

Zusammenfassung Dissertation

Bedeutung von Osteopontin bei chronisch thromboembolischer pulmonaler Hypertonie

Eine gesteigerte Expression von Osteopontin (OPN), einem nicht-strukturellen Protein der Extrazellulärmatrix, wurde bei entzündlichen Prozessen und fibrotischem Gewebsumbau beobachtet. Mit dieser translationalen Promotionsarbeit sollte die Hypothese überprüft werden, ob OPN als Mediator von Entzündungsreaktionen und fibrotischem Umbau an der Entwicklung einer chronischen thromboembolischen pulmonalen Hypertonie (CTEPH) nach akuter Lungenembolie (LE) beteiligt sein könnte. Dafür wurden OPN-Plasmakonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten in venösen Blutproben in einem prospektiven Patientenkollektiv mit akuter LE und in einem prospektiven Patientenkollektiv mit CTEPH mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) gemessen. Zudem wurden während Pulmonaler Endarterektomie (PEA) chirurgisch gewonnene CTEPH-Gewebeproben sowie experimentell durch Ligation der Vena cava inferior induzierte Mausthromben verschiedenen Alters mit (immun-)histochemischen Methoden auf das Vorhandensein von OPN untersucht.

Zum Zeitpunkt der Aufnahme zur Durchführung einer PEA hatten CTEPH-Patienten (n=70) höhere OPN-Plasmakonzentrationen (106,9 [IQR; 75,6-155,9] ng/ml) als Patienten zum Aufnahmezeitpunkt mit akuter LE (n=119; 90,4 [53,3-123,9] ng/ml; $p < 0,001$) und zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung nach sechs Monaten (n=90; 55,1 [36,8-76,9] ng/ml; $p < 0,001$). Auch im Vergleich zu gemessenen OPN-Plasmaspiegeln bei gesunden Referenzkohorten zeigten sich diese bei LE- und CTEPH-Patienten erhöht. Von 90 LE-Patienten, die an der klinischen Nachuntersuchung teilnahmen, wurden sechs Patienten (5,0%) mit einer CTEPH diagnostiziert. Diese Patienten hatten bei Aufnahme mit akuter LE niedrigere OPN-Plasmakonzentrationen als LE-Patienten, bei denen keine CTEPH diagnostiziert wurde (51,8 [28,7-70,1] vs. 94,3 [54,7-125,9] ng/ml; $p = 0,049$). LE-Patienten mit OPN-Plasmakonzentrationen $< 55,0$ ng/ml bei Aufnahme hatten ein 15,2-fach erhöhtes Risiko für die Diagnose einer CTEPH innerhalb von sechs Monaten (95% CI, 1,7-135,5, $p = 0,015$). In der Grenzwertoptimierungskurve zeigte sich eine Fläche unter der Kurve von 0,74 (95%-

KI: 0,56-0,92) für OPN Plasmakonzentrationen gemessen bei Patienten mit akuter LE im Hinblick auf die Diagnosestellung einer CTEPH während der Nachbeobachtungsperiode von 6 Monaten.

Bei den immunhistochemischen Analysen verschiedener Areale der CTEPH-Gewebeproben (histologisch klassifiziert als: frischer Thrombus, organisierender Thrombus, Myofibroblasten-reichte Areale, gefäßreiche Areale, profibrotische Areale und Fibrose) und den zu verschiedenen Zeitpunkten (3, 7, 14, 21 Tage nach Induktion) gewonnenen Mausthromben ließen sich OPN und weiterer Marker in unterschiedlichem Ausmaß mit spezifischen Antikörpern detektieren. In den CTEPH-Gewebeproben fand sich die stärkste Färbung für OPN und sein Downstream-target Matrix-Metalloproteinase (MMP)-9 vorrangig in Myofibroblasten-reichen (13,0 [9,2-19,6] % und 4,4 [1,4-8,5] %) und profibrotischen Arealen (9,9 [6,8-26,5] % und 8,8 [3,4-14,3] %). Zudem konnte in der Immunfluoreszenz eine Co-Expression von OPN und *alpha smooth muscle actin* in Endothelzellen und Myofibroblasten nachgewiesen werden. In frischen CTEPH-Thromben ließ sich kaum eine positive Anfärbung für OPN (0,6 [0,4-1,0] %) und MMP-2 (0,1 [0,0-0,9] %) detektieren, wohingegen sich die frühe Phase der Thrombusauflösung im Mausmodell durch eine verstärkte Anfärbung für OPN (6,1 [2,1-10,0] %; $p < 0,001$) und MMP-2 (4,6 [2,2-7,1] %; $p < 0,001$) auszeichnete.

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse der Promotionsarbeit Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von OPN an der Pathogenese der CTEPH. Ob sich OPN als Biomarker für die Vorhersage der Diagnose einer CTEPH nach akuter LE etablieren lässt und ob ein Kausalzusammenhang zwischen OPN und der Pathogenese der CTEPH besteht, muss in weiteren Studien mit größerer Fallzahl untersucht werden und könnte damit Gegenstand der zukünftigen Forschung sein.

