

Periphere Biomarker in Patienten mit
pulmonal-arterieller Hypertonie und
hereditärer hämorrhagischer Teleangiektasie

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

vorgelegt von Schmitt, Nicolai
aus Aschaffenburg

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich der Justus-Liebig-Universität Gießen

Medizinische Klinik II

Gutachter/in: Frau Prof. Dr. Sommer, Natascha

Gutachter/in: Prof. Dr. Dörr, Oliver

Tag der Disputation: 16.01.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Pulmonale Hypertonie (PH)	3
1.1.1	Definition und Klassifikation	3
1.1.2	Pathophysiologie und Pathogenese der pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH)	6
1.1.3	Genetische Faktoren der PAH	7
1.1.4	Diagnostik der P(A)H	8
1.1.5	Therapie der PAH	10
1.2	Hereditäre Hämorrhagische Teleangiektasie (HHT)	11
1.2.1	Definition und Klassifikation	11
1.2.2	Pathophysiologie und Pathogenese der HHT	12
1.2.3	Symptome und Diagnostik der HHT	12
1.2.4	Therapie der HHT	14
1.3	PAH assoziiert mit HHT	16
1.4	TGF- β -Signalweg bei <i>ALK1/ENG</i> - und <i>BMPR2</i> -Mutation	17
1.5	Effekt von Tacrolimus auf den <i>BMPR2</i> -Signalweg	23
1.5.1	Definition und Wirkmechanismus	23
1.5.2	Tacrolimusdosierung bei dysfunktionalem <i>BMPR2</i> -Signalweg	24
1.5.3	Biomarker bei dysfunktionalem <i>ALK1/ENG/BMPR2</i> -Signalweg	24
1.6	Fragestellung und Zielsetzung	25
2	Methodik	27
2.1	Material	27
2.2	Patientenkollektiv	28
2.3	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)</i> -Isolierung und Tacrolimus-Inkubierung	32
2.4	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	33
2.5	<i>Proximity Extension Assay (PEA)</i>	34
2.6	Statistik	37

3 Ergebnisse	38
3.1 Charakterisierung der PAH in den unterschiedlichen Patientengruppen	38
3.1.1 Invasive hämodynamische Messungen mittels Rechtsherzkatheter	38
3.1.2 Therapeutika zur Behandlung der PAH	42
3.2 PBMC-Untersuchungen	42
3.2.1 TGF- β - und VEGF-Level bei stimulierten und unstimulierten PBMC	42
3.2.2 Effekt von Tacrolimus auf TGF- β - und VEGF-Level in PBMC	45
3.3 Plasma-Untersuchungen	48
3.3.1 TGF- β - und VEGF-Konzentration in humanem Plasma	48
3.3.2 Bestimmung zirkulierender Biomarker mittels PEA	50
4 Diskussion	57
4.1 Fazit	57
4.2 Repräsentativität des Studienkollektivs	57
4.3 Auswertung der klinischen Daten	59
4.4 VEGF- und TGF- β -Freisetzung aus stimulierten und unstimulierten PBMC	60
4.5 VEGF- und TGF- β -Freisetzung aus PBMC nach Tacrolimus-Gabe	61
4.6 Periphere Biomarker in humanem Plasma bei <i>ALK1/ENG</i> - und <i>BMPR2</i> -Mutation	61
4.6.1 Auswertung von TGF- β - und VEGF-Konzentrationen	62
4.6.2 Untersuchung zirkulierender Biomarker mittels PEA	63
Zusammenfassung	68
Summary	70
Literaturverzeichnis	72
Anhang	95
Ehrenwörtliche Erklärung	101

1 Einleitung

1.1 Pulmonale Hypertonie

1.1.1 Definition und Klassifikation. Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine schwere, potenziell lebensbedrohliche Erkrankung der pulmonalen Gefäße. Die Prävalenz der pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) schwankt je nach untersuchter Population zwischen 15 Fällen pro eine Million Einwohner in einer französischen Bevölkerungskohorte, 22 Fällen pro eine Million Einwohner in einer tschechischen Studie (Jansa et al., 2014) und 25.9 Fällen pro eine Million Einwohner in Deutschland (Hoepfer, Huscher, Pittrow, 2016). Die idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH) steht hier für den größten Teil der Patienten mit ungefähr 50%. Die hereditäre pulmonal-arterielle Hypertonie (HPAH) steht für 4-14% der auftretenden PAH (Humbert et al. 2006). Die PH wird definiert durch einen mittleren pulmonal arteriellen Druck (mPAP) von >20 mmHg. Des Weiteren werden prä- und postkapilläre Formen unterschieden. Die präkapilläre PH wird durch einen pulmonalen Gefäßwiderstand (PVR) von >3 Wood-Einheiten und einen pulmonal-arteriellen Verschlussdruck (PAWP) von ≤ 15 mmHg charakterisiert, wohingegen die postkapilläre PH durch einen PAWP von >15 mmHg definiert wird. Gemäß der *World Symposium for Pulmonary Hypertension* Klassifikation (WSPH-Klassifikation) von 2018 wird die PH in fünf Gruppen aufgeteilt. Die PAH ist dabei Gruppe 1. Die Gruppe 2 bildet PH bei Linksherzerkrankung, die Gruppe 3 PH bei chronischer Lungenerkrankung, die Gruppe 4 PH bei pulmonal arterieller Obstruktion und Gruppe 5 PH mit unklarem beziehungsweise multifaktoriellen Mechanismus (Galiè et al., 2009; Galiè et al. 2019; Hoepfer et al., 2013; McLaughlin et al., 2009; Oudiz, 2007; Simonneau et al., 2019) (Tabelle 1). Zur Einschätzung der Überlebensrate der Patienten der ätiologischen Gruppen können die *New York Heart Association* (NYHA) Klassifikation oder klinische Parameter herangezogen werden. So konnte für die Gruppe mit PAH eine Überlebensrate für 1, 3, und 5 Jahre von 88.2%, 72.2% und 59.4% im Vergleich zu 79.5%, 52.7% und 38.1% für PH bei chronischer Lungenerkrankung gezeigt werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug für NYHA Klasse I und II 78.3%, 58.2% für Klasse III und 39.4% für Klasse IV. Des Weiteren konnte das Patientenalter, das Geschlecht und der 6-Minuten-Gehtest als überlegene Vorhersagewerte für das Überleben im Vergleich zur NYHA-Klassifikation auch über die PH-Gruppen hinaus festgestellt werden (Gall et al. 2017).

<p>Gruppe I</p> <p>Pulmonal-arterielle Hypertonie</p>	<ul style="list-style-type: none"> - idiopathisch - hereditär (<i>BMPR2, ALK1, ENG, GDF2, SMAD4</i>, u. a.) - verursacht durch Medikamente/Toxine - assoziiert mit <ul style="list-style-type: none"> → Bindegewebserkrankungen → HIV-Infektionen → portaler Hypertension → angeborenen Herzfehlern → Schistosomiasis -PAH <i>long-term responder</i> auf Kalziumkanalblocker - PAH mit offenkundigen Merkmalen einer venösen/kapillären Beteiligung - persistierende PAH des Neugeborenen
<p>Gruppe II</p> <p>Pulmonale Hypertonie infolge von Linksherzerkrankungen</p>	<ul style="list-style-type: none"> - PH durch Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion - PH durch Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion - Klappenerkrankungen - angeborene/erworbene Linksherz-Einfluss-/Ausflusstrakt-Obstruktionen und angeborene Kardiomyopathien - angeborene/erworbene Pulmonalvenenstenose

<p>Gruppe III</p> <p>Pulmonale Hypertonie infolge von Lungenerkrankungen bzw. Hypoxie</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Obstruktive Lungenerkrankung - Restriktive Lungenerkrankung - Lungenerkrankungen mit gemischt restriktivem und obstruktivem Muster - Hypoxie ohne Lungenerkrankung - Entwicklungsstörungen der Lunge
<p>Gruppe IV</p> <p>Pulmonale Hypertonie durch pulmonal arterielle Obstruktionen</p>	<ul style="list-style-type: none"> - CTEPH - Pulmonalarterien-Obstruktionen <ul style="list-style-type: none"> → Sarkome oder Angiosarkom → andere maligne Tumore → andere nicht-maligne Tumore → Arteriitis ohne Bindegewebserkrankung → angeborene Pulmonalarterienstenose → Parasiten (Hydatidose)
<p>Gruppe V</p> <p>Pulmonale Hypertonie mit unklarem bzw. multifaktoriellem Mechanismus</p>	<ul style="list-style-type: none"> - hämatologische Erkrankungen - systemische und metabolische Erkrankungen - andere (fibrosierende Mediastinitis, chronisches Nierenversagen mit/ohne Dialyse, segmentale pulmonale Hypertonie) - komplexe angeborene Herzerkrankungen

Tabelle 1. Klinische Klassifikation nach dem sechsten WSPH 2018 (Simonneau et al., 2019).

WSPH = *World Symposium for Pulmonary Hypertension*, *BMP2* = *bone morphogenetic protein receptor type 2*, *ALK1* = *activin A receptor-like type 1*, *ENG* = *Endoglin*, *GDF2* = *growth differentiation factor 2*, *SMAD4* = *Mothers against decapentaplegic homolog 4*, HIV = Humane Immundefizienz-Virus, PAH = Pulmonal-arterielle Hypertonie, PH = Pulmonale Hypertonie, CTEPH = Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie.

1.1.2 Pathophysiologie und Pathogenese der PAH. Mehrere Faktoren führen bei der präkapillären PH, insbesondere der PAH, zu ihrem typischen, progredienten Verlauf. Es kommt unter anderem zu einer Erhöhung des Gefäßwiderstandes durch Vasokonstriktion bzw. ausbleibende Vasodilatation, *Remodeling* der Gefäße, Inflammation und in situ Thrombosierung bei den Betroffenen (Gaine & Rubin, 1998; Galiè et al., 2009; Humbert et al., 2004).

Ein wichtiger Vasodilatator ist Stickstoffmonoxid (NO), der mittels *second messenger* eine Senkung der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt. Dies führt wiederum zu einer Verringerung des Tonus der glatten Muskelzellen und schließlich zu einer Vasodilatation. Patienten mit PAH weisen eine verringerte NO-Synthese der Endothelzellen auf, was somit in einer schwächeren/fehlenden Vasodilatation resultiert (Ghofrani et al., 2004). Entgegengesetzt wirkend wird Endothelin-1 (ET-1) durch das Endothel gebildet, welches zu den stärksten Vasokonstriktoren der glatten Muskulatur der pulmonalen Gefäße gehört. Außerdem wirkt es durch seine mitogenen Eigenschaften zellproliferativ auf glatte Muskelzellen (Chua, Krebs, Chua, Diglio, 1992). Zusätzlich zu der Verringerung vasodilatatorischer Faktoren konnte eine Erhöhung des Serumspiegels von ET-1 bei Patienten mit IPAH im Vergleich zu Gesunden beobachtet werden (Stewart, Levy, Cernacek, Langleben, 1991).

Darüber hinaus kommt es zu einem pathologischen Umbau der pulmonalen Gefäße, welcher durch die endotheliale Dysfunktion begünstigt wird. Hierbei exprimieren Endothelzellen Gerinnungs-, Wachstums- und vasoproliferative Faktoren (Jeffery & Morrell, 2002). Dadurch kommt es sowohl zu einer quantitativen Erhöhung und Migration der Endothelzellen als auch der glatten Muskelzellen, welche nun ebenfalls zu distalen, nicht muskularisierten, pulmonalen Gefäßen auswandern und diese mit einer neuen Schicht aus glatten Muskelzellen umgeben (Humbert et al., 2004; Masri et al., 2007). Im fortgeschrittenen Stadium der PAH kommt es zu einer Proliferation aller Zellen der pulmonalen Gefäßwand und zusätzlich zu einer Ablagerung von Blutbestandteilen und Entzündungsmediatoren an den pulmonalen Arterien (Taraseviciene-Stewart et al., 2001; Xu et al., 2007).

Diese Entzündungsfaktoren und die Zellen, die sie exprimieren, spielen eine spezifische Rolle bei bestimmten Formen der PH. Beispielsweise besserte sich der Zustand des Lungenhochdrucks bei PH-Patienten mit assoziiertem systemischem Lupus Erythematodes (SLE) nach immunsuppressiver Therapie. Ebenso konnte bei IPAH-Patienten eine Erhöhung von Entzündungsmediatoren und Rezeptoren nachgewiesen

werden, wie zum Beispiel Zytokine und deren Rezeptoren sowie *stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)*, *monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)* und *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)*. Dies hebt die Bedeutung der Inflammation bei der Pathogenese der PH hervor (Dorfmueller, Perros, Balabanian, Humbert, 2003).

Bedeutsam ist hier ebenfalls der pathologische Gerinnungsprozess und die damit einhergehende Thromboseneigung. Hierbei kommt es zu einer vermehrten Expressierung des von-Willebrand-Faktors (vWF) und des *plasminogen activator inhibitor typ-1 (PAI-1)*. Diese Erhöhung der intravaskulären Koagulation ist ein anhaltender Prozess bei der PAH, der durch Fibrinopeptid A- und D-Dimere nachgewiesen werden kann (Humbert et al., 2004). Zusätzlich kommt es zu einer strukturellen und funktionellen Veränderung der pulmonalen Gefäßwände durch die Interaktion mit Thrombozyten. Diese Prozesse laufen nicht getrennt voneinander ab, sondern beeinflussen sich gegenseitig. So wirken Thrombozyten nicht nur in der Blutgerinnung mit, sondern setzen auch Mediatoren zum Gefäßumbau und zur Vasokonstriktion frei, unter anderem Thromboxan-A₂, *platelet-activating factor (PAF)*, *platelet-derived growth factor (PDGF)*, Serotonin sowie *transforming growth factor (TGF)* und *vascular endothelial growth factor (VEGF)* (Herve et al., 2001; Humbert et al., 2004).

1.1.3 Genetische Faktoren der PAH. Mutationen, die zur einer *loss-of-function* im *bone-morphogenic protein receptor 2 (BMPR2)* führen, der am TGF- β -Signalweg beteiligt ist (1.4), sind als Prädisposition für die Entwicklung einer PAH bekannt. Zurzeit sind mindestens 15 Gene bekannt, die mit der Entstehung einer PAH in Verbindung gebracht werden können: *ALK1*, *BMPR2*, *bone-morphogenetic protein-9 (BMP9)*, *Caveolin-1 (CAV-1)*, *eukaryotic translation initiation factor-2 alpha kinase-4 (EIF2AK4)*, *Endoglin (ENG)*, *potassium pore domain channel subfamily K member 3 (KCNK3)*, *potassium voltage-gated channel subfamily A member 5 (KCNA5)*, *mothers against decapentaplegic homolog 1 (SMAD1)*, *mothers against decapentaplegic homolog 4 (SMAD4)*, *mothers against decapentaplegic homolog 9 (SMAD9)*, *T-box transcription factor 4 (TBX4)*, *ATPase 13A3 (ATP13A3)*, *aquaporin 1 (AQP1)* und *SRY-box transcription factor 17 (SOX17)* (Gräf et al., 2018; Morrell et al., 2019). *BMPR2*-Mutationen machen hierbei 75% der HPAH und circa 25% der idiopathischen PAH-Fälle ohne Vorerkrankungen in der Familiengeschichte aus, andere Mutationen kommen deutlich seltener vor (Machado et al., 2015; Wang et al., 2016). Zudem zeigte sich, dass

Patienten mit HPAH und *BMP2*-Mutation früher erkranken im Vergleich zu IPAH-Patienten ohne Mutation, schwerere Symptome erleiden, eine schlechtere Hämodynamik und eine erhöhte Mortalität aufweisen (Austin et al., 2009; Girerd et al., 2010; Koehler et al., 2004; Machado et al., 2009; Sztrymf et al., 2008). *ALK1*- und *ENG*-Mutationen bei PAH treten meist assoziiert mit hereditärer hämorrhagischer Teleangiektasie (HHT) auf. Bei erblicher pulmonal venookklusiver Erkrankung (PVOD) beziehungsweise pulmonaler kapillärer Hämangiomasose (PCH) wurde hingegen bei mehreren Patienten eine autosomal rezessiv vererbte Mutation des *EIF2AK4*-Gens festgestellt (Eyries et al., 2014).

1.1.4 Diagnostik der P(A)H. Aufgrund unspezifischer Symptome ist die frühzeitige Diagnostizierung einer PAH entsprechend erschwert. Zu diesen zählen Belastungsdyspnoe, Fatigue, Brustschmerz, Benommenheit/Synkopen und weniger häufig Husten. Spätere Symptome bedingt durch progressive Rechtsherzinsuffizienz sind Blähungen, Ödeme und Aszites. Seltener treten Hämoptysen und Arrhythmien auf (Frost et al., 2019).

Nicht-invasive Diagnostikverfahren können auf das Vorliegen einer PAH hinweisen. Dazu gehört das Elektrokardiogramm (EKG), welches jedoch wenig Sensitivität und Spezifität für die Detektion einer PAH aufweist und nur indirekt auf Rechtsherzbelastung durch Rechtsabweichung der QRS-Achse in den Extremitätenableitungen hinweisen kann (Al-Naamani et al., 2008; Dumitrescu et al., 2016; Frost et al., 2019).

Die wichtigste non-invasive Untersuchungsmethode zur Diagnosestellung einer PAH ist die transthorakale Echokardiographie (TTE). Die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer PAH kann mittels Trikuspidalklappenregurgitationsgeschwindigkeit (TRV), Größe des rechten Ventrikels, Funktion des interventrikulären Septums, Schwankungen des Durchmessers der *Vena Cava inferior* mit den Atemzyklen, endsystolischer Fläche des rechten Vorhofes, dem Muster der systolischen Flussgeschwindigkeit und früh-diastolischer pulmonaler Regurgitationsgeschwindigkeit festgestellt werden (Frost et al., 2019). Darüber hinaus kann zur Messung der körperlichen Belastbarkeit bei einer PAH der 6-Minuten-Gehtest dienen, mit dessen Hilfe sich prognostische Aussagen treffen lassen und der meist als primärer Zielparameter bei Studien zur PAH-Therapie eingesetzt wird (Grünig et al., 2010; Miyamoto et al., 2000; Paciocco et al., 2001; Sitbon et al., 2002). Für die Anwendung dieses Tests sprechen seine

einfache Durchführbarkeit, Reproduzierbarkeit, Standardisierung sowie die niedrigen Kosten. Ebenso wie der 6-Minuten-Gehtest korreliert auch die Spiroergometrie mit der Schwere einer PAH (Palange et al., 2007; Ross, 2003). Die Spiroergometrie kann zur Einschätzung der kardiopulmonalen Einschränkungen und zur Beurteilung der pulmonalen Gefäßbeteiligung eingesetzt werden. Des Weiteren können nach erfolgter PAH-Diagnose die Schwere der körperlichen Beeinträchtigung und die prognostischen Aussichten eingeschätzt werden (Frost et al., 2019). Charakteristisch für PAH-Patienten ist eine reduzierte Sauerstoffaufnahme, verminderte ventilatorische Effizienz, reduzierter Sauerstoffpuls sowie ein unverhältnismäßiger Herzfrequenzanstieg unter Belastung im Vergleich zu Gesunden (Oudiz et al., 2006). Des Weiteren kann eine reduzierte Kohlenstoffmonoxiddiffusion vorliegen (Frost et al., 2019).

Blutuntersuchungen sind nicht etabliert in der Diagnostik der PAH, werden jedoch genutzt, um Formen der PH zu unterscheiden oder Begleiterkrankungen zu erkennen. So treten beispielsweise Schilddrüsenerkrankungen häufig in Zusammenhang mit einer PAH auf. Ebenso sollte auch nach Anzeichen von Kollagenosen, HIV- und Hepatitisserkrankungen gesucht werden, da diese zu einer PH führen, beziehungsweise assoziiert sein können. Darüber hinaus empfiehlt sich eine erweiterte Gerinnungsdiagnostik bei Patienten mit gesicherter chronisch thromboembolischer pulmonaler Hypertonie (CTEPH) zum Ausschluss von Koagulopathien und Thrombophilien. Zusätzlich kann der *brain natriuretic peptide* (BNP) und *N-terminal pro-BNP* (NT-proBNP) Wert bestimmt werden, da Erhöhungen der Werte mit Rechtsherzbelastung korrelieren und Prädiktoren für ungünstige Verläufe sind (Frost et al., 2019).

Die invasive Untersuchung ist der Goldstandard und besteht aus dem Rechtsherzkatheter (RHK), verbunden mit der Möglichkeit einer Vasoreagibilitätsprüfung. Der RHK dient zur Diagnosestellung der PH, der Bestimmung des Schweregrades der hämodynamischen Veränderungen sowie zur Testung der pulmonalen Vasoreagibilität. Hierbei werden der pulmonalarterielle Druck (systolisch, diastolisch, Mitteldruck), rechtsatrialer Druck, pulmonal-kapillärer Verschlussdruck, pulmonaler Gefäßwiderstand sowie der Druck im rechten Ventrikel (systolisch, enddiastolisch) gemessen (Kovacs et al., 2016; Simonneau et al., 2019). Bei dieser Untersuchung können darüber hinaus Vasoreagibilitätsprüfungen durchgeführt werden, um Patienten mit IPAH zu identifizieren, die Nutzen an einer Langzeittherapie mit Kalziumantagonisten aufweisen (Rich, Kaufmann, Levy, 1992; Sitbon et al., 2005). Mit

NO gibt es weltweit am meisten Erfahrung. Es kann aber ebenso inhalatives Iloprost, intravenöses (i.v.) Epoprostenol oder i.v. Adenosin dazu dienen, akute *Responder* zu detektieren (Kovacs et al., 2016; Jing et al., 2009; Opitz & Rubin, 2009; Simonneau et al., 2019; Sitbon et al., 2005).

1.1.5 Therapie der PAH. Die Behandlung der PAH erfolgt gemäß den Leitlinien der *European Society of Cardiology* (ESC) und der *European Respiratory Society* (ERS), welche auch nach der WSPH 2018 weiterhin gelten (Galiè et al., 2019). Zurzeit sind Therapeutika im Einsatz, die über drei verschiedene Signalwege Einfluss auf die endotheliale Funktion nehmen: der Prostacyclin- und NO-Signalweg, welche bei PAH eine verminderte Funktion zeigen, und den Endothelin-Signalweg, welcher verstärkt aktiviert ist (Galiè et al., 2019).

In Deutschland zugelassene Medikamente, die über diese Signalwege wirken, sind Phosphodiesterase-5-Hemmer (PDE-5-Hemmer), ein Stimulator der löslichen Guanylatcyclase (Riociguat), Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ERA), Prostacyclin-Analoga und Prostacyclin-Rezeptor-Agonisten. Für Patienten mit positivem Vasoreagibilitätstest kommt außerdem die Therapie mit Kalziumkanal-Blocker in Frage (Galiè et al., 2019; Hoeper et al., 2016).

PDE-5-Hemmer, wie zum Beispiel Sildenafil, konnten zu einer Verbesserung der Hämodynamik, der 6-Minuten-Gehstrecke und der Weltgesundheitsorganisation (WHO)-Funktionsklasse führen. Des Weiteren können PDE-5-Hemmer mit allen anderen Substanzklassen außer Riociguat kombiniert werden (Galiè et al., 2005; Galiè et al., 2015). Stimulatoren der löslichen Guanylatcyclase haben ebenso eine günstige Wirkung auf diese Parameter (Ghofrani et al., 2013) und lassen sich zusätzlich mit ERA oder nicht-intravenösen Prostacyclin-Analoga kombinieren (Hoeper et al., 2016). Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, wie zum Beispiel Bosentan, das erste Therapeutikum aus der Substanzklasse, führten zu einer Verbesserung der klinischen Symptomatik, der Hämodynamik und der Zeit bis zur klinischen Verschlechterung (Dhaun et al., 2014; Galiè et al., 2008; Rubin et al., 2002). Aufgrund des besseren Nebenwirkungsprofils und verminderten pharmakologischen Interaktionen werden aktuell allerdings nur noch Ambrisentan oder Macitentan, aber nicht Bosentan zur Therapie empfohlen. Ambrisentan wurde hierbei eine Verbesserung des Langzeitverlaufs in Kombination mit Tadalafil im Vergleich zur Monotherapie nachgewiesen. Für Macitentan konnte sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit PDE-5-Hemmern eine Verbesserung des

progressionsfreien Überlebens, Verbesserung der 6-Minuten-Gehstrecke und des pulmonalen Gefäßwiderstandes gezeigt werden (Galiè et al., 2015). Des Weiteren kann die Therapie mit einem Prostacyclin-Rezeptor-Agonist, beispielsweise Selexipag, bei vorhandener Therapie mit einem PDE-5-Inhibitor und/oder ERA erweitert werden oder als Monotherapie bei Patienten, die für andere Medikamentengruppen Kontraindikationen aufweisen, eingesetzt werden (Galiè et al., 2019). Prostacyclin-Analoga, wie Trepostinil, können subkutan oder intravenös mittels einer subkutan implantierten Pumpe appliziert werden (Ewert, Halank, Bruch, Ghofrani, 2012; Hoeper et al., 2016).

In aktuellen Studien wird Sotatercept als potenziell wirksames Medikament untersucht. Es wird aus dem Protein *activin A receptor type 2A (ACVR2A)* verbunden mit der Fc-Domäne von Immunglobulin G1 (IgG1), welcher als Fänger von Liganden der TGF- β -Superfamilie fungiert, gebildet. Hierdurch wird eine Balance zwischen dem wachstumsfördernden *growth differentiation factor* -Signalweg und dem wachstumsinhibierenden BMP-Signalweg erzielt. Diese Medikation wurde mit einer basalen Grundtherapie für PAH kombiniert und stellt eine zukünftige, zusätzliche Behandlungsoption dar (Humbert et al., 2021).

Allgemein richtet sich das angewandte Therapieschema danach, ob es sich um eine neudiagnostizierte oder vorbehandelte PAH handelt, ob diese Charakteristika einer typischen oder atypischen PAH aufweist, und nach dem Risikoprofil des Patienten (Hoeper et al., 2016).

1.2 Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie

1.2.1 Definition und Klassifikation. Die HHT ist eine autosomal dominant vererbte genetische Störung, die sich vor allem durch arteriovenöse Malformationen (AVM), d.h. direkte Gefäßverbindungen zwischen arteriellem und venösen System, manifestiert. Diese AVM resultieren meist in den für die HHT typischen Symptomen: rezurrenente Epistaxis und Magen-Darm-Blutungen, Teleangiektasien (auf Lippen, Zunge, Mundschleimhaut, Gesicht, Brust und Finger) sowie Lungen-, Leber-, und Gehirn-AVM mit Hyperzirkulation und der Gefahr der Hypoxämie und thromboembolischer Ereignisse im Falle der pulmonalen AVM. Die Inzidenz der HHT beträgt 1/10000 Einwohner in Nordamerika (Cottin et al., 2007; McDonald & Pyeritz, 2000).

Je nach mutiertem Gen kann die HHT weiter unterteilt werden. Die zwei

wichtigsten Formen sind HHT1 und HHT2. HHT1 [Mutation auf dem *Endoglin (ENG)* Gen] tritt bei 44% und HHT2 [Mutation auf dem *activin A receptor like type 1 (ACVRL1)* Gen] bei 52% der HHT-positiven-Patienten auf (McDonald, Bayrak-Toydemir, DeMille, Wooderchak-Donahue, Whitehead, 2020). Während HHT1 meist mit pulmonalen AVM assoziiert ist, tritt HHT2 eher in Verbindung mit PH und hepatischen AVM auf (Cottin et al., 2007).

1.2.2 Pathophysiologie und Pathogenese der HHT. Ebenso wie bei Mutationen, die zu einer PAH führen, handelt es sich auch bei der HHT um *loss-of-function* Mutationen (McDonald & Pyeritz, 2000). Die Rezeptoren ENG und ALK1 (kodiert auf dem *ACVRL1* Gen) bilden hierbei zusammen mit dem BMPR2 einen Rezeptorkomplex zur Signaltransduktion (Abbildung 1).

ACVRL1 ist auf dem Genlocus 12q13.13 zu finden (McDonald & Pyeritz, 2000). Das Gen kodiert den *activin A receptor-like type 1 (ALK1)* für Liganden der *TGF-β*-Superfamilie, die meist auf Endothelzellen exprimiert werden (Abdalla, Letarte, 2006). Von pathologischen Mutationen bei HHT sind Exon 8, 7 und 3 in 65% der Fälle betroffen. In 53% treten *Missense*-Mutationen auf, ansonsten sind auch Deletionen, Insertionen und *splice-site* Mutationen bekannt (Richards-Yutz, Grant, Chao, Walther, Ganguly, 2010).

Das *ENG*-Gen weist den Locus 9q34.11 auf. Es kodiert für den Co-Rezeptor Endoglin, der ebenfalls am *TGF-β*-Signalweg beteiligt ist (McDonald & Pyeritz, 2000).

Es gibt darüber hinaus noch weitere Gene, die bei HHT betroffen sein können. Diese sind der *growth differentiation factor 2 (GDF2)*, *RAS p21 protein activator 1 (RASAI)*, *Ephrin type-B receptor 4 (EPHB4)* und *SMAD4* (McDonald & Pyeritz, 2000). Alle diese Gene exprimieren Moleküle der *TGF-β*-Superfamilie oder Moleküle, die an diesem Signalweg beteiligt sind (1.4) (David et al., 2008).

1.2.3 Symptome und Diagnostik der HHT. Die Diagnose einer HHT wird gestellt, wenn drei der vier Curaçao-Kriterien vorliegen. Diese Kriterien beinhalten erstens die spontane, wiederkehrende Epistaxis, zweitens multiple Teleangiectasien an charakteristischen Lokalisationen (Lippen, Mundschleimhaut, Finger und Nase), drittens viszerale arteriovenöse Malformationen (pulmonal, zerebral, hepatisch, gastrointestinal und spinal) und viertens mindestens einen Verwandten ersten Grades mit bekannter HHT (Faughnan et al., 2011; McDonald & Pyeritz, 2000). Wichtig hierbei ist die Berücksichtigung des Alters des Patienten, da die HHT-Symptomatik eine Penetranz von

90% erst ab dem 40. Lebensjahr aufweist und daher trotz gesicherter Mutationsdiagnostik noch nicht alle Kriterien erfüllt sein können (Faughnan et al., 2011). Sobald drei oder mehr der Curaçao-Kriterien vorliegen, gilt die Diagnose HHT als gesichert. Bei zwei oder weniger kann insbesondere bei noch jungen Patienten die Diagnose HHT nicht ausgeschlossen werden (Faughnan et al., 2011; McDonald & Pyeritz, 2000). Als nächsten Schritt in der Diagnostik werden genetische Tests empfohlen, um die kausative genetische Mutation einer klinisch gesicherten HHT zu identifizieren, asymptomatische Patienten zu detektieren oder die Diagnose HHT bei nicht eindeutigen klinischen Kriterien zu festigen (Faughnan et al., 2011). Hierzu wird meist erst eine Einzel-Gen-Testung für die Gene *ENG* und *ACVRL1* durchgeführt. Sollte diese negativ ausfallen, so empfiehlt sich eine weitere Testung auf eine *SMAD4* Mutation oder eine *GDF2* Testung bei stärkerer, nicht klassischer Ausbreitung der dermalen Teleangiektasien (McDonald & Pyeritz, 2000).

Die spontan auftretende, wiederkehrende Epistaxis bildet das häufigste Symptom der HHT. 50% der Patienten weisen es bis zu ihrem 20. Lebensjahr auf, bei insgesamt 78-96% tritt es im Laufe der Erkrankung auf (Plauchu, Chadarévian, Bideau, Robert, 1989). Abgesehen von der massiven Einschränkung der Lebensqualität (Pasculli et al., 2004) führt die Epistaxis häufig zu einer Eisenmangel-Anämie (Shah, Dhingra, Shapshay, 2002).

Die klassischen Teleangiektasien der HHT treten meist nach der Epistaxis mit einer Penetranz von 30% bei unter 20-Jährigen und bei 66% vor dem Erreichen des 40. Lebensjahres auf (Berg et al., 2003). Vor allem an der Schleimhaut befindliche Teleangiektasien können leicht rupturieren. Diese Blutungen sind meist langanhaltend aufgrund der pathologischen arteriovenösen Shunts (McDonald & Pyeritz, 2000). Ebenso kann es durch gastrointestinale Teleangiektasien zu gastrointestinalen (GI) Blutungen kommen. Dies ist jedoch eher durch eine Eisenmangel-Anämie als durch akute GI-Blutungssymptomatik wahrnehmbar (McDonald & Pyeritz, 2000). Hier sollte eine Ösophagogastroduodenoskopie zur Diagnostik erfolgen. Bei bestehendem Verdacht auf GI-Blutung, aber negativer Ösophagogastroduodenoskopie, kann eine Kapselendoskopie indiziert sein (Faughnan et al., 2020).

