

**Fibrose-assoziierte Biomarker – Einfluss der Behandlung mit
Serelaxin im murinen Nierenfibrose-Modell und prädiktiver
Aussagewert in der pulmonalen Hypertonie**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT CHEMIE UND
PHARMAZIE

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Veronika Wetzl aus

Ingolstadt

im Jahr 2017

Promotionsgesuch eingereicht am 10. April 2017

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. med. Lothar Färber

Für meine Eltern

„Erst zweifeln, dann untersuchen, dann entdecken!“

Henry Thomas Buckle

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1 Einleitung.....	5
1.1 Wundheilung und Fibrose	6
1.1.1 Zelluläre Prozesse bei fibrotischem Gewebe-Umbau.....	7
1.1.2 Molekulare Mechanismen und Marker fibrotischer Prozesse	8
1.1.3 Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren	14
1.1.4 Protektive Rolle des NO-cGMP-cGKI-Signalweges am Beispiel der renalen Fibrose.....	16
1.1.5 Therapieoptionen bei fibrotischen Erkrankungen	18
1.2 Serelaxin – eine organprotektive Behandlungs-Option.....	20
1.2.1 Entwicklung von Serelaxin	20
1.2.2 Signaltransduktion von Serelaxin.....	22
1.2.3 Physiologische Wirkungen von Relaxin.....	24
1.2.4 Pleiotrope Wirkungen von Serelaxin	25
1.2.5 Serelaxin in der akuten Herzinsuffizienz	30
1.3 Die pulmonale Hypertonie – eine Fibrose-assoziierte Erkrankung	33
1.3.1 Diagnostik, Klassifikation und Pathophysiologie.....	33
1.3.2 Fibrotische Umbauprozesse in der pulmonalen Hypertonie	35
1.3.3 Therapie der pulmonalen Hypertonie	36
1.3.4 Epidemiologie der pulmonalen Hypertonie.....	37
1.3.5 Prognose der pulmonalen Hypertonie.....	37
1.4 Fragestellung.....	40
2 Methoden.....	41
2.1 Antifibrotischer Signalweg von Serelaxin am Beispiel eines murinen Nierenfibrose-Modells	41
2.1.1 Verwendete Mauslinie und <i>knock out</i> Mutanten.....	41
2.1.2 Unilaterale Ureterligation	42

2.1.3	Behandlung	42
2.1.4	Organentnahme.....	43
2.1.5	Material.....	44
2.1.6	Statistische Auswertung.....	53
2.1.7	Enzyme-linked immunosorbent assay.....	53
2.1.8	Quantitative RT-PCR	54
2.1.9	Western Blotting und Zymographie.....	56
2.1.10	Immunhistochemie und Sirius Red/ Fast Green-Färbung.....	60
2.1.11	Kreatinin-Bestimmung.....	62
2.2	Fibrose-assoziierte Biomarker in der pulmonalen Hypertonie	65
2.2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	65
2.2.2	Patientenkollektiv.....	65
2.2.3	Klinische Parameter.....	66
2.2.4	Blutentnahme.....	67
2.2.5	Bestimmung der Biomarker.....	67
2.2.6	Statistische Auswertung.....	68
3	Ergebnisse.....	71
3.1	Antifibrotischer Signalweg von Serelaxin am Beispiel eines murinen Nierenfibrose-Modells	71
3.1.1	Serelaxin-Konzentrationen im Serum.....	71
3.1.2	Einfluss von Serelaxin auf cGMP und die cGMP-abhängige Proteinkinase cGKI.....	71
3.1.3	Einfluss von Serelaxin auf die Progression der renalen Fibrose – 3 vs. 7 Tage	74
3.1.4	Einfluss von Zaprinast und der Kombination aus Zaprinast und Serelaxin auf die Progression der renalen Fibrose – 7 Tage	89
3.1.5	Einfluss von Serelaxin auf die Nierenfunktion während der Progression der renalen Fibrose.....	97
3.2	Fibrose-assoziierte Biomarker in der pulmonalen Hypertonie	101
3.2.1	Charakterisierung der Patienten-Population.....	101

3.2.2	Plasma-Konzentrationen ausgewählter Biomarker.....	108
3.2.3	Korrelations-Analysen.....	113
3.2.4	Prädiktiver Wert der MMP/TIMP-Verhältnisse	117
4	Diskussion	126
4.1	Antifibrotischer Signalweg von Serelaxin am Beispiel eines murinen Nierenfibrose-Modells	126
4.1.1	Einfluss von Serelaxin auf die Progression der renalen Fibrose bei 7-tägiger UUO	126
4.1.2	Kurzfristige (3 Tage) Effekte von Serelaxin auf die Progression der renalen Fibrose im Vergleich zur längerfristigen Behandlung (7 Tage).....	132
4.1.3	Pharmakotherapeutische Modulation von cGMP – Vergleich von Serelaxin und Zaprinast in der Progression der renalen Fibrose	135
4.1.4	Einfluss von Serelaxin auf die Nierenfunktion während der Progression der renalen Fibrose.....	139
4.1.5	Die Modulation des zyklischen Nukleotids cGMP bei fibrotischen Erkrankungen	142
4.2	Fibrose-assoziierte Biomarker als prognostische Biomarker in der pulmonalen Hypertonie	144
4.2.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs.....	144
4.2.2	Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren bei kardiovaskulären Erkrankungen	146
4.2.3	Korrelationen von MMP/TIMP-Verhältnissen bei der Folgeuntersuchung im iPAH-Kollektiv	148
4.2.4	Prädiktiver Wert von MMP/TIMP-Verhältnissen bei der Folgeuntersuchung im iPAH-Kollektiv	150
4.2.5	Korrelationen von MMP/TIMP-Verhältnissen bei der Folgeuntersuchung im PH-LHD-Kollektiv	151
4.2.6	Bedeutung von MMP2/TIMP4 bei kardiovaskulären Erkrankungen bzw. Herzinsuffizienz	152
4.2.7	Limitationen	153
4.2.8	Matrix-Metalloproteinasen – Biomarker mit prädiktivem und therapeutischem Stellenwert.....	154

5	Fazit/ Ausblick.....	156
6	Zusammenfassung	157
7	Veröffentlichungen.....	159
8	Danksagung	161
9	Eidesstattliche Erklärung	163
10	Zusätzliche Anmerkung	164
11	Anhang	165
11.1	Anhang 1 – Einteilung der Matrix-Metalloproteinasen	165
11.2	Anhang 2 – mRNA-Expression	166
11.2.1	mRNA-Expression nach 7-tägiger UUO	166
11.2.2	mRNA Expression nach 3-tägiger UUO	166
12	Abkürzungsverzeichnis	167
13	Abbildungsverzeichnis	171
14	Tabellenverzeichnis	175
15	Literaturverzeichnis.....	177

1 Einleitung

In den westlichen Industriestaaten sind ungefähr 45 % aller Todesfälle auf eine Organdysfunktion zurückzuführen, die als Folge fibrotischer Umbauprozesse entsteht.¹ Unter einer Fibrose versteht man die überschießende Produktion und Akkumulation von kollagenem Bindegewebe mit anschließender Gewebeverhärtung bzw. -vernarbung. Die Fibrose bildet sich aufgrund fehlender Regenerierbarkeit von Organgewebe zur Aufrechterhaltung der Struktur und Integrität und kann in verschiedenen Organen auftreten, z. B. in der Lunge, der Leber, den Nieren, dem Herz, der Haut oder auch dem Gefäßsystem. Häufig wird nur die Grunderkrankung, wie z. B. Hypertonie, Diabetes mellitus oder Herzinsuffizienz diagnostiziert, weswegen man davon ausgehen kann, dass die tatsächliche Verknüpfung von Mortalität und Fibrose deutlich über 45 % liegt.

Die Untersuchung der Fibrose stellt aufgrund ihrer hohen Prävalenz in der Bevölkerung, der schlechten Prognose für die Patienten sowie der komplexen Pathophysiologie ein sehr wichtiges Forschungsgebiet mit hohem Bedarf an neuen Therapeutika dar. Serelaxin zeigte bereits als therapeutischer Ansatz in verschiedenen Modellen organprotektive Eigenschaften. Diese könnten mit dem antifibrotischen Wirkmechanismus assoziiert sein, welcher über den *second messenger* cGMP vermittelt wird und noch nicht umfassend erforscht ist.²

Auch die pulmonale Hypertonie ist ein Krankheitsbild, das neben der pulmonalvaskulären Vasokonstriktion auch durch pulmonalvaskuläre und kardiale Fibrosierung charakterisiert ist. Nach Diagnosestellung lebten in den 80er Jahren nur knapp die Hälfte der Patienten noch nach 3 Jahren. Die Mortalität konnte durch neue Therapieansätze, z.B. cGMP-modulierende Pharmaka (Inhibitoren der Phosphodiesterase, Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase), gesenkt werden. Allerdings liegt das Überleben dennoch drei Jahre nach Diagnosestellung nur bei 68 %.³ Hier ist der Bedarf an weiteren innovativen Pharmaka als auch neuen prognostischen Markern – beispielsweise Fibrose-assoziierten Biomarkern – hoch.

1.1 Wundheilung und Fibrose

Die Fibrose wird als entartete Form der Wundheilung bezeichnet. Einen Überblick zur physiologischen Wundheilung, welche in vier Phasen eingeteilt werden kann, liefert Abbildung 1.

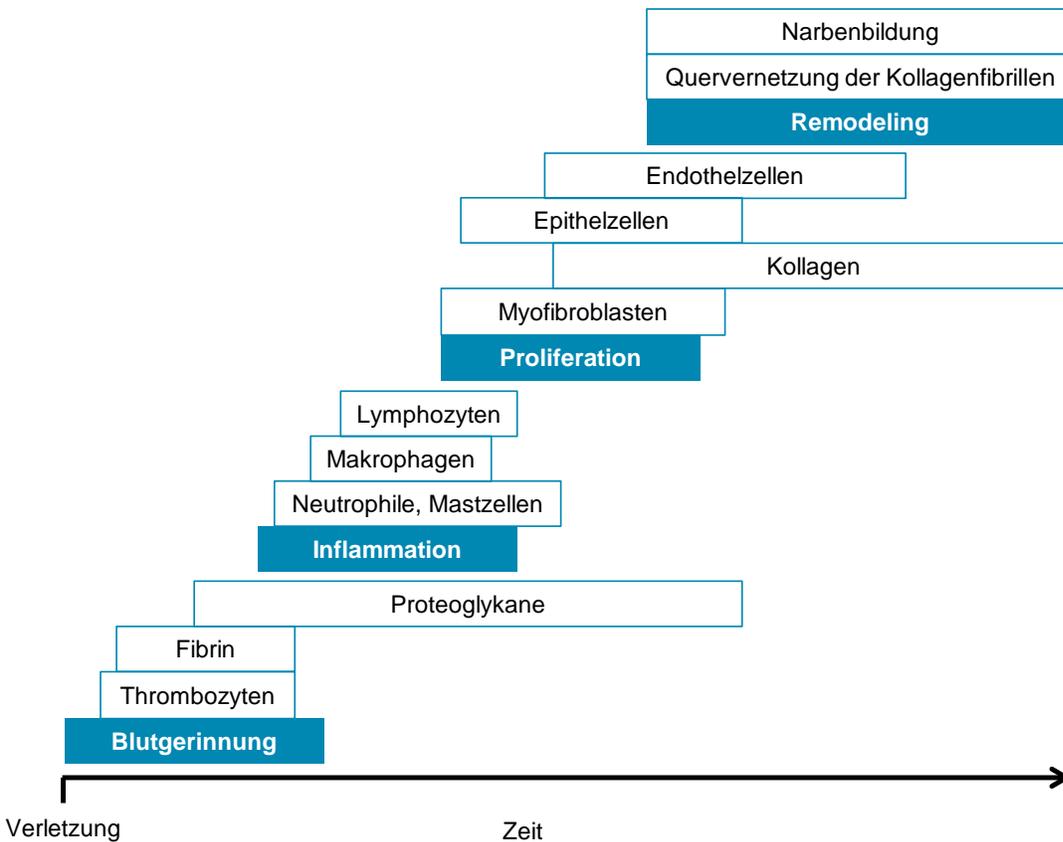


Abbildung 1 Phasen der physiologischen Wundheilung (nach Diegelmann et al., 2004⁴) Initial findet die Blutgerinnung statt. Die daraufhin einsetzende Inflammation führt zur Freisetzung von profibrotischen Zytokinen und Einwanderung von Zelltypen, welche in der proliferativen Phase zu Myofibroblasten differenzieren. Myofibroblasten sind vor allem für die Bildung von kollagenem Gewebe verantwortlich, welches sich längerfristig durch Umbau und Quervernetzungen weiter stabilisiert.

