

Aus der Klinik für Neonatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Microfluidics-basierte Quantifizierung zirkulierender
Endothelzellen bei pulmonalarterieller Hypertonie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hannes Sallmon

aus Berlin

Datum der Promotion: 08.12.2017

Inhaltverzeichnis

I.	Zusammenfassung/Abstract (deutsch/englisch)	3
II.	Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung	6
III.	Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge)	8
IV.	Druckexemplar der Publikation	9
V.	Lebenslauf	22
VI.	Publikationsliste	24
VII.	Danksagung	27

I. Zusammenfassung/Abstract (deutsch/englisch)

Zusammenfassung

Hintergrund: Die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH) ist eine ätiologisch heterogene, proliferative kardiovaskuläre Erkrankung, die mit einer hohen Mortalität einhergeht. Zirkulierende Endothelzellen (*circulating endothelial cells*, CECs) werden als potentielle Biomarker zur Diagnose und Verlaufsbeurteilung bei PAH diskutiert. Die aktuell verfügbaren Methoden zur Isolierung und Quantifizierung dieser Zellen sind aber zeit- und arbeitsaufwendig.

Fragestellung: Ziel dieser Studie war es, eine auf Microfluidics-Technologie basierende Plattform zur Messung von CECs zu entwickeln und diese bei PAH-Patienten zu validieren.

Methoden: Basierend auf einer aus Vorarbeiten verfügbaren polymerischen diagnostischen Plattform zur Quantifizierung endothelialer Progenitorzellen (*endothelial progenitor cells*, EPCs) wurde ein modifizierter Microfluidics-basierter Chip für die CEC Messung entwickelt. Humanes Vollblut wurde gesammelt und in die Microfluidics-Plattform injiziert. Hier erfolgte die Bindung der Zellen an anti-CD146 Antikörper-tragende Mikrosäulen. Nach Komplettierung der immunfluoreszenzbasierten Färbungen wurden die Zellen ausgezählt.

Ergebnisse: Zuerst wurde der CEC Chip gegen konventionelle Durchflusszytometrie validiert ($r = 0.89$, $n=7$). Danach wurden die CEC Zahlen von 66 weiblichen PAH-Patienten mit denen von Kontrollpatienten ohne PAH verglichen. Es konnte eine signifikante, drei- bis fünffache Erhöhung der CEC Zahlen bei PAH gezeigt werden ($p < 0.001$). Diese war unabhängig von der Subgruppenzugehörigkeit der PAH-Patienten (idiopathische/hereditäre PAH, Medikamenten-induzierte PAH und *Connective Tissue Disease*-assoziierte PAH). Eine Korrelation zu den potentiell den Krankheitsverlauf beeinflussenden Faktoren Alter und Body Mass Index bestand nicht.

Diskussion: Der Microfluidics CEC Chip ist zur schnellen und verlässlichen Bestimmung der CEC Zahl geeignet. Der Chip benötigt 200-400 μ l Vollblut und bietet

potentiell die Grundlage für ein bettseitiges Screening von Patienten mit PAH oder anderen mit Gefäßschäden assoziierten Erkrankungen.

Abstract

Background: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a proliferative cardiovascular disease of heterogeneous etiology. PAH is still associated with a high mortality. Thus, methods allowing for a timely diagnosis and adequate risk-stratification are highly warranted. Circulating endothelial cells (CECs) have been discussed as potential biomarkers in patients with PAH. However, current protocols for isolation and quantification of these cells are laborious and time-consuming.

Objective: The aim of this study was to develop a disposable microfluidic chip platform capable of enumerating CECs and to test whether CECs measured by this device may serve as useful biomarker in patients with PAH.

Methods: We previously developed a polymeric cell-affinity microfluidic diagnostic platform for the enumeration of human endothelial progenitor cells (EPC). Herein, we developed a modified chip for CEC detection. Human whole blood was collected and injected into microfluidic chips containing microcolumns pre-coated with anti-CD146 antibodies. Captured cells were immunofluorescently stained for additional stem and endothelial cell markers and enumerated by fluorescence microscopy.

