

Growth arrest-specific 6 und Soluble Axl als Biomarker bei pulmonaler Hypertonie

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

vorgelegt von Sebastian Philipp Herpel
aus Gelnhausen

Gießen 2019

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II für Pneumologie und Intensivmedizin unter
der Leitung von Prof. Dr. Werner Seeger des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-
Universität Gießen.

Gutachter: PD Dr. Gall

Gutachter: Prof. Dr. Ghofrani

Tag der Disputation: 09.09.2020

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	PULMONALE HÄMODYNAMIK	1
1.2	KLINIK DER PULMONALEN HYPERTONIE	1
1.3	PULMONALE HYPERTONIE	2
1.3.1	DEFINITION	2
1.3.2	KLINISCHE KLASSIFIKATION	2
1.3.3	ÄTIOLOGIE DER PULMONALEN HYPERTONIE	2
1.3.3.1	Pulmonal arterielle Hypertonie	4
1.3.3.2	Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen	5
1.3.3.3	Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen oder Hypoxie	5
1.3.3.4	Chronisch-thromboembolische pulmonale Hypertonie	6
1.3.3.5	Pulmonale Hypertonie bei unklarer oder multifaktorieller Ursache	6
1.3.4	DIAGNOSTISCHER PROZESS	6
1.3.5	KLINISCHER SCHWEREGRAD UND PROGNOSEEINSCHÄTZUNG	7
1.3.6	PHARMAKOLOGISCHE BEHANDLUNG	8
1.3.6.1	Allgemeine pharmakologische Behandlungsmöglichkeiten	8
1.3.6.2	Spezifische pharmakologische Behandlungsmöglichkeiten der PAH	9
1.3.6.3	Nicht pharmakologische Therapiemöglichkeiten	10
1.4	BIOMARKER	11
1.4.1	DEFINITION	11
1.4.2	ALLGEMEINES	11
1.4.3	BIOMARKER DER PULMONALEN HYPERTONIE	12
1.4.3.1	Brain natriuretic peptide (BNP)	12
1.4.3.2	Endothelin-1 (ET-1) und Carboxy-Terminal pro-endothelin-1 (CTproET-1)	14
1.4.3.3	Potentielle Biomarker bei PH	14
1.4.4	BIOMARKER DIESER ARBEIT	16
1.4.4.1	Die Rezeptortyrosinkinase Axl und das Spaltprodukt Soluble Axl (sAxl)	16
1.4.4.2	Growth arrest-specific 6	20
2	<u>ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT</u>	24
3	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	24

3.1	STUDIENKOLLEKTIV	24
3.2	STUDIENPROTOKOLL	25
3.2.1	BLUTENTNAHME	25
3.2.2	QUANTITATIVE MESSUNG VON SAXL UND GAS6	25
3.2.3	ERFASSUNG KLINISCHER PARAMETER	29
3.2.3.1	Messparameter der Rechtsherzkatheteruntersuchung	29
3.2.3.2	Ermittlung des klinischen Schweregrades und der körperlichen Belastbarkeit	30
3.2.3.3	Überleben und die Zeit bis zur klinischen Verschlechterung	30
3.3	STATISTISCHE AUSWERTUNG	30
4	ERGEBNISSE	32
<hr/>		
4.1	STUDIENKOLLEKTIV	32
4.1.1	GESCHLECHT	32
4.1.2	DIAGNOSEGRUPPEN DER PH	32
4.1.3	WHO FC	33
4.1.4	ÜBERLEBEN BIS APRIL 2015	33
4.1.5	STUDIENKOLLEKTIV HINSICHTLICH DER SMWD	34
4.1.6	MESSGRÖßEN DER RECHTSHERZKATHETERUNTERSUCHUNG	34
4.1.7	VERTEILUNG DER GAS6 PLASMAKONZENTRATION	34
4.1.8	VERTEILUNG DER SAXL PLASMAKONZENTRATION	35
4.1.9	MESSGRÖßEN INNERHALB DER PH DIAGNOSEGRUPPEN	36
4.2	EXPLORATIVE DATENANALYSE	36
4.2.1	DIAGNOSTISCHER VORHERSAGEWERT DER GAS6 UND SAXL PLASMAKONZENTRATIONEN	36
4.2.2	ZUSAMMENHANG MIT KLINISCHER SCHWERE DER ERKRANKUNG (<i>WHO FC</i>)	37
4.2.3	UNTERSCHIEDE ZWISCHEN GESCHLECHTERN	38
4.2.4	KORRELATIONEN MIT KLINISCHEN PARAMETERN	39
4.2.5	ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN PLASMAKONZENTRATIONEN UND ÜBERLEBEN	40
4.2.5.1	Überleben und Gas6	40
4.2.5.2	Überleben und sAxl	41
4.2.6	ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN PLASMAKONZENTRATIONEN UND TTCW	43
4.2.6.1	TTCW und Gas6	43
4.2.6.2	TTCW und sAxl	44
4.2.7	COX-REGRESSIONSANALYSE ZUM ÜBERLEBEN UND ZUR TTCW IM ZUSAMMENHANG MIT DER PLASMAKONZENTRATION VON GAS6	45
4.2.8	COX-REGRESSIONSANALYSE ZUM ÜBERLEBEN UND ZUR TTCW IM ZUSAMMENHANG MIT DER PLASMAKONZENTRATION VON SAXL	47

4.2.9	GAS6 UND SAXL ALS BIOMARKER DER EINZELNEN ÄTIOLOGIEN	48
4.2.9.1	IPAH und Gas6	48
4.2.9.2	IPAH und sAxl	49
4.2.9.3	CTD und Gas6	49
4.2.9.4	CTD und sAxl	50
4.2.9.5	CTEPH und Gas6	50
4.2.9.6	CTEPH und sAxl	52
4.2.9.7	PVH und Gas6	52
4.2.9.8	PVH und sAxl	53
5	<u>DISKUSSION</u>	53
5.1	PROTEINKONZENTRATIONEN IM STUDIENVERGLEICH	54
5.2	EINFLUSS VON VITAMIN K-ANTAGONISTEN AUF DIE GAS6 PLASMAKONZENTRATION	55
5.3	STUDIENKOLLEKTIV	56
5.3.1	EINFLÜSSE AUF DIE PLASMAKONZENTRATIONEN (GESCHLECHT, ALTER, NIERENFUNKTION)	56
5.3.2	KLINISCHER SCHWEREGRAD UND RISIKOEINSCHÄTZUNG	57
5.3.3	WEITERE KORRELATIONEN	59
5.4	DIAGNOSTISCHER VORHERSAGEWERT	59
5.4.1	LITERATURHINWEISE AUF EINE MÖGLICHE DIAGNOSTISCHE RELEVANZ VON GAS6 UND SAXL BEI PH	60
5.4.2	GAS6 UND SAXL ALS DIAGNOSTISCHE BIOMARKER INNERHALB DES STUDIENKOLLEKTIVS	61
5.5	DIE PLASMAKONZENTRATIONEN IM HINBLICK AUF ÜBERLEBEN UND TTCW	62
5.6	LIMITATIONEN	66
5.7	AUSBlick	66
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	68
7	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	72
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	75
9	<u>ANHANG</u>	87
9.1	VERWENDETE MATERIALIEN SAXL	87

9.2	VERWENDETE MATERIALIEN GAS6	87
9.3	AMENDMENT ZUM ETHIKANTRAG	88
9.4	SONSTIGES	89
<u>ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION</u>		95
<u>DANKSAGUNG</u>		96

1 Einleitung

1.1 Pulmonale Hämodynamik

Bei dem Blutkreislauf der Lunge handelt es sich um ein Niederdrucksystem. Der pulmonal arterielle Mitteldruck (mPAP) weist beim gesunden Menschen nur einen Bruchteil des systemischen Mitteldruckes auf und beträgt in Ruhe 14 ± 3 mmHg¹. Begünstigt werden die niedrigen Druckverhältnisse durch einen geringen Anteil an glatter Muskulatur. Arterien und Arteriolen der pulmonalen Strombahn weisen dünnere und weniger stark muskularisierte Gefäßwände auf als ihre Gegenstücke im systemischen Kreislauf. Dies führt zu einer vermehrten passiven und aktiven Dehnbarkeit, was bei einer Zunahme des Herzzeitvolumens (HZV) zur Rekrutierung zusätzlicher Gefäßareale führt und damit den pulmonalen Druck auf einem niedrigen Niveau stabilisiert. Sind diese Mechanismen limitiert, so kommt es in der Folge zu einer Widerstands- und Druckerhöhung im pulmonalen Kreislauf. Diese Veränderungen haben Einfluss auf die Funktion des rechten Ventrikels, der sich durch eine physiologische Hypertrophie an die chronisch erhöhten Drücke anpasst. Im weiteren Verlauf führen ungünstige Druckverhältnisse jedoch zu einer pathologischen Hypertrophie und dabei zur Abnahme des HZV. Diese rechtsventrikuläre Dysfunktion ist für die klassischen Symptome der Rechtsherzinsuffizienz verantwortlich und der limitierende Faktor, bezogen auf das Überleben der Patienten mit pulmonaler Hypertonie (PH).²

1.2 Klinik der pulmonalen Hypertonie

Die pathologischen Verhältnisse in der pulmonalen Strombahn haben charakteristische Symptome zur Folge. Jedoch sind diese nicht spezifisch für die PH. Häufig präsentieren sich Patienten bei Diagnosestellung mit Dyspnoe (98%) und Abgeschlagenheit (73%). Auch sind thorakale Schmerzen und Beinödeme verbreitete Symptome¹ sowie Synkopen und belastungsabhängige Schwäche³. Ferner können Palpitationen, Husten, Heiserkeit und Orthopnoe auftreten². Im Rahmen einer körperlichen Untersuchung sind Zeichen einer Rechtsherzbelastung auffällig. Sichtbar gestaute Halsvenen, Hepatomegalie, Aszites, periphere Ödeme und kalte Extremitäten sind unmittelbare Folgen der Herzinsuffizienz. Auskultatorisch können ein Diastolikum über der Pulmonalklappe und ein dritter Herzton auffallen³.

1.3 Pulmonale Hypertonie

1.3.1 Definition

Die PH beschreibt eine heterogene Gruppe von Erkrankungen der Lunge, die sich in hämodynamischen und daraus resultierenden klinischen Veränderungen manifestieren. In ihrem Verlauf kommt es zu ungünstigen Umbauprozessen der Blutgefäße⁴. Eine PH liegt vor, wenn bei Rechtsherzkatheteruntersuchungen in körperlicher Ruhe ein mPAP von 25 mmHg oder darüber gemessen wird⁵. Ein mPAP von 15-24 mmHg kann als Borderline-PH bezeichnet werden⁴. Kein Diagnosekriterium stellt der mPAP unter Belastung dar¹, jedoch kann er bei einer Erhöhung auf bereits vorhandene pathologische Gefäßveränderungen hindeuten⁴. Eine Unterform ist die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH), welche auf lange Sicht eine vergleichsweise schlechte Prognose aufweist⁶.

1.3.2 Klinische Klassifikation

Die PH wird seit der Weltkonferenz der Weltgesundheitsorganisation (WHO) 1998 in Évian-les-Bains in fünf verschiedene Kategorien unterteilt, welche zuletzt 2013 während der WHO-Weltkonferenz von Nizza überarbeitet wurden⁷. Die klinische Einteilung ermöglicht eine Differenzierung nach pathologischen Befunden, hämodynamischen Charakteristiken und therapeutischen Gesichtspunkten⁸. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der diagnostischen Gruppen.

1.3.3 Ätiologie der pulmonalen Hypertonie

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit den wichtigsten Ätiologien der PH und gibt einen kurzen Einblick in pathophysiologische Zusammenhänge, die bei der Entwicklung von Biomarkern von zentraler Bedeutung sind.

Tabelle 1 Klinische Klassifikation der PH. Modifiziert nach⁸. BMPR2 = bone morphogenetic protein receptor type 2, HIV = human immunodeficiency virus.

1. Pulmonal arterielle Hypertonie

- 1.1. Idiopathische pulmonal arterielle Hypertonie (IPAH)
- 1.2. Hereditäre pulmonal arterielle Hypertonie (HPAH)
 - 1.2.1. BMPR2
 - 1.2.2. Andere Mutationen
- 1.3. Arzneimittel- und toxininduziert
- 1.4. Assoziierte pulmonal arterielle Hypertonie (APAH)
 - 1.4.1. Kollagenosen
 - 1.4.2. HIV-Infektion
 - 1.4.3. Portale Hypertonie
 - 1.4.4. Angeborene Herzerkrankungen
 - 1.4.5. Bilharziose (Schistosomiasis)

1' Pulmonale venookklusive Erkrankung

1'' Persistierende pulmonal arterielle Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)

2. Pulmonale Hypertonie bei Erkrankungen des linken Herzens

- 2.1. Linksventrikuläre systolische Dysfunktion
- 2.2. Linksventrikuläre diastolische Dysfunktion
- 2.3. Herzklappenerkrankungen
- 2.4. Kongenitale oder erworbene Linksherz Einstrom-/Ausstrom-Trakt Obstruktion und kongenitale Kardiomyopathien
- 2.5. Angeborene/erworbene Pulmonalvenenstenose

3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie

- 3.1. Chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD)
- 3.2. Interstitielle Lungenerkrankung
- 3.3. Andere restriktiv und obstruktiv gemischte pulmonale Erkrankungen
- 3.4. Schlafapnoe-Syndrom
- 3.5. Alveoläre Hypoventilation
- 3.6. Chronische Höhenkrankheit
- 3.7. Anlagebedingte Fehlbildungen

4. Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer Thrombembolien und anderen pulmonal arteriellen Obstruktionen

- 4.1. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)
- 4.2. Andere Pulmonalarterienobstruktionen
 - 4.2.1. Angiosarkom
 - 4.2.2. Andere intravaskuläre Tumore
 - 4.2.3. Arteriitis
 - 4.2.4. Angeborene Pulmonalarterienstenose
 - 4.2.5. Parasiten (Hydatidose)

5. Pulmonale Hypertonie mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen

- 5.1. Hämatologische Erkrankungen: Chronische hämolytische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie
- 5.2. Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhans-Zell-Histiozytose, Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis
- 5.3. Metabolische Störungen: Glykogenspeicherkrankheiten, M. Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
- 5.4. Andere: Pulmonale tumorbedingte thrombotische Mikroangiopathie, fibrosierende Mediastinitis, chronisches Nierenversagen (mit und ohne Dialyse), segmentale pulmonale Hypertonie

1.3.3.1 Pulmonal arterielle Hypertonie

Bei der PAH kommt es allgemein zu strukturellen sowie funktionellen Veränderungen, insbesondere der kleinen pulmonalen Arterien und Arteriolen². Die Proliferation der Intima, eine Hypertrophie von glatten Muskelzellen und die Expansion der Tunica adventitia, sind verantwortlich für strukturelle Veränderungen und führen zu einer Verengung der kleinen Blutgefäße⁹. Dazu kommen funktionelle Einschränkungen des Gefäßendothels, welche durch vasokonstriktive Einflussfaktoren wie Endothelin verursacht werden. Einhergehend mit dieser Okklusion verändern sich verschiedene hämodynamische Parameter wie der pulmonal vaskuläre Widerstand (PVR) und der Druck im Lungenkreislauf. Ergänzend zu der allgemeinen PH-Definition müssen ein $PVR > 3$ Wood Units bei einem pulmonal arteriellen Wedge Druck (PAWP) ≤ 15 mmHg zur Diagnosestellung obligatorisch vorliegen. Darüber hinaus müssen andere präkapilläre Ursachen (CTEPH, PH infolge von Lungenerkrankungen) ausgeschlossen sein.¹⁰ Diese hämodynamischen Veränderungen bedingen eine Mehrbelastung des rechten Herzens, was im Krankheitsverlauf zum Rechtsherzversagen und damit zum Tod führen kann. Die Inzidenz der PAH liegt bei 2.3 von 10^6 Erwachsenen und kommt häufiger bei Frauen als bei Männern vor. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt ab dem Diagnosezeitpunkt ca. 57 %^{11,12}.

Die Ursachen für die beschriebene Umgestaltung der Blutgefäße sind manchmal erblich bedingt. In diesem Fall spricht man von einer hereditären PAH (HPAH)¹³. Eine große Gruppe der beteiligten Gene kodiert für die Transforming-Growth-Factor- β (TGF- β) Superfamilie, zu dieser zählt das Bone-Morphogenetic-Protein (BMP). Es wird geschätzt, dass 75 % aller HPAH-Fälle in Zusammenhang mit einer Mutation im Gen des *BMP receptor type II* (BMPRII) stehen¹⁴. Diese Mutationen beeinflussen das Wachstum in pulmonal vaskulären Muskelzellen und die Apoptoserate in pulmonalen Endothelzellen, was zu einer endothelialen Dysfunktion und einer Proliferation der glatten Muskulatur führt und damit ursächlich zur Umgestaltung der Blutgefäße beiträgt⁹. Andere Mutationen im TGF- β -Signalweg sind in Tabelle 2 aufgelistet und haben ähnliche Auswirkungen¹⁵. Außerhalb der TGF- β -Superfamilie werden Mutationen im Caveolin-1-Protein (CAV1) und Potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) mit der HPAH assoziiert^{16,17}.

Tabelle 2 Relevante Mutationen, die ursächlich zu einer HPAH beitragen.

Mutationen in der TGF-β-Superfamilie
Activin receptor-like kinase 1 (ALK1)
Endoglin (ENG)
SMAD family member 9 (SMAD9)
Bone morphogenetic protein receptor type II (BMP2)
Mutationen außerhalb der TGF-β-Superfamilie
Caveolin-1-Protein (CAV1)
Potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3)

Die Entwicklung einer PAH wird außerdem unter Arzneimittel- und Toxin-Einfluss beobachtet. Die Appetitzügler Fenfluramin und Dexfenfluramin wurden bereits vom Markt genommen, da sie über verschiedene Mechanismen eine PAH induzieren können¹⁸. Ferner wird die PAH mit Kollagenosen, HIV-Infektionen, portaler Hypertonie, Schistosomiasis sowie angeborenen Herzfehlern assoziiert¹². Bleibt die Ursache unbekannt, so ist die Diagnose idiopathische PAH (IPAH) zu stellen⁹.

1.3.3.2 Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen

Bei Linksherzerkrankungen lässt sich im Rahmen einer Rechtsherzkatheteruntersuchung meist eine Erhöhung des PAWP > 15 mmHg feststellen. Verschiedene Linksherzerkrankungen bedingen zuerst eine isoliert postkapilläre PH (Ipc-PH). Dabei sind die pulmonal-venöse Strombahn und der linke Vorhof betroffen.¹⁹ Im weiteren Verlauf erreicht die Druckerhöhung auch präkapilläre Gefäße, im Sinne einer kombiniert post- und präkapillären PH (Cpc-PH)^{20,21}. Bei der Ipc-PH liegt der diastolische Druck Gradient (DPG = diastolischer PAP - mittlerer PAWP) bei < 7 mmHg und der PVR bei ≤ 3 Wood Units³. Der PVR nimmt mit Progression der Erkrankung zu und deutet auf eine reaktive Entwicklung hin, unter der es zu irreversiblen Umbauprozessen von Gefäßen kommt. Die daraus resultierende Cpc-PH weist einen DPG ≥ 7 mmHg und einen PVR > 3 Wood Units auf³. Häufige Linksherzerkrankungen sind hierbei die diastolische Herzinsuffizienz, Mitral- und Aortenklappenvitien²⁰.

1.3.3.3 Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen oder Hypoxie

Unter physiologischen Bedingungen induziert eine akute Hypoxie die pulmonale Vasokonstriktion und eine damit einhergehende Umverteilung des Blutes in Lungenareale mit höherem Sauerstoffpartialdruck, was eine optimale Durchblutung der

sauerstoffreichen Lungenareale ermöglicht (Euler-Liljestrand-Mechanismus). Chronischer Sauerstoffmangel führt außerdem zu einer pathologischen Inflammation und Proliferation der vaskulären Endothelzellen sowie der glatten Muskulatur, reguliert durch den hypoxie-induzierten Faktor-1 α (HIF-1 α) und Mediatoren wie *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) sowie durch verschiedene Zytokine²². Eine chronische Hypoxie kann deshalb ungünstige pulmonal-vaskuläre Umbauprozesse hervorbringen^{23,24}. Gegebenheiten, die eine chronische Hypoxie fördern, sind neben dem Aufenthalt in großen Höhen, die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), das Schlafapnoe-Syndrom und die interstitiellen Lungenerkrankungen²³. Insbesondere bei den interstitiellen Lungenerkrankungen ist die PH mit einer schlechten Prognose verbunden. Dabei spielen neben der hypoxischen Vasokonstriktion, die Destruktion des Lungengewebes und die Einengung der Lungengefäße durch Überblähungen eine wichtige Rolle².

1.3.3.4 Chronisch-thromboembolische pulmonale Hypertonie

Vergleicht man die PAH mit der CTEPH, so ergeben sich bei letzterer nichthomogene, diffuse Störungen in pulmonal-arteriellen Gefäßen, welche mit vorangegangenen pulmonalen thromboembolischen Ereignissen zusammenhängen. Es können große arterielle oder auch kleinere periphere arterielle Gefäße betroffen sein. Nach dem thromboembolischen Verschluss erfolgt häufig ein vaskuläres Remodeling, induziert durch den wandadhärenten Thrombus^{25,26}. Das Remodeling findet auch in hyperperfundierten, emboliefreien Gefäßabschnitten statt². Klinisch kommt es nach einer akuten Lungenembolie oft zu einem symptomfreien Zeitraum, gefolgt von Anzeichen, die einer PAH ähneln²⁶. Den Rechtsherzkatheter-Messungen muss eine dreimonatige effektive Antikoagulation vorangegangen sein²⁷. Die CTEPH führt unbehandelt nicht selten zu einem Rechtsherzversagen mit Todesfolge²⁸.

1.3.3.5 Pulmonale Hypertonie bei unklarer oder multifaktorieller Ursache

Diese Kategorie beinhaltet Formen der PH, verursacht durch hämatologische, systemische oder metabolische Störungen, die keiner der anderen Kategorien zugeordnet werden konnten⁷.

1.3.4 Diagnostischer Prozess

Der diagnostische Algorithmus zur Identifizierung und Einordnung der PH beinhaltet verschiedene nicht-invasive und invasive Verfahren. Im Hinblick auf potentielle

diagnostische Biomarker liegt es im Interesse des Patienten und der behandelnden Ärzte Diagnoseprozesse zu verkürzen und Risiken durch weniger invasive Verfahren zu minimieren.²⁹

Bei entsprechender Klinik sind zuerst Basisuntersuchungen durchzuführen. Dazu gehören ein Elektrokardiogramm (EKG), Röntgen-Thorax, die Lungenfunktionsdiagnostik/Bodyplethysmografie und eine Basislabordiagnostik². EKG und Röntgen-Thorax eignen sich jedoch nicht zum Ausschluss einer PH³⁰.

Die transthorakale Echokardiografie (TTE) stellt die wichtigste Methode zum Screening auf eine PH dar¹, wobei diese auch zur Verlaufskontrolle eingesetzt werden kann². Dabei ist durch die Messung des Trikuspidalrefluxjets eine Schätzung des systolischen PAP (sPAP) möglich¹, wobei ein Peak des Trikuspidalrefluxjets von $> 3,4$ m/s mit hoher Wahrscheinlichkeit für eine PH spricht³. Der im Rahmen einer TTE geschätzte sPAP korreliert signifikant mit der Messung des sPAP durch einen Rechtsherzkatheter³¹. Darüber hinaus lassen sich mit dem TTE andere Zeichen erkennen, die auf eine Rechtsherzbelastung hinweisen und es können linkskardiale Ursachen erkannt werden³².

Erhärtet sich während einer TTE der PH Verdacht, so sollten in Folge Lungenerkrankungen (PH Gruppe 3) ausgeschlossen werden. Dazu kann eine *high-resolution* Computertomografie (HRCT) herangezogen werden. Das HRCT erlaubt die Einschätzung des Lungenparenchyms und damit die Erkennung von interstitiellen Lungenerkrankungen³. Sind Lungenerkrankungen (PH Gruppe 3) und Linksherzkrankungen (PH Gruppe 2) als PH Ursache unwahrscheinlich, so sollte als nächstes der Ausschluss einer CTEPH erfolgen³. In diesem Zusammenhang wird eine Ventilations-/Perfusionsszintigrafie zur Erkennung von segmentalen Perfusionsdefekten durchgeführt³⁰. Die Operabilität der CTEPH kann mithilfe einer Kontrastmittel CT evaluiert werden^{3,1}. Bleibt die Ätiologie bis dahin ungeklärt, folgen weitere spezifische Tests zur immunologischen, serologischen, genetischen und hämatologischen Abklärung. Abschließend folgt die Zuordnung in Diagnosegruppe 1 bzw. 5³².

1.3.5 Klinischer Schweregrad und Prognoseeinschätzung

Zur Einschätzung des klinischen Schweregrades und der Prognose eignet sich die *World Health Organization Functional Classification (WHO FC)*³³. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Version der *New York Heart Association Functional Classification*

(NYHA FC)³⁴. Wird ein Patient initial bei Diagnosestellung einer hohen WHO FC zugeordnet, so spricht dies für eine schlechte Prognose. Kommt es im Krankheitsverlauf zur Zuordnung in eine höhere WHO FC, so spricht dies zusätzlich für ein Voranschreiten der Erkrankung³³. Eine Übersicht über die Klassen liefert Tabelle 3.

Tabelle 3 World Health Organisation Klassifikation der funktionellen Kapazität für Patienten mit PH. Abgewandelt nach³⁴.

WHO FC I	Patienten mit PH, ohne Limitation der physikalischen Aktivität; Gewöhnliche physikalische Belastung verursacht keine Atemnot, Brustschmerzen oder Präsynkopen.
WHO FC II	Patienten mit PH und leichter Limitation der physikalischen Aktivität; keine Limitationen im Ruhezustand; Gewöhnliche physikalische Belastung führt zu Atemnot, Erschöpfung, Brustschmerzen oder Präsynkopen.
WHO FC III	Patienten mit PH und ausgeprägter Limitation der physikalischen Aktivität; keine Limitationen im Ruhezustand; Geringfügige Belastung führt zu Atemnot, Erschöpfung, Brustschmerzen oder Präsynkopen.
WHO FC IV	Patienten mit PH, die nicht mehr in der Lage zu einer beliebigen physikalischen Aktivität sind; Dyspnoe und/oder Erschöpfung im Ruhezustand; Verschlechterung der Symptome unter physikalischer Belastung; Synkope kann unter Anstrengung auftreten.

Zur Prognoseeinschätzung eignet sich zudem die 6-Minuten-Gehstrecke (SMWD). Dabei handelt es sich um einen einfach durchführbaren Test, um die submaximale Belastbarkeit von Patienten zu evaluieren³⁵. Die SMWD ist ein wichtiger Prädiktor für das Überleben bei Patienten mit PH^{36,37}. Weitere prognostisch relevante Parameter können im Rahmen einer Spiroergometrie (z. B. die maximale Sauerstoffaufnahme), Echokardiografie, kardialen Magnetresonanz-Tomografie sowie im Rechtsherzkatheter ermittelt werden³⁸. Im Kapitel 1.4 wird zudem ausführlich auf biochemische Marker zur Prognoseeinschätzung eingegangen.

1.3.6 Pharmakologische Behandlung

1.3.6.1 Allgemeine pharmakologische Behandlungsmöglichkeiten

Im Rahmen einer Basistherapie zur Volumenentlastung des rechten Ventrikels kann eine Medikation mit **Diuretika** indiziert sein. Eine **Sauerstoffgabe** wird im Rahmen der Versorgung von hypoxischen Patienten empfohlen, da die Hypoxie wie bereits in Kapitel 1.3.3.3 (S. 5) beschrieben, einen Reiz für eine pulmonale Vasokonstriktion darstellt³⁴. Eine langfristige Sauerstofftherapie (LTOT) kann u.a. das Mortalitätsrisiko von COPD-Patienten senken und wirkt sich günstig auf den PAP aus^{39,34}. Patienten mit HPAH, IPAH und Appetitzügler-assoziiertes PAH scheinen von einer **Antikoagulation** bezüglich ihrer Mortalität zu profitieren^{40,41}.

1.3.6.2 Spezifische pharmakologische Behandlungsmöglichkeiten der PAH

Spezifische Pharmaka sind im Wesentlichen zur Behandlung der PAH zugelassen. Zur Behandlung einer PAH kommen Prostanoiden, Stimulatoren am IP-Rezeptor, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ERA) und Phosphodiesterase-5 Inhibitoren (PDE5i) sowie Kalzium-Antagonisten (CCB) und Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase (soluble GC, sGC) zum Einsatz^{34,42,43}. Im folgenden Abschnitt wird auf die verschiedenen Medikamente eingegangen.

CCB sollen, basierend auf einer positiven vasodilatorischen Antwort (Abfall des mPAP auf ≤ 40 mmHg, und Δ mPAP ≥ 10 mmHg) auf die Testung mit inhalativem Stickstoffmonoxid (NO), Iloprost oder intravenösem Adenosin, bei Patienten mit IPAH, HPAH und Appetitzügler-assoziiierter PAH eingesetzt werden^{44,45}. Kalzium-Antagonisten, wie z. B. Diltiazem, blockieren spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, was eine Weitstellung der pulmonalen Gefäße begünstigt¹¹. Außerhalb dieser klar definierten Gruppe sind CCB kontraindiziert.

Zu den **ERA** zählen Bosentan, Macitentan und Ambrisentan. Endothelin spielt unter pathophysiologischen Gesichtspunkten eine wichtige Rolle, da es mitogene und vasokonstriktorische Effekte auf pulmonale glatte Gefäßmuskelzellen (PASMC) hat¹¹.

Der **PDE5i** Sildenafil, welcher einen Abbau von cyclischem Guanosinmonophosphat verhindert, wies in verschiedenen Studien eine signifikante Verbesserung von hämodynamischen Merkmalen (mPAP, PVR) und eine Steigerung der SMWD auf^{46,45,43}.⁴⁷. Ebenfalls wurden antiproliferative Effekte nachgewiesen³. Auch Tadalafil steht zur Behandlung der PAH zur Verfügung. Dabei zeigten sich ähnliche Effekte wie bei Sildenafil⁴⁷. **Prostanoiden bzw. Prostacycline** stellen Thromboxan A₂ Gegenspieler dar. Sie können die vasokonstriktorische und aggregationsfördernde Wirkung des Thromboxan A₂ antagonisieren und werden von Endothelzellen ausgeschüttet⁴⁸. Iloprost wird als inhalatives Prostacyclin-Derivat zur Behandlung einer IPAH mit WHO-Funktionsklasse III eingesetzt⁴⁵. Eine Steigerung der SMWD konnte hierbei beobachtet werden⁴⁹. Epoprostenol, welches zur intravenösen Therapie zugelassen ist, wird jedoch aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit und der komplizierten Applikationsform nur selten außerhalb der Klinik verwendet^{34,43}. Treprostinil konnte bei subkutaner Anwendung u.a. eine Verbesserung bezüglich der SMWD und der hämodynamischen Parameter erzielen^{50,43}.

Der oral verfügbare **Prostacyclin IP-Rezeptor-Agonist** Selexipag bindet hochselektiv humane Prostacyclin-Rezeptoren. Gastroenterale Nebenwirkungen, wie bei Prostacyclinen, blieben bei Selexipag im Versuch mit Rattenmodellen aus⁵¹. Selexipag konnte bereits in einer Phase-II-Studie eine signifikante Verbesserung bezüglich des PVR und der 6-Minuten-Gehstrecke demonstrieren⁵². Auch bezüglich eines *composite* Endpunkts (z. B. Tod jeglicher Ursache oder eine Komplikation bei PAH) konnte Selexipag im Rahmen einer Phase-III-Studie überzeugen⁵³.

Riociguat führt zu einer Erhöhung der Konzentration des intrazellulären cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP). Riociguat vermindert inflammatorische und proliferatorische Prozesse in pulmonalen Gefäßen und führt über weitere Mechanismen zu einer Vasodilatation und Unterdrückung der Thrombozytenaggregation. Es wirkt nicht nur direkt stimulierend auf die **sGC**, sondern auch indirekt über eine Sensibilisierung für NO⁵⁴. In der *Pulmonary Arterial Hypertension Soluble Guanylate Cyclase–Stimulator Trial 1* (PATENT-1) konnte Riociguat signifikant die SMWD und verschiedene sekundäre Endpunkte (PVR, NT-proBNP-Spiegel, *WHO FC*, Zeit bis zur klinischen Verschlechterung, Borg-Dyspnoe-Skala) verbessern⁵⁵. CTEPH-Patienten scheinen ebenfalls von Riociguat zu profitieren⁵⁶. Riociguat darf nicht mit einem PDE-5i kombiniert werden³.

Um eine optimale pharmakologische Behandlung zu ermöglichen, werden verschiedene Wirkmechanismen in einer **Kombinationstherapie** verbunden⁴⁵. Zur Verfügung stehen dabei drei verschiedene Signalwege (Prostanoide, ERA, PDE5i bzw. sGC)³.

1.3.6.3 Nicht pharmakologische Therapiemöglichkeiten

Körperliches Training sowie **mentale Unterstützung** durch spezialisierte Zentren können die medikamentöse Therapie unterstützen^{34,45}. Bei einer CTEPH ist die **pulmonale Endarteriektomie** das Mittel erster Wahl und einer medikamentösen Therapie vorzuziehen. Im Rahmen dieser Operation werden die okkludierten Blutgefäße rekanalisiert, wobei der Zugang über eine mediane Sternotomie erfolgt⁵⁷. Bei hoher Komorbidität, distaler vaskulärer Obstruktion oder unzureichendem Therapieerfolg nach pulmonaler Endarteriektomie, kann eine **pulmonale Ballonangioplastie (BPA)** diskutiert werden, wobei es sich noch um ein experimentelles Verfahren handelt⁵⁸.

1.4 Biomarker

1.4.1 Definition

Eine verbreitete Definition für Biomarker in der Medizin liefert die *Biomarkers Working Group*²⁹. Dabei handelt es sich um die Definition eines Konzepts⁵⁹:

“A characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention“.⁶⁰

Nach dem Konzept stellt ein Biomarker einen objektiv messbaren Parameter dar. Dieser dient der Evaluation von biologischen Prozessen, welche pathogenetischer oder physiologischer Natur sein können. Darüber hinaus umfasst die Definition die Evaluation von pharmakologischen Reaktionen auf therapeutische Interventionen.

Eine andere Definition liegt seit 2013 durch *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* vor. Diese lässt sich auf biochemische Marker im engeren Sinne übertragen:

“Human or animal biological property whose in vitro measurement or identification is useful for the prevention, diagnosis, prognosis, treatment, and follow-up of human or animal diseases, and for their understanding“.⁵⁹

Dabei werden Biomarker als biologisches Eigentum von Menschen und Tieren angesehen, wobei Messungen und die Identifikation der Marker für Prävention, Diagnostik, Prognostik, Therapie und zur Verifizierung von Wirksamkeit in Studien nützlich sind und zum Verständnis von Krankheiten beitragen⁵⁹.