Weiterführend gibt es verschiedene Formen der AVM, die je nach Lokalisation zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen können. Zerebrale AVM (CAVM) können mithilfe einer Magnetresonanztomographie (MRT) detektiert werden. CAVM gehören jedoch zu den seltener auftretenden AVM (Faughnan et al., 2011). Pulmonale AVM treten hingegen häufiger auf und können zu transitorischen ischämischen Attacken, embolischen Schlaganfällen und zerebralen Abszessen führen und stellen somit ein hohes

Risiko für die Patienten dar. Zudem kann eine Hypoxämie aufgrund eines relevanten Rechts-Links-*Shunts* auftreten sowie eine Hyperzirkulation (Faughnan et al., 2011; McDonald, Bayrak-Toydemir, Pyeritz, 2011). Die Untersuchungsmethode mit der höchsten Sensitivität und der kleinsten Komplikationswahrscheinlichkeit ist hier die transthorakale Kontrastmittel-Echokardiographie (Cottin et al., 2007; Faughnan et al., 2011). Des Weiteren können in seltenen Fällen hepatische AVM auftreten, die zu *High-Output* Herzversagen, portaler Hypertension und biliärer Nekrose führen können (Garcia-Tsao et al., 2000). Deswegen sollte bei jedem Patienten mit HHT ein Screening auf Leber-AVM durchgeführt werden. Als diagnostischer Test wird hierbei zunächst eine Doppler-Ultraschalluntersuchung und im weiteren Verlauf eine Computertomographie (CT) herangezogen (Faughnan et al., 2011; Faughnan et al., 2020; Vorselaars et al., 2015). Eine zusätzliche Komplikation der HHT ist die P(A)H und kann durch verschiedene Ätiologien begründet sein, beispielsweise die pulmonalvenöse PH bei Hyperzirkulation aufgrund von AVM oder PAH durch präkapillären Gefäßumbau (ausführliche Darstellung in 1.3) (Cottin et al., 2007; Faughnan et al., 2020).

1.2.4 Therapie der HHT. Aufgrund der genetischen Ätiologie der HHT ist aktuell keine kausale kurative Therapie möglich. Allerdings lassen sich die typischen Symptome wie Epistaxis und AVM symptomatisch behandeln.

Zur Therapie der Epistaxis gibt es mehrere operative und nicht-operative Möglichkeiten. Zunächst kann der Patient mittels Selbsttamponade moderate Blutungen behandeln. Des Weiteren ist eine Befeuchtung und tägliche Behandlung mit nasalen Befeuchtungsmitteln empfohlen, um endonasale Krustenbildung zu verhindern, da diese zu einer erneuten Rupturierung der nasalen Teleangiektasien führen kann. Hierfür wird vor allem topische Kochsalzlösung empfohlen (Faughnan et al., 2011; Faughnan et al., 2020; McDonald & Pyeritz, 2000). Bei Nichtansprechen auf topische Mittel wird Tranexamsäure (Antifibrinolytikum zur Blutungsprophylaxe) als wirksame orale Medikation empfohlen. Darüber hinaus kann eine Laserablation ein Mittel zur Behandlung darstellen (Boyer, Fernandes, Duran, Hunter, Goding, 2011; Faughnan et al., 2020). Bei Versagen von Befeuchtungsmitteln, Tranexamsäure und Laserablation sind systemische Angiogenese-Inhibitoren (z.B. Bevacizumab) oder eine Septodermatoplastik indiziert. Bei sehr starken Blutungen wird eine Nasenverschluss-OP empfohlen (Faughnan et al., 2020). Bei starker, rezidivierender Epistaxis kann eine Eisenersatztherapie notwendig sein (Faughnan et al., 2011; Faughnan et al., 2020; McDonald & Pyeritz, 2000).

Zur Therapie der GI-Blutung bei HHT sind orale Antifibrinolytika oder eine antiangiogenetische Therapie Mittel der Wahl (Faughnan et al., 2020). Bei starker, anhaltender GI-Blutung empfiehlt sich eine endoskopische Untersuchung, bei Bedarf mit Argon-Plasma-Koagulation. Diese sollte jedoch nur sparsam und von HHT erfahrenen Ärzten durchgeführt werden (Faughnan et al., 2011; Faughnan et al., 2020). Alle erwachsenen HHT-Patienten und alle Kinder mit Blutungs oder Anämie Symptomen werden auf Eisenmangel und Anämie getestet. Bei Vorliegen wird zunächst eine orale Eisensubstitution empfohlen. Sollte diese nicht erfolgreich sein, ist eine intravenöse Eisengabe indiziert. Ebenso kann die Gabe von Blutzelltransfusionen notwendig werden (Faughnan et al., 2020).

Trotz des erhöhten Blutungsrisikos kann es bei HHT-Patienten im Rahmen anderer Erkrankungen notwendig sein, eine prophylaktische oder eine therapeutische Antikoagulation beziehungsweise thrombozytenaggregationshemmende Therapie durchzuführen. Bei jedem Patienten ist hierfür das individuelle Blutungsrisiko entscheidend. In den HHT-Leitlinien von 2020 wird hierbei von einer dualen Plättchenhemmung oder Kombinationstherapie abgeraten (Faughnan et al., 2020).

Pulmonale AVM (PAVM) ab einem Gefäßdurchmesser von 2mm können meist erfolgreich mithilfe einer Transkatheter-Embolotherapie behandelt werden (Mager, Overtoom, Blauw, Lammers, Westermann, 2004; Pollak et al., 2006; Trerotola & Pyeritz, 2010). Patienten mit nachgewiesenen PAVM sollen eine Antibiotikaphylaxe bei Verfahren erhalten, die die Gefahr einer Bakteriämie beinhalten (Faughnan et al., 2020).

Bei hepatischen AVM (HAVM) ist eine Embolisationstherapie grundsätzlich möglich und verbessert die Symptome des High-Output Herzversagens und des mesenterialen Entzugssyndroms (Chavan et al., 2004). Jedoch kann es zu einem Rezidiv kommen und in 30% der Fälle treten zusätzliche Komplikationen auf, wie ischämische Cholangitis, ischämische Cholezystitis und hepatische Nekrosen, die zu einer Lebertransplantation oder dem Tod führen können (Chavan et al., 2004). Daher wird aufgrund der erhöhten Morbidität und Mortalität von einer Embolisation abgeraten. Sie sollte nur im Einzelfall erwogen werden (Faughnan et al., 2020). Des Weiteren kann intravenöses Bevacizumab nachweislich den kardialen *Output* und somit die Möglichkeit eines Herzversagens verringern. Deshalb wird es bei therapieresistenter *High-Output* Herzinsuffizienz bei hepatischen AVM empfohlen (Dupuis-Girod et al., 2012; Mitchell et al., 2008). Symptomatische oder komplizierte HAVMs bedürfen intensivmedizinischer Therapie. Bei therapieresistenten Patienten oder vorliegenden starken Komplikationen,

wie refraktäres *High-Output* Herzversagen, biliären Ischämien oder komplizierter portaler Hypertension, ist die Lebertransplantation Mittel der Wahl (Buscarini et al., 2011; Chavan et al., 2013; Dupuis-Girod et al., 2010; Faughnan et al., 2020; Lee, Sze, Bonham, Daugherty, 2010).

Durch das seltene Auftreten von zerebralen AVM gibt es kaum gesicherte Daten zu ihrer Behandlung. Es wird jedoch aufgrund der Daten von nicht-HHT CAVM (HawterBrugge, Willinsky, Tomlinson, 2006; Lawton et al., 2005) zu einer Behandlung mittels Embolisation, Mikrochirurgie oder stereotaktische Radiochirurgie oder einer Kombination aus allen dreien geraten (Faughnan et al., 2011; Faughnan et al., 2020; McDonald & Pyeritz, 2000).

1.3 Pulmonal-arterielle Hypertonie assoziiert mit hereditärer hämorrhagischer Teleangiektasie

Die bisher angenommene Prävalenz einer pulmonalvenösen PH bei HHT liegt bei 13%, die Prävalenz einer PAH liegt jedoch darunter (Chizinga et al., 2017). PAH bei HHT entsteht durch *Remodeling* der Gefäße und ist histologisch kaum von der präkapillären IPAH zu unterscheiden. Sie gehören daher zur PH-Gruppe I und werden behandelt wie eine HPAH (Lyle et al., 2016; Revuz et al., 2017; Vorselaars et al., 2017). Postkapilläre PH bei HHT entsteht meist assoziiert mit HAVM, die zu einem erhöhten *cardiac output* (CO) und daraus folgender *High-Output*-Herzinsuffizienz mit erhöhtem pulmonalvenösen Verschlussdruck (PAWP) führen können, und gehört somit zur PH-Gruppe II (Cottin et al., 2007; Faughnan et al., 2009). PH und PAH treten meist bei Patienten mit *ACVRL1*-Mutation auf (Abdalla et al., 2004; Girerd et al., 2010; Harrison et al., 2003; Trembath, 2001), seltener bei *ENG*-Mutation, bei der häufiger PAVM auftreten (Cottin et al., 2007). Das häufigere Auftreten von PH liegt vermutlich an der erhöhten Wahrscheinlichkeit für HAVM bei *ACVRL1*-Mutation, die zu einer erhöhten Volumenbelastung des Herzens und der Lungengefäße führen (Cottin et al., 2007). Bei postkapillärer PH durch *High-Output*-Herzinsuffizienz (z.B. bei HAVM) kann eine Salzrestriktion und Diuretika oft zu Besserung führen (Cottin et al., 2007). Bei HAVM kann eine Embolisation durchgeführt werden, sollte jedoch aufgrund der möglichen Komplikationen kritisch hinterfragt werden. Eine Lebertransplantation ist darüber hinaus eine Option (Cottin et al., 2007). HAVM konnten bereits erfolgreich mit Bevacizumab behandelt werden, was jedoch die Gefahr von GI-Blutungen bei HHT-Patienten erhöhen

könnte (Lyle et al., 2016). Des Weiteren können die PAVM, die meist bei *ENG*-Mutation vorliegen, *high-flow* und *low-resistance* PAVM ausbilden, die den pulmonalarteriellen Druck und den pulmonalen Widerstand reduzieren und damit eine eigentliche P(A)H überdecken (Trembath et al., 2001). Somit kann bei einer Vaso-Okklusion der PAVM eine PH demaskiert werden oder eine bestehende PH verschlimmert werden, weshalb bei bekannter PH von einer Vaso-Okklusion der PAVM abgesehen wird. Hierbei ist es wichtig, die PH aufgrund von AVM von der PAH durch Gefäßumbau zu unterscheiden, da beide Formen bei einer HHT auftreten können, jedoch unterschiedlicher Behandlung bedürfen (Haitjema, Berg, Overtoom, Ernst, Westermann, 1996; Remy-Jardin et al., 2006; Sapru, Hutchison, Hall, 1969).

Die Prävalenz der präkapillären PAH bei Patienten mit HHT ist wahrscheinlich höher als bisher angenommen, da eine *ACVRL1*-Mutation auch ohne klinische Zeichen einer HHT zu einer PAH-Symptomatik führen kann, diese jedoch sehr unspezifisch sein können. Die Penetranz des Gens für HHT-Symptome erfolgt erst in höherem Alter. Somit ist ein Genscreening bei IPAH-Patienten eine diagnostische Möglichkeit zur Detektion einer unerkannten HHT, da P(A)H assoziiert mit HHT eine schlechtere Prognose als bei alleiniger P(A)H aufweist (Girerd et al., 2010; Sopeña et al., 2013). Zudem sollte allgemein bei IPAH bzw. HPAH auf Anzeichen einer HHT geachtet werden, da in vier von 104 Familien, die aufgrund von idiopathischer oder familiärer PAH vorstellig wurden, eine HHT nachgewiesen werden konnte (Abdalla et al., 2004).

Bisher gibt es noch keine randomisierten, kontrollierten Studien zu einer Behandlung von P(A)H bei HHT (Lyle et al., 2016) und daher werden Patienten mit HHT und PAH nach PH-Leitlinie für PH-Patienten der Gruppe I behandelt. Aufgrund der hohen allgemeinen Blutungsgefahr bei HHT-Patienten wird von Antikoagulanzen abgeraten (Faughnan et al., 2011). Dies sollte aber individuell entschieden werden (Edwards, Shehata, Faughnan, 2012). Durch die erhöhte Blutungsneigung bei HHT sollten auch Prostazyklintherapeutika nur mit Vorsicht zum Einsatz kommen, da diese zwar positiv auf die PAH wirken, jedoch ein gesteigertes Blutungsrisiko durch Verhinderung der Thrombozytenaggregation aufweisen (Moncada et al., 1979; Kingman et al., 2017).

1.4 TGF- β -Signalweg bei *ALK1/ENG*- und *BMPR2*-Mutation

Der TGF- β -Signalweg mittels ALK1/ENG/BMPR2 ist im menschlichen Körper unter anderem für Inhibierung der Zellproliferation, Angiogenese und Apoptose

zuständig (Massagué, 2000). Mehr als 40 verschiedene Proteine gehören zur TGF- β -Superfamilie. Sie werden aufgeteilt in die Gruppen der TGF- β s (TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 bei Säugetieren), BMPs (BMP2/BMP4 Gruppe, BMP5/BMP8 Gruppe und BMP9/BMP10 Gruppe), das Zytokin *nodal growth differentiation factor* (*NODAL*) und dessen Co-Proteine, der GDFs (GDF1-GDF3, GDF5-GDF11 und GDF15) und Anti-Müllerian Hormone (González-Núñez et al., 2013).

BMPs regulieren die Transkription von Genen, die unter anderem für Osteogenese, Neurogenese und die Entwicklung des ventralen Mesoderms zuständig sind (González-Núñez et al., 2013). Hierzu binden sie an Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie. Diese Rezeptoren bilden einen heterotrimeren Komplex, bestehend aus einem Typ I Rezeptor (ALK1, ALK2, ALK3 oder ALK6) und einem Typ II Rezeptor [BMPR2, *actin-related protein 2-A bzw. -B* (ActRIIA oder ActRIIB)] (Massagué, 2008a). Im Folgenden phosphoryliert der Typ II Rezeptor den Typ I Rezeptor, aktiviert ihn dadurch und dieser phosphoryliert nun die intrazellulären Rezeptor-regulierten SMADs (r-SMAD: SMAD1, 2, 3, 5, 8 und 9), welche zur intrazellulären Signalweiterleitung dienen. Ebenso gibt es non-SMAD Signalwege über *mitogen-activated protein* (MAP)-, *phosphoinositid 3-kinase/protein kinase B* (PI3K/Akt) - und *protein kinase C* (PKC)-Signalwege (Massagué, 2008a, 2008b; Xu, Liu, Derynck, 2012). Zwei wichtige, entgegengesetzte Signalwege für die Homöostase des Endothels bilden hierbei ALK5 mittels r-SMAD SMAD2/3 Signalübertragung zur Aktivierung der Angiogenese und ALK1 durch r-SMAD SMAD1/5/8 Signalübertragung (SMAD1/5/8 bilden hetero-oligomeren Komplex mit dem Co-SMAD: SMAD4) zur Inhibierung der Angiogenese (García de Vinuesa, Abdelilah-Seyfried, Knaus, Zwijsen, Bailly, 2016; González-Núñez et al., 2013).

Sowohl bei der HPAH als auch bei HHT kommt es zu Störungen im TGF- β /ALK1/ENG/BMP2-Signalweg. Bei HPAH liegt eine Mutation im *BMPR2*-Gen, das für einen Typ II Rezeptor kodiert, vor. Dadurch kann das Signal durch die Liganden BMP2/4 und BMP9/10 nicht mehr weitergeleitet werden. Unter anderem kann die endotheliale NO-Synthase nicht phosphoryliert und damit aktiviert werden. Des Weiteren wird die Zellapoptose, das Zellwachstum und die Angiogenese gestört (García de Vinuesa, Abdelilah-Seyfried, Knaus, Zwijsen, Bailly, 2016). Es entsteht das Bild einer PAH (Gangopahyay et al., 2011). Bei HHT liegt meist eine Mutation im Gen für den Typ I Rezeptor ALK1 oder für den Co-Rezeptor ENG vor, seltenere Mutationen betreffen zum Beispiel *BMP9* und *SMAD4* (1.2.2). BMP9/10 weisen die höchste Bindungsaffinität für ALK1 auf (David, Mallet, Mazerbourg, Feige, Bailly, 2007; Scharpfenecker et al., 2007).

ALK1 bildet mit einem Typ II Rezeptor und ENG die Bindungsstelle des Rezeptors für den Liganden. ENG dient hierbei als Signalverstärker und fördert die Bindungsfähigkeit von Liganden der TGF- β -Superfamilie (Cheifetz et al., 1992; Guerrero-Esteo, Sanchez-Elsner, Letamendia, Bernabeu, 2002). Der Rezeptorkomplex aktiviert nun SMAD1/5/8 durch Phosphorylierung (Miyazawa, Shinozaki, Hara, Furuya, Miyazono, 2002). Diese r-SMADs bilden einen heteromeren Komplex mit SMAD4 und translozieren in den Zellkern, assoziieren mit DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren und regulieren dort die Genaktivität (Abbildung 1) (García de Vinuesa, Abdelilah-Seyfried, Knaus, Zwijsen, Bailly, 2016). Damit kommt es durch die Liganden BMP9/10 zur Expression verschiedener angiogenetisch wirksamer Moleküle: *inhibitor of DNA binding 1* bzw. 2 (ID1 bzw. ID2), SMAD6, SMAD7, *Interleukin-8* (IL8), *E-Selectin*, *Endothelin-1* (ET-1), *stromal cell-derived factor 1 receptor* (SDF-1-Rezeptor), *EphrinB2*, *fibroblast growth factor receptor 1* und *-2* (FGFR1 & -2), *vascular endothelial growth factor receptor 1* (VEGFR1) sowie *matrix GLA protein* (MGP). Des Weiteren wird im Sinne eines positiven *forward loop* unter anderem ENG und BMPR2 synthetisiert, um eine Sensibilisierung der Endothelzellen für andere BMPs zu erzielen (García de Vinuesa, Abdelilah-Seyfried, Knaus, Zwijsen, Bailly, 2016). Anhand dieser vaskulär verändernden Proteine bewirkt BMP9/10 mittels ALK1/BMPR2/ENG die Inhibierung der Zellproliferation und -migration. Somit resultiert aus einem Defizit des BMP9/10-ALK1-BMPR2-ENG-Signalwegs eine Reaktivierung der Angiogenese und somit eine endotheliale Hyperproliferation und -migration. Dies wird verstärkt durch die fehlende physiologische Inhibierung der VEGF-Expression durch BMP9/10 über den ALK1-Rezeptor. Daraus resultiert die Überexpression von VEGF und schließlich die Bildung von arteriovenösen Malformationen (Atri, Larrivé, Eichmann, Simons, 2013; David, Feige, Bailly, 2009; Upton, Davies, Trembath, Morrell, 2009; Yao, Zebboudj, Torres, Shao, Boström, 2007). Der phänotypische Unterschied der HHT und der HPAH resultiert daraus, dass bei der HPAH nur der BMPR2-Signalweg betroffen ist. Bei der HHT sind hingegen ebenfalls andere Signalwege betroffen, da ALK1 zudem mit anderen Typ-II-Rezeptoren außer BMPR2 Signalwege bildet. Des Weiteren ist ENG als Co-Rezeptor bei weiteren Signalwegen. Dies erklärt, warum bei einer *BMPR2*-Mutation als Leitsymptom eine PAH und bei *ALK1/ENG*-Mutation der Phänotyp einer HHT mit unterschiedlichen Symptomausprägungen auftritt.

Neben dem beschriebenen *canonical-pathway* werden noch weitere Proteine im TGF- β -Signalweg durch verschiedene *non-canonical-pathways* aktiviert, die im

Folgenden dargestellt werden. Moleküle, die hierbei betroffen sind und gleichzeitig mit PAH in Verbindung gebracht werden können, sind *extracellular-signal regulated kinases* (ERK), *c-Jun N-terminal kinase/p38 mitogen activated protein kinase* (JNK/p38 MAPK), *Rho-family GTPases* sowie PI3K/Akt und gehören zum *non-canonical-pathway* (Rol, Kurakula, Happé, Bogaard, Goumans, 2018).

Im Rahmen der Phosphorylierung der TGF- β -Rezeptoren I und II kommt es über *SHC-transforming protein A* (ShcA), *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2), *rat sarcoma* (Ras), *rapidly growing fibrosarcoma* (Raf) und *mitogen-activated protein kinase kinase 1/2* (MEK1/2) zur Aktivierung von ERK1/2 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Dies führt zu *Epithelial-zu-Mesenchymal Transition* (EMT). EMT hat einen großen Einfluss auf Zell-Zell-Kontakte sowie Migration und Apoptoseresistenz (Zhang, 2009, 2017).

Zusätzlich interagieren Liganden gebundene TGF- β -Rezeptoren mit *TNF receptor associated factor 6* (TRAF6) und *transforming growth factor- β -activated kinase 1* (TAK1), wodurch es zur Aktivierung von Kinasen wie JNK und p38 MAPK kommt. SMAD6 wirkt hierbei inhibierend, wohingegen SMAD7 die Aktivierung unterstützt. JNK und p38 MAPK phosphorylieren nun ihre jeweiligen Transkriptionsfaktoren und führen ebenso zu EMT. JNK reguliert darüber hinaus mittels r-SMAD noch die SMAD-Aktivität (Zhang 2009, 2017). Für p38 MAPK konnte eine erhöhte Konzentration bei PAH typischem vaskulärem Lungengewebe im Vergleich zu Gesundem festgestellt werden (Ogo et al., 2013).

TGF- β aktiviert den PI3K/Akt-Signalweg über eine Untereinheit von PI3K über die TGF- β -Rezeptoren. Akt vermittelt hierbei seine Wirkung über *mechanistic target of rapamycin 1* (mTOR1) und ribosomale *protein-S6-kinase beta-1* (S6K). Während der EMT unterstützt der PI3K/Akt-Signalweg den SMAD vermittelten *canonical pathway*, wirkt jedoch als Antagonist während des Wachstumsstopps und der Apoptose (Zhang, 2009, 2017).

Rho-family GTPases können SMAD abhängig und unabhängig aktiviert werden und führen bei EMT zur Aktinpolymerisation und Stressfaserformation (Rol, Kurakula, Happé, Bogaard, Goumans, 2018).

Die Beteiligung des *non-canonical* Signalweges an der Entstehung und Aufrechterhaltung der PAH bzw. HHT ist sehr wahrscheinlich. Die genauen Abläufe und Interaktionen sind bisher noch Gegenstand der Forschung. Für ERK, JNK/p38 und *Rho like GTPases* konnte bereits eine Verbindung zur Pathogenese der PAH gefunden werden

(Zhang, 2009, 2017).

Es kommt zur ERK1/2 und p38 Aktivierung bei BMPR2 Inaktivität. Überschießende ERK-Aktivierung konnte bereits in vaskulärem Lungengewebe bei PAH Erkrankten nachgewiesen werden. Zusätzlich aktiviert ET-1, welches bei PAH erhöht ist, ERK1/2 und sorgt somit für eine gesteigerte Zellproliferation und dadurch zu PAH-typischer Hyperplasie der pulmonalen Gefäße (Lambers et al., 2013; Awad et al., 2016).

Es kann somit gezeigt werden, dass durch Mutationen im Rahmen des TGF- β -Signalweges nicht nur der *canonical* Signalweg zur Entstehung einer PAH bzw. HHT führen kann, sondern ebenso der *non-canonical* Signalweg einen großen Einfluss auf Proliferation, Migration und Apoptose hat.

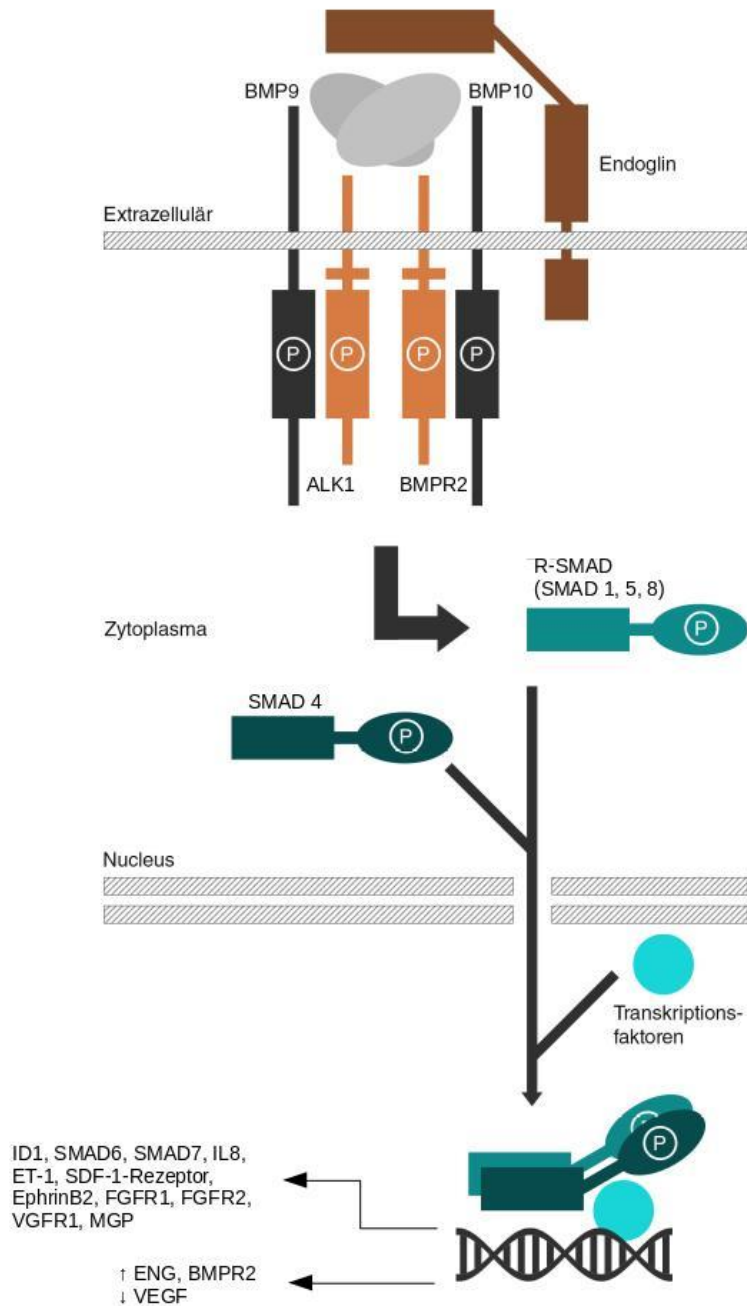


Abbildung 1. TGF-β-Signalkaskade mittels BMP9/10 über ALK1/BMPR2/ENG.

Bei Bindung von BMP9/10 an den Rezeptorkomplex aus ALK1, BMPR2 und Endoglin, phosphoryliert BMPR2 ALK1 und rekrutiert somit den Rezeptorkomplex. Endoglin dient hierbei als Bindungshilfe. ALK1 phosphoryliert daraufhin den Smad1/5/8 Komplex,

sodass dieser mit dem Co-Smad (SMAD4) einen heteromeren Komplex bildet, welcher in den *Nucleus* transferiert, mit Transkriptionsfaktoren an die DNA bindet und somit zur Genexpression von *inhibitor of DNA binding 1* bzw. 2 (ID1 bzw. ID2), *mothers against decapentaplegic homolog 6* bzw. 7 (SMAD6 bzw. SMAD7), *Interleukin-8* (IL8), *E-Selectin*, *Endothelin-1* (ET-1), *stromal cell-derived factor 1 receptor* (SDF-1-Rezeptor), *EphrinB2*, *fibroblast growth factor receptor 1 und -2* (FGFR1 & -2), *vascular endothelial growth factor receptor 1* (VGFR1) sowie *matrix GLA protein* (MGP) führt. Dies führt über eine Steigerung der ENG- und BMPR2-Expression zu einer erhöhten Sensitivität für BMP-abhängige Signalwege sowie zu einer erniedrigten Zellproliferation und -migration, unter anderem durch eine erniedrigte *vascular endothelial growth factor* (VEGF) Expression. Bei einer Störung dieses Signalweges erfolgt daher eine Reaktivierung der Angiogenese und somit eine endotheliale Hyperproliferation und -migration. BMP-9/10 = *bone morphogenetic protein-9/10*, BMPR2 = *bone morphogenetic protein receptor type 2*, ALK1 = *activin receptor-like kinase 1*, SMAD 1/4/5/8 = *mothers against decapentaplegic homolog 1/4/5/8*.

1.5 Effekt von Tacrolimus auf den BMPR2-Signalweg

1.5.1 Definition und Wirkmechanismus. Tacrolimus, auch bekannt als FK506, gehört zur Gruppe der Immunsuppressiva und wird hauptsächlich in der Therapie gegen Abstoßung eines Organtransplantates eingesetzt. Tacrolimus bildet einen Komplex mit FK506 *binding protein 12* (FKBP12). Dieser inhibiert die Calcineurinphosphatase, wodurch wiederum die *Interleukin-2* (IL2) Expression blockiert wird. Die verminderte IL2 Konzentration und die Bindung an den T-Zellrezeptor durch Tacrolimus inhibieren somit die T-Zellproliferation. Durch das Fehlen von IL2 werden indirekt auch B-Zellwachstum und die Antikörperproduktion eingeschränkt. Aufgrund der Einflussnahme über Calcineurin wird Tacrolimus innerhalb der Gruppe der Immunsuppressiva als sogenannter Calcineurininhibitor bezeichnet (Scott et al., 2003).

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Tacrolimus einen Aktivator im BMP9-ALK1-Signalweg darstellt, indem es FKBP12 bindet, welcher ein Repressor des TGF- β -Signalweges darstellt. Somit löst Tacrolimus FKBP12 von seiner Bindung mit Typ I Rezeptoren ALK1, ALK2 und ALK3 des TGF- β -Signalweges und wirkt hierüber und über die Aktivierung von SMAD1/5/8 als Aktivator der Signalweiterleitung bei dysfunktionalem BMPR2 (Spiekerkoetter et al., 2013). Somit könnte die Aktivierung der

Angiogenese, verursacht durch den dysfunktionalen ALK1/ENG/BMP2-Signalweg (wie bei HHT und HPAH), mittels Tacrolimus wieder inhibiert werden. Dies geschieht durch Wiederherstellung der physiologischen, antiangiogenetischen Funktion des ALK1/ENG/BMP2-Signalweges (1.4). So konnte gezeigt werden, dass in pulmonal-arteriellen Endothelzellen die endotheliale Dysfunktion aufgehoben werden und die *Neointima* in peripheren Pulmonalarterien wiederhergestellt wurde. Des Weiteren konnte im Tiermodell eine Inhibierung der Proliferation und eine Induzierung der Apoptose in *human pulmonary artery smooth muscle cells* (PASMC) von Monocrotalin (MCT)-PAH-induzierten Ratten gezeigt werden (Spiekerkoetter et al., 2013). In einem Fallbericht von Sommer et al. (2019) wurde ein Patient mit HHT und PAH mit *ALK1*-Mutation mit Tacrolimus behandelt. Hier konnte ein signifikanter Rückgang der HHT-Symptome, jedoch nicht der PAH-Symptomatik, gezeigt werden. VEGF-A- und TGF- β 1-Level in *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) verringerten sich im Vergleich zu Beginn der Behandlung, wohingegen Biomarker, welche spezifisch mit dem BMP2-Signaling verbunden werden (z.B. ID1), sich nicht dem Kontrollwert näherten.

1.5.2 Tacrolimusdosierung bei dysfunktionalem BMP2-Signalweg. In einer Studie von Spiekerkoetter et al. (2013) wurden verschiedene Konzentrationen Tacrolimus getestet. Als Bezugswert wurde die übliche Konzentration im Plasma zur Induktion von Immunsuppression (15ng/ml) herangezogen. So wurde *low dose* Tacrolimus definiert als 0.2ng/ml bis 2.0ng/ml im Puffer. Die Studie konnte nachweisen, dass unter dieser Konzentration eine gesteigerte ID1-Expression stattfand, zusammen mit einer Inhibierung der Proliferation und Induzierung der Apoptose von PASMC. Diese Effekte konnten teilweise auch mit höheren Dosen (definiert als *high dose*: 15ng/ml-2 μ g/ml im Puffer) erzielt werden, jedoch ohne Induktion der Apoptose.

