in the pathogenesis of vascular calcification in humans. In *Atherosclerosis* 241 (1), pp. 183–191. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.012.

Alastalo, Tero-Pekka; Li, Molong; Perez, Vinicio de Jesus; Pham, David; Sawada, Hirofumi; Wang, Jordon K. et al. (2011): Disruption of PPAR γ / β -catenin-mediated regulation of apelin impairs BMP-induced mouse and human pulmonary arterial EC survival. In *The Journal of clinical investigation* 121 (9), pp. 3735–3746. DOI: 10.1172/JCI43382.

Anwar, Anjum; Ruffenach, Gregoire; Mahajan, Aman; Eghbali, Mansoureh; Umar, Soban (2016): Novel biomarkers for pulmonary arterial hypertension. In *Respiratory research* 17 (1), p. 88. DOI: 10.1186/s12931-016-0396-6.

Balabanian, Karl; Foussat, Arnaud; Dorfmueller, Peter; Durand-Gasselin, Ingrid; Capel, Francis; Bouchet-Delbos, Laurence et al. (2002): CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. In *American journal of respiratory and critical care medicine* 165 (10), pp. 1419–1425. DOI: 10.1164/rccm.2106007.

Bando, M.; Ishii, Y.; Sugiyama, Y.; Kitamura, S. (1999): Elevated plasma brain natriuretic peptide levels in chronic respiratory failure with cor pulmonale. In *Respiratory medicine* 93 (7), pp. 507–514. DOI: 10.1016/S0954-6111(99)90094-X.

Battke, Christina; Kremmer, Elisabeth; Mysliwietz, Josef; Gondi, Gabor; Dumitru, Claudia; Brandau, Sven et al. (2011): Generation and characterization of the first inhibitory antibody targeting tumour-associated carbonic anhydrase XII. In *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 60 (5), pp. 649–658. DOI: 10.1007/s00262-011-0980-z.

Behrends, Jan C. (2010): Physiologie. 93 Tabellen. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe). Available online at <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-23566>.

Bendayan, D.; Shitrit, D.; Ygla, M.; Huerta, M.; Fink, G.; Kramer, M. R. (2003): Hyperuricemia as a prognostic factor in pulmonary arterial hypertension. In *Respiratory medicine* 97 (2), pp. 130–133. DOI: 10.1053/rmed.2003.1440.

Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; Stryer, Lubert; Gatto, Gregory J. (2013): Biochemie. 7. Auflage. Berlin: Springer Spektrum.

Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework (2001). In *Clinical pharmacology and therapeutics* 69 (3), pp. 89–95.

Brown-Glaberman, Ursa; Marron, Marilyn; Chalasani, Pavani; Livingston, Robert; Iannone, Maria; Specht, Jennifer; Stopeck, Alison T. (2016): Circulating Carbonic Anhydrase IX and Antiangiogenic Therapy in Breast Cancer. In *Disease markers* 2016, p. 9810383. DOI: 10.1155/2016/9810383.

Chazova, I.; Loyd, J. E.; Zhdanov, V. S.; Newman, J. H.; Belenkov, Y.; Meyrick, B. (1995): Pulmonary artery adventitial changes and venous involvement in primary pulmonary hypertension. In *The American Journal of Pathology* 146 (2), pp. 389–397.

Cheng, Fangyuan; Wang, Xiao'e; Zhong, Diansheng; Sun, Linlin; Wang, Qian; Liu, Chang (2015): Significance of detection of serum carbonic anhydrase IX in the diagnosis

of lung cancer. In *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer* 18 (1), pp. 29–33. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2015.01.05.

Chin, Bernard S. P.; Conway, Dwayne S. G.; Chung, Natalie A. Y.; Blann, Andrew D.; Gibbs, Christopher R.; Lip, Gregory Y. H. (2003): Interleukin-6, tissue factor and von Willebrand factor in acute decompensated heart failure: relationship to treatment and prognosis. In *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 14 (6), pp. 515–521. DOI: 10.1097/00001721-200309000-00001.

Cohn, Jay N. (2001): Optimal diuretic therapy for heart failure. In *The American Journal of Medicine* 111 (7), p. 577. DOI: 10.1016/S0002-9343(01)00915-9.

Dorfmueller, P.; Perros, F.; Balabanian, K.; Humbert, M. (2003): Inflammation in pulmonary arterial hypertension. In *The European respiratory journal* 22 (2), pp. 358–363. DOI: 10.1183/09031936.03.00038903.

Dunham-Snary, Kimberly J.; Wu, Danchen; Sykes, Edward A.; Thakrar, Amar; Parlow, Leah R. G.; Mewburn, Jeffrey D. et al. (2017): Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: From Molecular Mechanisms to Medicine. In *Chest* 151 (1), pp. 181–192. DOI: 10.1016/j.chest.2016.09.001.

Erdmann, Erland (Ed.) (2011): *Klinische Kardiologie. Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße. 8., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage.* Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Available online at <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-16481-1>.

