

Schlussbericht

Deutsches Zentrum für Lungenforschung (DZL)

Standort: Translational Lung Research Center Heidelberg

Partner: Thoraxklinik am Universitätsklinikum Heidelberg

Förderkennzeichen: 82DZLB44A2

Förderperiode: 1.07.2019 – 31.12.2020

DZL Klinische Studie: Pilotstudie – Assoziation zwischen der Expression von BMPR2 und dem Eisenstoffwechsel bei Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie

Autoren: Christina Eichstaedt, Ekkehard Grünig

Gefördert durch



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



Baden-Württemberg

MINISTERIUM FÜR WISSENSCHAFT, FORSCHUNG UND KUNST

Schlussbericht 2019-2020

Zuwendungsempfänger: Thoraxklinik am Universitätsklinikum Heidelberg

Förderkennzeichen: 82DZLB44A2

Vorhabenbezeichnung:

Association between *BMPR2* mutations and iron metabolism in pulmonary arterial hypertension patients (AMIA)

Assoziation zwischen der Expression von *BMPR2* und dem Eisenstoffwechsel bei Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie

Laufzeit des Vorhabens: 01.07.2019 – 31.12.2020

I. Kurze Darstellung des Vorhabens

1.1. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Das Ziel der Pilotstudie ist die Prüfung der Machbarkeit sowie die Generierung von ersten Daten zur Rolle des Eisenstoffwechsels bei pulmonal-arterieller Hypertonie (PAH), um damit zu einer besseren Therapie des Eisenmangels bei PAH beizutragen. Es handelt sich hierbei um eine prospektive Querschnittsstudie für 60 idiopathische PAH (IPAH) und 20 hereditäre PAH (HPAH) Patienten mit und ohne eine *BMPR2*-Mutation, die untersucht und mit 30 gesunden Kontrollen verglichen wurden.

Der primäre Endpunkt der Studie war zum einen, die Korrelation der Expression des bei HPAH am häufigsten genetisch veränderten Zelloberflächen-Rezeptors *BMPR2* mit dem Eisenstoffwechsel-Hormon Heparin; zum anderen beinhaltete der primäre Endpunkt den Vergleich der Heparin-Werte zwischen HPAH-, IPAH-Patienten und Kontrollen. Sekundäre Endpunkte beinhalteten den Vergleich von Eisenparametern zwischen HPAH-Patienten mit *BMPR2*-Mutation und IPAH-Patienten ohne *BMPR2*-Mutation sowie Korrelationen zwischen Eisenparametern und klinischen Werten der jeweiligen Gruppen (HPAH, IPAH und Kontrollen).

1.2. Ablauf des Vorhabens

Arbeitspaket 1: Einreichung und Genehmigung des Studienprotokolls bei der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg inklusive Amendment der Studie (Kollektiverweiterung, Querschnittsstudie statt Anwendungsbeobachtung). Das Ziel der Patientenrekrutierung wurde erreicht: 21 HPAH-Patienten mit *BMPR2*-Mutation, 58 IPAH-Patienten ohne *BMPR2*-Mutation und 30 gesunde Kontrollen

Arbeitspaket 2: Dieses Arbeitspaket hätte ein Follow-Up nach 3 Monaten von Patienten umfasst, welche intravenöses Eisen während der klinischen Routine erhalten hatten. Da zur Bestimmung der Eisenparameter zwei weitere Blutröhrchen hätten abgenommen werden müssen, galt dieser Zeitpunkt nach BfArM nicht als Anwendungsbeobachtung sondern als eine Arzneimittelgesetz-Studie. Daher wurde ein Amendment bei der Ethikkommission Heidelberg eingereicht, um diesen Zeitpunkt zu streichen und das Kollektiv von 20 HPAH- und 20 IPAH-Patienten auf 20 HPAH-, 60 IPAH-Patienten und 20 gesunde Kontrollen zu erweitern.

Arbeitspaket 3: Die folgenden Laboruntersuchungen wurden erfolgreich abgeschlossen:

- BMPR2-Protein Niveau-Bestimmung mittels Western Blot aus peripheren, mononukleären Blutzellen; BMPR2-Protein-Expressionsmessung mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) aus Serum
- *BMPR2*-Gen-Expression-Bestimmung im Vollblut (RNA-Isolation, complementary DNA (cDNA) Synthese, quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion)
- ELISA aus Serum für die Protein-Expression von Heparin, BMP2 und BMP6
- Färbung von Lungenschnitten: 10 Kontrollen im Vergleich zu 9 IPAH Patienten und einem Patienten mit HPAH. Erfolgte Färbungen: Eisen (Berliner Blaufärbung); Ferritin-L (Ferritin-L-Antikörper), glatte Muskelzellen (SMA-Antikörper), Makrophagen (CD68-Antikörper).

Arbeitspaket 4: Die Datenanalyse ist bereits weit fortgeschritten und ist in diesem Bericht zum aktuellen Stand zusammengefasst.