1.5.3 Biomarker bei dysfunktionalem ALK1/ENG/BMP2-Signalweg. In der Studie von Spiekerkoetter et al. (2013) zur Identifizierung von potenziellen Medikamenten bei dysfunktionalem BMP2-Signalweg wurde unter anderem die ID1-Aktivierung als Zielparameter festgelegt. Dabei zeigte sich die Überlegenheit von Tacrolimus im Vergleich zu anderen Medikamenten bei der Stimulation des BMP4-Signalweges (exemplarisch für BMP-Signalwege). Ein weiterer peripherer Biomarker für das Ansprechen auf eine Therapie des dysfunktionalen BMP2-Signalweges könnte (eine Erniedrigung des) VEGF sein. Erhöhte Konzentrationen wurden bei dysfunktionalem

ALK1/ENG/BMP2-Signalweg, wie er bei HHT- und HPAH-Patienten auftritt, nachgewiesen (Botella, Albiñana, Ojeda-Fernandez, Recio-Poveda, Bernabéu, 2015; Ruiz et al., 2017). Zusätzlich konnte ein Ansprechen (im Sinne einer Erniedrigung) von VEGF-A und TGF- β 1, sowohl im Plasma als auch in PBMC nach Tacrolimus-Behandlung bei einem Patienten mit *ALK1*-Mutation gezeigt werden (Sommer et al., 2019).

Des Weiteren führte eine zusätzliche Stimulierung *in vitro* mit TGF- β 1 bei unterschiedlichen Mutationen je nach Defekt des Signalweges zu unterschiedlich starker und TGF- β -Freisetzung, wodurch die Ausprägung der Dysfunktionalität abgeschätzt werden könnte (Botella, Albiñana, Ojeda-Fernandez, Recio-Poveda, Bernabéu, 2015). Da TGF- β 1 vor allem den *transforming growth factor β receptor type II (T β RII)* -ALK1-Signalweg und weniger den BMP2-ALK1-Signalweg, stimuliert, können bei unterschiedlichen Mutationen die Freisetzung von TGF- β oder VEGF verschieden beeinflusst werden (García de Vinuesa, Abdelilah-Seyfried, Knaus, Zwijsen, Bailly, 2016).

Durch Wiederherstellung des BMP2-Signalweges mittels Tacrolimus kann somit ein Ansprechen mithilfe von TGF- β 1 und VEGF im Plasma bzw. in PBMC überprüft werden. Außerdem kann durch die Stimulierung mit TGF- β 1 ein eventueller Unterschied der Mutationen und die Wiederherstellung des BMP2-ALK1-Signalweges dargestellt werden.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Sowohl die HHT als auch die PAH sind lebensbedrohliche Erkrankungen, die gerade in Kombination massive Einschränkungen und Probleme bei den Betroffenen hervorrufen und für die keine kausale Therapie zur Verfügung steht. Aktuell ist unklar, welche Patienten mit HHT zusätzlich ein PAH entwickeln und warum unterschiedliche Mutationen im BMP2-Signalweg zu den unterschiedlichen Phänotypen PAH oder HHT führen.

In dieser Arbeit wurden daher Unterschiede in der Freisetzung bekannter, dem ALK1/ENG/BMP2-Signalweg nachgeschalteter Faktoren (wie VEGF und TGF- β), von PBMC untersucht. Dies erfolgte vor und nach Stimulation mit TGF- β 1 bei Patienten mit HHT, PAH mit *BMP2*-Mutation und HHT-PAH. Als möglicher therapeutischer Ansatz wird zusätzlich die Reaktion der Freisetzung dieser Faktoren nach Tacrolimus-Gabe untersucht. Außerdem wird das Plasma der unterschiedlichen Patientengruppen bezüglich

peripherer Biomarker untersucht, um mögliche Unterschiede der durch den ALK1/ENG/BMP2-Rezeptorkomplex regulierten Signalwege im Vergleich zu gesunden Probanden und zwischen HHT und (H)PAH zu identifizieren.

Die Studie wurde als explorative Machbarkeitsstudie konzipiert. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie viele Patienten der einzelnen Gruppen in einem tertiären PH-Zentrum rekrutiert werden können, und welche Unterschiede in den einzelnen Parametern (TGF- β und VEGF-Freisetzung mit und ohne Tacrolimus-Stimulation, Screening peripherer Biomarker) zu erwarten sind, um die Patientenzahlgröße für Folgestudien abschätzen zu können. Außerdem sollten in der explorativen Analyse der peripheren Biomarker Hypothesen generiert werden, die in einer Bestätigungskohorte in Zukunft überprüft werden müssen.

2 Methodik

2.1 Material

PBMC-Isolierung und Tacrolimus-Inkubierung:

EDTA Monovetten 7,5ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland,
01.1605.001

Ficoll Lösung, Sigma, Saint-Louis, USA, 17144003

SepMate-50 Gefäß, Stemcell, Vancouver, Kanada, 85450

50ml Tube, Greiner, Kremsmünster, Österreich, 227261

PBS-Lösung, ohne Magnesium- und Kalziumchlorid, gefiltert,
Sigma, Saint-Louis, USA, P04-36500

Neubauer Zählkammer, LO Laboroptik, Lanving, UK

RPMI + 5% FCS, PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland, P04-
16500, F0804

12-Well Platte, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, 83.3921

0,9% NaCl Lösung, Braun, Melsungen, Deutschland, 3570130

Tacrolimus (Prograf 5mg/ml), Astellas Pharma GmbH, München,
Deutschland, 1853147

Human TGF β 1, R & D Systems, Minneapolis, USA, 7754-BH

Brutschrank, Heraeus, Hanau, Deutschland

Eppendorf Tubes, Greiner, Kremsmünster, Deutschland,
72.690.001

ELISA:

Human TGF- β 1 DuoSet ELISA, R & D Systems, Minneapolis,
USA, DY240-05

Human VEGF DuoSet ELISA, R & D Systems, Minneapolis, USA,
DY293B-05

96-Well microplates, R & D Systems, Minneapolis, USA

PBS 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM
KH₂PO₄, pH 7.2-7.4, 0.2 μ m filtered, R & D Systems, Minneapolis,
USA

Plattenversiegler, R & D Systems, Minneapolis, USA

Waschpuffer, 0.05% Tween 20 in PBS, R & D Systems, Minneapolis, USA

Blockpuffer, 5% Tween in 20 PBS, R & D Systems, Minneapolis, USA

Verdünnungslösung, Konzentration 1, R & D Systems, Minneapolis, USA

Substratlösung, 1:1 mixture of Color Reagent A (H₂O₂) and Color Reagent B (Tetramethylbenzidine), R & D Systems, Minneapolis, USA

Stopplösung, 2 N H₂SO₄, R & D Systems, Minneapolis, USA

PEA:

96-Well Platte, Bio-Rad, Hercules, USA, HSP9601

Geräte und Software:

Prism 9, GraphPad, Boston, USA

Zentrifuge Rotina 46R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Absorptions-Mikrotiterplatten-Lesegerät ELX808, BioTek, Winooski, USA

2.2 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfasste 42 Patienten, die im Zeitraum von Juni 2018 bis April 2021 in der pneumologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Gießen in Behandlung waren und bei denen die klinische Diagnose einer HHT+PAH, HPAH mit *BMP2*-Mutation (*BMP2*-PAH), IPAH oder HHT ohne Anzeichen einer PAH gestellt wurde. Die Gruppen waren wie folgt definiert: Patienten mit Genmutationen, die mit einer PAH assoziiert sind (*BMP2*), Patienten mit Genmutationen, die mit einer HHT assoziiert sind (*ENG* oder *ACVRL1*) und Patienten mit Ausschluss einer Genmutation dieser oder anderer PAH-assoziiierter Gene (z.B. *GDF2*, *SMAD4*). Die Gruppe mit bekannter Mutation im Bereich des Gens, das für *BMP2* kodiert, bestand aus sechs Patienten. Die Gruppe mit HHT bildete sich aus neun Patienten, die aufgliedert werden konnten in zwei Patienten mit Mutation im Bereich des Gens, welches für den Co-Rezeptor *ENG* kodiert sowie zwei Patienten mit Mutationen im *ACVRL1*-Gen, welches für den *ALK1*

Rezeptor kodiert. Fünf Patienten aus dieser Gruppe erhielten keine Mutationsdiagnostik. Zwei dieser Patienten sind jedoch Verwandte 1. bzw. 2. Grades eines Probanden mit bekannter *ENG*-Mutation, weswegen eine *ENG*-Mutation sehr wahrscheinlich ist (McDonald & Pyeritz, 2000). Aus diesem Grund wurden diese Patienten der Gruppe mit *ENG*-Mutation zugeteilt. Die Gruppe mit klinischer Diagnose einer PAH und HHT bestand aus vier Patienten, von denen zwei eine Mutation im *ACVRL1*-Gen und einer eine Mutation im *ENG*-Gen aufwiesen. Ein Patient erhielt zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch keine Mutationsdiagnostik, erfüllt jedoch die Curaçao-Kriterien. Die Gruppe ohne Mutationen im Bereich HHT- oder PAH-assoziiierter Gene und klinisch diagnostizierter PAH bestand aus neun Patienten (Tabelle 2). Eine PAH wurde gemäß der jeweils zum Zeitpunkt der Diagnose geltenden WSPH-Klassifikation diagnostiziert und eine HHT gemäß der Curaçao-Kriterien. Zusätzlich wurden freiwillige, gesunde Kontrollprobanden rekrutiert. Die gesunde Kontrollgruppe bestand aus 14 Probanden, von denen keiner an bekannten PAH- oder HHT-Symptomen litt oder eine positive Familienanamnese für PAH oder HHT aufwies.

Gruppe	N	Alter	SD	%	ED-RHK	Verlaufs-RHK	Mutation
HHT+PAH	4	58	± 9.6	75	3	2	2 <i>ALK-1</i> ; 1 <i>ENG</i> ; 1 Unbekannt
BMPR2-PAH	6	50	± 6.6	67	6	3	6 <i>BMPR2</i>
IPAH	9	60	± 7.5	22	8	5	Keine
HHT	9	57	± 14.9	33	-	-	2 <i>ALK-1</i> ; 2 <i>ENG</i> ; 5 Unbekannt
Kontrollgruppe	14	43	± 17.5	64	-	-	Keine*

Tabelle 2. Patientenkollektiv.

Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie mit pulmonal-arterieller Hypertonie (HHT+PAH), *bone morphogenetic receptor 2* Mutation mit pulmonal-arterieller Hypertonie (BMPR2-PAH), idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH), hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT). % = Anteil des männlichen

Geschlechts in Prozent. RHK = Rechtsherzkatheteruntersuchung. ED-RHK = Erstdiagnose-RHK, Verlauf-RHK = RHK im Abstand von 5-8 Jahren nach ED-RHK. * = keine Mutationsdiagnostik erfolgt. *ALK1* = *activin A receptor like type 1*. *ENG* = Endoglin.

Von den Patientengruppen mit PAH erfolgte eine retrospektive Auswertung der invasiv mittels RHK bestimmten Parameter der pulmonalen Hämodynamik sowie Blutgase: der mittlere pulmonalarterielle Druck (mPAP) in mmHg, der pulmonalvenöse Verschlussdruck (pulmonary arterial wedge pressure, PAWP) in mmHg, der *cardiac index* (CI) in l/min/m², der pulmonale Gefäßwiderstand (pulmonary vascular resistance, PVR) in dyn*sec*cm⁻⁵, der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) in mmHg, die Kohlenstoffdioxidsättigung (pCO₂) in mmHg, die Sauerstoffgabe während der Untersuchung in l/min. Untersucht wurden die Gruppen HHT+PAH, BMPR2-PAH und IPAH. Aus diesen Gruppen erhielten 19 Patienten mindestens einen RHK, hiervon 17 Erstdiagnose-RHK (ED-RHK), HHT-PAH, n = 3, BMPR2-PAH, n = 6, IPAH, n = 8, (Ergebnisse in 3.1.1). Des Weiteren wurde der ED-RHK mit einem Verlaufs-RHK im Abstand von 5-8 Jahren (6.5 ± 1.2 Jahren) verglichen. Hierbei erfüllten 10 Patienten die Voraussetzungen (HHT+PAH, n = 2; BMPR2-PAH, n = 3; IPAH, n = 5). Zusätzlich wurde die Hämoglobin (Hb)-Konzentration am Tag der Blutentnahme (06/2018-04/2021) in g/dl gemessen. Für den Hb-Wert wurde zusätzlich die Gruppe HHT verglichen.

Die Blutentnahmen wurden im Universitätsklinikum Gießen vorgenommen und innerhalb einer Stunde die Plasmaprobengewinnung und die PBMC-Isolierung durchgeführt. Aus den Blutentnahmen wurden insgesamt 40 Plasmaproben von 42 Probanden isoliert (Tabelle 3). Zwei Plasmaproben von IPAH-Patienten mussten aufgrund von starker Hämolyse verworfen werden. Im Anschluss erfolgte die Isolation der PBMC und die Inkubierung dieser mit Tacrolimus in einer Dosierung von 2µg/ml, 5µg/ml und 10 µg/ml, die dem hohen Dosisbereich gemäß Spiekerkoetter et al. (2013) entsprach. Für die Tacrolimus-Gabe wurden Proben von 31 Probanden genutzt, da ein HHT+PAH Patient bereits *in vivo* Tacrolimus erhielt und von zehn weiteren Patienten/Probanden nicht genug PBMC zur Durchführung der Tacrolimusversuche gewonnen werden konnte.

Gruppe	N	Plasma- Untersuchung	PEA- Biomarker- Screening	Tacrolimus- Inkubierung der PBMC
HHT+PAH	4	4	0	2
BMPR2-PAH	6	6	6	6
IPAH	9	7	0	9
HHT	9	9	7	5
Kontrollgruppe	14	14	11	9
Gesamtanzahl	42	40	24	31

Tabelle 3. Probandenaufteilung.

Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie mit pulmonal-arterieller Hypertonie (HHT+PAH), *bone morphogenetic receptor 2* Mutation mit pulmonal-arterieller Hypertonie (BMPR2-PAH), idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH), hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT). *Peripheral blood mononuclear cell* (PBMC). Tacrolimus-Inkubierung der PBMC mit anschließender Messung der Level der Biomarker VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und TGF- β - (*transforming growth factor β*). Plasma-Untersuchung mit Messung der Level der Biomarker VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und TGF- β (*transforming growth factor β*). *Proximity extension assay* (PEA) mit Screening auf kardiovaskuläre Biomarker im Plasma. Zur Fokussierung auf Unterschiede des TGF- β -Signalweges wurde nur die Gruppe BMPR2-PAH und HHT sowie die Kontrollgruppe einem PEA-Biomarker-Screening unterzogen.

Plasmaproben von 40 Probanden wurden auf die Biomarker VEGF und TGF- β untersucht. Außerdem wurden 92 Biomarker (Anhang, Tabelle 4) im Plasma von HHT- und BMPR2-PAH-Patienten sowie der gesunden Kontrollgruppe gemessen. Aufgrund von limitierten Probenmaterial konnten diese bei insgesamt 24 Patienten untersucht werden. Die Gruppeneinteilung erfolgte in sieben HHT und sechs BMPR2-PAH Patienten sowie eine gesunde Kontrollgruppe bestehend aus 11 Probanden. Fünf Proben (zwei aus der Gruppe HHT, drei aus der gesunden Kontrollgruppe) konnten nicht mittels PEA untersucht werden, da nicht ausreichend Probenmaterial zur Verfügung stand.

Alle Patienten und Probanden wurden im Vorfeld über die Blutentnahme und die folgenden Untersuchungen der Proben aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Ein positives Votum der lokalen Ethikkommission des Fachbereichs Medizin lag zu Beginn für die Blutentnahme und die Biomarkeruntersuchung (Aktenzeichen 100-13 und 58-15) vor.

2.3 PBMC-Isolierung und Tacrolimus-Inkubierung

Die Blutentnahme erfolgte aus einer peripheren Vene und das Vollblut wurde in zwei EDTA-Blutentnahmeröhrchen à 7.5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gesammelt. Das Vollblut wurde innerhalb einer Stunde den weiteren Untersuchungen überführt.

Die PBMC wurden mit Tacrolimus in verschiedenen Dosierungen (2, 5, 10 µg/ml) behandelt. Für die Verdünnungsreihe wurden 20 µl Tacrolimus mit einer Konzentration von 5 mg/ml mit 180 µl 0.9% NaCl Lösung (Braun, Melsungen, Deutschland) vermischt, sodass eine Konzentration von 500 µg/ml entstand. Um die jeweilige Konzentration in 1ml Zellen zu erreichen, wurden für 2 µg/ml Tacrolimus-Konzentration 4 µl, für 5 µg/ml Tacrolimus-Konzentration 10 µl und für 10 µg/ml 20 µl hinzugefügt. Diese Dosierung liegt im hohen Bereich der bereits erfolgten Studie zu Tacrolimus bei PAH von Spiekerkoetter et al. (2013). Diese Gruppe bestand aus 31 Probanden: zwei PAH+HHT, sechs BMPR2-PAH, neun IPAH, fünf HHT ohne PAH und neun gesunden Teilnehmern. Die genauen Angaben der Studienpopulation sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Aus dem Vollblut wurden zunächst PBMC isoliert. Hierzu wurden 15 ml Ficoll Lösung (Sigma, Saint-Louis, USA) in ein SepMate-50 Gefäß (Stemcell, Vancouver, Kanada) gegeben, danach das Vollblut langsam aufgeschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation über 12 min bei 1200 g ohne Bremse. Im Anschluss wurden aus der Plasmaphase Proben entnommen und bei -80 °C gelagert. Der Überstand des zentrifugierten Vollblutes wurde aus dem SepMate-50 Gefäß (Stemcell, Vancouver, Kanada) in einen 50 ml Tube (Greiner, Kremsmünster, Deutschland) überführt und mit 20 ml PBS (Sigma, Saint-Louis, USA) gemischt. Dieses Gemisch zentrifugierte bei 300 g über eine Dauer von 12 min. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 20 ml PBS resuspendiert. Eine Probe von 10 µl wurde entnommen und mittels einer Neubauer Zählkammer (LO Laboroptik, Lancing, UK) ausgezählt, um die Zellanzahl zu bestimmen. Die Suspension wurde erneut bei 1200 g für 12 min zentrifugiert. Der Überstand wurde

erneut verworfen, das Pellet mit RPMI +5% FCS (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) gemischt, sodass pro Milliliter Lösung 2.5 Millionen Zellen enthalten waren. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 12-Well Platte (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert. Hierbei wurden sechs Wells der 12-Well Platte jeweils mit 1 ml à 2.5 Millionen Zellen von einem Patienten gefüllt. Zuerst wurde dem Kontroll Well 0.1 ml 0.9% NaCl Lösung (Braun, Melsungen, Deutschland) hinzugefügt. Danach wurden vier Wells mit steigenden Dosen Tacrolimus (Astellas Pharma GmbH, München, Deutschland), welches mit 0.9% NaCl titriert worden war, hinzugegeben, um die entsprechenden Konzentrationen zu erreichen. Im sechsten Well wurde der Zellsuspension TGF- β 1 (R & D Systems, Minneapolis, USA) mit einer Konzentration von 10 ng/ml hinzugefügt. Die Well Platte wurde im Anschluss für 2 h auf einen Rüttler im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37 °C und 5.0% CO₂ inkubiert. Nach 2 h wurde das Lysat der Wells in Eppendorf Tubes (Greiner, Kremsmünster, Deutschland) überführt und bei 1200 RPM für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bei -80 °C für die folgenden ELISAs (*enzyme-linked immuno sorbent assay*) eingefroren. Das Pellet wurde separat bei -80 °C für DNA-Untersuchungen eingefroren.

2.4 ELISA

Zur quantitativen Bestimmung von humanem TGF- β 1 und humanem VEGF wurde mit den aus der PBMC-Isolierung gewonnenen Plasmaproben (2.3) ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Es wurden DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) zum Nachweis von humanem TGF- β 1 und humanem VEGF genutzt und nach den Angaben des Herstellers verwendet. Alle Materialien, die zur Durchführung benötigt, aber nicht beigelegt waren, wurden ebenfalls von der Firma R & D Systems, Minneapolis, USA verwendet.

Hierbei wurden die Wells mit jeweils 100 μ l Plasmaproben befüllt und mit einem entsprechenden Maus anti-humanem TGF- β 1- bzw. Maus anti-humanem VEGF-Fängerantikörper bestückt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Wells mit 0.05% Tween 20 in PBS Waschpuffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Die Platte wurde nun mit 5% Tween 20 in PBS geblockt, um damit unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Die Wells wurden erneut mit 0.05% Tween 20 in PBS gewaschen. Anschließend wurde die Well-Platte mit dem Probenmaterial 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Wells wurden erneut gewaschen.

Daraufhin wurde der biotinylierte Huhn anti-humanem TGF- β 1- bzw. biotinylierte Huhn anti-humanem VEGF-Detektionsantikörper hinzugegeben und erneut bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Nach dem Waschen wurde Streptavidin-HRP (*horseradish-peroxidase*) in die Wells gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ab diesem Schritt wurde die Well Platte keinem direkten Licht mehr ausgesetzt. Die Proben wurden gewaschen und mit Substratlösung für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. 1 M H₂SO₄ Lösung wurde hinzugegeben, um den Farbumschlag zu stoppen. Die Wells konnten anschließend bei 450 nm mittels Absorbtiions-Mikrotiterplatten-Lesegerät ELX808 (BioTek, Winooski, USA) ausgewertet werden. Die TGF- β 1- bzw. VEGF-Level wurden mittels Interpolierung aus Vier-Parameter Logistik (4-PL) Standardkurven ermittelt.

2.5 Proximity Extension Assay

Der *Multiplex-Immunoassay* (Olink Proteomics, Uppsala, Schweden) wurde verwendet, um die entsprechenden Biomarker zu detektieren. Die Vorbereitung der Proben wurde nach den Angaben des Herstellers ausgeführt und zur Durchführung des Assays eingesendet.

Verwendet wurde das Olink Target 96 Cardiovascular II Panel. Hierzu wurden die Plasmaproben aus der PBMC-Isolierung (2.3) genutzt. 60 μ l der jeweiligen Plasmaprobe wurden in eine 96-Well-Platte (Bio-Rad, Hercules, USA) pipettiert und die Platte zur Analyse an die Firma Olink verschickt.

Das Olink-Assay beruht auf dem Prinzip des *Proximity Extension Assay*. Diese Art von *Immunoassay* nutzt Antikörperpaare, die mit DNA-Oligonukleotiden versehen sind. Die Antikörper binden das Zielprotein. Sobald sich passende DNA-Oligonukleotide in der Nähe zueinander befinden, hybridisieren diese und werden mit Hilfe einer DNA-Polymerase verlängert. Diese DNA-Stränge sind spezifisch für das Zielprotein und werden mittels *microfluidic qPCR* quantifiziert. Ergebnisse werden in *Normalized Protein eXpression* (NPX) aufgeführt, welche in einer log₂ Skalierung angegeben werden. Hierbei entspricht ein hoher NPX-Wert einer hohen Proteinkonzentration. Die Daten sind eine relative Quantifizierung, das heißt sie können innerhalb derselben Probe miteinander verglichen werden, jedoch nicht mit anderen PEA ohne Referenzproben.

Eine Übersicht der 92 Biomarker befindet sich im Anhang (Tabelle 4). Biomarker des Cardiovascular II Panels, die in der Ätiologie der PAH eine Rolle spielen, sind:

A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13 (ADAM-TS13), das an der CTEPH Pathogenese beteiligt ist und sowohl bei PAH als auch bei CTEPH im Vergleich zu gesunden Kontrollen als erniedrigt nachgewiesen werden konnte (Newnham, 2019; Panzenboeck & Sadushi-Kolici, 2018). *Angiopoietin-1* (ANGPT1) und *Angiopoietin-1 receptor* (TIE2) sind in ihrer Beteiligung umstritten. Mehrere Studien zeigen die Beteiligung des ANGPT1/TIE2 Signalwegs an der Entstehung einer PAH. In einer Studie konnte eine Erhöhung von TIE2 bei IPAH nachgewiesen werden (Dewachter et al., 2006), wohingegen in einer anderen Studie bei TIE2 Haploinsuffizienz eine Anfälligkeit für PAH gezeigt werden konnte (Kugathasan et al., 2009). Für *Fibroblast growth factor 21* (FGF-21) konnte eine signifikante Erhöhung von FGF-21 im Lungengewebe von Patienten mit IPAH im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden werden (Chen et al., 2018; Papathanasiou et al., 2021). Für *Fibroblast growth factor 23* (FGF-23) konnte, ebenso wie für FGF-21, eine erhöhte Plasmakonzentration nachgewiesen und eine negative Korrelation zwischen der Schwere und Prognose der vorhandenen PAH mit der FGF-23 Konzentration im Blut gezeigt werden (Bouzina et al., 2019). Für GDF2 konnte eine Beteiligung am TGF- β -Signalweg festgestellt werden (McDonald & Pyritz, 2000). Für *heat shock 27 kDa protein* (HSP27), beziehungsweise den beteiligten Signalweg, konnte bei Aktivierung eine erhöhte vaskuläre Permeabilität, perivaskuläre Ödeme und erhöhte Immunzellinfiltration im Frühstadium der PH nachgewiesen werden (Rafikova et al., 2018). *Heme oxygenase 1* (HO-1) konnte eine protektive Wirkung auf pulmonale und systemische Gefäße vor allem, aber nicht ausschließlich, in Verbindung mit Rifampycin nachgewiesen werden (Zhou et al., 2006). Es konnte festgestellt werden, dass *Interleukin 1* (IL1) eine wichtige Rolle in der Pathogenese der PAH zu spielen scheint und somit IL-1ra als Antagonist wahrscheinlich eine protektive Wirkung für die Entwicklung einer PAH aufweist (Lawrie et al., 2011). *Interleukin 17D* (IL-17D) schien über die gesteigerte *Interleukin 6* (IL6) Produktion eine Rolle in der Pathophysiologie der PAH zu spielen (Arvidsson et al., 2021). Es konnte eine *Interleukin* (IL18) Erhöhung bei PAH Gruppe 1 im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Ross et al., 2012). IL6 Werte waren im Plasma von PAH Patienten erhöht (Hashimoto-Kataoka et al., 2015). Eine erhöhte *Lectin-like oxidized LDL receptor 1* (LOX-1) -Expression mit PAH-spezifischem *Remodeling* konnte in PSMC beobachtet werden (Zhang et al., 2018). Matrixmetalloproteinasen (MMP) schienen eine Rolle bei der Entwicklung oder Aufrechterhaltung einer PAH zu spielen, da beispielsweise MMP-7 und -12 bei PAH im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe

signifikant erhöht waren (Arvidsson et al., 2019). Es konnte eine signifikante Reduktion von *P-selectin glycoprotein ligand 1* (PSGL-1) in Plasmazellen von Patienten mit IPAH im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden (González-Tajuelo et al., 2020). Des Weiteren konnte eine signifikante Erhöhung von *Pentraxin-related protein PTX3* (PTX3) bei Patienten mit PAH im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe dargestellt werden (Tamura et al., 2012). In einer Studie zeigte sich, dass unter anderem signifikant mehr *platelet-derived growth factor subunit B* (PDGFB) in Gewebe von kleinen pulmonal-arteriellen Gefäßen bei Patienten mit IPAH im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe gebildet wurde (Perros et al., 2008; Schermuly et al., 2005). Eine *Poly [ADP-ribose] polymerase 1* (PARP-1) Überexpression konnte in PASMC im Vergleich zu gesunden Zellen nachgewiesen werden (Meloche et al., 2014). *Prolargin* (PRELP) konnte als Biomarker für PAH identifiziert werden (Arvidsson et al., 2021). Eine erhöhte *protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2* (TGM2) Aktivität konnte in Tierversuchen bei der Pathogenese von Hypoxie-induzierter PAH nachgewiesen werden (DiRaimondo et al., 2014). Es zeigte sich, dass Thrombin mittels *proteinase-activated receptor 1* (PAR-1) eine bleibende Vasokonstriktion herbeiführte und so zur Pathophysiologie der PAH beitrug (Maki et al., 2010). Eine medikamentöse Inhibierung des *proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src* (SRC)/*signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) Signalwegs konnte *in vitro* teilweise eine vorliegende PAH umkehren (Paulin et al., 2011). Des Weiteren konnte für *receptor for advanced glycosylation end products* (RAGE) sowohl im *in vivo* PAH-Tiermodell als auch *in vitro* eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu gesunden Kontrollen dargestellt werden (Meloche et al., 2013). Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) schien ebenfalls bei der PAH aktiviert zu sein. Es waren Serumwerte von Renin (REN) und Angiotensin I im Vergleich zur Normalbevölkerung deutlich erhöht (Maron & Leopold, 2014). *Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial* (SOD2) könnte bei der Anfälligkeit für PAH beteiligt sein, da PAH Patienten einen signifikanten Unterschied eines bestimmten Polymorphismus des Gens für SOD2 im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe aufwiesen (Xu et al., 2017). Die *Thrombomodulin* (TM)-Konzentration im Plasma war bei PAH Patienten signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe (Sakamaki, et al., 2000). *Thrombopoietin* (THPO) konnte als signifikant erhöht bei Patienten mit PAH im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden (Haznedaroğlu et al., 2002). Für *Thrombospondin-2* (THBS2) konnte bei MCT-induzierter PH im Tiermodell eine Hochregulation für THBS2 über das Doppelte des Wertes der Kontrollgruppe gezeigt

werden (Franz et al., 2016). Ebenso wurde für *tissue factor* (TF) sowohl im Tierversuch als auch am Menschen eine erhöhte Expression von TF in Gefäßen, die morphologisch stark von der PAH betroffen waren, nachgewiesen werden (White et al., 2007). Es wurde bereits gezeigt, dass *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2* (TRAIL-R2) Serumwerte bei Patienten mit PAH gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht waren (Hameed et al., 2012; Liu et al., 2015). VEGF-A war in allen PAH Gruppen im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant unterschiedlich, wohingegen sich VEGF-D nur in der PAH Gruppe mit Linksherzerkrankung von den anderen PAH Patienten und gesunden Kontrollen unterschied (Säleby et al., 2017).

2.6 Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SD (*standard deviation*) angegeben. Das Programm GraphPad Prism 9.5 (GraphPad Software, Boston, USA) wurde verwendet und die Daten mittels *two-way ANOVA* (*analysis of variance*), *one-way ANOVA* und *t*-Test analysiert. Die Graphen wurden ebenfalls mit GraphPadPrism angefertigt. Hierfür wurden für die Tacrolimus-Auswertung Graphen aus Mittelwertdarstellungen und für die restlichen Auswertungen Graphen aus Einzelwertdarstellungen verwendet. Die Normalverteilung wurde mittels *Q-Plot* getestet und bei nicht normalverteilten Werten (Plasmabiomarker) eine log-Transformation vorgenommen. Ergebnisse, die das Signifikanzniveau von $p < 0.05$ erreichten, wurden entsprechend in den Graphen gekennzeichnet. Ein *p*-Wert von < 0.05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der PAH in den unterschiedlichen Patientengruppen

3.1.1 Invasive hämodynamische Messungen mittels Rechtsherzkatheter. Zum Vergleich des hämodynamischen Status der Patientengruppen wurden RHK-Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung des jeweiligen Patienten analysiert: Eine RHK-Messung zur Erstdiagnose (ED-RHK) und eine RHK-Messung 5-8 Jahre nach Erstdiagnose (Verlaufs-RHK). Des Weiteren wurden Blut-Gas-Analyse (BGA)-Werte während der RHK und Laborwerte (Hb) bei Blutentnahme miteinander verglichen.