Results: The CEC capture chip was initially validated against conventional flow cytometry ($r=0.89$, $n=7$). In a cohort of 66 patients with three types of PAH (idiopathic/heritable, drug-induced, and connective tissue disease), CEC numbers were significantly increased 3-5 fold in PAH subjects vs. matched controls ($p < 0.001$) and CEC numbers were comparable across PAH sub-classes. However, they were not related to the potential disease modifiers age and body mass index.

Discussion: The CEC capture chip allows for a rapid and reliable detection of CECs. The device requires 200-400 μL of whole blood and can potentially be automated. Thus, it may serve as a bedside test for the screening and monitoring of patients with PAH and other diseases related to vascular injury.

II. Anteilserklärung und eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Hannes Sallmon, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Microfluidics-basierte Quantifizierung zirkulierender Endothelzellen bei pulmonalarterieller Hypertonie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

22.03.2017

(Unterschrift *Hannes Sallmon*)

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation: Sallmon H, Hatch A, Plouffe BD, Murthy SK, Hansmann G: Circulating endothelial cell quantification by microfluidics-chip in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017; 56, 680-682.

Beitrag im Einzelnen:

Die Entwicklung des vorgestellten Microfluidics-basierten CEC Chips fußt auf einer Vorarbeit, in der erstmals das verwendete Prinzip der Microfluidics-Technologie zur Quantifizierung humaner endothelialer Vorläuferzellen und ihre Anwendung bei kardiovaskulären Erkrankungen demonstriert wurde. Herr Sallmon war an der Rekrutierung der Studienteilnehmer, Datenerhebung und -auswertung dieser Studie beteiligt und ist Koautor der entsprechenden Veröffentlichung (Hansmann G, Plouffe BD, Hatch A, von Gise A, Sallmon H, Zamanian RT, Murthy SK: Design and Validation of an Endothelial Progenitor Cell Microfluidic Capture Chip: Application in Patients with Pulmonary Hypertension. *J Mol Med.* 2011; 89, 10: 971-983. IF 4,855). In der aktuellen Arbeit wurde ein modifizierter Chip zur Quantifizierung zirkulierender Endothelzellen entwickelt. Herr Sallmon war an der Konzeption dieser Modifikation beteiligt (Auswahl der Antikörper, Verdünnungen etc.). Er rekrutierte Studienteilnehmer, führte Blutentnahmen und die Erhebung demographischer und medizinischer Daten durch. Zudem analysierte er eigenverantwortlich die Daten und wertete diese statistisch aus. Er verfasste das Manuskript, erstellte die Abbildungen und Tabellen und führte die Korrespondenz mit dem Journal während des Begutachtungsprozesses. Der Aufenthalt des Doktoranden am Boston Children's Hospital der Harvard Medical School wurde durch Stipendien des Deutschen Akademischen Austauschdienstes und der Boehringer Ingelheim Foundation unterstützt.

22.03.2017

(Unterschrift *Hannes Sallmon*)

III. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge)

Das American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology liegt in der Kategorie "*Respiratory System*" der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge) des Journal Citation Reports auf der Perzentile 83,62 (10/58) mit einem Impactfaktor von 4,082 und einem Eigenfaktor von 0,02118 (Stand Februar 2017).

	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Lancet Respiratory Medicine	2,343	15.328	0.01200
2	AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE	53,045	13.118	0.09232
3	EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL	30,252	8.332	0.05287
4	THORAX	19,740	8.121	0.03302
5	JOURNAL OF HEART AND LUNG TRANSPLANTATION	8,788	7.509	0.02545
6	CHEST	44,914	6.136	0.07151
7	Journal of Thoracic Oncology	10,099	5.040	0.03484
8	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY	12,944	4.721	0.01663
9	Journal of Breath Research	1,081	4.177	0.00236
10	AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY	11,341	4.082	0.02118

IV. Druckexemplar der Publikation

Sallmon H, Hatch A, Plouffe BD, Murthy SK, Hansmann G: Circulating endothelial cell quantification by microfluidics-chip in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017; 56, 680-682.