1.4.2 Allgemeines

Biomarker stellen im medizinischen Forschungs- und Klinikalltag wichtige Anhaltspunkte dar, um z. B. Krankheitsmechanismen und Erkrankungsursachen zu untersuchen sowie den etwaigen therapeutischen Erfolg zu evaluieren oder um eine Diagnose zu stellen. Bezüglich der PH bedeutet dies, dass Biomarker wichtige Werkzeuge zur Früherkennung (*Screening*) und ferner zur diagnostischen Einordnung, zur prognostischen Einschätzung und zur Einschätzung der Angemessenheit von therapeutischen Maßnahmen darstellen.²⁹ Auch werden Biomarker zur Erkennung von Risikofaktoren eingesetzt, die eine Krankheitsentstehung begünstigen sowie zur Zuordnung zu Krankheitsstadien herangezogen. In der Entwicklung von Medikamenten

spielen insbesondere molekulare Biomarker eine herausragende Rolle. Biomarker können physikalisch, biologisch und molekular beschaffen sein.⁶¹ Bezüglich der PH ist es bisher nicht gelungen, einen diagnostischen molekularen Biomarker im klinischen Alltag zu etablieren²⁹.

Im Hinblick auf eine individuelle Therapie bei Patienten mit PH könnte eine Multibiomarker-Strategie von erheblicher Bedeutung sein. Dabei können Biomarker, um z. B. optimale Behandlungsziele zu erreichen, mehrfach therapiebegleitend abgenommen werden. Es ist zudem sinnvoll, Biomarker aus unterschiedlichen pathophysiologischen Zusammenhängen (s. Abbildung 1) in einem Multibiomarker-Ansatz zu kombinieren.^{62,3,63}

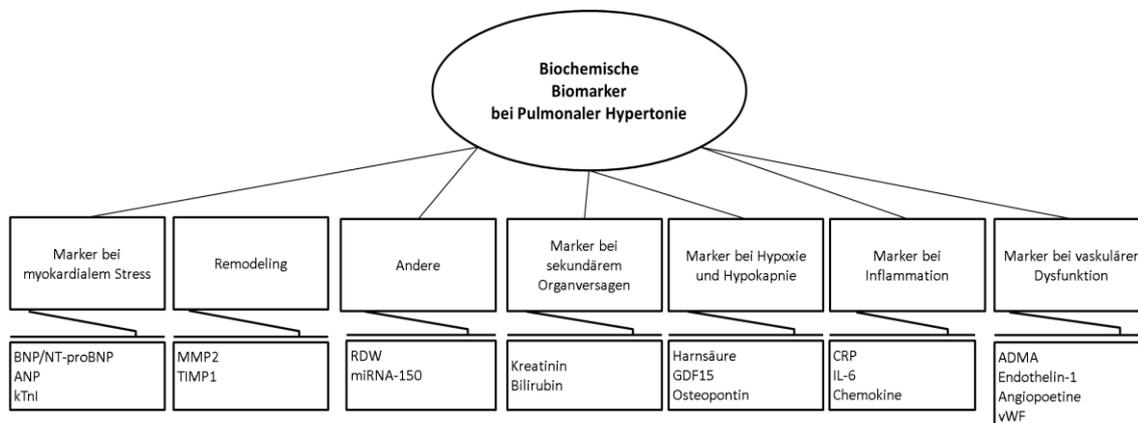


Abbildung 1 Übersicht über biochemische Biomarker bei PH unter pathophysiologischen Gesichtspunkten. Die einzelnen Biomarker sind ihrem pathophysiologischen Korrelat zugeordnet. ADMA = asymmetric dimethylarginine, ANP = atrial natriuretic peptide, BNP/NT-proBNP = brain natriuretic peptide, CRP = C-reaktives Protein, GDF15 = growth differentiation factor 15, IL-6 = Interleukin-6, kTnI = kardiales Troponin I, miRNA-150 = micro-Ribonukleinsäure-150, MMP2 = matrix metalloproteinase-2, RDW = red cell distribution width, TIMP1 = tissue inhibitor of metalloproteinases 1, vWF = Von-Willebrand-Faktor. Modifiziert nach ³ und ⁶³.

1.4.3 Biomarker der pulmonalen Hypertonie

An dieser Stelle wird auf bereits etablierte und potentielle biochemische Biomarker hinsichtlich der PH eingegangen.

1.4.3.1 Brain natriuretic peptide (BNP)

Die Vorstufe proBNP wird hauptsächlich in ventrikulären Kardiomyozyten gebildet. Aus der Vorstufe gebildetes BNP sowie NT-proBNP, die im Rahmen einer Druck- bzw. Volumenbelastung und einer damit einhergehenden erhöhten Wandspannung ins Blut sezerniert werden, weisen unterschiedliche Plasmahalbwertszeiten auf. Die Halbwertszeit von BNP im Plasma beträgt ca. 22 Minuten, die von NT-ProBNP etwa

zwei Stunden²⁹. BNP trägt zur physiologischen Blutdruckregulation bei. Durch die Erhöhung der Ausscheidung von Natrium und Wasser durch die Nieren, die Unterdrückung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und eine direkte vasodilatierende Wirkung kann BNP den Pre- und Afterload des rechten Ventrikels (RV) vermindern (Abbildung 2)^{64,65}. NT-proBNP dient als Indikator für linksventrikuläre und rechtsventrikuläre Dysfunktionen, weshalb ein Anstieg im Rahmen einer PH zu beobachten ist⁶⁶. Hämodynamische Parameter sowie die rechtsventrikuläre myokardiale Masse korrelieren positiv mit der NT-proBNP Plasmakonzentration⁶⁵. Positive Korrelation zwischen BNP Plasmakonzentrationen und der *WHO FC* finden ebenfalls Erwähnung, insbesondere bei Patienten mit primärer PH⁶⁶. Darüber hinaus kann NT-proBNP als prognostischer Biomarker herangezogen werden. Hohe *Baseline* NT-proBNP Werte sprechen für eine erhöhte Mortalität. Zudem korrelieren positive Antworten auf vasodilatorische Therapien mit Abnahmen des NT-proBNPs, was mit günstigen Prognosen assoziiert wird.⁶⁶ NT-proBNP-Plasmakonzentrationen werden weniger stark durch die Nierenfunktion beeinflusst als BNP-Plasmakonzentrationen. Ebenfalls scheint NT-proBNP als Prädiktor für Überleben dem BNP überlegen zu sein. In diesem Kontext könnten die unterschiedlichen Halbwertszeiten eine Rolle spielen.⁶⁷

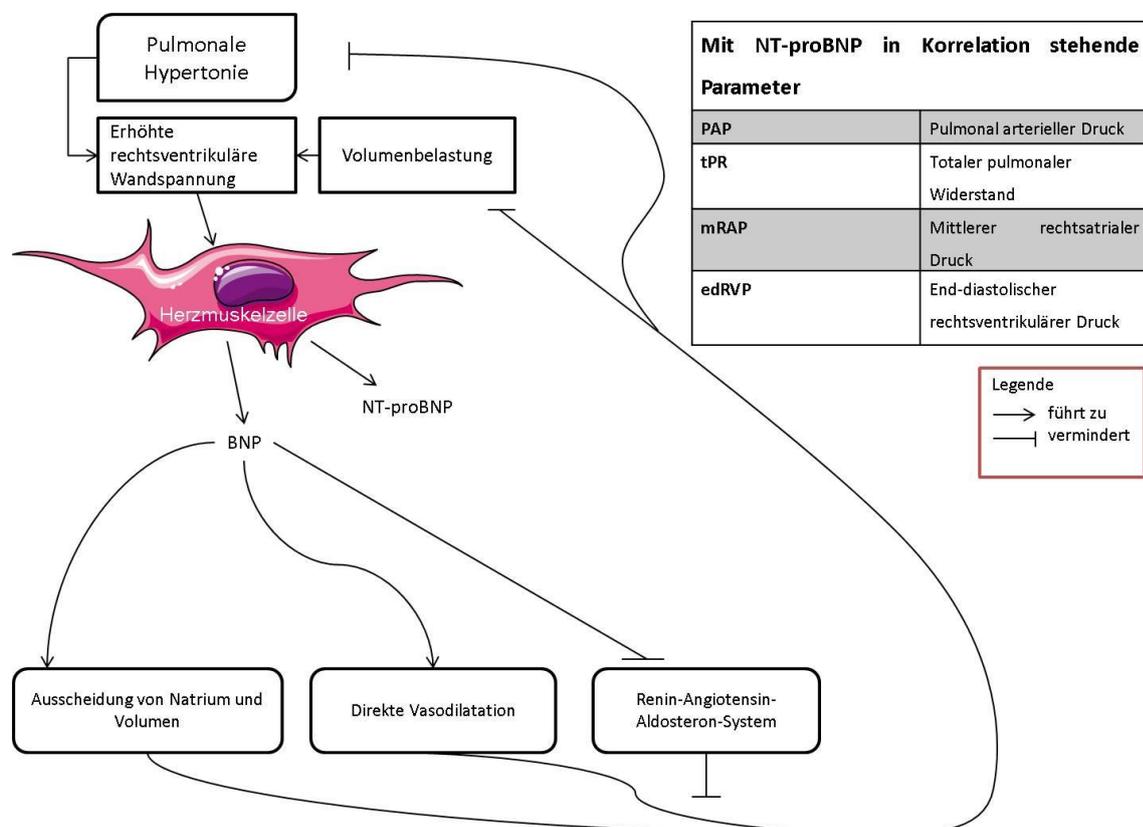


Abbildung 2 BNP und NT-proBNP als Biomarker bei PH. Bei einer PH kommt es zu einer erhöhten rechtsventrikulären Wandspannung. Diese führt zur Ausschüttung von NT-proBNP und BNP aus der Herzmuskelzelle. BNP erhöht die Ausscheidung von Natrium und Volumen durch die Nieren, es führt direkt zu einer Vasodilatation und es hemmt zusätzlich das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Dies führt zu einer Volumenreduktion im Herzkreislaufsystem und vermindert die rechtsventrikuläre Wandspannung. NT-proBNP-Plasmaspiegel korrelieren mit hämodynamischen Parametern (PAP, tPR, mRAP, edRVP). Modifiziert nach^{64,65}.

1.4.3.2 Endothelin-1 (ET-1) und Carboxy-Terminal pro-endothelin-1 (CTproET-1)

Der potente Vasokonstriktor ET-1 wird von Endothelzellen und Kardiomyozyten sezerniert. ET-1 ist an der Regulation der physiologischen kardiovaskulären Funktion beteiligt. Nach seiner Freisetzung bindet ET-1 an den ET-A-Rezeptor innerhalb des kardiovaskulären Systems, wodurch vaskuläres Remodeling und eine Vasokonstriktion begünstigt werden.⁶⁸ Hochrelevant ist zudem der ET-B₁-Rezeptor, der bei seiner Aktivierung die Synthese von Stickstoffmonoxid und Prostacyclin erhöht, welche eine Vasodilatation und Antiproliferation begünstigen⁶⁹. CTproET-1 wird stöchiometrisch mit ET-1 sezerniert und weist eine längere Plasmahalbwertszeit auf. Bei gesunden Patienten korrelieren CTproET-1-Plasmakonzentrationen signifikant positiv mit den Faktoren Alter, verminderte Nierenfunktion, zunehmende linksatriale Größe und epidermal Growth-Faktor (eGF). Eine negative Korrelation besteht im Zusammenhang mit dem diastolischen Blutdruck.⁷⁰ CTproET-1 kann die kardiovaskuläre Mortalität der Patienten mit chronischem Herzversagen über einen Zeitraum von 12 Monaten vorhersagen⁷¹ und ist ein Prädiktor der eventfreien Ein-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit PAH^{72,73}. Hinsichtlich des klinischen Schweregrades unterscheiden sich Plasmaspiegel signifikant zwischen der *WHO FC II* und *III*. Ebenfalls korreliert CTproET-1 signifikant negativ mit der SMWD bei PAH-Patienten⁷².

1.4.3.3 Potentielle Biomarker bei PH

Kardiale Troponine stellen Biomarker für myokardiale Verletzungen, z. B. im Rahmen eines Herzinfarktes dar. In diesem Zusammenhang sind sie fest im klinischen Diagnosealgorithmus etabliert.⁷⁴ Erhöhte Plasmakonzentrationen von **kardialem Troponin I (kTnI)** können eine Rechtsherzbelastung im Rahmen einer akuten Lungenembolie (PE) anzeigen. Durch die Verfügbarkeit von neuen hochsensitiven Tests könnte kTnI nicht nur im Zusammenhang mit der PE, sondern auch in Beziehung mit einer PAH von Bedeutung sein.^{75,73} Sind kTnI-Plasmakonzentrationen von PAH-Patienten erhöht, so besteht eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit an einem Rechtsherzversagen zu versterben. Darüber hinaus korrelieren kTnI-Konzentrationen

positiv mit der *WHO FC*, BNP, CRP, der Größe des rechten Vorhofs und negativ mit der SMWD und Sauerstoffsättigung.⁷⁶

Hohe **Harnsäure-Serumkonzentrationen** korrelieren bei IPAH-Patienten positiv mit dem mPAP, der *NYHA* Klasse und negativ mit der Ejektionsfraktion (EF) des rechten und linken Ventrikels. Die Ursache der erhöhten Harnsäure-Serumkonzentration wird im hypoxisch-ischämischen Untergang des Lungengewebes vermutet.⁷⁷

PAH-Patienten weisen Dysregulationen bezüglich **micro Ribonukleinsäuren (miRNAs)** auf, welche in der Lage sind, Translationsprozesse zu beeinflussen. So korreliert die **miRNA-150** (micro-Ribonukleinsäure) Plasmakonzentration mit der Zwei-Jahres-Überlebensrate und kann als Prädiktor für das Überleben bei Patienten mit PAH herangezogen werden. Eine verringerte miRNA-150 Plasmakonzentration wird demnach mit einer schlechten Prognose assoziiert.⁷⁸ Der **miRNA Cluster 17/92** wird als möglicher Regulator des BMPR2 postuliert, wobei eine miRNA-17/92 Überexpression zu einer verminderten Translation des BMPR2 führt. Die Überexpression von miRNA-17/92 wird durch **Interleukin-6 (IL-6)** beeinflusst. BMPR2 spielt eine herausragende Rolle in der PH-Pathogenese⁷⁹, weshalb miRNA-17/92 in der Entwicklung von PH-Biomarkern relevant sein könnte.

Der potentielle Biomarker **Growth-differentiation factor-15 (GDF-15)** ist in Lungen von PAH-Patienten im Vergleich zu gesunden nicht-PAH-Patienten⁸⁰ sowie im Serum erhöht⁶². Bei dem Zytokin handelt es sich um einen TGF- β Abkömmling, welcher u.a. vermehrt bei Scherstress und Hypoxie von verschiedenen Zellen des kardiovaskulären Systems exprimiert wird⁸⁰. Erhöhte Serumkonzentrationen von GDF-15 korrelieren positiv mit der *NYHA* Klasse, dem NT-proBNP-Plasmaspiegel sowie dem mittleren rechtsatrialen Druck und negativ mit der SMWD sowie der gemischtvenösen Sauerstoffsättigung. Bei GDF-15 handelt es sich zudem um einen Prädiktor für den Endpunkt Überleben.⁶²

Die **red cell distribution width (RDW, Erythrozytenverteilungsbreite)**, welche in klinischen Standarduntersuchungen erhoben wird, gilt als vielversprechender Biomarker bei verschiedenen Unterformen der PH. RDW korreliert positiv mit der *WHO FC*, mit NT-proBNP und negativ mit der SMWD⁸¹. Bei der RDW handelt es sich um einen unabhängigen Prädiktor für das Überleben bei Patienten mit IPAH⁸¹.

Weiterhin ist der **VEGF-Signalweg** im Hinblick auf vaskuläre Umbauprozesse bei PH beteiligt. Die Plasmakonzentrationen der freien Liganden **soluble fms-like tyrosine kinase 1** und **placental growth factor** zeigten sich signifikant unterschiedlich bei verschiedenen PH Unterformen und kommen ebenfalls in Kombination als vielversprechende diagnostische Biomarker bei PH in Frage.⁸²

1.4.4 Biomarker dieser Arbeit

1.4.4.1 Die Rezeptortyrosinkinase Axl und das Spaltprodukt Soluble Axl (sAxl)

Bei Axl handelt es sich um eine Unterform der TAM-Rezeptor Familie, welche insgesamt aus drei Mitgliedern (Tyro3, Axl, Mer) besteht. Sie beschreiben Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), welche funktionelle sowie strukturelle Gemeinsamkeiten verbinden⁸³. Axl wurde 1988 bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie erstmals entdeckt und 1991 näher charakterisiert. Den Namen Axl von *Anexelekto* (griechisch: „unkontrolliert“), erhielt der Rezeptor durch sein Potential Neoplasmen bei Fibroblasten hervorrufen zu können⁸⁴.

Axl wird durch ein Gen auf Chromosom 19 mit dem Locus q13.2 kodiert⁸⁴. Es werden die Exons 1-20 unterschieden. Exon 1 kodiert ein *N-terminales* Signalpeptid zur Integration von Axl in die Plasmamembran. Exon 2-5 sind verantwortlich für zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen, welche u.a. das Protein *Growth arrest-specific 6* (Gas6) binden können. Exon 6-9 beinhalten Informationen über Fibronektin Typ-III Domänen, welche zusammen mit anderen Molekülen Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsion vermitteln. In Bezug auf Exon 10 kann es zu einem *Exon-skipping* im Rahmen eines *alternativen Splicings* kommen, wodurch kurze und lange Isoformen unterschieden werden. Dies ist nicht zu verwechseln mit Exon 11, welches eine Sonderrolle einnimmt⁸⁵. Am Genprodukt kann hier die lösliche Form (sAxl) durch eine extrazelluläre Protease abgespalten werden. Diese wurde identifiziert als *activity of disintegrin-like metalloproteinase 10* (ADAM 10)⁸⁶. Exon 13-20 kodieren die intrazelluläre *C-terminale* Kinase Untereinheit⁸⁵. Das Protein Axl liegt je nach Glykosylierung mit einer Masse von 120kDa bzw. 140kDa vor⁸⁴, seine lösliche Form mit 65kDa⁸⁷. Die Konzentration von sAxl im Plasma übersteigt im Normalfall die des Proteins Gas6, wobei Gas6 stets an sAxl gebunden vorliegt. Vermutet wird, dass sAxl und Axl um die Bindung an Gas6 konkurrieren⁸⁸.

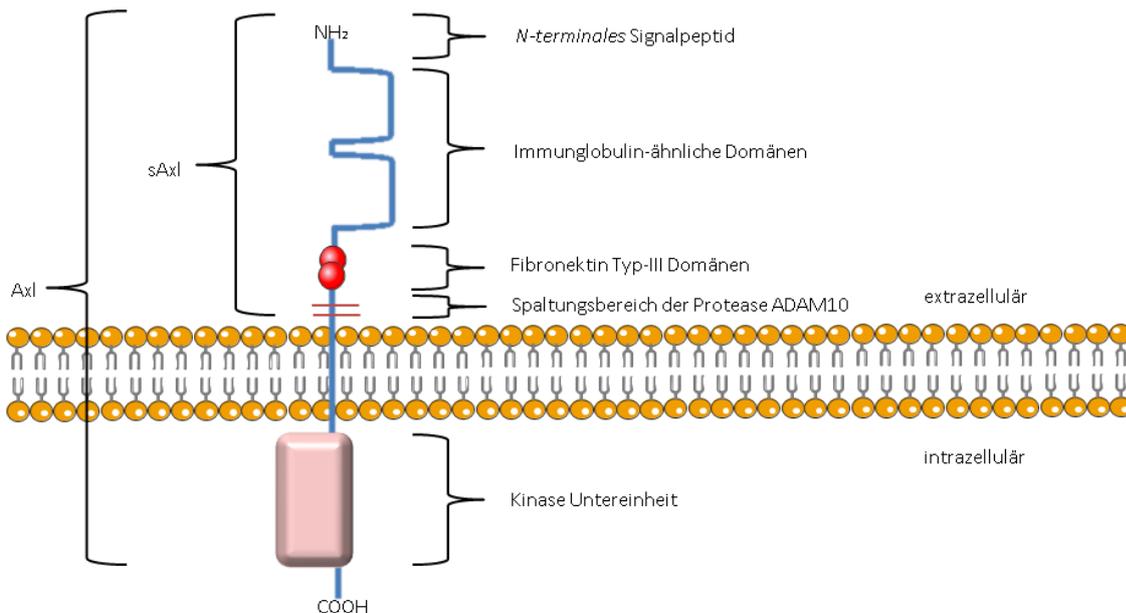


Abbildung 3 Struktur des Axl-Rezeptors. Die Abbildung zeigt den strukturellen Aufbau von Axl und sAxl. Oberhalb der Zellmembran befindet sich der extrazelluläre Anteil von Axl mit (von oben nach unten) N-terminalem Signalpeptid, zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen zur Bindung von Gas6, zwei Fibronektin Typ-III Domänen (rot) und dem Spaltungsbereich der Protease ADAM 10 (rote Querstriche). Intrazellulär befindet sich die Kinase Untereinheit und der C-Terminus. Abbildung in Anlehnung an⁸⁵.

Die Aktivierung von Axl kommt durch eine extrazelluläre Bindung des Proteins Gas6 zustande⁸⁹. Dabei bindet Gas6 mit einer *sex hormone-binding-globulin-domain* (SHBG) an die beiden Immunglobulin-ähnlichen Domänen, was zu einer Homodimerisierung und damit zu einer Aktivierung der Kinase Axl durch Autophosphorylierung führt (s. Abbildung 4). In diesem Zustand kann Axl unterschiedliche intrazelluläre Signalwege durch weitere Phosphorylierungen anstoßen^{83,85}.

Eine Bildung von homophilen Bindungen zwischen Axl-Rezeptoren zweier benachbarter Zellen wird ebenfalls im Tiermodell beschrieben, insbesondere bei einer Axl Überexpression. Diese homophile Bindung führt zu einer Rezeptoraktivierung und einer Zellaggregation⁹⁰. Die Bildung von Heterodimeren zwischen Axl und anderen RTKs der TAM Familie wird ebenfalls mit der Bereinigung von Apoptose-Zellen durch Makrophagen in Zusammenhang gebracht⁹¹. Die Entstehung von Heterodimeren zwischen Axl und nicht-TAM-Rezeptoren ist ebenfalls möglich. Das Heterodimer aus Type 1 Interferon Rezeptor (IFNAR) und Axl inhibiert die Produktion von Zytokinen im Rahmen der *Toll like Rezeptor* (TLR) Aktivierung und trägt damit zur Unterdrückung von Immunreaktionen bei⁹².

Axl ist außerdem unter Einfluss von Wasserstoffperoxid zur Autophosphorylierung fähig. Diese findet unabhängig von Gas6 statt und wird z. B. bei VSMC vermutet⁹³.

Auch laminarer Scherstress scheint eine Gas6-unabhängige Phosphorylierung von Axl zu begünstigen, was einen anti-apoptotischen Effekt auf vaskuläre Endothelzellen hat⁹⁴. Auch unterstützt Axl die VEGF-A abhängige Aktivierung des PI3K/Akt Signalwegs⁹⁵.

Im nächsten Absatz wird die Wirkung von Axl auf verschiedene PH relevante Gewebe erläutert. Proliferation, Migration, Überleben sowie erhöhte Gefäßpermeabilität und Inflammation werden durch den Mediator Axl vermittelt. Im Wesentlichen beschränken sich die Informationen auf die Wirkung von Axl auf VSMC, Gefäßendothelzellen und kardiale Fibroblasten.⁸⁵

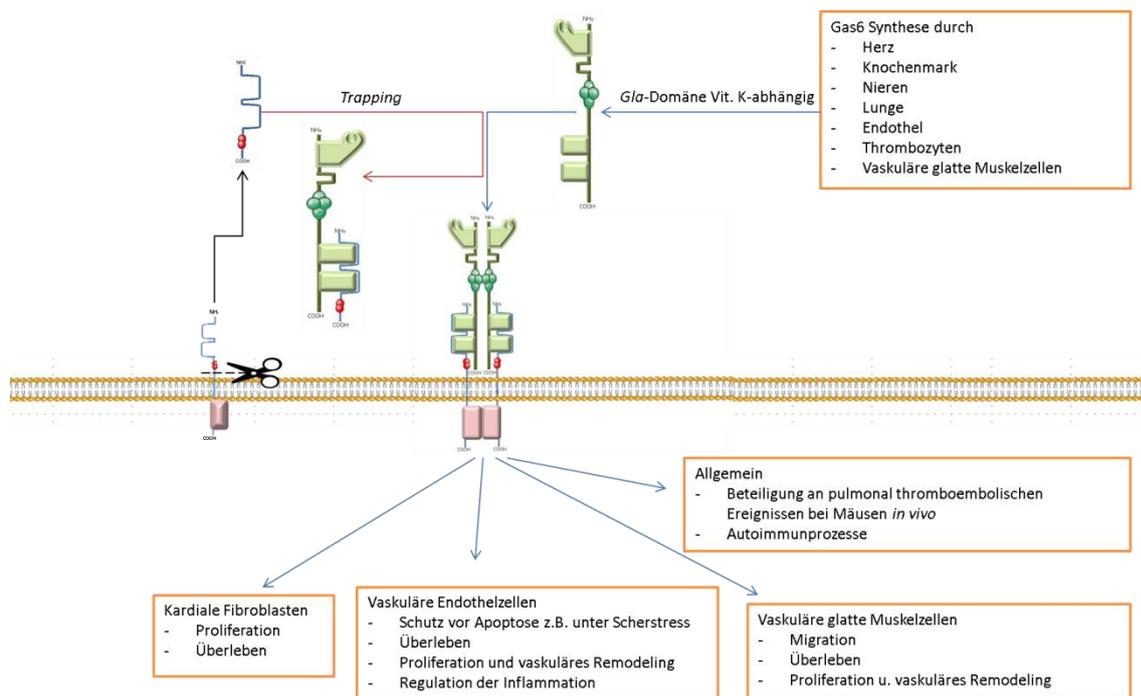


Abbildung 4 Gas6-(s)Axl-Interaktion und Einfluss auf PH relevante Gewebe. Nach der Vitamin K-abhängigen Synthese kann Gas6 durch sAxl extrazellulär abgefangen (*Trapping*) werden und steht für die Aktivierung von Axl nicht mehr zur Verfügung⁹⁶. Die Schere symbolisiert das Enzym ADAM 10, welches sAxl extrazellulär absplattet. Nach der Bindung von Gas6 an Axl kommt es zu einer Homodimerisierung und Aktivierung der Axl-Kinase. Die Aktivierung ist stets Kalzium abhängig. Die Einflüsse auf PH relevante Gewebe sind in der unteren Abbildungshälfte dargestellt. In Anlehnung an⁸⁵.

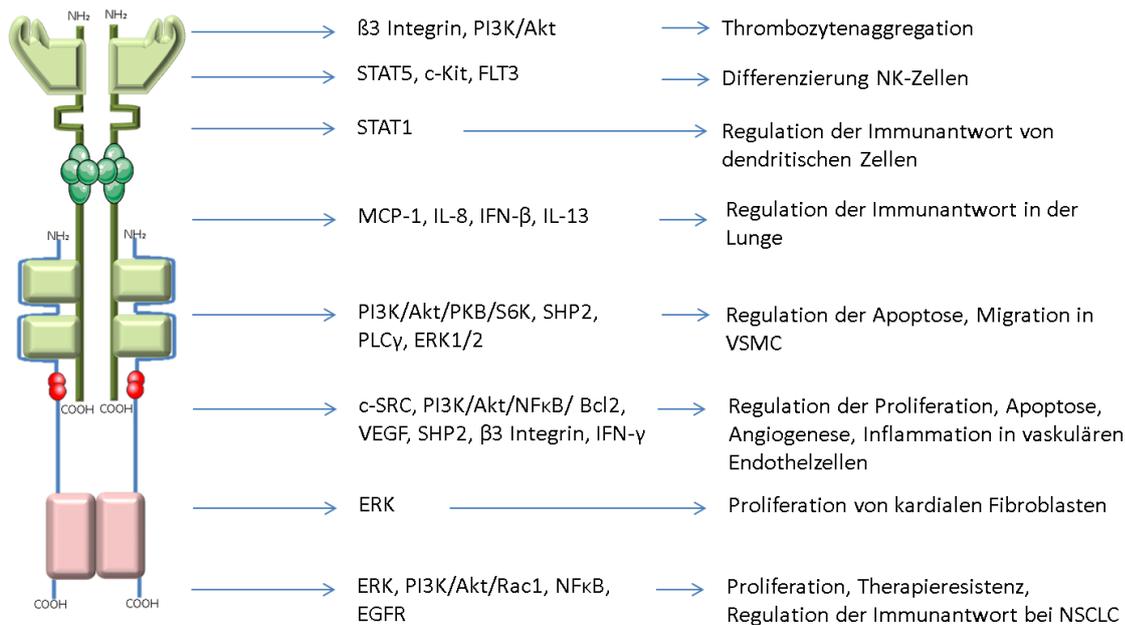


Abbildung 5 Übersicht Signalwege der Gas6-(s)Axl-Interaktion mit Einfluss auf ausgewählte Zelltypen und Gewebe. Die Rezeptortyrosinkinase Axl stößt nach ihrer Aktivierung unterschiedliche Signalwege an und hat somit Einfluss auf verschiedene Zelltypen sowie Gewebe. Abgebildet sind potenziell PH relevante Signalwege, Zell- und Gewebetypen. In Anlehnung an⁸⁵. PI3K = Phosphoinositid-3-Kinasen, Akt = Protein kinase B, STAT = Signal transducer and activator of transcription 5, FLT3 = fetal liver kinase 3, MCP-1 = monocyte chemotactic protein 1, IL-8 = Interleukin 8, NK-Zellen = Natürliche Killerzellen, IFN-β = Interferon-β, IL-13 = Interleukin 13, PKB = Proteinkinase B, S6K = Ribosomal protein S6 kinase, SHP2 = Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2, PLC = Phospholipase C, ERK = extracellular signal-regulated kinases, NFκB = nuclear factor κ-light-chain-enhancer, IFN-γ = Interferon- γ, Bcl2 = B-cell lymphoma 2, Rac1 = Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor, NSCLC = Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom.

Im Gefäßendothel hat Axl eine Schutzfunktion. Die aktivierte RTK unterdrückt bei laminarem Scherstress *in vitro* die Apoptose des Gefäßendothels. Wird die Expression von Axl künstlich durch die Blockade von Ionenaustauschern unterdrückt, so kommt es im Endothel vermehrt zur Apoptose. Zusätzlich verhindert die lösliche Form sAxl *in vitro* unter Scherstress die Phosphorylierung von Axl, was pro-apoptotische Auswirkungen hat.⁹⁴ Auch die Gas6 abhängige Aktivierung von Axl verhindert den programmierten Zelltod von humanen pulmonal-arteriellen Endothelzellen *in vitro*⁹⁷.

In einem *deoxycorticosterone Acetate-Salt Rats* Modell, wo eine künstliche Hypertonie erzeugt wird, führt die RTK verstärkt zu vaskulärem Remodeling und zu einer Verschlechterung der vom Endothel abhängigen Vasodilatation⁹⁸. Einen ähnlichen Einfluss hat Axl auf VSMC. Über den bereits beschriebenen PI3K/Akt Signalweg hat Axl anti-apoptotische Wirkung auf VSMC^{95,99}, beeinflusst die Migration des Zelltyps und führt über Phosphoinositid-Phospholipase C (PLC) zur Verdickung der *Neointima* nach vaskulären Schädigungen¹⁰⁰. Bei kardialen Fibroblasten begünstigt der Gas6-Axl-

Signalweg ebenfalls Proliferation und das Überleben. Dabei scheint der *extracellular-signal Regulated Kinase* (ERK) Signalweg einen wichtigen Beitrag zu leisten¹⁰¹.

Das Spaltprodukt sAxl wird bereits in zahlreichen Krankheitsbildern als potentieller Biomarker beschrieben. Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom ist die Serumkonzentration von sAxl signifikant erhöht und korreliert mit CRP, TNF- α und Troponin I. Dabei kommen inflammatorische Prozesse als Ursache in Betracht.¹⁰² Ebenfalls zeigen Patienten mit Herzversagen erhöhte sAxl Serumkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch ist eine erhöhte sAxl Serumkonzentration mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit Herzversagen assoziiert.¹⁰³ Darüber hinaus kommt sAxl als Prädiktor für die Ruptur eines intrakranialen Aneurysmas in Frage¹⁰⁴. Beim abdominalen Aortenaneurysma korreliert sAxl negativ und Gas6 positiv mit dessen Größe. Nach der Einführung eines Gas6/sAxl-Verhältnisses wurde eine noch bessere positive Korrelation erzielt¹⁰⁵. Im Zusammenhang mit Krebserkrankungen spielt sAxl als Biomarker eine wichtige Rolle. Bei Patienten mit Nierenkrebs weisen erhöhte sAxl Serumkonzentrationen auf eine schlechte Prognose hin¹⁰⁶. Bei Patienten mit Neurofibromatose Typ I ist die Serumkonzentration von sAxl ebenfalls im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöht.¹⁰⁷

1.4.4.2 *Growth arrest-specific 6*

Das Protein Gas6 wurde 1993 in NIH/3T3 Fibroblasten näher charakterisiert, nach der Entdeckung durch C. Schneider, R. M. King, und L. Philipson im Jahr 1988. Namensgebend war ein Zustand der erhöhten Gas6 Expression bei Fibroblasten im Zellzyklusarrest (*Growth arrest-specific*).¹⁰⁸

Bei Gas6 handelt es sich um ein Vitamin K-abhängiges Protein, verwandt mit den Gerinnungsfaktoren IX, X, II, VII sowie Protein S und C¹⁰⁹. Es interagiert mit Phosphatidylserin-haltigen Phospholipiden sowie TAM-Rezeptoren, wobei Axl und Tyro3 bevorzugt werden.^{86,110}

Humanes Gas6 besteht aus 678 Aminosäuren und ist zu 44% mit der Aminosäure-Sequenz von Protein S identisch¹⁰⁸. Zu lokalisieren ist das Gas6-Gen auf Chromosom 13 (13q34)¹¹¹. Strukturell folgen auf die *N-Terminale γ -Carboxyglutamat-Domäne* (Gla-Domäne) vier EGF-ähnliche Domänen, gefolgt von zwei *Laminin G-Domänen*, die zusammen das SHBG ausmachen (Abbildung 6)¹¹². Die Gla-Domäne ist zuständig für eine Kalzium-abhängige Bindung von Phospholipiden auf Zelloberflächen. Die SHBG-

Domäne interagiert, wie bereits beschrieben, mit TAM-Rezeptoren und die EGF-ähnlichen Domänen vermitteln interzelluläre Kommunikation.⁸⁵ Erwähnung findet auch eine *Disulfidbrücken-Loop-Region* zwischen den Gla- und EGF-Domänen, welche mit der Serin-Protease Thrombin interagiert¹¹³.

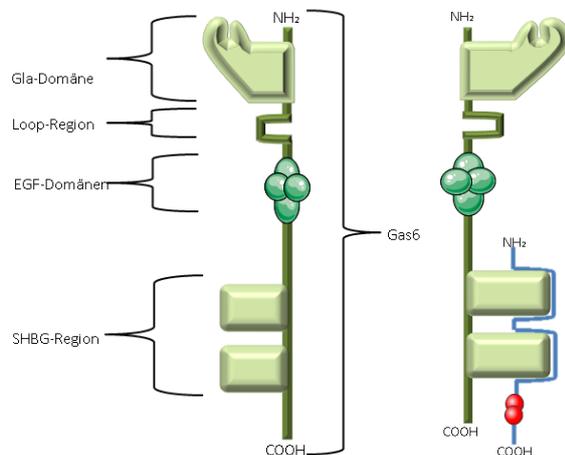


Abbildung 6 Gas6 Struktur. Gas6 besteht aus einer Vitamin K-abhängigen Gla-Domäne, einer Loop-Region, vier EGF-Domänen und der SHBG-Region zur Bindung an (s)Axl. Auf der rechten Seite liegt Gas6 gebunden an sAxl vor (*Trapping*). In Anlehnung an⁸⁵.