Für den ED-RHK unterschied sich der mPAP nicht signifikant in den Gruppen (Abbildung 2a, HHT+PAH: 42.7 ± 8.1 mmHg, BMPR2-PAH: 53.3 ± 12.6 mmHg, IPAHA: 54.9 ± 8.9 mmHg, $p = 0.2371$). Der PAWP des ED-RHK unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zwischen den Gruppen (Abbildung 2b, HHT+PAH: 10.3 ± 5.0 mmHg, BMPR2-PAH: 7.0 ± 3.3 mmHg, IPAHA: 8.9 ± 3.9 mmHg, $p = 0.4585$). Des Weiteren unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant im ED-RHK für den CI (Abbildung 2c, HHT+PAH: 2.75 ± 0.76 l/min/m², BMPR2-PAH: 2.22 ± 0.56 l/min/m², IPAHA: 2.34 ± 0.49 l/min/m², $p = 0.4219$). Der PVR unterschied sich ebenfalls nicht signifikant in den Gruppen für den ED-RHK (Abbildung 2d, HHT+PAH: 479 ± 250 dyn*sec*cm⁻⁵, BMPR2-PAH: 1047 ± 261 dyn*sec*cm⁻⁵, IPAHA: 1021 ± 603 dyn*sec*cm⁻⁵, $p = 0.2070$). Für den pO₂ und pCO₂ ist die Gruppe HHT+PAH für den ED-RHK statistisch nicht auswertbar, da die Gruppen HHT+PAH für diese Werte n = 2 aufwiesen. Für den ED-RHK unterschieden sich die Gruppen BMPR2-PAH und IPAHA für den pO₂ nicht signifikant (BMPR2-PAH: 85.17 ± 12.74 mmHg, IPAHA: 72.00 ± 9.50 mmHg, $p = 0.1427$). Der pCO₂ unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zwischen der Gruppe BMPR2-PAH und IPAHA für den ED-RHK (BMPR2-PAH: 30.07 ± 4.52 mmHg, IPAHA: 32.10 ± 2.61 mmHg, $p = 0.4406$).

Der Hb zum Blutentnahmezeitpunkt unterschied sich in den Gruppen nicht signifikant (HHT+PAH: Hb 10.9 ± 2.9 g/dl, BMPR2-PAH: Hb 14.3 ± 2.0 g/dl, IPAHA: Hb 12.5 ± 3.1 g/dl, HHT: Hb 12.5 ± 3.0 g/dl, $p = 0.1379$).

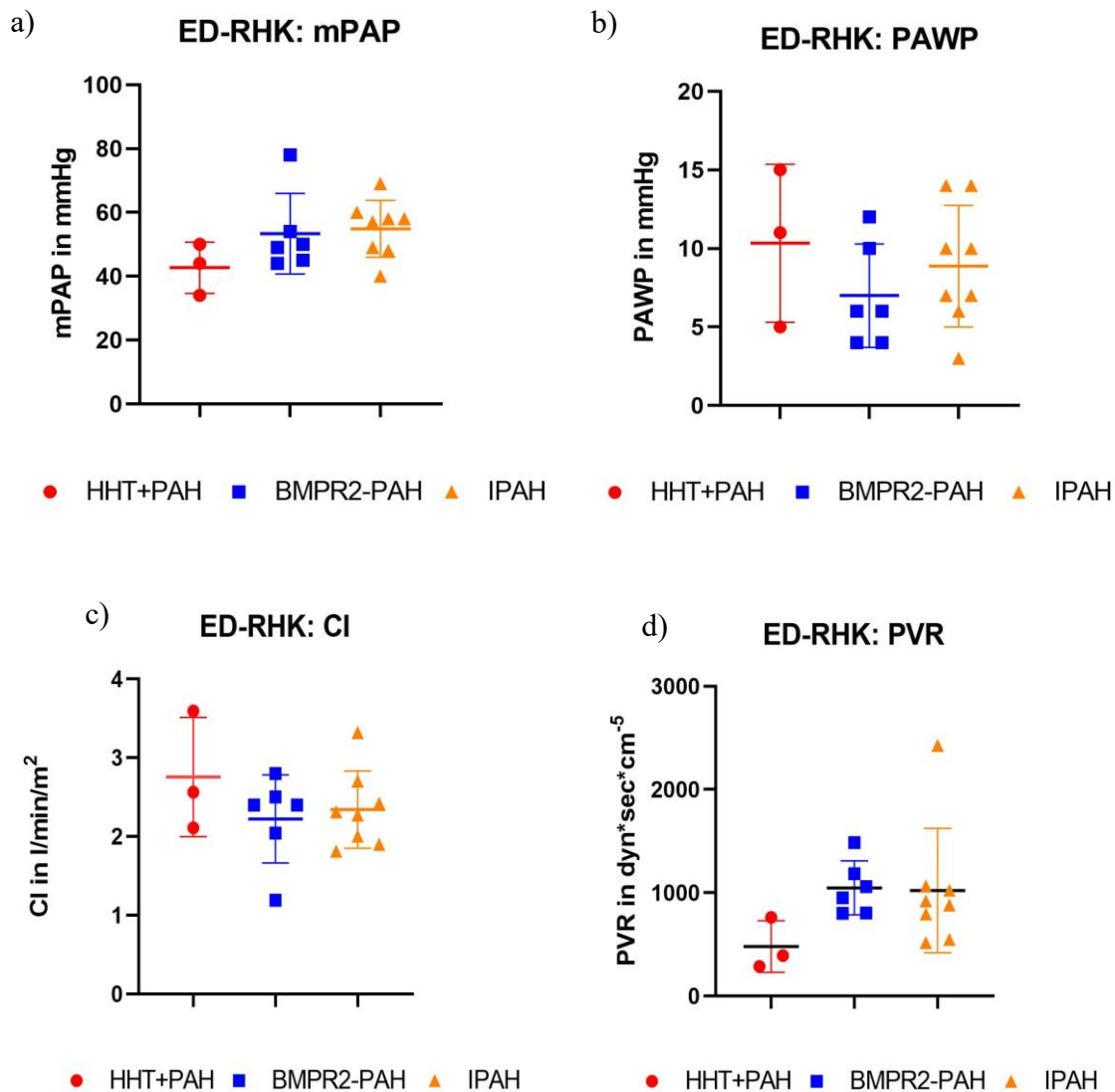


Abbildung 2 a) – d). Vergleich der ED-RHK für HHT+PAH, BMPR2-PAH und IPAH. Rechtsherzkatheter bei Erstdiagnose (ED-RHK), a) mittlerer pulmonal-arterieller Druck (mPAP), b) pulmonalvenöser Verschlussdruck (PAWP), c) *cardiac index* (CI), d) pulmonaler Gefäßwiderstand (PVR), hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie mit pulmonal-arterieller Hypertonie (HHT+PAH, n = 3), *bone-morphogenetic-receptor-2* Mutation mit pulmonal-arterieller Hypertonie (BMPR2-PAH, n = 6), idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH, n = 8). Die jeweiligen Messungen in den Gruppen unterschieden sich statistisch nicht signifikant. Statistischer Test: *one-way ANOVA* mit *Tukey post-hoc* Test.

Der Vergleich des ED-RHK und des Verlaufs-RHK sind in der Gruppe PAH+HHT statistisch nicht auswertbar, da die n-Zahl in dieser Gruppe nur n = 2 betrug. In der Gruppe

BMPR2-PAH zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem ED-RHK und dem Verlaufs-RHK (ED-RHK: mPAP: 47.7 ± 3.2 mmHg, Verlaufs-RHK: mPAP: 48.7 ± 9.1 mmHg, $p = 0.8727$; ED-RHK: PAWP: 4.7 ± 1.2 mmHg, Verlaufs-RHK: PAWP: 5.0 ± 2.6 mmHg, $p = 0.8845$; ED-RHK: CI: 2.28 ± 0.21 l/min/m², Verlaufs-RHK CI: 2.76 ± 0.62 l/min/m², $p = 0.4030$; ED-RHK: PVR: 887 ± 148 dyn*sec*cm⁻⁵, Verlaufs-RHK: PVR: 788 ± 185 dyn*sec*cm⁻⁵, $p = 0.6515$; ED-RHK: pO₂: 85.17 ± 12.74 mmHg, Verlaufs-RHK: pO₂: 77.73 ± 15.78 mmHg, $p = 0.4340$; ED-RHK: pCO₂: 30.07 ± 4.52 mmHg, Verlaufs-RHK: pCO₂: 33.20 ± 3.47 mmHg, $p = 0.1620$).

Die Unterschiede zwischen dem ED-RHK und Verlaufs-RHK waren in der Gruppe IPAH ebenfalls nicht signifikant (ED-RHK: mPAP: 54.6 ± 10.8 mmHg, Verlaufs-RHK: mPAP: 42.8 ± 7.0 mmHg, $p = 0.0738$; ED-RHK: PAWP: 7.2 ± 3.0 mmHg, Verlaufs-RHK: PAWP: 8.0 ± 6.8 mmHg, $p = 0.8303$; ED-RHK: CI: 2.45 ± 0.60 l/min/m², Verlaufs-RHK: CI: 3.16 ± 0.60 l/min/m², $p = 0.0677$; ED-RHK: PVR: 1087 ± 782 dyn*sec*cm⁻⁵, Verlaufs-RHK: PVR: 484 ± 145 dyn*sec*cm⁻⁵, $p = 0.1344$; ED-RHK: pO₂: 72.00 ± 9.50 mmHg, Verlaufs-RHK: pO₂: 73.28 ± 5.41 mmHg, $p = 0.8497$; ED-RHK: pCO₂: 32.10 ± 2.61 mmHg, Verlaufs-RHK: pCO₂: 34.22 ± 3.09 mmHg, $p = 0.3737$).

Zusätzlich wurde mittels *two-way ANOVA* ermittelt, ob es eine signifikante Interaktion zwischen den Gruppen (BMPR2-PAH und IPAH) und der Zeit (Abstand von 5-8 Jahren zwischen ED-RHK und Verlaufs-RHK) gab. Es konnten keine signifikanten Unterschiede für mPAP (Haupteffekt [Patientengruppe]: $p = 0.9765$; Haupteffekt [Zeit]: $p = 0.1802$; Interaktion [Patientengruppe/Zeit]: $p = 0.1495$), PAWP (Haupteffekt [Patientengruppe]: $p = 0.2338$; Haupteffekt [Zeit]: $p = 0.9600$; Interaktion [Patientengruppe/Zeit]: $p = 0.9600$), CI (Haupteffekt [Patientengruppe]: $p = 0.4257$; Haupteffekt [Zeit]: $p = 0.0743$; Interaktion [Patientengruppe/Zeit]: $p = 0.6796$), pO₂ (Haupteffekt [Patientengruppe]: $p = 0.1872$; Haupteffekt [Zeit]: $p = 0.6008$; Interaktion [Patientengruppe/Zeit]: $p = 0.4168$) und pCO₂ (Haupteffekt [Patientengruppe]: $p = 0.4319$; Haupteffekt [Zeit]: $p = 0.1236$; Interaktion [Patientengruppe/Zeit]: $p = 0.6804$) nachgewiesen werden. Es konnte jedoch für den PVR ein signifikanter Unterschied für die Gruppe IPAH gezeigt werden (Haupteffekt [Patientengruppe]: $p = 0.4090$; Haupteffekt [Zeit]: $p = 0.0474$; Interaktion [Patientengruppe/Zeit]: $p = 0.1430$, Abbildung 3).

Verläufe PVR

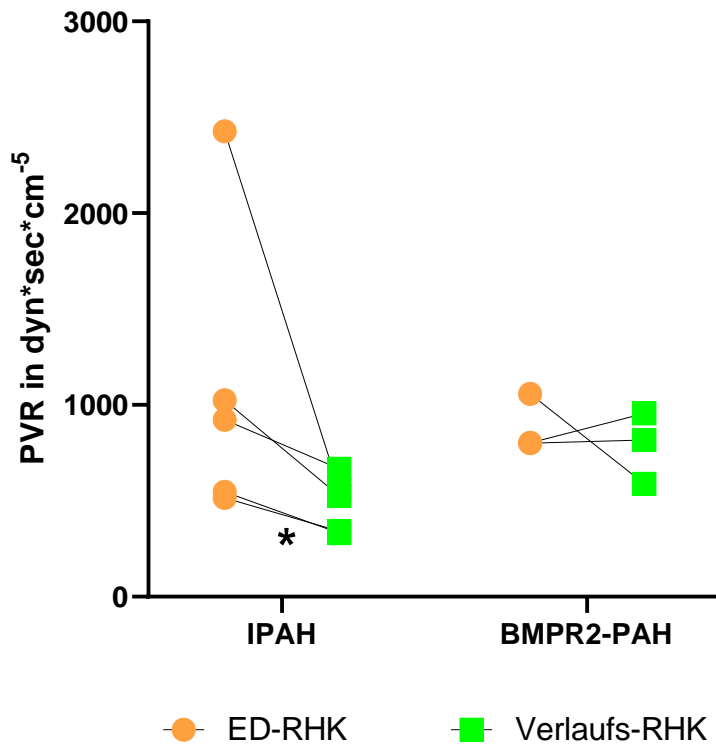


Abbildung 3. Vergleich des PVR des ED-RHK und des Verlaufs-RHK für BMPR2-PAH und IPAH.

Pulmonaler Gefäßwiderstand (PVR), Erstdiagnose (ED), Rechtsherzkatheter (RHK), Idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH, $n = 5$), *bone-morphogenetic-receptor-2* Mutation mit pulmonal-arterieller Hypertonie (BMPR2-PAH, $n = 3$). Es wurde der Verlauf über 5-8 Jahre des PVR für die Gruppen BMPR2-PAH und IPAH miteinander verglichen. Haupteffekt (Patientengruppe): $p = 0.4090$; Haupteffekt (Zeit): $p = 0.0474$; Interaktion (Patientengruppe/Zeit): $p = 0.1430$; * ($p = 0.0286$), Vergleich von ED-RHK zu Verlaufs-RHK; Statistischer Test: *two-way ANOVA* mit Šidák *post-hoc* Test.

Zum Vergleich des hämodynamischen Status der Patientengruppen wurden RHK-Messungen miteinander verglichen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den Gruppen für den ED-RHK. Der Unterschied wurde ebenfalls nicht signifikant in den Gruppen für ED-RHK und Verlaufs-RHK und innerhalb der Gruppen zwischen ED-RHK und Verlaufs-RHK. Es konnte jedoch für die Gruppe IPAH gezeigt werden, dass es einen signifikanten Unterschied für den PVR zwischen dem ED-RHK und dem Verlaufs-RHK gibt.

3.1.2 Therapeutika zur Behandlung der PAH. Von den 19 Patienten, die wegen PAH behandelt wurden, erhielten 16 einen PDE-5-Hemmer (13 Sildenafil, drei Tadalafil), drei einen Stimulator der löslichen Guanylatcyclase (Riociguat), 15 einen Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (zwei Ambrisentan, neun Macitentan und vier Bosentan), 14 ein Prostazyklin-Analogon (sechs Treprostinil und acht Iloprost), vier einen Kalziumkanal-Inhibitor (zwei Amlodipin und einmal Diltiazem) und drei einen Prostazyklin-Rezeptor-Agonisten (Selexipag). Ein HHT+PAH Patient erhielt bereits vor Beginn der Studie *off-label* Tacrolimus (Calcineurin-Inhibitor) (Tabelle 5). Es wurde bei 13 Patienten eine Pharmakotherapie mit mindestens Dreifachkombination durchgeführt, bei vier Patienten eine duale Therapie und bei zwei Patienten eine Monotherapie.

	<i>N</i>	<i>PDE-5</i>	<i>sGC</i>	<i>ERA</i>	<i>Ca²⁺</i>	<i>IP</i>	<i>PGI2</i>
HHT+PAH	4*	4	-	3	-	-	3
BMPR2-PAH	6	5	1	6	-	2	4
IPAH	9	7	2	6	3	1	3

Tabelle 5. Medikamente zur Behandlung der PAH.

PDE-5 = Phosphodiesterase-5-Hemmer. sGC = Stimulator der löslichen Guanylatcyclase. ERA = Endothelin-Rezeptor-Antagonist. Ca²⁺ = Kalziumkanal-Inhibitor. IP = Prostazyklin-Rezeptor-Agonist. PGI2 = Prostazyklin-Analogon. * = ein Patient erhielt bereits vor Beginn der Studie *off-label* Tacrolimus (Calcineurin-Inhibitor).

3.2 PBMC-Untersuchungen

3.2.1 TGF- β - und VEGF-Level bei stimulierten und unstimulierten PBMC.

Im Rahmen der PBMC-Untersuchungen wurde die Freisetzung von VEGF und TGF- β aus unstimulierten und mit TGF- β 1 stimulierten Zellen bestimmt, um Unterschiede in den nachgeschalteten Signalwegen des ALK1/ENG/BMP2-Signalweges in den unterschiedlichen Patientengruppen zu untersuchen. Da TGF- β 1 vor allem den T β RII-ALK1-Signalweg und weniger den BMP2-ALK1-Signalweg beeinflusst, wurde hypothesiert, dass bei Patienten mit *ALK1*-Mutation ein geringerer Effekt auf die Freisetzung nachgeschalteter Proteine (VEGF und TGF- β) im Vergleich zu Patienten mit oder ohne *BMP2*-Mutation beobachtet werden kann.

Die Freisetzung von TGF- β unterschied sich vor und nach Stimulation signifikant ($p < 0.0001$), allerdings konnte im *post-hoc* Test kein Unterschied zwischen einzelnen Gruppen detektiert werden (HHT+PAH: TGF- β basal 2627 ± 1156 pg/ml, TGF- β stimuliert 5142 ± 867 pg/ml, BMPR2-PAH: basal 4165 ± 1506 pg/ml, TGF- β stimuliert 6849 ± 1924 pg/ml, IPAH: TGF- β basal 5048 ± 2266 pg/ml, TGF- β stimuliert 8274 ± 3860 pg/ml, HHT: TGF- β basal 4048 ± 1636 pg/ml, TGF- β stimuliert 7077 ± 2612 pg/ml, Kontrollgruppe: TGF- β basal 3857 ± 2284 pg/ml, TGF- β stimuliert 7313 ± 2861 pg/ml, Abbildung 4).

Der Freisetzung von VEGF unterschied sich ebenfalls vor und nach Stimulation signifikant ($p = 0.0321$), allerdings konnte im *post-hoc* Test kein Unterschied zwischen einzelnen Gruppen detektiert werden (HHT+PAH: VEGF basal 46.63 ± 30.82 pg/ml, VEGF stimuliert 42.67 ± 30.52 pg/ml, BMPR2-PAH: VEGF basal 22.47 ± 22.47 pg/ml, VEGF stimuliert 34.87 ± 35.76 pg/ml, IPAH: VEGF basal 21.44 ± 14.96 pg/ml, VEGF stimuliert 27.04 ± 19.58 pg/ml, HHT: VEGF basal 16.94 ± 11.78 pg/ml, VEGF stimuliert 32.62 ± 22.06 pg/ml, Kontrollgruppe: VEGF basal 10.83 ± 9.26 pg/ml, VEGF stimuliert 12.23 ± 7.86 pg/ml, Abbildung 5).

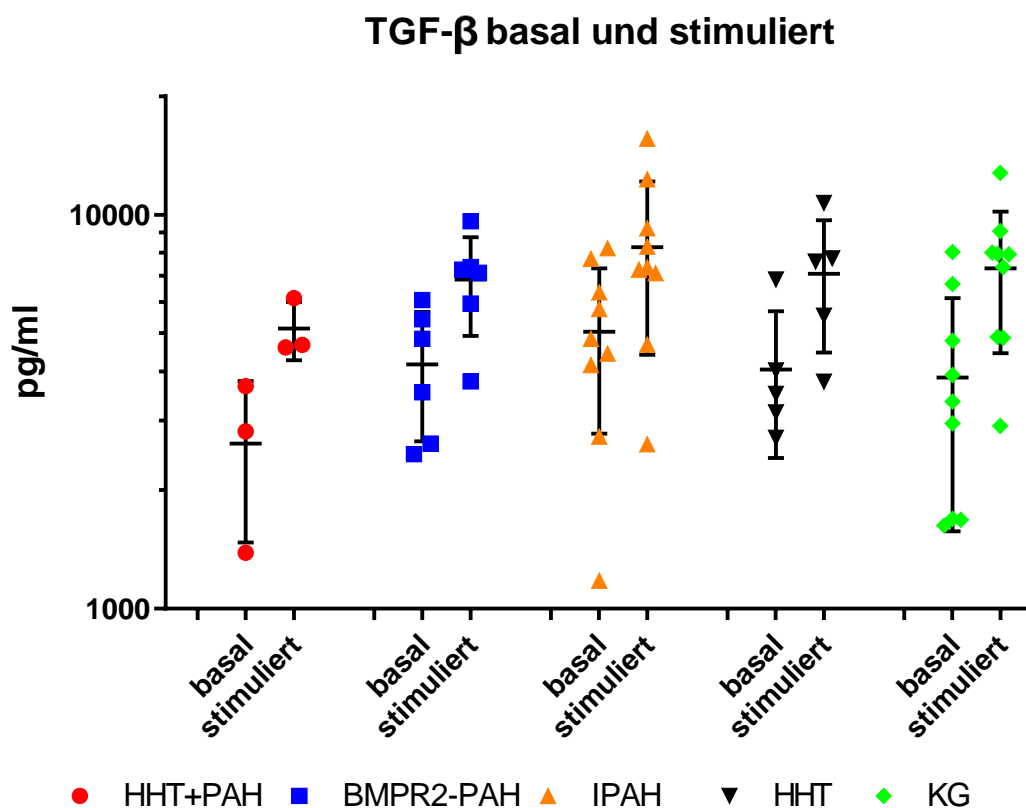


Abbildung 4. TGF- β -Level bei unstimulierten und stimulierten PBMC.

Transforming growth factor β (TGF- β), hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie mit

pulmonal-arterieller Hypertonie (HHT+PAH, n = 3), *bone morphogenetic receptor 2* Mutation mit pulmonal-arterieller Hypertonie (BMPR2-PAH, n = 6), idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH, n = 9), hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT, n = 5), Kontrollgruppe (KG, n = 9). Es wurde die TGF- β -Freisetzung von PBMC unter basalen Bedingungen (basal) und nach Stimulation mit TGF- β 1 (stimuliert) bestimmt. Haupteffekt (Behandlung): $p < 0.0001$, Haupteffekt (Patientengruppe): $p = 0.6103$, Interaktion (Behandlung/Patientengruppe) $p = 0.4248$; Statistischer Test: *two-way ANOVA* mit Tukey *post-hoc* Test.

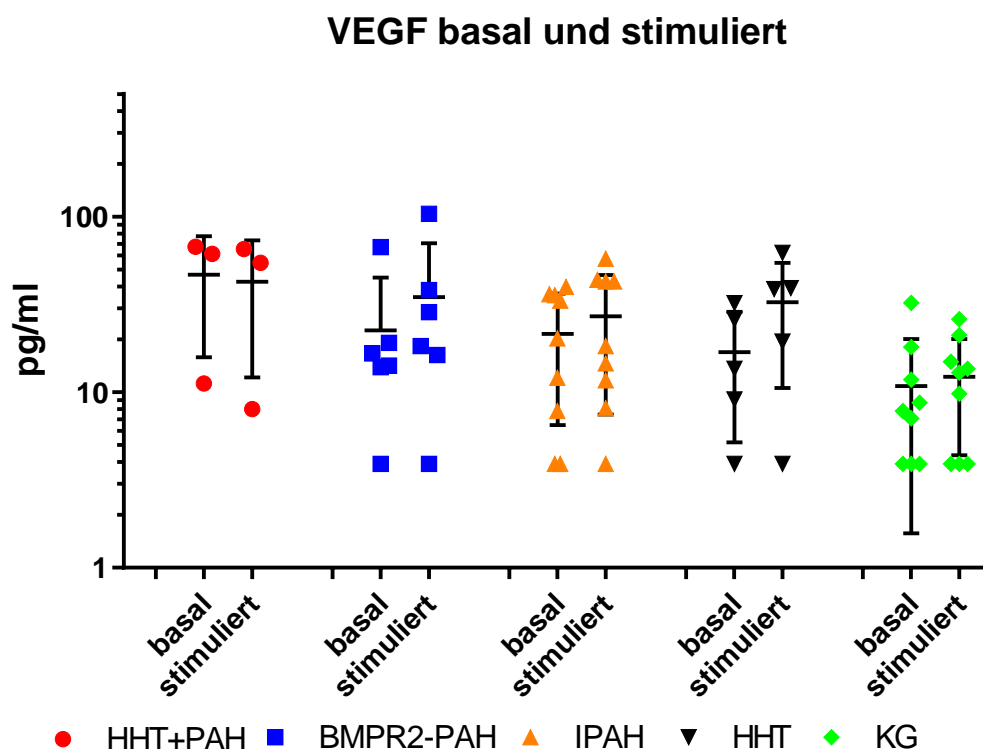


Abbildung 5. VEGF-Level bei unstimulierten und stimulierten PBMC.

Transforming growth factor β (TGF- β), Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie mit pulmonal-arterieller Hypertonie (HHT+PAH, n = 3), *bone morphogenetic receptor 2* Mutation mit pulmonal-arterieller Hypertonie (BMPR2-PAH, n = 6), idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH, n = 9), hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT, n = 5), Kontrollgruppe (KG, n = 9); *vascular endothelial growth factor (VEGF)*; Es wurde die VEGF-Freisetzung von PBMC unter basalen Bedingungen (basal) und nach Stimulation mit TGF- β 1 (stimuliert) bestimmt. Haupteffekt (Behandlung): $p = 0.0321$, Haupteffekt (Patientengruppe): $p = 0.2120$, Interaktion (Behandlung/Patientengruppe) $p = 0.4231$; Statistischer Test: *two-way ANOVA* mit Tukey *post-hoc* Test.

Zur Untersuchung der nachgeschalteten Signalwege des ALK1/ENG/BMP2-Signalweges in den unterschiedlichen Patientengruppen wurden die TGF- β - und VEGF-Level der PBMC mit und ohne TGF- β 1-Stimulation betrachtet. Für TGF- β - und VEGF-Level zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten PBMC. Allerdings konnte in dieser kleinen Stichprobe kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen detektiert werden.

3.2.2 Effekt von Tacrolimus auf TGF- β - und VEGF-Level in PBMC. Die Freisetzung der Biomarker TGF- β und VEGF aus PBMC der unterschiedlichen Patientengruppen wurde in dieser Untersuchung vor und nach der Gabe steigender Tacrolimus-Konzentrationen untersucht, um einen möglichen therapeutischen Nutzen bei dysfunktionalem ALK1/ENG/BMP2-Signalweg zu überprüfen.

Die Tacrolimus-Behandlung führte zu einem statistisch signifikanten Abfall der TGF- β -Freisetzung ($p = 0.0062$), allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden. Im *post-hoc* Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollwert und 10 μ g/ml Tacrolimus für die Gruppe BMP2-PAH ($p = 0.0302$) (HHT+PAH: Kontrollwert 2104 pg/ml, 2 μ g-Konz. 1791 pg/ml, 5 μ g-Konz. 1735 pg/ml, 10 μ g-Konz. 1441 pg/ml, BMP2-PAH: Kontrollwert 3064 \pm 630 pg/ml, 2 μ g-Konz. 2633 \pm 1130 pg/ml, 5 μ g-Konz. 2508 \pm 871.3 pg/ml, 10 μ g-Konz. 2219 \pm 714.8 pg/ml, IPAH: Kontrollwert 4873 \pm 2343 pg/ml, 2 μ g-Konz. 4281 \pm 2481 pg/ml, 5 μ g-Konz. 4133 \pm 2049 pg/ml, 10 μ g-Konz. 4433 \pm 2901 pg/ml, HHT: Kontrollwert 4518 \pm 1489 pg/ml, 2 μ g-Konz. 4311 \pm 1581 pg/ml, 5 μ g-Konz. 4555 \pm 2006 pg/ml, 10 μ g-Konz. 3992 \pm 1217 pg/ml, Kontrollgruppe: Kontrollwert 3097 \pm 2147 pg/ml, 2 μ g-Konz. 2890 \pm 1750 pg/ml, 5 μ g-Konz. 3061 \pm 1789 pg/ml, 10 μ g-Konz. 2595 \pm 1096pg/ml, Abbildung 6).

Die Tacrolimus-Behandlung führte zu einem statistisch signifikanten Abfall der VEGF-Freisetzung ($p = 0.0002$), allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden. Im *post-hoc* Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied für die Tacrolimus-Behandlung zwischen Kontrollwert und einer bestimmten Tacrolimus-Konzentration (HHT+PAH: Kontrollwert 36.35 pg/ml, 2 μ g-Konz. 29.65 pg/ml, 5 μ g-Konz. 28.30 pg/ml, 10 μ g-Konz. 27.75 pg/ml, BMP2-PAH: Kontrollwert 19.15 \pm 22.70 pg/ml, 2 μ g-Konz. 16.55 \pm 26.31 pg/ml, 5 μ g-Konz. 13.97 \pm 21.90 pg/ml, 10 μ g-Konz. 11.28 \pm 18.09 pg/ml; IPAH: Kontrollwert 21.41 \pm 14.99 pg/ml, 2 μ g-Konz.

17.72 ± 13.64 pg/ml, 5µg-Konz. 14.29 ± 12.35 pg/ml, 10µg-Konz. 13.43 ± 12.44 pg/ml, HHT: Kontrollwert 21.66 ± 9.80 pg/ml, 2µg-Konz. 19.04 ± 13.21 pg/ml, 5µg-Konz. 17.26 ± 11.69 pg/ml, 10µg-Konz. 16.00 ± 13.62 pg/ml, Kontrollgruppe: Kontrollwert 10.79 ± 9.43 pg/ml, 2µg-Konz. 10.31 ± 9.66 pg/ml, 5µg-Konz. 11.58 ± 9.51 pg/ml, 10µg-Konz. 9.58 ± 5.89 pg/ml, Abbildung 7).

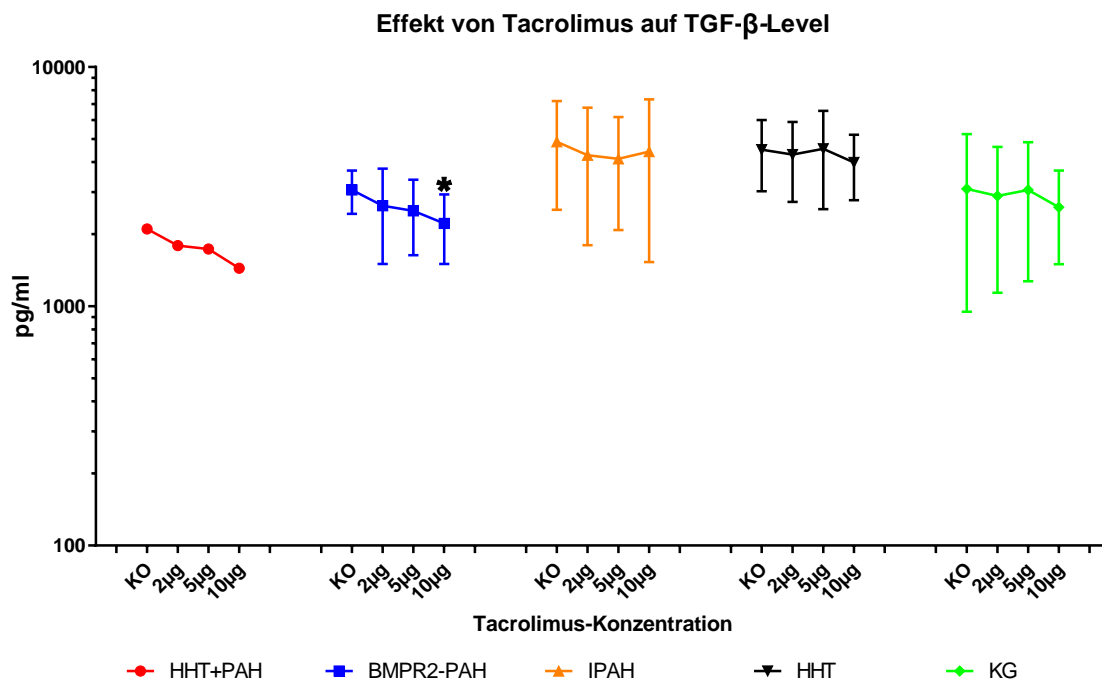


Abbildung 6. Effekt von Tacrolimus auf den TGF-β-Level in PBMC.

Transforming growth factor β (TGF-β), hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie mit pulmonal-arterieller Hypertonie (HHT+PAH, n = 2, für die statistische Auswertung ausgeschlossen), *bone morphogenetic receptor 2* Mutation mit pulmonal-arterieller Hypertonie (BMPR2-PAH, n = 6), idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAHA, n = 9), hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT, n = 5), Kontrollgruppe (KG, n = 9). Kontrollwert (KO), 2µg/ml, 5µg/ml und 10µg/ml Tacrolimus-Konzentration; Es wurde die TGF-β-Freisetzung von PBMC nach Tacrolimus-Behandlung bestimmt. Haupteffekt (Tacrolimus-Behandlung): p = 0.0062, Haupteffekt (Patientengruppe): p = 0.1694, Interaktion (Behandlung/Patientengruppe): p = 0.7395; * (p = 0.0302), Vergleich von 10 µg-Tacrolimus zu KO; Statistischer Test: *two-way ANOVA* mit Dunnett *post-hoc* Test.