1.3. Inhalte und Ergebnisse

1.3.1. Ergebnisse

Insgesamt wurden 115 Probanden in einem Zeitraum von Mai 2019 bis Januar 2020 gescreent. Von diesen wurden 109 Probanden in die Studie eingeschlossen, aufgeteilt in 21 HPAH-Patienten mit *BMPR2*-Mutation, 58 IPAH-Patienten ohne *BMPR2*-Mutation und 30 gesunde Kontrollen.

Die BMPR2-Expression wurde im Serum für Protein und im Vollblut für Boten RNA (mRNA) untersucht. Die mRNA-Expression des BMPR2-Gens zeigte eine klare Reduktion bei BMPR2-Mutationsträgern und eine leichte Reduktion bei IPAH-Patienten ohne BMPR2-Mutation im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($p < 0,0001$).

Die BMPR2-Protein-, BMP2-Protein- und BMP6-Protein Expression gemessen im Serum mittels ELISA wies hingegen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen auf. Eine niedrige BMPR2-mRNA Expression korrelierte zudem signifikant mit

einer schlechteren Leistung des rechten Herzens, gemessen im systolischen pulmonal arteriellen Druck ($p=0,016$) und der Wanddicke des rechten Ventrikels ($p=0,014$). Dieses ist die erste Studie die einen solchen Zusammenhang darstellen konnte.

Die aktuellen Analysen zeigten keinen signifikanten Hecpidin-Proteinniveau-Unterschied gemessen mittels ELISA zwischen den drei Gruppen. Das Hecpidin korrelierte jedoch signifikant mit Ferritin ($p>0.001$), Transferrin ($p=0.005$), dem löslichen Transferrinrezeptor ($p=0.038$) und dem Ferritin-Index ($p=0.002$).

1.3.2. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die gesamte Studie inklusive eisenspezifische Laboruntersuchungen wurde in enger Zusammenarbeit vom PH-Zentrum der Thoraxklinik (TLRC) mit bzw. in der Gruppe von Frau Prof. Martina Muckenthaler (UKHD, TLRC) durchgeführt. Dr. Henning Gall (Justus Liebig Universität Gießen, UGLMC) reichte die Studie ebenfalls bei der zuständigen Ethikkommission ein. Die externen DZL-Standorte Universität Leipzig und Technische Universität Dresden reichten in Kooperation mit Prof. Hans-Jürgen Seyfarth und PD Dr. Michael Halank ebenfalls die Studie bei Ihrer Ethikkommission ein und stellten Proben und Daten von HPAH-Patienten zur Verfügung. Die Sequenzierung auf mögliche Mutationen im *BMP2*-Gen erfolgte am Institut für Humangenetik (UKHD). Eine Vielzahl der Laboruntersuchungen wurde von Dr. Marc Schneider (Thoraxklinik, TLRC) begleitet. Kontrollschnitte zur Erprobung der Färbungen wurden ebenfalls von Dr. Marc Schneider und Prof. Thomas Muley (Thoraxklinik, TLRC) zur Verfügung gestellt. Die Lungenschnitte wurden durch Prof. Danny Jonigk und Prof. Marius Hoepfer (Medizinische Hochschule Hannover, BREATH) bereitgestellt. Eine Auswertung der Schnitte erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Daniel Kazdal am Institut für Pathologie (UKHD, TLRC).

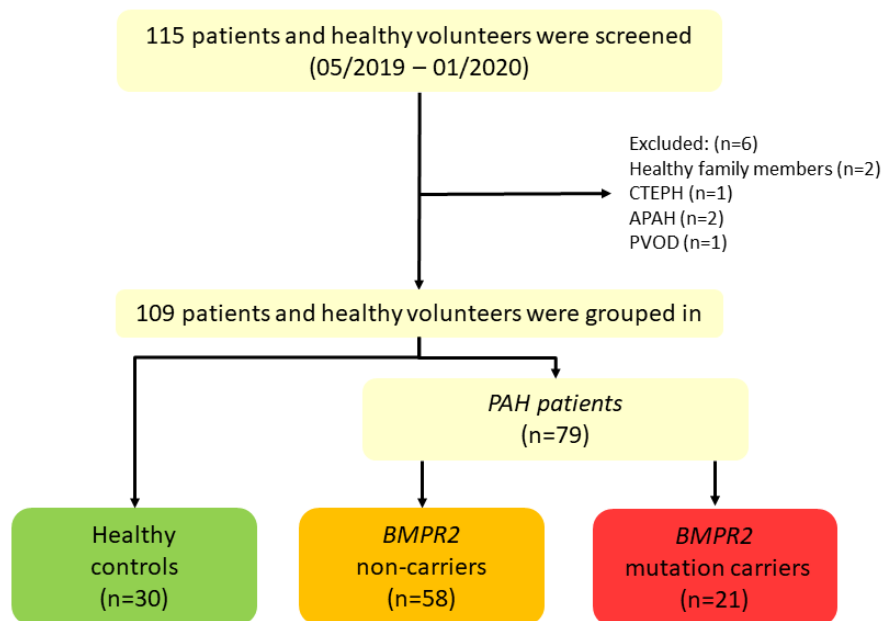
II. Eingehende Darstellung des Vorhabens