Fidan, Evren; Mentese, Ahmet; Ozdemir, Feyyaz; Deger, Orhan; Kavgaci, Halil; Caner Karahan, S.; Aydin, Fazil (2013): Diagnostic and prognostic significance of CA IX and suPAR in gastric cancer. In *Medical oncology (Northwood, London, England)* 30 (2), p. 540. DOI: 10.1007/s12032-013-0540-9.

Fijalkowska, Iwona; Xu, Weiling; Comhair, Suzy A. A.; Janocha, Allison J.; Mavrakis, Lori A.; Krishnamachary, Balaji et al. (2010): Hypoxia inducible-factor1alpha regulates the metabolic shift of pulmonary hypertensive endothelial cells. In *The American Journal of Pathology* 176 (3), pp. 1130–1138. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090832.

Finkelmeier, Fabian; Canli, Özge; Peiffer, Kai-Henrik; Walter, Dirk; Tal, Andrea; Koch, Christine et al. (2018): Circulating hypoxia marker carbonic anhydrase IX (CA9) in patients with hepatocellular carcinoma and patients with cirrhosis. In *PloS one* 13 (7), e0200855. DOI: 10.1371/journal.pone.0200855.

Folsom, A. R.; Wu, K. K.; Rosamond, W. D.; Sharrett, A. R.; Chambless, L. E. (1997): Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. In *Circulation* 96 (4), pp. 1102–1108. DOI: 10.1161/01.cir.96.4.1102.

Frost, Adaani; Badesch, David; Gibbs, J. Simon R.; Gopalan, Deepa; Khanna, Dinesh; Manes, Alessandra et al. (2019): Diagnosis of pulmonary hypertension. In *The European respiratory journal* 53 (1). DOI: 10.1183/13993003.01904-2018.

Frost, Susan C.; McKenna, Robert (Eds.) (2014): Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications. Dordrecht, s.l.: Springer Netherlands (Subcellular Biochemistry, 75). Available online at <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=654390>.

Galiè, Nazzareno; Humbert, Marc; Vachiery, Jean-Luc; Gibbs, Simon; Lang, Irene; Torbicki, Adam et al. (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). In *European heart journal* 37 (1), pp. 67–119. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv317.

Galiè, Nazzareno; Olschewski, Horst; Oudiz, Ronald J.; Torres, Fernando; Frost, Adaani; Ghofrani, Hossein A. et al. (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. In *Circulation* 117 (23), pp. 3010–3019. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.742510.

Ghofrani, Hossein A.; Morrell, Nicholas W.; Hoeper, Marius M.; Olschewski, Horst; Peacock, Andrew J.; Barst, Robyn J. et al. (2010): Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy. In *American journal of respiratory and critical care medicine* 182 (9), pp. 1171–1177. DOI: 10.1164/rccm.201001-0123OC.

Ghofrani, Hossein-Ardeschir; D'Armini, Andrea M.; Grimminger, Friedrich; Hoeper, Marius M.; Jansa, Pavel; Kim, Nick H. et al. (2013): Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. In *The New England journal of medicine* 369 (4), pp. 319–329. DOI: 10.1056/NEJMoa1209657.

Girgis, Reda E.; Champion, Hunter C.; Diette, Gregory B.; Johns, Roger A.; Permutt, Solbert; Sylvester, J. T. (2005): Decreased exhaled nitric oxide in pulmonary arterial hypertension: response to bosentan therapy. In *American journal of respiratory and critical care medicine* 172 (3), pp. 352–357. DOI: 10.1164/rccm.200412-1684OC.

Grünig, E.; Benjamin, N.; Krüger, U.; Kaemmerer, H.; Harutyunova, S.; Olsson, K. M. et al. (2016): Allgemeine und supportive Therapie der pulmonal arteriellen Hypertonie: Empfehlungen der Kölner Konsensus Konferenz 2016. In *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 141 (S 01), S26-S32. DOI: 10.1055/s-0042-114525.

Hammerer-Lercher, Angelika; Neubauer, Elke; Müller, Silvana; Pachinger, Otmar; Puschendorf, Bernd; Mair, Johannes (2001): Head-to-head comparison of N-terminal pro-brain natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and N-terminal pro-atrial natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction. In *Clinica Chimica Acta* 310 (2), pp. 193–197. DOI: 10.1016/S0009-8981(01)00578-2.

Hektoen, Helga Helseth; Flatmark, Kjersti; Andersson, Yvonne; Dueland, Svein; Redalen, Kathrine Røe; Ree, Anne Hansen (2015): Early increase in circulating carbonic anhydrase IX during neoadjuvant treatment predicts favourable outcome in locally advanced rectal cancer. In *BMC cancer* 15, p. 543. DOI: 10.1186/s12885-015-1557-6.

Hildenbrand, Florian F.; Bloch, Konrad E.; Speich, Rudolf; Ulrich, Silvia (2012): Daytime measurements underestimate nocturnal oxygen desaturations in pulmonary arterial and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. In *Respiration; international review of thoracic diseases* 84 (6), pp. 477–484. DOI: 10.1159/000341182.