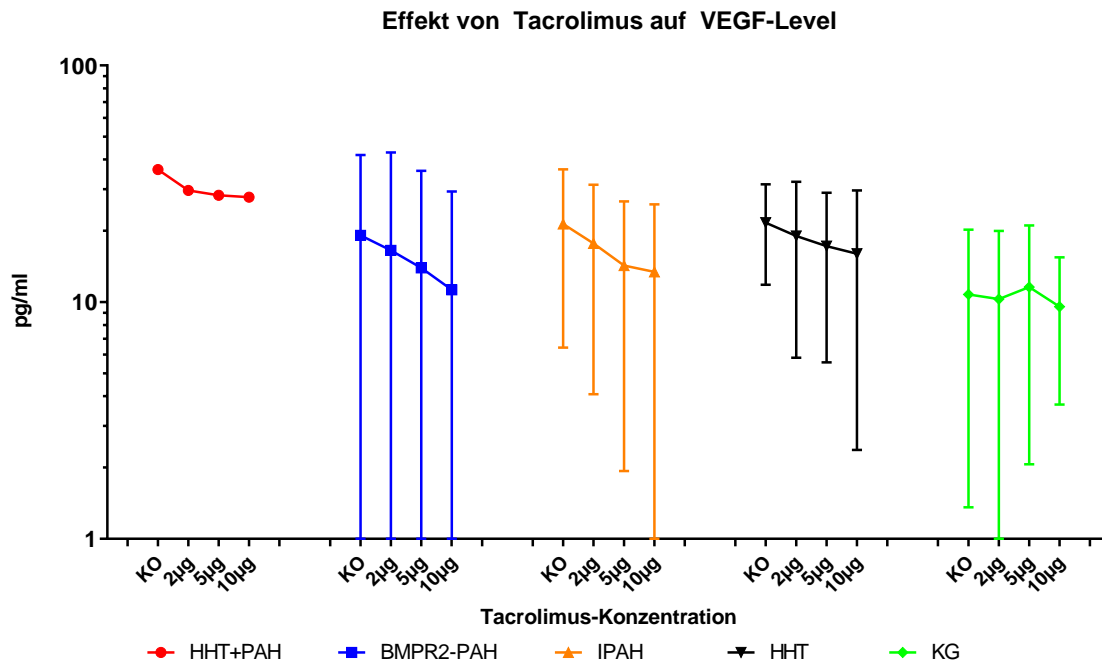


Abbildung 7. Effekt von Tacrolimus auf den VEGF-Level in PBMC.

Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie mit pulmonal-arterieller Hypertonie (HHT+PAH, n = 2, für die statistische Auswertung ausgeschlossen), *bone morphogenetic receptor 2* Mutation mit pulmonal-arterieller Hypertonie (BMPR2-PAH, n = 6), idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH, n = 9), hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT, n = 5), Kontrollgruppe (KG, n = 9). Kontrollwert (KO), 2µg/ml, 5µg/ml und 10µg/ml Tacrolimus-Konzentration; Es wurde die VEGF-Freisetzung von PBMC nach Tacrolimus-Behandlung bestimmt. Haupteffekt (Tacrolimus-Behandlung): $p = 0.0002$, Haupteffekt (Patientengruppe): $p = 0.5194$, Interaktion (Behandlung/Patientengruppe): $p = 0.1500$; Statistischer Test: *two-way ANOVA* mit Dunnett *post-hoc* Test.

Insgesamt zeigte sich somit ein signifikanter Effekt der Tacrolimus-Behandlung auf die TGF-β- und VEGF-Freisetzung. Im *post-hoc* Test konnte dieser für die Gruppe BMPR2-PAH bei einer Tacrolimus-Konzentration von 10 µl/ml für die TGF-β-Freisetzung nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht gezeigt werden.

3.3 Plasma-Untersuchungen

3.3.1 TGF- β - und VEGF-Konzentration in humanem Plasma. Das Plasma aus der PBMC-Isolation der unterschiedlichen Patientengruppen HHT+PAH, BMPR2-PAH, IPAH, HHT und der gesunden Kontrollgruppe wurde nach den Biomarkern TGF- β und VEGF untersucht, um mögliche Unterschiede der durch den dysfunktionalen ALK1/ENG/BMPR2-Rezeptorkomplex regulierten Signalwege zu identifizieren.

Es ergab sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der TGF- β -Konzentration in humanem Plasma in den Gruppen ($p = 0.0476$). Im *post-hoc* Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen BMPR2-PAH und HHT ($p = 0.0362$) (HHT+PAH: TGF- β 2587 ± 1030 pg/ml, BMPR2-PAH: TGF- β 2067 ± 987 pg/ml, IPAH: TGF- β 4397 ± 2479 pg/ml, HHT: TGF- β 5215 ± 2349 pg/ml, Kontrollgruppe: TGF- β 4742 ± 4396 pg/ml, Abbildung 8).

Des Weiteren konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der VEGF-Konzentration in humanem Plasma in den Gruppen gefunden werden (HHT+PAH: VEGF 20.03 ± 23.45 pg/ml, BMPR2-PAH: VEGF 40.08 ± 53.81 pg/ml, IPAH: VEGF 103.3 ± 229.4 pg/ml, HHT: VEGF 49.41 ± 50.99 pg/ml, Kontrollgruppe: VEGF 59.20 ± 51.94 pg/ml, $p = 0.5226$, Abbildung 9).

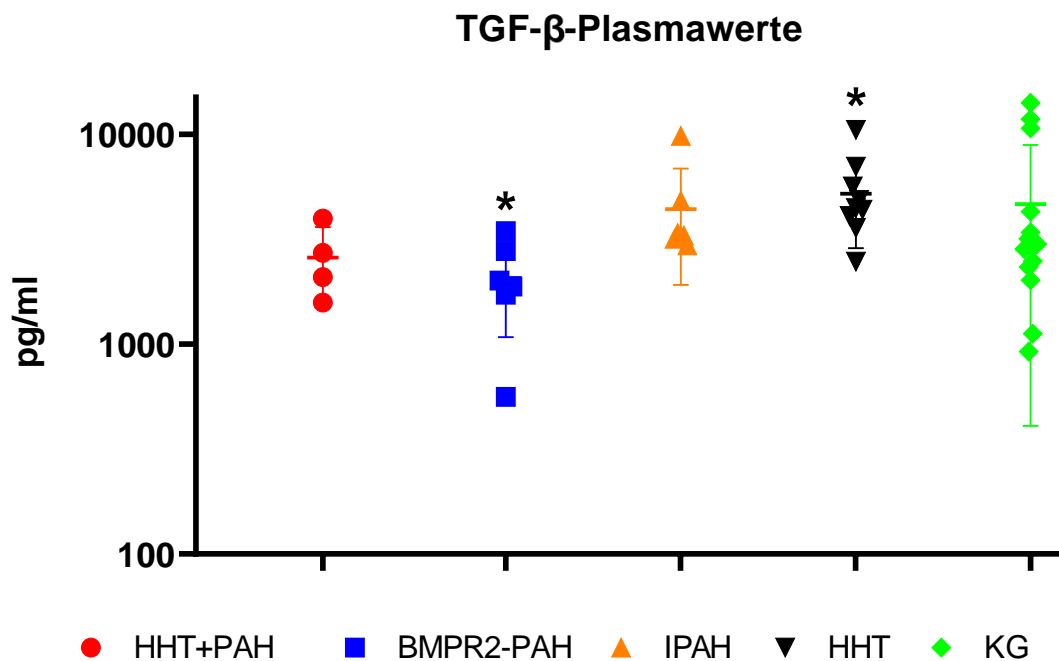


Abbildung 8. TGF- β -Konzentration in humanem Plasma.

Transforming growth factor β (TGF- β), hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie mit pulmonal-arterieller Hypertonie (HHT+PAH, $n = 4$), *bone morphogenetic receptor 2*

Mutation mit pulmonal-arterieller Hypertonie (BMPR2-PAH, n = 6), idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH, n = 7), hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT, n = 9), Kontrollgruppe (KG), n = 14); Es wurde die TGF- β -Konzentration in humanem Plasma bestimmt; Haupteffekt (Patientengruppe): p = 0.0476; * (p = 0.0362), Vergleich von BMPR2-PAH und HHT; Statistischer Test: *one-way ANOVA* mit Tukey *post-hoc* Test.

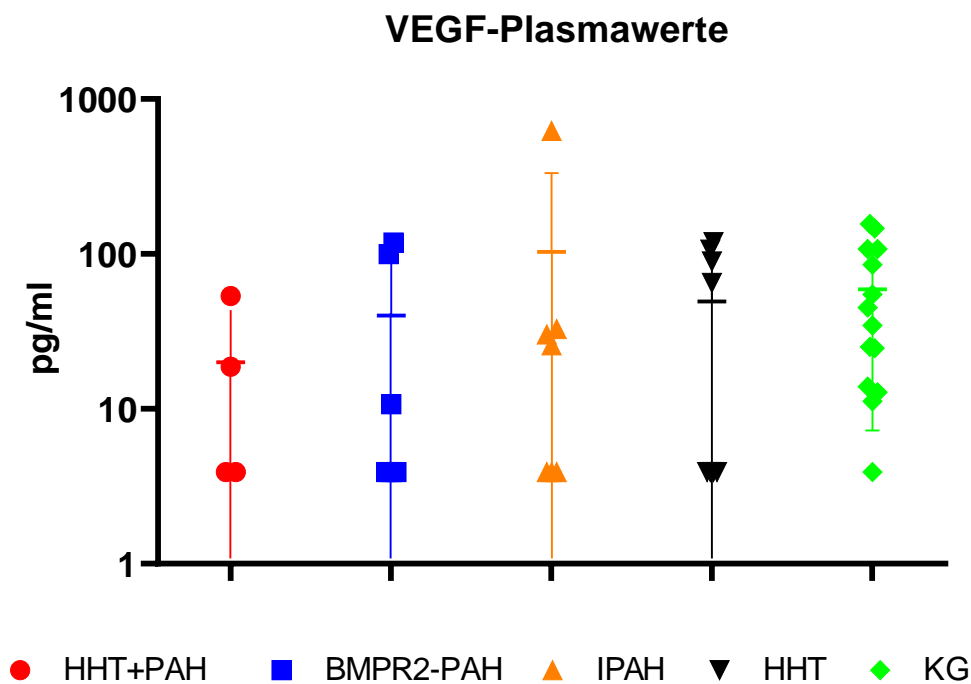


Abbildung 9. VEGF-Konzentration in humanem Plasma.

Transforming growth factor β (TGF- β), hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie mit pulmonal-arterieller Hypertonie (HHT+PAH, n = 4), *bone morphogenetic receptor 2* Mutation mit pulmonal-arterieller Hypertonie (BMPR2-PAH, n = 6), idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH, n = 7), hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT, n = 9), Kontrollgruppe (KG), n = 14); Es wurde die VEGF-Konzentration in humanem Plasma bestimmt; Die *standard deviation* (SD) für HHT+PAH, BMPR2-PAH, IPAH und HHT überschreitet die untere Abbildungsgrenze; Haupteffekt (Patientengruppe): p = 0.5226; Statistischer Test: *one-way ANOVA* mit Tukey *post-hoc* Test.

Insgesamt konnte für TGF- β -Level in humanem Plasma ein signifikanter Unterschied in den Gruppen gefunden werden. Der Unterschied im VEGF-Level in humanem Plasma wurde in den Gruppen dahingegen nicht signifikant.

3.3.2 Bestimmung zirkulierender Biomarker mittels PEA. Das Plasma aus der PBMC-Isolation der unterschiedlichen Patientengruppen BMPR2-PAH, HHT und der gesunden Kontrollgruppe wurde nach kardio-vaskulären peripheren Biomarkern untersucht, um mögliche Unterschiede der, durch den dysfunktionalen ALK1/ENG- und BMPR2-Rezeptorkomplex regulierten, Signalwege zu identifizieren. Die Ergebnisse werden in *Normalized Protein eXpression* (NPX) aufgeführt, welche in einer log₂ Skalierung angegeben werden. Hierbei entspricht ein hoher NPX-Wert einer hohen Proteinkonzentration.

Biomarker, für die ein Unterschied im Plasma in den Gruppen gefunden werden konnte, sind: FGF-21 ($p = 0.0362$), SOD2 ($p = 0.0446$) und THBS2 ($p = 0.0464$) (FGF-21: Kontrollgruppe: 5.118 ± 1.515 , HHT: 6.561 ± 1.083 , BMPR2-PAH: 6.472 ± 1.212 ; SOD2: Kontrollgruppe: 10.089 ± 0.099 , HHT: 9.969 ± 0.117 , BMPR2-PAH: 9.958 ± 0.136 ; THBS2: 5.409 ± 0.160 , HHT: 5.658 ± 0.342 , BMPR2-PAH: 5.347 ± 0.153).

Des Weiteren konnten Biomarker im Plasma gefunden werden, die sich signifikant in den Gruppen unterschieden und im *post-hoc* Test einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der HHT-Gruppe aufwiesen: *Adrenomedullin* (ADM) ($p = 0.0358$), ADAM-TS13 ($p = 0.0172$), BOC ($p = 0.0433$) und IL6 ($p = 0.0184$) (ADM: Unterschied Kontrollgruppe und HHT: $p = 0.0489$; ADAM-TS13: Unterschied Kontrollgruppe und HHT: $p = 0.0437$; BOC: Unterschied Kontrollgruppe und HHT: $p = 0.0453$; IL6: Unterschied Kontrollgruppe und HHT: $p = 0.0144$; ADM: Kontrollgruppe: 7.621 ± 0.659 , HHT: 8.367 ± 0.731 , BMPR2-PAH: 8.227 ± 0.322 ; ADAM-TS13: Kontrollgruppe: 5.530 ± 0.183 , HHT: 5.282 ± 0.219 , BMPR2-PAH: 5.265 ± 0.192 ; BOC: Kontrollgruppe: 3.544 ± 0.286 , HHT: 3.134 ± 0.472 , BMPR2-PAH: 3.501 ± 0.201 ; IL6: Kontrollgruppe: 2.432 ± 0.319 , HHT: 3.496 ± 1.146 , BMPR2-PAH: 2.706 ± 0.648).

Es konnte für folgende Biomarker im Plasma ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und BMPR2-PAH-Gruppe gefunden werden: ADAM-TS 13 ($p = 0.0358$), *alpha-L-iduronidase* (IDUA) ($p = 0.0271$), REN ($p = 0.0260$) und *fatty acid binding protein 2* (FABP2) ($p = 0.0007$) (ADAM-TS13: Unterschied Kontrollgruppe und BMPR2-PAH: $p = 0.400$; IDUA: Unterschied Kontrollgruppe und BMPR2-PAH: $p = 0.0249$; REN: Unterschied Kontrollgruppe und BMPR2-PAH: $p = 0.0223$; FABP2: Unterschied Kontrollgruppe und BMPR2-PAH: $p = 0.0087$; ADAM-TS13: Kontrollgruppe: 5.530 ± 0.183 , HHT: 5.282 ± 0.219 , BMPR2-PAH: 5.265 ± 0.192 ; REN: Kontrollgruppe: 5.951 ± 0.663 , HHT: 6.281 ± 1.180 , BMPR2-PAH: 7.183 ± 0.652 ; IDUA:

Kontrollgruppe: 5.336 ± 0.511 , HHT: 5.236 ± 0.281 , BMPR2-PAH: 4.741 ± 0.310 ;
 FABP2: Kontrollgruppe: 7.698 ± 0.543 , HHT: 7.271 ± 0.745 , BMPR2-PAH: 8.805 ± 0.488).

Zudem konnte für einen Biomarker im Plasma ein signifikanter Unterschied zwischen HHT- und BMPR2-PAH-Gruppe gezeigt werden: FABP2 ($p = 0.0007$) (FABP2: Unterschied HHT und BMPR2-PAH: $p = 0.0005$; FABP2: Kontrollgruppe: 7.698 ± 0.543 , HHT: 7.271 ± 0.745 , BMPR2-PAH: 8.805 ± 0.488).

Im Folgenden werden die Biomarker mit signifikantem Unterschied in der Abbildung 10 gezeigt. Die y-Achse beschreibt den Biomarker-Level im Plasma und ist zur besseren Vergleichbarkeit in der Einheit NPX und im \log_{10} dargestellt. Als statistischer Test wurde eine *one-way ANOVA* mit Tukey *post-hoc* Test verwendet. Für multiples Testen wurde nicht korrigiert, da es sich um eine explorative, hypothesengenerierende Analyse handelt.

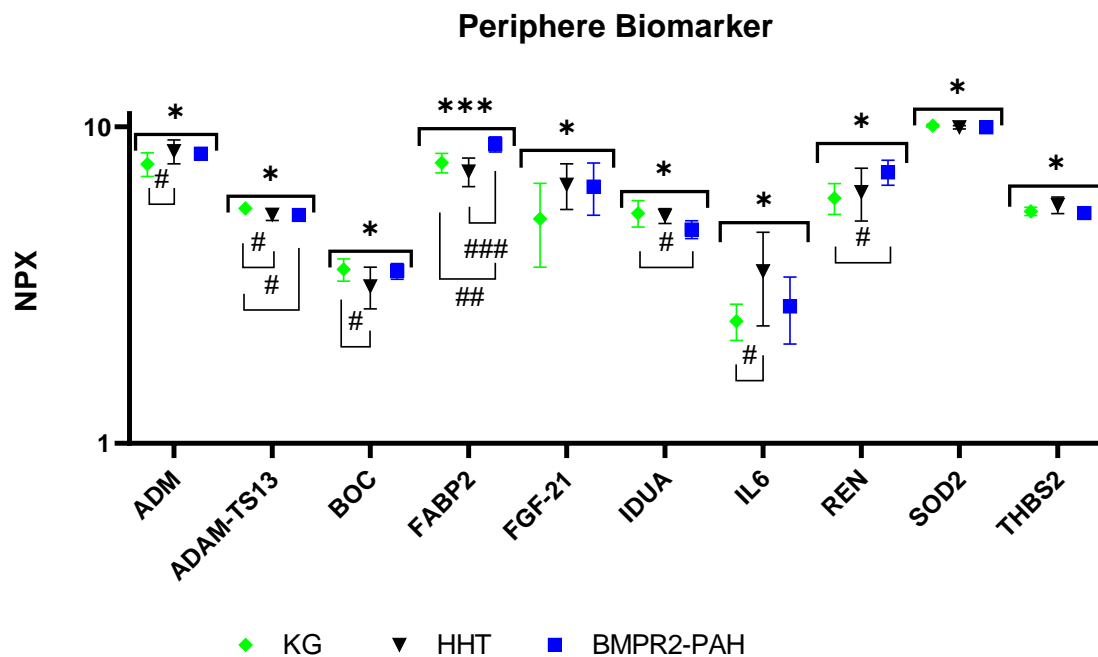


Abbildung 10. Signifikant unterschiedliche Biomarker in humanem Plasma.

Kontrollgruppe (KG, $n = 11$), hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT, $n = 7$), *bone morphogenetic receptor 2* Mutation mit PAH (BMPR2-PAH, $n = 6$), *Adrenomedullin* (ADM), *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13* (ADAM-TS13), *brother of CDO* (BOC), *fatty acid binding protein 2* (FABP2), *fibroblast growth factor 21* (FGF-21), *alpha-L-iduronidase* (IDUA), *Interleukin 6* (IL6), *Renin* (REN), *Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial* (SOD2), *Thrombospondin-2* (THBS2);

Normalized Protein eXpression (NPX). Es wurden die Level verschiedener Biomarker im Plasma bestimmt; * ($p < 0.05$), *** ($p < 0.001$), Haupteffekt; # ($p < 0.05$), ## ($p < 0.01$), ### ($p < 0.001$), Vergleich der entsprechenden Patientengruppen; ADM: * Haupteffekt: $p = 0.0358$, ADAM-TS13: * Haupteffekt: $p = 0.0172$, BOC: * Haupteffekt: $p = 0.0433$, FABP2: *** Haupteffekt: $p = 0.0007$, FGF-21: * Haupteffekt: $p = 0.0362$, IDUA: * Haupteffekt: $p = 0.0271$, IL6: * Haupteffekt: $p = 0.0184$, REN: * Haupteffekt: $p = 0.0260$, SOD2: * Haupteffekt: $p = 0.0446$, THBS2: * Haupteffekt: $p = 0.0464$; ADM: # (KG vs. HHT, $p = 0.0489$), ADAM-TS13: # (KG vs. HHT, $p = 0.0437$, KG vs. BMPR2-PAH, $p = 0.400$), BOC: # (KG vs. HHT, $p = 0.0453$), FABP2: ## (KG vs. BMPR2-PAH, $p = 0.0087$), ### (HHT vs. BMPR2-PAH, $p = 0.0005$), IDUA: # (KG vs. BMPR2-PAH, $p = 0.0249$), IL6: # (KG vs. HHT, $p = 0.0144$),), REN # (KG vs. BMPR2-PAH, $p = 0.0223$); Statistischer Test: *one-way ANOVA* mit Tukey *post-hoc* Test.

Für alle anderen Biomarker wurde kein signifikanter Unterschied in den unterschiedlichen Patientengruppen festgestellt (Tabelle 6).

Biomarker	Gruppenzugehörigkeit					
	Kontrollgruppe		HHT		BMPR2-PAH	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
ACE2	3.158	± 0.209	3.410	± 0.497	3.226	± 0.473
AGRP	4.887	± 0.369	4.516	± 0.490	4.502	± 0.230
AMBP	7.463	± 0.165	7.496	± 0.224	7.416	± 0.233
ANGPT1	6.470	± 1.899	7.065	± 1.768	5.361	± 1.094
BMP-6	4.279	± 0.597	4.072	± 0.335	4.199	± 0.313
BNP	2.182	± 1.315	2.877	± 1.944	2.911	± 1.176
CA5A	2.748	± 0.674	2.817	± 0.679	2.228	± 0.539
CCL17	8.128	± 1.503	8.047	± 1.294	7.266	± 0.712
CCL3	5.960	± 0.759	6.232	± 0.781	5.756	± 0.508
CD4	4.728	± 0.577	4.579	± 0.193	4.432	± 0.194
CD40-L	4.073	± 2.310	3.696	± 2.096	2.744	± 1.293
CD84	4.399	± 0.761	4.384	± 0.447	4.045	± 0.405
CEACAM8	4.219	± 0.462	3.869	± 0.327	3.818	± 0.463
CTRC	10.604	± 0.946	10.150	± 0.937	10.791	± 0.947

CTSL1	6.838	± 0.307	6.848	± 0.385	7.158	± 0.396
CXCL1	8.759	± 1.739	8.687	± 1.731	7.435	± 1.188
DCN	3.988	± 0.273	3.835	± 0.248	3.836	± 0.281
DECR1	5.586	± 2.645	4.897	± 2.111	4.507	± 1.508
Dkk-1	7.581	± 1.155	7.920	± 0.936	7.051	± 0.458
FGF-23	3.313	± 0.929	3.489	± 0.609	3.336	± 0.346
FS	10.301	± 0.552	10.369	± 0.491	10.505	± 0.475
Gal-9	7.549	± 0.468	7.956	± 0.242	7.639	± 0.203
GDF2	8.374	± 0.506	8.293	± 0.405	8.377	± 0.563
GH	7.132	± 2.484	6.881	± 2.388	7.309	± 2.395
GIF	6.820	± 0.532	7.281	± 1.001	7.116	± 0.892
GLO1	7.138	± 1.229	6.426	± 1.205	6.085	± 0.945
GT	2.234	± 0.285	2.122	± 0.526	2.268	± 0.349
HAOX1	5.534	± 1.803	6.050	± 1.497	4.765	± 1.344
HB-EGF	5.386	± 1.360	5.485	± 1.272	4.765	± 0.286
HO-1	11.097	± 0.332	11.006	± 0.462	11.328	± 0.366
hOSCAR	10.419	± 0.304	10.419	± 0.287	10.334	± 0.164
HSP27	9.506	± 0.962	9.228	± 1.313	8.639	± 1.377
IgG Fc receptor II-b	3.845	± 0.543	3.615	± 0.830	3.730	± 0.674
IL16	6.368	± 1.068	6.619	± 0.718	6.205	± 0.387
IL-17D	2.428	± 0.350	2.223	± 0.220	2.349	± 0.191
IL18	8.051	± 0.435	8.411	± 0.318	8.298	± 0.610
IL-1ra	4.147	± 0.693	4.757	± 0.707	3.953	± 0.152
IL1RL2	3.816	± 0.472	3.746	± 0.418	3.808	± 0.245
IL-27	5.683	± 0.555	5.800	± 0.482	5.774	± 0.324
IL-4RA	1.987	± 0.197	2.145	± 0.286	1.968	± 0.255
ITGB1BP2	4.072	± 2.408	3.603	± 1.814	3.073	± 1.358
KIM1	7.600	± 0.795	7.921	± 0.471	7.344	± 0.547
LEP	5.583	± 1.234	6.721	± 1.178	5.060	± 1.141
LOX-1	6.401	± 0.535	6.047	± 0.331	6.004	± 0.273
LPL	10.040	± 0.589	10.072	± 0.309	10.319	± 0.522
MARCO	6.789	± 0.214	6.796	± 0.310	6.638	± 0.172

MERTK	5.772	± 0.179	5.846	± 0.292	5.703	± 0.235
MMP12	6.863	± 0.967	6.585	± 0.612	7.083	± 0.784
MMP7	9.510	± 0.567	8.958	± 0.525	9.192	± 0.639
NEMO	6.526	± 2.550	5.868	± 2.319	4.995	± 1.541
PAPPA	3.147	± 0.705	2.787	± 0.479	3.304	± 0.838
PAR-1	8.155	± 0.999	8.241	± 0.568	7.765	± 0.576
PARP-1	3.787	± 2.485	4.014	± 1.947	3.565	± 0.742
PDGF subunit B	7.444	± 2.175	7.942	± 2.108	5.981	± 2.097
PD-L2	3.256	± 0.183	3.077	± 0.526	3.119	± 0.219
PGF	6.852	± 0.244	6.909	± 0.466	6.570	± 0.284
PIgR	5.675	± 0.136	5.674	± 0.145	5.701	± 0.125
PRELP	8.064	± 0.175	7.949	± 0.278	8.038	± 0.174
PRSS27	8.473	± 0.459	8.176	± 0.529	8.190	± 0.331
PRSS8	8.035	± 0.292	8.430	± 0.360	8.062	± 0.470
PSGL-1	4.588	± 0.141	4.484	± 0.252	4.697	± 0.236
PTX3	3.243	± 0.406	2.941	± 0.351	2.863	± 0.359
RAGE	13.022	± 0.314	12.932	± 0.670	13.106	± 0.589
SCF	8.950	± 0.399	8.661	± 0.841	8.854	± 0.400
SERPINA12	2.743	± 0.595	3.278	± 1.498	2.876	± 1.070
SLAMF7	3.209	± 1.348	2.623	± 0.538	2.626	± 0.354
SORT1	7.962	± 0.575	7.909	± 0.349	7.764	± 0.365
SPON2	7.758	± 0.297	7.885	± 0.323	7.831	± 0.207
SRC	5.474	± 1.826	5.335	± 1.567	5.077	± 1.605
STK4	3.567	± 2.227	2.999	± 1.991	2.199	± 1.796
TF	5.438	± 0.413	5.409	± 0.495	5.442	± 0.247
TGM2	6.830	± 0.873	6.311	± 0.407	6.407	± 0.676
THPO	3.403	± 0.474	3.116	± 0.403	3.073	± 0.220
TIE2	6.945	± 0.215	6.730	± 0.344	6.714	± 0.244
TM	9.172	± 0.306	9.151	± 0.439	8.981	± 0.262
TNFRSF10A	2.728	± 0.341	2.682	± 0.222	2.751	± 0.226
TNFRSF11A	4.911	± 0.553	5.159	± 0.554	5.015	± 0.284
TNFRSF13B	9.223	± 0.404	9.112	± 0.461	9.314	± 0.399

TRAIL-R2	5.577	± 0.478	5.742	± 0.361	5.522	± 0.258
VEGF-D	7.659	± 0.291	7.389	± 0.425	7.855	± 0.379
VSIG2	3.687	± 0.510	3.805	± 0.667	4.347	± 0.555
XCL1	4.845	± 0.434	4.707	± 0.621	4.753	± 0.409

Tabelle 6. Ergebnisse der nicht signifikant unterschiedlichen Biomarker im Plasma.

Werte in *Normalized Protein eXpression* (NPX). Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT), *bone morphogenetic receptor 2* Mutation mit PAH (BMPR2-PAH), Standardabweichung (SD); *Angiotensin-converting enzym 2* (ACE2), *Agouti-related protein* (AGRP), *alpha-1-microglobulin/bikunin precursor* (AMBIP), *Angiopoietin-1* (ANGPT1), *bone morphogenetic protein 6* (BMP-6), *brain natriuretic peptide* (BNP), *Carbonic anhydrase 5A, mitochondrial* (CA5A), *C-C motif chemokine 17* (CCL17), *C-C motif chemokine 3* (CCL3), *T-cell surface glycoprotein CD4* (CD4), *CD40 ligand* (CD40-L), *signaling lymphocytic activation molecule family member 5* (CD84), *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8* (CEACAM8), *Chymotrypsin C* (CTRC), *Cathepsin 1* (CTSL1), *C-X-C motif chemokine 1* (CXCL1), *Decorin* (DCN), *2, 4-dienoyl-CoA reductase* (DECRI), *Dickkopf-related protein 1* (Dkk-1), *fibroblast growth factor 23* (FGF-23), *Follistatin* (FS), *Galectin 9* (Gal-9), *growth differentiation factor 2* (GDF2), *growth hormone* (GH), *gastric intrinsic factor* (GIF), *lactoylglutathione lyase* (GLO1), *Gastrotropin* (GT), *hydroxyacid oxidase 1* (HAOX1), *proheparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF), *heme oxygenase 1* (HO-1), *Osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor* (hOSCAR), *heat shock 27 kDa protein* (HSP27), *low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-b* (IgG Fc receptor II-b), *Pro-Interleukin 16* (IL16), *Interleukin 17D* (IL-17D), *Interleukin 18* (IL18), *Interleukin-1 receptor antagonist protein* (IL-1ra), *Interleukin-1 receptor-like 2* (IL1RL2), *Interleukin 27* (IL27), *Interleukin-4 receptor subunit alpha* (IL-4RA), *Melusin* (ITGB1BP2), *kidney injury molecule* (KIM1), *Leptin* (LEP), *Lectin-like oxidized LDL receptor 1* (LOX-1), *lipoprotein lipase* (LPL), *macrophage receptor MARCO* (MARCO), *Tyrosine-protein kinase Mer* (MERTK), *matrix metalloproteinase-12* (MMP12), *matrix metalloproteinase-7* (MMP7), *NF-kappa-B essential modulator* (NEMO), *Pappalysin-1* (PAPPA), *proteinase-activated receptor 1* (PAR-1), *Poly [ADP-ribose] polymerase 1* (PARP-1), *platelet-derived growth factor subunit B* (PDGFB), *programmed cell death 1 ligand 2* (PD-L2), *placenta growth factor* (PGF), *polymeric immunoglobulin receptor* (PIgR), *Prolargin* (PRELP), *Serine protease 27* (PRSS27), *Prostasin* (PRSS8), *P-selectin glycoprotein ligand 1* (PSGL-1), *Pentraxin-related protein PTX3* (PTX3), *receptor for*

advanced glycosylation end products (RAGE), stem cell factor (SCF), Serpin A12 (SERPINA12), SLAM family member 7 (SLAMF7), Sortilin (SORT1), Spondin-2 (SPON2), proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (SRC), Serine/threonine-protein kinase 4 (STK4), tissue factor (TF), protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2 (TGM2), Thrombopoietin (THPO), Angiopoietin-1 receptor (TIE2), Thrombomodulin (TM), tumor necrosis factor receptor superfamily member 10A (TNFRSF10A), tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A (TNFRSF11A), tumor necrosis factor receptor superfamily member 13B (TNFRSF13B), TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 (TRAIL-R2), vascular endothelial growth factor D (VEGF-D), V-set and immunoglobulin domain-containing protein 2 (VSIG2), Lymphotoxin (XCL1); Es wurden die Level verschiedener Biomarker im Plasma bestimmt; Statistischer Test: *one-way ANOVA* mit *Tukey post-hoc* Test.