In der ersten Phase der Wundheilung werden durch Thrombozyten Gerinnungsfaktoren gebildet, welche die Blutgerinnungskaskade aktivieren und zur Ausbildung eines Fibrinnetzes führen. Außerdem sezernieren die Thrombozyten verschiedene Wachstumsfaktoren (z. B. TGF- β).⁵ In der inflammatorischen Phase wird aufgrund der erhöhten Kapillarpermeabilität und der Sekretion der eben genannten Wachstumsfaktoren sowie der Produktion anderer profibrotischer oder proinflammatorischer Zytokine die Einwanderung von Immunzellen, wie

Makrophagen, Lymphozyten, Monozyten, Leukozyten, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten, begünstigt. Neben ihrer sekretorischen Eigenschaft wirken diese Zellen auch phagozytotisch und proteolytisch und sind somit für den Abtransport bzw. Abbau von nekrotischem Gewebe verantwortlich.⁴ Weiterhin stimulieren sie die Matrix-degradierenden Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). In der proliferativen Phase kommt es nach mehreren Tagen zur Einsprossung von Kapillaren sowie zur Einwanderung von Fibroblasten, welche ein dicht kapillarisiertes und zellreiches Granulationsgewebe ausbilden und die Bildung von extrazellulärer Matrix (ECM) stimulieren. Die Zellmigration durch diese extrazelluläre Matrix wird durch die proteolytisch wirksamen MMPs (vgl. Kapitel 1.1.3) erleichtert. Die Fibroblasten werden in Myofibroblasten umgewandelt, welche in der Lage sind, große Mengen an Kollagen zu bilden. Außerdem trägt dieser Zelltyp aufgrund seiner kontraktilen Eigenschaft zur Wundkontraktion bei. Die Wunde wird durch Einwanderung neuer Zellen endgültig geschlossen. Im letzten Schritt kommt es zum Gewebe-Umbau, wobei die Kollagene durch Quervernetzungen an Stabilität gewinnen. Ist die Wundheilung abgeschlossen, wird die Kollagensynthese wieder auf ein Basalniveau reduziert und die Myofibroblasten werden durch Apoptose entfernt.^{4, 5}

Bei der Wundheilung ist es wichtig, dass ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix gewährleistet ist. Durch endogene MMPs kann Matrix beispielsweise abgebaut werden. Überwiegt der Aufbau von extrazellulärer Matrix, entwickelt sich eine Fibrose. Sie ist charakterisiert durch eine Gewebsversteifung mit übermäßiger Akkumulation von extrazellulären Matrix-Komponenten – bestehend aus Kollagenen (v. a. Typ 1, 3, 4), Fibronectin sowie aus Proteoglykanen oder Glykoproteinen.⁶ Abhängig vom betroffenen Gewebe kommt es zu einer Funktionsbeeinträchtigung des Organs, welche längerfristig zu Organversagen und Tod führen kann.

Auch zahlreiche kardiovaskuläre Erkrankungen sind mit fibrotischen Umbauprozessen assoziiert, unter anderem die Herzinsuffizienz (vgl. Kapitel 1.2.5) oder die pulmonale Hypertonie (vgl. Kapitel 1.3.1). Ebenso stellt die Nierenfibrose einen Langzeitschaden von Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie dar. Die Pathophysiologie der Fibrose unterliegt in jedem einzelnen Organ ähnlichen Prinzipien (vgl. Kapitel 1.1.1 und 1.1.2).

1.1.1 Zelluläre Prozesse bei fibrotischem Gewebe-Umbau

Die zellulären Prozesse in fibrotischem Gewebe sind mit denen der Wundheilung vergleichbar. Die prolongierte oder chronische Inflammation sowie die ausdauernde

Myofibroblasten-Aktivität führen zu einer Gewebeverhärtung und -fibrose. Mechanische Stimuli oder profibrotische Zytokine aktivieren die Proliferation von Fibroblasten sowie die Differenzierung in Myofibroblasten. Letztere entwickeln sich aus mesenchymalen, endothelialen oder epithelialen Zellen sowie Perizyten, Fibrozyten und Fibroblasten. Die Differenzierung von Epithelzellen oder Endothelzellen zu Myofibroblasten mit mesenchymalem Charakter wird als epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) bzw. als endothelial-mesenchymale Transformation (EndMT) bezeichnet. Dabei verändert sich die Genexpression der Zellen. Durch die verringerte Transkription von Adhäsionsmolekülen verlieren die Zellen ihre Polarität und den Zell-Zell-Kontakt. Sie nehmen einen mesenchymalen Phänotyp an und sind befähigt über die Basalmembran in den extrazellulären Raum zu migrieren. Dort sind sie als Haupteffektorzellen in der Fibrose für die Sekretion von profibrotischen Zytokinen und Matrix-Metalloproteinasen sowie für eine übermäßige Synthese verschiedener Kollagene oder Fibronectin verantwortlich.⁷ Weiterhin zeichnen sich Myofibroblasten durch kontraktile Eigenschaften sowie die Expression von α -smooth muscle actin (α -SMA) aus.⁸

Im fortgeschrittenen Stadium hat die übermäßige Akkumulation von extrazellulärer Matrix eine Gewebhypoxie zur Folge, welche wiederum mit Zellverlust und weiterer Fibrogenese assoziiert ist.⁹

1.1.2 Molekulare Mechanismen und Marker fibrotischer Prozesse

Der *transforming growth factor- β* (TGF- β) ist das zentrale profibrotische Zytokin und wird hauptsächlich von Makrophagen, Fibroblasten und Myofibroblasten sezerniert.^{4, 10} Es stimuliert die Bildung von extrazellulärer Matrix, die Differenzierung von Myofibroblasten sowie die epithelial- und endothelial-mesenchymale Transformation.

TGF- β kommt in drei Isoformen (β 1- β 3) vor und wird in der latenten Form sezerniert.¹¹ Es liegt als Homodimer nicht-kovalent gebunden an *latency-associated proteins* (LAPs) vor und ist über das *latent TGF- β binding protein* (LTBP) mit der extrazellulären Matrix verbunden.¹² Die Aktivierung von TGF- β erfolgt durch proteolytische Abspaltung vom LTBP-LAP-Komplex, z. B. mithilfe von Plasmin, reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) oder Matrix-Metalloproteinasen (vgl. Abbildung 2). Aktives TGF- β liegt dann als Monomer oder als Homodimer vor.

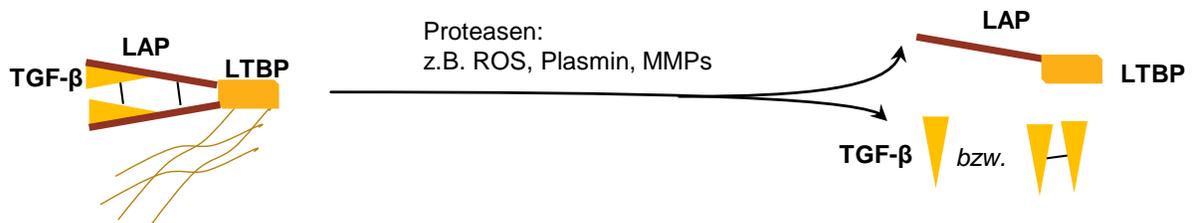


Abbildung 2 Aktivierung des latenten TGF- β -Komplexes Latentes TGF- β liegt als Homodimer gebunden an *latency-associated protein* (LAP) vor und wird über das latent TGF- β binding protein (LTBP) an die extrazelluläre Matrix gebunden. Proteasen setzen die aktive Form von TGF- β frei. MMP – Matrix-Metalloproteinase; ROS – reaktive Sauerstoffspezies; TGF- β – transforming growth factor- β

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Isoform TGF- β 1 (im Folgenden TGF- β genannt) untersucht. Die profibrotische Signaltransduktion von TGF- β , welches sowohl auto- als auch parakrin wirkt,¹³ ist in Abbildung 3 dargestellt.

TGF- β -Rezeptoren (T β Rs) fungieren sowohl als Serin-Threonin- als auch als Tyrosin-Kinasen,^{14, 15} die in der inaktiven Form als Homodimere vorliegen. Nach Aktivierung von TGF- β wird primär der TGF- β -Rezeptor II (T β RII) phosphoryliert, welcher einen Heterotetramer mit dem TGF- β -Rezeptor I (T β RI) bildet. Durch eine nachfolgende Phosphorylierung von T β RI werden Prozesse aktiviert,^{11, 13} welche zur Transkription von Zielgenen führen und entweder abhängig oder unabhängig von Smad-Proteinen (*small mothers against decapentaplegic protein*) ablaufen.

Die Signaltransduktion von TGF- β ist sehr komplex und bis heute nicht vollständig aufgeklärt. In dieser Arbeit werden schwerpunktmäßig die über die Smad-Proteine und über die ERK1/2 MAP-Kinase vermittelten Signalwege untersucht.

Beim Smad-abhängigen Weg (Abbildung 3, blau) werden die Rezeptor-assoziierten Smad2- und Smad3-Proteine durch die Serin-Threonin-Kinase T β RI phosphoryliert. Nach Bindung an Smad4 kommt es zur Translokation in den Nukleus, wo die Transkription von Kollagenen, z. B. Kollagen1A1, hochreguliert wird.¹⁶ Smad7 wird ebenfalls abhängig von TGF- β transkribiert und stellt eine negative Rückkopplung dar, indem es an den T β RI-Smad-Komplex bindet und diesen somit hemmt.¹⁷

Die Smad-unabhängige TGF- β -Signaltransduktion kann über verschiedene Mediatoren erfolgen. Beispielsweise sind kleine GTPasen (RhoA, RhoB, Rac, Cdc42), die Proteinkinase C (PKC) oder die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) involviert. Daneben können auch MAP-Kinasen, wie die p38 MAPK, ERK1/2 MAPK oder die JNK, aktiviert werden. Bei MAP-

Kinasen handelt es sich ebenfalls um Serin-Threonin-Kinasen, welche ihrerseits entweder durch Tyrosin-Kinasen oder durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden können.

Bei dem über ERK1/2 vermittelten TGF- β -Signalweg (Abbildung 3, gelb) fungiert der TGF- β -Rezeptor T β RI – anders als beim Smad-Signaling – als Tyrosin-Kinase, welche über die Rekrutierung von Adapter-Proteinen (Shc, Grb2, Sos) das Ras-Protein aktiviert. Dadurch wird das Signal über Raf und MEK1/2 auf die ERK1/2 MAP-Kinase übertragen, welche wiederum die Transkription über den Transkriptionsfaktor AP-1 vermittelt.¹⁸ Die Aktivierung von ERK wurde in Epithelzellen sowie in Fibroblasten beobachtet^{14, 19, 20} und ist an der EMT beteiligt.^{21,}

22

Zusätzlich existiert ein Crosstalk zwischen ERK1/2 und den Smad-Proteinen. Der ERK1/2-Signalweg greift, abhängig vom jeweiligen Zelltyp sowie der ERK1/2 Aktivierung, in die Smad-Phosphorylierungskaskade ein und wirkt entweder positiv oder negativ auf die Smad-Signal-Weiterleitung. In genetisch transfizierten Zellkulturen wurde die nukleäre Translokation des Smad-Komplexes durch Ras-Raf-MEK1-ERK1/2 unterbunden.²³ Neuere Beobachtungen deuten auf eine inhibierende Wirkung der ERK1/2 auf die Smad3-Phosphorylierung hin, welche durch eine reduzierte Dichte von T β RI an der Zelloberfläche zustande kommen soll.^{15,} ²⁴ Andererseits wurde eine verstärkende Wirkung auf die Smad-abhängige Transkription durch die ERK1/2 vermittelte Phosphorylierung von Smad2²⁵ und Smad3 beobachtet.²⁶ Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie, welche als Substrate von ERK1/2 bekannt sind, interagieren zudem mit dem Smad-Komplex im Nukleus und regulieren die Gentranskription.²⁷ In den Fibroblasten wird die TGF- β -abhängige ERK1/2 Stimulation über den PI3K-Weg vermittelt, welcher langsamer als die Ras-Raf-MEK1-ERK1/2 Kaskade verläuft und somit die Smad-Phosphorylierung erst im Nukleus realisiert. Diese ist sowohl mit einer erhöhten Smad-Transkription als auch mit einer länger andauernden transkriptionalen Aktivität verbunden.²⁸

Neben TGF- β wirken die Zytokine PDGF (*platelet-derived growth factor*) und CTGF (*connective tissue growth factor*) über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen profibrotisch. Auch die vasoaktiven Peptide Angiotensin-II (AT-II)²⁹ und Endothelin-1 (ET-1)³⁰, welche über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wirken,³¹ oder hohe Glukose-Serumkonzentrationen begünstigen die Fibrose³² – eine Erklärung, warum Erkrankungen wie Bluthochdruck und Diabetes mellitus mit vermehrter Fibrose einhergehen.

Die über Angiotensin-II vermittelte profibrotische TGF- β -Signaltransduktion wird über eine Quervernetzung von ERK1/2 mit Smad-Proteinen vermittelt, über welche wiederum die CTGF-Expression reguliert wird.