2.1. Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Ursprünglich war die Studie als eine Anwendungsbeobachtung zur Gabe von klinisch indizierter, intra-venöser Eisengabe mittels Ferric Carboxymaltose (Ferrinject) geplant. Dieses Vorhaben wurde jedoch von Bundesministerium für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) als Arzneimittelgesetz-Studie gewertet, da zwei zusätzliche Blutröhrchen für Studienzwecke zum Follow-Up Zeitpunkt entnommen werden sollten. Daher wurde im Verlauf der Studie eine Protokoll-Änderung bei der zuständigen Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Heidelberg eingereicht und das Patientenkollektiv von 40 Patienten auf 60 Patienten erweitert und 20 gesunde Kontrollen hinzugefügt.

Studienkohorte

Insgesamt wurden 115 Probanden in einem Zeitraum von Mai 2019 bis Januar 2020 gescreent. Von diesen wurden 109 Probanden in die Studie eingeschlossen, aufgeteilt in 21 HPAH-Patienten mit *BMPR2*-Mutation, 58 IPAH-Patienten ohne *BMPR2*-Mutation und 30 gesunde Kontrollen (siehe Abb. 1). Die gesunden Kontrollen wurden hinsichtlich Alter und Geschlecht passend zu den IPAH Patienten ausgewählt. Aus den DZL-externen PH-Zentren in Leipzig und Dresden wurden insgesamt 7 HPAH-Patienten mit *BMPR2*-Mutationen eingeschlossen. Einschlusskriterien der PAH-Patienten waren: eine mittels Rechts-Herzkatheter gesicherte PAH-Diagnose und optimierte medikamentöse PAH-Therapie, welche über mindestens 2 Monate vor der Studie unverändert geblieben ist. Patienten wurden nicht eingeschlossen bei i.v. Eisengabe im Zeitraum von 2 Monaten vor Studienbeginn, Schwangerschaft, Stillzeit, Komorbiditäten die den Eisenstoffwechsel beeinflussen konnten (hämolytische Anämie, Diabetes, kardiovaskuläre Erkrankungen).



CTEPH: chronisch thromboembolische PH, APAH: assoziierte PAH, PVOD: venookklusive Erkrankung

Abb.1: Flussdiagramm zum Patienten- und Probandeneinschluss

Insgesamt wurden 30 gesunde Kontrollen und 79 PAH-Patienten in die Studie eingeschlossen.

Bei den PAH-Patienten erfolgten neben den klinischen Routine-Untersuchungen von Lungenfunktion, Echokardiographie, 6-Minutengehtest und Standardlaboruntersuchungen auch weitere Messungen zu Eisenparametern. Hcpidin wurde dazu mittels ELISA in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Muckenthaler (UKHD, TLRC) gemessen. Die klinische und eisenspezifischen Patientencharakteristika sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Patientencharakteristika

		All patients		
		mean ± SD or n and (%)		n
Characteristics	Age, years	51.43 ± 15.97		79
	Height, cm	168.50 ± 8.79		78
	Weight, kg	74.01 ± 16.79		78
	Body mass index	26.02 ± 5.56		78
	Sex, female		73,42	79
	Age at diagnosis	41.97 ± 23.51		76
PAH Classification	Idiopathic PAH		73,42	79
	Heritable PAH		26,58	79
Iron storage status	Hepcidin, ng/ml	19.48 ± 18.05		79
	Ferritin, µg/l	92.78 ± 91.89		77
	Transferrin, g/l	2.36 ± 0.42		76
	Iron, µg/dl	14.57 ± 6.83		76
	Transferrin saturation, %	25.85 ± 16.27		68
	Soluble Transferrinrezeptor, mg/l	3.22 ± 1.74		71
	Ferritin-Index	2.00 ± 1.77		70
	Erythrocytes, /pl	4.80 ± 0.49		79
	Haemoglobin, g/dl	14.14 ± 1.46		79
	Hematocrit, l/l	0.42 ± 0.04		79
	MCV, fl	88.57 ± 5.36		79
	MCH, pg	29.61 ± 2.08		79
	MCHC, g/dl	33.37 ± 1.00		79
	Hypochromic erythrocytes, %	1.29 ± 3.20		72
Rbdcw, %	14.09 ± 1.00		79	
Laboratory	Erythropoetin, mU/ml	18.83 ± 25.16		72
	CRP, mg/l	7.01 ± 9.08		76
	Interleukin-6, pg/ml	2.59 ± 3.00		71
	Creatinine, mg/dl	1.12 ± 2.50		79
	Urea, mg/dl	31.69 ± 13.03		78
	Glomerular filtration rate, %	91.72 ± 25.96		79
	NT-proBNP, ng/l	593.28 ± 1003.17		78
Diffusion capacity	DLCO SB, %	61.09 ± 17.55		78
6MWD	6MWD, m	460.42 ± 112.83		78
Echocardiography	Right atrial area, cm ²	17.22 ± 7.61		78
	Right ventricular area, cm ²	18.96 ± 7.02		72
	Systolic pulmonary arterial pressure, mmHg	53.89 ± 27.00		79
	Tricuspid annular plane systolic excursion	3.30 ± 3.90		77
Right heart catheter	Mean pulmonary arterial pressure, mmHg	50.74 ± 14.83		74
	Cardiac output, l/min	4.31 ± 1.21		55
	Pulmonary arterial wedge pressure, mmHg	9.17 ± 3.37		66
	Pulmonary vascular resistance, dynes*sec*cm ⁻¹	849.28 ± 569.81		58