Insgesamt zeigte sich bei der Untersuchung zirkulierender Biomarker ein signifikanter Unterschied von der Kontrollgruppe zu HHT für die Biomarker ADM, ADAM-TS13, BOC, und IL6. Des Weiteren konnte ein signifikanter Unterschied von der Kontrollgruppe zu BMPR2-PAH für ADAM-TS13, IDUA, REN und FABP2 nachgewiesen werden. Der Unterschied zwischen HHT und BMPR2-PAH wurde für FABP2 signifikant.

4 Diskussion

4.1 Fazit

Den Erkrankungen HHT und PAH liegen teilweise Störungen der gleichen Signaltransduktionswege, insbesondere im BMPR2-ALK1-Signalweg, zugrunde. Trotzdem sind beide Erkrankungen in ihrer Ausprägung sehr unterschiedlich (HHT mit Teleangiektasien und AVMs, PAH mit pulmonalvaskulärem *Remodeling*) und nur wenige Patienten mit HHT entwickeln eine PAH (HHT-PAH). Die HHT, PAH und HHT-PAH sind sehr seltene Erkrankungen und die Unterschiede in der Pathogenese beruhen auf einer Störung des BMPR2- (PAH), bzw. ALK1-(HHT)-Signalweges und sind unzureichend verstanden. In dieser explorativen Arbeit wurden daher Patienten aus einem einzelnen Zentrum für PH mit diesen Erkrankungen untersucht, um Unterschiede in Biomarkern und der Ansprache auf einen möglichen Therapieansatz mit Tacrolimus zu identifizieren, die in einer größeren Folgestudie weiter untersucht werden sollten. Bei der geringen Zahl der eingeschlossenen Patienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den klinischen Parametern. Ebenso konnte kein signifikanter Unterschied in der Ansprache der PBMC auf TGF- β -Stimulation oder Tacrolimus-Inkubierung gefunden werden, wobei allerdings insgesamt ein signifikanter Anstieg bzw. Abfall der TGF- β - und VEGF-Freisetzung nach Stimulation mit TGF- β 1 oder Inhibierung mit Tacrolimus dargestellt werden konnte. Somit eignet sich eine *ex vivo* Stimulation von PBMC generell zur Untersuchung von BMPR2/ALK1-abhängigen-Signalwegen und die Senkung der TGF- β - und VEGF-Freisetzung aus PBMC nach Tacrolimus-Gabe unterstützt bisherige Untersuchungen, die einen positiven therapeutischen Effekt von Tacrolimus bei diesen Erkrankungen postuliert haben. In einer Studie mit größerer Teilnehmerzahl sollten Unterschiede in den Gruppen weiter untersucht werden. Diese Studie eignet sich auch zur Abschätzung der erwartbaren Effekte und damit des Aufbaus zukünftiger Studien. Des Weiteren konnten Unterschiede in den peripheren Biomarkern festgestellt werden, insbesondere Unterschiede zwischen der HHT- bzw. BMPR2-PAH- und der Kontrollgruppe.

4.2 Repräsentativität des Studienkollektivs

In dieser Arbeit wurden Patienten mit verschiedenen Mutationen im *BMPR2/ALK1*-Signalweg und entsprechende Kontrollen verglichen. Es handelt sich um eine explorative Analyse, die hypothesengenerierend ist. Die Gruppen HHT+PAH,

BMPR2-PAH, IPAH, HHT und die gesunde Kontrollgruppe entsprachen hinsichtlich Alters- und Geschlechterverteilung weitestgehend bisherigen epidemiologischen Studien. So konnte in einer Arbeit zur Prävalenz der PAH mit einem Patientenkollektiv aus PAH-Patienten der Gruppe I mit unterschiedlicher Ätiologie (IPAH, HPAH, PAH assoziiert mit Bindegewebserkrankung, portopulmonaler Hypertension und HIV-Infektion) ein Durchschnittsalter der Patienten von 50 ± 15 Jahren gezeigt werden und eine Geschlechterverteilung von weiblichen zu männlichen Patienten von 1.9:1 (Humbert et al., 2006). Speziell für die IPAH bzw. HPAH lag die Geschlechterverteilung bei 37.9% bzw. 30.8% männlichen Patienten. In der vorliegenden Arbeit entsprach der Anteil von Patienten männlichen Geschlechts mit IPAH mit 22% einem kleineren Anteil als in der epidemiologischen Studie. Der Geschlechteranteil wich für die Gruppe BMPR2-PAH, welche mit HPAH verglichen werden kann, da *BMPR2*-Mutationen 75% der HPAH-Patienten ausmachen, noch weiter ab (Machado et al., 2015; Wang et al., 2016). In der hier vorliegenden Arbeit lag der Anteil bei 67% für männliche Patienten und somit deutlich über der epidemiologischen Studie. Bezüglich des Durchschnittsalters unterschied sich die BMPR2-PAH Gruppe mit 50 ± 6.6 Jahren kaum von der epidemiologischen Studie. Die Gruppe IPAH wich mit 60 ± 7.5 Jahren Altersdurchschnitt mehr davon ab. Damit entsprach das Patientenkollektiv bezüglich Altersverteilung weitestgehend publizierten, prävalenten Daten, während die Geschlechtsverteilung leicht davon abwich. Der Grund dafür ist unklar, hat aber höchstwahrscheinlich keine Auswirkung auf die Aussagekraft der hier vorliegenden Arbeit.

Für die HHT konnte in einer epidemiologischen Studie zur Prävalenz ein Durchschnittsalter von 42 ± 19 Jahren und eine Geschlechterverteilung von 54% weiblicher und 46% männlicher Patienten festgestellt werden (Puate et al., 2016). Die Verteilung der Geschlechter in der hier vorliegenden Arbeit, bezogen auf alle HHT-Patienten, entspricht der epidemiologischen Studie mit 46% männlichen HHT-Patienten. Die HHT+PAH Gruppe zeigte mit 75% männlichen Probanden einen höheren Anteil. Im Gegensatz zu HHT, die mit 33% einen niedrigeren Anteil männlicher Probanden aufwies. Der Altersdurchschnitt von 42 ± 19 Jahren für HHT war außerdem in der Studie niedriger als in der hier vorliegenden Arbeit mit 57 ± 15 Jahren. Dies könnte an der teilweise verspäteten Penetranz der HHT-Erkrankung liegen, da in der hier vorliegenden Arbeit nur Patienten mit prävalenter HHT-Erkrankung eingeschlossen wurden und in der epidemiologischen Arbeit ein Screening für HHT an asymptomatischen Probanden enthalten war (McDonald & Pyeritz, 2000; Puate et al., 2016). Damit entsprach das

Patientenkollektiv bezüglich Geschlechtsverteilung weitestgehend publizierten, prävalenten Daten, während die Altersverteilung leicht davon abwich. Der Grund dafür ist unklar, hat aber höchstwahrscheinlich keine Auswirkung auf die Aussagekraft der hier vorliegenden Arbeit. Die Patientengruppen unterschieden sich signifikant bezüglich des Alters (HHT+PAH: 58 Jahre, Bmpr2-PAH: 50 Jahre, IPAH: 60 Jahre, HHT: 57 Jahre, Kontrollgruppe: 43 Jahre, $p = 0.0365$; *one-way ANOVA* mit Tukey *post-hoc* Test: IPAH vs. Kontrollgruppe: $p = 0.0442$), allerdings konnte bezüglich der Geschlechterverteilung kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p = 0.1594$; Statistischer Test: Chi-Quadrat-Test). Der signifikante Unterschied des Alters hat kaum eine Auswirkung auf die Aussagekraft der hier vorliegenden Arbeit, da der Unterschied zwischen IPAH- und Kontrollgruppe auftrat. Der Fokus liegt jedoch auf dem Vergleich der Gruppen mit *ALK1/ENG*- bzw. *Bmpr2*-Mutationen.

4.3 Auswertung der klinischen Daten

Zum Vergleich des hämodynamischen Status der Patientengruppen wurden RHK-Messungen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung des jeweiligen Patienten analysiert: 1) RHK-Messung bei Erstdiagnose und 2) eine RHK-Messung nach 5-8 Jahren. Hierfür wurden die Gruppen HHT+PAH, Bmpr2-PAH und IPAH miteinander verglichen. Es wurde der ED-RHK im Vergleich dargestellt sowie der Verlauf zwischen ED-RHK und Verlauf-RHK. Des Weiteren wurden BGA-Werte und der Hb-Wert zum Zeitpunkt der Blutentnahme miteinander verglichen. Es konnte für die ED-RHK kein signifikanter Unterschied in den Gruppen festgestellt werden. Für die BGA-Werte konnte kein statistisch auswertbares Ergebnis dargestellt werden. Des Weiteren zeigte sich kein signifikanter Unterschied für den Hb-Wert in den Gruppen. Für den Vergleich zwischen ED-RHK und Verlauf-RHK konnte für die Gruppe IPAH ein signifikanter Unterschied in den Gruppen nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass 68% der Patienten mit einer pharmakotherapeutischen Dreifachtherapie und 21% mit einer dualen Therapie behandelt wurden.

Insgesamt konnte somit bei geringer Stichprobengröße kein Unterschied der Hämodynamik zwischen den Gruppen bei Erstdiagnose oder im Verlauf dargestellt werden. Dies hätte möglicherweise erwartet werden, da gezeigt werden konnte, dass Patienten mit *Bmpr2*-Mutation einen signifikant erhöhten mPAP, PVR und signifikant erniedrigten CI im Vergleich zu IPAH-Patienten ohne Mutation aufweisen (Sztrymf et al., 2008). In der hier vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass für IPAH-Patienten

im Verlauf eine Besserung der Hämodynamik auftrat im Gegensatz zu Patienten mit *BMPR2*-Mutation. In Folgestudien mit größerer Stichprobenzahl sollten die Unterschiede in der Hämodynamik im Verlauf zu Beurteilung der Therapieansprache weiter untersucht werden.

4.4 VEGF- und TGF- β -Freisetzung aus stimulierten und unstimulierten PBMC

Die PBMC der unterschiedlichen Patientengruppen wurden hinsichtlich der Freisetzung von TGF- β und VEGF untersucht. Hierzu wurden die PBMC mit und ohne TGF- β 1-Gabe analysiert, um Unterschiede in den nachgeschalteten Signalwegen des ALK1/ENG/BMP2-Signalweges in den unterschiedlichen Patientengruppen zu untersuchen. TGF- β 1 stimuliert vor allem den *transforming growth factor β receptor type II* (T β RII) -ALK1-Signalweg und weniger den BMP2-ALK1-Signalweg, welcher eine größere Affinität zu BMP9/10 aufweist. Hierdurch wird die TGF- β - und VEGF-Expression gesteigert (García de Vinuesa, Abdelilah-Seyfried, Knaus, Zwijsen, Bailly, 2016).

Für die VEGF- und TGF- β -Level konnte gezeigt werden, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten PBMC in den Gruppen gibt. Der Effekt auf die VEGF- und TGF- β -Level war ein erwartbarer Effekt, da wie oben beschrieben TGF- β 1 den T β RII/ALK1-Signalweg aktiviert. In der hier vorliegenden Arbeit konnte damit bewiesen werden, dass das *ex vivo* Stimulationssystem bei PBMC funktioniert.

Es ist bekannt, dass VEGF im Plasma von HHT-Patienten erhöht ist (Botella, Albiñana, Ojeda-Fernandez, Recio-Poveda, Bernabéu, 2015). Für VEGF in PBMC lagen jedoch lediglich Studienergebnisse an Patienten mit rheumatoider Arthritis vor, deren PBMC mit TGF- β stimuliert wurden. Hierbei konnte eine signifikante Erhöhung für VEGF nachgewiesen werden (Bottomley et al., 1999). Dies war erwartbar, da TGF- β über BMP2 die VEGF-Expression anregt (David, Feige, Bailly, 2009; García de Vinuesa, Abdelilah-Seyfried, Knaus, Zwijsen, Bailly, 2016). In der hier vorliegenden Arbeit konnte somit übereinstimmend ein signifikanter Unterschied für die VEGF-Freisetzung gezeigt werden.

Insgesamt konnte mit diesem Versuchsteil gezeigt werden, dass die *in vitro* Stimulation von PBMC von Patienten mit TGF- β 1 prinzipiell als Untersuchungsmethode für den BMP2-Signalweg geeignet ist.

4.5 VEGF- und TGF- β -Freisetzung aus PBMC nach Tacrolimus-Gabe

Die Freisetzung der Biomarker TGF- β und VEGF aus PBMC der unterschiedlichen Patientengruppen wurden in dieser Untersuchung vor und nach der Gabe steigender Tacrolimus-Konzentrationen überprüft, um einen möglichen therapeutischen Nutzen bei dysfunktionalem ALK1/ENG/BMP2-Signalweg festzustellen. Für TGF- β -Level konnte ein signifikanter Unterschied mit der Tacrolimus-Behandlung gezeigt werden. Es unterschied sich im *post-hoc* Test der TGF- β -Level für 10 μ g/ml-Tacrolimus-Konzentration in der Gruppe BMP2-PAH signifikant vom Kontrollwert. Ebenfalls zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Tacrolimus-Behandlung für den VEGF-Level.

Basierend auf den Untersuchungsergebnissen von Spiekerkoetter et al. (2013), die eine Inhibierung des BMP2-Signalweges mit Tacrolimus-Inkubation in der Konzentration von 0.2ng/ml bis 2 μ g/ml zeigten, wurden die PBMC der Probanden mit verschiedenen Dosierungen Tacrolimus inkubiert, welche deutlich über den immunsuppressiven Talblut-Spiegeln von 5-20 ng/ml lagen (Astellas Pharma GmbH, 2022). Für diese Konzentrationen konnte ein signifikanter Abfall der TGF- β -Freisetzung in den Gruppen mit der Tacrolimus-Gabe nachgewiesen werden. Insbesondere die Gruppe BMP2-PAH zeigte für eine Tacrolimus-Konzentration von 10 μ g/ml einen signifikanten Abfall der TGF- β -Freisetzung im Vergleich zum Kontrollwert.

Zusätzlich konnte in Übereinstimmung mit der Arbeit von Spiekerkoetter et al. (2013) eine signifikante Senkung der VEGF-Konzentration in den PBMC der unterschiedlichen Gruppen nachgewiesen werden. In der Studie von Spiekerkoetter et al. (2013) wurde dargelegt, dass Tacrolimus einen positiven Einfluss auf dysfunktionales BMP2-Signaling aufweist. So wurde in der PBMC-Untersuchung der hier vorliegenden Arbeit weniger der T β RII-ALK1-Signalweg, welcher vermehrt TGF- β und VEGF exprimiert, sondern der BMP2-ALK1-Signalweg stimuliert, was zu einer geringeren Expression von TGF- β und VEGF führte (García de Vinuesa, Abdelilah-Seyfried, Knaus, Zwijsen, Bailly, 2016). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit unterstützen somit die Resultate von Spiekerkoetter et al. (2013), dass Tacrolimus einen verstärkenden Einfluss auf den BMP2-Signalweg hat. Dies konnte hinsichtlich der Parameter VEGF und TGF- β bestätigt werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden höhere Tacrolimus-Konzentrationen als von Spiekerkoetter et al. (2013) verwendet, bei denen die meisten signifikanten Unterschiede auftraten. Es wurde stattdessen eine um den Faktor 1000 höhere Dosierung

gewählt, für welche in der Studie schwächere Effekte nachgewiesen wurden. Obwohl ein signifikanter Effekt der Tacrolimus-Stimulation auf die TGF- β - und VEGF-Freisetzung nachgewiesen werden konnte, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des Effektes in den verschiedenen Gruppen. Dies sollte in einer größeren Stichprobe überprüft werden.

Die therapeutische Relevanz des TGF- β -Signalweges wurde bereits mit der Einführung des neuen Medikaments Sotatercept, welches als Ligandenfänger der TGF- β -Superfamilie dient, nachgewiesen. In der klinischen Studie mit Sotatercept zeigte sich, dass eine Balance zwischen dem Wachstum fördernden *growth differentiation factor* - Signalweg und dem wachstumsinhibierenden -BMP-Signalweg hergestellt werden kann (Humbert et al., 2021).

Zusammenfassend konnte für Tacrolimus somit ein verstärkender Effekt auf den BMPR2-Signalweg sowie die Möglichkeit der *ex vivo* Stimulation isolierter PBMC als *Readout* der therapeutischen Ansprache nachgewiesen werden.

4.6 Periphere Biomarker in humanem Plasma bei *ALK1/ENG*- und *BMPR2*-Mutation

4.6.1 Auswertung von TGF- β - und VEGF-Konzentrationen. Das Plasma aus der PBMC-Isolation der unterschiedlichen Patientengruppen HHT+PAH, BMPR2-PAH, IPAHA, HHT und der gesunden Kontrollgruppe wurde nach den peripheren Biomarkern TGF- β und VEGF untersucht, um mögliche Unterschiede der, durch den dysfunktionalen ALK1/ENG/BMPR2-Rezeptorkomplex regulierten, Signalwege zu identifizieren. Für VEGF-Level in humanem Plasma konnte kein signifikanter Unterschied in den Gruppen gezeigt werden. Es konnte ein signifikanter Unterschied für TGF- β -Level in humanem Plasma für die Gruppen HHT und BMPR2-PAH festgestellt werden.

In der Übersichtsarbeit von Botella et al. (2015) konnte für HHT eine erhöhte Plasmakonzentration für VEGF bereits nachgewiesen werden. In der hier vorliegenden Arbeit konnte für VEGF kein signifikanter Unterschied gefunden werden, jedoch für TGF- β zwischen der BMPR2-PAH-Gruppe und der HHT-Gruppe. Botella et al. (2015) führten abweichende Plasmaspiegel bei HHT-Patienten bei Biomarkern wie VEGF und TGF- β auf abweichende Studienpopulationen, genetische Unterschiede und auf die Einteilung des Studienkollektivs zurück (Botella, Albiñana, Ojeda-Fernandez, Recio-Poveda, Bernabéu, 2015). Ähnlich wie in anderen Untersuchungen zeigte sich eine hohe Variabilität der Ausprägung der Biomarker im Plasma der Patienten und Probanden. Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass in der hier vorliegenden Arbeit für VEGF kein

signifikanter Unterschied detektiert werden konnte. Der gefundene signifikante Unterschied zwischen BMPR2-PAH und HHT für TGF- β unterstützt die Annahme, dass es unterschiedliche Auswirkungen, je nach Dysfunktionalität von ALK1 bzw. BMPR2, auf den ALK1/BMPR2-Signalweg gibt. Es ist daher sinnvoll, die Untersuchung in einer größeren Patientengruppe zu wiederholen.

4.6.2 Untersuchung zirkulierender Biomarker mittels PEA. Das Plasma aus der PBMC-Isolation der unterschiedlichen Patientengruppen BMPR2-PAH, HHT und der gesunden Kontrollgruppe wurde nach unterschiedlichen Spiegeln für periphere, kardiovaskuläre Biomarker untersucht, um mögliche Unterschiede der, durch den dysfunktionalen ALK1/ENG- und BMPR2-Rezeptorkomplex regulierten, Signalwege zu identifizieren.

Für ADM, ADAM-TS13, BOC und IL6 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der HHT-Gruppe. Des Weiteren konnte ein signifikanter Unterschied für ADAM-TS13, IDUA und REN zwischen der Kontrollgruppe und der BMPR2-PAH-Gruppe nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich für den Biomarker FABP2 zwischen der Kontrollgruppe und der BMPR2-PAH-Gruppe sowie zwischen den Gruppen HHT und BMPR2-PAH. Für die Biomarker FGF-21, SOD2 und THBS2 konnte ein signifikanter Unterschied in den Gruppen festgestellt werden, jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im Tukey *post-hoc* Test. Da es sich um eine explorative Analyse handelte, wurde nicht für multiples Testen oder Störvariablen korrigiert.

Die Gruppen unterschieden sich signifikant im Plasmaspiegel für den Biomarker ADM. Es zeigte sich ein signifikant höherer Spiegel in der HHT-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe. ADM hat eine hypotensive Wirkung mittels Vasodilatation und steigert die Diurese (Kitamura et al., 2002). Ebenso konnte in *vascular smooth muscle cells* (VSMC) von Ratten eine Beteiligung von ADM an der vaskulären Proliferation und Migration sowie am vaskulären *Remodeling* gezeigt werden (Kitamura et al., 2002). In einer anderen Studie zu ADM bei HHT-Patienten konnte eine signifikant höhere ADM-Konzentration im Serum von HHT-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden nachgewiesen werden (Iriarte et al., 2021). Die hier vorliegende Arbeit zeigt zusammen mit den aufgeführten Studien, dass ADM eine wichtige Rolle bei der Angiogenese bei HHT spielen könnte.

Für ADAM-TS13 konnte ein signifikanter Unterschied im Plasmaspiegel in den

Gruppen gefunden werden. Hierbei zeigte sich ein signifikant höherer Wert in der Kontrollgruppe sowohl im Vergleich zu HHT als auch im Vergleich zu BMPR2-PAH. ADAM-TS13 spaltet den von-Willebrand-Faktor (vWF) und reguliert somit die durch den vWF vermittelte Thrombenbildung (Akiyama et al. 2009). Somit konnte dem Biomarker eine antikoagulatorische Wirkung nachgewiesen werden (Levy et al., 2005). Dem Biomarker ADAM-TS13 konnte eine Beteiligung an der Pathogenese der CTEPH und eine Reduktion im Plasma bei PH (PH der Gruppe I und III) - und CTEPH-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden (Newnham, 2019; Panzenboeck & Sadushi-Kolici, 2018). Zum Zeitpunkt der hier vorliegenden Arbeit konnte keine Verbindung von ADAM-TS13 und HHT nachgewiesen werden. Der signifikant niedrigere ADAM-TS13-Level bei BMPR2-PAH stimmt mit den Daten von Panzenboeck et al. (2018) überein, in denen ein signifikant geringerer Plasmaspiegel für ADAM-TS13 für PH-Patienten (unter denen HPAH-Patienten waren) gefunden werden konnte.

Der Biomarker BOC konnte als signifikant unterschiedlich im Plasma in den Gruppen nachgewiesen werden. Hier wies die Kontrollgruppe den signifikant höheren Wert im Vergleich zu HHT auf. Eine Beteiligung von BOC an der Zell-Zell-Interaktion und am MAPK-Signalweg konnte bisher nachgewiesen werden (Sanchez-Arrones et al., 2012). Zum Zeitpunkt der hier vorliegenden Arbeit konnte keine Verbindung von BOC mit PAH oder HHT hergestellt werden.

Für IL6 konnte ein signifikanter Unterschied im Plasma in den Gruppen gezeigt werden. Hierbei wies HHT den signifikant höheren Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. IL6 wurden diverse immunregulatorische Funktionen nachgewiesen, wie beispielsweise die Vermittlung der Akuten-Phase-Reaktion und die Regulation der Differenzierung und Proliferation von T-Zellen (Horn et al., 2000). IL6-Werte waren im Plasma von PAH-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden signifikant erhöht (Humbert et al., 1995). Die Pathogenese der PAH wurde hierbei im Hypoxie-induzierte-PH-Mausmodell über den IL6/IL21 Signalweg vermittelt (Hashimoto-Kataoka et al., 2015). IL6-Level im Plasma bei HHT-Patienten wurden zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht untersucht. Jedoch wurde der Einfluss des ALK1/ENG-Signalweges auf die Immunantwort in humanen Endothelzellen und bei HHT-Patienten *in vivo* erforscht (Guilhem et al., 2013; Ojeda-Fernández et al., 2016). Hierbei konnte im Mausmodell eine erhöhte Infektanfälligkeit und eine reduzierte Makrophagen-Aktivität nachgewiesen werden (Ojeda-Fernández et al., 2016). Bei HHT-Patienten konnte *in vivo*

eine signifikante Lymphopenie im Vollblut und eine signifikante Erhöhung der Immunglobuline G und A im Serum im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden gezeigt werden (Guilhem et al., 2013). Der in der hier vorliegenden Arbeit gefundene signifikante Unterschied zwischen Kontrollgruppe und HHT stimmt somit mit den aktuellen Studiendaten überein, dass HHT-Patienten über dysfunktionales ALK1/ENG-Signaling eine Veränderung der immunologischen Parameter aufweisen.

Der Biomarker IDUA konnte als signifikant unterschiedlich im Plasma in den Gruppen nachgewiesen werden. Hierbei wies die Kontrollgruppe einen signifikant höheren Wert als die Gruppe BMPR2-PAH auf. Das Protein IDUA hydrolysiert L-Iduronat von Glykosamynoglykanen und ist bei Dysfunktionalität an der Entstehung von Mukopolysaccharidose I beteiligt (Bie et al., 2013). Eine Verbindung zu PAH und HHT konnte zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht hergestellt werden.

Für REN konnte im Plasma ein signifikanter Unterschied in den Gruppen nachgewiesen werden. Die Gruppe BMPR2-PAH wies hierbei einen signifikant höheren Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. REN ist Teil des RAAS mit der Funktion der Umwandlung von Angiotensinogen zu Angiotensin I und ist somit an der Erhöhung des Blutdrucks durch Natrium-Retention in den Nieren beteiligt (Nguyen et al., 2002). Dem RAAS wurde eine Beteiligung an PAH nachgewiesen. So waren die Serumwerte von REN und Angiotensin I bei IPAH-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung signifikant erhöht (Maron et al., 2014). Zum Zeitpunkt der hier vorliegenden Arbeit konnte keine Verbindung von REN zu HHT nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit stimmen mit den Daten von Maron et al. (2014) überein, dass REN bei PAH-Patienten erhöht ist. Limitierend ist das unterschiedliche Patientenkollektiv, da die Vergleichbarkeit von IPAH- und HPAH-Patienten eingeschränkt ist.

Für FABP2 konnte ein signifikanter Unterschied im Plasma in den Gruppen nachgewiesen werden. Hierbei wies die Gruppe BMPR2-PAH einen signifikant höheren Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu HHT auf. FABP2 bindet Fettsäuren mit erhöhter Spezifität für langkettige Fettsäuren (Storch et al., 2009). Bei *FABP2*-defizienten Mäusen konnten erhöhte Triglycerid-Spiegel im Serum festgestellt werden sowie *steatosis hepatis* und eine erhöhte Insulinresistenz im Vergleich zu gesunden Mäusen (Vassileva et al., 2000). Ein *FABP2*-Polymorphismus führte beim Menschen zu erhöhten LEP-Spiegeln im Serum sowie zu Übergewicht und verringerter Insulinsensitivität im Vergleich zu gesunden Probanden (Hegele, 1998). Zum Zeitpunkt dieser Arbeit konnte keine Verbindung zwischen PAH und HHT zu FABP2 gezeigt werden. Da ein

signifikanter Unterschied für BMPR2-PAH zu Kontrollgruppe und HHT gefunden werden konnte und bisher keine Daten bezüglich FABP2-Plasmalevel bei PAH- und HHT-Patienten vorliegen, kann angenommen werden, dass ein Unterschied im BMPR2-Signalweg Ursache der signifikanten FABP2-Plasmaspiegel-Erhöhung ist.

Der Plasmaspiegel von FGF-21 war in den Gruppen unterschiedlich. FGF-21 fördert die Insulin-unabhängige Glukoseaufnahme in differenzierten Adipozyten (Kharitonov et al., 2005). Seine Wirkung auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer PAH ist jedoch umstritten. FGF-21 wurde einerseits als signifikant erhöht im Plasma bei Patienten mit IPAH im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden beschrieben (Papathanasiou et al., 2021). Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass FGF-21 zu einer Abschwächung der Hypoxie-induzierten Apoptose und Dysfunktion von *human pulmonary arterial endothelial cells* (HPAECs) führte (Chen et al., 2018).

Die Gruppen unterschieden sich im SOD2-Plasmaspiegel. SOD2 ist an der Beseitigung von freien Radikalen beteiligt (MacMillan-Crow & Thompson, 1999). Des Weiteren wurde in einer Studie der Einfluss von oxidativem Stress auf die Entwicklung von Endotheldysfunktion in einem HHT-Mausmodell untersucht (Jerkic et al., 2012). Hierbei wurde ebenfalls die Beteiligung von SOD2 an der Beseitigung von freien Radikalen zur Reduzierung von oxidativem Stress nachgewiesen. Ein signifikanter Unterschied eines *SOD2*-Polymorphismus konnte bereits in einer chinesischen Population zwischen HPAH- und IPAH-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden gefunden werden. Dieser Polymorphismus führte zu einer geringeren Exprimierung des *SOD2*-Gens (Xu et al., 2017).

Für den THBS2-Plasmaspiegel konnte ein Unterschied in den Gruppen nachgewiesen werden. THBS2 weist eine antiangiogenetische Funktion auf (Bornstein et al., 2000; Koch et al., 2011; Streit et al., 1999). Des Weiteren konnte THBS2 bei MCT-induzierter PH bei Ratten als über das doppelte erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden (Franz et al., 2016). In einer Studie zu Plasmabiomarkern bei HHT-Patienten konnte ein signifikanter Unterschied für THBS2 je nach AVM-Manifestation festgestellt werden, wobei er bei HHT-Patienten mit CAVM signifikant niedriger war als bei anderen AVM-Manifestationen bei HHT (Wetzel-Strong et al., 2021). Diese Studien und die hier vorliegende Arbeit zeigen, dass THBS2 sowohl an der PAH als auch an der HHT beteiligt sein könnte. Die antiangiogenetischen Eigenschaften von THBS2 könnten bei der gestörten Angiogenese des ALK1/BMP2-Signalweges eine Rolle spielen.

Die hier gefundenen Biomarker, in denen sich die Patienten mit *BMP2*-Mutation

(*BMPR2*-PAH) und *ALK1/ENG*-Mutation (HHT) signifikant voneinander unterschieden, müssen in einer zweiten, größeren Patientengruppe überprüft und auf Störvariablen wie Alter, *body-mass-index* (BMI), Komorbiditäten und Stoffwechsel untersucht werden. Die vorliegenden Daten bezüglich der Tacrolimus-Gabe unterstützen den vermuteten, wiederherstellenden Einfluss auf den *BMPR2*-Signalweg. Des Weiteren heben die Unterschiede der Auswirkungen auf Plasmabiomarker bei *BMPR2*- und *ALK1/ENG*-Mutation die Wichtigkeit des TGF- β -Signalweges für zukünftige Forschung hervor. Dies wird zusätzlich durch den neu entdeckten Ligandenfänger Sotatercept unterstützt, welcher durch seine Einflussnahme auf den TGF- β -Signalweg, wie dargestellt von Humbert et al. (2021), die Bedeutsamkeit des TGF- β /BMP-*Signaling* für die PAH zeigt. Des Weiteren wird die Möglichkeit des TGF- β -Signalwegs als Anknüpfungspunkt für zukünftige Therapien hervorgehoben.

Zusammenfassung

Hintergrund: Die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) ist eine seltene und potenziell lebensbedrohliche Erkrankung. Gleiches gilt für die erbliche hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT). Aufgrund gemeinsamer pathogenetischer Mechanismen kann die HHT gemeinsam mit einer PAH auftreten, die aktuell aufgrund unspezifischer Symptome spät diagnostiziert wird und für die es bisher nur eingeschränkte Therapiemöglichkeiten gibt. Die Gemeinsamkeit hierbei ist der *transforming growth factor β* (TGF- β) - Signalweg, wobei bei erblicher PAH größtenteils der *bone morphogenetic protein receptor type 2* (BMP2) Abschnitt und bei HHT meist der *activin A receptor-like type 1* (ALK1) oder der *Endoglin* (ENG) Anteil dysfunktional ist. Diese Arbeit soll daher potenzielle Unterschiede von nachgeschalteten Signalmolekülen bei Patienten mit HHT oder PAH mit BMP2-Mutation (hereditäre PAH, HPAH) identifizieren, um die verschiedenen Auswirkungen der Mutationen auf den TGF- β -Signalweg herauszustellen. Des Weiteren sollte das therapeutische Potential von Tacrolimus bzgl. einer Steigerung des BMP2/ALK1/ENG-Signalweges in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von Patienten mit HHT, PAH und beiden Erkrankungen (HHT-PAH) untersucht werden. Die Studie wurde als explorative Machbarkeitsstudie konzipiert, um zu untersuchen, welche Änderungen zu erwarten sind, und wieviele Patienten für zukünftige Studien rekrutiert werden müssen, um diese Faktoren weiter quantitativ zu untersuchen.

Methodik: Plasma von Patienten mit HHT, HHT-PAH, HPAH, PAH ohne Mutation (idiopathische PAH, IPAH) und gesunden Kontrollprobanden wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) hinsichtlich der Quantität des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und des TGF- β , als nachgeschaltete Moleküle des BMP2/ALK1/ENG-Signalweges, untersucht. Darüber hinaus wurde mithilfe eines *Proximity Extension Assay* (PEA) das Plasma von BMP2-PAH, HHT und gesunden Kontrollen hinsichtlich 92 Biomarker analysiert. Des Weiteren wurden PBMC aller Gruppen mit unterschiedlichen Tacrolimus-Dosierungen behandelt und hinsichtlich der Veränderung der Parameter VEGF und TGF- β untersucht.