Eine aktivierende Gas6-Axl-Interaktion ist Kalzium- und Phosphatidylserin-abhängig, wobei Gla-defizientes Gas6 an Axl binden kann ohne jedoch dabei eine Aktivierung der Kinase hervorzurufen. Die molekulare Masse von Gas6 beträgt 75 kDa¹¹⁴. Exprimiert wird Gas6 hauptsächlich in Herz, Knochenmark, Nieren, Lunge, Endothel, Thrombozyten sowie in VSMC^{113,115}. Ein direkter Zusammenhang besteht, wie bereits beschrieben, zwischen dem Gas6-Axl-Signalweg und dem Überleben von Endothelzellen. Dabei ist die *post-translationale* Vitamin K-abhängige Modifikation der Gla-Domäne durch die γ -Glutamylcarboxylase für die Aktivierung von Axl durch Gas6 essentiell¹¹⁶. Der Vitamin K-Antagonist Warfarin unterbindet diese Modifikation, was einen negativen Einfluss auf das Überleben von *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) und Fibroblasten hat¹¹⁷. Es wird zudem angenommen, dass die Pankreastumorzellenmigration durch eine *low-dose* Warfarin-Exposition vermindert wird. Dies trifft unter der Bedingung zu, dass Axl ausreichend von Tumorzellen exprimiert wird¹¹⁸. Ein positiver Einfluss auf das Überleben von PH Patienten mit linksventrikulärer systolischer Dysfunktion (LVSD) unter Warfarin wird erwähnt. Dieser Effekt war nicht zu beobachten bei Patienten mit LVSD ohne PH¹¹⁹.

In diesem Absatz wird auf die Funktion von Gas6 eingegangen. Wie bereits erwähnt, besteht eine Verwandtschaft zwischen den Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren und Gas6¹⁰⁹. Dabei kommt es *in vivo* bei Gas6-defizienten Mäusen zu einem Rückgang von Kollagen/Epinephrin induzierten pulmonalen thromboembolischen Ereignissen, ohne dabei das Risiko einer Spontanblutung zu erhöhen. Somit hat Gas6 Einfluss auf die Thrombozyten-Funktion¹¹⁵. Es wird davon ausgegangen, dass zumindest im Mausmodell Gas6 durch die Degranulation von aktivierten Thrombozyten freigesetzt wird, wo es danach an TAM-Rezeptoren der benachbarten Thrombozyten bindet und dort einen PI3K-Signalweg initiiert. Dies führt zu einer Phosphorylierung von β 3-Integrinen, welche u.a. an der Thrombozytenaggregation beteiligt sind. Ebenfalls kommt es zu einer Hochregulation der Expression von P-Selektinen und des *Tissue factor* in vaskulären Endothelzellen^{113,120}. Der Nachweis von Gas6 in humanen Thrombozyten wurde jedoch bisher nicht erbracht¹²¹.

In Endothelzellen eines Mausmodells führt die Gas6-abhängige Axl Aktivierung zu einer proinflammatorischen Signalkaskade. Dabei werden im Endothel die vaskulären Zelladhäsionsmoleküle *Vascular cell adhesion Protein 1* (VCAM-1) und das *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) stärker exprimiert. Dies bedingt eine erhöhte Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an das Endothel, gefolgt von der Einwanderung der Leukozyten in tiefere Gewebeschichten¹²². Eine Vermittlung der Phagozytose von apoptotischen Zellen kommt möglicherweise durch Gas6-TAM-Signalwege zustande. Dabei exprimieren apoptotische Zellen vermehrt Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche, welches die Gla-Domäne von Gas6 bindet. Gas6 wiederum vermittelt über TAM-Rezeptoren ein pro-Phagozytose Signal und dient somit als Brückenmolekül. Makrophagen und dendritische Zellen werden daraufhin aktiviert und es kommt zur *Clearance* der apoptotischen Zellen. Wird dieser Prozess gestört, so verbleiben vermehrt apoptotische Zellen, die im Mausmodell zur Entwicklung von Autoimmunprozessen, z. B. des systemischen Lupus erythematosus, beitragen⁹¹.

Auch tritt Gas6 als potentieller Biomarker in Erscheinung. Bei Patienten mit chronischem Nierenversagen waren Gas6 Plasmakonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht¹¹⁴. Patienten mit akuter Dyspnoe wiesen bei Lungenentzündung und Herzversagen signifikant höhere Plasmakonzentrationen auf, als Patienten mit gleicher Symptomatik bei einer nachgewiesenen Lungenembolie. Gas6

könnte hier in der Differentialdiagnostik bei Dyspnoe eine wichtige Rolle einnehmen¹²³. Bei Patienten mit Koronararterien-Bypass waren Plasmakonzentrationen von Gas6 und sAxl im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verringert. Dabei waren hohe Gas6 Plasmakonzentrationen assoziiert mit einer niedrigeren operationsbedingten Sterberate.¹²⁴ Bei Patienten mit Sepsis korrelierte die Gas6 Plasmakonzentration mit dem Schweregrad der Erkrankung, insbesondere mit der hepatorenenalen Dysfunktion¹²⁵. Bei Rheuma-Patienten mit systemischem Lupus erythematosus korrelierten Gas6 und sAxl Plasmakonzentrationen positiv mit der Erkrankungsaktivität, mit der Blutsenkungsreaktion und CRP sowie negativ mit der Hämoglobinkonzentration¹²⁶. Bei Patienten mit Sjögren Syndrom (SS) ist die Plasmakonzentration von Gas6 ein unabhängiger Risikofaktor, wobei Patienten mit SS eine signifikante verringerte Konzentration aufweisen¹²⁷. Bei Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom kann Gas6 als unabhängiger Prädiktor für das Überleben herangezogen werden. Serumkonzentrationen von Gas6 waren hier signifikant höher als in der Kontrollgruppe.¹²⁸ Auch beim Ovarialkarzinom starben Patienten mit erhöhter Gas6 Expression früher¹²⁹.

Als mögliches therapeutisches Ziel bietet der Gas6-Axl-Signalweg ebenfalls Potential. Das *small-molecule* R428 stellt einen Inhibitor der Axl-Kinase dar. Die inhibierende Wirkung wurde *in vitro* bei verschiedenen Zelltypen (z. B. HUVECs) nachgewiesen. R428 blockiert die Gas6-Axl-Signalkaskade und damit die Tumorzellinvasion sowie die Absiedlung von Tumormetastasen und nimmt Einfluss auf die Angiogenese.¹³⁰ Die Blockade der Axl abhängigen Migration der VSMCs und ein negativer Einfluss auf das Überleben von VSMCs konnte ebenfalls *in vitro* nachgewiesen werden¹³¹. Bei idiopathischer Lungenfibrose blockierte R428 die Migration, Invasion und Proliferation von Fibroblasten *in vitro* sowie im Mausmodell (SCID/Bg)¹³².

Der Einfluss von Warfarin auf die Aktivität von Gas6 wurde bereits erwähnt. Eine andere Möglichkeit stellt das rekombinante Äquivalent zu sAxl dar, welches Gas6 Interaktionen mit Axl blockieren kann. Ein Schutz vor pulmonalen Thrombosen konnte bei Mäusen bereits nachgewiesen werden⁹⁶. Einen weiteren Therapieansatz stellen monoklonale Anti-Axl-Antikörper dar, welche z. B. die Gas6-Axl-Interaktion verhindern und damit nachgeschaltete Signalwege inhibieren, was Einfluss auf die Tumorprogression haben könnte¹³³. Weitere Substanzen, deren Indikationen und Entwicklungsstand sind der Tabelle 25 im Anhang zu entnehmen.

2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Vorhandene Erkenntnisse über Gas6 und sAxl als Biomarker beziehen sich auf eine Variation verschiedener Krankheitsbilder. Im Hinblick auf die PH sind beide Proteine bisher weitgehend unbeachtet. Diese Arbeit soll demnach untersuchen, ob es sich bei Gas6 und sAxl um Biomarker bei PH handeln könnte. Daraus ergeben sich mehrere Fragestellungen.

Die diagnostische Relevanz betreffend soll untersucht werden, ob sich die Plasmakonzentrationen der Proteine signifikant zwischen PH-Patienten und Nicht-PH-Patienten unterscheiden. Darüber hinaus wird untersucht, ob die Plasmakonzentrationen zwischen den Diagnosegruppen der PH abweichen.

Bei Rechtsherzkatheteruntersuchungen werden verschiedene Parameter gemessen. Korrelationen zwischen Plasmakonzentrationen der potentiellen Biomarker und den Parametern mPAP, PAWP, HZV, *cardiac index* (CI) sowie PVR sollen ermittelt werden. Darüber hinaus soll eine mögliche Korrelation mit der SMWD untersucht werden.

Ein hoher klinischer Schweregrad der PH ist mit einer hohen Alltagsbelastung für den Patienten³⁴ und mit einer erhöhten Mortalität assoziiert³. Es ergibt sich nun die Frage, ob die potentiellen Biomarker zwischen Patienten mit hohem bzw. niedrigem klinischen Schweregrad der PH differenzieren können. In diesem Kontext wird untersucht, ob ein Unterschied der Plasmakonzentrationen über die *WHO FC's* vorliegt.

Auch soll untersucht werden, ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Proteinkonzentrationen und der Überlebenszeit bzw. der Zeit bis zur klinischen Verschlechterung (*TTCW*) besteht. Eine mögliche Eignung der Proteine als Risikoprädiktoren soll ebenfalls untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Studienkollektiv

Das Studienkollektiv setzte sich aus 179 (Gas6) Patienten, bzw. 167 (sAxl) Patienten zusammen. Alle Patienten befanden sich im Rahmen der Erstuntersuchung in stationärer oder ambulanter Behandlung am Uniklinikum Gießen und Marburg (UKGM), Standort Gießen. Den Patienten wurden chronologisch fortlaufende Nummern zugeordnet. Die

Zuteilung in die Diagnosegruppen erfolgte nach fortlaufenden Nummern und zielte darauf ab, eine Stichprobengröße von jeweils $N = 40$ zu erreichen. Die Studienteilnehmer wurden anhand aktueller Leitlinien durch ein interdisziplinäres Team von PH-Experten in die Diagnosegruppen CTEPH, pulmonal-venöse Hypertonie (PVH), IPAH, PH assoziiert mit Bindegewebserkrankungen (CTD) und Ausschluss PH eingruppiert³. Die Gruppe PVH entspricht dabei der Nizza Gruppe 2. Bei den erhobenen Messwerten handelt es sich stets um Daten aus Erstuntersuchungen. Kein Patient erhielt zu diesem Zeitpunkt eine PH-spezifische Medikation. Die Patienten wurden vor der Untersuchung ausführlich aufgeklärt und es erfolgte eine schriftliche Zustimmung zur geplanten Untersuchung, zur statistischen Auswertung der erhobenen Informationen sowie der Weiterverwendung der abgenommenen Blutproben. Ein Ethikvotum mit dem Aktenzeichen 100/13 „Biomarker für die Pulmonale Hypertonie“ liegt vor und die spezifische Ergänzung vom 19. Januar 2016 kann im Anhang eingesehen werden.

3.2 Studienprotokoll

3.2.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte über den Rechtsherzkatheter (*Swan-Ganz-Katheter*) und damit aus einer Pulmonalarterie in eine Ethylendiamintetraessigsäure- (EDTA) Monovette®. Im Anschluss wurde das zum Transport auf Eis liegende Blut bei 3000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß übertragen und die zellulären Blutbestandteile daraufhin verworfen. Direkt im Anschluss wurde das gewonnene EDTA-Plasma bei -80°C verwahrt.

3.2.2 Quantitative Messung von sAxl und Gas6

Die Plasmakonzentration der Proteine wurde mithilfe eines *Enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA) bestimmt¹³⁴. In beiden Fällen basierte die Messung auf dem *sandwich-Enzym* Prinzip (Abbildung 7) zur Quantifizierung von Antigenen¹³⁵.

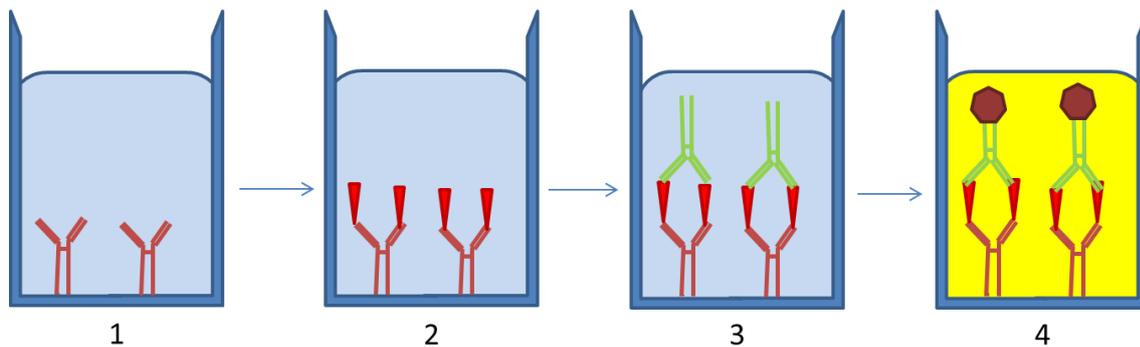


Abbildung 7 Sandwich-ELISA. Die Abbildung beschreibt den allgemeinen Ablauf eines Sandwich-ELISA. Zuerst wird der *Capture Antibody* (rot) am Boden eines Gefäßes fixiert (1). Es folgt die Zugabe eines Antigens, das an den spezifischen *Capture Antibody* bindet (2). Danach wird ein zweiter spezifischer Antikörper (*Detection Antibody*) zugegeben, der an ein weiteres Epitop des Antigens bindet (3). Im letzten Schritt wird ein Enzym zugesetzt (dunkelrotes Siebeneck), das an den *Detection Antibody* bindet und ein Substrat umsetzen kann. Dies führt zu einem Farbumschlag (hier gelb) (4). Die Geschwindigkeit der Farbbildung ist proportional zur Menge des vorhandenen Antigens. Zwischen den Schritten 1-4 sind jeweils Waschvorgänge notwendig. Verändert nach ¹³⁵.

Für die quantitative Bestimmung der Plasmakonzentration von sAxl wurde ein DuoSet® ELISA von R&D Systems® herangezogen (DuoSet® ELISA DEVELOPMENT SYSTEM Catalog Number: DY154; DuoSet® Ancillary Reagent Kit 2 Catalog Number: DY008). Der Inhalt der Sets wird im Anhang aufgelistet.

Vor Beginn der Testreihe wurde ein *Spike, Recovery, and Linearity* Protokoll der Herstellerfirma R&D Systems durchgeführt, um die mitgelieferten Reagenzien (DY154, DY008) auf ihre Messgenauigkeit hin zu überprüfen. Dabei wurde eine ausreichende Linearität und eine geringe Abweichung im *Spike/Recovery assay* erreicht.

Nach dem Hersteller-Protokoll wurde eine 96-Well-Platte (Tabelle 4) mit dem verdünnten *Human Axl Capture Antibody* (CA) beschichtet (100µl/Well). Die 96-Well-Platte wurde daraufhin bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten ein Waschvorgang und die Blockade von unspezifischen Bindungsstellen mithilfe des *Reagent Diluent* (RD) nach Herstellervorgabe. Daraufhin wurden die Plasmaproben erneut zentrifugiert und auf 1/20 der Ursprungskonzentration in RD verdünnt sowie schließlich nach einem erneuten Waschvorgang auf die 96-Well-Platte (100µl/Well) pipettiert. Dabei wurden stets horizontale Duplikate gebildet. Eine Kontrollprobe erhielt einen extra Platz (Duplikat) auf der 96-Well-Platte und wurde stets bei jeder erneuten Messung aufgetragen, um eventuelle Abweichungen zwischen den Messungen aufzudecken (Tabelle 4). Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration ist eine Referenzmenge essentiell. Dafür wurde vom Hersteller ein rekombinanter *Human Axl Standard* (Std) mitgeliefert. Dieser wurde im Rahmen einer 7-Punkt

Standardkurve verdünnt und jeweils als Duplikat auf die 96-Well-Platte aufgetragen. Die höchste Std Konzentration lag bei 4000pg/ml (serielle zweifach Verdünnungsreihe, Tabelle 4). Ein Duplikat wurde mit RD befüllt, welches als Leerwert (Blank) herangezogen wurde. Nach dem Auftragen von Std, Blank, Kontrollprobe und den Plasmaproben wurde eine Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur eingehalten. Nach der Inkubation erfolgte ein erneuter Waschvorgang. Als nächstes wurde der *Human Axl Detection Antibody* (DA) nach Herstellerangaben auf die 96-Well-Platte aufgetragen. Es erfolgte eine erneute Inkubation über zwei Stunden bei Raumtemperatur. Der nächste Schritt bestand darin das Enzym, das später ein Substrat umsetzen soll, nach einem erneuten Waschvorgang aufzutragen. Als Enzym wurde *Streptavidin-HRP* verwendet. Die Inkubationszeit, die das Enzym zum Binden an den *Human Axl* DA benötigte, betrug 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Nach der Inkubation schloss sich ein erneuter Waschvorgang an, bevor das Substrat, ein Gemisch aus *Color Reagent A u. B*, aufgetragen wurde. Eine erneute Inkubation wurde unter Lichtschutz bei Raumtemperatur für 20 Minuten durchgeführt. In dieser Zeit war ein Farbwechsel von transparent auf blau erkennbar. Nach der Zugabe einer *Stop Solution*, zur Unterbrechung der Enzymaktivität, war ein erneuter Farbwechsel von blau auf gelb erkennbar. Die photometrische Messung erfolgte mithilfe eines *Tecan Sunrise™ Plate-Reader* bei 570nm und dem Programm *Magellan™* Version 7.1.

Auch bezüglich des Proteins Gas6 wurde ein *Spike, Recovery, and Linearity* Protokoll angewandt. Es konnte keine ausreichende Linearität in den Verdünnungsreihen erreicht werden. Zudem zeigte sich eine zu große Abweichung im *Spike/Recovery assay*. Aus diesem Grund wurde auf einen anderen CA (*Human Gas6 Antibody; Polyclonal Goat IgG; R&D Systems; Catalog Number AB885*) ausgewichen, der bereits in vergleichbaren Analysen verwendet wurde¹²¹. Das ELISA Protokoll wurde dementsprechend angepasst. Eine *Recovery* zwischen 80-120% kann nach Herstellerangaben als ausreichend erachtet werden. Nach der Anpassung wurden im *Spike/Recovery assay* zufriedenstellende Werte erreicht. Das verwendete Material zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Gas6 ist dem Kapitel 9.2 im Anhang zu entnehmen.

Ermittlung der *Recovery*:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{Gemessene Plasmakonzentration mit Std}) - (\text{Gemessene Plasmakonzentration ohne Std})}{(\text{Erwartete Konzentration Std})} \times 100$$

Ergebnis:

$$82,64 \% = \frac{2385,4 \left(\frac{\text{pg}}{\text{ml}}\right) - 1063,1 \left(\frac{\text{pg}}{\text{ml}}\right)}{1600 \left(\frac{\text{pg}}{\text{ml}}\right)} \times 100$$

Tabelle 4 Anordnung der 96-Well-Platte. Es wird die beispielhafte Anordnung der 96-Well-Platte für Gas6 und sAxI beschrieben. Jede Zelle steht für ein kleines Gefäß auf der 96-Well-Platte. Es wurden jeweils Duplikate angelegt. Links sind die Duplikate der 7-Punkte Standardkurve zu erkennen. Die Position der Kontrollprobe sowie die Anordnung der einzelnen Proben bezüglich der Diagnosegruppen wurden variiert, um eventuelle systematische Messfehler zu vermeiden.

4000pg/ml	4000pg/ml	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
2000pg/ml	2000pg/ml	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
1000pg/ml	1000pg/ml	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
500pg/ml	500pg/ml	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
250pg/ml	250pg/ml	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
125pg/ml	125pg/ml	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
62,5pg/ml	62,5pg/ml	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
Blank	Blank	Kontrollprobe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
7-Punkte Standardkurve und Blank		IPAH	CTD		CTEPH		Ausschluss		PVH		

Im folgenden Abschnitt wird das modifizierte ELISA Protokoll beschrieben. Zuerst wurde der CA in 1ml *ELISA Plate-Coating Buffer* gelöst. In einem weiteren Schritt wurden 440µl des 1mg/ml CA in 10560µl *ELISA Plate-Coating Buffer* (25x) verdünnt. Es erfolgte die Beschichtung einer 96-Well-Platte mit dem verdünnten CA (100µl/Well) und die anschließende Inkubation über acht Stunden bei 37°C. Nach der Inkubation wurde ein Waschvorgang angeschlossen, bei dem die 96-Well-Platte insgesamt drei Mal mit 300µl/Well *Wash Buffer* mithilfe einer Multipipette gespült wurde. Danach wurde die 96-Well-Platte mit 3% RD (300µl/Well) für 24 Stunden im Kühlschrank (7°C) blockiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Plasmaproben, die bereits kurz zuvor in 1% RD im Verhältnis von 1:40 verdünnt wurden, auf die 96-Well-Platte (100µl/Well) pipettiert. Dabei wurden horizontale Duplikate angelegt. Analog zu sAxI wurde eine Kontrollprobe aufgetragen. Eine 7-Punkte Standardkurve wurde angelegt, wobei der höchste Standard eine Konzentration von 4000pg/ml aufwies. Eine serielle

zweifach Verdünnungsreihe wurde angelegt und ein Duplikat für den *Blank* (1% RD) verwendet. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte erneut ein Waschvorgang, gefolgt von der Auftragung des *Human Gas6* DA (100µl/Well). Dieser wurde hierfür um den Faktor 180x in 1% RD verdünnt. Nach einer erneuten zweistündigen Inkubation und einem sich anschließenden Waschvorgang wurden 55µl *Streptavidin-HRP* in 10945µl 1% RD (200x) verdünnt und aufgetragen (100µl/Well). Es schloss sich eine Inkubation von 20 Minuten unter Lichtabschluss an. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden 100µl/Well an *Substrate Solution (Color Reagent A und B)* aufgetragen. Es folgte eine elfminütige Inkubation unter Lichtabschluss. Ein Farbumschlag von transparent nach blau war erkennbar. Zur Unterbrechung der Reaktion wurden 50µl/Well *Stop Solution* aufgetragen, was zu einem Farbumschlag von blau auf gelb führte. Die photometrische Messung erfolgte mithilfe eines *Tecan Sunrise™ Plate-Reader* bei 570nm und dem Programm *Magellan™* Version 7.1.

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse wurde der Variabilitätskoeffizient (CV) zwischen den Testungen (*Inter-Assay Coefficient of Variability*) herangezogen. Der CV bezog sich hierbei auf die Kontrollprobe. Bei einem CV <10% kann laut Hersteller von einem verlässlichen Test ausgegangen werden.

3.2.3 Erfassung klinischer Parameter

Im Rahmen der Rechtsherzkatheteruntersuchung wurden verschiedene Messwerte erhoben. Darüber hinaus wurden Informationen über den Schweregrad der Erkrankung und im Verlauf Auskünfte über eine etwaige klinische Verschlechterung oder den Tod eingeholt.

3.2.3.1 Messparameter der Rechtsherzkatheteruntersuchung

Im Rahmen der Katheterisierung wurden wichtige Messgrößen unter der Anleitung einer erfahrenen Intensivpflegekraft bestimmt. Darunter der mPAP, PAWP, das HZV, der CI (CI = Herzminutenvolumen in l/min / Körperoberfläche in m²) und der PVR. Der Druckaufnehmer des *Swan-Ganz-Katheters* wurde auf Höhe der mittleren Axillarlinie eingestellt, um potentielle hydrostatisch bedingte Druckfehlmessungen auszuschließen. Ebenfalls fand eine Eichung der Druckkurve gegen den atmosphärischen Luftdruck statt⁵.

3.2.3.2 *Ermittlung des klinischen Schweregrades und der körperlichen Belastbarkeit*

Zur Evaluation des klinischen Schweregrades der PH wurde die *WHO FC* herangezogen. Anhand der *WHO FC* wurden die Patienten vier verschiedenen Klassen zugeordnet, wobei Klasse IV ein schweres Beschwerdebild darstellt (Tabelle 3)³⁴.

Zur Beurteilung der Belastbarkeit von Patienten mit PH hat sich die SMWD als geeignet erwiesen. Die SMWD ermöglicht zudem eine Abschätzung der Prognose hinsichtlich der Mortalität von Patienten mit PH³⁵. Der standardisierte Test wurde auf einer abgesteckten Teststrecke durchgeführt.

3.2.3.3 *Überleben und die Zeit bis zur klinischen Verschlechterung*

Im weiteren Behandlungsverlauf wurden Patienten hinsichtlich Überleben und der Zeit bis zur klinischen Verschlechterung beobachtet. Es wurde der Überlebenszeitraum ab der ersten Rechtsherzkatheteruntersuchung bis April 2015 ermittelt. Dabei wurde das transplantationsfreie Überleben als Endpunkt definiert. Einen weiteren Endpunkt stellte die TTCW dar. Kam es im Rahmen der PH zu einer Erweiterung der Medikation, zum Tod des Patienten oder zur Lungentransplantation, so wurde der Endpunkt TTCW erreicht.

3.3 *Statistische Auswertung*

Die erfassten Daten wurden mithilfe der Magellan™ Software exportiert und mit Microsoft Excel® verarbeitet. Danach folgte die deskriptive und explorative Auswertung durch das Programm IBM SPSS Statistics 23, welches ebenfalls zur Generierung von Grafiken verwendet wurde. In diesem Zusammenhang wird kurz auf die verwendeten statistischen Verfahren eingegangen.

In einem ersten Schritt erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung hinsichtlich der Konzentrationsverteilung der Biomarker. Dabei wurde die rechtsschiefe Verteilung der Gas6-Konzentrationen durch Logarithmieren in eine Normalverteilung umgewandelt und im Folgenden mit dem logarithmierten Wert weiter gearbeitet. Um zu ermitteln, ob es sich bei den Proteinen um einen diagnostischen Biomarker handelt, wurde eine Varianzanalyse (*one-way Anova*) durchgeführt. Es erfolgte eine erneute Varianzanalyse (*Kruskal-Wallis Test*), um Unterschiede bezüglich der Konzentrationsverteilung zwischen den verschiedenen *WHO FC*'s nachzuweisen. Ein ebenfalls nicht-parametrischer Test (*Mann-Whitney U Test*) fand Anwendung, um geschlechtsabhängige Konzentrationsunterschiede zu ermitteln. Die

Proteinkonzentrationen wurden mit klinischen Parametern (SMWD, mPAP, PAWP, HZV, CI, PVR) korreliert (Pearson-Korrelation) sowie die Interkorrelationen der klinischen Parameter untersucht. Als Maß der Effektstärke wurde der Korrelationskoeffizient (r) herangezogen, welcher auch die klinische Relevanz beschreibt. Ab einem Wert von $r \geq 0,6$ wurde von einem großen Effekt ausgegangen, wobei Werte von $r \leq 0,4$ einen geringen Effekt beschreiben und dazwischen von einem mittelstark ausgeprägten Effekt ausgegangen werden muss.¹³⁶ Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Der Kaplan-Meier-Schätzer wurde für Überlebens- und TTCW-Analysen herangezogen. Dabei wurde ein *Log-rank Test* durchgeführt, um die Überlebensverteilung zwischen verschiedenen Gruppen von Patienten zu vergleichen. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde dabei als signifikant erachtet.

Zuletzt wurde eine Cox-Regressions-Analyse durchgeführt, wobei ein Einfluss von Variablen (z. B. die Gas6-Konzentration) auf die Überlebenszeit oder die TTCW geschätzt wurde. Ein wesentlicher Aspekt dieser Methode ist die sog. Hazard-Funktion ($h(t)$). Die Hazard-Ratio (HR) vergleicht zwei verschiedene Gruppen (A und B) hinsichtlich ihrer $h(t)$.

$$\frac{hA(t)}{hB(t)} = HR$$

Eine $HR = 1$ bedeutet, dass im Kontext Überleben das Risiko in einem bestimmten Zeitintervall zu versterben in beiden Gruppen gleich groß ist.¹³⁷ Es wurden Analysen mit einer Variablen und multivariate Analysen durchgeführt. Die Analysen wurden auf eine dichotomisierte Stichprobe sowie auf Quartile angewendet. Ein p-Wert von $< 0,154$ wurde im Rahmen der multivariaten Analysen als signifikant angesehen¹³⁸. Bei univariaten Analysen galt ein p-Wert von unter 0,05 als signifikant. Zusätzlich wurde das 95%-Konfidenzintervall (95% KI) bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Studienkollektiv

4.1.1 Geschlecht

Das Studienkollektiv (N) von Gas6 bestand aus 179 Patienten. Darunter 67 (37,4%) männliche und 112 (62,6%) weibliche Teilnehmer. Bei sAxl bestand das Kollektiv aus insgesamt 167 Patienten, wobei 105 (62,9%) weibliche und 62 (37,1%) männliche Teilnehmer gezählt wurden (Tabelle 5).

Tabelle 5 Beschreibung des Studienkollektives hinsichtlich Geschlecht. Die Tabelle gibt die absolute und relative Anzahl der Patienten innerhalb des Gas6- und sAxl-Kollektives an. In Klammern befinden sich Angaben nach Exklusion der Diagnosegruppe Ausschluss.

Geschlecht	Gas6 absolut	Gas6 in %	sAxl absolut	sAxl in %
weiblich	112(88)	62,6(62,0)	105(82)	62,9(63,1)
männlich	67(54)	37,4(38,0)	62(48)	37,1(36,9)
total	179(142)		167(130)	

4.1.2 Diagnosegruppen der PH

Die Patienten wurden den Diagnosegruppen der PH zugeordnet. Dabei wurden bei Gas6 38 (21,2%) Patienten den Diagnosegruppen IPAH, CTD und CTEPH zugeordnet sowie 28 (15,6%) Patienten der Diagnosegruppe PVH und 37 (20,7%) der Gruppe Ausschluss. Bei dem Protein sAxl wurden 36 (21,6%) der Gruppe IPAH, 35 (21%) der Gruppe CTD, 34 (20,4%) der Gruppe CTEPH, 25 (15%) der Gruppe PVH und 37 (22,2%) Patienten der Gruppe Ausschluss zugeordnet. Eine Übersicht liefert Abbildung 8.

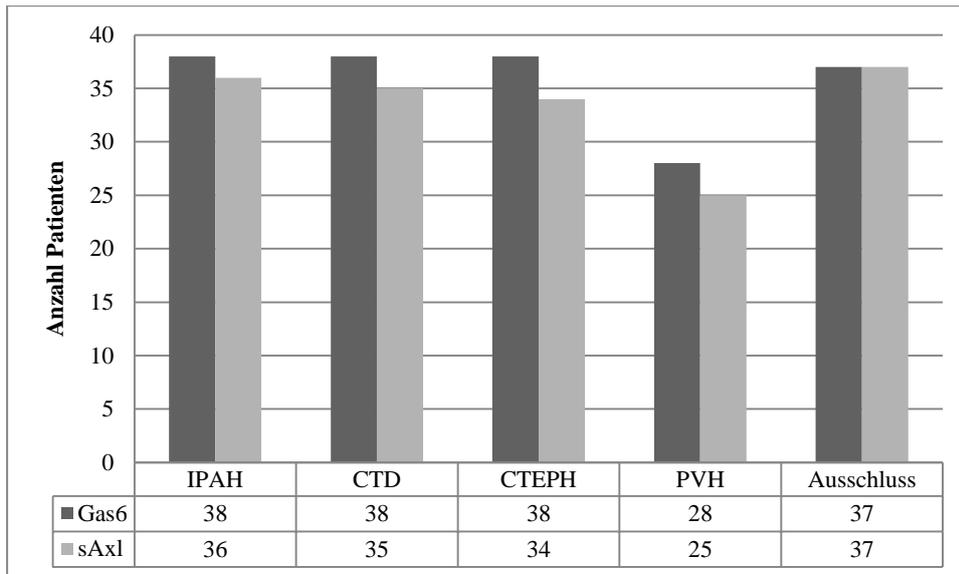


Abbildung 8 Anzahl der Patienten in Diagnosegruppen. Absolute Anzahl der Patienten innerhalb der PH Diagnosegruppen, bezogen auf das jeweilige Protein. Im Balkendiagramm wurde Gas6 dunkelgrau und sAx1 hellgrau dargestellt.

4.1.3 WHO FC

Die Patienten wurden nach dem klinischen Schweregrad ihrer Erkrankung der spezifischen *WHO FC* zugeteilt. Bezüglich Gas6 konnten 44 (26,3%) Patienten der *WHO FC II*, 101 (60,5%) Patienten der *WHO FC III* und 22 (13,2%) Patienten der *WHO FC IV* zugeordnet werden. Bei sAx1 wurden analog 41 (26,8%) Patienten der *WHO FC II*, 94 (61,4%) Patienten der *WHO FC III* und 18 (11,8%) Patienten der *WHO FC IV* zugeordnet (Tabelle 6). Kein Patient konnte hingegen der *WHO FC I* zugeordnet werden.

Tabelle 6 Beschreibung des Studienkollektives hinsichtlich der WHO FC. Die Tabelle gibt die absolute und relative Anzahl der Patienten an. In Klammern befinden sich absolute und relative Angaben nach Exklusion der Diagnosegruppe Ausschluss.

WHO FC	Gas6 absolut	Gas6 in %	sAx1 absolut	sAx1 in %
II	44(38)	26,4(26,8)	41(35)	26,80(26,9)
III	101(81)	60,48(57,0)	94(75)	61,44(57,7)
IV	22(21)	13,17(14,8)	18(18)	11,76(13,8)
total	167(140)		153(128)	

4.1.4 Überleben bis April 2015

Bezüglich des Proteins Gas6 überlebten bis April 2015 123 (68,7%) der insgesamt 179 Patienten. 56 (31,3%) Patienten waren zu diesem Zeitpunkt bereits verstorben. Bei sAx1 waren bis zu diesem Zeitpunkt noch 116 (69,5%) Patienten am Leben und 51 (30,5%) der insgesamt 167 Patienten bereits verstorben (s. Tabelle 7).

Tabelle 7 Überleben bis April 2015. Die Tabelle beschreibt die relative und absolute Anzahl der Überlebenden und Verstorbenen bis April 2015. Die Zeile mit dem Attribut „nein“ bezieht sich dabei auf die Patienten, welche nach April 2015 noch am Leben waren. Die Zeile mit dem Attribut „ja“ beschreibt die im Zeitraum verstorbenen Patienten. In Klammern befinden sich absolute und relative Angaben nach Exklusion der Diagnosegruppe Ausschluss.

verstorben↓	Gas6 absolut	Gas6 in %	sAxl absolut	sAxl in %
Nein	123(95)	68,7(66,9)	116(87)	69,5(66,9)
Ja	56(47)	31,3(33,1)	51(43)	30,5(33,1)
total	179(142)		167(130)	

4.1.5 Studienkollektiv hinsichtlich der SMWD

Bei Gas6 war eine Erhebung der SMWD bei 148 Patienten möglich. Die im Durchschnitt zurückgelegte Distanz betrug $317 \pm 116,68$ m. Im Vergleich dazu konnte die SMWD bezüglich sAxl bei 137 Patienten ermittelt werden. Die zurückgelegte Distanz betrug hier durchschnittlich $328 \pm 120,555$ m. Eine Übersicht liefern Tabelle 8 und Tabelle 9.

4.1.6 Messgrößen der Rechtsherzkatheteruntersuchung

Im Rahmen der Katheterisierung wurden weitere Messgrößen bestimmt. Die Tabellen 8 und 9 geben einen Überblick über die erhobenen Messwerte.