Hoepfer, M. M.; Apitz, C.; Grünig, E.; Halank, M.; Ewert, R.; Kaemmerer, H. et al. (2016): Gezielte Therapie der pulmonal arteriellen Hypertonie: Empfehlungen der Kölner Konsensuskonferenz 2016. In *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 141 (S 01), S33-S41. DOI: 10.1055/s-0042-114526.

Hoepfer, Marius M.; Bogaard, Harm Jan; Condliffe, Robin; Frantz, Robert; Khanna, Dinesh; Kurzyna, Marcin et al. (2013): Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. In *Journal of the American College of Cardiology* 62 (25 Suppl), D42-50. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.10.032.

Hoo, Zhe Hui; Candlish, Jane; Teare, Dawn (2017): What is an ROC curve? In *Emergency Medicine Journal* 34 (6), p. 357. DOI: 10.1136/emermed-2017-206735.

Hu, Yanhua; Zhang, Zhongyi; Torsney, Evelyn; Afzal, Ali R.; Davison, Fergus; Metzler, Bernhard; Xu, Qingbo (2004): Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to

atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. In *The Journal of clinical investigation* 113 (9), pp. 1258–1265. DOI: 10.1172/JCI19628.

Hudalla, Hannes; Michael, Zoe; Christodoulou, Nicolas; Willis, Gareth R.; Fernandez-Gonzalez, Angeles; Filatava, Evgenia J. et al. (2019): Carbonic Anhydrase Inhibition Ameliorates Inflammation and Experimental Pulmonary Hypertension. In *American journal of respiratory cell and molecular biology* 61 (4), pp. 512–524. DOI: 10.1165/rcmb.2018-0232OC.

Humbert, M.; Monti, G.; Brenot, F.; Sitbon, O.; Portier, A.; Grangeot-Keros, L. et al. (1995): Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. In *American journal of respiratory and critical care medicine* 151 (5), pp. 1628–1631. DOI: 10.1164/ajrccm.151.5.7735624.

Ivanov, Sergey; Liao, Shu-Yuan; Ivanova, Alla; Danilkovitch-Miagkova, Alla; Tarasova, Nadezhda; Weirich, Gregor et al. (2001): Expression of Hypoxia-Inducible Cell-Surface Transmembrane Carbonic Anhydrases in Human Cancer. In *The American Journal of Pathology* 158 (3), pp. 905–919. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64038-2.

Jenkins, David (2015): Pulmonary endarterectomy: the potentially curative treatment for patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. In *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 24 (136), pp. 263–271. DOI: 10.1183/16000617.00000815.

Juliette A. Loncaster; Adrian L. Harris; Susan E. Davidson; John P. Logue; Robert D. Hunter; Charles C. Wycoff et al. (2001): Carbonic Anhydrase (CA IX) Expression, a Potential New Intrinsic Marker of Hypoxia: Correlations with Tumor Oxygen Measurements and Prognosis in Locally Advanced Carcinoma of the Cervix. In *Cancer Res* 61 (17), pp. 6394–6399. Available online at <https://cancerres.aacrjournals.org/content/61/17/6394.full-text.pdf>.

Kalavska, Katarina; Chovanec, Michal; Zatovicova, Miriam; Takacova, Martina; Gronesova, Paulina; Svetlovska, Daniela et al. (2016): Prognostic value of serum carbonic anhydrase IX in testicular germ cell tumor patients. In *Oncology letters* 12 (4), pp. 2590–2598. DOI: 10.3892/ol.2016.5010.

Kaluz, Stefan; Kaluzová, Milota; Liao, Shu-Yuan; Lerman, Michael; Stanbridge, Eric J. (2009): Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show? In *Biochimica et biophysica acta* 1795 (2), pp. 162–172. DOI: 10.1016/j.bbcan.2009.01.001.

Kawut, Steven M.; Horn, Evelyn M.; Berekashvili, Ketevan K.; Widlitz, Allison C.; Rosenzweig, Erika B.; Barst, Robyn J. (2005): von Willebrand factor independently predicts long-term survival in patients with pulmonary arterial hypertension. In *Chest* 128 (4), pp. 2355–2362. DOI: 10.1378/chest.128.4.2355.

Kim, Joo Young; Lee, Sang Hwa; An, Soyeon; Kim, Sung Joo; Sung, You-Na; Song, Ki-Byung et al. (2018): Carbonic anhydrase 9 expression in well-differentiated pancreatic neuroendocrine neoplasms might be associated with aggressive behavior and poor survival. In *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 472 (5), pp. 739–748. DOI: 10.1007/s00428-018-2353-x.

Kim, Nick H.; Delcroix, Marion; Jais, Xavier; Madani, Michael M.; Matsubara, Hiromi; Mayer, Eckhard et al. (2019): Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. In *The European respiratory journal* 53 (1), p. 1801915. DOI: 10.1183/13993003.01915-2018.