Ergebnisse: Der TGF- β -Plasmaspiegel unterschied sich signifikant zwischen BMP2-PAH und HHT. Im Biomarker-Screening wurden signifikante Unterschiede in den Plasmaspiegeln von zehn Biomarkern gefunden, zum Beispiel ein erhöhter *fatty acid binding protein 2* (FABP2) -Spiegel bei Patienten mit BMP2-PAH im Vergleich zu HHT-Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Darüber hinaus zeigten die Plasmaspiegel verschiedener Biomarker signifikante Unterschiede in der Gruppe

BMPR2-PAH und HHT im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Die Behandlung der PBMC mit unterschiedlichen Tacrolimus-Konzentrationen ergab eine signifikante Senkung von VEGF und TGF- β in den Gruppen. Die Senkung der TGF- β - und VEGF-Freisetzung aus PBMC nach Tacrolimus-Gabe unterstützt die bisherigen Untersuchungen, die einen positiven Effekt von Tacrolimus auf den TGF- β -Signalweg bei *BMPR2*-Mutation zeigten.

Schlussfolgerung: Die Unterschiede der Biomarker im Plasma bei verschiedenen Mutationen im TGF- β -Signalweg zeigen dessen Relevanz für zukünftige Studien und sollten in einer größeren Patientenpopulation überprüft werden. Die *ex vivo* Behandlung von PBMC eignet sich als Untersuchungsmethode für therapeutische Ansätze des BMPR2/ALK1/ENG-Signalweges.

Summary

Background: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare and potentially life-threatening disease. The same applies to the disease hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT). Because of similar pathological mechanisms HHT and PAH can occur together, which increases the mortality due to inadequate treatment options and late diagnosis. Commonality is the *transforming growth factor β* (TGF- β)-signaling pathway in which the hereditary PAH (HPAH) is mostly dysfunctional in the *bone morphogenetic protein receptor type 2* (*BMPR2*) and the HHT mostly the *activin A receptor-like type 1* (*ALK1*) or the *Endoglin* (*ENG*) section. Therefore, the present work deals with the search for potential downstream signaling molecules in HHT or PAH with *BMPR2*-mutation (HPAH) in order to point out the different effects of mutations on the TGF- β -signaling pathway. In addition, the therapeutic potential of tacrolimus treatment was tested in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with HHT, PAH and both diseases (HHT-PAH) regarding the activation of the *BMPR2/ALK1/ENG*-signaling pathway. This study was designed as exploratory feasibility study to examine the expected changes and how many patients will be need in future for a quantitative investigation of the factors.

Methods: The plasma of patients with HHT, HHT-PAH, HPAH, PAH without mutations (idiopathic PAH, IPAH) and healthy control subjects was examined for quantity of VEGF and TGF- β as downstream molecules of the *BMPR2/ALK1/ENG*-signaling pathway using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In addition, the plasma of HPAH, HHT and healthy controls was analyzed for 92 biomarkers through proximity extension assay (PEA). Furthermore, the PBMC of all groups were treated with different concentrations of tacrolimus and examined for changes in the parameters VEGF and TGF- β .

Results: Regarding the biomarkers, a significant difference of TGF- β in the plasma could be found for HPAH and HHT. Significant differences in biomarkers could be detected, for example an increase of fatty acid binding protein 2 (FABP2)-plasma levels in patients with *BMPR2*-PAH compared to HHT and healthy controls. In addition, several plasma-biomarkers had a significant difference in the *BMPR2*-PAH- and HHT-group compared to healthy controls. The treatment of the PBMC with tacrolimus showed a significant reduction in VEGF and TGF- β for the groups. The reduction of VEGF- and TGF- β -levels in PBMC after tacrolimus treatment supports previous studies which found a positive therapeutic effect for tacrolimus regarding the TGF- β -signaling pathway in *BMPR2*-

mutation.

Conclusion: The differences in biomarkers in patients with different mutations in the TGF- β -signaling pathway show its relevance for future studies and should be examined in a bigger population of patients. In addition, the *ex vivo* treatment of PBMC is suitable for examining therapeutic approaches regarding the BMPR2/ALK1/ENG signaling pathway.

Literaturverzeichnis

- Abdalla, S. A., Gallione, C. J., Barst, R. J., Horn, E. M., Knowles, J. A., Marchuk, D. A. et al. (2004). Primary pulmonary hypertension in families with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *The European respiratory journal*, 23 (3), 373–377. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00085504>
- Abdalla, S. A. & Letarte, M. (2006). Hereditary haemorrhagic telangiectasia. Current views on genetics and mechanisms of disease. *Journal of medical genetics*, 43 (2), 97–110. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.030833>
- Akiyama, M., Takeda, S., Kokame, K., Takagi, J., & Miyata, T. (2009). Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(46), 19274-19279. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909755106>
- Al-Naamani, K., Hijal, T., Nguyen, V., Andrew, S., Nguyen, T. & Huynh, T. (2008). Predictive values of the electrocardiogram in diagnosing pulmonary hypertension. *International journal of cardiology*, 127 (2), 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.06.005>
- Arsura, M., Panta, G. R., Bilyeu, J. D., Cavin, L. G., Sovak, M. A., Oliver, A. A. et al. (2003). Transient activation of NF-kappaB through a TAK1/IKK kinase pathway by TGF-beta1 inhibits AP-1/SMAD signaling and apoptosis. Implications in liver tumor formation. *Oncogene*, 22 (3), 412–425. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206132>
- Arvidsson, M., Ahmed, A., Bouzina, H. & Rådegran, G. (2019). Matrix metalloproteinase 7 in diagnosis and differentiation of pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary circulation*, 9 (4), 2045894019895414. <https://doi.org/10.1177/2045894019895414>
- Arvidsson, M., Ahmed, A., Bouzina, H. & Rådegran, G. (2021). Plasma proteoglycan prolargin in diagnosis and differentiation of pulmonary arterial hypertension. *ESC heart failure*, 8 (2), 1230–1243. <https://doi.org/10.1002/ehf2.13184>
- Astellas Pharma GmbH (2022). Prograf 5mg/ml: Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung. Zugriff am 21.03.2023.
- Atri, D., Larrivée, B., Eichmann, A. & Simons, M. (2013). Endothelial signaling and the molecular basis of arteriovenous malformation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1475-1>
- Austin, E. D., Cogan, J. D., West, J. D., Hedges, L. K., Hamid, R., Dawson, E. P. et al. (2009). Alterations in oestrogen metabolism. Implications for higher penetrance of

- familial pulmonary arterial hypertension in females. *The European respiratory journal*, 34 (5), 1093–1099. <https://doi.org/10.1183/09031936.00010409>
- Awad, K. S., Elinoff, J. M., Wang, S., Gairhe, S., Ferreyra, G. A., Cai, R. et al. (2016). Raf/ERK drives the proliferative and invasive phenotype of BMP2-silenced pulmonary artery endothelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 310(2), L187-L201. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00303.2015>
- Belaguli, N. S., Zhang, M., Rigi, M., Aftab, M. & Berger, D. H. (2007). Cooperation between GATA4 and TGF-beta signaling regulates intestinal epithelial gene expression. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 292 (6), G1520-33. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00236.2006>.
- Berg, J., Porteous, M., Reinhardt, D., Gallione, C., Holloway, S., Umasunthar, T. et al. (2003). Hereditary haemorrhagic telangiectasia. A questionnaire based study to delineate the different phenotypes caused by endoglin and ALK1 mutations. *Journal of medical genetics*, 40 (8), 585–590. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.8.585>
- Bie, H., Yin, J., He, X., Kermodé, A. R., Goddard-Borger, E. D., Withers, S. G. et al. (2013). Insights into mucopolysaccharidosis I from the structure and action of α -L-iduronidase. *Nature chemical biology*, 9 (11), 739–745. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1357>
- Bornstein, P., Armstrong, L. C., Hankenson, K. D., Kyriakides, T. R. & Yang, Z. (2000). Thrombospondin 2, a matricellular protein with diverse functions. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 19 (7), 557–568. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(00\)00104-9](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(00)00104-9)
- Botella, L.-M., Albiñana, V., Ojeda-Fernandez, L., Recio-Poveda, L. & Bernabéu, C. (2015). Research on potential biomarkers in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Frontiers in genetics*, 6, 115. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00115>
- Bottomley, M. J., Webb, N. J., Watson, C. J., Holt, P. J., Freemont, A. J. & Brenchley, P. E. (1999). Peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis spontaneously secrete vascular endothelial growth factor (VEGF). Specific up-regulation by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in synovial fluid. *Clinical and experimental immunology*, 117 (1), 171–176. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00949.x>
- Bouzina, H., Hesselstrand, R. & Rådegran, G. (2019). Higher plasma fibroblast growth factor 23 levels are associated with a higher risk profile in pulmonary arterial

- hypertension. *Pulmonary circulation*, 9 (4), 2045894019895446. <https://doi.org/10.1177/2045894019895446>
- Boyer, H., Fernandes, P., Duran, O., Hunter, D. & Goding, G. (2011). Office-based sclerotherapy for recurrent epistaxis due to hereditary hemorrhagic telangiectasia. A pilot study. *International forum of allergy & rhinology*, 1 (4), 319–323. <https://doi.org/10.1002/alr.20053>
- Buscarini, E., Leandro, G., Conte, D., Danesino, C., Daina, E., Manfredi, G. et al. (2011). Natural history and outcome of hepatic vascular malformations in a large cohort of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Digestive diseases and sciences*, 56 (7), 2166–2178. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1585-2>
- Chavan, A., Caselitz, M., Gratz, K.-F., Lotz, J., Kirchhoff, T., Piso, P. et al. (2004). Hepatic artery embolization for treatment of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and symptomatic hepatic vascular malformations. *European radiology*, 14 (11), 2079–2085. <https://doi.org/10.1007/s00330-004-2455-5>
- Chavan, A., Schumann-Binarsch, S., Luthe, L., Nickau, B., Elsässer, A., Kühnel, T. et al. (2013). Systemic therapy with bevacizumab in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT). *VASA. Zeitschrift für Gefasskrankheiten*, 42 (2), 106–110. <https://doi.org/10.1024/0301-1526/a000253>
- Cheifetz, S., Bellón, T., Calés, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massagué, J. et al. (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 267 (27), 19027–19030. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)41732-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41732-2)
- Chen, A., Liu, J., Zhu, J., Wang, X., Xu, Z., Cui, Z. et al. (2018). FGF21 attenuates hypoxia-induced dysfunction and apoptosis in HPAECs through alleviating endoplasmic reticulum stress. *International journal of molecular medicine*, 42 (3), 1684–1694. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3705>
- Chizinga, M., Rudkovskaia, A. A., Henderson, K., Pollak, J., Garcia-Tsao, G., Young, L. H. et al. (2017). Pulmonary Hypertension Prevalence and Prognosis in a Cohort of Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Undergoing Embolization of Pulmonary Arteriovenous Malformations. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 196 (10), 1353–1356. <https://doi.org/10.1164/rccm.201702-0267LE>
- Chua, B. H., Krebs, C. J., Chua, C. C. & Diglio, C. A. (1992). Endothelin stimulates protein synthesis in smooth muscle cells. *The American journal of physiology*, 262 (4 Pt 1), E412-6. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1992.262.4.E412>

- Cottin, V., Dupuis-Girod, S., Lesca, G. & Cordier, J.-F. (2007). Pulmonary vascular manifestations of hereditary hemorrhagic telangiectasia (rendu-osler disease). *Respiration; international review of thoracic diseases*, 74 (4), 361–378. <https://doi.org/10.1159/000103205>
- David, L., Feige, J.-J. & Bailly, S. (2009). Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews*, 20 (3), 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.05.001>
- David, L., Mallet, C., Keramidas, M., Lamandé, N., Gasc, J.-M., Dupuis-Girod, S. et al. (2008). Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circulation research*, 102 (8), 914–922. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.165530>
- David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J.-J. & Bailly, S. (2007). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*, 109 (5), 1953–1961. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-034124>
- Dewachter, L., Adnot, S., Fadel, E., Humbert, M., Maitre, B., Barlier-Mur, A.-M. et al. (2006). Angiopoietin/Tie2 pathway influences smooth muscle hyperplasia in idiopathic pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 174 (9), 1025–1033. <https://doi.org/10.1164/rccm.200602-304OC>
- Dhaun, N., Vachieri, J. L., Benza, R. L., Naeije, R., Hwang, L. J., Liu, X., et al. (2014). Endothelin antagonism and uric acid levels in pulmonary arterial hypertension: clinical associations. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 33(5), 521-527. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2014.01.853>
- DiRaimondo, T. R., Klöck, C., Warburton, R., Herrera, Z., Penumatsa, K., Toksoz, D. et al. (2014). Elevated transglutaminase 2 activity is associated with hypoxia-induced experimental pulmonary hypertension in mice. *ACS chemical biology*, 9 (1), 266–275. <https://doi.org/10.1021/cb4006408>.
- Dorfmueller, P., Perros, F., Balabanian, K. & Humbert, M. (2003). Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*, 22 (2), 358–363. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00038903>
- Dumitrescu, D., Gerhardt, F., Viethen, T., Schmidt, M., Mayer, E. & Rosenkranz, S. (2016). Case report. Subjective loss of performance after pulmonary embolism in an athlete- beyond normal values. *BMC pulmonary medicine*, 16, 21. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0180-x>

- Dupuis-Girod, S., Chesnais, A.-L., Ginon, I., Dumortier, J., Saurin, J.-C., Finet, G. et al. (2010). Long-term outcome of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and severe hepatic involvement after orthotopic liver transplantation. A single-center study. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 16 (3), 340–347. <https://doi.org/10.1002/lt.21990>
- Dupuis-Girod, S., Ginon, I., Saurin, J.-C., Marion, D., Guillot, E., Decullier, E. et al. (2012). Bevacizumab in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and severe hepatic vascular malformations and high cardiac output. *JAMA*, 307 (9), 948–955. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.250>
- Edwards, C. P., Shehata, N. & Faughnan, M. E. (2012). Hereditary hemorrhagic telangiectasia patients can tolerate anticoagulation. *Annals of hematology*, 91 (12), 1959–1968. <https://doi.org/10.1007/s00277-012-1553-8>
- Ewert, R., Halank, M., Bruch, L. & Ghofrani, H. A. (2012). A case series of patients with severe pulmonary hypertension receiving an implantable pump for intravenous prostanoid therapy. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 186 (11), 1196–1198. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.186.11.1196>
- Eyries, M., Montani, D., Girerd, B., Perret, C., Leroy, A., Lonjou, C. et al. (2014). EIF2AK4 mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nature genetics*, 46 (1), 65–69. <https://doi.org/10.1038/ng.2844>
- Fang, W. B., Mafuvadze, B., Yao, M., Zou, A., Portsche, M. & Cheng, N. (2015). TGF- β Negatively Regulates CXCL1 Chemokine Expression in Mammary Fibroblasts through Enhancement of Smad2/3 and Suppression of HGF/c-Met Signaling Mechanisms. *PloS one*, 10 (8), e0135063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135063>
- Faughnan, M. E., Granton, J. T. & Young, L. H. (2009). The pulmonary vascular complications of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *The European respiratory journal*, 33 (5), 1186–1194. <https://doi.org/10.1183/09031936.00061308>
- Faughnan, M. E., Mager, J. J., Hetts, S. W., Palda, V. A., Lang-Robertson, K., Buscarini, E. et al. (2020). Second International Guidelines for the Diagnosis and Management of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Annals of internal medicine*, 173 (12), 989–1001. <https://doi.org/10.7326/M20-1443>
- Faughnan, M. E., Palda, V. A., Garcia-Tsao, G., Geisthoff, U. W., McDonald, J., Proctor,

- D. D. et al. (2011). International guidelines for the diagnosis and management of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Journal of medical genetics*, 48 (2), 73–87. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.069013>
- Fernandez-L, A., Garrido-Martin, E., Sanz-Rodriguez, F., Ramirez, J.-R., Morales-Angulo, C., Zarrabeitia, R. et al. (2017). Therapeutic action of tranexamic acid in hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT). Regulation of ALK-1/endoglin pathway in endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis*, 97 (02), 254–262. <https://doi.org/10.1160/TH06-07-0373>
- Fisher, M. R., Criner, G. J., Fishman, A. P., Hassoun, P. M., Minai, O. A., Scharf, S. M. et al. (2007). Estimating pulmonary artery pressures by echocardiography in patients with emphysema. *The European respiratory journal*, 30 (5), 914–921. <https://doi.org/10.1183/09031936.00033007>
- Franz, M., Grün, K., Betge, S., Rohm, I., Ndongson-Dongmo, B., Bauer, R., Jung, C. (2016). Lung tissue remodelling in MCT-induced pulmonary hypertension: A proposal for a novel scoring system and changes in extracellular matrix and fibrosis associated gene expression. *Oncotarget* (7), 81241–81254.
- Frost, A., Badesch, D., Gibbs, J. S. R., Gopalan, D., Khanna, D., Manes, A. et al. (2019). Diagnosis of pulmonary hypertension. *The European respiratory journal*, 53 (1). <https://doi.org/10.1183/13993003.01904-2018>
- Gainé, S. P. & Rubin, L. J. (1998). Primary pulmonary hypertension. *The Lancet*, 352 (9129), 719–725. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)02111-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)02111-4)
- Galiè, N., Channick, R. N., Frantz, R. P., Grünig, E., Jing, Z. C., Moiseeva, O. et al. (2019). Risk stratification and medical therapy of pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*, 53 (1). <https://doi.org/10.1183/13993003.01889-2018>
- Galiè, N., Ghofrani, H. A., Torbicki, A., Barst, R. J., Rubin, L. J., Badesch, D. et al. (2005). Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine*, 353 (20), 2148–2157. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050010>
- Galiè, N., Hoeper, M. M., Humbert, M., Torbicki, A., Vachiery, J.-L., Barbera, J. A. et al. (2009). Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. The 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 the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European heart journal*, 30 (20), 2493–2537. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp297>
- Galiè, N., Humbert, M., Vachiery, J.-L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A. 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). *European heart journal*, 37 (1), 67–119. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv317>
- Galiè, N., Müller, K., Scalise, A. V., & Grünig, E. (2015). PATENT PLUS: a blinded, randomised and extension study of riociguat plus sildenafil in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal*, 45(5), 1314-1322.
- Galiè, N., Rubin, L. J., Hoeper, M. M., Jansa, P., Al-Hiti, H., Meyer, G. M.B. et al. (2008). Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study). A double-blind, randomised controlled trial. *The Lancet*, 371 (9630), 2093–2100. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60919-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60919-8)
- Gall, H., Felix, J. F., Schneck, F. K., Milger, K., Sommer, N., Voswinckel, R. et al. (2017). The Giessen Pulmonary Hypertension Registry: survival in pulmonary hypertension subgroups. *The journal of heart and lung transplantation*, 36(9), 957-967. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2017.02.016>
- Gangopahyay, A., Oran, M., Bauer, E. M., Wertz, J. W., Comhair, S. A., Erzurum, S. C. et al. (2011). Bone morphogenetic protein receptor II is a novel mediator of endothelial nitric-oxide synthase activation. *The Journal of biological chemistry*, 286 (38), 33134–33140. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.274100>
- García de Vinuesa, A., Abdelilah-Seyfried, S., Knaus, P., Zwijsen, A. & Bailly, S. (2016). BMP signaling in vascular biology and dysfunction. *Cytokine & growth factor reviews*, 27, 65–79. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.12.005>
- Garcia-Tsao, G., Korzenik, J. R., Young, L., Henderson, K. J., Jain, D., Byrd, B. et al. (2000). Liver disease in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *The New England journal of medicine*, 343 (13), 931–936. <https://doi.org/10.1056/NEJM200009283431305>
- Ghofrani, H.-A., Galiè, N., Grimminger, F., Grünig, E., Humbert, M., Jing, Z.-C. et al. (2013). Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine*, 369 (4), 330–340. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209655>
- Ghofrani, H. A., Pepke-Zaba, J., Barbera, J. A., Channick, R., Keogh, A. M., Gomez-Sanchez, M. A. et al. (2004). Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in

- pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 43 (12 Suppl S), 68S-72S. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.02.031>
- Girerd, B., Montani, D., Coulet, F., Sztrymf, B., Yaici, A., Jaïs, X. et al. (2010). Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in patients carrying an ACVRL1 (ALK1) mutation. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 181 (8), 851–861. <https://doi.org/10.1164/rccm.200908-1284OC>
- González-Núñez, M., Muñoz-Félix, J. M. & López-Novoa, J. M. (2013). The ALK-1/Smad1 pathway in cardiovascular physiopathology. A new target for therapy? *Biochimica et biophysica acta*, 1832 (10), 1492–1510. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.016>
- González-Tajuelo, R., González-Sánchez, E., Silván, J., Muñoz-Callejas, A., Vicente-Rabareda, E., García-Pérez, J. et al. (2020). Relevance of PSGL-1 Expression in B Cell Development and Activation. *Frontiers in immunology*, 11, 588212. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.588212>
- Gräf, S., Haimel, M., Bleda, M., Hadinnapola, C., Southgate, L., Li, W. et al. (2018). Identification of rare sequence variation underlying heritable pulmonary arterial hypertension. *Nature communications*, 9 (1), 1416. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03672-4>
- Grünig, E., Barner, A., Bell, M., Claussen, M., Dandel, M., Dumitrescu, D. et al. (2010). Nicht-invasive Diagnostik der pulmonalen Hypertonie. ESC/ERS-Leitlinien mit Kommentierung der Kölner Konsensus-Konferenz 2010. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, 135 Suppl 3, S67-77. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1263314>
- Guerrero-Esteo, M., Sanchez-Elsner, T., Letamendia, A. & Bernabeu, C. (2002). Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *The Journal of biological chemistry*, 277 (32), 29197–29209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111991200>
- Guilhem, A., Malcus, C., Clarivet, B., Plauchu, H. & Dupuis-Girod, S. (2013). Immunological abnormalities associated with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Journal of internal medicine*, 274 (4), 351–362. <https://doi.org/10.1111/joim.12098>
- Haitjema, T., Berg, J. M. ten, Overtoom, T. T., Ernst, J. M. & Westermann, C. J. (1996). Unusual complications after embolization of a pulmonary arteriovenous malformation. *Chest*, 109 (5), 1401–1404. <https://doi.org/10.1378/chest.109.5.1401>
- Hameed, A. G., Arnold, N. D., Chamberlain, J., Pickworth, J. A., Paiva, C., Dawson, S. et al. (2012). Inhibition of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

- (TRAIL) reverses experimental pulmonary hypertension. *The Journal of experimental medicine*, 209 (11), 1919–1935. <https://doi.org/10.1084/jem.20112716>
- Harrison, R. E., Flanagan, J. A., Sankelo, M., Abdalla, S. A., Rowell, J., Machado, R. D. et al. (2003). Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Journal of medical genetics*, 40 (12), 865–871. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.12.865>
- Hashimoto-Kataoka, T., Hosen, N., Sonobe, T., Arita, Y., Yasui, T., Masaki, T. et al. (2015). Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112 (20), E2677-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424774112>
- Haw, C. S., terBrugge, K., Willinsky, R. & Tomlinson, G. (2006). Complications of embolization of arteriovenous malformations of the brain. *Journal of neurosurgery*, 104 (2), 226–232. <https://doi.org/10.3171/jns.2006.104.2.226>
- Haznedaroğlu, I. C., Atalar, E., Oztürk, M. A., Ozer, N., Ovünç, K., Aksöyek, S. et al. (2002). Thrombopoietin inside the pulmonary vessels in patients with and without pulmonary hypertension. *Platelets*, 13 (7), 395–399. <https://doi.org/10.1080/0953710021000024000>
- Hegele, R. A. (1998). A review of intestinal fatty acid binding protein gene variation and the plasma lipoprotein response to dietary components. *Clinical biochemistry*, 31 (8), 609–612. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(98\)00078-2](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(98)00078-2)
- Held, M., Linke, M. & Jany, B. (2014). Echokardiographie und Rechtsherzkatheterisierung bei pulmonaler Hypertonie. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, 139 (30), 1511–1517. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1370161>
- Herve, P., Humbert, M., Sitbon, O., Parent, F., Nunes, H., Legal, C. et al. (2001). PATHOBIOLOGY OF PULMONARY HYPERTENSION. *Clinics in chest medicine*, 22 (3), 451–458. [https://doi.org/10.1016/S0272-5231\(05\)70283-5](https://doi.org/10.1016/S0272-5231(05)70283-5)
- Hoepfer, M. M., Aplitz, C., Grünig, E., Halank, M., Ewert, R., Kaemmerer, H. et al. (2016). Gezielte Therapie der pulmonal arteriellen Hypertonie. Empfehlungen der Kölner Konsensuskonferenz 2016. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, 141 (S 01), S33-S41. <https://doi.org/10.1055/s-0042-114526>
- Hoepfer, M. M., Bogaard, H. J., Condliffe, R., Frantz, R., Khanna, D., Kurzyna, M. et al. (2013). Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 62 (25 Suppl), D42-50. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.032>

- Hoeper, M. M., Huscher, D. & Pittrow, D. (2016). Incidence and prevalence of pulmonary arterial hypertension in Germany. *International journal of cardiology*, *203*, 612–613. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.11.001>
- Horn, F., Henze, C. & Heidrich, K. (2000). Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function. *Immunobiology*, *202* (2), 151–167. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(00\)80061-3](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(00)80061-3)
- Humbert, M., McLaughlin, V., Gibbs, J. S. R., Gombert-Maitland, M., Hoeper, M. M., Preston, I. R. et al. (2021). Sotatercept for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *The New England journal of medicine*, *384* (13), 1204–1215. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2024277>
- 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. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *151* (5), 1628–1631. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.151.5.7735624>
- Humbert, M., Morrell, N. W., Archer, S. L., Stenmark, K. R., MacLean, M. R., Lang, I. M. et al. (2004). Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, *43* (12 Suppl S), 13S–24S. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.02.029>
- Humbert, M., Sitbon, O., Chaouat, A., Bertocchi, M., Habib, G., Gressin, V. et al. (2006). Pulmonary arterial hypertension in France. Results from a national registry. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *173* (9), 1023–1030. <https://doi.org/10.1164/rccm.200510-1668OC>
- Iriarte, A., Ochoa-Callejero, L., García-Sanmartín, J., Cerdà, P., Garrido, P., Narro-Íñiguez, J. et al. (2021). Adrenomedullin as a potential biomarker involved in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *European journal of internal medicine*, *88*, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2021.03.039>
- Jansa, P., Jarkovsky, J., Al-Hiti, H., Popelova, J., Ambroz, D., Zatocil, T. et al. (2014). Epidemiology and long-term survival of pulmonary arterial hypertension in the Czech Republic: a retrospective analysis of a nationwide registry. *BMC pulmonary medicine*, *14*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-14-45>
- Jameson, J. J. & Cave, D. R. (2004). Hormonal and antihormonal therapy for epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *The Laryngoscope*, *114* (4), 705–709. <https://doi.org/10.1097/00005537-200404000-00021>
- Jeffery, T. K. & Morrell, N. W. (2002). Molecular and cellular basis of pulmonary vascular

- remodeling in pulmonary hypertension. *Progress in cardiovascular diseases*, 45 (3), 173–202. <https://doi.org/10.1053/pcad.2002.130041>
- Jerkic, M., Sotov, V. & Letarte, M. (2012). Oxidative stress contributes to endothelial dysfunction in mouse models of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012, 686972. <https://doi.org/10.1155/2012/686972>
- Jing, Z.-C., Jiang, X., Han, Z.-Y., Xu, X.-Q., Wang, Y., Wu, Y. et al. (2009). Iloprost for pulmonary vasodilator testing in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*, 33 (6), 1354–1360. <https://doi.org/10.1183/09031936.00169608>
- Kharitononkov, A., Shiyanova, T. L., Koester, A., Ford, A. M., Micanovic, R., Galbreath, E. J. et al. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *The Journal of clinical investigation*, 115(6), 1627-1635. <https://doi.org/10.1172/jci23606>
- Kitamura, K., Kangawa, K. & Eto, T. (2002). Adrenomedullin and PAMP. Discovery, structures, and cardiovascular functions. *Microscopy research and technique*, 57 (1), 3–13. <https://doi.org/10.1002/jemt.10052>
- Kingman, M., Archer-Chicko, C., Bartlett, M., Beckmann, J., Hohsfield, R., & Lombardi, S. (2017). Management of prostacyclin side effects in adult patients with pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary circulation*, 7(3), 598-608. <https://doi.org/10.1177/2045893217719250>
- Koch, M., Hussein, F., Woeste, A., Gründker, C., Frontzek, K., Emons, G., & Hawighorst, T. (2011). CD36-mediated activation of endothelial cell apoptosis by an N-terminal recombinant fragment of thrombospondin-2 inhibits breast cancer growth and metastasis in vivo. *Breast cancer research and treatment*, 128, 337-346. <https://doi.org/10.1007%2Fs10549-010-1085-7>
- Koehler, R., Grünig, E., Pauciulo, M. W., Hoepfer, M. M., Olschewski, H., Wilkens, H. et al. (2004). Low frequency of BMPR2 mutations in a German cohort of patients with sporadic idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Journal of medical genetics*, 41 (12), e127. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.023101>
- 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. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, 141 (S 01), S10-S18. <https://doi.org/10.1055/s-0042-114523>
- Kugathasan, L., Ray, J. B., Deng, Y., Rezaei, E., Dumont, D. J. & Stewart, D. J. (2009). The angiotensin-1-Tie2 pathway prevents rather than promotes pulmonary arterial

- hypertension in transgenic mice. *The Journal of experimental medicine*, 206 (10), 2221–2234. <https://doi.org/10.1084/jem.20090389>
- Lambers, C., Roth, M., Zhong, J., Campregher, C., Binder, P., Burian, B. et al. (2013). The interaction of endothelin-1 and TGF- β 1 mediates vascular cell remodeling. *PLoS one*, 8(8), e73399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073399>
- Lawrie, A., Hameed, A. G., Chamberlain, J., Arnold, N., Kennerley, A., Hopkinson, K. et al. (2011). Paigen diet-fed apolipoprotein E knockout mice develop severe pulmonary hypertension in an interleukin-1-dependent manner. *The American journal of pathology*, 179 (4), 1693–1705. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.06.037>
- Lawton, M. T., Du, R., Tran, M. N., Achrol, A. S., McCulloch, C. E., Johnston, S. C. et al. (2005). Effect of presenting hemorrhage on outcome after microsurgical resection of brain arteriovenous malformations. *Neurosurgery*, 56 (3), 485-93; discussion 485-93. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000153924.67360.EA>
- Lebrin, F., Srun, S., Raymond, K., Martin, S., van den Brink, S., Freitas, C. et al. (2010). Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Nature medicine*, 16 (4), 420–428. <https://doi.org/10.1038/nm.2131>
- Lee, M., Sze, D. Y., Bonham, C. A. & Daugherty, T. J. (2010). Hepatic arteriovenous malformations from hereditary hemorrhagic telangiectasia. Treatment with liver transplantation. *Digestive diseases and sciences*, 55 (11), 3059–3062. <https://doi.org/10.1007/s10620-010-1353-8>
- Levy, G. G., Motto, D. G. & Ginsburg, D. (2005). ADAMTS13 turns 3. *Blood*, 106 (1), 11–17. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4097>
- Li, W., Xiong, C.-M., Gu, Q., Wang, X.-T., Cheng, X.-L., Huang, L. et al. (2018). The clinical characteristics and long-term prognosis of pulmonary arterial hypertension associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Pulmonary circulation*, 8 (2), 2045894018759918. <https://doi.org/10.1177/2045894018759918>
- Liu, H., Yang, E., Lu, X., Zuo, C., He, Y., Jia, D. et al. (2015). Serum levels of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand correlate with the severity of pulmonary hypertension. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, 33, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2015.06.002>
- Lyle, M. A., Fenstad, E. R., McGoon, M. D., Frantz, R. P., Krowka, M. J., Kane, G. C. et al. (2016). Pulmonary Hypertension in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Chest*, 149 (2), 362–371. <https://doi.org/10.1378/chest.15-0535>

- Machado, R. D., Eickelberg, O., Elliott, C. G., Geraci, M. W., Hanaoka, M., Loyd, J. E. et al. (2009). Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 54 (1 Suppl), S32-S42. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.04.015>
- Machado, R. D., Southgate, L., Eichstaedt, C. A., Aldred, M. A., Austin, E. D., Best, D. H. et al. (2015). Pulmonary Arterial Hypertension. A Current Perspective on Established and Emerging Molecular Genetic Defects. *Human mutation*, 36 (12), 1113–1127. <https://doi.org/10.1002/humu.22904>.
- MacMillan-Crow, L. A., & Thompson, J. A. (1999). Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Archives of biochemistry and biophysics*, 366(1), 82-88. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1202>
- Madani, M. M., Auger, W. R., Pretorius, V., Sakakibara, N., Kerr, K. M., Kim, N. H. et al. (2012). Pulmonary endarterectomy. Recent changes in a single institution's experience of more than 2,700 patients. *The Annals of thoracic surgery*, 94 (1), 97-103; discussion 103. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2012.04.004>
- Mager, J. J., Overtom, T. T. C., Blauw, H., Lammers, J. W. J. & Westermann, C. J. J. (2004). Embolotherapy of pulmonary arteriovenous malformations. Long-term results in 112 patients. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR*, 15 (5), 451–456. <https://doi.org/10.1097/01.RVI.0000126811.05229.B6>
- Maki, J., Hirano, M., Hoka, S., Kanaide, H. & Hirano, K. (2010). Thrombin activation of proteinase-activated receptor 1 potentiates the myofilament Ca²⁺ sensitivity and induces vasoconstriction in porcine pulmonary arteries. *British journal of pharmacology*, 159 (4), 919–927. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00591.x>.
- Maron, B. A. & Leopold, J. A. (2014). The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathobiology of pulmonary arterial hypertension (2013 Grover Conference series). *Pulmonary circulation*, 4 (2), 200–210. <https://doi.org/10.1086/675984>.
- Masri, F. A., Xu, W., Comhair, S. A. A., Asosingh, K., Koo, M., Vasanji, A. et al. (2007). Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 293 (3), L548-54. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00428.2006>.
- Massagué, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1 (3), 169–178. <https://doi.org/10.1038/35043051>

- Massagué, J. (2008a). A very private TGF-beta receptor embrace. *Molecular cell*, 29 (2), 149–150. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.01.006>
- Massagué, J. (2008b). *TGFβ* in Cancer. *Cell*, 134 (2), 215–230. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>
- Mayer, E., Jenkins, D., Lindner, J., D'Armini, A., Kloek, J., Meyns, B. et al. (2011). Surgical management and outcome of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. Results from an international prospective registry. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 141 (3), 702–710. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2010.11.024>
- McDonald, J., Bayrak-Toydemir, P., DeMille, D., Wooderchak-Donahue, W. & Whitehead, K. (2020). Curaçao diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia is highly predictive of a pathogenic variant in ENG or ACVRL1 (HHT1 and HHT2). *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 22 (7), 1201–1205. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0775-8>
- McDonald J, Pyeritz R. E. (Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., Hrsg.) (2000 [Updated 2021 Nov 24]). *Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia*, Seattle (WA): University of Washington, Seattle. GeneReviews® [Internet]. 1993-2023. Zugriff am 14.03.2023. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1351/>
- McDonald, J., Bayrak-Toydemir, P. & Pyeritz, R. E. (2011). Hereditary hemorrhagic telangiectasia. An overview of diagnosis, management, and pathogenesis. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 13 (7), 607–616. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3182136d32>
- McGoon, M. D., Benza, R. L., Escribano-Subias, P., Jiang, X., Miller, D. P., Peacock, A. J. et al. (2013). Pulmonary arterial hypertension. Epidemiology and registries. *Journal of the American College of Cardiology*, 62 (25 Suppl), D51-9. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.023>
- McLaughlin, V. V., Archer, S. L., Badesch, D. B., Barst, R. J., Farber, H. W., Lindner, J. R. et al. (2009). ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *Journal of the American College of Cardiology*, 53 (17), 1573–1619. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.01.004>
- Meloche, J., Courchesne, A., Barrier, M., Carter, S., Bissierier, M., Paulin, R. et al. (2013).