Der Volltext wird aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht. Er ist verfügbar unter folgendem Link:

<http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2017-0026LE>

Am J Respir Cell Mol Biol. 2017 May;56(5):680-682. doi: 10.1165/rcmb.2017-0026LE.

V. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

VI. Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

Sallmon H, Hatch A, Plouffe BD, Murthy SK, Hansmann G: Circulating endothelial cell quantification by microfluidics-chip in pulmonary arterial hypertension. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 2017; 56, 680-682. (IF 4,082)

Barikbin P*, **Sallmon H***, Wilitzki S, Photiadis J, Bühner C, Koehne P, Schmalisch G: Lung function in very low birth weight infants after treatment of patent ductus arteriosus with a cyclooxygenase inhibitor or surgical ligation. **BMC Pediatr.** 2017; 17:5. *Contributed equally. (IF 1,813)

Barikbin P*, **Sallmon H***, Hüseman D, Sarioglu N, Weichert A, von Weizsäcker K, Bühner C, Koehne P: Clinical, laboratory, and placental findings in neonatal listeriosis: a case series. **Fetal Pediatr Pathol.** 2016; 35, 307-314. *Contributed equally. (IF 0,514)

Raschzok N, Reutzel-Selke A, Schmuck RB, Tannus LM, Morgul MH, Dietel C, Leder A, Struecker B, Lippert S, **Sallmon H**, Schmelzle M, Bartels M, Jonas S, Pratschke J, Sauer IM: MicroRNA signatures in peripheral blood fail to detect clinically significant allograft rejection after liver transplantation. **Biomarkers.** 2016; 21, 699-707. (IF 2,016)

Calvier L, Grimm L, Legchenko E, **Sallmon H**, Hatch A, Plouffe BD, Schröder C, Bauersachs J, Murthy SK, Hansmann G: Galectin-3 and aldosterone as potential tandem biomarkers in pulmonary arterial hypertension. **Heart.** 2016; 102, 390-96. (IF 5,693)

Kluge M, Reutzel-Selke A, Napierala H, Hillebrandt KH, Major RD, Struecker B, Leder A, Siefert J, Tang P, Lippert S, **Sallmon H**, Seehofer D, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Human hepatocyte isolation: Does portal vein embolization affect the outcome? **Tissue Eng Part C Methods.** 2016; 22, 38-48. (IF 3,892)

Weber SC, Weiss K, Bühner C, Hansmann G, Koehne P,* **Sallmon H***: Natural history of patent ductus arteriosus in VLBW infants after discharge. **J Pediatr.** 2015; 167, 1149-51. *Contributed equally. (IF 3,890)

Werner W, **Sallmon H**, Leder A, Lippert S, Reutzel-Selke A, Morgül MH, Jonas S, Dame C, Neuhaus P, Iacomini J, Tullius SG, Sauer IM, Raschzok N: Independent Effects of Sham Laparotomy and Anaesthesia on Hepatic miRNA Expression in Rats. **BMC Res Notes.** 2014; 7, 702. (IF n/a)

Sallmon H,* Weber SC,* Hüning BM, Stein A, Horn P, Felderhoff-Müser U, Dame C, Bühner C, Hansmann G#, Koehne P#: Thrombocytopenia Within the First 24 Hours and Incidence of Patent Ductus Arteriosus. **Pediatrics.** 2012; 130, 3: e623-630. *Contributed equally as first authors. # Contributed equally as senior authors. (IF 5,473)

Weber SC,* **Sallmon H**,* Sarioglu N, Degenhardt P, Bühler C, Rüdiger M, Koehne P: The Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptors in Congenital Bronchopulmonary Cystic Malformations. **Eur J Pediatr Surg.** 2012; 22, 2: 127-32. *Contributed equally. (IF 1,269)

Hansmann G, Plouffe BD, Hatch A, von Gise A, **Sallmon H**, Zamanian RT, Murthy SK: Design and Validation of an Endothelial Progenitor Cell Microfluidic Capture Chip: Application in Patients with Pulmonary Hypertension. **J Mol Med.** 2011; 89, 10: 971-983. (IF 4,855)