Kobayashi, Makoto; Matsumoto, Toshihide; Ryuge, Shinichiro; Yanagita, Kengo; Nagashio, Ryo; Kawakami, Yoshitaka et al. (2012): CA XII Is a sero-diagnostic marker for lung cancer. In *PloS one* 7 (3), e33952. DOI: 10.1371/journal.pone.0033952.

Kock, Lilli; Mahner, Sven; Choschzick, Matthias; Eulenburg, Christine; Milde-Langosch, Karin; Schwarz, Joerg et al. (2011): Serum carbonic anhydrase IX and its prognostic relevance in vulvar cancer. In *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 21 (1), pp. 141–148. DOI: 10.1097/IGC.0b013e318204c34f.

Kovacs, G.; Dumitrescu, D.; Barner, A.; Greiner, S.; Grünig, E.; Hager, A. et al. (2016): Klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie und initiale Diagnostik: Empfehlungen der Kölner Konsensus Konferenz 2016. In *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 141 (S 01), S10-S18. DOI: 10.1055/s-0042-114523.

Kovacs, Gabor; Olschewski, Horst (2019): Debating the new haemodynamic definition of pulmonary hypertension: much ado about nothing? In *The European respiratory journal* 54 (2). DOI: 10.1183/13993003.01278-2019.

Kumar, Rahul; Robinson, Jeffrey C.; Tuder, Rubin M. (2016): The Defining Characteristics of Pulmonary Arterial Hypertension. In Bradley A. Maron, Roham T. Zamanian, Aaron B. Waxman (Eds.): *Pulmonary Hypertension*, vol. 62. Cham: Springer International Publishing, pp. 17–28.

Kümpers, Philipp; Nickel, Nils; Lukasz, Alexander; Golpon, Heiko; Westerkamp, Volker; Olsson, Karen M. et al. (2010): Circulating angiopoietins in idiopathic pulmonary arterial

hypertension. In *European heart journal* 31 (18), pp. 2291–2300. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq226.

Lee, Ji Young; Alexeyev, Mikhail; Kozhukhar, Natalya; Pastukh, Viktoriya; White, Roderica; Stevens, Troy (2018): Carbonic anhydrase IX is a critical determinant of pulmonary microvascular endothelial cell pH regulation and angiogenesis during acidosis. In *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 315 (1), L41-L51. DOI: 10.1152/ajplung.00446.2017.

Leschke, M.; Wädlich, A.; Waldenmaier, S.; Faehling, M. (2009): Diagnostik der pulmonalen Hypertonie. In *Der Internist* 50 (9), 1086, 1088-90, 1092-100. DOI: 10.1007/s00108-009-2335-9.

Leuchte, H. H.; Freyhaus, H. ten; Gall, H.; Halank, M.; Hoeper, M. M.; Kaemmerer, H. et al. (2016): Risikostratifizierung und Verlaufskontrollen bei PAH-Patienten: Empfehlungen der Kölner Konsensus-Konferenz 2016. In *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 141 (S 01), S19-S25. DOI: 10.1055/s-0042-114524.

Lichtblau M, Berlier C, Saxer S, Carta AF, Mayer L, Groth A, Bader PR, Schneider SR, Furian M, Schwarz EI, Swenson ER, Bloch KE, Ulrich S. Acute Hemodynamic Effect of Acetazolamide in Patients With Pulmonary Hypertension Whilst Breathing Normoxic and Hypoxic Gas: A Randomized Cross-Over Trial. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Jul 22;8:681473. doi: 10.3389/fmed.2021.681473 PMID: 34368187 PMCID: PMC8341560.

Lopes, A. A.; Barreto, A. C.; Maeda, N. Y.; Cícero, C.; Soares, R. P. S.; Bydlowski, S. P.; Rich, S. (2011): Plasma von Willebrand factor as a predictor of survival in pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease. In *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 44 (12), pp. 1269–1275. DOI: 10.1590/s0100-879x2011007500149.

Lorenzen, Johan M.; Nickel, Nils; Krämer, Robert; Golpon, Heiko; Westerkamp, Volker; Olsson, Karen M. et al. (2011): Osteopontin in patients with idiopathic pulmonary hypertension. In *Chest* 139 (5), pp. 1010–1017. DOI: 10.1378/chest.10-1146.

M İlie; N M Mazure; V Hofman; R E Ammadi; C Ortholan; C Bonnetaud et al. (2010): High levels of carbonic anhydrase IX in tumour tissue and plasma are biomarkers of poor prognostic in patients with non-small cell lung cancer. In *Br J Cancer* 102 (11), pp. 1627–1635. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605690.

M. M. Hoeper; M. W. Pletz; H. Golpon; T. Welte (2007): Prognostic value of blood gas analyses in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. In *European Respiratory Journal* 29 (5), pp. 944–950. DOI: 10.1183/09031936.00134506.

M. Reinhardt (2018): Charakterisierung der Expression des Kolonie-stimulierenden Faktor-1 Rezeptors in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen. Inauguraldissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen.

Maron, Bradley A.; Zamanian, Roham T.; Waxman, Aaron B. (Eds.) (2016): Pulmonary Hypertension. Cham: Springer International Publishing.