CTGF ist ein Wachstumsfaktor, der für die Zellproliferation, Migration und Adhäsion von Zellen sowie die Produktion von extrazellulärer Matrix verantwortlich ist.³³ Er fungiert als *downstream*-Mediator von TGF- β . Seine Genexpression wird unter anderem in den Mesangiumzellen der Niere und in den Fibroblasten durch TGF- β initiiert sowie Smad- und MAPK-abhängig vermittelt.^{34, 35} Smad3, jedoch nicht Smad2, ist in die Promoter-Aktivierung der TGF- β -vermittelten CTGF-Transkription involviert.³⁶ Außerdem sind die MAP-Kinasen ERK, p38 und JNK daran beteiligt. Eine Blockade zweier dieser Kinasen führt dazu, dass die CTGF-Expression nicht erhöht werden kann.³⁷ Jedoch ist der Mechanismus des Crosstalks zwischen den Signalwegen noch unklar.³⁸ Eine Interaktion zwischen TGF- β und CTGF wird, wie nachfolgend beschrieben, diskutiert. Durch CTGF werden die über TGF- β vermittelte Myofibroblasten-Differenzierung, die Proliferation der Fibroblasten und die Kollagen-Synthese angeregt.³⁹ Durch direkte Bindung von CTGF an TGF- β wird eine erhöhte TGF- β -Rezeptorbindung und somit eine erhöhte Smad-Phosphorylierung erreicht.⁴⁰ In humanen Mesangiumzellen reduziert CTGF die TGF- β -vermittelte Smad-Phosphorylierung durch Bindung an den TGF- β -Rezeptor III (T β RIII) und vermindert die Affinität von TGF- β zu seinem Rezeptor.⁴¹ Dagegen nimmt die Phosphorylierung der ERK1/2 unter TGF- β - und CTGF-Einfluss zu. Die erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung könnte auf die erhöhte Aktivität des Adapterproteins Src zurückgeführt werden, was zu einer pathologisch vermehrten Genexpression führt.⁴¹ Für die Myofibroblasten-Differenzierung sowie die Fibronectin- und MMP2-Produktion ist der ERK1/2-Signalweg unabdingbar.^{42, 43}

Die Differenzierung von Myofibroblasten aus Epithelzellen (EMT) sowie aus Endothelzellen (EndMT) scheint zellspezifisch von vielen Signalwegen – unter anderem sowohl von der Smad- als auch von der ERK1/2 -Phosphorylierung – abhängig zu sein.^{8, 18, 44}

Die Kollagensynthese, insbesondere Kollagen Typ 1 und 3, wird durch die ERK-abhängige Phosphorylierung der Linker-Region des Smad2/3-Komplexes verstärkt, wobei vor allem ERK2 dafür verantwortlich ist.⁴⁵⁻⁴⁷ Die Regulation von Fibronectin, einer weiteren Komponente der extrazellulären Matrix, steht im Zusammenhang mit dem ERK1/2-abhängigen, jedoch nicht mit dem Smad-abhängigen Weg.⁴⁸⁻⁵⁰

PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) ist der endogene Inhibitor der Plasminogen-Aktivator-Proteine tPA (*tissue plasminogen aktivator*) und uPA (Urokinase) und hat durch die Hemmung der proteolytischen Plasminogen-Aktivator/ Plasmin-Achse bei der Gerinnung und der pathologischen Gewebsfibrose eine entscheidende Bedeutung.⁵¹ PAI-1 hemmt ebenfalls die Plasmin-vermittelte MMP2- und MMP9-Produktion und hat somit einen negativen Einfluss auf die EndMT.⁵¹ Die Regulation von PAI-1 wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren, u. a. durch TGF- β , getriggert und involviert sowohl den Smad- als auch den MAPK-Signalweg.^{52 51, 53}

Für die Degradation von extrazellulärer Matrix sind Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) verantwortlich. Sie erhalten das physiologische Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau von Bindegewebs-Bestandteilen. In fibrotischem Gewebe sind sowohl die Expression als auch die Aktivität der MMPs sowie deren natürliche Inhibitoren pathologisch verändert.

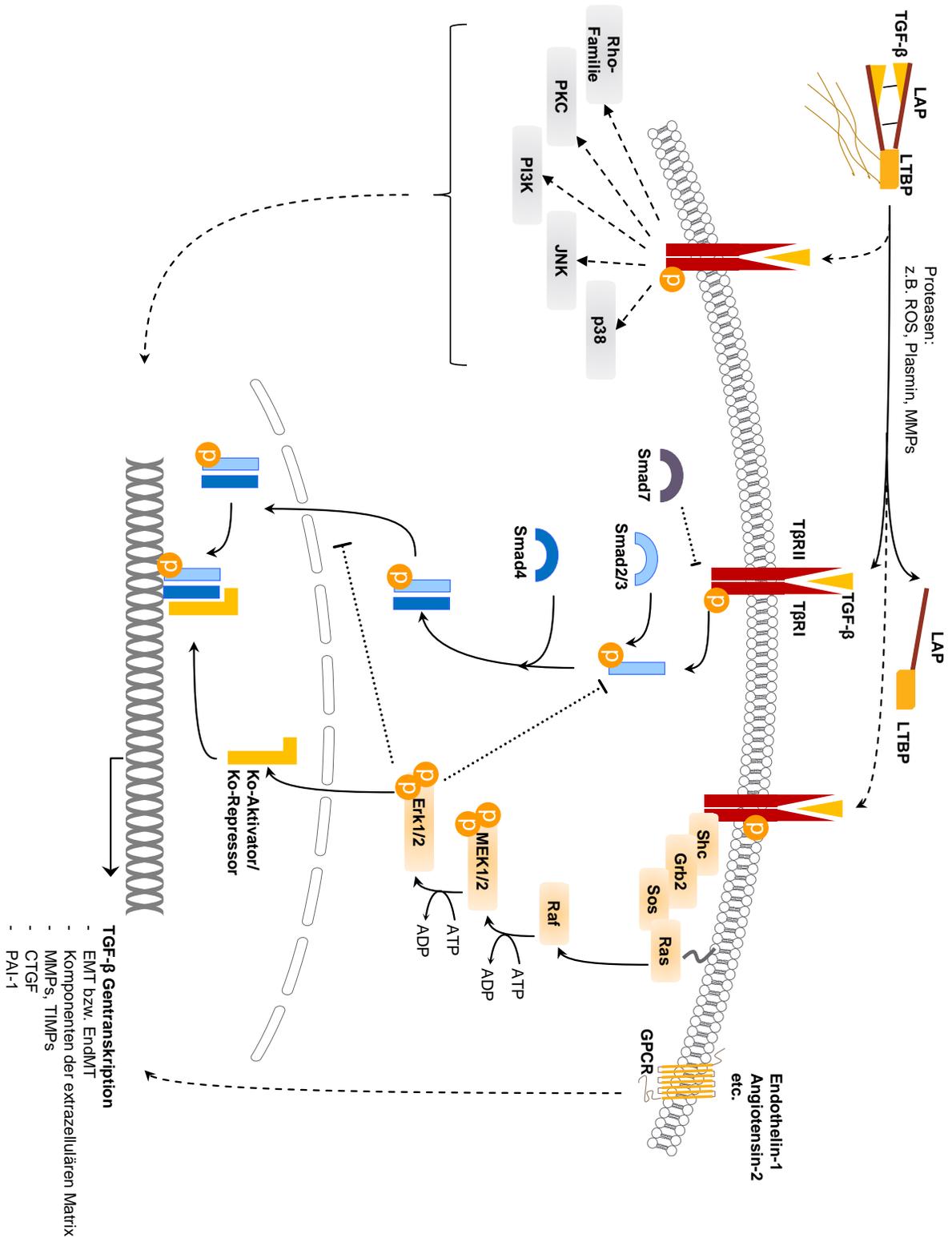


Abbildung 3 Signaltransduktions-Kaskaden von TGF- β Die TGF- β -Signaltransduktion verläuft Smad-abhängig (blau) oder -unabhängig (grau, gelb), z. B. über verschiedene MAP-Kinasen, um die TGF- β -abhängige Gentranskription im Zellkern zu regulieren.

1.1.3 Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) wurden im Jahr 1962 entdeckt⁵⁴ und gehören zur Familie der Zink-abhängigen Proteine. Durch ihre Matrix-degradierenden Eigenschaften nehmen sie eine wichtige Rolle für den Erhalt der Bindegewebs-Homöostase sowohl im gesunden als auch im pathologisch veränderten Gewebe ein. Zusätzlich erfüllen sie verschiedene Aufgaben, die mit immunologischen und reparativen Abläufen einhergehen, auf die hier nicht näher eingegangen wird.⁵⁵

Matrix-Metalloproteinasen werden von Bindegewebszellen und proinflammatorischen Zellen, wie Fibroblasten, Osteoblasten, Endothelzellen, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten oder Lymphozyten, sezerniert.⁵⁶ Sie bestehen aus einer Pro-Domäne, einer katalytischen Domäne und einer Hämapexin-ähnlichen Domäne (außer MMP7, 23 und 26). Die Pro-Domäne verfügt über einen konservierten Cystein-Rest, welcher im inaktiven Pro-Peptid an das Zink-Ion im katalytischen Zentrum bindet. Die Abspaltung der Pro-Domäne führt zu einem sog. *Cystein-Switch*, welcher durch Konformationsänderung das Peptid in die aktive Form umwandelt.

Aktuell wurden 25 humane MMPs beschrieben, wobei diese in 6 verschiedene Gruppen gemäß ihrer Struktur- und Substrat-Spezifität unterteilt werden: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, membranständige MMPs, Matrilysine und andere MMPs (vgl. Anhang, Kapitel 11.1). Die Struktur der Gelatinasen, die in dieser Arbeit näher untersucht werden (MMP2 und MMP9), ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt.⁵⁷

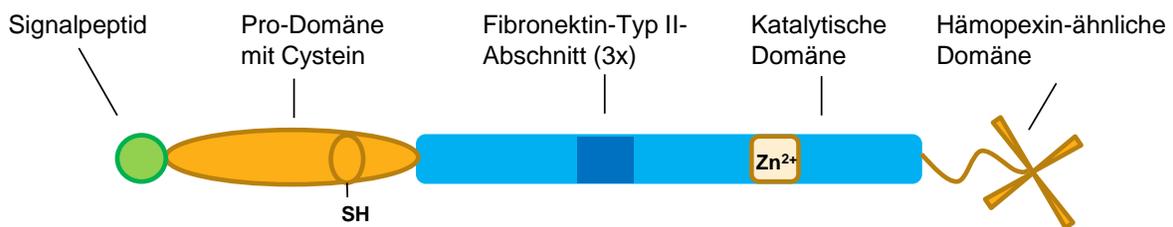


Abbildung 4 Struktur der Gelatinasen MMP2 und MMP9 bestehen aus einem Signalpeptid, einer Pro-Domäne, einer katalytischen Domäne und einer Hämapexin-ähnlichen Domäne. Die Pro-Domäne verfügt über einen konservierten Cystein-Rest, welcher im inaktiven Pro-Peptid an das Zink-Ion im katalytischen Zentrum bindet.

MMP2 und MMP9 spielen bei kardiovaskulären, renalen und pulmonalen Fibrose-assoziierten Erkrankungen eine wichtige Rolle. Diese beiden MMPs zeichnen sich durch die Fibronektin-Typ II-Domäne aus, durch welche sie in der Lage sind, denaturiertes (Gelatine)

und natives Kollagen, Fibronectin, Elastin sowie Laminin abzubauen. MMP2 ist im Gegensatz zu MMP9 zusätzlich fähig, Kollagen Typ 1 - 3 abzubauen.⁵⁷

Die Bedeutung der Gelatinasen in fibrotischem Gewebe ist weitaus komplexer als ursprünglich angenommen. MMP2 und MMP9 haben nicht nur proteolytische Aktivität, sie sind zusätzlich sowohl an inflammatorischen Prozessen als auch an der Myofibroblasten-Aktivierung beteiligt. Weiterhin wird ihnen das Mitwirken an der Zellmigration, Zelladhäsion und der Freisetzung sowie Aktivierung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zugeschrieben. Beispielsweise sind MMP2 und MMP9 in der Lage, TGF- β aus dem inaktiven TGF- β -LTBP-LAP-Komplex abzuspalten.^{55, 58}

Die Regulation von Matrix-Metalloproteinasen kann entweder auf Transkriptionsebene durch Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine oder durch Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktion reguliert werden.^{57, 59} Die Gelatinasen werden in der latenten Form als Zymogene sezerniert und proteolytisch aktiviert. Während MMP9 z. B. durch Plasmin oder NO in die aktive Form überführt wird, wird latentes MMP2 hauptsächlich durch MT-MMPs (membranständige MMPs; vgl. Kapitel 11.1)) gespalten.⁵⁷

Die sog. TIMPs (*tissue inhibitors of MMPs*) agieren als endogene Inhibitoren der MMPs, welche in einem 1:1-Verhältnis die Funktion der Matrix-Metalloproteinasen hemmen. Bis heute sind vier verschiedene TIMPs identifiziert worden (TIMP1-4), wobei – bis auf wenige Ausnahmen – alle MMPs durch jede TIMP blockiert werden können.⁵⁷ Neben der hemmenden Wirkung auf die MMPs haben auch die TIMPs gegensätzliche Effekte. Beispielsweise wird pro-MMP2 durch Komplexbildung mit MT-MMP1 und TIMP2 in die aktive Form gespalten.