Tabelle 8 Gas6 Messwerte aus Rechtsherzkatheteruntersuchungen und SMWD. Die Tabelle beschreibt erhobene Messwerte aus Rechtsherzkatheteruntersuchungen und die SMWD. Angegeben sind Mittelwert, Median, Standardabweichung und die Anzahl der Patienten (N). In Klammern befinden sich Angaben nach Exklusion der Diagnosegruppe Ausschluss.

	SMWD in m	MPAP in mmHg	PAWP in mmHg	HZV in l/min	CI in l/min/m ²	PVR in dyn·s/cm ⁵
Mittelwert	317,6(318)	37,7 (42,6)	9,6(10)	4,5(4,4)	2,4(2,3)	569,9(678)
Standardabweichung	116,7(118,9)	14,4(11,6)	5,3(5,5)	1,3(1,2)	0,6(0,6)	424,5(412)
N	148(125)	179(142)	179(142)	179(142)	179(142)	179(142)

Tabelle 9 sAxl Messwerte aus Rechtsherzkatheteruntersuchungen und SMWD. Die Tabelle beschreibt erhobene Messwerte aus Rechtsherzkatheteruntersuchungen und die SMWD. Angegeben sind Mittelwert, Median, Standardabweichung und die Anzahl der Patienten (N). In Klammern befinden sich Angaben nach Exklusion der Diagnosegruppe Ausschluss.

	SMWD in m	MPAP in mmHg	PAWP in mmHg	HZV in l/min	CI in l/min/m ²	PVR in dyn·s/cm ⁵
Mittelwert	328,7(324,9)	37,1(42,6)	9,6(10)	4,6(4,4)	2,5(2,4)	546,3(659)
Standardabweichung	120,6(120,9)	15,1(12,4)	5,3(5,7)	1,3(1,2)	0,6(0,6)	414,4(403)
N	137(116)	167(130)	167(130)	167(130)	167(130)	167(130)

4.1.7 Verteilung der Gas6 Plasmakonzentration

Die Bestimmung der Gas6 Konzentration aus EDTA-Plasma der Pulmonalarterie ergab einen Median von 13663 pg/ml, bei einem Interquartilabstand von 5150 pg/ml. Der

maximal gemessene Wert lag bei 39608 pg/ml und der kleinste Wert bei 7237 pg/ml. Der CV zwischen den Testungen lag bei 6,80%. Da es sich um eine rechtsschiefe Verteilung handelt, wurde der *logarithmus naturalis* (\ln) herangezogen. Durch Logarithmieren lag der Mittelwert von $\ln(\text{Gas6})$ bei 9,55 mit einer Standardabweichung (SD) von $\pm 0,29$ (Abbildung 9). Die explorative Datenanalyse erfolgte mit dem \ln der Gas6 Plasmakonzentration.

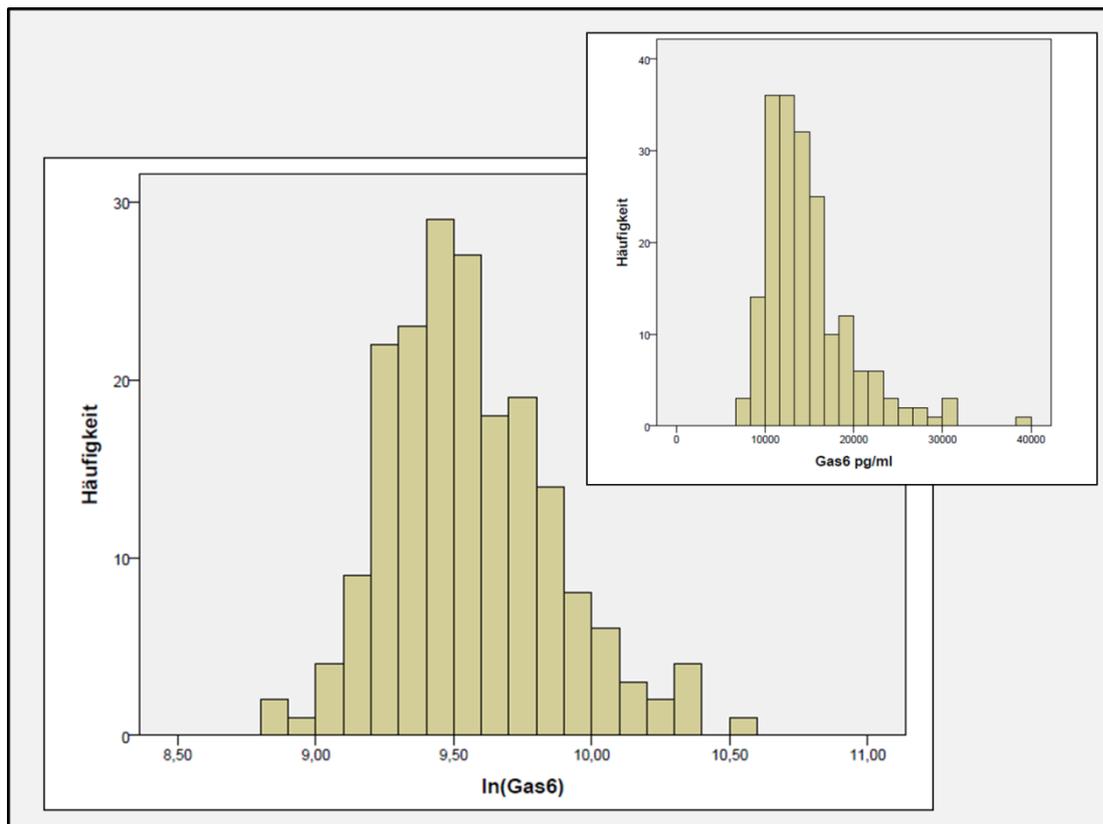


Abbildung 9 Verteilung der Gas6 Plasmakonzentration. Die Grafik zeigt die Verteilung der Gas6 Plasmakonzentration vor und nach dem Logarithmieren. Der Mittelwert(\pm SD) von $\ln\text{Gas6}$ lag bei $9,56(\pm 0,29)$.

4.1.8 Verteilung der sAxI Plasmakonzentration

Bei der Verteilung der sAxI Plasmakonzentration handelte es sich hinsichtlich des im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Studienkollektivs um eine Normalverteilung (s. Abbildung 10). Der Mittelwert lag bei 24698 pg/ml, mit einer Standardabweichung von ± 7033 pg/ml. Der Maximalwert wurde gemessen mit 63701 pg/ml, wobei der kleinste gemessene Wert bei 12171 pg/ml lag. Der CV zwischen den Testungen betrug 8,40%.

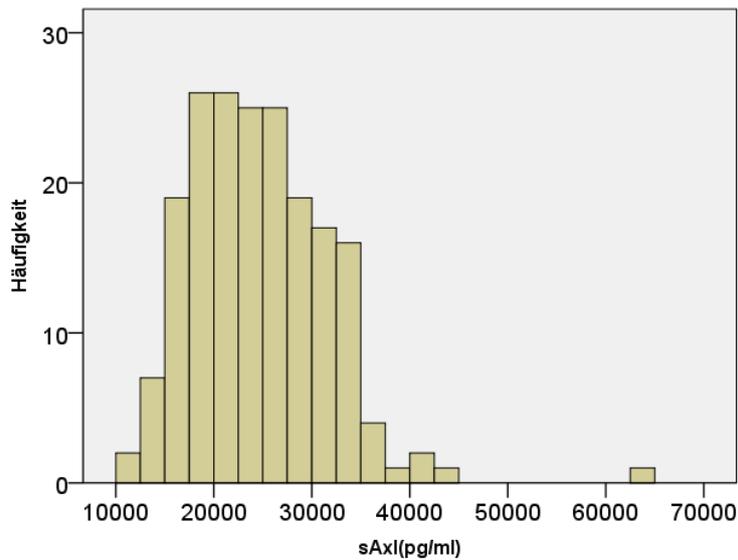


Abbildung 10 Verteilung der Plasmakonzentration von sAxl. Der Mittelwert(\pm SD) von sAxl lag bei 24698,32(\pm 7033,12) pg/ml. Die Diagnosegruppe Ausschluss wurde einbezogen.

4.1.9 Messgrößen innerhalb der PH Diagnosegruppen

Die Tabelle 20 und Tabelle 21 im Anhang fassen funktionelle und hämodynamische Eigenschaften sowie die Konzentrationen der Biomarker innerhalb der Diagnosegruppen zusammen. Da es sich bei sAxl und Gas6 um verschiedene Kollektive handelt, werden beide einzeln dargestellt. Ebenfalls ersichtlich ist die jeweilige Stichprobengröße.

4.2 Explorative Datenanalyse

4.2.1 Diagnostischer Vorhersagewert der Gas6 und sAxl Plasmakonzentrationen

Um auf die Fragestellung einzugehen, ob es sich bei Gas6 oder sAxl um diagnostische Biomarker handelt, wurde die Verteilung der Plasmakonzentrationen im Hinblick auf Unterschiede zwischen den diagnostischen Gruppen der PH untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Diagnosegruppen festgestellt werden. Weder eine einfaktorische Varianzanalyse über alle PH Gruppen (Gas6 $p = 0,222$; sAxl $p = 0,345$), noch Mehrfachvergleiche (Tabelle 10 und Tabelle 11) zeigten signifikante Ergebnisse.

Tabelle 10 Mehrfachvergleiche zwischen Gas6 Diagnosegruppen. Angabe der jeweiligen Vergleichsvariablen und des dazugehörigen P-Werts.

Mehrfachvergleiche Gas6 (Tukey-HSD)

Vergleichsvariablen	p-Wert
IPAH und CTD	0,861
IPAH und CTEPH	0,977
IPAH und PVH	0,62
IPAH und Ausschluss	0,769
CTD und CTEPH	0,515
CTD und PVH	0,987
CTD und Ausschluss	1
CTEPH und PVH	0,292
CTEPH und Ausschluss	0,403
PVH und Ausschluss	0,998

Tabelle 11 Mehrfachvergleiche zwischen sAx1 Diagnosegruppen. Angabe der jeweiligen Vergleichsvariablen und des dazugehörigen P-Werts.

Mehrfachvergleiche sAx1 (Tukey-HSD)

Vergleichsvariablen	p-Wert
IPAH und CTD	0,991
IPAH und CTEPH	0,618
IPAH und PVH	0,946
IPAH und Ausschluss	1
CTD und CTEPH	0,876
CTD und PVH	0,775
CTD und Ausschluss	0,996
CTEPH und PVH	0,261
CTEPH und Ausschluss	0,667
PVH und Ausschluss	0,922

Die Mittelwerte(\pm SD) der einzelnen diagnostischen Gruppen sind der Tabelle 20 (Gas6) und Tabelle 21 (sAx1) im Anhang zu entnehmen.

4.2.2 Zusammenhang mit klinischer Schwere der Erkrankung (*WHO FC*)

Ob es sich bei Gas6 oder sAx1 um einen potentiellen Biomarker handelt, der zwischen verschiedenen klinischen Schweregraden (*WHO FC's*) differenzieren kann, ist ebenfalls Teil der Fragestellung. Die Tests wurden nur an Patienten mit manifester PH durchgeführt, weshalb die Diagnosegruppe Ausschluss nicht einbezogen wurde. In diesem Zusammenhang wurde ein nicht-parametrischer Hypothesentest (*Kruskal-Wallis-Test*) durchgeführt. Es wurde eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Gas6 Plasmakonzentration über die Gruppen der *WHO FC* festgestellt ($p = 0,015$). Allerdings steigt die Gas6-Konzentration nicht mit der *WHO FC* an (Abbildung 11). Mittelwerte(\pm SD) der einzelnen *WHO FC's* sind der Tabelle 20 im Anhang zu entnehmen.

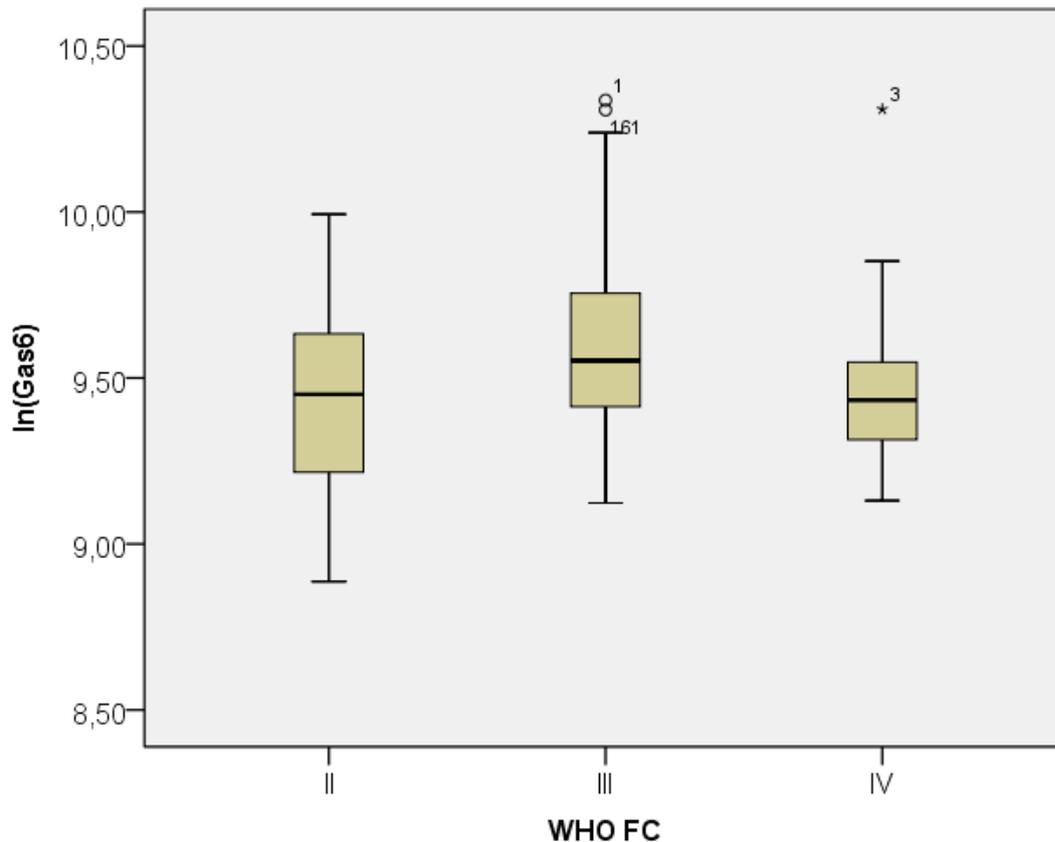


Abbildung 11 Verteilung von $\ln(\text{Gas6})$ über *WHO FC II-IV*. Dargestellt sind Boxplots der *WHO FC II, III* und *IV*. Die beige Box der Grafik umfasst den Median als schwarzen Strich und wird begrenzt durch das obere und untere Quartil. Die Spannweite beschreibt den gesamten Umfang der ermittelten Plasmakonzentrationen. *WHO FC II*: Median 9,4509; Interquartilbereich 0,43; Spannweite 1,21. *WHO FC III*: Median 9,5521; Interquartilbereich 0,36; Spannweite 1,21. *WHO FC IV*: Median 9,4334, Interquartilbereich 0,24, Spannweite 1,18. Die Grafik beinhaltet ausschließlich PH-Patienten.

Bei sAx1 konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Verteilung der Plasmakonzentration über die *WHO FC* ermittelt werden ($p = 0,763$). Die einzelnen Mittelwerte(\pm SD) für sAx1 sind der Tabelle 21 im Anhang zu entnehmen.

4.2.3 Unterschiede zwischen Geschlechtern

Ein signifikanter Unterschied der Gas6 bzw. sAx1 Konzentration zwischen den Geschlechtern konnte nicht festgestellt werden (T-Test, Gas6 $p = 0,723$; sAx1 $p = 0,643$). Es wurden ebenfalls nur PH-Patienten einbezogen.

Die Mittelwerte(\pm SD) der logarithmierten Plasmakonzentrationen betragen für Gas6 beim männlichen Geschlecht 9,53(\pm 0,32) und 9,54(\pm 0,25) für das weibliche Geschlecht. Mittelwerte(\pm SD) von sAx1 lagen bei 24150,91(\pm 8536,89) pg/ml bei Männern bzw. 24154,19(\pm 5919,42) pg/ml bei Frauen.

4.2.4 Korrelationen mit klinischen Parametern

Im nächsten Abschnitt werden Pearson-Korrelationen der sAxl bzw. Gas6-Konzentration mit verschiedenen klinischen Parametern aufgeführt. Eine Übersicht zu den linearen Korrelationen ist Tabelle 22 im Anhang zu entnehmen.

Es zeigte sich eine hoch signifikante, schwach ausgeprägte Korrelation zwischen Gas6 und dem PAWP ($p = 0,006$, $r = 0,230$, Abbildung 12). Eine ebenfalls schwach ausgeprägte Korrelation zwischen Gas6 und dem CI ($p = 0,049$, $r = -0,166$, Abbildung 13) sowie eine grenzwertig signifikante Korrelation zwischen Gas6 und dem mPAP waren erkennbar ($p = 0,062$, $r = 0,157$). Zwischen Gas6 und den Parametern SMWD ($p = 0,244$), PVR ($p = 0,472$) und HZV ($p = 0,171$) bestanden keine signifikanten Korrelationen innerhalb des Kollektives.

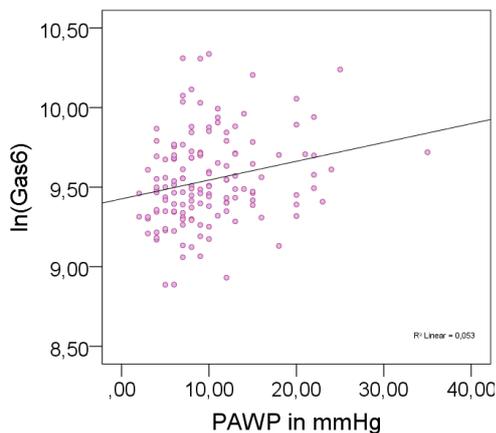


Abbildung 12 Korrelation zwischen Gas6 und dem PAWP. Die Abbildung zeigt eine positive, signifikante Korrelation zwischen Gas6 und dem PAWP ($p = 0,006$ $r = 0,230$).

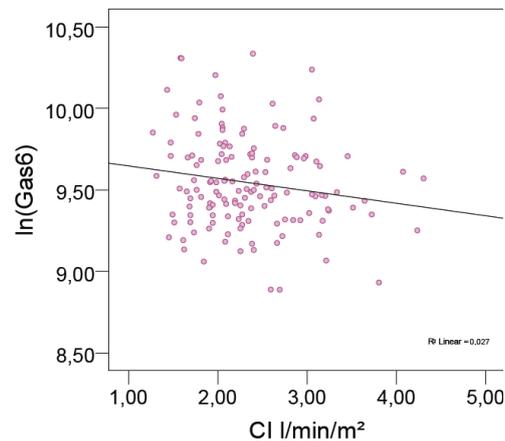


Abbildung 13 Korrelation zwischen Gas6 und dem CI. Die Abbildung zeigt eine negative, signifikante Korrelation zwischen Gas6 und dem CI ($p = 0,049$ $r = -0,166$).

Die Proteinkonzentration von sAxl korrelierte ebenfalls signifikant, schwach mit dem PAWP im beschriebenen Kollektiv ($p = 0,021$, $r = 0,202$, Abbildung 14). Hinsichtlich sAxl waren keine weiteren signifikanten Korrelationen erkennbar (mPAP $p = 0,290$, HZV $p = 0,413$, CI $p = 0,563$, PVR $p = 0,128$, SMWD $p = 0,719$).

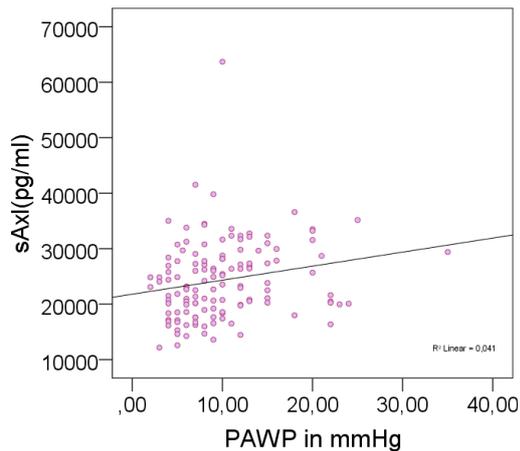


Abbildung 14 Korrelation zwischen sAxI und dem PAWP. Die Abbildung zeigt eine positive, signifikante Korrelation zwischen Gas6 und dem PAWP ($p=0,021$ $r=0,202$)

4.2.5 Zusammenhänge zwischen Plasmakonzentrationen und Überleben

4.2.5.1 Überleben und Gas6

Bei einer Stichprobengröße von 142 Patienten zeigten sich insgesamt 47 Ereignisse. Nach einem Jahr waren noch 89,4% (14 Ereignisse kumulativ), nach drei Jahren noch 69,4% (38 Ereignisse kumulativ) und nach fünf Jahren 63,8% (43 Ereignisse kumulativ) der Patienten am Leben.

Tabelle 12 Gas6 Kaplan-Meier Überlebenszeit. Die Tabelle fasst die relative Anzahl der Überlebenden sowie die Anzahl der Ereignisse innerhalb der definierten Zeiträume zusammen.

Zeitraum in Jahren	% Überleben im Zeitraum	Anzahl der Kumulativereignisse
1	89,4	14
3	69,4	38
5	63,8	43

Im Rahmen der weiteren Analyse wurde die Stichprobe in Quartile unterteilt. Anschließend wurde ein *Log Rank (Mantel-Cox)* Test angewandt, um die Verteilung bezüglich der Überlebenszeit über die vier Quartile zu vergleichen. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede ($p = 0,037$). Abbildung 15 und Tabelle 13 geben einen Überblick über die einzelnen Quartile.

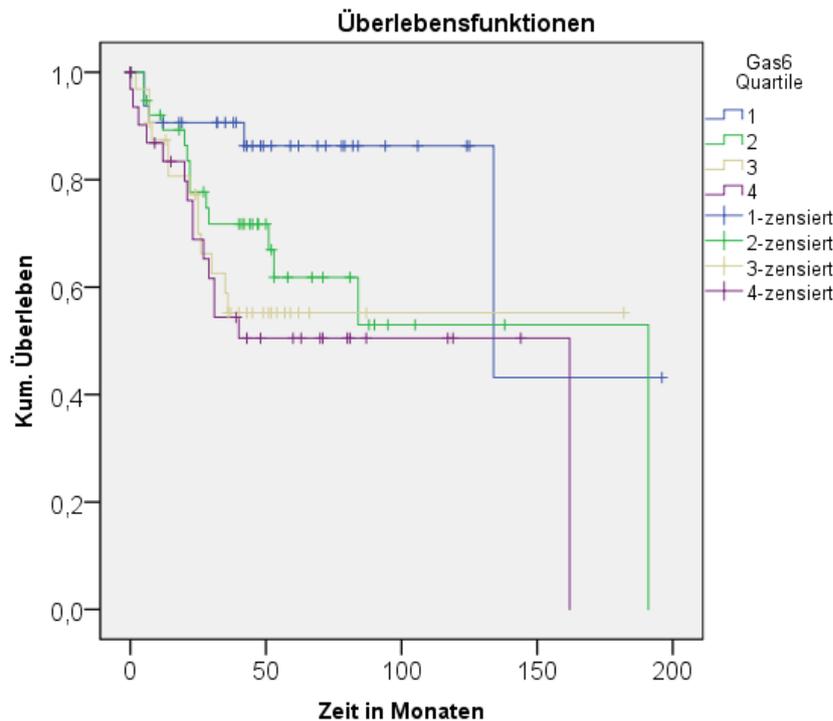


Abbildung 15 Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Quartile für Gas6. Auf der Abszisse befindet sich die Zeit in Monaten, wobei die Ordinate das kumulative Überleben beschreibt. Das Quartil 1 wird blau, Quartil 2 grün, Quartil 3 gelb und Quartil 4 lila dargestellt. Quartil 1 stellt das Quartil mit der niedrigsten Plasmakonzentration dar. Knicke im Verlauf der Quartile stellen das Eintreffen eines Ereignisses dar, wobei Querstriche eine Zensur bedeuten. Es zeigten sich signifikante Unterschiede über die Quartile bezüglich der Überlebenszeit ($p = 0,037$).

Tabelle 13 Übersicht über Gas6 Quartile bezüglich Überleben. Die Tabelle gibt für das jeweilige Quartil die Grenzwerte bezüglich der Proteinkonzentration im Plasma, das Überleben nach drei und fünf Jahren in %, die Anzahl der Gesamtereignisse (Tod bzw. Transplantation) sowie die Anzahl der Fälle an.

Quartil	Proteinkonzentration Gas6 in pg/ml	% Überleben nach 3 Jahren	% Überleben nach 5 Jahren	Anzahl Gesamt ereignisse	Anzahl der Fälle
1	< 11449,5	90,6	86,3	5	34
2	11449,5 bis < 13663,0	71,7	61,8	14	43
3	13663,0 bis < 16599,5	58,9	55,2	13	33
4	≥ 16599,5	54,4	50,5	15	32

4.2.5.2 Überleben und sAxl

Die Stichprobengröße von sAxl umfasste insgesamt 129 Patienten und die Zahl der Ereignisse lag bei 43. Insgesamt waren nach einem Jahr noch 90,7% (11 Ereignisse kumulativ), nach drei Jahren noch 69,4% (34 Ereignisse kumulativ) und nach dem fünften Jahr noch 64,0% (38 Ereignisse kumulativ) der Patienten am Leben.

Tabelle 14 sAxl Kaplan-Meier Überlebenszeit. Die Tabelle fasst die relative Anzahl der Überlebenden sowie die Anzahl der Ereignisse innerhalb der definierten Zeiträume zusammen.

Zeitraum in Jahren	% Überleben im Zeitraum	Anzahl der Kumulative Ereignisse
1	90,7	11
3	69,4	34
5	64,0	38

Analog zu Gas6 erfolgte die Einteilung der Stichprobe in Quartile. Der *Log Rank (Mantel-Cox)* zeigte hier keine signifikanten Ergebnisse ($p = 0,496$). Ein relevanter Unterschied zwischen den Überlebenszeiten der Quartile war demnach nicht erkennbar. Die Abbildung 16 und Tabelle 15 geben analog zu Gas6 die wichtigsten Eigenschaften der unterschiedlichen sAxl-Quartile wieder.

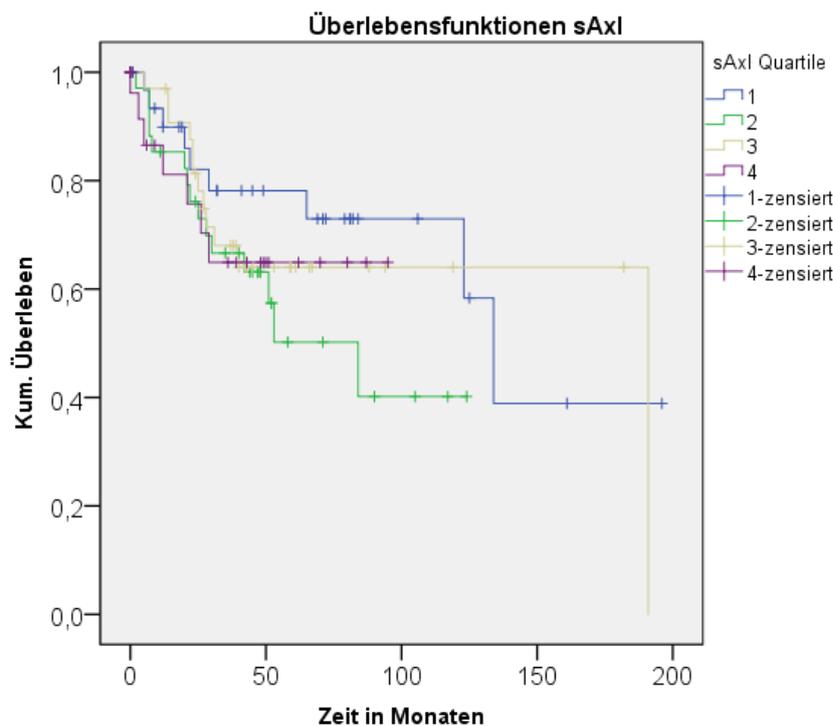


Abbildung 16 Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Quartile für sAxl. Auf der Abszisse befindet sich die Zeit in Monaten, wobei die Ordinate das kumulative Überleben beschreibt. Das Quartil 1 wird blau, Quartil 2 grün, Quartil 3 gelb und Quartil 4 lila dargestellt. Quartil 1 stellt das Quartil mit der niedrigsten Plasmakonzentration dar. Knicke im Verlauf der Quartile stellen das Eintreffen eines Ereignisses dar, wobei Querstriche eine Zensur bedeuten. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede über die Quartile bezüglich der Überlebenszeit ($p = 0,496$).

Tabelle 15 Übersicht über sAxl Quartile bezüglich Überleben. Die Tabelle gibt für das jeweilige Quartil die Grenzwerte bezüglich Proteinkonzentration im Plasma, das Überleben nach drei und fünf Jahren in %, die Anzahl der Gesamt ereignisse (Tod bzw. Transplantation) sowie die Anzahl der Fälle an.

Quartil	Proteinkonzentration sAxl in pg/ml	% Überleben nach 3 Jahren	% Überleben nach 5 Jahren	Anzahl Gesamt ereignisse	Anzahl der Fälle
1	< 19322,0	78,2	78,2	9	32
2	19322,0 bis < 23816,0	66,6	50,2	15	35

3	23816,0 bis < 29635,0	68,0	64,0	12	36
4	≥ 29635,0	64,9	64,9	7	26

4.2.6 Zusammenhänge zwischen Plasmakonzentrationen und TTCW

4.2.6.1 TTCW und Gas6

Ebenfalls wurde die Plasmakonzentration der Proteine in Bezug auf die TTCW untersucht. Die Stichprobengröße von Gas6 betrug 135 Patienten bei insgesamt 84 Ereignissen, wobei eine klinische Verschlechterung als Ereignis definiert wurde. Dabei waren nach einem Jahr noch 65,3% der Patienten ohne Ereignis (47 Ereignisse kumulativ), nach drei Jahren noch 40,8% (72 Ereignisse kumulativ) und nach fünf Jahren noch 29,3% der Patienten ohne Ereignis (80 Ereignisse kumulativ).

Tabelle 16 TTCW im Gas6-Kollektiv. Die Tabelle fasst die relative Anzahl der Patienten ohne klinische Verschlechterung sowie die Anzahl der Ereignisse in den definierten Zeiträumen zusammen.

TTCW im Gas6-Kollektiv		
Zeitraum in Jahren	% ohne klinische Verschlechterung	Anzahl der Kumulativevents
1	65,3	47
3	40,8	72
5	29,3	80

Nach Einführung der Gas6 Quartile konnte ein signifikanter Unterschied (*Log Rank Mantel-Cox*) nachgewiesen werden ($p = 0,017$, Abbildung 17 und Tabelle 17). Somit waren Unterschiede im Hinblick auf die TTCW über die verschiedenen Quartile feststellbar.

Tabelle 17 Übersicht über Gas6 Quartile bezüglich TTCW. Die Tabelle gibt für das jeweilige Quartil die Grenzwerte bezüglich Proteinkonzentration im Plasma sowie die kumulative relative Häufigkeit ohne klinische Verschlechterung nach drei und fünf Jahren in %, die Anzahl der Gesamtereignisse und die Anzahl der Fälle an.

Quartil	Protein-konzentration Gas6 in pg/ml	% ohne klinische Verschlechterung* nach 3 Jahren	% *nach 5 Jahren	Anzahl Gesamtereignisse	Anzahl der Fälle
1	< 11449,5	54,6	44,7	17	33
2	11449,5 bis < 13663,0	53,1	36,8	20	41
3	13663,0 bis < 16599,5	32,4	11,1	22	31
4	≥ 16599,5	20,8	20,8	25	30

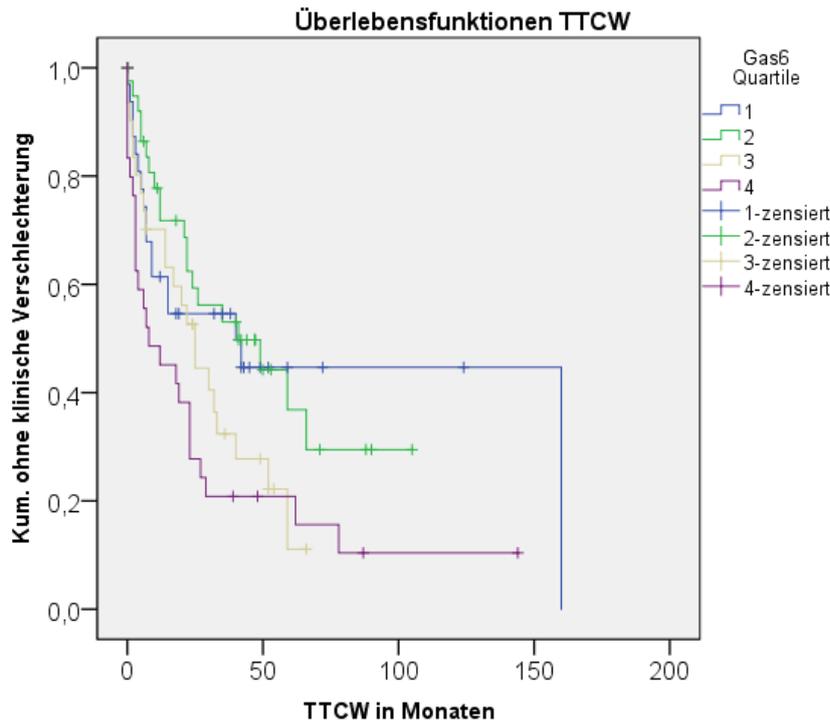


Abbildung 17 Kaplan-Meier-TTCW der Quartile für Gas6. Auf der Abszisse befindet sich die Zeit in Monaten, wobei die Ordinate die kumulative Häufigkeit der Patienten ohne klinische Verschlechterung beschreibt. Zum Zeitpunkt 0 waren noch 1,0 (100%) der Patienten ohne klinische Verschlechterung. Das Quartil 1 wird blau, Quartil 2 grün, Quartil 3 gelb und Quartil 4 lila dargestellt. Quartil 1 stellt das Quartil mit der niedrigsten Plasmakonzentration dar. Knick im Verlauf der Quartile stellen das Eintreffen eines Ereignisses dar, wobei Querstriche eine Zensur bedeuten. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Quartilen bezüglich der TTCW ($p = 0,017$).

4.2.6.2 TTCW und sAxl

Bei sAxl betrug die Stichprobengröße 124 bei insgesamt 76 Ereignissen über den gesamten Beobachtungszeitraum. Nach einem Jahr waren insgesamt noch 68,0% der Patienten ohne Ereignis (37 Ereignisse kumulativ), nach drei Jahren 40,9% (65 Ereignisse kumulativ) sowie nach 5 Jahren 31,7% (71 Ereignisse kumulativ).

Tabelle 18 TTCW im sAxl-Kollektiv. Die Tabelle fasst die relative Anzahl der Patienten ohne klinische Verschlechterung sowie die Anzahl der Ereignisse in den definierten Zeiträumen zusammen.

Zeitraum in Jahren	% ohne klinische Verschlechterung	Anzahl der Kumulativereignisse
1	68	37
3	40,9	65
5	31,7	71

Ein signifikanter Unterschied zwischen den sAxl Quartilen konnte nicht nachgewiesen werden ($p = 0,920$).