Mauritz, Gert-Jan; Rizopoulos, Dimitris; Groepenhoff, Herman; Tiede, Henning; Felix, Janine; Eilers, Paul et al. (2011): Usefulness of serial N-terminal pro-B-type natriuretic peptide measurements for determining prognosis in patients with pulmonary arterial hypertension. In *The American Journal of Cardiology* 108 (11), pp. 1645–1650. DOI: 10.1016/j.amjcard.2011.07.025.

McLaughlin, Vallerie V.; Benza, Raymond L.; Rubin, Lewis J.; Channick, Richard N.; Voswinckel, Robert; Tapson, Victor F. et al. (2010): Addition of inhaled treprostinil to oral therapy for pulmonary arterial hypertension: a randomized controlled clinical trial. In *Journal of the American College of Cardiology* 55 (18), pp. 1915–1922. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.01.027.

McLaughlin, Vallerie V.; Gaine, Sean Patrick; Howard, Luke S.; Leuchte, Hanno H.; Mathier, Michael A.; Mehta, Sanjay et al. (2013): Treatment goals of pulmonary hypertension. In *Journal of the American College of Cardiology* 62 (25 Suppl), D73-81. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.10.034.

McMahon, Timothy J.; Bryan, Nathan S. (2017): Biomarkers in Pulmonary Vascular Disease: Gauging Response to Therapy. In *The American Journal of Cardiology* 120 (8S), S89-S95. DOI: 10.1016/j.amjcard.2017.06.014.

Mentese, Ahmet; Güven, Süleyman; Demir, Selim; Sümer, Ayşegül; Yaman, Serap Özer; Alver, Ahmet et al. (2018): Circulating parameters of oxidative stress and hypoxia in normal pregnancy and HELLP syndrome. In *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University* 27 (11), pp. 1567–1572. DOI: 10.17219/acem/74653.

Montani, David; Souza, Rogerio; Binkert, Christoph; Fischli, Walter; Simonneau, Gerald; Clozel, Martine; Humbert, Marc (2007): Endothelin-1/endothelin-3 ratio: a potential

prognostic factor of pulmonary arterial hypertension. In *Chest* 131 (1), pp. 101–108. DOI: 10.1378/chest.06-0682.

Morrison, L.Katherine; Harrison, Alex; Krishnaswamy, Padma; Kazanegra, Radmila; Clopton, Paul; Maisel, Alan (2002): Utility of a rapid B-natriuretic peptide assay in differentiating congestive heart failure from lung disease in patients presenting with dyspnea. In *Journal of the American College of Cardiology* 39 (2), pp. 202–209. DOI: 10.1016/S0735-1097(01)01744-2.

Nagaya, N.; Uematsu, M.; Satoh, T.; Kyotani, S.; Sakamaki, F.; Nakanishi, N. et al. (1999): Serum uric acid levels correlate with the severity and the mortality of primary pulmonary hypertension. In *American journal of respiratory and critical care medicine* 160 (2), pp. 487–492. DOI: 10.1164/ajrccm.160.2.9812078.

Nickel, Nils; Kempf, Tibor; Tapken, Heike; Tongers, Jörn; Laenger, Florian; Lehmann, Ulrich et al. (2008): Growth differentiation factor-15 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. In *American journal of respiratory and critical care medicine* 178 (5), pp. 534–541. DOI: 10.1164/rccm.200802-235OC.

Oishi, Peter; Fineman, Jeffrey R. (2016): Pulmonary Hypertension. In *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies* 17 (8 Suppl 1), S140-5. DOI: 10.1097/PCC.0000000000000754.

Olive, P. L.; Aquino-Parsons, C.; MacPhail, S. H.; Liao, S. Y.; Raleigh, J. A.; Lerman, M. I.; Stanbridge, E. J. (2001): Carbonic anhydrase 9 as an endogenous marker for hypoxic cells in cervical cancer. In *Cancer research* 61 (24), pp. 8924–8929.

Olschewski, Horst (2015): Imatinib for Pulmonary Arterial Hypertension - Wonder Drug or Killer Drug? In *Respiration; international review of thoracic diseases* 89 (6), pp. 513–514. DOI: 10.1159/000430997.

Olsson, Karen M.; Delcroix, Marion; Ghofrani, H. Ardeschir; Tiede, Henning; Huscher, Doerte; Speich, Rudolf et al. (2014): Anticoagulation and survival in pulmonary arterial hypertension: results from the Comparative, Prospective Registry of Newly Initiated Therapies for Pulmonary Hypertension (COMPERA). In *Circulation* 129 (1), pp. 57–65. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004526.

Oosterwijk-Wakka, Jeannette C.; Boerman, Otto C.; Mulders, Peter F. A.; Oosterwijk, Egbert (2013): Application of monoclonal antibody G250 recognizing carbonic anhydrase

IX in renal cell carcinoma. In *International journal of molecular sciences* 14 (6), pp. 11402–11423. DOI: 10.3390/ijms140611402.