TIMP-1 ist der Hauptregulator von MMP-9. TIMP4 ist der noch am wenigsten untersuchte TIMP. Interessant macht ihn die kardioselektive Expression. Unter physiologischen Bedingungen wurden TIMP4-Konzentrationen im Herzen detektiert, jedoch konnte es auch in sehr geringen Konzentrationen im Gewebe des Pankreas, der Niere sowie des Kolons und der Testes nachgewiesen werden.⁶⁰ Keine Expression von TIMP4 wurde in Leber, Gehirn, Lunge, Thymus und Milz detektiert.⁶⁰ Unter fibrotischen Bedingungen wurden aber auch erhöhte TIMP4-Konzentrationen in anderen Organen, wie z. B. der Lunge, dokumentiert.⁶¹

1.1.4 Protektive Rolle des NO-cGMP-cGKI-Signalweges am Beispiel der renalen Fibrose

Die antifibrotische Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) und dem *second messenger* cGMP (zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat), welche an der reduzierten Expression von TGF- β beteiligt sind, wurde in der Niere bereits häufig beschrieben.⁶²⁻⁶⁴ NO ist ein starker Vasodilatator, welcher mithilfe der endothelialen, neuronalen sowie induzierbaren NO-Synthasen (eNOS, nNOS, iNOS) durch Desaminierung von Arginin gebildet wird (vgl. Abbildung 5). NO aktiviert die lösliche Guanylatzyklase, welche aus Guanosin-5'-Triphosphat (GTP) das zyklische Guanosin-3'5'-Monophosphat (cGMP) bildet.^{65, 66} Außerdem katalysiert die durch natriuretische Peptide stimulierte pGC (partikuläre bzw. membranständige Guanylatzyklase) die Entstehung von cGMP aus GTP. Endogenes cGMP ist in fibrotischem Nierengewebe stark erhöht. Durch die pharmakologische Intervention mit cGMP-modulierenden Substanzen, wie z. B. Phosphodiesterase-Inhibitoren oder Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase wurde ein weiterer Anstieg beobachtet. Dadurch konnte das Fortschreiten der renalen Fibrose im Tiermodell verzögert und die Nierenfunktion länger aufrechterhalten werden.⁶² Zielstrukturen von cGMP sind die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGK's) Typ I und Typ II (cGKI, cGKII), die Phosphodiesterasen (PDEs) sowie die CNG-Ionenkanäle (zyklische Nukleotid-aktivierte Kationenkanäle).⁶⁷⁻⁷⁰

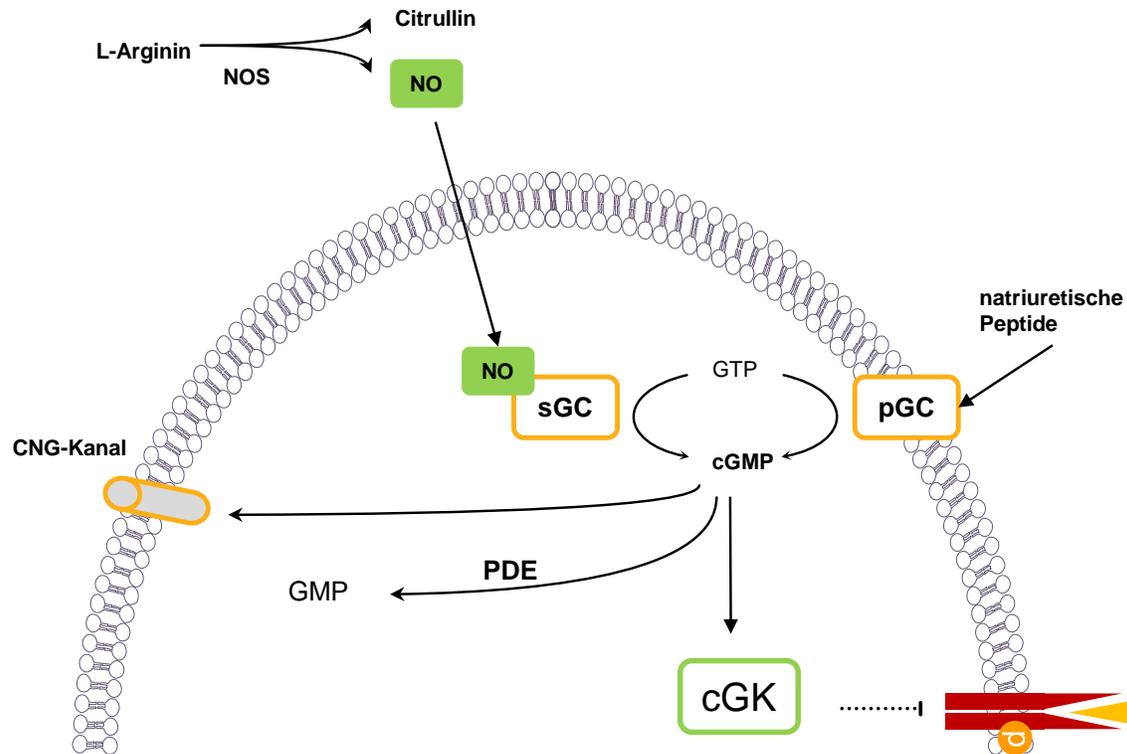


Abbildung 5 NO-cGMP-Signaltransduktion Stickstoffmonoxid (NO) wird über die NO-Synthasen (NOS) aus L-Arginin gebildet und überträgt das Signal auf die lösliche Guanylatzyklase (sGC), welche aus Guanosin-5'-Triphosphat (GTP) das zyklische Guanosin-3'-5'-Monophosphat (cGMP) bildet. Zielstrukturen von cGMP sind die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGKs) Typ I und Typ II, die Phosphodiesterasen (PDEs) sowie die CNG-Ionenkanäle (zyklische Nukleotid-aktivierte Kationenkanäle); GMP – Guanosin-5'-Monophosphat; pGC – partikuläre Guanylatzyklase

Die Proteinkinasen cGKI und cGKII werden durch die Gene *pgrk1* und *pgrk2* codiert und gehören zur Familie der Serin-Threonin-Kinasen.

Die Lokalisation der cGMP-abhängigen Proteinkinasen in der Niere wurde bereits im Jahr 1986 nachgewiesen.⁷¹ Schinner et al.⁶⁴ konnten die cGKI im murinen Nierengewebe in Arteriolen, Mesangium und im kortikalen Gewebe lokalisieren. Durch alternatives Spleißen existieren zwei Isoformen, cGKI α und cGKI β , wobei der cGKI α eine Funktion in der Nierenfibrose zugeordnet wurde.⁶⁴ Die α -Isoform konnte man weiterhin im juxtaglomerulären Apparat sowie in den medullären Fibroblasten nachweisen. Außerdem zeigten Schinner et al., dass die renale Fibrose über das cGMP-cGKI α -Signaling gehemmt werden kann. Auch Cui et al.⁶³ haben eine antifibrotische Wirkung von NO-cGMP-cGKI in der Niere nachgewiesen – jedoch ohne Unterscheidung der Isoformen. Die cGKI wird überwiegend in den glatten Gefäßmuskeln exprimiert, wo eine Aktivierung zu einer Vasodilatation führt. Weiterhin wurde sie sowohl in Fibroblasten als auch in Myofibroblasten detektiert und zeigte

eine vermehrte Expression in fibrotischem Gewebe.⁶⁴ Die NO-cGMP-cGKI-Signalkaskade kann über noch nicht aufgeklärte Mechanismen die Signaltransduktion von TGF- β unterdrücken.

Die Phosphodiesterasen sind eine Gruppe von 11 Enzymen, welche in der Lage sind, zyklische Nukleotide abzubauen. cGMP-spezifische PDEs sind vor allem PDE1 und PDE5. Nimodipin ist ein experimentell eingesetzter Inhibitor der PDE1, welcher in Tierversuchen mit einer verbesserten Nierenfunktion assoziiert war. PDE5-Inhibitoren, wie z. B. Sildenafil, sind für die Behandlung der erektilen Dysfunktion sowie der pulmonalarteriellen Hypertonie zugelassen. Bei deren Einsatz in murinen Nierenfibrose-Modellen wurde ebenfalls ein positiver Einfluss auf das Remodeling in der Niere beobachtet.^{63, 64}

1.1.5 Therapieoptionen bei fibrotischen Erkrankungen

In den westlichen Industriestaaten sind ca. 45 % aller Todesfälle auf ein Organversagen infolge einer Fibrose zurückzuführen.¹ Bis heute sind jedoch kaum effektive Therapieoptionen zur Behandlung oder Prävention von Organfibrosen verfügbar. Bei sekundären Fibrosen steht vor allem die Behandlung der Grunderkrankung im Vordergrund. Weiterhin werden Immunsuppressiva zur Hemmung der Immunantwort bzw. der Myofibroblastenaktivität eingesetzt oder die Behandlung erfolgt rein symptomorientiert. Im Endstadium kann eine Organtransplantation angedacht werden.

Bei Fibrose-assoziierten Erkrankungen in Herz und Nieren wird vor allem das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System therapeutisch adressiert. ACE-Inhibitoren und Angiotensin-Rezeptor-Blocker sowie Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten verbesserten die Nierenfunktion und verringerten das Auftreten von kardialen Arrhythmien (zusammengefasst in Rokey et al., 2015⁷²). In der idiopathischen Lungenfibrose wurden vor Kurzem die Wirkstoffe Pirfenidon und Nintedanib zugelassen. Pirfenidon zeigte eine verlangsamte Krankheitsprogression und eine erhöhte Überlebensrate. Die antifibrotischen und antiinflammatorischen Eigenschaften der Substanz werden zum Teil durch die Inhibition der TGF- β -Signalkaskade erreicht. Der genaue Wirkmechanismus ist noch unklar.⁷³ Nintedanib ist ein Multikinase-Inhibitor, der ebenfalls die Progression der idiopathischen Lungenfibrose verzögert.⁷⁴

Rosenbloom et al.⁷⁵ liefern eine umfassende Zusammenfassung vielversprechender neuer pharmakologischer Ansätze sowohl aus der präklinischen als auch klinischen Entwicklung,

welche an verschiedenen Angriffspunkten die profibrotische Signalweiterleitung inhibieren, unter anderem über:

- TGF- β -Expression und -Aktivierung
- TGF- β -Signaltransduktion
- Lymphozyten-Homing
- Regulation der Transkription.

In einem kürzlich von Samuel et al.⁷⁶ veröffentlichten Review wurde dem bereits in den 1920er Jahren entdeckten Relaxin-2 als vielversprechende antifibrotische Therapiemöglichkeit großes Potential zugeschrieben.

Allerdings kann ein antifibrotischer Effekt in der klinischen Praxis nur schwer durch nicht-invasive Methoden nachgewiesen werden, was die Evaluation der Wirksamkeit neuer Substanzen herausfordernd macht. In den meisten Studien werden eine verlangsamte Krankheitsprogression, ein verlängertes Überleben oder Biomarker als Surrogat-Parameter für die organprotektive bzw. antifibrotische Wirkung verwendet.

1.2 Serelaxin – eine organprotektive Behandlungs-Option

Serelaxin – die rekombinante Form des humanen Schwangerschaftshormons Relaxin-2 – hat in einer Phase III Studie an mehr als 1000 Patienten mit akuter Herzinsuffizienz neben einer Symptomverbesserung auch einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Placebo bis Tag 180 gezeigt (37 % relative Risiko-Reduktion der kardiovaskulär bedingten Todesfälle, $p=0,028$; 37 % relative Risiko-Reduktion der Gesamtmortalität, $p=0,019$) und war dabei mit einer organprotektiven Wirkung in der Niere, im Herzen sowie in der Leber assoziiert.^{77, 78} Es wurde diskutiert, dass Serelaxin während der akuten Dekompensation eine durch Remodeling-Prozesse entstehende Organschädigung verhindern könnte.⁷⁹ Allerdings konnte, wie kürzlich bekannt geworden, die RELAX-AHF-2 Studie die primären Endpunkte (Reduktion kardiovaskulärer Mortalität in den ersten 180 Tagen, Verringerung des Ereignisses *Worsening Heart Failure* in den ersten fünf Tagen) nicht erreichen.⁸⁰ Ob in dieser Studie der organprotektive Effekt von Serelaxin reproduzierbar war, ist aktuell noch nicht bekannt.

1.2.1 Entwicklung von Serelaxin

Forscher um Hisaw et al.⁸¹ haben in den 1920er Jahren eine antifibrotisch wirksame Substanz im Blutserum schwangerer Meerschweinchen entdeckt. Sie injizierten das Serum dieser Tiere jungfräulichen Meerschweinchen und beobachteten dabei eine Relaxation des pubischen Ligaments und den Umbau des Bindegewebes. Aufgrund der beobachteten Eigenschaften wurde die entdeckte Substanz *Relaxin* genannt. Für weitere Untersuchungen wurde nun das Peptidhormon systematisch aus dem Lutealkörper von Schweinen bzw. aus der Plazenta von Kaninchen extrahiert.⁸²

Erst in den 90er Jahren konnte die Struktur von Relaxin, welches Ähnlichkeiten zu Insulin aufweist, aufgedeckt werden (vgl. Abbildung 6).⁸³ Die Relaxin-Familie besteht aus 3 verschiedenen Relaxin-Genen (*rln1-3*), jedoch konnte nur das Peptid Relaxin-2 (aus *rln2*) im menschlichen Serum detektiert werden (im Folgenden Relaxin genannt). Andere Säugetierarten (keine Primaten) besitzen nur die Relaxin-Gene *rln1* und *rln3*, wobei hier *rln1* dem humanen *rln2* entspricht.

Relaxin ist ein 6,3 kDa großes Peptidhormon und besteht aus 53 Aminosäuren. Zwei Peptidketten (A-Kette, B-Kette) werden über 2 intermolekulare Disulfid-Brücken miteinander

verbunden. Außerdem verfügt die A-Kette über eine zusätzliche intramolekulare Disulfid-Brücke (Abbildung 6).^{2, 84} Serelaxin wurde in einem rekombinanten und synthetischen Verfahren hergestellt und ist strukturell identisch mit dem humanen Relaxin-2 (Relaxin).