PAH= pulmonary arterial hypertension, MCV= mean corpuscular volume, MCH= mean Corpuscular haemoglobin, MCHC= mean corpuscular haemoglobin concentration, Rbdcw= red cell distribution width, DLCO= diffusion capacity of carbon monoxide, 6MWD= six minute walking distance

Das Kollektiv wurde zudem hinsichtlich eines vorangehenden Eisenmangels charakterisiert (Abb. 2). Bei den eingeschlossenen PAH-Patienten trat bei 80% bereits in der Vergangenheit ein Eisenmangel auf.

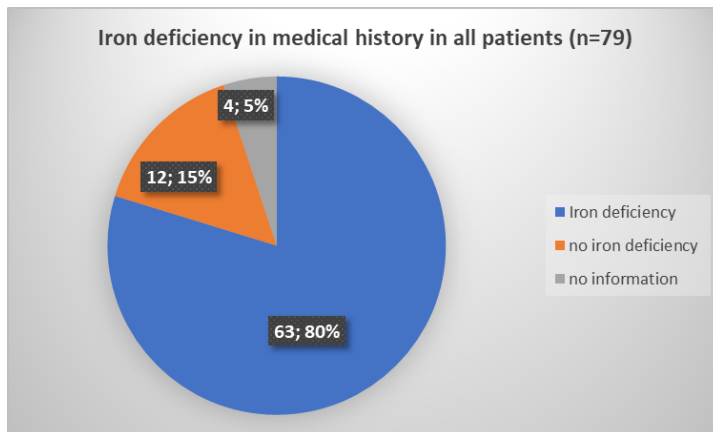


Abb. 2: Eisenmangel in der Krankengeschichte der PAH-Patienten

Insgesamt zeigten 80% der PAH-Patienten einen Eisenmangel in der Vergangenheit (n=63).

Molekulare Messungen

Die *BMPR2*-Expression wurde im Serum für Protein und im Vollblut für Boten RNA (mRNA) untersucht. Die mRNA-Expression des *BMPR2*-Gens zeigte eine klare Reduktion in *BMPR2*-Mutationsträgern und eine leichte Reduktion bei IPAH-Patienten ohne *BMPR2*-Mutation im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($p < 0,0001$), siehe Abb. 3.

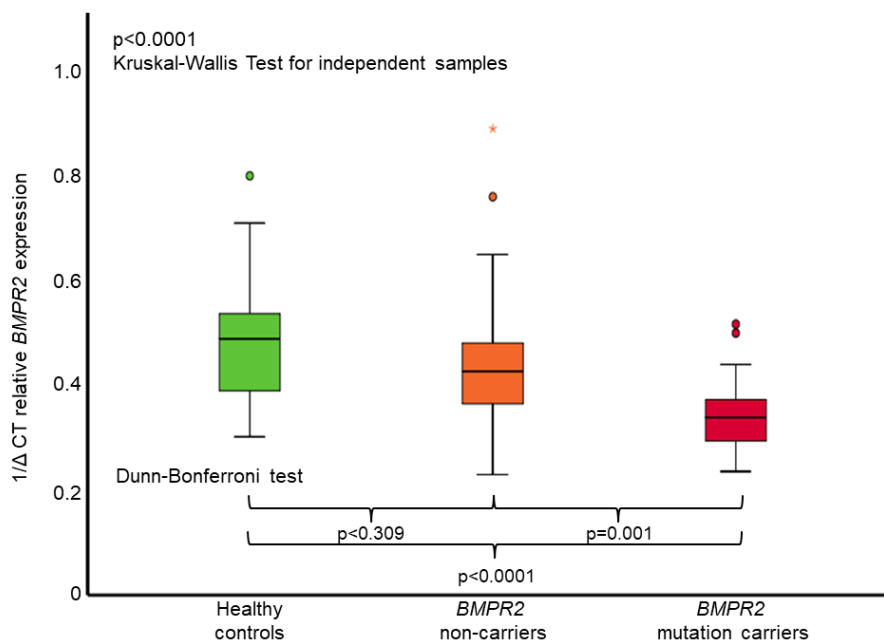


Abb. 3: Vergleich der Expression der Boten-RNA im Vollblut von Kontrollen, IPAH und HPAH-Pateinten
 Es zeigte sich ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Gruppen, gemessen mit quantitativer Polymerase Kettenreaktion.