Ostheimer, C.; Bache, M.; Güttler, A.; Kotsch, M.; Vordermark, D. (2014): A pilot study on potential plasma hypoxia markers in the radiotherapy of non-small cell lung cancer. Osteopontin, carbonic anhydrase IX and vascular endothelial growth factor. In *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]* 190 (3), pp. 276–282. DOI: 10.1007/s00066-013-0484-1.

Parati, Gianfranco; Revera, Miriam; Giuliano, Andrea; Faini, Andrea; Bilo, Grzegorz; Gregorini, Francesca et al. (2013): Effects of acetazolamide on central blood pressure, peripheral blood pressure, and arterial distensibility at acute high altitude exposure. In *European heart journal* 34 (10), pp. 759–766. DOI: 10.1093/eurheartj/ehs140.

Parkkila, S.; Rajaniemi, H.; Parkkila, A. K.; Kivela, J.; Waheed, A.; Pastorekova, S. et al. (2000): Carbonic anhydrase inhibitor suppresses invasion of renal cancer cells in vitro. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (5), pp. 2220–2224. DOI: 10.1073/pnas.040554897.

Quarck, Rozenn; Nawrot, Tim; Meyns, Bart; Delcroix, Marion (2009): C-reactive protein: a new predictor of adverse outcome in pulmonary arterial hypertension. In *Journal of the American College of Cardiology* 53 (14), pp. 1211–1218. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.12.038.

Rabinovitch, Marlene; Guignabert, Christophe; Humbert, Marc; Nicolls, Mark R. (2014): Inflammation and Immunity in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. In *Circulation research* 115 (1), pp. 165–175. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301141.

Richter, Manuel J.; Ewert, Jan; Grimminger, Friedrich; Ghofrani, Hossein Ardeschir; Kojonazarov, Baktybek; Petrovic, Aleksandar et al. (2018): Nintedanib in Severe Pulmonary Arterial Hypertension. In *American journal of respiratory and critical care medicine* 198 (6), pp. 808–810. DOI: 10.1164/rccm.201801-0195LE.

Rosenberg, V.; Pastorekova, S.; Zatovicova, M.; Vidlickova, I.; Jelenska, L.; Slezak, P. (2016): High serum carbonic anhydrase IX predicts shorter survival in head and neck cancer. In *Bratislavske lekarske listy* 117 (4), pp. 201–204. DOI: 10.4149/BLL_2016_038.

Schermuly, Ralph Theo; Dony, Eva; Ghofrani, Hossein Ardeschir; Pullamsetti, Soni; Savai, Rajkumar; Roth, Markus et al. (2005): Reversal of experimental pulmonary

hypertension by PDGF inhibition. In *The Journal of clinical investigation* 115 (10), pp. 2811–2821. DOI: 10.1172/JCI24838.

Schütze, Dina; Milde-Langosch, Karin; Witzel, Isabell; Rody, Achim; Karn, Thomas; Schmidt, Marcus et al. (2013): Relevance of cellular and serum carbonic anhydrase IX in primary breast cancer. In *Journal of cancer research and clinical oncology* 139 (5), pp. 747–754. DOI: 10.1007/s00432-013-1378-4.

Selimovic, N.; Bergh, C-H; Andersson, B.; Sakiniene, E.; Carlsten, H.; Rundqvist, B. (2009): Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension. In *The European respiratory journal* 34 (3), pp. 662–668. DOI: 10.1183/09031936.00174908.

Semenza, Gregg L. (2014): Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. In *Annual review of physiology* 76, pp. 39–56. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021113-170322.

Shao, Dongmin; Park, John E. S.; Wort, Stephen J. (2011): The role of endothelin-1 in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. In *Pharmacological research* 63 (6), pp. 504–511. DOI: 10.1016/j.phrs.2011.03.003.

Simonneau, Gérald; Montani, David; Celermajer, David S.; Denton, Christopher P.; Gatzoulis, Michael A.; Krowka, Michael et al. (2019): Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. In *The European respiratory journal* 53 (1). DOI: 10.1183/13993003.01913-2018.

Smith, Alan D.; Truong, Mathew; Bristow, Rob; Yip, Paul; Milosevic, Michael F.; Joshua, Anthony M. (2016): The Utility of Serum CA9 for Prognostication in Prostate Cancer. In *Anticancer research* 36 (9), pp. 4489–4492. DOI: 10.21873/anticancer.10994.

Solary, E.; Eymin, B.; Droin, N.; Haugg, M. (1998): Proteases, proteolysis, and apoptosis. In *Cell biology and toxicology* 14 (2), pp. 121–132. DOI: 10.1023/a:1007481921502.

Soon, Elaine; Holmes, Alan M.; Treacy, Carmen M.; Doughty, Natalie J.; Southgate, Laura; Machado, Rajiv D. et al. (2010): Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. In *Circulation* 122 (9), pp. 920–927. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.933762.