- Critical role for the advanced glycation end-products receptor in pulmonary arterial hypertension etiology. *Journal of the American Heart Association*, 2 (1), e005157. <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.005157>
- Meloche, J., Pflieger, A., Vaillancourt, M., Paulin, R., Potus, F., Zervopoulos, S. et al. (2014). Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 129 (7), 786–797. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006167>
- Minai, O. A., Rigelsky, C., Eng, C., Arroliga, A. C. & Stoller, J. K. (2007). Long-term outcome in a patient with pulmonary hypertension and hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Chest*, 131 (4), 984–987. <https://doi.org/10.1378/chest.06-2275>
- Mitchell, A., Adams, L. A., MacQuillan, G., Tibballs, J., vanden Driesen, R. & Delriviere, L. (2008). Bevacizumab reverses need for liver transplantation in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 14 (2), 210–213. <https://doi.org/10.1002/lt.21417>
- Miyamoto, S., Nagaya, N., Satoh, T., Kyotani, S., Sakamaki, F., Fujita, M. et al. (2000). Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 161 (2 Pt 1), 487–492. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.2.9906015>
- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T. & Miyazono, K. (2002). Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 7 (12), 1191–1204. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2002.00599.x>
- Moncada, S., & Vane, J. R. (1979). The role of prostacyclin in vascular tissue. In *Federation proceedings* (Vol. 38, No. 1, pp. 66-71).
- Morrell, N. W., Aldred, M. A., Chung, W. K., Elliott, C. G., Nichols, W. C., Soubrier, F. et al. (2019). Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*, 53 (1). <https://doi.org/10.1183/13993003.01899-2018>
- Newnham, M. (2019). *A genome-wide association study in chronic thromboembolic pulmonary hypertension and the ADAMTS13-VWF axis*. Dissertation. University of Cambridge, Cambridge.
- Nguyen, G., Delarue, F., Burcklé, C., Bouzahir, L., Giller, T. & Sraer, J.-D. (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses

- to renin. *The Journal of clinical investigation*, 109 (11), 1417–1427. <https://doi.org/10.1172/JCI14276>
- Ogo, T., Chowdhury, H. M., Yang, J., Long, L., Li, X., Torres Cleuren, Y. N. et al. (2013). Inhibition of overactive transforming growth factor- β signaling by prostacyclin analogs in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 48(6), 733-741. <https://doi.org/10.1165/rcmb.20120049OC>
- Ojeda-Fernández, L., Recio-Poveda, L., Aristorena, M., Lastres, P., Blanco, F. J., Sanz-Rodríguez, F. et al. (2016). Mice Lacking Endoglin in Macrophages Show an Impaired Immune Response. *PLoS genetics*, 12 (3), e1005935. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005935>
- Opitz, C. F., Blindt, R., Blumberg, F., Borst, M. M., Bruch, L., Leuchte, H. et al. (2010). Pulmonale Hypertonie. Invasive Diagnostik: Empfehlungen der Kölner Konsensus-Konferenz 2010. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, 135 Suppl 3, S78-86. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1263315>
- Opitz, C. F. & Rubin, L. J. (2009). Acute vasodilator testing in idiopathic pulmonary arterial hypertension. Must we take NO for the answer? *The European respiratory journal*, 33 (6), 1247–1249. <https://doi.org/10.1183/09031936.00033809>
- Oudiz, R. J. (2007). Pulmonary hypertension associated with left-sided heart disease. *Clinics in chest medicine*, 28 (1), 233-41, x. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2006.12.001>
- Oudiz, R. J., Barst, R. J., Hansen, J. E., Sun, X.-G., Garofano, R., Wu, X. et al. (2006). Cardiopulmonary exercise testing and six-minute walk correlations in pulmonary arterial hypertension. *The American journal of cardiology*, 97 (1), 123–126. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.07.129>
- Paciocco, G., Martinez, F. J., Bossone, E., Pielsticker, E., Gillespie, B. & Rubenfire, M. (2001). Oxygen desaturation on the six-minute walk test and mortality in untreated primary pulmonary hypertension. *The European respiratory journal*, 17 (4), 647–652. <https://doi.org/10.1183/09031936.01.17406470>
- Palange, P., Ward, S. A., Carlsen, K.-H., Casaburi, R., Gallagher, C. G., Gosselink, R. et al. (2007). Recommendations on the use of exercise testing in clinical practice. *The European respiratory journal*, 29 (1), 185–209. <https://doi.org/10.1183/09031936.00046906>
- Panzenboeck, A., Sadushi-Kolici, R. (2018). P1621 Plasma ADAMTS13 in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *European Heart Journal*, 39.
- Papathanasiou, A. E., Spyropoulos, F., Michael, Z., Joung, K. E., Briana, D. D.,

- Malamitsi-Puchner, A. et al. (2021). Adipokines and Metabolic Regulators in Human and Experimental Pulmonary Arterial Hypertension. *International journal of molecular sciences*, 22 (3). <https://doi.org/10.3390/ijms22031435>
- Pasculli, G., Resta, F., Guastamacchia, E., Di Gennaro, L., Suppressa, P. & Sabbà, C. (2004). Health-related quality of life in a rare disease. Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) or Rendu-Osler-Weber disease. *Quality of life research : an international journal of quality of life aspects of treatment, care and rehabilitation*, 13 (10), 1715–1723. <https://doi.org/10.1007/s11136-004-7865-y>
- Paulin, R., Meloche, J., Jacob, M. H., Bissierier, M., Courboulin, A. & Bonnet, S. (2011). Dehydroepiandrosterone inhibits the Src/STAT3 constitutive activation in pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 301 (5), H1798-809. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00654.2011>.
- Perros, F., Montani, D., Dorfmueller, P., Durand-Gasselien, I., Tcherakian, C., Le Pavec, J. et al. (2008). Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 178 (1), 81–88. <https://doi.org/10.1164/rccm.200707-1037OC>
- Plauchu, H., Chadarévian, J. P. de, Bideau, A. & Robert, J. M. (1989). Age-related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *American journal of medical genetics*, 32 (3), 291–297. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320320302>
- Pollak, J. S., Saluja, S., Thabet, A., Henderson, K. J., Denbow, N. & White, R. I. (2006). Clinical and anatomic outcomes after embolotherapy of pulmonary arteriovenous malformations. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR*, 17 (1), 35-44; quiz 45. <https://doi.org/10.1097/01.RVI.0000191410.13974.B6>
- Puente, R. Z., Bueno, J. & Salcedo, M. (2016). Epidemiology of Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia (HHT) in Spain. *Hereditary Genetics*, 05 (03). <https://doi.org/10.4172/2161-1041.1000173>
- Rafikova, O., Williams, E. R., McBride, M. L., Zemskova, M., Srivastava, A., Nair, V. et al. (2018). Hemolysis-induced Lung Vascular Leakage Contributes to the Development of Pulmonary Hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 59 (3), 334–345. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0308OC>
- Remy-Jardin, M., Dumont, P., Brillet, P.-Y., Dupuis, P., Duhamel, A. & Remy, J. (2006). Pulmonary arteriovenous malformations treated with embolotherapy. Helical CT evaluation of long-term effectiveness after 2-21-year follow-up. *Radiology*, 239 (2),

- 576–585. <https://doi.org/10.1148/radiol.2391050333>
- Revuz, S., Decullier, E., Ginon, I., Lamblin, N., Hatron, P.-Y., Kaminsky, P. et al. (2017). Pulmonary hypertension subtypes associated with hereditary haemorrhagic telangiectasia. Haemodynamic profiles and survival probability. *PloS one*, *12* (10), e0184227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184227>
- Rich, S., Kaufmann, E. & Levy, P. S. (1992). The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine*, *327* (2), 76–81. <https://doi.org/10.1056/NEJM199207093270203>
- Richards-Yutz, J., Grant, K., Chao, E. C., Walther, S. E. & Ganguly, A. (2010). Update on molecular diagnosis of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Human genetics*, *128* (1), 61–77. <https://doi.org/10.1007/s00439-010-0825-4>
- Rol, N., Kurakula, K. B., Happé, C., Bogaard, H. J. & Goumans, M.-J. (2018). TGF- β and BMPR2 Signaling in PAH. Two Black Sheep in One Family. *International journal of molecular sciences*, *19* (9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092585>
- Ross, D. J., Strieter, R. M., Fishbein, M. C., Ardehali, A. & Belperio, J. A. (2012). Type I immune response cytokine-chemokine cascade is associated with pulmonary arterial hypertension. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, *31* (8), 865–873. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2012.04.008>
- Ross, R. M. (2003). ATS/ACCP statement on cardiopulmonary exercise testing. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *167* (10), 1451; author reply 1451. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.167.10.950>
- Rubin, L. J., Badesch, D. B., Barst, R. J., Galie, N., Black, C. M., Keogh, A. et al. (2002). Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine*, *346* (12), 896–903. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012212>
- Ruiz, S., Chandakkar, P., Zhao, H., Papoin, J., Chatterjee, P. K., Christen, E. et al. (2017). Tacrolimus rescues the signaling and gene expression signature of endothelial ALK1 loss-of-function and improves HHT vascular pathology. *Human molecular genetics*, *26* (24), 4786–4798. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx358>
- Sakamaki, F., Kyotani, S., Nagaya, N., Sato, N., Oya, H., Satoh, T., & Nakanishi, N. (2000). Increased plasma P-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy. *Circulation* (102), 2720–2725.
- Säleby, J., Bouzina, H., Lundgren, J. & Rådegran, G. (2017). Angiogenic and

- inflammatory biomarkers in the differentiation of pulmonary hypertension. *Scandinavian cardiovascular journal : SCJ*, 51 (5), 261–270. <https://doi.org/10.1080/14017431.2017.1359419>
- Sanchez-Arrones, L., Cardozo, M., Nieto-Lopez, F. & Bovolenta, P. (2012). Cdon and Boc. Two transmembrane proteins implicated in cell-cell communication. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44 (5), 698–702. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.01.019>
- Sapru, R. P., Hutchison, D. C. & Hall, J. I. (1969). Pulmonary hypertension in patients with pulmonary arteriovenous fistulae. *British heart journal*, 31 (5), 559–569. <https://doi.org/10.1136/hrt.31.5.559>
- Scharpfenecker, M., van Dinther, M., Liu, Z., van Bezooijen, R. L., Zhao, Q., Pukac, L. et al. (2007). BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *Journal of cell science*, 120 (Pt 6), 964–972. <https://doi.org/10.1242/jcs.002949>
- Schermuly, R. T., Dony, E., Ghofrani, H. A., Pullamsetti, S., Savai, R., Roth, M. et al. (2005). Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *The Journal of clinical investigation*, 115 (10), 2811–2821. <https://doi.org/10.1172/JCI24838>.
- Schumacher, J. D. & Guo, G. L. (2016). Regulation of Hepatic Stellate Cells and Fibrogenesis by Fibroblast Growth Factors. *BioMed research international*, 2016, 8323747. <https://doi.org/10.1155/2016/8323747>
- Scott, L. J., McKeage, K., Keam, S. J. & Plosker, G. L. (2003). Tacrolimus. A further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs*, 63 (12), 1247–1297. <https://doi.org/10.2165/00003495-200363120-00006>
- Shah, R. K., Dhingra, J. K. & Shapshay, S. M. (2002). Hereditary hemorrhagic telangiectasia. A review of 76 cases. *The Laryngoscope*, 112 (5), 767–773. <https://doi.org/10.1097/00005537-200205000-00001>
- Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M. et al. (2019). Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *The European respiratory journal*, 53 (1). <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>
- Sitbon, O., Humbert, M., Jaïs, X., Ioos, V., Hamid, A. M., Provencher, S. et al. (2005). Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 111 (23), 3105–3111.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.488486>

- Sitbon, O., Humbert, M., Nunes, H., Parent, F., Garcia, G., Hervé, P. et al. (2002). Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 40 (4), 780–788. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(02\)02012-0](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(02)02012-0)
- Sommer, N., Droege, F., Gamen, K. E., Geisthoff, U., Gall, H., Tello, K. et al. (2019). Treatment with low-dose tacrolimus inhibits bleeding complications in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia and pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary circulation*, 9 (2), 2045894018805406. <https://doi.org/10.1177/2045894018805406>
- Sopeña, B., Pérez-Rodríguez, M. T., Portela, D., Rivera, A., Freire, M. & Martínez-Vázquez, C. (2013). High prevalence of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *European journal of internal medicine*, 24 (3), e30-4. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2012.11.012>
- Spiekerkoetter, E., Tian, X., Cai, J., Hopper, R. K., Sudheendra, D., Li, C. G. et al. (2013). FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension. *The Journal of clinical investigation*, 123 (8), 3600–3613. <https://doi.org/10.1172/JCI65592>.
- Stewart, D. J., Levy, R. D., Cernacek, P. & Langleben, D. (1991). Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension. Marker or mediator of disease? *Annals of internal medicine*, 114 (6), 464–469. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-114-6-464>
- Storch, J. & McDermott, L. (2009). Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. *Journal of lipid research*, 50 Suppl (Suppl), S126-31. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800084-JLR200>
- Streit, M., Riccardi, L., Velasco, P., Brown, L. F., Hawighorst, T., Bornstein, P., & Detmar, M. (1999). Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26), 14888-14893. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.14888>
- Sztrymf, B., Coulet, F., Girerd, B., Yaici, A., Jais, X., Sitbon, O. et al. (2008). Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in carriers of BMPR2 mutation. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 177 (12), 1377–1383. <https://doi.org/10.1164/rccm.200712-1807OC>
- Tamura, Y., Ono, T., Kuwana, M., Inoue, K., Takei, M., Yamamoto, T. et al. (2012). Human pentraxin 3 (PTX3) as a novel biomarker for the diagnosis of pulmonary

- arterial hypertension. *PloS one*, 7 (9), e45834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045834>
- Taraseviciene-Stewart, L., Kasahara, Y., Alger, L., Hirth, P., Mc Mahon, G., Waltenberger, J. et al. (2001). Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15 (2), 427–438. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0343com>
- Trembath, R. C. (2001). Mutations in the TGF-beta type 1 receptor, ALK1, in combined primary pulmonary hypertension and hereditary haemorrhagic telangiectasia, implies pathway specificity. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 20 (2), 175. [https://doi.org/10.1016/S1053-2498\(00\)00352-1](https://doi.org/10.1016/S1053-2498(00)00352-1)
- Trembath, R. C., Thomson, J. R., Machado, R. D., Morgan, N. V., Atkinson, C., Winship, I. et al. (2001). Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *The New England journal of medicine*, 345 (5), 325–334. <https://doi.org/10.1056/NEJM200108023450503>
- Trerotola, S. O. & Pyeritz, R. E. (2010). PAVM embolization. An update. *AJR. American journal of roentgenology*, 195 (4), 837–845. <https://doi.org/10.2214/AJR.10.5230>
- Uniprot (o.D.) [*UniProt provides the scientific community with a comprehensive, high-quality and freely accessible resource of protein sequence and functional information*]. Zugriff am 01.06.2021. Verfügbar unter <https://www.uniprot.org/>
- Upton, P. D., Davies, R. J., Trembath, R. C. & Morrell, N. W. (2009). Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (23), 15794–15804. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.002881>
- Vassileva, G., Huwyler, L., Poirier, K., Agellon, L. B. & Toth, M. J. (2000). The intestinal fatty acid binding protein is not essential for dietary fat absorption in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14 (13), 2040–2046. <https://doi.org/10.1096/fj.99-0959com>
- Vorselaars, V. M., Velthuis, S., Snijder, R. J., Vos, J. A., Mager, J. J. & Post, M. C. (2015). Pulmonary hypertension in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *World journal of cardiology*, 7 (5), 230–237. <https://doi.org/10.4330/wjc.v7.i5.230>

- Vorselaars, V., Velthuis, S., van Gent, M., Westermann, C., Snijder, R., Mager, J. et al. (2017). Pulmonary Hypertension in a Large Cohort with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Respiration; international review of thoracic diseases*, 94 (3), 242–250. <https://doi.org/10.1159/000458447>
- Wang, G., Fan, R., Ji, R., Zou, W., Penny, D. J., Varghese, N. P. et al. (2016). Novel homozygous BMP9 nonsense mutation causes pulmonary arterial hypertension. A case report. *BMC pulmonary medicine*, 16, 17. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0183-7>
- Wetzel-Strong, S. E., Weinsheimer, S., Nelson, J., Pawlikowska, L., Clark, D., Starr, M. D. et al. (2021). Pilot investigation of circulating angiogenic and inflammatory biomarkers associated with vascular malformations. *Orphanet journal of rare diseases*, 16 (1), 372. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-02009-7>
- White, R. J., Meoli, D. F., Swarthout, R. F., Kallop, D. Y., Galaria, I. I., Harvey, J. L. et al. (2007). Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 293 (3), L583-90. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00321.2006>
- Wooderchak-Donahue, W. L., McDonald, J., O'Fallon, B., Upton, P. D., Li, W., Roman, B. L. et al. (2013). BMP9 mutations cause a vascular-anomaly syndrome with phenotypic overlap with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *American journal of human genetics*, 93 (3), 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.07.004>
- Xu, M., Xu, M., Han, L., Yuan, C., Mei, Y., Zhang, H. et al. (2017). Role for Functional SOD2 Polymorphism in Pulmonary Arterial Hypertension in a Chinese Population. *International journal of environmental research and public health*, 14 (3). <https://doi.org/10.3390/ijerph14030266>
- Xu, P., Liu, J. & Derynck, R. (2012). Post-translational regulation of TGF- β receptor and Smad signaling. *FEBS letters*, 586 (14), 1871–1884. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.010>
- Xu, W., Koeck, T., Lara, A. R., Neumann, D., DiFilippo, F. P., Koo, M. et al. (2007). Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (4), 1342–1347. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605080104>
- Yaniv, E., Preis, M., Hadar, T., Shvero, J. & Haddad, M. (2009). Antiestrogen therapy for hereditary hemorrhagic telangiectasia. A double-blind placebo-controlled clinical trial. *The Laryngoscope*, 119 (2), 284–288. <https://doi.org/10.1002/lary.20065>

- Yao, Y., Zebboudj, A. F., Torres, A., Shao, E. & Boström, K. (2007). Activin-like kinase receptor 1 (ALK1) in atherosclerotic lesions and vascular mesenchymal cells. *Cardiovascular research*, 74 (2), 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.09.014>
- Zhang, Y. E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell research*, 19(1), 128–139. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.328>
- Zhang, Y. E. (2017). Non-Smad signaling pathways of the TGF- β family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(2), a022129. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022129>
- Zhang, W., Zhu, T., Wu, W., Ge, X., Xiong, X., Zhang, Z. et al. (2018). LOX-1 mediated phenotypic switching of pulmonary arterial smooth muscle cells contributes to hypoxic pulmonary hypertension. *European journal of pharmacology*, 818, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.10.037>
- Zhou, H., Liu, H., Porvasnik, S. L., Terada, N., Agarwal, A., Cheng, Y. et al. (2006). Heme oxygenase-1 mediates the protective effects of rapamycin in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 86 (1), 62–71. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700361>

Anhang

Proteinname	Gen	Übergeordnete Funktion
<i>2,4-dienoyl-CoA reductase</i>	DECR1	Abbau von ungesättigten Fettsäuren
<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13</i>	ADAM-TS13	Antikoagulatorisch
<i>Adrenomedullin</i>	ADM	Hypotensiv und vasodilatatorisch
<i>Agouti-related protein</i>	AGRP	Teil des Melanocortinsystems; Gewichtshomöostase
<i>Alpha-L-iduronidase</i>	IDUA	Proteinspaltung
<i>Angiopoietin-1</i>	ANGPT1	Pro- und antiangiogenetisch
<i>Angiopoietin-1 Rezeptor</i>	TIE2	Regulation von Angiogenese, Endothelzellüberleben, -proliferation, -migration und -adhäsion
<i>Angiotensin-converting enzym 2</i>	ACE2	Teil des Renin-Angotensin- Aldosteron-Sytems; Reguliert systemischen Gefäßwiderstand und die kardiovaskuläre Homöostase
<i>Bone morphogenetic protein 6</i>	BMP-6	Ektopische Knochen- und Knorpelbildung
<i>Brain natriuretic peptide</i>	BNP	Kardio-renale Homöostase
<i>Brother of CDO</i>	BOC	Zell-Zell Interaktion
<i>Carbonic anhydrase 5A, mitochondrial</i>	CA5A	Reversible Hydrierung von Kohlenstoffdioxid
<i>Carcinoembryonic antigenrelated cell adhesion molecule 8</i>	CEACAM8	Zelladhäsion, Zellmigration, Bindung von Pathogenen
<i>Cathepsin L1</i>	CTSL1	Proteinabbau
<i>C-C motif chemokine 17</i>	CCL17	Entwicklung von T-Zellen
<i>C-C motif chemokine 3</i>	CCL3	Beteiligt an Rekrutierung und Aktivierung von Lymphozyten
<i>CD40 ligand</i>	CD40-L	Stimuliert T-Zell Proliferation und

		Zytokinausschüttung
<i>Chymotrypsin C</i>	CTRC	Aktivierung und Degradierung von Trypsinogen und Procarboxypeptidasen
<i>C-X-C motif chemokine 1</i>	CXCL1	Inflammatorische Immunantwort; chemotaktisch
<i>Decorin</i>	DCN	Beteiligt an Fibrillogenese; Inhibierung der Angiogenese
<i>Dickkopf-related protein 1</i>	Dkk-1	Beteiligt an der Knochenbildung
<i>Fatty acid binding protein 2</i>	FABP2	Aufnahme, Transport und Abbau von langkettigen Fettsäuren
<i>Fibroblast growth factor 23</i>	FGF-23	Reguliert Phosphatkonzentration im Plasma
<i>Fibroblast growth factor 21</i>	FGF-21	Glukoseaufnahme
<i>Follistatin</i>	FS	Inhibitor der Synthese und Sekretion von follikelstimulierendem Hormon (FSH)
<i>Galectin 9</i>	Gal-9	Proapoptotisch
<i>Gastric intrinsic factor</i>	GIF	Aufnahme von Vitamin B12
<i>Gastrotropin</i>	GT	Bildung von Magensäure und Pepsinogen
<i>Growth differentiation factor 2</i>	GDF2	Inhibitor der Angiogenese
<i>Growth hormone</i>	GH	Zellwachstum und -proliferation
<i>Heat shock 27 kDa protein</i>	HSP27	Formhaltung von denaturierten Proteinen
<i>Heme oxygenase 1</i>	HO-1	Bindung des Häm-Rings; Bildung von Biliverdin
<i>Hydroxyacid oxidase 1</i>	HAOX1	Peroxismales Enzym
<i>Interleukin 6</i>	IL6	Geweberegeneration, Immunantwort, Bildung von <i>vascular endothelial growth factor</i>
<i>Interleukin 17D</i>	IL-17D	Induziert u.a. die Expression von IL6 von Endothelzellen

<i>Interleukin 18</i>	IL18	Proinflammatorisch
<i>Interleukin 27</i>	IL27	Pro- und antiinflammatorisch
<i>Interleukin-1 receptor antagonist protein</i>	IL-1ra	Antiinflammatorisch
<i>Interleukin-1 receptor-like 2</i>	IL1RL2	Proinflammatorisch
<i>Interleukin-4 receptor subunit alpha</i>	IL-4RA	Regulation von allergisch-entzündlichen Prozessen
<i>Kidney Injury Molecule</i>	KIM1	Entwicklung von T-Helferzellen; Involviert bei Nierenverletzungen
<i>Lactoylglutathione lyase</i>	GLO1	Beseitigung von toxischen Verbindungen; Regulation von NF-kappa-B
<i>Lectin-like oxidized LDL receptor 1</i>	LOX-1	Erkennung, Aufnahme und Abbau von oxidiertem <i>low density lipoprotein</i>
<i>Leptin</i>	LEP	Proangiogenetisch; unterdrückt Hungergefühl
<i>Lipoprotein lipase</i>	LPL	Clearance, Nutzung und Lagerung von Lipiden
<i>Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-b</i>	IgG Fc receptor II-b	Regulation der Phagozytose
<i>Lymphotactin</i>	XCL1	Aktivierung von Lymphozyten
<i>Macrophage receptor MARCO</i>	MARCO	Bindung von Bakterienoberflächenantigenen
<i>Matrix metalloproteinase 12</i>	MMP12	Gewebewiederherstellung
<i>Matrix metalloproteinase 7</i>	MMP7	Aktiviert Prokollagenasen, reduziert extrazelluläre Proteine
<i>Melusin</i>	ITGB1BP2	Reifung und Organisation von Muskelzellen
<i>NF-kappa-B essential modulator</i>	NEMO	Proinflammatorisch, beteiligt an Zellüberleben
<i>Osteoclast-associated</i>	hOSCAR	Regulator der Osteoklastogenese

<i>immunoglobulin-like receptor</i>		
<i>Pappalysin-1</i>	PAPPA	Freisetzung von <i>Insulin-like growth factor</i>
<i>Pentraxin-related protein PTX3</i>	PTX3	Akute-Phase-Protein
<i>Placenta growth factor</i>	PGF	Aktiviert Angiogenese und Endothelzellwachstum
<i>Platelet-derived growth factor subunit B</i>	PDGFB	Proliferation von Perizyten und glatten Muskelzellen
<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 1</i>	PARP-1	DNA-Metabolismus, -Reparatur und Genregulation
<i>Polymeric immunoglobulin receptor</i>	PIgR	Transzytose von IgA und IgM
<i>Programmed cell death 1 ligand 2</i>	PD-L2	T-Zellproliferation
<i>Proheparin-binding EGF-like growth factor</i>	HB-EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor zur Wundheilung und Herzentwicklung
<i>Pro-Interleukin-16</i>	IL16	Stimuliert Migration von Lymphozyten, Monozyten und Eosinophilen; chemotaktisch
<i>Prolargin</i>	PRELP	Zellverankerung
<i>Prostasin</i>	PRSS8	Stimuliert epitheliale Natriumkanäle
<i>alpha-1-microglobulin/bikunin precursor</i>	AMBP	Bindet Hämoglobin; Radikalfänger; Enzyminhibierung
<i>Proteinase-activated receptor 1</i>	PAR-1	Aktivierung von Thrombozyten
<i>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2</i>	TGM2	Vernetzung von Proteinen, Konjugation von Polyaminen zu Proteinen
<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>	SRC	Signaltransduktion
<i>P-selectin glycoprotein ligand</i>	PSGL-1	Rekrutierung von Leukozyten

<i>1</i>		
<i>Receptor for advanced glycosylation end products</i>	RAGE	Vermittelt vaskuläre, inflammatorische Prozesse
<i>Renin</i>	REN	Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems; Vasokonstriktion und Natrium Retention
<i>Serine protease 27</i>	PRSS27	Endopeptidase
<i>Serine/threonine-protein kinase 4</i>	STK4	Proapoptotisch
<i>Serpin A12</i>	SERPINA12	Moduliert Insulinwirkung in weißem Fettgewebe
<i>signaling lymphocytic activation molecule family member 5</i>	CD84	Aktivierung und Differenzierung von Immunzellen
<i>signaling lymphocytic activation molecule family member 7</i>	SLAMF7	Immunantwort
<i>Sortilin</i>	SORT1	Sortierungs- und Transportfunktion in der Zelle
<i>Spondin-2</i>	SPON2	Zelladhäsion und -wachstum
<i>Stem cell factor</i>	SCF	Beteiligt an Hämatopoese, Spermio-genese und Melanogenese; proinflammatorisch
<i>Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial</i>	SOD2	Binden von freien Radikalen
<i>T-cell surface glycoprotein CD4</i>	CD40-L	Immunantwort
<i>Thrombomodulin</i>	TM	Inhibiert Koagulation
<i>Thrombopoietin</i>	THPO	Proliferation und Reifung von Megakaryozyten
<i>Thrombospondin-2</i>	THBS2	Antagonist der Angiogenese; Mediator für Zell-Zell Kontakte

<i>Tissue factor</i>	TF	Prokoagulatorisch
<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2</i>	TRAIL-R2	Rezeptor für zytotoxische Liganden
<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10A</i>	TNFRSF10A	Beteiligt an Apoptose
<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A</i>	TNFRSF11A	Interaktion zwischen T- und dendritischen Zellen; Aktivierung und Differenzierung von Osteoklasten
<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 13B</i>	TNFRSF13B	Stimulation von B- und T-Zellen
<i>Tyrosine-protein kinase Mer</i>	MERTK	Regulation der Apoptose
<i>Vascular endothelial growth factor D</i>	VEGF-D	Aktiviert Angiogenese, Lymphogenese und Endothelzellwachstum
<i>V-set and immunoglobulin domain-containing protein 2</i>	VSIG2	Keine spezifische Funktion bekannt

Tabelle 4. Olink Biomarker des Cardiovascular Panels II

(Uniprot, o. D.)

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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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