Die BMPR2 Protein-, BMP2-Protein- und BMP6-Protein Expression gemessen im Serum mittels ELISA wies hingegen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen auf.

Eine niedrige BMPR2-mRNA-Expression korrelierte zudem signifikant mit einer schlechteren Leistung des rechten Herzens, gemessen mit einem erhöhten systolischen pulmonal arteriellen Druck untersucht in der Echokardiographie ($p=0,016$) und dem Rechtsherzkatheter ($p=0,031$). Ebenfalls korrelierte eine größere Wanddicke des rechten Ventrikels ($p=0,014$) mit einer verringerten BMPR2-mRNA-Expression. Dies galt ebenfalls für eine schlechtere körperliche Leistungsfähigkeit gemessen im 6-Minuten Gehstest, der eine verminderte Gehstrecke zeigte (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Korrelation von BMPR2 mRNA-Expression mit klinischen und molekularen Daten

	1/ Δ CT relative <i>BMPR2</i> expression			
	Pearson correlation	R ²	Sig. (2-tailed)	N
Laboratory				
Hematocrit	-.242*	0,059	0,031	79
Urea	-.242*	0,059	0,033	78
Rbdcw	-.226*	0,051	0,045	79
GFR	.329**	0,11	0,003	79
Right heart catheterization				
sPAP	-.269*	0,072	0,031	65
Transthoracic echocardiography				
RV	-.282*	0,08	0,014	76
sPAP	-.271*	0,073	0,016	79
Exercise status				
6MWD	.344**	0,12	0,002	78

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

R² coefficient of determination

Die aktuellen Analysen zeigen keinen signifikanten Hecpidin-Proteinniveau-Unterschied gemessen mittels ELISA zwischen HPAH, IPAH und Kontrollen. Das Hecpidin korrelierte jedoch signifikant mit Ferritin ($p>0.001$), Transferrin ($p=0.005$), dem löslichen Transferrinrezeptor ($p=0.038$) und dem Ferritin-Index ($p=0.002$) in PAH-Patienten.

Daher konnte die initiale Hypothese, dass niedrige BMPR2-Spiegel mit einem erhöhten Hecpidin einhergehen, in unserem Kollektiv nicht bestätigt werden. Es ist möglich, dass eine Hecpidin-Regulierung von anderen Signalwegen außerhalb dem BMPR2-Signalweg

übernommen wird und so die Auswirkungen eines fehlregulierten BMPR2-Signalwegs sich weniger auswirken. Es ist auch möglich, dass eine 2-monatige Pause einer i.v. Gabe von Ferric Carboxymaltose (Ferrinject) nicht ausreichend war, um die Heparin und Eisenwerte nicht mehr zu beeinflussen.

Färbungen von Lungenschnitten

Im Rahmen dieser Studie wurden PAH-Lungengewebeschnitte von 10 PAH-Patienten und 10-Kontrollen der Medizinischen Hochschule Hannover (BREATH, UGMLC) auf Eisen, Makrophagen, glatte Muskelzellen und Ferritin angefärbt. Die statistische Auswertung der Quantifizierungen der Färbungen läuft aktuell noch. Ein Beispiel für eine Eisenfärbung ist in Abb. 4 gezeigt.