4.2.7 Cox-Regressionsanalyse zum Überleben und zur TTCW im Zusammenhang mit der Plasmakonzentration von Gas6

Im Rahmen der Cox-Regressionsanalyse wurde die prognostische Funktion der beiden potentiellen Biomarker evaluiert. Bei Gas6 wurde auch hier der \ln der Plasmakonzentration verwendet.

Bezüglich der univariaten Analyse von Gas6 als kontinuierliche Variable in Bezug auf das Überleben wurde ein signifikanter Zusammenhang ermittelt ($p = 0,002$), mit einer HR von 4,4. Das 95% KI für die HR wurde mit 1,7-11,2 angegeben. Zur weiteren Analyse wurden erneut Gas6 Quartile herangezogen. Im univariaten Vergleich der Quartile konnte ein signifikantes Ergebnis zwischen Quartil 1 und Quartil 4 ermittelt werden ($p = 0,008$; HR = 0,250; 95% KI für HR 0,090-0,692). Des Weiteren waren keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Quartilen ermittelbar (Tabelle 19). Liegt die Gas6 Plasmakonzentration eines Patienten innerhalb des Quartils 4, so ist die prognostizierte Sterbewahrscheinlichkeit im Vergleich zu Quartil 1 um den Faktor $\frac{1}{0,250} = 4$ erhöht.

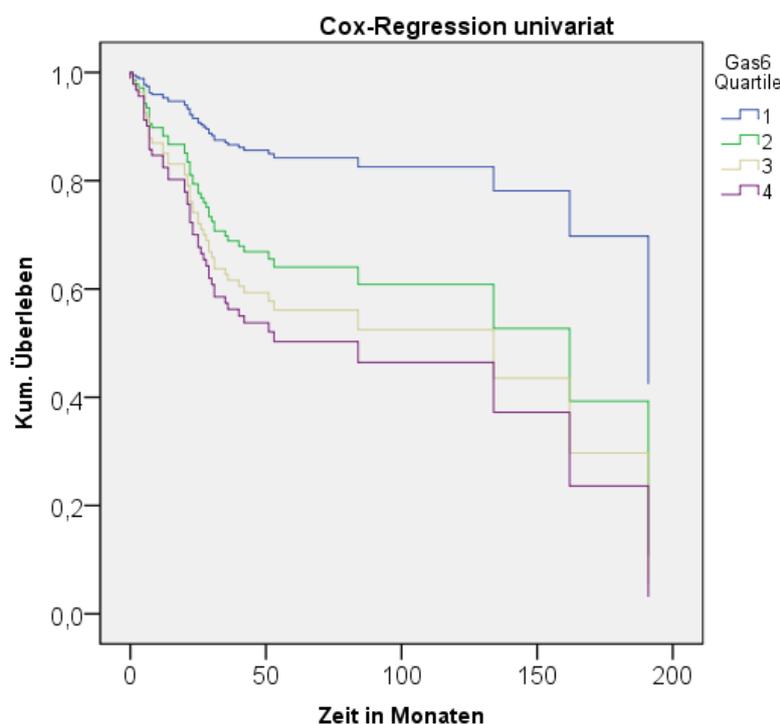


Abbildung 18 Cox-Regression univariat für Gas6 Quartile. Auf der Abszisse befindet sich die Zeit in Monaten, wobei die Ordinate das kumulative Überleben beschreibt (1 = 100%, 0,4 = 40%). Zum Zeitpunkt 0 waren noch 1,0 (100%) der Patienten am Leben. Das Quartil 1 wird blau, Quartil 2 grün, Quartil 3 gelb und Quartil 4 lila dargestellt. Quartil 1 stellt das Quartil mit der niedrigsten Plasmakonzentration dar. Knicke im Verlauf der Quartile stellen das Eintreffen eines möglichen Ereignisses dar. Die Überlebenszeitprognose im Vergleich von Quartil 1 und Quartil 4 war signifikant unterschiedlich ($p = 0,008$).

Tabelle 19 Cox-Regression Gas6 univariat, Vergleich der Quartile.

	Signifikanz	HR	95,0% KI für HR	
			Untere	Obere
Quartil 1 gegen 4	0,008	0,250	0,090	0,692
Quartil 2 gegen 4	0,247	0,648	0,310	1,352
Quartil 3 gegen 4	0,649	0,841	0,400	1,771

Im Rahmen der dichotomisierten Cox-Regressionsanalyse wurden Plasmakonzentrationen von Gas6 unterhalb und oberhalb des Medians miteinander verglichen (Abbildung 19). Die univariate Analyse der dichotomisierten Stichprobe ergab ein signifikantes Ergebnis ($p = 0,021$; HR = 2,0; 95% KI für HR 1,1-3,6).

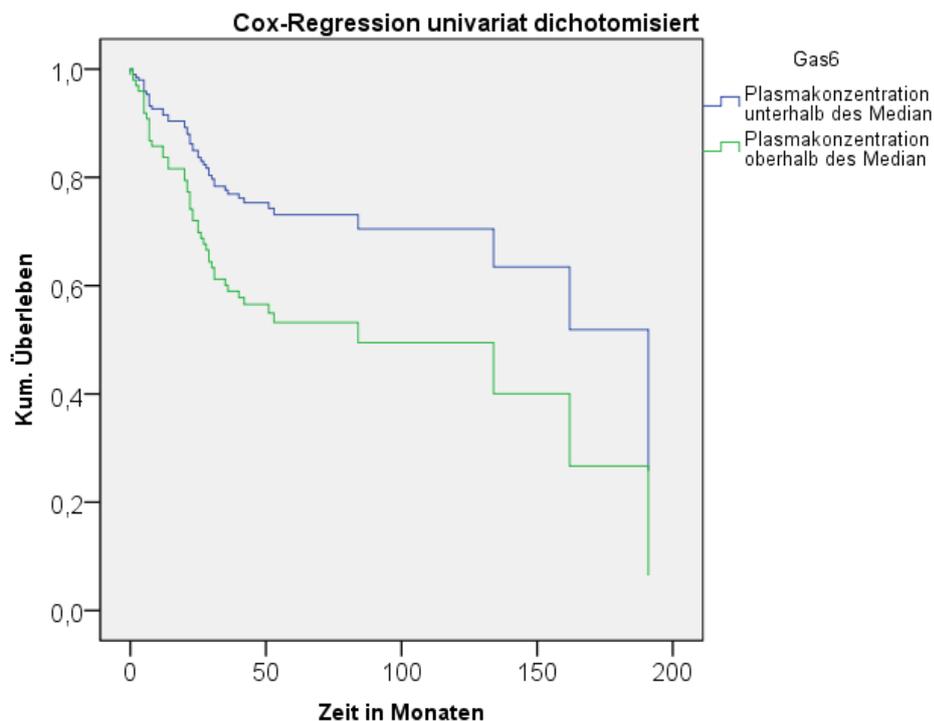


Abbildung 19 Cox-Regression univariat dichotomisiert. Die Grafik beschreibt eine Prognose bezüglich Patienten mit Plasmakonzentrationen oberhalb des Medians (grüne Linie) und unterhalb des Medians (blaue Linie). Der Unterschied zwischen den beiden Kollektiven war signifikant ($p = 0,021$).

In einem multivariaten Ansatz der Cox-Regressionsanalyse blieb Gas6 unabhängiger Prädiktor der Überlebenszeit. Die kontinuierliche Analyse zeigte nach Einführung der konfundierenden Variablen (PVR, Geschlecht, SMWD, WHO FC) ein signifikantes Ergebnis ($p = 0,013$; HR = 4,734; 95% KI für HR 1,384-16,198), wobei 35 Ereignisse gezählt wurden. Die dichotomisierte multivariate Cox-Regressionsanalyse (s. Abbildung 20) fiel nach der Einführung der konfundierenden Variablen (Geschlecht,

SMWD, CI, PVR) ebenfalls signifikant aus ($p = 0,116$; HR= 1,747, 95% KI für HR 0,871-3,508).

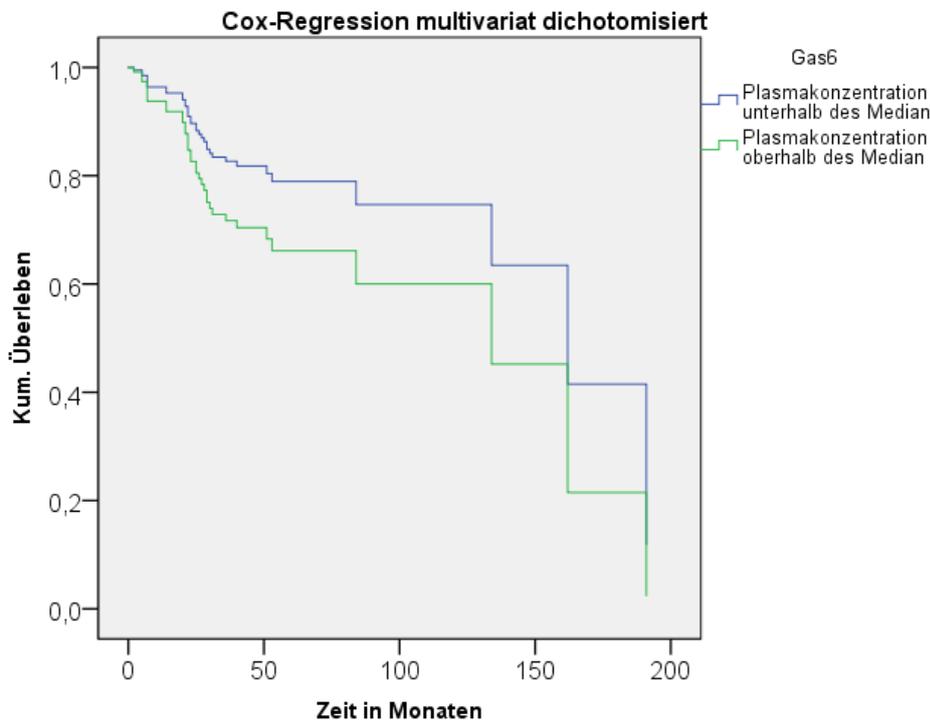


Abbildung 20 Cox-Regression multivariat dichotomisiert. Die Grafik beschreibt eine Prognose bezüglich Patienten mit Plasmakonzentrationen oberhalb des Medians (grüne Linie) und unterhalb des Medians (blaue Linie). Der Unterschied zwischen den beiden Kollektiven war signifikant ($p = 0,116$).

Darüber hinaus erfolgte eine univariate Cox-Regressionsanalyse mit kontinuierlichen Variablen bezüglich der TTCW. Es wurden 84 Ereignisse gezählt und ein signifikanter Zusammenhang zwischen der TTCW und der Gas6 Plasmakonzentration festgestellt ($p = 0,005$; HR = 2,845; 95% KI für HR 1,377-5,875).

4.2.8 Cox-Regressionsanalyse zum Überleben und zur TTCW im Zusammenhang mit der Plasmakonzentration von sAxl

Das Verfahren erfolgte Analog zu Gas6. Die univariate kontinuierliche Cox-Regressionsanalyse zeigte bei sAxl keine signifikanten Zusammenhänge in Bezug auf das Überleben ($p = 0,472$; HR = 1; 95% KI für HR 1-1). Insgesamt wurden 43 Ereignisse gezählt. Eine univariate Analyse zum Vergleich der Quartile lieferte ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse (Quartil 1 gegen Quartil 4; $p = 0,362$; HR = 0,625; 95% KI für HR 0,227-1,71). Die univariate Analyse der dichotomisierten Stichprobe fiel ebenfalls nicht signifikant aus ($p = 0,982$; HR = 0,993; 95% KI für HR 0,543-1,817). Es handelt sich bei sAxl nicht um einen multivariat stabilen Prädiktor für

Überleben, weder mit kontinuierlichen Variablen ($p = 0,792$; HR = 1,00; 95% KI für HR 1-1), noch dichotomisiert ($p = 0,913$; HR = 1,04; 95% KI für HR 0,515-2,099).

Die durchgeführte univariate, kontinuierliche Cox-Regressionsanalyse zu sAxl und der TTCW ließ ebenfalls kein signifikantes Ergebnis zu ($p = 0,170$; HR = 1,00; 95% KI für HR 1-1). Dabei wurden insgesamt 76 Ereignisse gezählt.

4.2.9 Gas6 und sAxl als Biomarker der einzelnen Ätiologien

Eine Zusammenfassung über statistische Tests im Hinblick auf die einzelnen Ätiologien im Vergleich zum Gesamtkollektiv liefern die Tabelle 23 und Tabelle 24 im Anhang.

4.2.9.1 IPAH und Gas6

In der Diagnosegruppe IPAH war die Verteilung der Plasmakonzentration von Gas6 über die WHO FC's signifikant unterschiedlich ($p = 0,039$; Mittelwerte(\pm SD) s. Tabelle 20). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern ($p = 0,067$).

Eine hochsignifikante und klinisch relevante Pearson-Korrelation zwischen dem PAWP und der Gas6 Plasmakonzentration (s. Abbildung 21) konnte beobachtet werden ($p = 0,009$; $r = 0,419$). In diesem Kontext konnten keine weiteren signifikanten Korrelationen gezeigt werden.

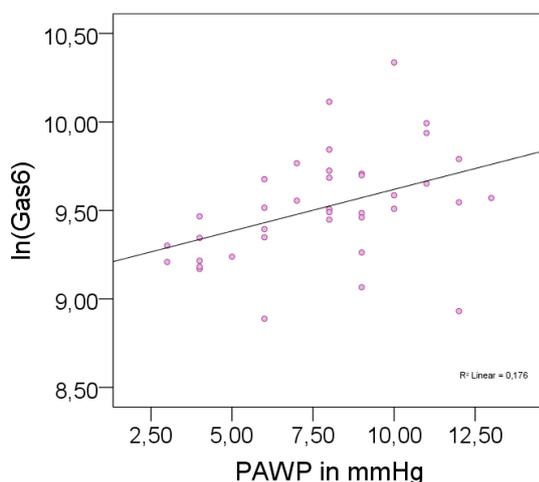


Abbildung 21 Korrelation zwischen Gas6 und dem PAWP im IPAH Kollektiv. Die Abbildung zeigt eine positive, signifikante Korrelation zwischen Gas6 und dem PAWP ($p = 0,009$; $r = 0,419$).

Die Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse zeigte insgesamt elf Ereignisse. Signifikante Unterschiede im Gesamtvergleich über die Quartile konnten nicht erzielt werden ($p = 0,596$). In der Gruppe IPAH waren nach einem Jahr noch 94,6%, nach drei und fünf

Jahren noch 79,9% am Leben. Auch die Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse bezüglich TTCW fiel bei insgesamt 26 Ereignissen nicht signifikant aus ($p = 0,212$).

Die Cox-Regressionsanalysen zum Überleben und zur TTCW zeigten keine signifikanten Ergebnisse (s. Tabelle 23). Ein multivariat kontinuierlicher Ansatz zeigte hinsichtlich Überleben nur eine tendenzielle Signifikanz ($p = 0,210$; HR = 8,583; 95% KI für HR 0,299-246,618). Betrachtet man das IPAH Kollektiv, so handelt es sich bei Gas6 nicht um einen Prädiktor für Überleben oder die TTCW.

4.2.9.2 IPAH und sAxl

Die Verteilung der Proteinkonzentration von sAxl über die WHO FC's war nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,719$; Mittelwert(\pm SD) s. Tabelle 21). Der WHO FC IV konnte nur ein Patient zugeordnet werden, weshalb eine Angabe zum Mittelwert(\pm SD) nicht möglich war. Ebenfalls bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der Plasmakonzentration zwischen den Geschlechtern ($p = 0,728$).

Eine signifikante Korrelation zwischen der sAxl Plasmakonzentration und klinischen Parametern bestand nicht (s. Tabelle 22). Nur eine tendenziell signifikante Korrelation mit dem PAWP konnte nachgewiesen werden ($p = 0,085$, $r = 0,291$).

Nach einem Jahr waren im sAxl IPAH Kollektiv noch 97,1%, nach drei und fünf Jahren noch 78,9% am Leben. Die Log Rank (Mantel-Cox) Analyse konnte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Überlebenszeitfunktion über die Quartile von sAxl nachweisen ($p = 0,075$). Die Kaplan-Meier Log Rank (Mantel-Cox) Analyse zur TTCW fiel ebenfalls nicht signifikant aus ($p = 0,913$).

Es folgten Cox-Regressionsanalysen bezüglich Überleben und TTCW, die ebenfalls nicht signifikant ausfielen (Übersicht s. Tabelle 24).

4.2.9.3 CTD und Gas6

In der Diagnosegruppe CTD zeigten sich bei Gas6 keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Verteilung der Gas6 Plasmakonzentration über die WHO FC's ($p = 0,435$; Mittelwerte(\pm SD) s. Tabelle 20). Die Plasmakonzentration unterschied sich ebenfalls nicht signifikant im Geschlechtsvergleich ($p = 0,967$).

In der Stichprobe CTD korrelierte die Plasmakonzentration von Gas6 signifikant negativ mit HZV ($p = 0,023$; $r = -0,369$), CI ($p = 0,010$; $r = -0,412$) und positiv mit PVR

($p = 0,028$, $r = 0,357$). Weitere signifikante Korrelationen lagen nicht vor (s. Tabelle 23).

Nach einem Jahr waren im betrachteten CTD Kollektiv noch 81,1%, nach drei Jahren noch 60,1% und nach fünf Jahren nur noch 46,3% der Patienten am Leben. Im Rahmen der Überlebenszeitanalyse konnte im Vergleich der Quartile kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p = 0,943$). Auch hinsichtlich der TTCW war kein signifikantes Ergebnis ableitbar ($p = 0,701$).

Die durchgeführten Cox-Regressionsanalysen erzielten überwiegend kein signifikantes Ergebnis (s. Tabelle 23). Ausschließlich der multivariate Ansatz mit kontinuierlichen Variablen im Hinblick auf das Überleben fiel signifikant aus ($p = 0,057$; HR = 0,041; 95% KI für HR 0,002-1,097).

4.2.9.4 CTD und sAxl

Im CTD Kollektiv des sAxl Proteins war kein signifikanter Unterschied zwischen den *WHO FC's* erkennbar ($p = 0,921$; Mittelwerte(\pm SD) s. Tabelle 21). Auch die Geschlechter unterschieden sich hinsichtlich der Plasmakonzentration von sAxl nicht signifikant ($p = 0,421$).

Im CTD Kollektiv waren keine signifikanten Korrelationen zu detektieren.

Im Rahmen der Kaplan-Meier Analyse ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse bezüglich Überleben ($p = 0,995$) und TTCW ($p = 0,852$). Nach einem Jahr waren in diesem Kollektiv noch 79,4%, nach drei Jahren 59,6% und nach fünf Jahren 47,6% am Leben, wobei insgesamt 17 Ereignisse gezählt wurden.

Die Cox-Regressionsanalyse ergab durchweg keine signifikanten Ergebnisse (s. Tabelle 24).

4.2.9.5 CTEPH und Gas6

Im nächsten Abschnitt wird das CTEPH Kollektiv von Gas6 beschrieben. Die Verteilung der Plasmakonzentration von Gas6 war hier über die *WHO FC's* nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,413$; Mittelwert(\pm SD) s. Tabelle 20). Die Verteilung der Plasmakonzentration unterschied sich ebenfalls nicht signifikant über die Geschlechter ($p = 0,122$).

Eine signifikante Korrelation wurde nicht beobachtet (s. Tabelle 22).

Es folgten Kaplan-Meier Analysen bezüglich Überleben und TTCW. Nach einem Jahr waren im CTEPH Kollektiv noch 91,5%, nach drei und fünf Jahren noch 75,4% der Patienten am Leben. Die Quartile unterschieden sich hinsichtlich Überleben signifikant ($p = 0,038$). Die Fünf-Jahres-Überlebenschance lag im Quartil 1 bei 92,3% und insgesamt einem Event, im Quartil 2 bei 88,9% und insgesamt einem Event, im Quartil 3 bei 26,7% und insgesamt drei Events sowie bei 57,1% im Quartil 4 bei insgesamt drei Events (s. Abbildung 22). Die Kaplan-Meier Analyse zur TTCW fiel nicht signifikant aus ($p = 0,239$)

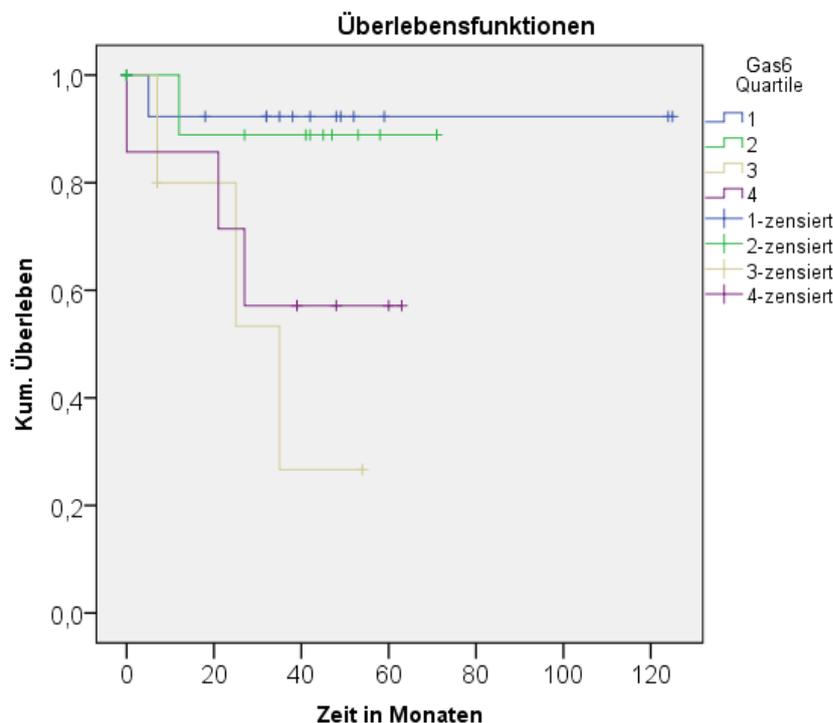


Abbildung 22 Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Quartile für Gas6 im CTEPH Kollektiv. Auf der Abszisse befindet sich die Zeit in Monaten, wobei die Ordinate das kumulative Überleben beschreibt (1 = 100%, 0,4 = 40%). Das Quartil 1 wird blau, Quartil 2 grün, Quartil 3 gelb und Quartil 4 lila dargestellt. Quartil 1 stellt das Quartil mit der niedrigsten Plasmakonzentration dar. Knicke im Verlauf der Quartile stellen das Eintreffen eines Ereignisses dar, wobei Querstriche eine Zensur bedeuten. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Quartilen bezüglich der Überlebenszeit ($p = 0,038$).

Es folgten Cox-Regressionsanalysen zum Überleben, wobei ausschließlich die univariate Analyse der dichotomisierten Stichprobe signifikant ausfiel ($p = 0,019$; HR = 6,829; 95% KI für HR 1,375-33,907). Multivariate Analysen waren in diesem Kollektiv aufgrund fehlender Variablen nicht möglich (Übersicht s. Tabelle 23). Die kontinuierliche univariate Cox-Regressionsanalyse bezogen auf die TTCW fiel ebenfalls signifikant aus ($p = 0,039$; HR = 5,558; 95% KI für HR 1,093-28,256).

4.2.9.6 CTEPH und sAxl

Die Verteilung der Proteinkonzentration über die *WHO FC's* ($p = 0,889$, Mittelwerte (\pm SD) s. Tabelle 21) sowie über die Geschlechter ($p = 0,931$) war nicht signifikant unterschiedlich.

Eine signifikante Korrelation konnte nicht aufgedeckt werden (s. Tabelle 22), wobei eine Tendenz in Bezug auf den PVR ($p = 0,059$; $r = -0,328$) erkennbar war.

Nach einem Jahr waren im CTEPH Kollektiv noch 89,8%, nach drei und fünf Jahren noch 74,3% am Leben. Der Quartilvergleich zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Überlebenszeit ($p = 0,881$) und bezüglich TTCW ($p = 0,822$). Die Analysen zur Cox-Regression zeigten ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse (s. Tabelle 24).

4.2.9.7 PVH und Gas6

In diesem Kollektiv unterschieden sich die Plasmakonzentrationen weder signifikant zwischen den *WHO FC's* ($p = 0,289$; Mittelwerte (\pm SD) s. Tabelle 20), noch zwischen den Geschlechtern ($p = 1,000$).

Eine signifikante mittelstarke Korrelation zwischen der Gas6 Plasmakonzentration und der SMWD konnte nachgewiesen werden ($p = 0,049$; $r = -0,435$; s. Abbildung 23). Es waren keine weiteren signifikanten Korrelationen erkennbar (s. Tabelle 22).

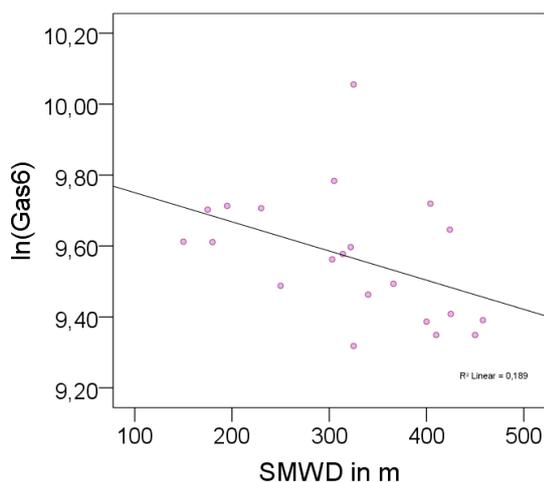


Abbildung 23 Korrelation zwischen Gas6 und der SMWD im PVH Kollektiv. Die Abbildung zeigt eine negative, signifikante Korrelation zwischen Gas6 und der SMWD ($p = 0,049$; $r = -0,435$).

Unter Betrachtung der Überlebenszeitanalyse (Kaplan-Meier) waren nach einem Jahr noch 91,7%, nach drei Jahren noch 59,1% und nach fünf Jahren noch 51,7% am Leben.

Ein Unterschied zwischen den Gas6 Quartilen hinsichtlich der Überlebenszeit im PVH-Kollektiv konnte nicht ermittelt werden ($p = 0,080$), jedoch in Bezug auf die TTCW ($p = 0,010$).

Die Cox-Regression zeigte keine signifikanten Ergebnisse in multivariaten Ansätzen. Die univariaten kontinuierlichen Analysen bezüglich Überleben ($p = 0,005$; HR = 94,655; 95% KI für HR 3,943-2272,280) und TTCW ($p = 0,002$; HR = 88,726; 95% KI für HR 5,532-1423,079) fielen signifikant aus. Dies war nicht der Fall in Bezug auf die dichotomisierte Stichprobe ($p = 0,483$; HR = 1,633; 95% KI für HR 0,415-6,418). Auch im univariaten Vergleich von Quartil 4 mit Quartil 3 konnte ein signifikantes Ergebnis erzielt werden ($p = 0,041$; HR = 0,206; 95% KI für HR 0,045-0,934).

4.2.9.8 PVH und sAxl

Zuletzt wird das PVH-Kollektiv bezüglich sAxl beschrieben. Die Verteilung von sAxl über die WHO FC ergab keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,749$; Mittelwerte(\pm SD) s. Tabelle 21). Dies traf auch für die Verteilung über die Geschlechter zu ($p = 0,536$). In diesem Kollektiv gab es keine signifikanten Korrelationen (Übersicht s. Tabelle 22).

Im Kollektiv waren nach einem Jahr noch 100%, nach drei Jahren noch 64,2% und nach fünf Jahren noch 56,1% am Leben. Eine Kaplan-Meier Analyse konnte keinen signifikanten Unterschied über die Quartile bezüglich Überleben ($p = 0,318$) und TTCW nachweisen ($p = 0,526$).

Die Cox-Regression zeigte weder bezüglich Überleben, noch in Bezug auf die TTCW signifikante Ergebnisse (s. Tabelle 24).

5 Diskussion

Die Bestimmung von Biomarkern aus dem menschlichen Blut stellt eine wenig invasive Methode dar und wird häufig im klinischen Alltag praktiziert. Die vorliegende Arbeit untersucht die Eignung von Gas6 und sAxl als Biomarker bei Patienten mit PH. Der zusammenhängende Gas6-(s)Axl-Signalweg reguliert immunologische Prozesse^{91,92}, Zellproliferation und -überleben^{94,97,101} sowie vaskuläre Umbauprozesse^{98,99} und hat Einfluss auf die Entstehung von Thrombosen¹¹⁵ (Abbildung 4). Ähnliche biologische Prozesse sind an der Entstehung der PH beteiligt^{24,27}. Zudem treten Gas6 und sAxl bereits als potentielle Biomarker bei verschiedenen Krankheitsbildern in Erscheinung,

welche in Verbindung mit einer PH stehen^{102,103,123,126,127}. Die Eignung der beiden Biomarker wird in diesem Kapitel diskutiert und bewertet.

5.1 Proteinkonzentrationen im Studienvergleich

Zur Prüfung der Verlässlichkeit der hier verwendeten ELISA Testmethode wurde der CV bestimmt (Kapitel 3.2.2). Dieser lag bei beiden Proteinen unter 10%. Die verwendete Methode lieferte somit studienintern verlässliche und vergleichbare Ergebnisse.

Darüber hinaus wurden die Testungen beider Proteine für EDTA Plasma validiert. Sowohl die Linearität im Rahmen der Verdünnungsreihe, als auch die Rückgewinnung der hinzugegebenen rekombinanten Proteine waren dabei ausreichend. Mögliche Matrixeffekte sind demnach als gering einzuschätzen.

Der Mittelwert der Plasmakonzentration von sAxI in der vorliegenden Studie lag bei 24698,32 pg/ml, bezogen auf das Gesamtkollektiv. In einer Studie zu Patienten mit plexiformer Neurofibromatose wurde eine Plasmakonzentration von 18000±8000 pg/ml für die Kontrollgruppe angegeben (N = 46, gesunde Patienten). Im Neurofibromatose-Kollektiv lag die sAxI Plasmakonzentration bei 26000±16000 pg/ml (N = 78). Auch hier wurde das DuoSet® ELISA von R&D Systems® (DY154) herangezogen¹⁰⁷. Somit ergaben sich keine erheblichen Differenzen zwischen den beiden Patientenkollektiven. Andere Studien griffen zum Teil auf abweichende Quantifizierungsverfahren zurück. Hier waren zum Teil erhebliche Abweichungen erkennbar^{103,86}. Damit ist ein Vergleich der sAxI Plasmakonzentrationen zwischen den verschiedenen Studien nur bedingt möglich.

Ähnliches gilt für die Plasmakonzentration von Gas6. Hier lag der Median der Plasmakonzentration bei 13663,00 pg/ml mit einem Interquartilabstand von 5150 pg/ml im Gesamtkollektiv. In einer Vergleichsstudie zum Sjögren-Syndrom (SS) lag der Mittelwert der Gas6 Plasmakonzentration der gesunden Kontrollgruppe bei 19900 pg/ml und bei 13500 pg/ml bei Patienten mit primärem SS. Dabei wurde ein DuoSet® ELISA von R&D Systems® verwendet¹²⁷. Im Rahmen der bereits erwähnten Studie (Analysis of Gas6 in Human Platelets and Plasma) wurden in humanem Citratplasma Konzentrationen von 18000 pg/ml in einer Kontrollgruppe sowie 15400 pg/ml in einer Gruppe mit Patienten unter Warfarin Behandlung gemessen. Dabei wurde ebenfalls der Antikörper (*Human Gas6 Antibody; Polyclonal Goat IgG; R&D Systems; Catalog*

Number AB885) verwendet¹²¹. Somit wurden im Studienvergleich ähnliche Plasmakonzentrationen ermittelt.

Anhand der Beispiele wird ersichtlich, dass ähnliche Verfahren zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen für Vergleiche zwischen Studien essentiell sind. Die Entwicklung eines standardisierten Verfahrens ist im Hinblick auf eine klinische Verwendung von Gas6 und sAx1 als Biomarker notwendig.

5.2 Einfluss von Vitamin K-Antagonisten auf die Gas6 Plasmakonzentration

Die Synthese der Gla-Domäne von Gas6 ist nur mithilfe von Vitamin K möglich¹¹⁷. Bei Patienten mit IPAH, HPAH, Appetitzügler-induzierter PAH und CTEPH kann eine supportive Therapie mit Vitamin K-Antagonisten indiziert sein³. Vor der Rechtsherzkatheterisierung wurden Vitamin K-Antagonisten aufgrund des Blutungsrisikos pausiert und die *International Normalized Ratio* (INR) unmittelbar vor der Untersuchung überprüft. Bei einem INR-Wert > 2 wurde die Katheterisierung nicht durchgeführt, um mögliche Blutungskomplikationen zu vermeiden. Eine individuelle Abwägung fand im Grenzbereich (INR 1,5-2,0) statt.

Ein Einfluss von Vitamin K-Antagonisten und des INR-Wertes auf die Gas6 Plasmakonzentration konnte bereits nachgewiesen werden. Die mittlere Gas6 Plasmakonzentration war bei Patienten unter Warfarin Therapie signifikant verringert, verglichen mit unbehandelten Kontrollen. Außerdem war eine progressive Verringerung der Gas6 Plasmakonzentration mit zunehmendem INR-Wert erkennbar¹²¹. Dabei wurde zudem erwähnt, dass verschiedene ELISA's unterschiedliche Epitope als Bindungsstellen bevorzugen. Dies hätte zur Folge, dass manche ELISA's Gla-defizientes Gas6 nicht nachweisen könnten¹²¹.

Eine Information zum Bindungsverhalten lag im Hinblick auf die hier verwendeten Antikörper nicht vor. Auch bleibt spekulativ, wie lange Einflüsse der Vitamin K-Antagonisten nach dem Absetzen auf Gas6 weiter bestehen.

5.3 Studienkollektiv

5.3.1 Einflüsse auf die Plasmakonzentrationen (Geschlecht, Alter, Nierenfunktion)

Das Studienkollektiv wurde mehrheitlich von weiblichen Probandinnen dominiert, wobei keine signifikanten Abweichungen hinsichtlich der Proteinkonzentration von Gas6 und sAxI zwischen den Geschlechtern feststellbar waren.

Die zu sAxI vorliegenden Studien beschreiben keine Geschlechtsabhängigkeit der Plasmakonzentration^{139,103}. Dies entspricht dem Ergebnis dieser Untersuchung. Eine frühere Studie zeigte signifikant höhere Gas6 Plasmakonzentrationen bei männlichen, adulten (Alter 18-80 Jahre) Probanden¹⁴⁰. In diesem Zusammenhang wurde ein möglicher Einfluss von Geschlechtshormonen auf die Gas6 Plasmakonzentration diskutiert¹⁴⁰. Eine andere Studie mit jüngeren Probanden (Alter 18-38 Jahre) zeigte signifikant geringere Gas6 Plasmakonzentrationen bei Männern im Vergleich zu Frauen unter Ausschluss einer oralen hormonellen Kontrazeption¹⁴¹. Auch wurde der Einfluss oraler Kontrazeptiva evaluiert. Dabei wiesen Probandinnen nach einer dreimonatigen Behandlung mit Ethinylestradiol und Levonorgestrel signifikant rückläufige Plasmakonzentrationen auf¹⁴¹.

Vor diesem Hintergrund muss die Studienlage bezüglich geschlechtsabhängiger Unterschiede der Gas6 Plasmakonzentration als inkonsistent bewertet werden. Auch der mögliche Einfluss von Kontrazeptiva auf die Gas6 Plasmakonzentration sollte bei künftigen Studien beachtet werden.

Ebenfalls erwähnt wurde eine negative Korrelation zwischen dem Alter und der Gas6 Plasmakonzentration bei beiden Geschlechtern¹⁴⁰. Das Alter wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht berücksichtigt. Ein möglicher Einfluss des Alters auf die Überlebenszeitprognose wird im Kapitel 5.5 diskutiert.