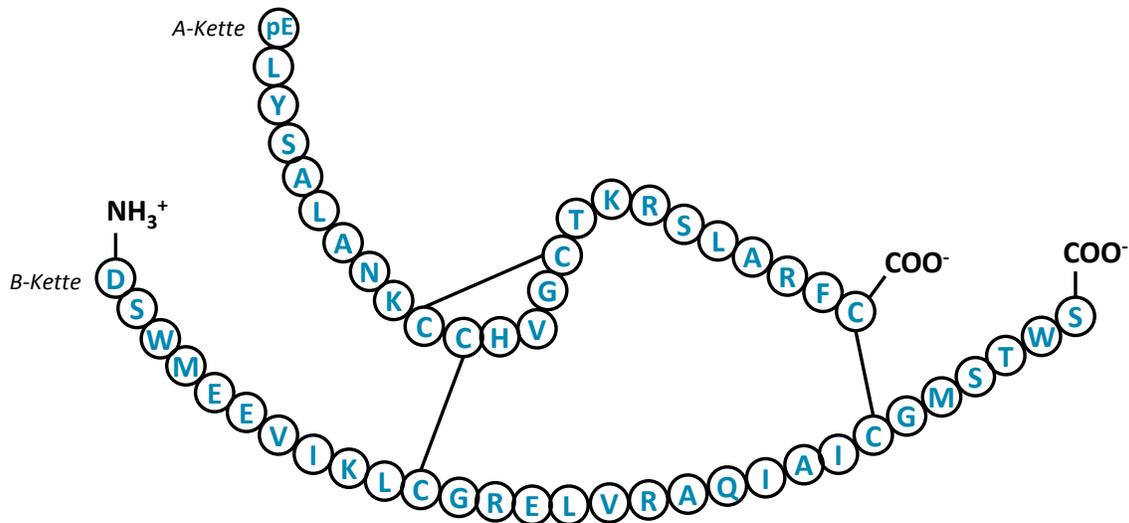


Abbildung 6 Aminosäure-Sequenz von humanem und rekombinantem Relaxin-2 (nach Teichman et al., 2009⁸⁴); es besteht aus 53 Aminosäuren. Zwei Peptidketten (A-Kette, B-Kette) werden über 2 intermolekulare Disulfid-Brücken miteinander verbunden, die A-Kette über eine zusätzliche intramolekulare Disulfid-Brücke

Serelaxin ist ein Peptid mit vasodilatatorischen, antiinflammatorischen, antiischämischen sowie antifibrotischen Eigenschaften und wurde erstmals in den 80er Jahren aufgrund seiner pleiotropen Eigenschaften in klinischen Prüfungen am Menschen eingesetzt. Untersuchungsgebiete waren in den darauffolgenden Jahren die Zervixreifung, Präeklampsie, Unfruchtbarkeit, Fibromyalgie, Kieferchirurgie, systemische Sklerose sowie Herzinsuffizienz und Hypertonie der Portalvene.⁸⁵ Erstere Indikationen wurden hauptsächlich aufgrund der fehlenden Wirksamkeit von Serelaxin nicht weiter verfolgt. Bisher wurden mehr als 1900 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen im Rahmen von klinischen Studien mit dem Peptidhormon behandelt (interne Dokumente, Novartis Pharma). Allerdings haben auch die im Frühjahr 2017 bekannt gegebenen Ergebnisse der RELAX-AHF-2 Studie bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz die primären Endpunkte Reduktion der kardiovaskulären Mortalität und der Verschlechterung bei initial stabilisierten Patienten mit akuter Herzinsuffizienz (AHF) nicht erreicht.⁸⁰

1.2.2 Signaltransduktion von Serelaxin

Im Jahr 2002 entdeckten Hsu et al.⁸⁶ die Rezeptoren LGR7 und LGR8, welche durch Relaxin aktiviert werden. Diese wurden später als RXFP1 und RXFP2 Rezeptoren (*relaxin family peptide receptors*) bezeichnet. RXFP1 wurde in vielen Organen, unter anderem im Gehirn, den Nieren, dem männlichem und weiblichem Reproduktionstrakt sowie im Gefäßsystem und im Herzen nachgewiesen.^{86, 87} Obwohl RXFP2 eng verwandt mit RXFP1 ist, weist Relaxin eine höhere Bindungsaffinität zum RXFP1-Rezeptor auf.² RXFP2 zeigt ebenfalls eine Expression im Gehirn, den Nieren und dem Reproduktionstrakt, zusätzlich zu RXFP1 wird er noch in Muskeln, Blutzellen sowie Knochenmark exprimiert.⁸⁶ Ein Jahr später wurden von Liu et al. zwei weitere Relaxin-Rezeptoren, RXFP3 und RXFP4, in verschiedenen Geweben lokalisiert.^{88, 89} Der RXFP1-Rezeptor ist laut Bathgate et al.⁹⁰ für die Signaltransduktion von Relaxin bei kardiovaskulären Erkrankungen von größter Bedeutung.

Bei der RXFP-Familie handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, welche initial über $G\alpha_s$ die Adenylatzyklase (AC) aktivieren und somit zu einem cAMP-Anstieg führen.⁸⁶ Ebenso kann die Adenylatzyklase über $G\alpha_{OB}$ inhibiert werden. Zusätzlich wird cAMP durch die Aktivierung des $G\alpha_{i3}$ -gekoppelten Proteins erhöht, welches die Adenylatzyklase über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die Proteinkinase C (PKC) aktiviert.² Ein späterer cAMP-Anstieg scheint durch die Phosphorylierung von Tyrosin-Kinasen sowie der ERK1/2 vermittelt zu werden.^{91, 92} Welcher Signalweg aktiviert wird, ist rezeptor- und zellabhängig (zusammengefasst von Du et al.⁹³; vgl. Abbildung 7).

Einen weiteren Signalweg stellt der NO-cGMP-Signalweg dar. Es gibt jedoch unterschiedliche Hypothesen, wie es zu einer Erhöhung von NO kommt. Eine Beteiligung der endothelialen, induzierbaren sowie neuronalen NO-Synthasen welche über die lösliche Guanylatzyklase (sGC) zur Bildung von cGMP beitragen,⁹⁴ wird diskutiert.^{95, 96} Weiterhin können hierbei auch die stark vasokonstriktiven und profibrotischen Effekte von Endothelin-1 (ET-1) abgeschwächt werden, indem die Rezeptor-Expression sowie die Aktivität des endothelialen ET_B durch Serelaxin erhöht werden. Dieser wirkt – im Gegensatz zum ET_A -Rezeptor – vasodilatativ und regt die NO-Produktion an (vgl. Abbildung 7).^{96, 97}

Zudem wird ein RXFP1-unabhängiger Signalweg als Relaxin-Wirkmechanismus vermutet. Dabei wirkt Relaxin intrazellulär durch Bindung an den Glukokortikoid-Rezeptor, wodurch sich unter anderem der antiinflammatorische Effekt von Relaxin begründen lässt. Neben der agonistischen Wirkung am Glukokortikoid-Rezeptor erhöht Relaxin zusätzlich die

Genexpression des Rezeptors sowie mögliche Bindungsstellen am Rezeptor (vgl. Abbildung 7).⁹⁸

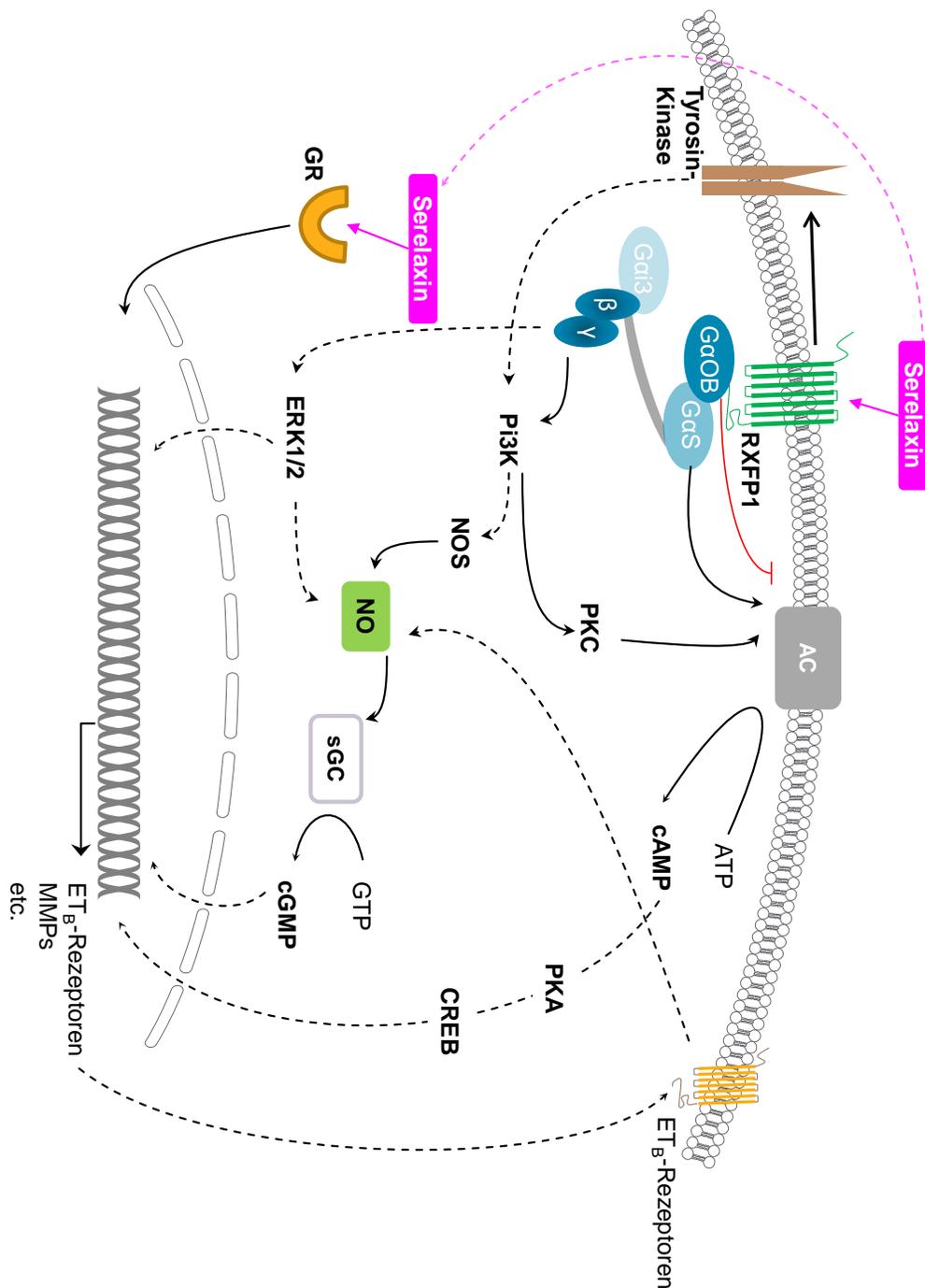


Abbildung 7 Signaltransduktion von Serelaxin (modifiziert nach Du et al.,⁹³ Bathgate et al.,² Schinner et al.⁹⁹); Serelaxin führt über die Bindung an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor RXFP1 über verschiedene Mechanismen zur Erhöhung der zyklischen Nucleotide cAMP und cGMP. Diese führen zur Gentranskription diverser Proteine, wie z. B. ET_B-Rezeptoren oder MMPs.

1.2.3 Physiologische Wirkungen von Relaxin

Relaxin war seit seiner Entdeckung aufgrund seiner physiologischen Eigenschaften während der Schwangerschaft und vor allem als geburtsvorbereitendes Hormon bekannt und wurde wegen der antifibrotischen Effekte durch Erweichung der extrazellulären Matrix im *ligamentum pubicum* als auch im *cervix uteri* näher untersucht. Bei Frauen zirkuliert Relaxin während der Lutealphase des Menstruationszyklus in sehr geringer Konzentration (ca. 50 pg/ml), erreicht in der 10. - 12. Woche der Schwangerschaft die maximale Serumkonzentration von 1 ng/ml und hält ab der 26. Woche eine konstante Konzentration von ca 400 pg/ml bis zum Ende der Schwangerschaft.⁸³ In Tierversuchen an Mäusen wurde die Bedeutung von Relaxin während der Schwangerschaft deutlich: so fördert das Hormon die Einnistung der befruchteten Eizelle¹⁰⁰ und *relaxin*-defiziente Tiere weisen ein geringeres Wachstum und eine verminderte Differenzierung der weiblichen Brustwarzen auf.¹⁰¹⁻¹⁰³ Beim Menschen sind erhöhte Relaxin-Konzentrationen in Dezidua- oder Uterusgewebe mit Frühgeburten assoziiert. Dies ist auf eine erhöhte Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen unter Relaxin-Einfluss zurückzuführen, welche mit einem vorzeitigen Blasensprung einhergeht.¹⁰⁴

Lange Zeit wurde Relaxin hauptsächlich mit dem Fokus auf die Fortpflanzung sowohl bei Frauen als auch bei Männern untersucht. Männer haben einen Relaxin-Serumspiegel von 1 - 5 pg/ml, das Hormon wurde in der Prostata nachgewiesen und wirkt sich positiv auf die Fertilität des Mannes aus.^{105, 106} In männlichen *relaxin*- und *rxfp1*-defizienten Mäusen waren die Entwicklung des Reproduktionssystems sowie die Reifung und Motilität der Spermien reduziert.^{107, 108}

Mit der Erhöhung der Relaxin-Konzentrationen finden auch hämodynamische und renale Veränderungen im schwangeren Körper statt, die mit der Wirkung von Relaxin assoziiert sind. Der systemische Gefäßwiderstand nimmt ab, was zu einer Erhöhung des renalen Blutflusses, der glomerulären Filtration sowie des Herzzeitvolumens führt. Gleichzeitig nimmt die arterielle Compliance zu. Bei Versuchen an Ratten konnten nach Verabreichung von Relaxin dieselben hämodynamischen Effekte beobachtet werden, jedoch nicht bei gleichzeitiger Gabe eines Relaxin-spezifischen Antikörpers.¹⁰⁹

Eine erhöhte endogene Relaxin-Konzentration im Plasma wurde bei Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Herzinsuffizienz aufgrund einer dilatativen oder ischämischen Kardiomyopathie im Vergleich zu Patienten ohne struktureller Veränderungen beobachtet.

Die endogene Relaxin-Konzentration normalisierte sich nach Gabe von Vasodilatoren, korrelierte mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz und zeigte eine inverse Korrelation mit dem Vasokonstriktor Endothelin-1.¹¹⁰ Prognostisch wertvoll zeigten sich erhöhte Relaxin-Konzentrationen in Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz.¹¹¹ In Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz konnte dies jedoch nicht nachgewiesen werden.¹¹² Bei Patienten mit pulmonalarterieller Hypertonie lagen ebenfalls erhöhte Plasmaspiegel vor, welche mit dem Ausmaß der rechtsventrikulären Dysfunktion korrelierten.¹¹³

1.2.4 Pleiotrope Wirkungen von Serelaxin

Die organprotektiven Effekte von Serelaxin erklärt man sich aus einem Zusammenspiel der pleiotropen Wirkweisen, die im Folgenden erläutert werden.