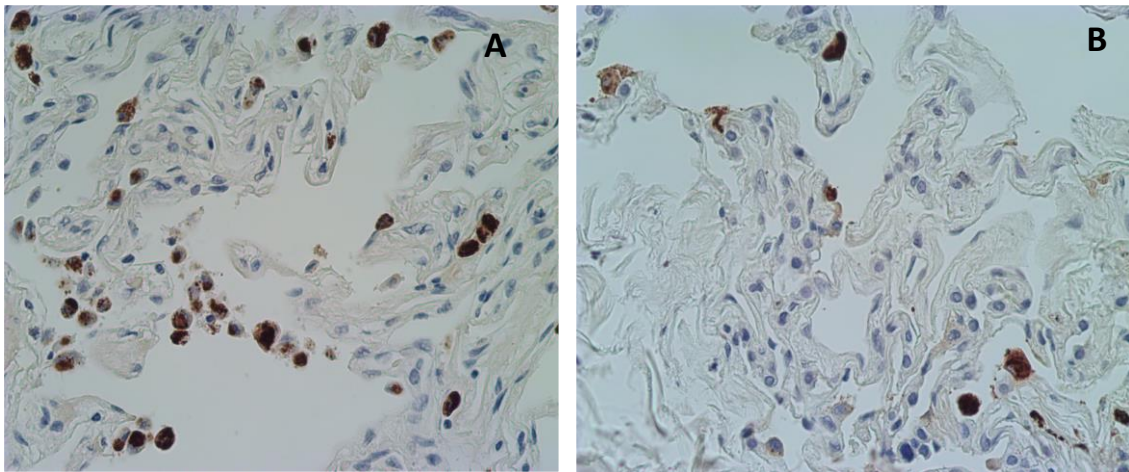


Abb. 4: Eisenfärbung in Lungengewebe von PAH Patient und Kontrolle

Die Eisenfärbung ist verstärkt links bei der Probe des hereditären PAH Patienten zu sehen (A) im Vergleich zum Lungengewebe einer gesunden Kontrolle (B). Die Färbung wurde mit Prussian Blue durchgeführt, Vergrößerung 40x, angefärbte Zellen: alveolare und interstitielle Makrophagen.

2.2. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) ist eine seltene Erkrankung, die durch einen erhöhten Druck der Pulmonalarterien und erhöhten pulmonalen Gefäßwiderstand charakterisiert ist. Dies führt zu Rechtsherzhypertrophie und -versagen und geht mit einer verminderten körperlichen Leistungsfähigkeit, reduzierter Lebensqualität und verschlechterten Prognose einher (Grünig et al. 2016).

Bei Patienten mit einer familiären, oder hereditären Form der pulmonal arteriellen Hypertonie (HPAH) besteht in vielen Fällen eine Mutation des Bone Morphogenetic Protein Rezeptor 2 (*BMPR2*) Gens, die Auswirkungen auf die klinische Symptomatik und

den Verlauf mit signifikant reduzierter 6-Minuten Gehstrecke, höherer WHO-Funktionsklasse, sowie erhöhter Gesamtmortalität haben kann (Evans et al. 2016). Auch bei anderen Formen des Lungenhochdruckes wurde eine verminderte Expression des *BMP2*-Gens beschrieben. Diese besteht im Lungengewebe, selbst dann, wenn keine *BMP2* Mutation vorliegt (Atkinson et al. 2002). Gleichzeitig liegt bei vielen PAH-Patienten ein Eisenmangel vor, dessen Korrektur in den aktuellen Leitlinien empfohlen wird (Galiè et al. 2015).

BMP2 spielt auch beim Eisenstoffwechsel eine Rolle. In einer Studie in 2011 wurde gezeigt, dass PAH-Patienten häufig einen Eisenmangel bei niedrigen Eisenserum-Werten und gleichzeitig erhöhten Werten des Eisenhormons Heparin aufwiesen (Rhodes et al. 2011). Heparin wird, welches die Eisenaufnahme im Darm hemmt, durch den *BMP2*-Signalweg (über *BMP6*) aktiviert (Muckenthaler et al. 2017). Die Auswirkung der *BMP2*-Expressionsrate auf den Eisenstoffwechsel ist jedoch noch nicht geklärt. Eine Eisengabe wird in den aktuellen Leitlinien zur Behandlung der PAH empfohlen, da auch diese die körperliche Belastbarkeit und Lebensqualität der Patienten verbesserte (Galiè et al. 2015).

Daher war das Ziel dieser Pilotstudie die Prüfung der Machbarkeit sowie die Generierung von ersten Daten zur Rolle der *BMP2*-Expressionsrate auf den Eisenstoffwechsel bei pulmonal-arterieller Hypertonie (PAH), um damit zu einer besseren Therapie des Eisenmangels bei PAH beizutragen. Dieses Projekt wurde als medizinische Doktorarbeit von Vivienne Theobald unter Betreuung von Prof. Ekkehard Grünig und PD Dr. Christina Eichstaedt am Zentrum für Pulmonale Hypertonie an der Thoraxklinik (TLRC) durchgeführt. Die in diesem Rahmen erarbeiteten Ergebnisse liefern wichtige Hinweise darauf, dass der Zusammenhang zwischen *BMP2*-Expression und Heparin-Niveaus bei PAH-Patienten noch komplexer ist als bisher angenommen. Daher liefert diese Studie wichtige Ansätze für weitere Studien.

2.3. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses

Sobald die Datenauswertung komplett abgeschlossen ist, werden die Ergebnisse zur Veröffentlichung eingereicht,. Zudem ergeben sich weitere Fragestellungen durch diese Pilotstudie, wie z.B. es zum Eisenmangel bei PAH-Patienten kommt, wenn nicht durch die direkte Hochregulation des Eisenhormons Heparin. Eine weitere Fragestellung für eine größere Studie wäre, wo genau das substituierte Eisen im Körper von PAH-Patienten verbleibt, so dass immer wieder neu ein Eisenmangel auftritt. Die entsprechenden Unterlagen für den Antrag der klinischen Vollstudie bei BfArM und der Ethikkommission werden daher vorbereitet.

2.4. Bekannt gewordene Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen und deren Effekt auf das Vorhaben

Literaturrecherchen erfolgten regelmäßig. Nach unserem Wissen sind bisher keine neuen Erkenntnisse bekannt geworden, die zu einer Änderung der Zielsetzungen veranlassen würden.