Im Hinblick auf die Nierenfunktion waren Gas6 Plasmakonzentrationen bei Patienten mit chronischem Nierenversagen signifikant erhöht. Zudem korrelierte die Gas6 Plasmakonzentration negativ mit der glomerulären Filtrationsrate¹¹⁴. Daten zur Nierenfunktion lagen unter Betrachtung des aktuellen Studienkollektivs nicht vor. Ein Einfluss der Nierenfunktion auf die dargelegten Ergebnisse kann somit nicht ausgeschlossen werden.

5.3.2 Klinischer Schweregrad und Risikoeinschätzung

Mit Hilfe der *WHO FC* wurde der klinische Schweregrad eingeschätzt³³. Neben anderen Parametern ist die *WHO FC* Teil einer umfassenden Risikoeinschätzung bei Patienten mit PAH. Erstrebenswert ist ein geringes Risikoprofil, welches mit einer niedrigen Sterblichkeit assoziiert ist³.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die meisten Patienten bei Diagnosestellung der *WHO FC III* zugeordnet (Kapitel 4.1.3, S. 33). Innerhalb des Kollektivs konnte kein Patient der *WHO FC I* zugeordnet werden. Dies ist zurückzuführen auf die Schwere der Erkrankung bei Diagnosestellung und typisch für das beschriebene Krankheitsbild, welches sich zu Beginn mit unspezifischen Symptomen präsentiert¹⁴². In einer Studie zu NT-proBNP als Biomarker bei PH wurden 79,66% der 118 Patienten der *WHO FC III* und *IV* zugeordnet. Das Kollektiv bestand hierbei aus 66 PAH-Patienten und 52 Nicht-PAH Patienten⁶⁷. Auch bei einer Studie zu BNP und Patienten mit primärer PH ließen sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 42 von insgesamt 60 Patienten der *WHO FC III* zuordnen. Auch hier wurde kein Patient der *WHO FC I* zugeordnet⁶⁶. Folglich wiesen beide Studien vergleichbare Ausprägungen hinsichtlich der Krankheitsschwere auf.

Die explorative Datenanalyse (*Kruskal-Wallis-Test*) wies auf eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Gas6 Plasmakonzentration über die verschiedenen *WHO FC*'s hin (Kapitel 4.2.2, S. 37). Die *WHO FC III* wies dabei den höchsten Mittelwert auf (Abbildung 11). Eine konsequente Zunahme der Mittelwerte in der Reihenfolge der zunehmenden *WHO FC*'s konnte demnach nicht beobachtet werden. Aus diesem Grund muss trotz statistischer Signifikanz von einer eingeschränkten klinischen Bedeutung ausgegangen werden.

Bei anderen Krankheitsbildern waren erhöhte Serumkonzentrationen von Gas6 mit einer hohen Krankheitsaktivität assoziiert. Eine Studie zum systemischen Lupus Erythematosus zeigte eine positive Korrelation zwischen der sAxl sowie Gas6 Plasmakonzentration und der Krankheitsaktivität¹²⁶. Auch bei Patienten mit Sepsis wurde eine positive Korrelation zwischen der Gas6 Plasmakonzentration und dem *Sepsis-related Organ Failure Assessment score* festgestellt¹²⁵.

Als mögliche Erklärung könnte in diesem Kontext angeführt werden, dass der Gas6-Axl Signalweg in der Immunmodulation eine wichtige Rolle spielt. Dabei treten

proinflammatorische als auch anti-inflammatorische Funktionen auf, abhängig vom jeweiligen Zelltyp. Eine Funktion ist die Gas6-Axl abhängige Bereinigung von Zellen nach erfolgter Apoptose^{91,143}. Die Bereinigung von untergegangenen Zellen schützt vor der Entwicklung von Autoantikörpern¹⁴⁴, diese tragen zur Entwicklung von Kollagenosen wie dem SLE bei¹⁴⁵. Patienten mit SLE wiesen ein erhöhtes Risiko hinsichtlich der Entwicklung einer PH auf¹⁴⁶.

Darüber hinaus unterstützte Gas6 im Mausmodell die Aktivierung von Endothelzellen durch TNF- α . Gas6 defiziente Mäuse schütteten dabei weniger Zytokine (IL-1 β und IL-6) aus als der Wildtyp¹²². Bei Patienten mit primärer PH (assoziierte PAH, IPAH) wurden erhöhte Konzentrationen von Zytokinen (IL-1 β , IL-6) im Serum nachgewiesen¹⁴⁷. Die Gas6 abhängige Interaktion von Leukozyten und dem Gefäßendothel, im Rahmen der Inflammation und der Entstehung von Thrombosen, konnte im Mausmodell nachgewiesen werden. Nach einer Injektion von Lipopolysacchariden in den Fußballen von Mäusen kam es zu einer lokalen Vaskulitis und Thrombose, welche bei Gas6 defizienten Mäusen deutlich reduzierter ausgeprägt waren¹²². Auch eine Extravasation von Leukozyten in das umliegende Lungengewebe war bei Gas6 defizienten Mäusen schwächer ausgeprägt¹²². Folglich zeigte sich auch hier der Einfluss auf inflammatorische Prozesse.

Eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Gas6 Plasmakonzentration über die verschiedenen *WHO FC's* war zudem innerhalb des IPAH Kollektivs reproduzierbar. Bei anderen Ätiologien (CTD, CTEPH, PVH) wurden keine signifikanten Ergebnisse beobachtet. Ob ein kausaler Zusammenhang mit der Entstehung von Ätiologien wie der IPAH besteht, bleibt zu diesem Zeitpunkt unklar, auch angesichts der fehlenden diagnostischen Relevanz von Gas6 (Kapitel 5.4.2). Kein signifikanter Unterschied der Plasmakonzentration über die *WHO FC's* war im CTD-Kollektiv nachweisbar. Dies überrascht im Hinblick auf die oben dargelegten Zusammenhänge bezüglich der Kollagenosen. Jedoch korrelierte die Plasmakonzentration von Gas6 innerhalb des CTD-Kollektivs signifikant negativ mit dem CI, HZV und positiv mit dem PVR. Auch bei dem CI handelt es sich um einen prognostisch relevanten Faktor³.

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz (Herzinsuffizienz bei systolischer Dysfunktion, Ejektionsfraktion $\leq 40\%$) wiesen Patienten mit fortgeschrittener NYHA-Klasse (III-IV) signifikant höhere Plasmakonzentrationen auf¹⁰³. Eine signifikant unterschiedliche

Verteilung der sAxI Plasmakonzentration über die WHO FC's des hier untersuchten Kollektivs war jedoch nicht erkennbar.

Zur umfassenden Risikoeinschätzung werden nach den aktuellen Leitlinien auch andere Parameter ergänzend zur *WHO FC* herangezogen³. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diesbezüglich Korrelationen zwischen den Plasmakonzentrationen und dem CI sowie der SMWD erhoben. Beide Parameter sind Teil dieser Risikoeinschätzung³.

Bezüglich Gas6 zeigte sich eine signifikant negative Korrelation zwischen der Plasmakonzentration und dem CI. Somit sank der CI mit zunehmender Gas6 Plasmakonzentration ab, wobei diese Korrelation von geringer Ausprägung war. Es bestand keine signifikante Korrelation mit der SMWD. Bei sAxI bestanden keine signifikanten Korrelationen mit der SMWD und dem CI.

Daraus lässt sich schließen, dass sAxI nicht mit etablierten Faktoren zur Risikoeinschätzung korreliert. Auch Gas6 kommt dabei keine aussagekräftige klinische Relevanz zu. Gas6 kann dennoch unabhängig davon als Prognoseinstrument herangezogen werden (siehe Kapitel 5.5, S 62).

5.3.3 Weitere Korrelationen

Eine tendenziell signifikante Korrelation zwischen der Gas6 Plasmakonzentration und dem mPAP war erkennbar (Kapitel 4.2.4). Somit steigt die Gas6 Plasmakonzentration tendenziell mit dem mPAP an, jedoch muss auch hier von einer geringen klinischen Relevanz ausgegangen werden.

Bezogen auf das Gesamtkollektiv waren bei beiden Proteinen signifikante, jedoch klinisch nicht relevante Korrelationen mit dem PAWP ableitbar (Kapitel 4.2.4). Die PH-Diagnosegruppe 2 (PVH) kann mit einem erhöhten PAWP einhergehen^{19,20,21}. Die positiven Korrelationen mit dem PAWP lassen die Annahme zu, dass Patienten mit hohem PAWP auch tendenziell erhöhte Plasmaproteinkonzentrationen aufweisen. Jedoch handelt es sich weder bei Gas6 noch bei sAxI um diagnostische Biomarker (s. Kapitel 5.4.2).

5.4 Diagnostischer Vorhersagewert

Die Entwicklung eines diagnostischen Biomarkers spielt bei der PH eine herausragende Rolle. Im Kapitel 1.3.4 wurde bereits das diagnostische Vorgehen dargelegt. Die Zuordnung zu einer Diagnosegruppe hat erheblichen Einfluss auf die Therapie

unterschiedlicher PH Formen, so kommen für Patienten mit CTEPH zum Teil kurative Ansätze in Betracht³. Die durchgeführte Literaturrecherche ergab Hinweise auf eine mögliche Relevanz von Gas6 und sAxl als diagnostische Biomarker bei PH.

5.4.1 Literaturhinweise auf eine mögliche diagnostische Relevanz von Gas6 und sAxl bei PH

Eine Analyse zur Genexpression (*oligonucleotide microarray technology*) bei Patienten mit primärer PH wies im Vergleich zu histologisch unauffälligen Probanden auf eine niedrigere Genexpression von Gas6 im Lungengewebe hin. Im Rahmen der Studie erhielten sechs Teilnehmer eine Lungenoperation, u.a. aufgrund von Tumorerkrankungen (Kontrollpatienten). Daraufhin wurden die Gewebe der sechs PH-Patienten jeweils mit den sechs Kontrollpatienten verglichen, was insgesamt 36 Vergleiche zuließ. Dabei war in 27 Vergleichen die Genexpression von Gas6 bei Patienten mit primärer PH vermindert¹⁴⁸.

Die beschriebene Studie lässt Spekulationen im Hinblick auf unterschiedliche Plasmakonzentrationen zwischen PH-Patienten und Ausschlusspatienten zu. Eine niedrige Gas6-Genexpression könnte möglicherweise eine niedrige Plasmakonzentration bedingen. Auch wurden nicht gesunde Kontrollpersonen einbezogen, analog zur Gruppe Ausschluss dieses Studienkollektivs.

In einer Studie zur Evaluation von Gas6 als Biomarker zur Differentialdiagnose bei Patienten mit Dyspnoe war die Gas6 Plasmakonzentration von Patienten mit Herzversagen im Vergleich zu Patienten mit Lungenembolie und Patienten ohne Evidenz für Lungen- bzw. Herzerkrankungen signifikant erhöht¹²³. Die innerhalb der aktuellen Studie festgestellte signifikante Korrelation zwischen Gas6 und dem PAWP (4.2.4) wies ebenfalls auf eine mögliche diagnostische Relevanz hin. Somit wäre eine erhöhte Gas6 Plasmakonzentration bei Patienten mit PVH denkbar gewesen. Eine weitere Patientengruppe, zusammengesetzt aus Patienten mit pulmonaler Infektion, Sepsis und systemischer Infektion, zeigte ebenfalls signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen im Vergleich zu Lungenemboliepatienten sowie Patienten ohne Evidenz für Lungen- und Herzerkrankungen¹²³. Ein möglicher Zusammenhang hinsichtlich der Rolle des Gas6-Axl-Signalwegs und immunologischen Prozessen wurde bereits im Kapitel 5.3.2 dargelegt.

Auch im Hinblick auf sAxl wurde ein Zusammenhang in Bezug auf Herzinsuffizienz erwähnt. In der bereits beschriebenen Studie (s. Kapitel 5.3.2) wiesen Patienten mit chronisch stabiler Herzinsuffizienz signifikant höhere sAxl Plasmakonzentrationen auf als die Kontrollgruppe. Eine *Receiver–Operator Characteristic Curve* (ROC) Analyse lies eine Sensitivität von 70,3% und eine Spezifität von 64,2% zu¹⁰³. Linksherzerkrankungen, welche mit einer reduzierten Ejektionsfraktion (HF_{rEF}) einhergehen, sind Teil der Diagnosegruppe PVH²¹. Innerhalb des aktuellen Kollektivs ergab sich eine Korrelation zwischen der sAxl Plasmakonzentration und dem PAWP, analog zu Gas6.

Bei Patienten mit thromboembolischen Ereignissen kann eine CTEPH die Folge sein^{25,26}. Bei Gas6-defizienten Mäusen wurde ein Rückgang dieser Ereignisse nachgewiesen. Ein Einfluss von Gas6 auf die Thrombozyten-Funktion wurde angenommen¹¹⁵ und könnte wichtig in der Entstehung einer CTEPH sein. Ausgeblieben ist bisher der Nachweis von Gas6 in humanen Thrombozyten^{121,122}. Ein direkter Nachweis von Gas6 in humanen Thrombozyten gehörte nicht zur Fragestellung dieser Arbeit. Es zeigte sich in diesem Zusammenhang jedoch auch keine diagnostische Relevanz der Gas6 Plasmakonzentration, insbesondere im Hinblick auf Patienten mit CTEPH (s. Kapitel 5.4.2). Das Fehlen von Gas6 in humanen Thrombozyten stellt eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis dar.

5.4.2 Gas6 und sAxl als diagnostische Biomarker innerhalb des Studienkollektivs

Im Rahmen der Varianzanalyse dieser Studie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den diagnostischen Gruppen (PAH, CTEPH, PVH, CTD und Ausschluss) bezogen auf sAxl und Gas6 Plasmakonzentrationen festgestellt werden (Kapitel 4.2.1). Auch im Rahmen der Mehrfachvergleiche kam es zu keinem signifikanten Ergebnis. Weder Gas6 noch sAxl eigneten sich demnach als diagnostische Biomarker innerhalb des beschriebenen Kollektivs. Mögliche Gründe werden im nächsten Absatz diskutiert.

Zusammenfassend erfolgte bereits im Rahmen der Einleitung eine Zuordnung der biochemischen Biomarker unter pathophysiologischen Gesichtspunkten der PH (s. Abbildung 1). Betrachtet man den Gas6-sAxl Signalweg, so lassen sich beide Proteine durchaus mehreren Gesichtspunkten zuordnen. Der Signalweg scheint insbesondere bei inflammatorischen Prozessen relevant zu sein. Hinweise lieferten Untersuchungen zur Sepsis, zum SLE, dem SS sowie zur Differentialdiagnose Dyspnoe im Hinblick auf

Pneumonien oder systemische inflammatorische Prozesse^{123,125,126,127,91}. Auch beim akuten Koronarsyndrom waren erhöhte sAxI Plasmakonzentrationen feststellbar und korrelierten mit inflammatorischen biochemischen Markern. Daneben wurde ein Einfluss des Signalwegs im Hinblick auf die Entstehung von Arteriosklerose vermutet¹⁰². Neben dem Einfluss auf die Inflammation wurde der Signalweg direkt mit der Förderung des vaskulären Remodelings und der vaskulären Zellfunktion in Verbindung gebracht^{98,99,100}. Bei Patienten mit Herzversagen lag ebenfalls eine erhöhte Serumkonzentration von sAxI vor und es wurde eine erhöhte Expression von AxI im Myokard beobachtet¹⁰³. Daneben wurde ein Einfluss des Signalwegs auf die Thrombozytenaggregation sowie Adhäsion an aktivierte Endothelzellen im Mausmodell beschrieben (s. Kapitel 1.4.4.2, 5.3.2)^{115,122}. Somit bestehen unterschiedliche Mechanismen, die jeweils nicht spezifisch für bestimmte Ätiologien der PH und der Ausschlussgruppe sind, was möglicherweise die fehlende diagnostische Aussagekraft der beiden potentiellen Biomarker erklärt.

Es ist zudem anzumerken, dass es sich bei Patienten der Diagnosegruppe Ausschluss nicht um gesunde Versuchsteilnehmer handelte. Diese erhielten eine Rechtsherzkatheteruntersuchung aufgrund des begründeten Verdachts auf eine PH. Es ist als wahrscheinlich anzunehmen, dass Patienten mit anderen Erkrankungen Teil des Ausschlusskollektivs waren. Verschiedene Erkrankungen (s. Kapitel 1.4.4, 5.5) haben zudem einen Einfluss auf die Gas6 und sAxI Plasmakonzentration. Weitere Untersuchungen unter der Berücksichtigung von gesunden Versuchsteilnehmern sollten dieser Studie angeschlossen werden. Jedoch entsprechen gesunde Versuchsteilnehmer nicht dem alltäglichen Patientenkollektiv, was bei einem signifikanten Unterschied zum PH Kollektiv den diagnostischen Mehrwert nicht erheblich erweitern würde.

5.5 Die Plasmakonzentrationen im Hinblick auf Überleben und TTCW

Bei sAxI ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge bezogen auf Überlebenszeit und TTCW. Auch durchgeführte Cox-Regressionsanalysen zeigten keine signifikanten Ergebnisse im Hinblick auf einen prognostischen Stellenwert. Die Plasmakonzentration von sAxI eignet sich demnach nicht für eine Überlebensprognose und es gab keinen Zusammenhang bezüglich Überleben und TTCW innerhalb des betrachteten Kollektivs. Dies trifft ebenfalls für alle diagnostischen Untergruppen zu.

Zusammenhänge zwischen der Plasmakonzentration von sAxl und dem Überleben wurden bereits im Hinblick auf verschiedene Krankheitsbilder beschrieben. Bei Patienten mit Herzversagen wirkte sich eine hohe sAxl Plasmakonzentration signifikant ungünstiger auf die eventfreie Ein-Jahres-Überlebenszeit (Gesamt mortalität, Transplantation, mit Herzversagen assoziierte Hospitalisierung) aus. Bei dem Kollektiv der Studie handelte es sich um Patienten mit chronisch stabilem Herzversagen mit systolischer Dysfunktion ($EF \leq 40\%$, siehe auch Kapitel 5.3.2). Eine durchgeführte Cox-Regressionsanalyse ergab eine HR von 3,31. Es wurden stets Patienten mit sAxl Plasmakonzentrationen unterhalb des dritten Quartils mit Patienten ab dem dritten Quartil verglichen. Darüber hinaus wurde vermutet, dass sAxl über einen BNP-unabhängigen Signalweg als Prädiktor bei Herzversagen fungiert.¹⁰³ Wie bereits beschrieben stellt das Rechtsherzversagen eine häufige Komplikation bei PH dar²⁸. Darüber hinaus kann eine PH als Folge einer HFrEF auftreten²¹. Jedoch steht das Ergebnis der beschriebenen Studie im Kontrast zu den hier dargelegten Ergebnissen, da keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der sAxl Plasmakonzentration und dem Überleben feststellbar waren.

Insbesondere innerhalb des PVH-Kollektivs wäre ein signifikantes Ergebnis denkbar gewesen. Bei einer HFrEF liegt die Prävalenz für gleichzeitiges Vorliegen einer PH bei 40-75%¹⁴⁹. In diesem Fall ist von einer schlechteren Prognose auszugehen²⁰. Bei dem zur Überlebenszeitanalyse herangezogenen Patientenkollektiv handelte es sich jedoch um Versuchsteilnehmer mit bereits bestätigter PH. Demnach wurden Patienten mit HFrEF ohne PH in dieser Studie nicht berücksichtigt. Die sAxl Plasmakonzentration lieferte hier möglicherweise auf dem Boden einer wahrscheinlich schlechteren Prognose und eines fortgeschrittenen Schweregrades keine signifikanten Ergebnisse. In der Vergleichsstudie wiesen 46% der Patienten, ab dem dritten Quartil der sAxl Plasmakonzentration, eine funktionelle NYHA Klasse von III und höher auf¹⁰³. Innerhalb des hier vorliegenden PH-Kollektivs waren die Patienten vergleichsweise schwerer erkrankt. Die Anzahl der Patienten innerhalb der WHO FC III und IV lag bei 73%. Darüber hinaus wurde keine weitere Differenzierung innerhalb der PVH Gruppe vorgenommen.

Auch denkbar für die abweichenden Ergebnisse der Studien könnte die im Vergleich geringere myokardiale Masse der rechten Herzhälfte sein¹⁵⁰. Somit wäre bei Rechtsherzversagen ein vergleichsweise geringerer Anstieg der sAxl

Plasmakonzentration messbar als bei Linksherzversagen. Eine erneute Evaluation von sAxl als prognostischen Biomarker bei PH Patienten und HFrEF könnte hier weitere Erkenntnisse liefern.

Im Hinblick auf Gas6 wiesen durchgeführte *Log Rank (Mantel Cox)* Tests auf signifikante Unterschiede im Hinblick auf die Überlebenszeit und TTCW hin. Dabei lebten PH Patienten innerhalb des Kollektivs mit hohen Gas6 Plasmakonzentrationen signifikant kürzer und es trat früher eine klinische Verschlechterung ein. Darüber hinaus wurden Cox-Regressionsanalysen durchgeführt. Sie erfolgten zuerst univariat sowie später multivariat, wobei jeweils kontinuierliche Variablen, die dichotomisierte Stichprobe und Quartile der Stichprobe betrachtet wurden. Dabei zeigte sich eine prognostische Relevanz der Plasmakonzentration von Gas6 bei allen Ansätzen. Im direkten univariaten Quartilvergleich wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Quartil 1 und Quartil 4 festgestellt. Im Quartil 4 (hohe Gas6 Plasmakonzentration) lag das prognostizierte Risiko zu versterben um den Faktor 4 höher, verglichen mit Quartil 1 (niedrige Gas6 Plasmakonzentration). Auch im multivariat dichotomisierten Ansatz wurde ein tendenziell signifikantes Ergebnis erzielt. Die HR lag hier bei 1,747 (95% KI für HR 0,871-3,508). Somit wurde für Patienten oberhalb der medianen Gas6 Plasmakonzentration eine signifikant schlechtere Überlebenszeit prognostiziert. Folglich handelt es sich bei Gas6 um einen multivariat stabilen Prädiktor der Überlebenszeit.

Die durchgeführte univariat kontinuierliche Cox-Regressionsanalyse zur TTCW wies ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang nach. Somit würde sich auch hier eine hohe Gas6 Plasmakonzentration ungünstig auf die Prognose auswirken.

Bei Patienten mit septischem Schock zeigte sich eine signifikante Abnahme der Gas6 Plasmakonzentration bei Überlebenden im Vergleich zu den versterbenden Probanden. Die signifikante Abnahme der Plasmakonzentration trat ab dem siebten Tag nach der ersten Bestimmung ein. Jedoch waren weder die Plasmakonzentrationen am siebten Tag, noch die Differenz der Plasmakonzentrationen zwischen dem siebten und dem ersten Tag aussagekräftig genug, um eine Überlebensprognose zuzulassen.¹²⁵ Wie bereits erwähnt sind in der Pathogenese der PH und der Sepsis inflammatorische Prozesse von Bedeutung. Die Gas6-abhängige Axl Aktivierung ist Teil einer proinflammatorischen Signalkaskade¹²². Bei der multifaktoriellen PH sind jedoch

weitere Gas6 und Axl abhängige Mechanismen relevant (s. Abbildung 4 sowie Kapitel 1.4.4.2). Nicht nur im Zustand der Sepsis bedingten Inflammation, sondern beispielsweise auch bei Herzinsuffizienz ist mit höheren Gas6 Plasmakonzentrationen zu rechnen¹²³. Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit Patienten über einen erheblich längeren Zeitraum beobachtet. Bei der PH handelt es sich um eine überwiegend unheilbare Erkrankung, die über mehrere Jahre voranschreitet³. Eventuell eignet sich Gas6 eher als Überlebenszeitprädiktor für progrediente und länger verlaufende Erkrankungen, wie zum Beispiel bei Tumoren und anderen Erkrankungen, die mit einer erhöhten Zellproliferation einhergehen.

Mehrfach beschrieben wurde die prognostische Relevanz von Gas6 bei Tumorerkrankungen. Eine prognostische Relevanz von Gas6 bei Patienten mit Nierenzellkarzinom wurde nachgewiesen¹⁰⁶. Auch beim oralen Plattenepithelkarzinom (oPK) konnte Gas6 im Serum als unabhängiger Prädiktor für das Überleben herangezogen werden. Die multivariate Cox-Regressionsanalyse, bezogen auf eine dichotomisierte Stichprobe, fiel signifikant aus (HR = 2,07, 95% KI für HR 1,79-3,62).¹²⁸ Beim Adenokarzinom der Lunge war die hohe Proteinexpression (Immunhistochemie von Adenokarzinom Lungengewebe) von Gas6 mit einem signifikant kürzeren Fünf-Jahres Gesamtüberleben assoziiert¹⁵¹. Auch beim Ovarialkarzinom war die Gas6-Expression ein unabhängiger Prädiktor für das Überleben. So wurde im Rahmen einer Cox-Regressionsanalyse eine hohe Tumorexpression von Gas6 mit einem signifikant kürzeren krankheitsfreien Überleben assoziiert.¹²⁹

Auch korrelierte die Gas6 Plasmakonzentration in einer vorangegangenen Studie signifikant negativ mit dem Alter (s. Kapitel 5.3.1).¹⁴⁰ Es ist somit anzunehmen, dass ältere Patienten mit einer altersbedingt niedrigeren Lebenserwartung eher niedrige Gas6 Plasmaspiegel aufweisen. In Zusammenhang mit PH Patienten waren niedrige Gas6 Plasmaspiegel jedoch mit einer günstigeren Prognose assoziiert. Demnach kann die beschriebene Korrelation die prognostische Relevanz von Gas6 nicht abwerten.

In einer vergleichbaren Studie wurde die prognostische Relevanz von *baseline* Plasma BNP bei 63 Patienten mit primärer PH untersucht. In einem multivariaten Modell zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen BNP und dem Überleben, wobei die nichtinvasiven Parameter *NYHA FC*, *heart rate*, *left ventricular deformity index*,

pericardial effusion, *Plasma ANP*, *Plasma BNP* und *Plasma norepinephrine* in die Untersuchung einbezogen wurden. Bei Patienten mit *baseline* BNP Plasmakonzentrationen oberhalb des Medians war dabei das Mortalitätsrisiko zwölfmal erhöht⁶⁶. Im direkten Vergleich des Mortalitätsrisikos erscheint somit BNP dem potentiellen Biomarker Gas6 überlegen. Jedoch handelte es sich bei der Vergleichsstudie ausschließlich um Patienten mit primärer PH. Außerdem wurden im multivariaten Ansatz unterschiedliche Faktoren einbezogen. Ein direkter Vergleich wäre somit nur innerhalb des hier untersuchten Patientenkollektivs aussagekräftig. Im Ausblick wird die Verwendung von BNP und Gas6 in einer Multibiomarker-Strategie diskutiert.

5.6 Limitationen

In der vorliegenden Studie erfolgte die Gewinnung von Patientenblut über einen *Swan-Ganz-Katheter* aus der Pulmonalarterie. Im Rahmen zukünftiger Forschungsarbeiten sollte eine weitere Untersuchung erfolgen, um etwaige Konzentrationsunterschiede zu peripher abgenommenem Blut auszuschließen. Die Notwendigkeit einer weiteren Untersuchung ist darauf zurückzuführen, dass die Bestimmung der molekularen Biomarker im klinischen Alltag aus peripheren Venen erfolgt, was ein weniger invasives Verfahren darstellt.

Auch im Hinblick auf die Wirkung von Vitamin K-Antagonisten auf die Gas6 Plasmakonzentration (Kapitel 5.2) sind weitere Untersuchungen notwendig. Ein möglicher Einfluss auf die prognostische Relevanz des potentiellen Biomarkers kann nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren sollten künftige Studien einen möglichen Einfluss der Nierenfunktion auf die Gas6 Plasmakonzentration berücksichtigen. Patienten mit deutlich erhöhtem Plasmakreatinin könnten von künftigen Studien ausgeschlossen werden.

5.7 Ausblick

Insbesondere bei Tumorerkrankungen scheint Gas6 als Prognoseinstrument einen Stellenwert zu besitzen. Im Rahmen der Tumorentstehung kommt es zu ungehemmter Tumorzellteilung (Proliferation). Die Proliferation von verschiedenen Zelltypen der pulmonalen Blutgefäße spielen eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung der PH (s. Kapitel 1.3.3.1). Auch haben Lungentumoren direkten Einfluss auf umgebende Zellen wie Gefäßzellen und Zellen des Immunsystems. Proliferation und Inflammation bei

Lungentumoren fördern demnach vaskuläres Remodeling und können in Verbindung mit einer PH auftreten¹⁵². Bei der Therapie von Tumorerkrankungen kommen Tyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib zum Einsatz¹⁵³. Auch Patienten mit PH profitieren zum Teil von einer Behandlung mit Imatinib¹⁵⁴. Bei Axl handelt es sich ebenfalls um eine Tyrosinkinase (s. Kapitel 1.4.4.1). In diesem Zusammenhang wurde das *small molecule* R428 als Inhibitor der Tyrosinkinase identifiziert¹³⁰. Das Unterdrücken der Tyrosinkinase Axl durch R428 scheint direkten Einfluss auf die Funktion von VSMCs zu haben¹³¹. Möglicherweise kommt R428 als therapeutische Option bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose in Betracht¹³². Eine PH kann unter anderem als Folge der Lungenfibrose auftreten. *In vitro* sowie *in vivo* Studien zur Evaluation von R428 als pharmakologische Option zur Behandlung der PH sollten in Zukunft folgen. Ein möglicher Einsatz von R428 als PH-Medikament beim Menschen sollte anschließend erprobt werden.

Wie bereits beschrieben (Kapitel 1.4.4.1) übersteigt die Plasmakonzentration von sAxl im Normalfall die des Proteins Gas6⁸⁶. Darüber hinaus soll Gas6 meist als Gas6-sAxl-Verbindung vorliegen. Eine Studie konnte nachweisen, dass Gas6-sAxl-Verbindungen Kalzium abhängig sind und durch EDTA Zusätze aufgehoben werden¹³⁹. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass im Rahmen des ELISA nur freie Gas6 und sAxl Moleküle nachgewiesen wurden. Eine mögliche Konkurrenz von sAxl und Axl um die Gas6 Bindung wurde angenommen⁸⁸. Eine inhibitorische Funktion von sAxl auf Gas6 wurde bei Mäusen im Zusammenhang mit der Entstehung von pulmonalen Thrombosen bestätigt⁹⁶. Bei Patienten mit abdominalem Aortenaneurysma korrelierte Gas6 positiv und sAxl negativ mit der Größe der Aneurysmata, weshalb ein Gas6/sAxl Stoffmengenverhältnis eingeführt wurde. Dieses Verhältnis erzielte noch bessere Korrelationen als die einzelnen Proteinkonzentrationen¹⁰⁵. Eine erneute Untersuchung des aktuellen Kollektivs unter Betrachtung des Gas6/sAxl Verhältnisses erscheint sinnvoll. Es besteht die Möglichkeit, dass ein Überschuss an Gas6 vermehrt zu einer Axl Aktivierung führt und PH relevante Veränderungen hervorbringt. Hinweise lieferten Untersuchungen zum Einfluss des Gas6-Axl-Signalwegs auf vaskuläres Remodeling und endotheliale Dysfunktion in Tiermodellen^{98,99} sowie der Schutz vor Apoptose bei humanen pulmonalen Endothelzellen *in-vitro*⁹⁷. Auch eine Evaluation nach direkter Quantifizierung des Gas6/sAxl Komplexes mittels ELISA könnte in Zukunft erfolgen und weitere Erkenntnisse liefern.

In der vorliegenden Studie konnte die prognostische Relevanz von Gas6 bei Patienten mit PH demonstriert werden (Kapitel 5.5). Betont wurde die Unabhängigkeit der prognostischen Relevanz von Parametern wie CI, SMWD und *WHO FC*. Es wurde zudem vermutet, dass es sich beim Gas6-Axl Signalweg um einen BNP unabhängigen Signalweg handeln könnte. Hinweise lieferten Untersuchungen zu sAxl als Biomarker bei Herzversagen (s. Kapitel 5.5)¹⁰³. Ähnliche Untersuchungen zu Gas6 stehen jedoch noch aus. Denkbar wäre eine Einführung von Gas6 als Prognoseparameter in einer Multibiomarker-Strategie, zusammen mit bereits etablierten Prognoseparametern wie BNP.

Zur Einschätzung der Wirksamkeit von therapeutischen Maßnahmen können Biomarker herangezogen werden. Deshalb sollte eine prognostische Relevanz auch im Hinblick auf die Gas6 Plasmakonzentration bei PH-Patienten unter pharmakologischer Therapie evaluiert werden.

6 Zusammenfassung

Bei der PH handelt es sich um eine schwerwiegende Erkrankung, die sich oftmals mit unspezifischen Symptomen präsentiert. Die Erkennung der PH, die Einordnung in eine PH-Ätiologie und die Einschätzung der Prognose setzen einen umfangreichen diagnostischen Vorgang voraus. Goldstandard innerhalb des Prozesses ist eine invasive Rechtsherzkatheteruntersuchung. Ziel der vorliegenden Studie war es, die potentiellen Biomarker Gas6 und sAxl im Hinblick auf ihre diagnostische und prognostische Aussagekraft zu untersuchen sowie mögliche Zusammenhänge mit der Krankheitsschwere und Parametern aus Rechtsherzkatheteruntersuchungen aufzudecken. Zu diesem Zweck wurden 167 (sAxl), bzw. 179 (Gas6) therapienaive Patienten des UKGM retrospektiv ab der ersten Rechtsherzkatheteruntersuchung bis April 2015 beobachtet. Darüber hinaus erfolgte eine Blutentnahme über die Pulmonalarterie im Rahmen der ersten Rechtsherzkatheteruntersuchung. Daraufhin wurden die aufeinanderfolgenden Patienten leitliniengerecht den ätiologischen Gruppen (PVH, IPAH, CTD, CTEPH) zugeordnet. Im Anschluss erfolgte die Quantifizierung der Proteine Gas6 und sAxl aus EDTA-Plasma mithilfe eines *Sandwich-ELISA* und die statistische Auswertung mit der Software SPSS. Dabei zeigte sich weder ein Unterschied zwischen PH-Patienten und der Ausschlussgruppe, noch gelang die Differenzierung zwischen PH-Ätiologien anhand der Gas6 bzw. sAxl

Plasmakonzentration (ln(Gas6) ANOVA $p = 0,222$, sAxl ANOVA $p = 0,345$). Folglich eignen sich beide Proteine nicht als diagnostische Biomarker. Im Hinblick auf die Krankheitsschwere war die Verteilung der Gas6 Plasmakonzentration über die *WHO FC* signifikant unterschiedlich (Kruskal-Wallis-Test $p = 0,015$). Andererseits musste aufgrund des nicht stetigen Anstiegs der *WHO FC* mit der ansteigenden Gas6 Plasmakonzentration eine eingeschränkte klinische Bedeutung angenommen werden. Bei sAxl zeigte sich bezüglich der Krankheitsschwere kein signifikanter Zusammenhang. Gas6 korrelierte bei Patienten mit PH zudem positiv mit dem PAWP ($r = 0,23$; $p = 0,006$) und negativ mit dem CI ($r = -0,166$; $p = 0,049$). Der CI besitzt neben der *WHO FC* ebenfalls prognostische Relevanz, jedoch waren beide Korrelationen nur von geringer Ausprägung. Im sAxl-PH-Kollektiv zeigte sich ebenfalls eine gering ausgeprägte, signifikante Korrelation mit dem PAWP ($r = 0,202$; $p = 0,021$). Somit wurden Zusammenhänge zwischen den untersuchten Proteinen und Parametern aus der Rechtsherzkatheteruntersuchung als gering und klinisch wenig relevant eingestuft. Im Hinblick auf das Überleben und die TTCW waren signifikante Unterschiede über die Gas6 Quartile innerhalb des PH-Kollektivs feststellbar (Überleben $p = 0,037$; Ein-, Drei-, Fünf-Jahres Überleben Quartil 4 mit 83%, 54%, 51% vs. Quartil 1 mit 91%, 91%, 86%; TTCW $p = 0,017$; Ein-, Drei-, Fünf-Jahre ohne klinische Verschlechterung Quartil 4 mit 45%, 21%, 21% vs. Quartil 1 mit 61%, 55%, 45%). Als letztes wurde die prognostische Relevanz der Proteine untersucht. Bei sAxl war nicht von einer prognostischen Relevanz auszugehen. Vielversprechend fielen dahingegen die Ergebnisse im Gas6-Kollektiv aus. In einem multivariaten Ansatz zeigte sich bei Patienten mit Gas6 Plasmakonzentrationen oberhalb des Medians eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit an einer PH zu versterben (Cox-Regression $p = 0,116$; HR = 1,7). Auch unter Betrachtung von Gas6 und der TTCW wurde ein signifikantes Ergebnis erzielt (Cox-Regression univariat, kontinuierlich $p = 0,005$; HR = 2,8). Abschließend konnte gezeigt werden, dass es sich bei Gas6 um einen multivariat stabilen Prädiktor im Hinblick auf das Überleben bei Patienten mit PH handelt. Weitere Untersuchungen zur Gas6 Plasmakonzentration aus peripheren Venen sollten perspektivisch folgen.