Teile dieser Dissertation wurden in *Thromb Haemost.* 2019 Aug;119(8):1332-1346. doi: 10.1055/s-0039-1692174 veröffentlicht: Kölmel S, Hobohm L, Käberich A, Krieg V, Bochenek ML, Wenzel P, Wiedenroth CB, Liebetrau C, Haßenfuß G, Mayer E, Konstantinides S, Schäfer K, Guth S, Lankeit M. *Potential involvement of osteopontin in inflammatory and fibrotic processes in pulmonary embolism and chronic thromboembolic pulmonary hypertension.* PMID: 31183846 DOI: 10.1055/s-0039-1692174.

Summary Doctoral Thesis

Importance of Osteopontin in chronic thromboembolic pulmonary hypertension

Osteopontin (OPN) is a non-structural protein of the extracellular matrix and its upregulated expression has been detected and described in inflammation and fibrotic tissue remodeling. With this translational doctoral thesis, we aimed to investigate if OPN as a mediator of inflammation and fibrotic remodeling might contribute to the development of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) after acute pulmonary embolism (PE). Therefore, OPN plasma concentrations were measured with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) at different time points in venous blood samples in a prospective cohort of patients with acute PE and in a prospective cohort with patients diagnosed with CTEPH. Furthermore, OPN was measured by (immuno)histochemistry in tissue material obtained from CTEPH patients during pulmonary endarterectomy (PEA) and in murine venous thrombi of different age induced by subtotal ligation of the inferior vena cava.

At the timepoint of PEA; CTEPH patients (n=70) had higher OPN plasma concentrations (median, 106.9 [IQR, 75.6-155.9]) compared to PE patients presenting with acute PE (n=119; 90.4 [53.3-123.9] ng/ml, p=0.001) and compared to PE patients at 6-month follow-up (n=90; 55.1 [36.8-76.9] ng/ml; p<0.001). OPN plasma concentrations in PE and CTEPH patients were also elevated compared to OPN plasma concentrations measured in healthy individuals. From 90 PE patients completing 6-month follow-up, six patients (5.0%) were diagnosed with CTEPH. Interestingly, these patients had lower OPN levels on admission for acute PE compared to patients who were not diagnosed with CTEPH during follow-up (51.8 [28.7-70.1] vs. 94.3 [54.7-125.9] ng/ml, p=0.049). PE patients with OPN plasma concentrations <55.0 ng/ml on admission had a 15.2-fold increased risk for the diagnosis of CTEPH during follow-up (95% CI, 1.7-135.5, p=0.015). Receiver operating characteristics (ROC) analysis illustrated an area under the curve (AUC) of 0.74 (95% CI, 0.56-0.92) for OPN on admission regarding a diagnosis of CTEPH during follow-up.

In the CTEPH tissue material (histologically classified as: fresh thrombus, organizing thrombus, myofibroblast-rich area, vessel-rich area, profibrosis and fibrosis) and murine thrombi (harvested on day 3, 7, 14 or 21 after ligation), OPN and other markers were observed in varying intensity in an immunohistochemical approach with different antibodies. In CTEPH tissue material OPN- and matrix-metalloproteinase (MMP)-9-positive cells were predominantly present in myofibroblast-rich (13.0 [9.2-19.6] % and 4.4 [1.4-8.5] %) and profibrotic areas (9.9 [6.8-26.5] % and 8.8 [3.4-14.3] %). Confocal microscopy revealed co-expression of OPN in alpha smooth muscle actin-positive endothelium and myofibroblasts. In fresh thrombi of CTEPH tissue material OPN and MMP-2 were almost absent (0.6 [0.4-1.0] %) and MMP-2 (0.1 [0.0-0.9] %) whereas early stages of murine thrombus resolution were characterized by high numbers of OPN- and MMP-2-positive cells (6.1 [2.1-10.0] %; $p < 0.001$) und MMP-2 (4.6 [2.2–7.1] %; $p < 0.001$).

In conclusion, the results of this doctoral thesis point to a possible involvement of OPN in the pathogenesis of CTEPH. To determine whether OPN might evolve as a relevant prognostic biomarker for the prediction of CTEPH after acute PE and whether OPN has a causative effect in the pathogenesis of CTEPH, further studies and bigger case counts are needed and could therefore be subject to future research.

Parts of this doctoral thesis were published in *Thromb Haemost.* 2019 Aug;119(8):1332-1346. doi: 10.1055/s-0039-1692174: Kölmel S, Hobohm L, Käberich A, Krieg V, Bochenek ML, Wenzel P, Wiedenroth CB, Liebetrau C, Haßenfuß G, Mayer E, Konstantinides S, Schäfer K, Guth S, Lankeit M. *Potential involvement of osteopontin in inflammatory and fibrotic processes in pulmonary embolism and chronic thromboembolic pulmonary hypertension.* PMID: 31183846 DOI: 10.1055/s-0039-1692174.