1.2.4.1 Vasodilatation

Die Gabe von Relaxin an nicht-schwangere Menschen und Tiere liefert vasodilatative Effekte im systemischen Kreislauf, welche überwiegend durch den Endothelin-Rezeptor ET_B sowie NO vermittelt werden.

Erste Hinweise auf eine Beteiligung des vasodilatativen NO-Signalweges wurden von Bani et al.¹¹⁴ erwähnt. Zusätzlich antagonisiert Relaxin die Wirkung der zwei vasokonstriktiven Mediatoren Endothelin-1 und Angiotensin-II. Die Angiotensin II-vermittelte Sekretion von Endothelin-1 wurde durch Relaxin gehemmt. Außerdem wird die Expression des Endothelin-Rezeptors ET_B, welche im Gegensatz zum vasokonstriktiv wirkenden ET_A-Rezeptor zu einer NO-abhängigen Vasodilatation führt, durch Relaxin in Endothel- sowie in Epithelzellen hochreguliert. In Gefäßmuskelzellen, in welchen dieser Rezeptor-Typ eine Vasokonstriktion bewirkt, bleibt die ET_B-Expression unverändert. Weiterhin steigert Relaxin die Clearance von Endothelin-1^{97, 110} und die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen, v.a. von MMP2, welches Big-Endothelin zum aktiven Endothelin spaltet.^{96, 115}

Der systemische Gefäßwiderstand (SVR) war in Ratten nach Infusion von Relaxin erniedrigt und das Herzzeitvolumen (CI) erhöht – bei krankhaft erhöhtem SVR stärker als bei normalem SVR.¹¹⁶

Der renale Blutfluss sowie die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) werden im ersten Trimenon der Schwangerschaft um 45 % gesteigert (vgl. Kapitel 1.2.3).¹¹⁷ Die renale Relaxin-Wirkung

wird durch Vasodilatation der afferenten sowie efferenten renalen Arteriole bewerkstelligt. Der renale Blutfluss sowie die glomeruläre Filtrationsrate wurden in Ratten ca. 1-2 Stunden nach einer Infusion von Relaxin über die Aktivierung der ET_B-NO-cGMP-Signalkaskade gesteigert.^{118, 119} Bei gesunden Freiwilligen sowie chronisch herzinsuffizienten Patienten wurde durch Relaxin nur der renale Blutfluss gesteigert, jedoch nicht die glomeruläre Filtrationsrate.^{120, 121}

In einer klinischen Pilotstudie an 16 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz wurden nach 24-stündiger Relaxin-Infusion von 10 bis 960 µg/kg/d mit einer Vasodilatation einhergehende hämodynamische Veränderungen verzeichnet, wie z. B. ein erhöhtes Herzzeitvolumen (CO), ein erniedrigter systemischer Gefäßwiderstand (SVR) und vor allem bei niedrigeren Dosen ein erniedrigter pulmonalarterieller Verschlussdruck (PAWP) ohne signifikante Hypotonien. Das hämodynamische Profil wirkte sich positiv auf den zeitlichen Verlauf von NT-proBNP, ein Marker für die kardiale Wandspannung, sowie des Nierenfunktions-Markers Kreatinin und Harnstoff im Serum aus.¹²² Auch in einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Studie an Patienten mit akuter Herzinsuffizienz konnten der pulmonalarterielle Verschlussdruck, der pulmonalarterielle Druck (PAP), der systemische Gefäßwiderstand und der Blutdruck nach Serelaxin-Infusion gesenkt werden.¹²³

1.2.4.2 Zellschutz

In Ischämie-Reperfusionen-Modellen am Herzen verringerte Relaxin den Reperfusionsschaden durch kardioprotektive Effekte, wodurch die Inflammation, der Zelltod, der oxidative Stress sowie die Calcium-Überladung abnahmen. Dies senkte die Infarktgröße, die Arrhythmie-Rate und die Mortalität.¹²⁴⁻¹²⁶ Die antiapoptotische Wirkung wird durch Beeinflussung des molaren Verhältnisses zwischen antiapoptotischem Bcl2 und proapoptotischem Bax sowie durch die Akt-Expression geregelt.¹²⁷ Unemori et al.¹²⁸ haben die angiogene Wirkung von Serelaxin über die cAMP-abhängige Erhöhung von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) in kultivierten Endometrium-Zellen beschrieben. Auch *in vivo* hat Relaxin die Expression von VEGF und bFGF (*basic fibroblast growth factor*) in Zellen des Wundheilungsapparates erhöht.^{129, 130} Außerdem bildeten sich durch Relaxin in der Infarkt-Region in einem Mausmodell Blutgefäße dichter aus.¹³¹

Die antiinflammatorische Wirkung von Relaxin wird nicht über den Relaxin-Rezeptor RXFP1, sondern unabhängig davon über den intrazellulär exprimierten Glukokortikoid-Rezeptor vermittelt.¹³² Relaxin unterdrückt über diesen Rezeptor die Transkription des

proinflammatorischen Transkriptionsfaktors AP-1¹³² und verhindert die Histamin-Ausschüttung aus Mastzellen sowohl in Ratten als auch in Meerschweinchen.¹³³ Außerdem wird die Leukozyten- und Neutrophilen-Rekrutierung^{126, 134} sowie die Ausschüttung von TNF- α , IL-1 und IL-6 aus Makrophagen gesenkt.⁹⁸ Dschietzig et al.⁹⁸ beobachteten zusätzlich eine gesteigerte Aktivität und Expression des Glukokortikoid-Rezeptors. Horton et al.¹³⁵ und Figueiredo et al.¹³⁶ postulieren jedoch eine proinflammatorische Wirkung von Relaxin in Abhängigkeit von RXFP1 bei längerfristiger Verabreichung bzw. einer höheren Dosis von Relaxin.

1.2.4.3 Reduktion der Fibrose

Seinen antifibrotischen Effekt entfaltet Relaxin sowohl durch den Abbau von Bestandteilen der extrazellulären Matrix als auch durch den verringerten Aufbau neuer Matrix. Bereits bei der Entdeckung endogenen Relaxins wurde eine Relaxation der Schambeinfuge von Meerschweinchen (als Vorbereitung der Niederkunft) beobachtet.⁸¹ *Relaxin*-defiziente Mäuse wiesen sowohl in weiblichen als auch in männlichen Tieren eine veränderte Entwicklung des Reproduktionstraktes auf.¹⁰⁵

Außerdem entwickeln *relaxin*-defiziente Mäuse eine altersbedingte Fibrose in verschiedenen Organen, unter anderem in Herz,¹³⁷ Niere¹³⁸ und Lunge,¹³⁹ welche durch eine Relaxin-Infusion zu einem gewissen Teil wieder reversibel war. In verschiedenen experimentell induzierten Fibrosemodellen wurde der antifibrotische Effekt ebenfalls bestätigt. In der Lunge wurde durch die Behandlung mit Relaxin eine Bleomycin-induzierte Fibrose reduziert.¹⁴⁰ In der Niere wurde die Fibrose sowohl bei einer Erkrankung der glomerulären Basalmembran,¹⁴¹ bei Bromethylamin-induzierter Fibrose,¹⁴² nach renaler Gewebsentfernung¹⁴³ als auch im Hypertonie-Modell¹⁴⁴ reduziert und somit die Organfunktion erhalten. Endogenes Relaxin verhinderte strukturelle Veränderungen nur in einer frühen Phase, fortgeschrittene Fibrosen konnten nicht gemildert werden.^{145, 146}

Die organprotektive Wirkung von Relaxin resultiert aus einem Zusammenspiel der pleiotropen Eigenschaften. Dies ist allerdings vor allem auf die antifibrotische Eigenschaft der Substanz zurückzuführen, da in verschiedenen Fibrose-Modellen eine vasodilatative und antiinflammatorische Wirkung der Substanz als Hauptursache für die organprotektive Eigenschaft ausgeschlossen worden ist.^{143, 146}

In Patienten mit stabiler diffuser Sklerodermie konnte unter Therapie mit Relaxin eine verringerte Verdickung der Dermis beobachtet werden.¹⁴⁷ Da diese Beobachtung jedoch in einer Phase III-Studie nicht bestätigt werden konnte, wurde das Entwicklungsprogramm für Serelaxin für diese Indikation eingestellt.¹⁴⁸

Der antifibrotische Signalweg von Serelaxin, welcher bisher nur lückenhaft untersucht wurde, ist in Abbildung 8 dargestellt. In renalen Myofibroblasten wurde beobachtet, dass Relaxin über RXFP1 zu einer verstärkten ERK1/2-Phosphorylierung führte und dadurch über die neuronale NO-Synthase und NO-sGC-cGMP die Signaltransduktion von TGF- β inhibierte.^{94, 95} Der abgeschwächte TGF- β -Effekt wird durch eine verringerte Smad2-Phosphorylierung realisiert.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ Dies resultiert in einer reduzierten Produktion von extrazellulärer Matrix und Myofibroblasten-Differenzierung sowohl in Menschen¹⁴⁹ als auch in Nagern.^{150, 152} Laut Chow et al.⁹⁵ wird die Hochregulation der Matrix-abbauenden MMPs und die Reduktion der MMP-inhibierenden TIMPs ebenfalls durch Relaxin moduliert, welches überwiegend durch die TGF- β -iNOS-Signalkaskade vermittelt wird. Aktuelle Untersuchungen haben ergeben, dass die Wirkung von Relaxin über den RXFP1-Rezeptor nur als Heterodimer mit dem Angiotensin-Rezeptor 2 (AT2-Rezeptor) unabhängig von dessen Ligand entfaltet wird. Der fehlende Einfluss von Relaxin auf die basale Bildung von extrazellulärer Matrix im gesunden Gewebe ist möglicherweise auf die vermehrte Expression von AT2-Rezeptoren in pathologisch verändertem Gewebe zurückzuführen.^{140, 153-155}

In anderen Organen wurden weitere Signaltransduktionswege untersucht, deren Funktion in der Niere jedoch noch unbekannt ist. In der Lunge wurde durch Relaxin die Myofibroblasten-Kontraktilität gehemmt, indem die induzierbare NO-Synthase über den NO-cGMP-abhängigen Signalweg die cGMP-abhängige Kinase aktivierte und somit die profibrotische RhoA-ROCK-Kaskade inhibierte.¹⁵⁶ Die kardiale Fibrose wurde durch eine verringerte TGF- β -Signaltransduktion nach Serelaxin Behandlung verringert, indem sowohl die Phosphorylierung von Smad3 als auch das TGF- β -Signal durch den Notch-Signalweg gehemmt wurde.^{157, 158}

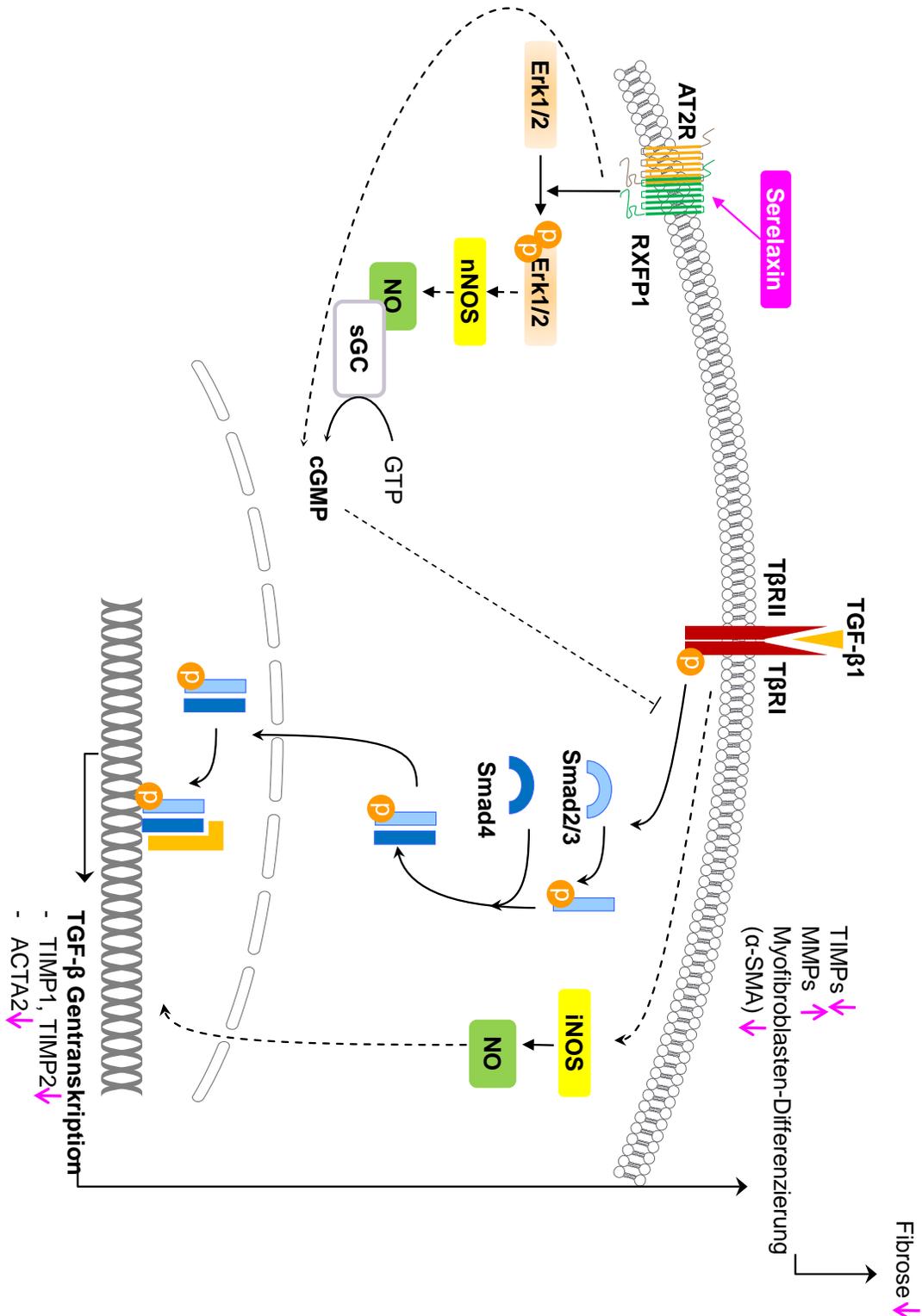


Abbildung 8 antifibrotische Signaltransduktion von Serelaxin am Beispiel der Nierenfibrose (modifiziert nach Samuel et al., 201576); Serelaxin wirkt über den RXFP1-Rezeptor, der einen Heterodimer mit dem Angiotensin-Rezeptor-2 (unabhängig von dessen Ligand) bildet. Die Rezeptor-Bindung führt zu einer Erhöhung der cGMP-Konzentration, welches in der Lage ist, den TGF- β -abhängigen Smad-Signalweg zu hemmen.