Weber SC, Gratopp A, Akanbi S, Rheinlaender C, **Sallmon H**, Barikbin P, Koehne PS: Isolation and Culture of Fibroblasts, Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cells from the Fetal Rat Ductus Arteriosus. **Pediatr Res.** 2011; 70, 3: 236-241. (IF 2,761)

Raschzok N, Werner W,* **Sallmon H**,* Billecke N, Dame C, Neuhaus P, Sauer IM: Temporal expression profiles indicate a primary function for miRNA during the peak of DNA replication after rat partial hepatectomy. **Am J Physiol (Regul Integr Comp Physiol).** 2011; 300: R1363-1373.* Contributed equally. (IF 3,168)

Hu Z, Slayton WB, Rimsza LM, Bailey M, **Sallmon H**, Sola-Visner MC: Differences between newborn and adult mice in their response to immune thrombocytopenia. **Neonatology.** 2010; 98, 1: 100-108. (IF 2,754)

Sallmon H, Hoene V, Weber SC, Dame C: Differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells by all-trans retinoic acid activates the interleukin-18 system. **J Interferon Cytokine Res.** 2010; 30, 2: 55-58. (IF 2,135)

Übersichtsarbeiten, Korrespondenz und Fallberichte

Sallmon H, Juan Lopez E, Weber SC, Herrmann S, Berger F, Haverkämper G: Subacute Myocarditis Associated with Bocavirus Infection in an 8-Week-Old Infant. **Klin Padiatr.** 2017; zur Veröffentlichung angenommen. (IF 0,980)

Dzietko M, Deindl P, **Sallmon H**, Stein A, Hansmann G: Erstversorgung und Reanimation des Neugeborenen - Update 2016. **Kinder- und Jugendmedizin.** 2016; 16, 433-438. (IF n/a)

Sallmon H, Koehne P, Hansmann G: Recent advances in the treatment of preterm newborn infants with patent ductus arteriosus. **Clin Perinatol.** 2016; 43, 113-129. (IF 2,611)

Cremer M, **Sallmon H**, Kling PJ, Bühler C, Dame C: Thrombocytopenia and platelet transfusion in the neonate. **Semin Fetal Neonatal Med.** 2016; 21, 10-8. (IF 2,800)

Raschzok N,* **Sallmon H**,* Pratschke J, Sauer IM: microRNAs in Liver Tissue Engineering – New Promises for Failing Organs. **Adv Drug Deliv Rev.** 2015; 1; 88: 67-77. * Contributed equally. (IF 15,606)

Sallmon H, Barikbin P, Koehne P, von Gise A, Hansmann G: Platelet-rich plasma for the treatment of patent ductus arteriosus: not quite ready for prime time. **Cardiol Young**. 2015; 25, 1: 139-40. (IF 0,825)

Raschzok N, **Sallmon H**, Dame C, Sauer IM: Liver regeneration after partial hepatectomy: unconsisted results of expression screenings for human, mouse, and rat miRNAs? **Am J Physiol**. (Gastrointest Liver Physiol) 2012; 302, 4: G470-1. (IF 3,297)

Sallmon H, Sola-Visner MC: Clinical and Research Issues in Neonatal Anemia and Thrombocytopenia. **Curr Opin Pediatr**. 2012; 24, 1: 16-22. (IF 2,202)

Sallmon H, Weber SC, von Gise A, Koehne P, Hansmann G: Ductal Closure in Neonates: A Developmental Perspective on Platelet-Endothelial Interactions. **Blood Coagul Fibrinolysis**. 2011; 22, 3: 242-4. (IF 1,242)

Sallmon H, Gutti RK, Ferrer-Marin F, Liu ZJ, Sola-Visner MC: Increasing Platelets Without Transfusion: Is it Time to Introduce Novel Thrombopoietic Agents in Neonatal Care? **J Perinatol**. 2010; 30, 12: 765-769. (IF 2,087)