PH is a severe disease and patients often suffer from unspecific symptoms. The diagnosis of PH, the etiological classification and the evaluation of the prognosis require an extensive procedure. Within this procedure invasive right heart

catheterisation plays an important key role. The aim of this study was to determine if Gas6 and sAxl are qualified as diagnostic and prognostic biomarkers and furthermore if they are capable of predicting relationships between biomarker concentrations and disease severity or parameters measured by right heart catheterisation. For this purpose a group of 167 (sAxl), resp. 179 (Gas6) consecutive patients were observed retrospectively at the UKGM from their first catheterisation until April 2015. Patients with mPAP equal or higher than 25 mmHg were diagnosed with PH. The other patients were diagnosed and defined as non-PH controls. During their first catheterisation blood samples were taken from the pulmonary arteria. Afterwards PH patients were divided into etiological subgroups following PH specific guidelines (PVH, IPAH, CTD and CTEPH). The next step was to measure plasma levels of sAxl and Gas6 using the sandwich-ELISA method followed by using SPSS for statistical evaluation. Test results showed no difference between non-PH controls and patients diagnosed with PH, regarding plasma concentrations of Gas6 and sAxl and there were also no differences between etiological subgroups (ln(Gas6) oneway ANOVA $p = 0,222$, sAxl oneway ANOVA $p = 0,345$). As a result neither Gas6 nor sAxl can be used as diagnostic biomarkers. Looking for an association between biomarker plasma levels and disease severity, the distribution of Gas6 was significantly different between WHO FC's (Kruskal-Wallis-Test $p = 0,015$). The result was limited, because the WHO FC did not steadily increase in conjunction with the rising Gas6 plasma concentration (median of the Gas6 concentration was the highest in WHO FC III and lower in WHO FC II and IV). There were no relevant results looking at sAxl and disease severity. There was also a significant positive correlation between Gas6 and PAWP ($r = 0,23$; $p = 0,006$) and a significant negative correlation between Gas6 and CI ($r = -0,166$; $p = 0,049$), which is also a prognostic factor besides the WHO FC. The protein sAxl also significantly correlated with PAWP ($r = 0,202$; $p = 0,021$). All these correlations were significant but clinically minor relevant. For survival and TTCW a Kaplan-Meier-Analysis was performed. Patients of quartile 4 with high Gas6 values had a poor survival rate compared to patients of quartile 1 (Log Rank $p = 0,037$, one-, three-, five-year survival 83%, 54%, 51% vs. 91%, 91%, 86%). Patients of quartile 4 also had a poor prognosis retrospectively regarding TTCW compared to patients of quartile 1 (Log Rank $p = 0,017$, one-, three-, five-year patients without clinical worsening 45%, 21%, 21% vs. 61%, 55%, 45%). There were no associations between sAxl levels with TTCW or survival. For evaluating the prognostic benefit a multivariate approach was performed.

Patients with Gas6 levels above the median had a poor survival prognosis (Cox-Regression $p = 0,116$, HR = 1,747). The result was equivalent in TTCW (Cox-Regression continuous univariate $p = 0,005$; HR = 2,845). In conclusion Gas6 has potential as a prognostic biomarker in patients with PH. Further investigations should look for differences in plasma concentrations between the pulmonary arteria and arm veins.

7 Abkürzungsverzeichnis

ADAM10	Activity of Disintegrin-like Metalloproteinase 10
ALK1	Activin Receptor-Like Kinase 1
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
AP-2	Activating Protein-2
APAH	Assoziierte pulmonal arterielle Hypertonie
BMP	Bone-Morphogenetic-Protein
BMPR2	Bone-Morphogenetic-Protein Receptor type II
BNP	Brain Natriuretic Peptide
BPA	pulmonale Ballonangioplastie
CA	Capture Antibody
CAV1	Caveolin-1-Protein
CCB	Kalzium-Antagonisten
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CI	Cardiac Index
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Cpc-PH	kombiniert post- und präkapilläre pulmonale Hypertonie
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomografie
CTD	PH assoziiert mit Bindegewebserkrankungen
CTEPH	chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
CTnI	cardiales Troponin I
CT-proET-1	Carboxy-Terminal pro-Endothelin-1
CV	Variabilitätskoeffizienten
DA	Detection Antibody
DPG	diastolischer Druck Gradient
edRVP	end-diastolischer rechtsventrikulärer Druck
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
eGF	epidermal Growth Faktor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EKG	Echokardiogramm
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
ENG	Endoglin
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERA	Endothelin-Rezeptor-Antagonisten
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
ET-1	Endothelin-1
Gas6	Growth arrest-specific 6
GC	Guanylatzyklase
GDF15	Growth Differentiation Factor 15
Gla	γ -Carboxyglutamat
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor-1 α

HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPAH	hereditäre pulmonal arterielle Hypertonie
HR	Hazard Ratio
HRCT	high-resolution Computertomografie
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
HZV	Herzzeitvolumen
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
IFNAR	Type I Interferon Rezeptor
IL-6	Interleukin-6
IPAH	idiopathische pulmonal arterielle Hypertonie
Ipc-PH	isoliert post-kapilläre pulmonale Hypertonie
KCNK3	Potassium Channel Subfamily K Member 3
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
kTnI	kardiales Troponin I
LAP	linksatrialer Druck
ln	<i>logarithmus naturalis</i>
LTOT	Langzeit Sauerstofftherapie
LVSD	Linksventrikuläre systolische Dysfunktion
miRNA	micro-Ribonukleinsäure
MMP2	Matrix Metalloproteinase-2
mPAP	mittlerer pulmonal arterieller Druck
mRAP	mittlerer rechtsatrialer Druck
MZF1	Myeloid Zinc Finger 1
N	Stichprobengröße
NO	Stickstoffmonoxid
NT-	
proBNP	Amino-terminales Fragment von proBNP
NYHA FC	New York Heart Association Functional Classification
oPK	orales Plattenepithelkarzinom
PAH	pulmonal arterielle Hypertonie
PAP	pulmonal arterieller Druck
PAR	pulmonal arterieller Widerstand
PASMC	pulmonale glatte Gefäßmuskelzellen
PAWP	pulmonal arterieller Wedge Druck
PDE5	Phosphodiesterase-5
PDE5i	Phosphodiesterase-5 Inhibitoren
PE	pulmonale Embolie
PH	Pulmonale Hypertonie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI3K/Akt	Phosphoinositid-3-Kinase/Akt
PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
PPHN	persistierende pulmonal arterielle Hypertonie des Neugeborenen

proBNP	Vorstufe des Brain Natriuretic Peptide
PVH	pulmonal venöse Hypertonie
PVR	pulmonal vaskulärer Widerstand
RCT	randomisierte kontrollierte Studie
RD	<i>Reagent Diluent</i>
RDW	Red Cell Distribution Width
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RV	rechter Ventrikel
SAPH	Sarkoidose assoziierte pulmonale Hypertonie
sAxl	soluble Axl
SD	Standardabweichung
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SHBG	Sex-Hormon-Binding-Globulin
SMAD9	SMAD family member 9
SMWD	6-Minuten-Gehstrecke
Sp	specificity protein
sPAP	systolischer pulmonal arterieller Druck
SS	Sjögren Syndrom
Std	Standard
TGF- β	Transforming-Growth-Factor- β
TIMP1	tissue inhibitor of metalloproteinases 1
TLR	Toll like Rezeptor
tPR	totaler pulmonaler Widerstand
TTCW	Zeit bis zur klinischen Verschlechterung
TTE	transthorakale Echokardiografie
UKGM	Uniklinikum Gießen und Marburg
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	vaskular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel-Lindau
VSMC	vascular smooth muscle cell
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WHO FC	World Health Organization Functional Classification
YAP	Yes-associated protein

8 Literaturverzeichnis

1. Wilkens H. Diagnostik der pulmonalen Hypertonie. *Der Pneumol.* 2010;7(3):174-186. doi:10.1007/s10405-009-0378-1.
2. Erdmann (Hsrg.) E, Schneider CA. *Klinische Kardiologie.* Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2011. doi:10.1007/978-3-642-16481-1.
3. Galiè N, Humbert M, Vachiery J, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 2015;46(4):903-975. doi:10.1183/13993003.01032-2015.
4. Ewert R, Olschewski H, Ghofrani HA, Opitz CF. [Early diagnosis and therapy in pulmonary hypertension--aspects of a vision]. *Pneumologie* 2013;67(7):376-87. doi:10.1055/s-0033-1344316.
5. Idrees MM, Saleemi S, Azem MA, et al. Saudi guidelines on the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: 2014 updates. *Ann. Thorac. Med.* 2014;9(Suppl 1):S1-S15. doi:10.4103/1817-1737.134006.
6. Kingman M, Hinzmann B, Sweet O, Vachiéry J-L. Living with pulmonary hypertension: unique insights from an international ethnographic study. *BMJ Open* 2014;4(5):e004735. doi:10.1136/bmjopen-2013-004735.
7. Rosenkranz S. Pulmonary hypertension 2015: current definitions, terminology, and novel treatment options. *Clin. Res. Cardiol.* 2014;(Cmmc). doi:10.1007/s00392-014-0765-4.
8. Simonneau G, Gatzoulis M a, Adatia I, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013;62(25 Suppl):D34-41. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.029.
9. Austin ED, Loyd JE. The genetics of pulmonary arterial hypertension. *Circ. Res.* 2014;115(1):189-202. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.303404.
10. Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, et al. Definitions and Diagnosis of Pulmonary Hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013;62(25):D42-D50. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.032.
11. Yamamura A. Pathological function of Ca²⁺-sensing receptor in pulmonary arterial hypertension. *J. Smooth Muscle Res.* 2014;50:8-17. doi:10.1540/jsmr.50.8.
12. Lai Y-C, Potoka KC, Champion HC, Mora AL, Gladwin MT. Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome. *Circ. Res.* 2014;115(1):115-30. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.301146.
13. Machado RD, James V, Southwood M, et al. Investigation of second genetic hits at the BMPR2 locus as a modulator of disease progression in familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2005;111(5):607-13. doi:10.1161/01.CIR.0000154543.07679.08.
14. Soubrier F, Chung WK, Machado R, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013;62(25 Suppl):D13-21. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.035.
15. Shintani M, Yagi H, Nakayama T, Saji T, Matsuoka R. A new nonsense mutation of SMAD8 associated with pulmonary arterial hypertension. *J. Med. Genet.*

- 2009;46(5):331-7. doi:10.1136/jmg.2008.062703.
16. Hofmann A, Gosemann J-H, Takahashi T, Friedmacher F, Duess JW, Puri P. Imbalance of caveolin-1 and eNOS expression in the pulmonary vasculature of experimental diaphragmatic hernia. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 2014;101(4):341-6. doi:10.1002/bdrb.21117.
 17. Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, et al. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(4):351-61. doi:10.1056/NEJMoa1211097.
 18. Archer SL, Djaballah K, Humbert M, et al. Nitric oxide deficiency in fenfluramine- and dexfenfluramine-induced pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998;158(4):1061-7. doi:10.1164/ajrccm.158.4.9802113.
 19. Guazzi M, Borlaug B a. Pulmonary hypertension due to left heart disease. *Circulation* 2012;126(8):975-90. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.085761.
 20. Thenappan T, Gomberg-Maitland M. Epidemiology of pulmonary hypertension and right ventricular failure in left heart failure. *Curr. Heart Fail. Rep.* 2014;11(4):428-35. doi:10.1007/s11897-014-0216-6.
 21. Miller WL, Grill DE, Borlaug B a. Clinical features, hemodynamics, and outcomes of pulmonary hypertension due to chronic heart failure with reduced ejection fraction: pulmonary hypertension and heart failure. *JACC. Heart Fail.* 2013;1(4):290-9. doi:10.1016/j.jchf.2013.05.001.
 22. Voelkel NF, Mizuno S, Bogaard HJ. The role of hypoxia in pulmonary vascular diseases: a perspective. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2013;304(7):L457-65. doi:10.1152/ajplung.00335.2012.
 23. Sommer N, Dietrich a, Schermuly RT, et al. Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur. Respir. J.* 2008;32(6):1639-51. doi:10.1183/09031936.00013908.
 24. Zangiabadi A, De Pasquale CG, Sajkov D. Pulmonary hypertension and right heart dysfunction in chronic lung disease. *Biomed Res. Int.* 2014;2014(i):739674. doi:10.1155/2014/739674.
 25. Morris T a, Marsh JJ, Chiles PG, Auger WR, Fedullo PF, Woods VL. Fibrin derived from patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension is resistant to lysis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006;173(11):1270-5. doi:10.1164/rccm.200506-916OC.
 26. Lang IM, Madani M. Update on chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation* 2014;130(6):508-18. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009309.
 27. Lang IM, Pesavento R, Bonderman D, Yuan JX-J. Risk factors and basic mechanisms of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a current understanding. *Eur. Respir. J.* 2013;41(2):462-8. doi:10.1183/09031936.00049312.
 28. Mielniczuk LM, Swiston JR, Mehta S. Riociguat: a novel therapeutic option for pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Can. J. Cardiol.* 2014;30(10):1233-40. doi:10.1016/j.cjca.2014.04.014.

29. Minai O a. Saudi Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension: Biomarkers in pulmonary arterial hypertension. *Ann. Thorac. Med.* 2014;9(Suppl 1):S92-7. doi:10.4103/1817-1737.134047.
30. Poland AT, France PD, Uk SH, et al. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension: The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 2004;25(24):2243-2278. doi:10.1016/j.ehj.2004.09.014.
31. Denton CP, Cailles JB, Phillips GD, Wells AU, Black CM, Bois RM. Comparison of Doppler echocardiography and right heart catheterization to assess pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *Rheumatology* 1997;36(2):239-243. doi:10.1093/rheumatology/36.2.239.
32. Hoepfer MM, Ghofrani HA, Gorenflo M, Grünig E, Rosenkranz S, Schranz D. Diagnostik und therapie der pulmonalen hypertonie: Europäische leitlinien 2009. *Kardiologie* 2010;4(3):189-207. doi:10.1007/s12181-010-0269-z.
33. Nickel N, Golpon H, Greer M, et al. The prognostic impact of follow-up assessments in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 2012;39(3):589-596. doi:10.1183/09031936.00092311.
34. Stamm J a, Risbano MG, Mathier M a. Overview of current therapeutic approaches for pulmonary hypertension. *Pulm. Circ.* 2011;1(2):138-59. doi:10.4103/2045-8932.83444.
35. Miyamoto S, Nagaya N, Satoh T, et al. Clinical Correlates and Prognostic Significance of Six-minute Walk Test in Patients with Primary Pulmonary Hypertension. (3). doi:10.1164/ajrccm.161.2.9906015.
36. Benza RL, Miller DP, Gomberg-Maitland M, et al. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). *Circulation* 2010;122(2):164-72. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.898122.
37. Gall H, Felix JF, Schneck FK, et al. The Giessen Pulmonary Hypertension Registry: Survival in pulmonary hypertension subgroups. *J. Hear. Lung Transplant.* 2017;36(9):957-967. doi:10.1016/j.healun.2017.02.016.
38. McLaughlin V V., Gaine SP, Howard LS, et al. Treatment Goals of Pulmonary Hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013;62(25):D73-D81. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.034.
39. Group CW. Long-Term Oxygen Therapy for Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): An Evidence-Based Analysis. 2012;12(7):1-64.
40. Johnson SR, Mehta S, Granton JT. Anticoagulation in pulmonary arterial hypertension: a qualitative systematic review. *Eur. Respir. J.* 2006;28(5):999-1004. doi:10.1183/09031936.06.00015206.
41. Barst RJ, Gibbs JSR, Ghofrani HA, et al. Updated evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;54(1 Suppl):S78-84. doi:10.1016/j.jacc.2009.04.017.
42. Taichman DB, Ornelas J, Chung L, et al. Pharmacological Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension in Adults: CHEST Guideline. *Chest* 2014. doi:10.1378/chest.14-0793.

43. Sommer N, Richter MJ, Tello K, et al. Update pulmonary arterial hypertension: Definitions, diagnosis, therapy. *Internist* 2017. doi:10.1007/s00108-017-0301-5.
44. Sitbon O, Humbert M, Jaïs X, et al. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2005;111(23):3105-11. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.488486.
45. Klose H, Opitz C, Bremer H, et al. [Targeted therapy of pulmonary arterial hypertension (PAH)]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2014;139 Suppl:S142-50. doi:10.1055/s-0034-1387489.
46. Galiè N, Ghofrani H, Torbicki A. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. ... *Engl. J. ...* 2005:2148-2157. Available at: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa050010>. Accessed January 2, 2015.
47. Oudiz RJ, Brundage BH, Galiè N, et al. Tadalafil for the treatment of pulmonary arterial hypertension: a double-blind 52-week uncontrolled extension study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012;60(8):768-74. doi:10.1016/j.jacc.2012.05.004.
48. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 1992;327(2):70-5. doi:10.1056/NEJM199207093270202.
49. Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, et al. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 2002;347(5):322-9. doi:10.1056/NEJMoa020204.
50. Trial P, Simonneau G, Barst RJ, et al. Continuous Subcutaneous Infusion of Treprostinil , a Prostacyclin Analogue , in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. 1999. doi:10.1164/rccm.2106079.
51. Morrison K, Studer R, Ernst R, Haag F, Kausser K, Clozel M. Differential effects of Selexipag [corrected] and prostacyclin analogs in rat pulmonary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012;343(3):547-55. doi:10.1124/jpet.112.197152.
52. Rosanio S, Pelliccia F, Gaudio C, Greco C, Keylani AM, D'Agostino DC. Pulmonary arterial hypertension in adults: novel drugs and catheter ablation techniques show promise? Systematic review on pharmacotherapy and interventional strategies. *Biomed Res. Int.* 2014;2014:743868. doi:10.1155/2014/743868.
53. Sitbon O, Channick R, Chin KM, et al. Selexipag for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N. Engl. J. Med.* 2015;373(26):2522-2533. doi:10.1056/NEJMoa1503184.
54. Said K. Riociguat: PATENT-1 Study. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2014;2014(2):31-5. doi:10.5339/gcsp.2014.21.
55. Ghofrani H-A, Galiè N, Grimminger F, et al. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(4):330-40. doi:10.1056/NEJMoa1209655.
56. Simonneau G, D'Armini AM, Ghofrani H-A, et al. Predictors of long-term outcomes in patients treated with riociguat for chronic thromboembolic pulmonary hypertension: data from the CHEST-2 open-label, randomised, long-

- term extension trial. *Lancet Respir. Med.* 2016;4(5):372-380. doi:10.1016/S2213-2600(16)30022-4.
57. Morsolini M, Boffini M, Paciocco G, Corsico AG, Solidoro P. Pulmonary endarterectomy: the lancet first, tears for pills. *Minerva Med.* 2014;105(5):7-13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25396687>. Accessed December 29, 2014.
 58. Andreassen AK, Ragnarsson A, Gude E, Geiran O, Andersen R. Balloon pulmonary angioplasty in patients with inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Heart* 2013;99(19):1415-20. doi:10.1136/heartjnl-2012-303549.
 59. Fuentes-Arderiu X. What is a biomarker? It's time for a renewed definition. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013;51(9):1689-1690. doi:10.1515/cclm-2013-0240.
 60. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001;69(3):89-95. doi:10.1067/mcp.2001.113989.
 61. Majkić-Singh N. What is a Biomarker? From its Discovery to Clinical Application. *J. Med. Biochem.* 2011;30(3):186-192. doi:10.2478/v10011-011-0029-z.
 62. Nickel N, Kempf T, Tapken H, et al. Growth differentiation factor-15 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008;178(5):534-541. doi:10.1164/rccm.200802-235OC.
 63. Tiede SL, Wassenberg M, Christ K, et al. Biomarkers of tissue remodeling predict survival in patients with pulmonary hypertension. *Int. J. Cardiol.* 2016;223:821-826. doi:10.1016/j.ijcard.2016.08.240.
 64. Pidgeon GB, Richards AM, Nicholls MG, Espiner EA, Yandle TG, Frampton C. Differing Metabolism and Bioactivity of Atrial and Brain Natriuretic Peptides in Essential Hypertension. *Hypertension* 1996;27(4):906-913. doi:10.1161/01.HYP.27.4.906.
 65. Nagaya N, Nishikimi T, Okano Y, et al. Plasma Brain Natriuretic Peptide Levels Increase in Proportion to the Extent of Right Ventricular Dysfunction in Pulmonary Hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998;31(1):202-208. doi:10.1016/S0735-1097(97)00452-X.
 66. Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, et al. Plasma Brain Natriuretic Peptide as a Prognostic Indicator in Patients With Primary Pulmonary Hypertension. *Circulation* 2000;102(8):865-870. doi:10.1161/01.CIR.102.8.865.
 67. Leuchte HH, El Nounou M, Tuerpe JC, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and renal insufficiency as predictors of mortality in pulmonary hypertension. *Chest* 2007;131(2):402-409. doi:10.1378/chest.06-1758.
 68. Brunner F, Brás-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol. Ther.* 2006;111(2):508-31. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.11.001.
 69. Strachan FE, Spratt JC, Wilkinson IB, Johnston NR, Gray G a., Webb DJ. Systemic Blockade of the Endothelin-B Receptor Increases Peripheral Vascular Resistance in Healthy Men. *Hypertension* 1999;33(1):581-585.

doi:10.1161/01.HYP.33.1.581.

70. Bhandari SS, Davies JE, Struck J, Ng LL. Plasma C-terminal proEndothelin-1 (CTproET-1) is affected by age, renal function, left atrial size and diastolic blood pressure in healthy subjects. *Peptides* 2014;52:53-7. doi:10.1016/j.peptides.2013.12.001.
71. Jankowska E a, Filippatos GS, von Haehling S, et al. Identification of chronic heart failure patients with a high 12-month mortality risk using biomarkers including plasma C-terminal pro-endothelin-1. *PLoS One* 2011;6(1):e14506. doi:10.1371/journal.pone.0014506.
72. Silva Marques J, Martins SR, Calisto C, et al. An exploratory panel of biomarkers for risk prediction in pulmonary hypertension: emerging role of CT-proET-1. *J. Heart Lung Transplant.* 2013;32(12):1214-21. doi:10.1016/j.healun.2013.06.020.
73. Lador F, Soccia PM, Sitbon O. Biomarkers for the prognosis of pulmonary arterial hypertension: Holy Grail or flying circus? *J. Heart Lung Transplant.* 2014;33(4):341-3. doi:10.1016/j.healun.2013.12.012.
74. Sandoval Y, Apple FS, Smith SW. High-sensitivity cardiac troponin assays and unstable angina. *Eur. Hear. J. Acute Cardiovasc. Care* 2016. doi:10.1177/2048872616658591.
75. Hakemi EU, Alyousef T, Dang G, Hakmei J, Doukky R. The Prognostic Value of Undetectable Highly Sensitive Cardiac Troponin I in Patients with Acute Pulmonary Embolism. *Chest* 2014. doi:10.1378/chest.14-0700.
76. Heresi G a, Tang WHW, AYTEKIN M, Hammel J, Hazen SL, Dweik R a. Sensitive cardiac troponin I predicts poor outcomes in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 2012;39(4):939-44. doi:10.1183/09031936.00067011.
77. Zhang C-Y, Ma L-L, Wang L-X. Relationship between serum uric acid levels and ventricular function in patients with idiopathic pulmonary hypertension. *Exp. Clin. Cardiol.* 2013;18(1):e37-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3716500>. Accessed January 12, 2015.
78. Rhodes CJ, Wharton J, Boon R a., et al. Reduced microRNA-150 is associated with poor survival in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013;187:294-302. doi:10.1164/rccm.201205-0839OC.
79. Brock M, Trenkmann M, Gay RE, et al. Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type ii through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circ. Res.* 2009;104:1184-1191. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.197491.
80. Nickel N, Jonigk D, Kempf T, et al. GDF-15 is abundantly expressed in plexiform lesions in patients with pulmonary arterial hypertension and affects proliferation and apoptosis of pulmonary endothelial cells. *Respir. Res.* 2011;12(1):62. doi:10.1186/1465-9921-12-62.
81. Rhodes CJ, Wharton J, Howard LS, Gibbs JSR, Wilkins MR. Red cell distribution width outperforms other potential circulating biomarkers in predicting survival in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Heart* 2011;97:1054-1060. doi:10.1136/hrt.2011.224857.

82. Tiede SL, Gall H, Dörr O, et al. New potential diagnostic biomarkers for pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 2015;46(5):1390-1396. doi:10.1183/13993003.00187-2015.
83. Lemke G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013;5. doi:10.1101/cshperspect.a009076.
84. O'Bryan JP, Frye R a, Cogswell PC, et al. Axl, a Transforming Gene Isolated From Primary Human Myeloid Leukemia Cells, Encodes a Novel Receptor Tyrosine Kinase. *Mol. Cell. Biol.* 1991;11(10):5016-5031. doi:10.1128/MCB.11.10.5016.Updated.
85. Axelrod H, Pienta KJ. Axl as a mediator of cellular growth and survival. *Oncotarget* 2014;5(19):8818-52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4253401&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
86. Uehara S, Gotoh K, Handa H, Maki Y. Plasma Levels of Growth Arrest Specific Protein (Gas6) and the Soluble Form of Its Tyrosine Kinase Receptor Axl (sAxl) in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *J. Cancer Ther.* 2013;04(April):632-639. doi:10.4236/jct.2013.42079.
87. Mudduluru G, Leupold JH, Stroebel P, Allgayer H. PMA up-regulates the transcription of Axl by AP-1 transcription factor binding to TRE sequences via the MAPK cascade in leukaemia cells. *Biol. Cell* 2010;103(1):21-33. doi:10.1042/BC20100094.
88. Costa M, Bellosta P, Basilico C. Cleavage and release of a soluble form of the receptor tyrosine kinase ARK in vitro and in vivo. *J. Cell. Physiol.* 1996;168(3):737-744. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199609)168:3<737::AID-JCP27>3.0.CO;2-U.
89. Nagata K, Ohashi K, Nakano T, et al. Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 1996;271(47):30022-30027. doi:10.1074/jbc.271.47.30022.
90. Bellosta P, Costa M, Lin D a, Basilico C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15(2):614-625.
91. Seitz HM, Camenisch TD, Lemke G, Earp HS, Matsushima GK. Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *J. Immunol.* 2007;178(9):5635-5642. doi:178/9/5635 [pii].
92. Rothlin C V., Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB a, Lemke G. TAM Receptors Are Pleiotropic Inhibitors of the Innate Immune Response. *Cell* 2007;131(6):1124-1136. doi:10.1016/j.cell.2007.10.034.
93. Konishi A, Aizawa T, Mohan A, Korshunov V a., Berk BC. Hydrogen Peroxide Activates the Gas6-Axl Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* 2004;279(27):28766-28770. doi:10.1074/jbc.M401977200.
94. D'Arcangelo D, Ambrosino V, Giannuzzo M, Gaetano C, Capogrossi MC. Axl receptor activation mediates laminar shear stress anti-apoptotic effects in human endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 2006;71(4):754-763.

- doi:10.1016/j.cardiores.2006.06.002.
95. Ruan G-X, Kazlauskas A. Axl is essential for VEGF-A-dependent activation of PI3K/Akt. *EMBO J.* 2012;31(7):1692-1703. doi:10.1038/emboj.2012.21.
 96. Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, et al. Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J. Clin. Invest.* 2005;115(2):237-46. doi:10.1172/JCI22079.
 97. Healy a M, Schwartz JJ, Zhu X, Herrick BE, Varnum B, Farber HW. Gas 6 promotes Axl-mediated survival in pulmonary endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2001;280(6):L1273-81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11350808>.
 98. Korshunov V a., Daul M, Massett MP, Berk BC. Axl Mediates Vascular Remodeling Induced by Deoxycorticosterone Acetate Salt Hypertension. *Hypertension* 2007;50(6):1057-1062. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.096289.
 99. Korshunov V a. Axl, A Receptor Tyrosine Kinase, Mediates Flow-Induced Vascular Remodeling. *Circ. Res.* 2006;98(11):1446-1452. doi:10.1161/01.RES.0000223322.16149.9a.
 100. Melaragno MG, Fridell YW, Berk BC. The Gas6/Axl system: a novel regulator of vascular cell function. *Trends Cardiovasc. Med.* 1999;9(8):250-3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11094334>.
 101. Stenhoff J, Dahlbäck B, Hafizi S. Vitamin K-dependent Gas6 activates ERK kinase and stimulates growth of cardiac fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;319(3):871-878. doi:10.1016/j.bbrc.2004.05.070.
 102. Liu Y-W, Yang Q-F, Zuo P-Y, Xiao C-L, Chen X-L, Liu C-Y. Elevated Serum Levels of Soluble Axl in Acute Coronary Syndrome. *Am. J. Med. Sci.* 2015;349(2):124-129. doi:10.1097/MAJ.0000000000000362.
 103. Battle M, Recarte-Pelz P, Roig E, et al. AXL receptor tyrosine kinase is increased in patients with heart failure. *Int. J. Cardiol.* 2014;173(3):402-409. doi:10.1016/j.ijcard.2014.03.016.
 104. Xu J, Ma F, Yan W, et al. Identification of the soluble form of tyrosine kinase receptor Axl as a potential biomarker for intracranial aneurysm rupture. *BMC Neurol.* 2015;15(1):23. doi:10.1186/s12883-015-0282-8.
 105. Ekman C, Site DF, Gottsäter A, Lindblad B, Dahlbäck B. Plasma concentrations of growth arrest specific protein 6 and the soluble form of its tyrosine kinase receptor Axl as markers of large abdominal aortic aneurysms. *Clin. Biochem.* 2010;43(1-2):110-114. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.07.025.
 106. Gustafsson A, Martuszevska D, Johansson M, et al. Differential Expression of Axl and Gas6 in Renal Cell Carcinoma Reflecting Tumor Advancement and Survival. *Clin. Cancer Res.* 2009;15(14):4742-4749. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2514.
 107. Lee M-J, Johansson G, Peng P-C, et al. Soluble AXL: A Possible Circulating Biomarker for Tumor Burden in Neurofibromatosis type 1 (P4.245). *Neurology* 2015;84(14_Supplement):P4.245-. doi:10.1371/journal.pone.0115916.

108. Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol. Cell. Biol.* 1993;13(8):4976-4985. doi:10.1128/MCB.13.8.4976.Updated.
109. Robins RS, Lemarié C a, Laurance S, et al. Vascular Gas6 contributes to thrombogenesis and promotes tissue factor up-regulation after vessel injury in mice. *Blood* 2013;121(4):692-9. doi:10.1182/blood-2012-05-433730.
110. Wu K-S, Hung Y-J, Lee C-H, Hsiao F-C, Hsieh P-S. The Involvement of GAS6 Signaling in the Development of Obesity and Associated Inflammation. *Int. J. Endocrinol.* 2015;2015:1-7. doi:10.1155/2015/202513.
111. Hsieh C-H, Chung R-H, Lee W-J, et al. Effect of Common Genetic Variants of Growth Arrest-Specific 6 Gene on Insulin Resistance, Obesity and Type 2 Diabetes in an Asian Population. *PLoS One* 2015;10(8):e0135681. doi:10.1371/journal.pone.0135681.
112. Studer RA, Opperdoes FR, Nicolaes GAF, Mulder B. Understanding the functional difference between growth arrest-specific protein 6 and protein S : an evolutionary approach. 2014.
113. Van Der Meer JHM, Van Der Poll T, Van't Veer C. TAM receptors, Gas6, and protein S: Roles in inflammation and hemostasis. *Blood* 2014;123(16):2460-2469. doi:10.1182/blood-2013-09-528752.
114. Lee IJ, Hilliard B, Swami A, et al. Growth arrest-specific gene 6 (Gas6) levels are elevated in patients with chronic renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2012;27(11):4166-4172. doi:10.1093/ndt/gfs337.
115. Angelillo-Scherrer a, de Frutos P, Aparicio C, et al. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat. Med.* 2001;7(2):215-21. doi:10.1038/84667.
116. Lew ED, Oh J, Burrola PG, et al. Differential TAM receptor-ligand-phospholipid interactions delimit differential TAM bioactivities. *Elife* 2014;3:1-23. doi:10.7554/eLife.03385.
117. HASANBASIC I, RAJOTTE I, BLOSTEIN M. The role of gamma-carboxylation in the anti-apoptotic function of gas6. *J. Thromb. Haemost.* 2005;3(12):2790-2797. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01662.x.
118. Kirane A, Ludwig KF, Sorrelle N, et al. Warfarin Blocks Gas6-Mediated Axl Activation Required for Pancreatic Cancer Epithelial Plasticity and Metastasis. *Cancer Res.* 2015;75(18):3699-3705. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2887-T.
119. Goudie A, Elder D, Deshmukh H, Szwejkowski BR, Lang CC, George J. Effect of warfarin on survival in patients with concomitant left ventricular systolic dysfunction and pulmonary hypertension: a population cohort study. *Eur. J. Heart Fail.* 2015;17(1):90-97. doi:10.1002/ejhf.199.
120. Laurance S, Lemarié CA, Blostein MD. Growth Arrest-Specific Gene 6 (gas6). *Am. Soc. Nutr. Adv. Nutr.* 2012;3:196-203. doi:10.3945/an.111.001826.Supported.
121. Balogh I. Analysis of Gas6 in Human Platelets and Plasma. *Arterioscler.*

- Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25(6):1280-1286. doi:10.1161/01.ATV.0000163845.07146.48.
122. Tjwa M, Bellido-Martin L, Lin Y, et al. Gas6 promotes inflammation by enhancing interactions between endothelial cells, platelets, and leukocytes. *Blood* 2008;111(8):4096-4105. doi:10.1182/blood-2007-05-089565.impairs.
 123. Sainaghi PP, Alciato F, Carneletto S, et al. Gas6 evaluation in patients with acute dyspnea due to suspected pulmonary embolism. *Respir. Med.* 2009;103(4):589-594. doi:10.1016/j.rmed.2008.10.018.
 124. Lee CH, Shieh YS, Tsai CS, Hung YJ, Tsai YT, Lin CY. Plasma concentrations predict aortic expression of growth-arrest-specific protein 6 in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *PLoS One* 2013;8(11):1-8. doi:10.1371/journal.pone.0079452.
 125. Gibot S, Massin F, Cravoisy A, et al. Growth arrest-specific protein 6 plasma concentrations during septic shock. *Crit. Care* 2007;11(1):R8. doi:10.1186/cc5158.
 126. Ekman C, Jonsen a., Sturfelt G, et al. Plasma concentrations of Gas6 and sAxl correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2011;50(6):1064-1069. doi:10.1093/rheumatology/keq459.
 127. Chen CH, Chen HC, Chang CC, et al. Growth arrest-specific 6 Protein in patients with sj??gren syndrome: Determination of the plasma level and expression in the labial salivary gland. *PLoS One* 2015;10(10):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0139955.
 128. Jiang T, Liu G, Wang L, Liu H. Elevated Serum Gas6 Is a Novel Prognostic Biomarker in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One* 2015;10(7):e0133940. doi:10.1371/journal.pone.0133940.
 129. Buehler M, Tse B, Leboucq A, et al. Meta-analysis of microarray data identifies gas6 expression as an independent predictor of poor survival in ovarian cancer. *Biomed Res. Int.* 2013;2013. doi:10.1155/2013/238284.
 130. Holland SJ, Pan A, Franci C, et al. R428, a Selective Small Molecule Inhibitor of Axl Kinase, Blocks Tumor Spread and Prolongs Survival in Models of Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res.* 2010;70(4):1544-1554. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2997.
 131. Smolock EM, Korshunov V a. Pharmacological inhibition of Axl affects smooth muscle cell functions under oxidative stress. *Vascul. Pharmacol.* 2010;53(3-4):185-192. doi:10.1016/j.vph.2010.07.002.
 132. Espindola MS, Habel DM, Narayanan R, et al. Targeting of TAM Receptors Ameliorates Fibrotic Mechanisms in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2018;rccm.201707-1519OC. doi:10.1164/rccm.201707-1519OC.
 133. Ye X, Li Y, Stawicki S, et al. An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies. *Oncogene* 2010;29(38):5254-5264. doi:10.1038/onc.2010.268.
 134. Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clin. Chem.. 51, Nr. 12, 2005, S. 2415-8* 2005;2418:2415-

2418. doi:10.1373/clinchem.2005.051532.
135. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Stryer Biochemie 7. Auflage*. Berlin, Heidelberg: Imprint: Springer Spektrum, 2013.; 2013.
 136. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*. London: Chapman and Hall/CRC; 1990.
 137. Ziegler A, Lange S, Bender R. Überlebenszeitanalyse: Die Cox-Regression. (17):42-44. doi:10.1055/s-2007-959039.
 138. Ewout S. *Clinical Prediction Models*. Springer-Verlag New York; 2009. doi:10.1007/978-0-387-77244-8.
 139. EKMAN C, STENHOFF J, DAHLBÄCK B. Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood. *J. Thromb. Haemost.* 2010;8(4):838-844. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03752.x.
 140. Hung Y-J, Lee C-H, Shieh Y-S, Hsiao F-C, Lin F-H, Hsieh C-H. Gender differences in plasma growth arrest-specific protein 6 levels in adult subjects. *Clin. Chim. Acta* 2015;441:1-5. doi:10.1016/j.cca.2014.12.001.
 141. Clauser S, Peyrard S, Gaussem P, et al. Development of a Novel Immunoassay for the Assessment of Plasma Gas6 Concentrations and Their Variation with Hormonal Status. *Clin. Chem.* 2007;53(10):1808-1813. doi:10.1373/clinchem.2007.089102.
 142. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al. Pulmonary Arterial Hypertension in France. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006;173(9):1023-1030. doi:10.1164/rccm.200510-1668OC.
 143. Ishimoto Y, Ohashi K, Mizuno K, Nakano T. Promotion of the Uptake of PS Liposomes and Apoptotic Cells by a Product of Growth Arrest-Specific Gene, gas6. *J. Biochem* 2000;127(3):411-417. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022622.
 144. Lu Q. Homeostatic Regulation of the Immune System by Receptor Tyrosine Kinases of the Tyro 3 Family. *Science (80-.)*. 2001;293(5528):306-311. doi:10.1126/science.1061663.
 145. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998;41(7):1241-1250. doi:10.1002/1529-0131(199807)41:7<1241::AID-ART15>3.0.CO;2-H.
 146. Akdogan A, Kilic L, Dogan I, et al. Pulmonary Hypertension in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Clin. Rheumatol.* 2013;19(8):421-425. doi:10.1097/RHU.0000000000000037.
 147. Humbert M, Monti G, Brenot F, et al. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(5):1628-1631. doi:10.1164/ajrccm.151.5.7735624.
 148. Geraci MW, Moore M, Gesell T, et al. Gene Expression Patterns in the Lungs of Patients With Primary Pulmonary Hypertension: A Gene Microarray Analysis. *Circ. Res.* 2001;88(6):555-562. doi:10.1161/01.RES.88.6.555.

149. Rosenkranz S, Lang I, Blindt R, et al. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen: Empfehlungen der Kölner Konsensus-Konferenz 2016. *DMW - Dtsch. Medizinische Wochenschrift* 2016;141(S 01):S48-S56. doi:10.1055/s-0042-114522.
150. Lorenz CH, Walker ES, Morgan VL, et al. Normal Human Right and Left Ventricular Mass , Systolic Function , and Gender Differences by Cine Magnetic Resonance Imaging Normal Human Right and Left Ventricular Mass , Systolic Function , and Gender Differences by Cine Magnetic Resonance Imaging. 2009;6647. doi:10.3109/10976649909080829.
151. Ishikawa M, Sonobe M, Nakayama E, et al. Higher Expression of Receptor Tyrosine Kinase Axl, and Differential Expression of its Ligand, Gas6, Predict Poor Survival in Lung Adenocarcinoma Patients. *Ann. Surg. Oncol.* 2013;20(S3):467-476. doi:10.1245/s10434-012-2795-3.
152. Pullamsetti SS, Kojonazarov B, Storn S, et al. Lung cancer-associated pulmonary hypertension: Role of microenvironmental inflammation based on tumor cell-immune cell cross-talk. *Sci. Transl. Med.* 2017;9(416):eaai9048. doi:10.1126/scitranslmed.aai9048.
153. Hehlmann R, Lauseker M, Saußebe S, et al. Assessment of imatinib as first-line treatment of chronic myeloid leukemia: 10-year survival results of the randomized CML study IV and impact of non-CML determinants. *Leukemia* 2017;31(11):2398-2406. doi:10.1038/leu.2017.253.
154. Frost AE, Barst RJ, Hooper MM, et al. Long-term safety and efficacy of imatinib in pulmonary arterial hypertension. *J. Hear. Lung Transplant.* 2015;34(11):1366-1375. doi:10.1016/j.healun.2015.05.025.
155. Shen Y, Chen X, He J, Liao D, Zu X. Axl inhibitors as novel cancer therapeutic agents. *Life Sci.* 2018;198(February):99-111. doi:10.1016/j.lfs.2018.02.033.

9 Anhang

9.1 Verwendete Materialien sAxl

- DuoSet® Ancillary Reagent Kit 2 (Catalog Number: DY008)
 - ELISA Plate-Coating Buffer (Part: 896036)
 - Reagent Diluent Concentrate 2 (10x) (Part: 841380)
 - Stop Solution (Part: 895926)
 - Color Reagent A (Part: 895000)
 - Color Reagent B (Part: 895001)
 - Wash Buffer Concentrate (Part: 895003)
 - Clear Microplates (Part: Keine Angabe)
 - ELISA Plate Sealers
- DuoSet® ELISA DEVELOPMENT SYSTEM (Catalog Number: DY154)
 - Human Axl Capture Antibody (Part: 841007)
 - Human Axl Detection Antibody (Part: 841008)
 - Human Axl Standard (Part: 841009)
 - Streptavidin-HRP (Part: 890803)

9.2 Verwendete Materialien Gas6

- DuoSet® Ancillary Reagent Kit 2 (Catalog Number: DY008), siehe Kapitel 9.1.
- Human Gas6 Antibody (Catalog Number AB885; R&D Systems)
- DuoSet® ELISA DEVELOPMENT SYSTEM (Catalog Number: DY885)
 - Human Gas6 Capture Antibody (Part: 841489), **wurde nicht verwendet!**
 - Human Gas6 Detection Antibody (Part: 841490)
 - Human Gas6 Standard (Part: 841491)
 - Streptavidin-HRP (Part: 890803)

9.3 **Amendment zum Ethikantrag**

JUSTUS-LIEBIG

UNIVERSITÄT
GIESSEN

FACHBEREICH 11



MEDIZIN

Ethik-Kommission, Klinikstr. 32 (Alte Frauenklinik), D-35385 GießenProf. Dr. A. Ghofrani
Med. Klinik II
Pneumologie
Klinikstr. 33
35385 Gießen**ETHIK-KOMMISSION
am Fachbereich Medizin
Vorsitz: Prof. H. Tillmanns**Klinikstr. 32 (Alte Frauenklinik)
D-35385 Gießen
Tel.: (0641)99-42470 / 47660
ethik.kommission@pharma.med.uni-giessen.deGießen, 2. Februar 2016
Dr. Kr./erb

AZ.: 100/13

Titel: Biomarker für die pulmonale Hypertonie.

Amendment vom 19. Januar 2016 bzgl. Messung weiterer potentieller BiomarkerSehr geehrter Herr Prof. Ghofrani, *lieber Ken Ghofrani*

die oben genannten Unterlagen wurden gemeinsam mit einem weiteren Mitglied der Kommission, Herrn Apotheker Brumhard, am 28.01.2016 besprochen. Die Ethik-Kommission hat keine Einwände und stimmt dem Amendment zu.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. H. Tillmanns
Vorsitzender der Ethik-Kommission

9.4 Sonstiges

Tabelle 20 Verteilung der unterschiedlichen Messgrößen im Gas6 Kollektiv. Die Tabelle gibt Mittelwerte(\pm SD) für SMWD, MPAP, PAWP, HZV, CI, PVR, die Gas6-Plasmakonzentration und Gas6-Plasmakonzentration innerhalb der WHO-FC 2-4 an. Außerdem die Stichprobengrößen der Verstorbenen und Überlebenden (Verstorben (nein)/ja) bis April 2015, den Stichprobenumfang der weiblichen bzw. männlichen Patienten, den Stichprobenumfang der Patienten innerhalb der Diagnosegruppen und den Stichprobenumfang der Probanden, bei denen eine Erhebung der klinischen Parameter möglich war. Jede Spalte bezieht sich dabei auf die spezifische Diagnosegruppe. Die Angabe von Mittelwert und Standardabweichung war bezogen auf die WHO FC IV Ausschluss nicht möglich, da nur ein Patient in die Stichprobe einbezogen war. (N = Stichprobengröße), (M(\pm SD) = Mittelwert \pm Standardabweichung), (* nach Exklusion der Gruppe Ausschluss).

Gas6						
Diagnosegruppen→	IPAH	CTD	CTEPH	PVH	Ausschluss	Gesamt-kollektiv
N Gesamtkollektiv	38	38	38	28	37	179
SMWD M(\pmSD) in m	346,34(\pm 124,143)	303,18(\pm 128,583)	297,79(\pm 114,943)	321,48(\pm 95,017)	315,48(\pm 105,964)	317,57(\pm 116,68)
N SMWD	38	33	33	21	23	148
MPAP M(\pmSD) in mmHg	47,13(\pm 13,731)	43,03(\pm 11,159)	40,92(\pm 9,454)	38,89(\pm 10,001)	18,19(\pm 3,836)	37,67(\pm 14,44)
N MPAP	38	38	38	28	37	179
PAWP M(\pmSD) in mmHg	7,8158(\pm 2,73965)	7,3684(\pm 3,36453)	9,3158(\pm 4,02093)	17,2857(\pm 6,31199)	8,2973(\pm 3,96418)	9,62(\pm 5,282)
N PAWP	38	38	38	28	37	179
HZV M(\pmSD) in l/min	4,1111(\pm 1,39243)	4,1953(\pm 1,01533)	4,3658(\pm 1,18874)	4,9329(\pm 1,24296)	5,2322(\pm 1,28030)	4,54(\pm 1,293)
N HZV	38	38	38	28	37	179
CI M(\pmSD) in l/min/m²	2,2184(\pm 0,68074)	2,3713(\pm 0,56283)	2,2503(\pm 0,56815)	2,5986(\pm 0,59543)	2,7686(\pm 0,62302)	2,43(\pm 0,638)
N CI	38	38	38	28	37	179
PVR M(\pmSD) in dyn·s/cm⁵	892,88(\pm 518,796)	749,76(\pm 379,047)	605,53(\pm 269,802)	387,50(\pm 231,639)	155,11(\pm 57,923)	569,94(\pm 424,5)
N PVR	38	38	38	28	37	179
ln(Gas6) M(\pmSD)	9,5162(\pm 0,30781)	9,5836(\pm 0,26818)	9,4760(\pm 0,29025)	9,6210(\pm 0,24751)	9,5967(\pm 0,35311)	9,5595(\pm 0,29951)
N ln(Gas6)	38	38	38	28	37	179
(N Female)/N Male	(24)/14	(33)/5	(16)/22	(15)/13	(24)/13	(112)/67
WHO FC II (N) M(\pmSD) des ln(Gas6)	(13) 9,3739(\pm 0,34611)	(4) 9,4554(\pm 0,24277)	(10) 9,3969(\pm 0,31844)	(11) 9,5468(\pm 0,15496)	(6) 9,4699(\pm 0,29770)	*(38) 9,4386(\pm 0,28326)
WHO FC III (N) M(\pmSD) des ln(Gas6)	(23) 9,6130(\pm 0,26026)	(22) 9,6045(\pm 0,25706)	(22) 9,5186(\pm 0,27684)	(14) 9,7069(\pm 0,29376)	(20) 9,5500(\pm 0,30564)	*(81) 9,6013(\pm 0,27201)
WHO FC IV (N) M(\pmSD) des ln(Gas6)	(2) 9,3283(\pm 0,16926)	(11) 9,5619(\pm 0,30507)	(5) 9,3356(\pm 0,14778)	(3) 9,4919(\pm 0,19746)	(1)	*(21) 9,4758(\pm 0,25970)
N Verstorben (nein)/ja	(27)/11	(20)/18	(30)/8	(18)/10	(28)/9	(123)/56

Tabelle 21 Verteilung der unterschiedlichen Messgrößen im sAxl Kollektiv. Die Tabelle gibt Mittelwerte(\pm SD) für SMWD, MPAP, PAWP, HZV, CI, PVR, sAxl-Plasmakonzentration und sAxl-Plasmakonzentration innerhalb der WHO-FC 2-4 an. Außerdem die Stichprobengrößen der Verstorbenen und Überlebenden (Verstorben (nein)/ja) bis April 2015, den Stichprobenumfang der weiblichen bzw. männlichen Patienten, den Stichprobenumfang der Patienten innerhalb der Diagnosegruppen und den Stichprobenumfang der Probanden, bei denen eine Erhebung der klinischen Parameter möglich war. Jede Spalte bezieht sich dabei auf die spezifische Diagnosegruppe. Die Angabe von Mittelwert und Standardabweichung war bezogen auf die WHO FC IV Ausschluss und IPAH nicht möglich, da der Stichprobenumfang zu klein war. (N = Stichprobengröße), (M(\pm SD) = Mittelwert \pm Standardabweichung), (* nach Exklusion der Gruppe Ausschluss).

sAxl						
Diagnosegruppen→	IPAH	CTD	CTEPH	PVH	Ausschluss	Gesamt-kollektiv
N Gesamtkollektiv	36	35	34	25	37	167
SMWD M(\pmSD) in m	356,94(\pm 120,566)	309,17(\pm 132,787)	307,37(\pm 122,090)	317,05(\pm 95,238)	349,67(\pm 119,556)	328,69(\pm 120,549)
N SMWD	36	30	30	20	21	137
MPAP M(\pmSD) in mmHg	47,47(\pm 15,814)	42,31(\pm 11,169)	40,56(\pm 9,705)	38,96(\pm 9,685)	17,84(\pm 3,912)	37,14(\pm 15,120)
N MPAP	36	35	34	25	37	167
PAWP M(\pmSD) in mmHg	7,9722(\pm 2,86343)	7,1143(\pm 3,31460)	9,4879(\pm 4,27655)	17,7600(\pm 6,14600)	8,2703(\pm 3,54063)	9,6323(\pm 5,30053)
N PAWP	36	35	34	25	37	167
HZV M(\pmSD) in l/min	4,1228(\pm 1,34547)	4,3043(\pm 0,88433)	4,3818(\pm 1,19223)	4,9192(\pm 1,22274)	5,2616(\pm 1,34920)	4,5851(\pm 1,27500)
N HZV	36	35	34	25	37	167
CI M(\pmSD) in l/min/m²	2,2508(\pm 0,66869)	2,4337(\pm 0,50580)	2,2888(\pm 0,52309)	2,5772(\pm 0,57397)	2,7854(\pm 0,65794)	2,4642(\pm 0,61957)
N CI	36	35	34	25	37	167
PVR M(\pmSD) in dyn·s/cm⁵	883,40(\pm 522,724)	697,69(\pm 314,836)	584,94(\pm 285,704)	382,40(\pm 237,398)	150,19(\pm 52,855)	546,27(\pm 414,359)
N PVR	36	35	34	25	37	167
sAxl M(\pmSD) in pg/ml	24902,78(\pm 9374,123)	24128,77(\pm 5679,522)	22504,74(\pm 6297,355)	26274,52(\pm 5592,221)	24758,54(\pm 7239,063)	24698,32(\pm 7033,116)
N sAxl	36	35	34	25	37	167
(N Female)/N Male	(24)/12	(30)/5	(14)/20	(14)/11	(23)/14	(105)/62
WHO FC II (N)	(13)	(3)	(9)	(10)	(6)	*(35)
M(\pmSD) von sAxl in pg/ml	22956,00(\pm 7379,811)	23495,00(\pm 5846,165)	21390,44(\pm 5589,836)	26128,20(\pm 6658,583)	21972,33(\pm 4378,837)	23505,97(\pm 6606,297)
WHO FC III (N)	(22)	(22)	(19)	(12)	(19)	*(75)
M(\pmSD) von sAxl in pg/ml	26115,14(\pm 10552,797)	23471,23(\pm 4623,426)	22328,95(\pm 6121,317)	25804,58(\pm 5347,277)	23933,58(\pm 5935,090)	24330,73(\pm 7319,901)
WHO FC IV (N)		(9)	(5)	(3)		*(18)
M(\pmSD) von sAxl in pg/ml	(1)	25112,56(\pm 7934,169)	21996,63(\pm 5690,449)	28642,00(\pm 2942,270)	(0)	24670,44(\pm 6347,170)
N Verstorben (nein)/ja	(25)/11	(18)/17	(27)/7	(17)/8	(29)/8	(116)/51

Tabelle 22 Zusammenfassung aller Korrelationen im sAxI und Gas6 Gesamtkollektiv. Korrelationen innerhalb der einzelnen Diagnosegruppen sind nicht aufgelistet. Die rot unterlegten Zellen beziehen sich ausschließlich auf das Gas6 Kollektiv. Die grau unterlegten Zellen beziehen sich nur auf das sAxI Kollektiv. Signifikante Korrelationen wurden fett formatiert.

Gas6 Kollektiv				sAxI Kollektiv							
				mPAP	PAWP	HZV	CI	PVR	SMWD		
PVR	Korrelation nach Pearson	-0,066		-0,093	,202	0,072	0,051	-0,134	-0,034	Korrelation nach Pearson	sAxI
	Signifikanz (2-seitig)	0,463		0,290	0,021	0,413	0,563	0,128	0,719	Signifikanz (2-seitig)	
	N	125		130	130	130	130	130	116	N	
CI	Korrelation nach Pearson	0,145	-,663		-0,044	-,420	-,435	,831	0,027	Korrelation nach Pearson	MPAP
	Signifikanz (2-seitig)	0,107	0,000		0,622	0,000	0,000	0,000	0,773	Signifikanz (2-seitig)	
	N	125	142		130	130	130	130	116	N	
HZV	Korrelation nach Pearson	0,113	-,695	,919		,256	0,161	-,350	-0,137	Korrelation nach Pearson	PAWP
	Signifikanz (2-seitig)	0,210	0,000	0,000		0,003	0,068	0,000	0,142	Signifikanz (2-seitig)	
	N	125	142	142		130	130	130	116	N	
PAWP	Korrelation nach Pearson	-0,134	-,311	0,135	,196		,885	-,664	0,005	Korrelation nach Pearson	HZV
	Signifikanz (2-seitig)	0,137	0,000	0,108	0,020		0,000	0,000	0,956	Signifikanz (2-seitig)	
	N	125	142	142	142		130	130	116	N	
MPAP	Korrelation nach Pearson	-0,071	,814	-,474	-,423	0,011		-,628	0,037	Korrelation nach Pearson	CI
	Signifikanz (2-seitig)	0,433	0,000	0,000	0,000	0,896		0,000	0,694	Signifikanz (2-seitig)	
	N	125	142	142	142	142		130	116	N	
In (Gas6)	Korrelation nach Pearson	-0,105	0,061	-,166	-0,116	,230	0,157		0,032	Korrelation nach Pearson	PVR
	Signifikanz (2-seitig)	0,244	0,472	0,049	0,171	0,006	0,062		0,735	Signifikanz (2-seitig)	
	N	125	142	142	142	142	142		116	N	
		SMWD	PVR	CI	HZV	PAWP	MPAP				

Tabelle 23 Gas6 Übersicht über diagnostische Gruppen. Angegeben sind p-Werte, der Korrelationskoeffizient ($r =$), die HR und das dazugehörige KI. Signifikante Ergebnisse sind farblich hinterlegt. (Cox = Cox-Regression, ÜL = Überleben, Q = Quartil).

Diagnosegruppe→ Fragestellung↓	IPAH	CTD	CTEPH	PVH	Gesamtkollektiv Gas6
WHO FC Vorhersagepotential	p = 0,039	p = 0,435	p = 0,413	p = 0,289	p = 0,015
Verteilung über Geschlechter	p = 0,067	p = 0,967	p = 0,122	p = 1,000	p = 0,723
Korrelation Gas6 mit mPAP	p = 0,324; r= 0,164	p = 0,151; r= 0,238	p = 0,535; r= 0,104	p = 0,169; r= 0,267	p = 0,062; r = 0,157
Korrelation Gas6 mit PAWP	p = 0,009; r=0,419	p = 0,700; r= 0,065	p = 0,186; r= 0,219	p = 0,203; r= 0,248	p = 0,006; r = 0,230
Korrelation Gas6 mit HZV	p = 0,895; r= -0,022	p = 0,023; r=-0,369	p = 0,253; r= -0,190	p = 0,777; r= -0,056	p = 0,171; r = -0,116
Korrelation Gas6 mit CI	p = 0,385; r= -0,145	p = 0,010; r=-0,412	p = 0,130; r= -0,250	p = 0,915; r= -0,021	p = 0,049; r = -0,166
Korrelation Gas6 mit PVR	p = 0,837; r= -0,035	p = 0,028; r= 0,357	p = 0,643; r= 0,078	p = 0,519; r= 0,127	p = 0,472; r = 0,061
Korrelation Gas6 mit SMWD	p = 0,576; r= -0,094	p = 0,990; r= 0,002)	p = 0,433; r= -0,141	p = 0,049; r= -0,435	p = 0,244; r = -0,105
Gas6 ÜL Quartile	p = 0,596	p = 0,943	p = 0,038	p = 0,080	p = 0,037
Gas6 TTCW Quartile	p = 0,212	p = 0,701	p = 0,239	p = 0,010	p = 0,017
ÜL kontinuierlich, univariat	p = 0,140; HR = 4,564; 95% KI für HR = 0,607-34,317	p = 0,900; HR = 1,121; 95% KI für HR = 1,90-6,593	p = 0,073; HR = 7,813; 95% KI für HR = 0,826-73,942	p = 0,005; HR = 94,655; 95% KI für HR = 3,943-2272,280	p = 0,002; HR = 4,379; 95% KI für HR = 1,717-11,173
ÜL Q1 vs. Q4 univariat (Cox)	p = 0,208; HR = 0,230; 95% KI für HR = 0,023-2,263	p = 0,876; HR = 0,878; 95% KI für HR = 0,170-4,539	p = 0,111; HR = 0,159; 95% KI für HR = 0,017-1,529	p = 0,223; HR = 0,253; 95% KI für HR = 0,028-2,314	p = 0,008; HR = 0,250; 95% KI für HR = 0,09-0,69
ÜL Q2 vs. Q4 univariat (Cox)	p = 0,630; HR = 0,671; 95% KI für HR = 0,132-3,404	p = 0,705; HR = 1,249; 95% KI für HR = 0,395-3,945	p = 0,184; HR = 0,216; 95% KI für HR = 0,022-2,077	p = 0,086; HR = 0,225; 95% KI für HR = 0,041-1,237	p = 0,247; HR = 0,648; 95% KI für HR = 0,310-1,352
ÜL Q3 vs. Q4 univariat (Cox)	p = 0,821; HR = 0,831; 95% KI für HR = 0,167-4,128	p = 0,667; HR = 1,336; 95% KI für HR = 0,357-4,997	p = 0,528; HR = 1,678; 95% KI für HR = 0,336-8,395	p = 0,041; HR = 0,206; 95% KI für HR = 0,045-0,934	p = 0,649; HR = 0,841; 95% KI für HR = 0,400-1,771
ÜL univariat, dichotomisiert (Cox)	p = 0,293; HR = 1,993; 95% KI für HR = 0,551-7,209	p = 0,977; HR = 0,987; 95% KI für HR = 0,391-2,489	p = 0,019; HR = 6,829; 95% KI für HR = 1,375-33,907	p = 0,483; HR = 1,633; 95% KI für HR = 0,415-6,418	p = 0,021; HR = 2,013; 95% KI für HR = 1,112-3,643
ÜL multivariat, kontinuierlich (Cox)	p = 0,210; HR = 8,583; 95% KI für HR = 0,299-246,618	p = 0,057; HR = 0,041; 95% KI für HR = 0,002-1,097	nicht möglich	p = 0,255; HR = 195,206; 95% KI für HR = 0,022-1704613,193	p = 0,013; HR = 4,734; 95% KI für HR = 1,384-16,198
ÜL multivariat, dichotomisiert (Cox)	p = 0,283; HR = 3,106; 95% KI für HR = 0,392-24,613	p = 0,159; HR = 0,359; 95% KI für HR = 0,087-1,492	nicht möglich	p = 0,499; HR = 0,466; 95% KI für HR = 0,051-4,260	p = 0,116; HR = 1,747; 95% KI für HR = 0,871-3,508)
TTCW univariat, kontinuierlich (Cox)	p = 0,301; HR = 2,065; 95% KI für HR = 0,523-8,153	p = 0,722; HR = 1,260; 95% KI für HR = 0,353-4,505	p = 0,039; HR = 5,558; 95% KI für HR = 1,093-28,256	p = 0,002; HR = 88,726; 95% KI für HR = 5,532-1423,079	p = 0,005; HR = 2,845; 95% KI für HR = 1,377-5,875

Tabelle 24 sAxI Übersicht über diagnostische Gruppen. Angegeben sind p-Werte, der Korrelationskoeffizient (r =), die HR und das dazugehörige KI. Signifikante Ergebnisse sind farblich hinterlegt. (Cox = Cox-Regression, ÜL = Überleben, Q = Quartil).

Diagnosegruppe→ Fragestellung↓	IPAH	CTD	CTEPH	PVH	Gesamtkollektiv sAxI
WHO FC Vorhersagepotential	p = 0,719	p = 0,921	p = 0,889	p = 0,749	p = 0,763
Verteilung über Geschlechter	p = 0,728	p = 0,421	p = 0,931	p = 0,536	p = 0,643
Korrelation sAxI mit mPAP	p = 0,341; r=0,163	p = 0,745; r= 0,057	p = 0,206; r= -0,222	p = 0,805; r= 0,052	p = 0,290; r= -0,093
Korrelation sAxI mit PAWP	p = 0,085; r=0,291	p = 0,309; r= 0,177	p = 0,283; r= 0,190	p = 0,562; r= 0,122	p = 0,021; r= 0,202
Korrelation sAxI mit HZV	p = 0,703; r= 0,066	p = 0,453; r= -0,131	p = 0,217; r=0,217	p = 0,928; r= -0,019	p = 0,413; r= 0,072
Korrelation sAxI mit CI	p = 0,994; r= 0,001	p = 0,265; r= -0,194	p = 0,106; r= 0,282	p = 0,864; r= 0,036	p = 0,563; r= 0,051
Korrelation sAxI mit PVR	p = 0,276; r= -0,187	p = 0,639; r= 0,082	p = 0,059; r= -0,328	p = 0,810; r= 0,051	p = 0,128; r= -0,134
Korrelation sAxI mit SMWD	p = 0,584; r= -0,094	p = 0,809; r= 0,046	p = 0,506; r= -0,126	p = 0,944; r= 0,017	p = 0,719; r= -0,034
sAxI ÜL Quartile	p = 0,075	p = 0,995	p = 0,881	p = 0,318	p = 0,496
sAxI TTCW Quartile	p = 0,913	p = 0,852	p = 0,822	p = 0,526	p = 0,920
ÜL kontinuierlich, univariat	p = 0,999; HR = 1,000; 95% KI für HR = 1,000-1,000	p = 0,450; HR = 1,000; 95% KI für HR = 1,000-1,000	p = 0,331; HR = 1,000; 95% KI für HR = 1,000-1,000	p = 0,706; HR = 1,000; 95% KI für HR = 1,000-1,000	p = 0,472; HR = 1; 95% KI für HR = 1-1
ÜL Q1 vs. Q4 univariat (Cox)	p = 0,157; HR = 0,249; 95% KI für HR = 0,036-1,711	p = 0,810; HR = 0,803; 95% KI für HR = 0,134-4,823	p = 0,599; HR = 0,524; 95% KI für HR = 0,047-5,820	p = 0,134; HR = 9,149; 95% KI für HR = 0,506-165,495	p = 0,362; HR = 0,625; 95% KI für HR = 0,227-1,71
ÜL Q2 vs. Q4 univariat (Cox)	p = 0,843; HR = 1,183; 95% KI für HR = 0,223-6,269	p = 0,944; HR = 0,944; 95% KI für HR = 0,189-4,715	p = 0,914; HR = 0,882; 95% KI für HR = 0,091-8,590	p = 0,618; HR = 1,781; 95% KI für HR = 0,185-17,184	nicht signifikant
ÜL Q3 vs. Q4 univariat (Cox)	p = 0,064; HR = 0,095; 95% KI für HR = 0,008-1,146	p = 0,917; HR = 0,917; 95% KI für HR = 0,182-4,626	p = 0,576; HR = 0,452; 95% KI für HR = 0,028-7,294	p = 0,299; HR = 3,375; 95% KI für HR = 0,340-33,517	nicht signifikant
ÜL univariat, dichotomisiert (Cox)	p = 0,557; HR = 0,683 95% KI für HR = 0,192-2,434	p = 0,919; HR = 1,051; 95% KI für HR = 0,404-2,730	p = 0,899; HR = 0,899; 95% KI für HR = 0,174-4,651	p = 0,938; HR = 0,947; 95% KI für HR = 0,237-3,788	p = 0,982; HR = 0,993; 95% KI für HR = 0,543-1,817
ÜL multivariat, kontinuierlich (Cox)	p = 0,956; HR = 1,000; 95% KI für HR = 1,000-1,000	p = 0,440; HR = 1; 95% KI für HR = 1,000-1,000	p = 0,326; HR = 1,000; 95% KI für HR = 1,000-1,000	p = 0,786; HR = 1,000; 95% KI für HR = 1,000-1,000	p = 0,792; HR = 1,00; 95% KI für HR = 1-1
ÜL multivariat, dichotomisiert (Cox)	p = 0,703; HR = 0,764; 95% KI für HR = 0,192-3,038	p = 0,747; HR = 0,806; 95% KI für HR = 0,218-2,986	p = 0,936; HR = 0,898; 95% KI für HR = 0,067-12,103	p = 0,516; HR = 1,926; 95% KI für HR = 0,266-13,933	p = 0,913; HR = 1,04; 95% KI für HR = 0,515-2,099
TTCW univariat, kontinuierlich (Cox)	p = 0,474; HR = 1,000; 95% KI für HR = 1,000,-1,000	p = 0,443; HR = 1,000; 95% KI für HR = 1,000-1,000	p = 0,634; HR = 1,000; 95% KI für HR = 1,000-1,000	p = 0,935; HR = 1,000; 95% KI für HR = 1,000-1,000	p = 0,170; HR = 1,00; 95% KI für HR = 1-1

Tabelle 25 Übersicht Axl Inhibitoren mit Indikation und Entwicklungsstand. AML = Akute myeloische Leukämie, GIST = Gastrointestinale Stromatumoren, NSCLC = Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, ZNS = Zentrales Nervensystem. In Anlehnung an ^{85,155}.

Name der Substanz	Indikation	Phase der klinischen Studie
R428	Brustkrebs, AML, NSCLC	Phase I/II
DP3975	Brustkrebs, AML, NSCLC	Präklinisch
NA80x1	Brustkrebs, AML, NSCLC	Präklinisch
YW327.6S2	Brustkrebs, AML, NSCLC	Präklinisch
GL21.T	Brustkrebs, AML, NSCLC	Präklinisch
BMS-777607 (ASLAN002)	Fortgeschrittene und metastasierte Tumoren	Phase I
NPS-1034	NSCLC mit Resistenzen gegen EGFR-Tyrosinkinase Inhibitoren	Präklinisch
Cabozantinib	NSCLC, Prostatakarzinom, Nierenkrebs, Schilddrüsenkrebs und weitere Tumoren	Zugelassen für medulläres Schilddrüsenkarzinom
TP-0903	Chronisch Lymphatische Leukämie	Präklinisch
Foretinib	Lungenkrebs, Nierenkarzinom und weitere Tumoren	Phase II
Merestinib	Glioblastom, Ovarialkarzinom, Lungenkrebs	Phase I
LDC1267	Fortgeschrittene und metastasierte Tumoren	Präklinisch
Bosutinib	Verschiedene Tumoren	Zugelassen bei Chronisch Myeloischer Leukämie
Gilteritinib	Akute Myeloische Leukämie	Phase I/II
SGI-7079	Lungenkrebs	Präklinisch
Crizotinib	NSCLC mit ZNS-Metastasen	Zugelassen bei NSCLC
Amuvatinib	Solide Tumoren	Phase II
UNC2025	Melanom	Präklinisch
S49076	Magenkarzinom, Lungenkrebs, Darmkrebs	Phase I
Sunitinib	Nierenkrebs, GIST, Neuroendokrine Tumoren	Zugelassen u.a. bei Nierenkrebs
RXDX-106	Verschiedene Tumoren	Präklinisch

Erklärung zur Dissertation

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

Feldler, 11. 04. 2019 

Ort, Datum Unterschrift

Danksagung

Auch wenn es sich bei der Verfassung einer wissenschaftlichen Arbeit um die Leistung einer einzelnen Person handelt, so wurde diese erst ermöglicht auf dem Boden von Freiheit, Sicherheit und Sorglosigkeit.

Mein Dank gilt zuerst meiner Familie, die mich fürsorglich auf meinem Weg durch das Studium begleitet hat. Auch danke ich meinen engen Freunden, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein besonderer Dank gilt zudem meinen Betreuern für Anregungen, Rat und viel Geduld.