1.2.5 Serelaxin in der akuten Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist ein komplexes klinisches Syndrom, das durch eine strukturelle oder funktionelle Störung des Herzens verursacht wird. Die Folge ist eine Minderversorgung des Gewebes mit Sauerstoff. Definierende Symptome und Zeichen wie Lungenstauung (pulmonale Rasselgeräusche, Dyspnoe), periphere Ödeme, erhöhte zentralvenöse Drücke, Müdigkeit und Gewebehypoxie sind Ausdruck eines kardialen Vorwärts- oder Rückwärtsversagens. Dabei wird zwischen einer unzureichenden ventrikulären Füllung (Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion) und einer mangelnden Auswurfleistung (Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion) unterschieden.^{159, 160}

Die akute Herzinsuffizienz kann als Verschlechterung einer manifesten chronischen Herzinsuffizienz oder auch *de novo* (z. B. nach Myokardinfarkt) auftreten. Sie ist durch schnelles Einsetzen bzw. Verschlechterung von lebensbedrohlichen Anzeichen und Symptomen einer Herzinsuffizienz gekennzeichnet, die unmittelbar eine Therapie erfordern und normalerweise zur Hospitalisierung führen.¹⁶⁰ Patienten befinden sich im Verlauf der chronischen Erkrankung in einer Abwärtsspirale mit progressiv abnehmender Herzfunktion und Lebensqualität, welche durch akute Dekompensationen beschleunigt wird.¹⁶¹ Hämodynamische und neurohumorale Veränderungen, wie z. B. die Aktivierung des Sympathikus, der Renin-Angiotensin-Aldosteron-Achse, der Ausschüttung von Vasopressin und der Freisetzung von Zytokinen, dienen als Kompensationsmechanismen. Längerfristig und während der akuten Dekompensation führen diese jedoch zu Endorganschäden. Durch ihre fibrotischen sowie apoptotischen Eigenschaften verändert sich die Gewebestruktur in der Niere, der Leber und im Herzen.¹⁶² Die Schäden können meist nicht wieder vollständig rückgängig gemacht werden und erhöhen somit das Risiko für erneute akute Ereignisse.

Die erste Studie zur Wirksamkeit von Serelaxin war die Placebo-kontrollierte Phase II Dosisfindungs-Studie Pre-RELAX-AHF. Dabei wurden 234 Patienten mit akuter Herzinsuffizienz, einem systolischen Blutdruck > 125 mmHg sowie einer leicht bis mäßig eingeschränkten Nierenfunktion (eGFR: 30-75 ml/min/1,73m²) innerhalb von 16 Stunden nach Hospitalisierung eingeschlossen.¹⁶³ Serelaxin wurde zusätzlich zur Standardtherapie für 48 Stunden mit einer Rate von 10, 30, 100 oder 250 µg/kg/d infundiert. Eine Dosis von 30 µg/kg/d (n=42) brachte das beste Ergebnis im Vergleich zur Placebo-Behandlung (n=61) und verbesserte die Dyspnoe der Patienten im Akutstadium bereits nach 6, 12 und 24 Stunden bei 23 % der Patienten unter Placebo-Behandlung sowie bei 40 % unter Serelaxin-

Behandlung (gemessen mit der 7-stufigen Likert-Skala; $p=0,044$). Serelaxin deutete darauf hin, die Dyspnoe bis Tag 14 anhaltend zu verbessern (gemessen mit der visuellen Analogskala; $p=0,053$). Weiterhin verkürzte sich der Krankenhausaufenthalt von 12,0 Tagen (unter Placebo) auf 10,2 Tage (unter 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ Serelaxin) und es verringerte sich die Mortalität sowie die Rehospitalisierung, da renale oder kardiale Folgeereignisse bis zum Tag 60 seltener auftraten ($p=0,53$).¹⁶³

In die Phase III-Studie RELAX-AHF wurden 1161 Patienten eingeschlossen, die zusätzlich zur Standardmedikation entweder mit 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ Serelaxin ($n=581$) oder mit Placebo ($n=580$) für einen Zeitraum von 48 Stunden behandelt wurden.⁷⁷ Das Studiendesign sowie die Patienten-Population war ähnlich mit Pre-RELAX-AHF. Die Studie erreichte einen der zwei primären Endpunkte, welcher – gemessen mittels *visueller Analogskala (VAS; 100mm)* eine signifikante Überlegenheit von Serelaxin gegenüber Placebo in Bezug auf die von den Patienten berichtete Dyspnoe-Verbesserung bis Tag 5 darstellte. Der ko-primäre Endpunkt, eine moderate oder ausgeprägt verbesserte Dyspnoe seit Beginn der Serelaxin-Infusion gemessen anhand der 7-stufigen Likert-Skala nach 6, 12 und 24 Stunden wurde verfehlt.

Die sekundären Wirksamkeits-Endpunkte – die Überlegenheit von Serelaxin gegenüber Placebo hinsichtlich Überlebenstagen außerhalb des Krankenhauses bis Tag 60 und kardiovaskulärer Tod oder Rehospitalisierung aufgrund von Herz- oder Niereninsuffizienz bis zu Tag 60 – wurden in dieser Studie ebenfalls nicht erreicht. Jedoch war sowohl die Gesamt-Mortalität nach 180 Tagen als auch die Mortalität aufgrund einer kardiovaskulären Erkrankung nach 180 Tagen um jeweils 37 % signifikant reduziert (relative Risikoreduktion; jeweils $p<0,05$).

Zusätzlich wiesen Patienten mit Serelaxin-Behandlung nach der 48-stündigen Infusion niedrigere Plasma-Konzentrationen von Biomarkern auf, die mit kardialer (hochsensitives Troponin), renaler (Kreatinin, Cystatin C) oder hepatischer (Aspartat-, Alanin-Transaminasen) Organschädigung assoziiert waren. Außerdem war NT-proBNP, ein Indikator für die kardiale Wandspannung, reduziert.⁷⁸

Das Sicherheitsprofil dieser Substanz bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz war vergleichbar mit dem der Placebo-Behandlung. Serelaxin zeigte ein vorteilhaftes Sicherheits- und Verträglichkeitsprofil ohne signifikante Hypotonie.^{77, 163}

Die RELAX-AHF-2 Studie – eine weitere Phase III Studie mit 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ Serelaxin zusätzlich zur Standardmedikation – wurde bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz durchgeführt, um

den Mortalitäts- und Morbiditätsbenefit an einem größeren Patientenkollektiv (> 6000 Patienten) im Vergleich zu Placebo zu bestätigen (*ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01870778*). Die im Frühjahr 2017 bekannt gegebenen Ergebnisse haben die primären Endpunkte Reduktion der kardiovaskulären Mortalität und Verschlechterung bei initial stabilisierten Patienten mit akuter Herzinsuffizienz (AHF) nicht erreicht.⁸⁰ Eine Publikation inklusive detaillierter Datenanalyse soll in Kürze veröffentlicht werden.

1.3 Die pulmonale Hypertonie – eine Fibrose-assoziierte Erkrankung

Gemäß den ESC/ERS-Leitlinien versteht man unter der pulmonalen Hypertonie (PH) einen erhöhten pulmonalarteriellen Mitteldruck (mPAP) in Ruhe von mindestens 25 mmHg. Bei zu Beginn nur leichter Symptomatik wird die Krankheit oft erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Typische Symptome sind eine Belastungsdyspnoe, abnehmende Leistungsfähigkeit, Müdigkeit und Synkopen.¹⁶⁴ Die pulmonalarterielle Hypertonie wird je nach Ursache in 5 Gruppen unterteilt.^{165, 166}

Gruppe 1 beinhaltet die pulmonalarterielle Hypertonie, welche idiopathisch (iPAH), hereditär, aufgrund von Pharmaka oder anderer Erkrankungen auftritt.

Gruppe 2 ist durch eine Linksherzerkrankung gekennzeichnet, bei der es zu einer postkapillären Hypertonie kommt. Durch einen Rückstau werden schließlich auch die Pulmonalarterien druckbelastet.¹⁶⁴

Gruppe 3 fasst alle Formen der PH zusammen, die auf eine Lungenerkrankung, wie z. B. COPD, oder auf eine Hypoxie zurückzuführen sind.

In Gruppe 4 fasst man die Formen der chronisch thromboembolischen PH zusammen.

Gruppe 5 vereint alle weiteren Formen der PH, die seltene Krankheiten, wie z. B. myeloproliferative Erkrankungen oder Speicherkrankheiten, oder Krankheiten mit unklaren bzw. multifaktoriellen Ursachen beinhaltet.¹⁶⁴

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (Gruppe 1; iPAH) und die pulmonale Hypertonie aufgrund einer Linksherzinsuffizienz (Gruppe 2; PH-LHD) näher untersucht.

1.3.1 Diagnostik, Klassifikation und Pathophysiologie

Für die Diagnose der pulmonalen Hypertonie ist eine ausführliche Diagnostik essentiell. Dazu werden eine körperliche Untersuchung, eine Elektrokardiographie, eine Echokardiographie und eine Rechtsherzkatheter-Untersuchung, welche den Goldstandard für die Diagnose der Patienten mit pulmonaler Hypertonie darstellt, durchgeführt.

Die für die Diagnosestellung sowie für die Beurteilung des Krankheitsverlaufs entscheidenden Parameter sind Tabelle 1 gelistet:

Tabelle 1 Parameter zur Diagnostik der pulmonalen Hypertonie

Rechtsherzkatheter	
CI	Herzindex
CO	Herzzeitvolumen
mPAP	Mittlerer pulmonalarterieller Druck
PAWP	Pulmonalarterieller Verschlussdruck
PVR	Pulmonalvaskulärer Widerstand
RAP	Rechtsatrialer Druck
SvO ₂	Venöse Sauerstoffsättigung
ZVD	Zentralvenöser Druck
Echokardiographie	
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
TAPSE	Verlagerung des Trikuspidal-Annulus zwischen Diastole und Systole („Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion“)
Sonstiges	
6MWD	6-Minuten-Gehtest
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid - <i>Brain Natriuretic Peptide</i>

Mit der Messung des pulmonalarteriellen Verschlussdruckes (PAWP) kann zwischen präkapillären und postkapillären Ursachen der pulmonalen Hypertonie unterschieden werden. Ein PAWP über 15 mmHg deutet auf eine PH der Gruppe 2 (PH-LHD) hin.¹⁶⁴

Tabelle 2 Schweregrad der pulmonalen Hypertonie gemäß WHO-Klassifizierung

WHO Schweregrad-Einteilung (funktionelle Klasse)	
Klasse I	Patienten mit pulmonaler Hypertonie ohne Einschränkung der körperlichen Aktivität; normale körperliche Aktivität verursacht keine vermehrte Dyspnoe, Müdigkeit, Thorax-Schmerzen oder Schwächeanfälle.
Klasse II	Patienten mit pulmonaler Hypertonie und leichter Einschränkung der körperlichen Aktivität, ohne Beschwerden in Ruhe; normale körperliche Aktivität verursacht vermehrte Dyspnoe, Müdigkeit, Thorax-Schmerzen oder Schwächeanfälle.
Klasse III	Patienten mit pulmonaler Hypertonie und deutlicher Einschränkung der körperlichen Aktivität, ohne Beschwerden in Ruhe; leichtere körperliche Aktivität verursacht vermehrte Dyspnoe, Müdigkeit, Thorax-Schmerzen oder Schwächeanfälle.
Klasse IV	Patienten mit pulmonaler Hypertonie und der Unfähigkeit, jegliche körperliche Aktivität ohne Symptome auszuführen; Manifestation von Symptomen einer Rechtsherzinsuffizienz, Dyspnoe und/ oder Müdigkeit in Ruhe, Verstärkung der Schmerzen bei jeglicher körperlicher Aktivität.

Der Schweregrad der Erkrankung wird gemäß der WHO-Klassifizierung (WHO-funktionelle Klasse; modifiziert nach NYHA-Klassifikation) angegeben (vgl. Tabelle 2).¹⁶⁷ Der 6-Minuten-Gehtests (6MWD) wird in der klinischen Praxis verwendet, um die Belastbarkeit des Patienten bzw. den Schweregrad der Erkrankung zu evaluieren. Er beschreibt die Wegstrecke (in m), die ein Patient innerhalb von sechs Minuten zurücklegen kann.