Sallmon H, Hansmann G: Neue Konzepte zur Behandlung der pulmonalarteriellen Hypertonie im Kindes- und Erwachsenenalter. **DIVI**. 2011; 2: 106-111. (IF n/a)

Sola-Visner M, **Sallmon H**, Brown R: New Insights Into the Mechanisms of Nonimmune Thrombocytopenia in Neonates. **Semin Perinatol**. 2009; 33, 1: 43-51. (IF 2,131)

Sallmon H: Bob Dylan (Biographie von Heinrich Detering, Reclam 2007–Buchrezension). **Ärztebl Meckl-Vorpom**. 2008; 2: 61. (IF n/a)

Buchbeiträge

Sallmon H, Bühner C: Fetofetales Transfusionssyndrom. In: Hansmann G (Hrsg.): Neugeborenen-Notfälle. 2. Aufl., Schattauer Verlag 2016. S. 187-189.

Sallmon H, Schwerk N: Kongenitale pulmonale Atemwegsmalformationen. In: Hansmann G (Hrsg.): Neugeborenen-Notfälle. 2. Aufl., Schattauer Verlag 2016. S. 349-350.

Sallmon H, Sola-Visner M: Gerinnungsstörungen. In: Hansmann G (Hrsg.): Neugeborenen-Notfälle. 2. Aufl., Schattauer Verlag 2016. S. 399-409.

VII. Danksagung

Herzlichster Dank gebührt meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christof Dame. Besonders danke ich ihm für die erste Gelegenheit zur wissenschaftlichen Arbeit in seiner Arbeitsgruppe und seine konstante und vorbehaltlose Unterstützung auf meinem oftmals unerwarteten Weg in der Forschung. Ebenso herzlich möchte ich Herrn Prof. Dr. Georg Hansmann für die Möglichkeit zur Durchführung der dieser Promotionsarbeit zugrundeliegenden Studie, die damit verbundene ausgezeichnete Betreuung und seine andauernde motivierende Förderung meiner Tätigkeit danken. Besondere Erwähnung verdient die Hilfe beider bei der Organisation meiner Aufenthalte am Boston Children's Hospital der Harvard Medical School. Den Koautoren dieser Untersuchung Dr. Adam Hatch, Dr. Brian Plouffe und Prof. Dr. Shashi Murthy vom Department of Chemical Engineering der Northeastern University danke ich für die äußerst angenehme Zusammenarbeit und ihre technische Expertise.

Für die großartige Zeit in Boston danke ich besonders Frau Prof. Dr. Martha Sola-Visner, die mir jederzeit bei allen Fragen und Problemen mit Rat und Tat zur Seite stand. Den Direktoren der Division of Newborn Medicine am Boston Children's Hospital und der Klinik für Neonatologie der Charité, Frau Prof. Dr. Stella Kourembanas und Herrn Prof. Dr. Christoph Bühner, gebührt ausdrücklicher Dank für die organisatorische Unterstützung meiner Tätigkeit. Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Frau PD Dr. Petra Koehne für die allzeit äußerst angenehme und produktive Zusammenarbeit und die andauernde Unterstützung meiner Arbeit bedanken.

Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. Hilmar Stolte, der International Academy of Life Sciences (IALS) und dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) für die Unterstützung meines Auslandsaufenthaltes im Rahmen des Biomedical Sciences Exchange Programs (BMEP) danken. Weiterhin danke ich dem Boehringer Ingelheim Fonds, der Charité – Universitätsmedizin Berlin und dem Boston Children's Hospital für die finanzielle Unterstützung durch Stipendien.

Mein größter Dank gebührt aber meiner Familie, vor allem meiner Mutter Dr. Sylke Sallmon und meinen Großeltern Sonja und Prof. Dr. Claus Krömke, sowie Dr. Ilona

Weisshuhn und Dr. Irina Modrow. Dr. Sven Christian Weber und Dr. Alexander von Gise danke ich nicht nur für viele wissenschaftlich lehrreiche Stunden sondern v.a. für ihre besondere freundschaftliche Verbundenheit.