2.5. Erfolgten oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Die klinischen und molekularen Untersuchungen sind abgeschlossen, die statistische Auswertung verbleibt nur noch für die Quantifizierung der gefärbten Lungenschnitte. Danach ist eine Veröffentlichung in einem wissenschaftlichen Journal geplant. Ein erster Entwurf dieser Veröffentlichung wird bereits zur abschließenden statistischen Analyse parallel erarbeitet.

Zudem hat die Fragestellung dieser Studie bei allen Beteiligten das Interesse am Eisenstoffwechsel verstärkt. Diesbezüglich werden aktuell zwei weitere klinische Arbeiten unabhängig von dieser Studie bearbeitet, die ebenfalls Eisenstoffwechsel-Parameter im Zentrum haben. Hierdurch wurde die Interaktion zwischen den DZL und TLRC-Zentren weiter verstärkt und gefördert.

2.6. Zusammenfassung des zahlenmäßigen Nachweises

Personal

Ausgaben: 0,00€

Investitionen

Keine.

Verbrauchsmittel

Ausgaben in 2020: € 21.785,52€

Gesamtausgaben in Höhe von 30.016,33€.

Kassenbestand

Es wurden Mittel in Höhe von 21.884,16€ in 2020 abgerufen. Der Gesamtmittelabruf beträgt 30.000€. Der aktuelle Kassenbestand beträgt -16,33€.

III. Erfolgskontrollbericht

3.1. Kurzfassung der wissenschaftlich-technischen Ergebnisse des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen

- Die *BMPR2*-mRNA Expression weist bereits im Blut eine Verringerung bei HPAH und IPAH Patienten auf.
- *BMPR2*-Proteinwerte im Serum zeigten keinen Unterschied, und spiegeln ggf. nicht adäquat das *BMPR2*-Niveau wider. Da *BMPR2* an der Zelloberfläche sitzt und nicht regulär im Serum zirkuliert, ist das ein wichtiger Informationsgewinn für zukünftige Studien, d.h. es sollten immer mRNA und nicht *BMPR2*-Proteinwerte im Blut bestimmt werden.
- Eine Korrelation von niedrigen *BMPR2*-Werten mit Parametern der Rechtsherzfunktion, sowie der körperlichen Leistungsfähigkeit wurde unseres Erachtens bisher noch nicht berichtet.
- Die Heparin-Protein-Werte zeigen keinen Unterschied zwischen PAH-Patienten in Kontrollen gemessen im Serum. Diese Werte könnte man in einer größeren Studie nochmals prüfen und weitere Parameter der Heparin-*BMPR2*-Achse weiter untersuchen.
- Die supportive regelhaft durchgeführte Therapie mit intra-venösem Eisen bei PAH Patienten könnte eine langfristige Auswirkung auf den Heparin-Protein-Wert haben. Es sollten daher bei Folgestudien Patienten rekrutiert werden, bei denen noch keine Eisensubstitution vorgelegen hat bzw. ein ausführlicher Vergleich zu diesen erfolgen.

3.2. Fortschreibung des Verwertungsplans

3.2.1. Erfindungen / Schutzrechtsanmeldungen

Aus der Studie gehen keine Erfindungen, Schutzrechtsanmeldungen oder Schutzrechte hervor.

3.2.2. Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Entfällt.

3.2.3. Wissenschaftliche und / oder technische Erfolgsaussichten

Entfällt.

3.2.4. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Es ist geplant, die Ergebnisse der Pilotstudie zu publizieren. Die Studie dient als Grundlage für die Auswahl geeigneter Parameter für die Kontrolle der Eisentherapie bei Patienten mit PAH, insbesondere bei Patienten mit einer Mutation im BMPR2-Gen auf den Krankheitsverlauf für den Vollartrag einer multizentrischen Studie, deren Ergebnis zu zukünftigen Richtlinien für die Behandlung von PAH beitragen wird.

3.3. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Ein Nachweis von BMPR2-Proteinwerten aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) im Western Blot gelang in mehreren Anläufen nicht. Da im anschließenden ELISA es weder zu Unterschieden zwischen den Gruppen kam, noch eine Menge an Protein nachgewiesen werden konnte, die auf eine Durchführbarkeit eines Western Blots schließen lässt, sollte in Zukunft darauf verzichtet werden. Alternativ könnten noch spezifischere Antikörper in sehr hohen Konzentrationen verwendet werden. Ein Mehrwert dieser Untersuchungstechnik bleibt jedoch fraglich.

3.4. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung mit entsprechenden Erläuterungen bei Abweichungen vom ursprünglichen Plan und wesentlichen Umwidmungen.

Der ursprüngliche Ausgaben- und Zeitplan wurde im Wesentlichen eingehalten.