Span, P. N.; Bussink, J.; Manders, P.; Beex, L. V. A. M.; Sweep, C. G. J. (2003): Carbonic anhydrase-9 expression levels and prognosis in human breast cancer: association with treatment outcome. In *British Journal of Cancer* 89 (2), pp. 271–276. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601122.

Stacher, Elvira; Graham, Brian B.; Hunt, James M.; Gandjeva, Aneta; Groshong, Steve D.; McLaughlin, Vallerie V. et al. (2012): Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. In *American journal of respiratory and critical care medicine* 186 (3), pp. 261–272. DOI: 10.1164/rccm.201201-0164OC.

Stenmark, Kurt R.; Davie, Neil; Frid, Maria; Gerasimovskaya, Evgenia; Das, Mita (2006): Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. In *Physiology (Bethesda, Md.)* 21, pp. 134–145. DOI: 10.1152/physiol.00053.2005.

Swenson, Erik R. (2014): New insights into carbonic anhydrase inhibition, vasodilation, and treatment of hypertensive-related diseases. In *Current hypertension reports* 16 (9), p. 467. DOI: 10.1007/s11906-014-0467-3.

Takacova, Martina; Bartosova, Maria; Skvarkova, Lucia; Zatovicova, Miriam; Vidlickova, Ivana; Csaderova, Lucia et al. (2013): Carbonic anhydrase IX is a clinically significant tissue and serum biomarker associated with renal cell carcinoma. In *Oncology letters* 5 (1), pp. 191–197. DOI: 10.3892/ol.2012.1001.

Tamosiuniene, Rasa; Tian, Wen; Dhillon, Gundeep; Wang, Lijuan; Sung, Yon K.; Gera, Lajos et al. (2011): Regulatory T cells limit vascular endothelial injury and prevent pulmonary hypertension. In *Circulation research* 109 (8), pp. 867–879. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.236927.

Thompson, K.; Rabinovitch, M. (1996): Exogenous leukocyte and endogenous elastases can mediate mitogenic activity in pulmonary artery smooth muscle cells by release of extracellular-matrix bound basic fibroblast growth factor. In *Journal of cellular physiology* 166 (3), pp. 495–505. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(199603)166:3<495::AID-JCP4>3.0.CO;2-K.

Tiede, Svenja L.; Gall, Henning; Dörr, Oliver; dos Santos Guilherme, Marina; Troidl, Christian; Liebetrau, Christoph et al. (2015): New potential diagnostic biomarkers for pulmonary hypertension. In *European Respiratory Journal* 46 (5), pp. 1390–1396. DOI: 10.1183/13993003.00187-2015.

Torbicki, Adam; Kurzyna, Marcin; Kuca, Paweł; Fijałkowska, Anna; Sikora, Jarosław; Florczyk, Michał et al. (2003): Detectable serum cardiac troponin T as a marker of poor prognosis among patients with chronic precapillary pulmonary hypertension. In *Circulation* 108 (7), pp. 844–848. DOI: 10.1161/01.CIR.0000084544.54513.E2.

Torsney, Evelyn; Hu, Yanhua; Xu, Qingbo (2005): Adventitial progenitor cells contribute to arteriosclerosis. In *Trends in cardiovascular medicine* 15 (2), pp. 64–68. DOI: 10.1016/j.tcm.2005.02.003.

Tuder, Rubin M. (2014): How do we measure pathology in PAH (lung and RV) and what does it tell us about the disease. In *Drug discovery today* 19 (8), pp. 1257–1263. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.05.022.

Uda, Narasimha Rao; Stenner, Frank; Seibert, Volker; Herzig, Petra; Markuly, Norbert; van Dijk, Marc et al. (2019): Humanized Monoclonal Antibody Blocking Carbonic Anhydrase 12 Enzymatic Activity Leads to Reduced Tumor Growth In Vitro. In *Anticancer research* 39 (8), pp. 4117–4128. DOI: 10.21873/anticancer.13570.

Ulrich, Silvia; Keusch, Stephan; Hildenbrand, Florian F.; Lo Cascio, Christian; Huber, Lars C.; Tanner, Felix C. et al. (2015): Effect of nocturnal oxygen and acetazolamide on exercise performance in patients with pre-capillary pulmonary hypertension and sleep-disturbed breathing: randomized, double-blind, cross-over trial. In *European heart journal* 36 (10), pp. 615–623. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv540.

Vaupel, Peter; Multhoff, Gabriele (2021): Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. In *The Journal of physiology* 599 (6), pp. 1745–1757. DOI: 10.1113/JP278810.

Wang, G. L.; Semenza, G. L. (1993): General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (9), pp. 4304–4308. DOI: 10.1073/pnas.90.9.4304.

Ware, Lorraine B.; Eisner, Mark D.; Thompson, B. Taylor; Parsons, Polly E.; Matthay, Michael A. (2004): Significance of von Willebrand factor in septic and nonseptic patients with acute lung injury. In *American journal of respiratory and critical care medicine* 170 (7), pp. 766–772. DOI: 10.1164/rccm.200310-1434OC.

Watson, P. H.; Chia, S. K.; Wykoff, C. C.; Han, C.; Leek, R. D.; Sly, W. S. et al. (2003): Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma. In *British Journal of Cancer* 88 (7), pp. 1065–1070. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600796.

Weissmann, Norbert; Nollen, Matthias; Gerigk, Boris; Ardeschir Ghofrani, Hossein; Schermuly, Ralph Theo; Gunther, Andreas et al. (2003): Downregulation of hypoxic vasoconstriction by chronic hypoxia in rabbits: effects of nitric oxide. In *American journal*

of physiology. *Heart and circulatory physiology* 284 (3), H931-8. DOI: 10.1152/ajpheart.00376.2002.

Woelber, Linn; Kress, Kerstin; Kersten, Jan F.; Choschzick, Matthias; Kilic, Ergin; Herwig, Uwe et al. (2011): Carbonic anhydrase IX in tumor tissue and sera of patients with primary cervical cancer. In *BMC cancer* 11, p. 12. DOI: 10.1186/1471-2407-11-12.

Woelber, Linn; Mueller, Volkmar; Eulenburg, Christine; Schwarz, Joerg; Carney, Walter; Jaenicke, Fritz et al. (2010): Serum carbonic anhydrase IX during first-line therapy of ovarian cancer. In *Gynecologic oncology* 117 (2), pp. 183–188. DOI: 10.1016/j.ygyno.2009.11.029.

Wykoff, C. C.; Beasley, N. J.; Watson, P. H.; Turner, K. J.; Pastorek, J.; Sibtain, A. et al. (2000): Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. In *Cancer research* 60 (24), pp. 7075–7083.

Yang, Jia-Sin; Chen, Mu-Kuan; Yang, Shun-Fa; Chang, Yu-Chao; Su, Shih-Chi; Chiou, Hui-Ling et al. (2014): Increased expression of carbonic anhydrase IX in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. In *Clinical chemistry and laboratory medicine* 52 (9), pp. 1367–1377. DOI: 10.1515/cclm-2014-0129.

Závada, J.; Závadová, Z.; Zát'ovicová, M.; Hyršl, L.; Kawaciuk, I. (2003): Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. In *British Journal of Cancer* 89 (6), pp. 1067–1071. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601264.

Zhang, Shuai; Yang, Ting; Xu, Xiaomao; Wang, Meng; Zhong, Linye; Yang, Yuanhua et al. (2015): Oxidative stress and nitric oxide signaling related biomarkers in patients with pulmonary hypertension: a case control study. In *BMC pulmonary medicine* 15, p. 50. DOI: 10.1186/s12890-015-0045-8.

Zhou, Grace X.; Ireland, Joanna; Rayman, Patricia; Finke, James; Zhou, Ming (2010): Quantification of carbonic anhydrase IX expression in serum and tissue of renal cell carcinoma patients using enzyme-linked immunosorbent assay: prognostic and diagnostic potentials. In *Urology* 75 (2), pp. 257–261. DOI: 10.1016/j.urology.2009.09.052.

10. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

11. Danksagung

An erster Stelle möchte ich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. Henning Gall für die Bereitstellung des Themas und die exzellente Betreuung bedanken. Ich konnte mich immer auf deine Ratschläge und Korrekturen verlassen, wenn es mal gehakt hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Werner Seeger für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Klinik durchführen zu können.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Ralf Schermuly dafür danken, dass ich für die Dauer meiner Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe so herzlich aufgenommen wurde.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Djuro Kosanovic und Herrn Aleksandar Petrovic bedanken. Ihr wart stets an meiner Seite und habt mich im Labor mit eurem Rat und eurer Unterstützung begleitet. Eure Anleitung und euer Engagement haben mir geholfen, meine ersten Schritte im wissenschaftlichen Arbeiten erfolgreich zu meistern.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des ECCPS in Gießen für die Unterstützung, die ich bei meiner Arbeit erhalten habe. Insbesondere danke ich Ewa Bieniek, die die immunohistochemischen Färbungen der Präparate durchgeführt hat und die langwierigen Auswertungen der Schnitte erträglich gemacht hat.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin Eva. Deine Liebe, Geduld und Inspiration haben mich immer wieder motiviert weiterzumachen. Du hast mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet. Du hast Verständnis für die vielen Wochenenden aufgebracht, an denen ich im Labor saß, anstatt mit dir die schönen Sommertage zu verbringen. Auch in Zeiten, in denen mir meine Frustration die Laune verhagelt hat, warst du für mich da.

Meinen Eltern möchte ich ebenfalls meinen tiefsten Dank aussprechen. Nur durch eure Unterstützung war es erst möglich, dass ich mich auf mein Medizinstudium und meine Doktorarbeit konzentrieren konnte. Und wer weiß, ob ich die Doktorarbeit ohne eure regelmäßigen Erinnerungen überhaupt irgendwann fertig gestellt hätte.

Meinen Dank möchte ich auch meinem Großvater Prof. Dr. Günter Ewert aussprechen, der mir mit seinen umfangreichen Kenntnissen stets eine große Hilfe war.