Heidelberg, den 01.03.2021

Projektleiter: PD Dr. Christina Eichstaedt
Prof. Dr. med. Ekkehard Grünig

Anlage

- Referenzen

Referenzen

1. Atkinson C, Stewart S, Upton PD, Machado R, Thomson JR, Trembath RC, and Morrell NW. 2002. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* 105(14):1672-1678.
2. Evans JD, Girerd B, Montani D, Wang XJ, Galie N, Austin ED, Elliott G, Asano K, Grünig E, Yan Y et al. 2016. BMPR2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: an individual participant data meta-analysis. *Lancet Respir Med* 4(2):129-137.
3. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M et al. 2015. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J* 46(4):903-975.
4. Grünig E, Benjamin N, Kruger U, Kaemmerer H, Harutyunova S, Olsson KM, Ulrich S, Gerhardt F, Neurohr C, Sablotzki A et al. 2016. Allgemeine und supportive Therapie der pulmonal arteriellen Hypertonie [General and supportive therapy of pulmonary arterial hypertension]. *Dtsch Med Wochenschr* 141(S 01):S26-S32.
5. Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, and Galy B. 2017. A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell* 168(3):344-361.
6. Rhodes CJ, Howard LS, Busbridge M, Ashby D, Kondili E, Gibbs JS, Wharton J, and Wilkins MR. 2011. Iron deficiency and raised hepcidin in idiopathic pulmonary arterial hypertension: clinical prevalence, outcomes, and mechanistic insights. *J Am Coll Cardiol* 58(3):300-309.
7. Spiekerkoetter E, Sung YK, Sudheendra D, Bill M, Aldred MA, van de Veerdonk MC, Vonk Noordegraaf A, Long-Boyle J, Dash R, Yang PC et al. 2015. Low-Dose FK506 (Tacrolimus) in End-Stage Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 192(2):254-257.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Veröffentlichung (Publikation)
3. Titel DZL Studie: Association between BMPR2 mutations and iron metabolism in pulmonary arterial hypertension patients (AMIA) Assoziation zwischen der Expression von BMPR2 und dem Eisenstoffwechsel bei Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] TLRC Prof. Dr. Ekkehard Grünig, PD Dr. Christina Eichstaedt	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.12.2020
	6. Veröffentlichungsdatum 01.03.2021
	7. Form der Publikation Sonstiges
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Thoraxklinik - Heidelberg, gemeinnützige Gesellschaft mit beschränkter Haftung	9. Ber.-Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen 82DZLB44A2
	11. Seitenzahl 13
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) BMBF_HMG Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst Baden-Württemberg, Königstraße 46, 70173 Stuttgart	13. Literaturangaben 7
	14. Tabellen 1
	15. Abbildungen 4
16. DOI (Digital Object Identifier)	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Helmholtz Zentrum München, München, 01. März 2021	
18. Kurzfassung Ziel der Pilotstudie: Prüfung der Machbarkeit sowie die Generierung von ersten Daten zur Rolle des Eisenstoffwechsels bei pulmonal-arterieller Hypertonie (PAH), um damit zu einer besseren Therapie des Eisenmangels bei PAH beizutragen. Methoden: Es wurden 109 Probanden in die Studie eingeschlossen, aufgeteilt in 21 HPAH-Patienten mit BMPR2-Mutation, 58 IPAH-Patienten ohne BMPR2-Mutation und 30 gesunde Kontrollen. Von den Patienten wurden klinische Routine-Parameter erfasst zu Lungenfunktion, Echokardiographie, 6-Minuten-Gehtest sowie Routine Labor- und Eisenparameter. Letztere wurden um Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) für BMPR2, BMP2, BMP6 und Hepcidin ergänzt. Zudem wurde die messenger RNA (mRNA)-Expression von BMPR2 mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion gemessen. Ergebnisse wurden zwischen den drei Gruppen verglichen und die vier zusätzlich gemessenen Parameter mit klinischen Werten korreliert. Ergebnisse: In dem Patientenkollektiv wiesen 80% einen vorangehenden Eisenmangel auf. Bei dem Vergleich der Expressionen von Hepcidin, BMPR2, BMP2 und BMP6 zwischen den drei Gruppen zeigte allein die BMPR2 mRNA einen signifikanten Unterschied. Eine niedrige BMPR2-mRNA Expression korrelierte signifikant mit einer schlechteren Leistung des rechten Herzens. Die Hepcidin-Proteinlevel korrelierten zudem signifikant mit den Eisenparametern. Konklusion: Mutationen im BMPR2-Gen führten zu einer reduzierten BMPR2-Expression zeigten jedoch keine Assoziation mit Hepcidin-Werten. Eisenparameter könnten daher weniger direkt durch den BMPR2-Singalweg beeinflusst zu sein als bisher gedacht. Eine größere Studie müsste klären, wie die Regulation des Hepcidin bei BMPR2-Mutationsträgern und PAH-Patienten erfolgt und weshalb es bei PAH-Patienten so häufig zu einem Eisenmangel kommt.	
19. Schlagwörter	
20. Verlag	21. Preis

Entwurf