Die Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie erklärt sich durch ein Ungleichgewicht vasokonstriktiver und vasodilatativer Mediatoren. Der erhöhte Druck in den Lungengefäßen verursacht eine endotheliale Dysfunktion, welche mit einem reduzierten Angebot an Vasodilatoren, wie z. B. NO oder Prostazyklin, einhergeht. Gleichzeitig werden Vasokonstriktoren (z. B. Endothelin) überexprimiert. Diese Belastung führt längerfristig zu pulmonalvaskulärem Remodeling und daraus resultierender pulmonalarterieller Vasokonstriktion, Hypertrophie der arteriellen Media, intimaler Proliferation und Fibrose, Thrombosen sowie komplexer plexiformer Läsionen. Der dadurch entstehende gesteigerte Gefäßwiderstand erhöht die Nachlast am rechten Herzen, und führt zur Fibrosierung des rechten Herzens.¹⁶⁸

Der rechte Ventrikel ist in seiner Geometrie sehr viel komplexer und die Wanddicke des rechten Ventrikels ist mit < 5 mm geringer als die des linken Ventrikels, weshalb eine erhöhte Nachlast weniger gut kompensiert werden kann. Die durch die pulmonale Hypertonie entstandene Druckbelastung resultiert sehr schnell in einer rechtsventrikulären Hypertrophie und systolischen Insuffizienz.¹⁶⁹ Eine andauernde Druckerhöhung im Lungensystem führt schließlich zu einer Dilatation und Fibrosierung des rechten Ventrikels.¹⁷⁰ Man spricht dabei auch von einem *cor pulmonale*. Durch die Volumenüberladung bzw. Druckbelastung wird das Septum in den linken Ventrikel verlagert, welches das enddiastolische Volumen des linken Ventrikels reduziert. Die fehlende linksventrikuläre Füllung verstärkt den Rückstau des Blutes in die pulmonalen Gefäße. Zudem kommt es zu einem verringerten linksventrikulären Schlagvolumen und einer weiter reduzierten Pumpleistung des rechten Ventrikels, was schließlich im Rechtszherzversagen resultiert.^{171, 172}

1.3.2 Fibrotische Umbauprozesse in der pulmonalen Hypertonie

In der Gruppe 1 der pulmonalarteriellen Hypertonie, sind die distalen Pulmonalarterien gekennzeichnet durch eine Hypertrophie der Media, proliferative bzw. fibrotische Veränderungen (konzentrisch, exzentrisch) der Intima und Verdickung der Adventitia. Zusätzlich liegen komplexe und thrombotische Läsionen sowie entzündliche Veränderungen

der Gefäßwand vor.¹⁶⁷ Pathologische Veränderungen in Gruppe 2, der pulmonalen Hypertonie aufgrund einer Linksherzerkrankung, beinhalten zudem vergrößerte und verdickte Pulmonalvenen sowie eine Dilatation der Pulmonalkapillaren. Distale Pulmonalarterien können eine hypertrophierte Media oder eine fibrotische Intima aufweisen. Der größte Anteil der Patienten fällt in diese Gruppe.¹⁷³ Aufgrund der langfristigen Druckbelastung des rechten Herzens (Erhöhung der Nachlast) und der daraus resultierenden neurohumoralen Aktivierung des sympathischen Nervensystems sowie der Renin-Angiotensin-Aldosteron-Achse kommt es neben den pulmonalen Gefäßwandverdickungen zu einer Hypertrophie und Fibrosierung des rechten Herzens. Die extrazelluläre Matrix ist hauptsächlich aus Kollagenen, Fibronectin, Laminin und Elastin aufgebaut, in welche die Kardiomyozyten eingebettet sind. Die vermehrte Akkumulation extrazellulärer Matrix führt zu einer Störung der Reizweiterleitung, woraus Arrhythmien entstehen können.¹⁷⁰ Matrix-Metalloproteinasen sowie deren Inhibitoren spielen bei dem Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle.

1.3.3 Therapie der pulmonalen Hypertonie

Die Therapie der Patienten mit pulmonaler Hypertonie hängt von der jeweiligen Eingruppierung der Pathophysiologie ab. Das Ziel der Therapie ist eine Verbesserung der Symptome, eine gesteigerte Leistungsfähigkeit sowie eine verlangsamte Krankheitsprogression (chronische Rechtsherzinsuffizienz und pulmonalvaskuläre Fibrosierung). Eine Heilung ist mit den bisher zur Verfügung stehenden Therapeutika nicht möglich. Für Patienten mit pulmonalarterieller Hypertonie (Gruppe 1) stehen Vertreter folgender vier Wirkstoffklassen zur Verfügung (vgl. Tabelle 3):¹⁶⁸

Tabelle 3 Substanzklassen zur Behandlung der PAH

Substanzklasse	Wirkmechanismus	Beispiele
Prostanoide	Vasodilatation durch cAMP-vermittelte Relaxation der glatten Gefäßmuskeln in den Pulmonalarterien.	<i>Epoprostenol, Iloprost, Treprostinil, Beraprost</i>
Endothelin-Rezeptor-Antagonisten	Antagonisierung von vasokonstriktivem und proinflammatorischem Endothelin-1	<i>Bosentan, Ambrisentan, Macitentan</i>
Phosphodiesterase 5-Inhibitoren	Verstärkung der NO-vermittelten Vasodilatation durch Erhöhung des cGMP-Angebots.	<i>Sildenafil, Tadalafil</i>
Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase	Verstärkung der Vasodilatation durch Stimulation der löslichen Guanylatzyklase zur Erhöhung des cGMP-Angebots (NO-unabhängig)	<i>Riociguat</i>

Es sind bisher keine Behandlungsoptionen für Patienten mit pulmonaler Hypertonie aufgrund einer Linksherzinsuffizienz (Gruppe 2) zugelassen. In den Leitlinien wird empfohlen, die bestehende Therapie der Linksherzinsuffizienz zu optimieren.¹⁶⁴

Aufgrund der rasch progressiv verlaufenden Erkrankung ist der Bedarf an neuen innovativen Behandlungsoptionen sehr hoch.

1.3.4 Epidemiologie der pulmonalen Hypertonie

Die pulmonalarterielle Hypertonie gilt als sogenannte *Orphan Disease* (seltene Krankheit; weniger als 5 pro 10 000 Einwohner). Die epidemiologischen Daten zur pulmonalarteriellen Hypertonie schwanken in Europa zwischen 15 und 60 Erkrankten auf 1 Million Einwohner, wobei pro Jahr 5 bis 10 neue Fälle hinzukommen.¹⁷⁴ Im Jahr 2014 betrug in Deutschland die Prävalenz 25,9 pro 1 Million Einwohner, wobei 3,9 Erkrankte pro 1 Million Einwohner jedes Jahr hinzukamen.¹⁷⁵ Die pulmonale Hypertonie aufgrund einer Linksherzinsuffizienz kommt dabei weitaus häufiger vor.¹⁷³

Noch in den 80er Jahren lag die mediane Überlebenszeit für Patienten mit dieser rasch progressiven Erkrankung bei 2,8 Jahren. Die Wahrscheinlichkeit, 1, 3 bzw. 5 Jahre zu überleben, wurde damals auf 68 %, 48 % bzw. 34 % geschätzt.¹⁷⁶

In den 90er Jahren wurden die ersten Medikamente zur Behandlung der pulmonalarteriellen Hypertonie zugelassen. Trotz der heute verfügbaren Therapie-Möglichkeiten bleibt die Sterblichkeitsrate hoch. In dem britischen Register ASPIRE, in dem mehr als 1300 Patienten mit pulmonaler Hypertonie in der Zeit von 2001 bis 2010 eingeschlossen wurden, beträgt die Wahrscheinlichkeit für das 1- bzw. 3-Jahres-Überleben bei PAH-Patienten 88 % bzw. 68 % und für das PH-LHD-Kollektiv 90 % bzw. 73 %.³

1.3.5 Prognose der pulmonalen Hypertonie

Als stärkster prognostischer Marker gilt die Schweregrad-Einteilung nach der WHO-Klassifikation. Von der ESC/ERS-Leitlinie¹⁶⁴ werden als prognostische Marker in der klinischen Praxis vor allem die WHO-Klassifizierung der Patienten,¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ der 6-Minuten-Gehtest,^{178, 180} NT-proBNP bzw. BNP,^{181, 182} die rechtsventrikuläre Funktion¹⁸³ oder hämodynamische Variablen^{178, 184} verwendet.

Der Nachteil des 6-Minuten-Gehtests ist die Abhängigkeit von den Umweltfaktoren, wie z. B. Alter, Geschlecht, Komorbiditäten. BNP bzw. sein inaktives Abspaltprodukt NT-proBNP (N-terminales proBNP) sind die einzigen Laborparameter, die in der klinischen Praxis Verwendung finden. BNP ist weniger stark von der Nierenfunktion abhängig als NT-proBNP, wobei NT-proBNP einen stärker prädiktiven Wert aufgewiesen hat.¹⁸⁵ Als hämodynamische Parameter sind z. B. der Herzindex (CI), die gemischt-venöse Sauerstoffsättigung sowie der rechtsatriale Druck aussagekräftige Kenngrößen, wobei echokardiographische Parameter die rechtsventrikuläre Funktion am besten abbilden können. Einen prognostischen Marker stellt dabei die TAPSE (*Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion*) dar, welche die Verlagerung des Trikuspidal-Annulus zwischen Diastole und Systole angibt.¹⁸³

Die eben genannten prognostischen Variablen wurden hauptsächlich zum Zeitpunkt der Diagnose-Stellung verwendet. Nickel et al.¹⁷⁹ haben jedoch gezeigt, dass diese bei der Nachfolge-Visite eine erhöhte prognostische Aussagekraft haben, denn zu diesem Zeitpunkt fließt bereits das Ansprechen auf die Medikation in die Beurteilung ein. Benza et al.¹⁷⁸ entwickelten einen Risiko-Score zur Abschätzung des 1-Jahres-Überlebens, welcher unter anderem die funktionelle Klasse (gemäß WHO-Klassifikation), BNP, 6MWD, Hämodynamik- und Echokardiographie-Variablen berücksichtigte. Obwohl er basierend auf Baseline-Daten erstellt worden ist, wurde bereits nachgewiesen, dass dieser Score während des gesamten Krankheitsverlaufs angewendet werden kann.

Fibrose-assoziierte Biomarker in der pulmonalen Hypertonie

Matrix-Metalloproteinasen spielen sowohl bei kardialen als auch pulmonalen Remodeling-Prozessen eine entscheidende Rolle (vgl. Kapitel 1.1.3). Die kardiale Lokalisation der Gelatinasen MMP2 und MMP9 sowie deren Beteiligung am pathologischen Remodeling im Herzen wurde bereits gezeigt.¹⁸⁶ In der pulmonalen Hypertonie wurden die Konzentrationen der Matrix-Metalloproteinasen sowie deren Inhibitoren mit dem Krankheitsverlauf bzw. mit dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert. Bei Patienten mit PAH waren im Urin MMP2- und MMP9-Spiegel im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht.¹⁸⁷ Schumann et al.¹⁸⁸ haben erhöhte Plasma-Konzentrationen von MMP2 und TIMP4 in 36 Patienten mit pulmonaler Hypertonie im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (n=44; alters- und geschlechtsangepasst) beobachtet. Dabei stand die MMP2-Konzentration mit dem Schweregrad der Erkrankung, die TIMP4-Konzentration mit der NYHA-Klasse sowie mit der rechtsventrikulären Hypertrophie in engem Zusammenhang. Safdar et al.¹⁸⁹ beobachteten ebenfalls erhöhte Spiegel von MMP9 und TIMP1 in EDTA-Plasma von 68 Patienten mit

pulmonalarterieller Hypertonie im Vergleich zur alters- und geschlechtsangepassten gesunden Kontrollgruppe (n=37). Diese Beobachtungen standen im Einklang mit verschiedenen Tiermodellen, in denen ebenfalls die Beteiligung der MMPs und TIMPs an den pathophysiologischen Veränderungen demonstriert wurde. In PAB-Modellen (Verengung der Pulmonalarterie durch *pulmonary artery binding*) wurde bereits ein Anstieg der MMP2-, MMP9- und TIMP1-Konzentrationen sowie eine Reduktion der TIMP4-Konzentrationen im Myokard beobachtet.^{190, 191} Bei Monocrotalin-induzierter pulmonaler Hypertonie konnte ebenfalls ein Anstieg dieser Marker im Lungengewebe beobachtet werden.^{192, 193}

1.4 Fragestellung

Das antifibrotische Wirkprinzip von Serelaxin kann möglicherweise an einer Reihe von Indikationen eine Rolle spielen. Innerhalb dieses Wirkmechanismus spielt der NO-cGMP-abhängige Signalweg eine tragende Rolle. Die dem *second messenger* cGMP nachgeschalteten Proteinkinasen, welche an der antifibrotischen Wirkung von Serelaxin funktionell beteiligt sind, sind bisher unbekannt. Deswegen sollen im Rahmen dieser Arbeit Erkenntnisse über cGKI – eine cGMP-abhängige Proteinkinase – und deren Substrate in der renalen Fibrose unter Einfluss von Serelaxin gewonnen werden. Dies soll mithilfe der Ureterligation, die ein etabliertes Modell für die tubulointerstitielle Nierenfibrose darstellt,¹⁹⁴ erreicht werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob durch einen weiteren pharmakologischen Ansatz zur Erhöhung von cGMP-Konzentrationen, nämlich durch die Gabe des PDE5-Inhibitors Zaprinast, ähnliche bzw. additive antifibrotische Effekte in der Niere erzielt werden können. PDE5-Inhibitoren werden vor allem in der pulmonalen Hypertonie eingesetzt.

Die pulmonale Hypertonie manifestiert sich durch eine starke Gewebefibrosierung. Sowohl die Diagnose, als auch die Behandlung sind momentan unzureichend, so dass die Erkrankung auch heutzutage noch mit einer hohen Mortalität assoziiert ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb zusätzlich die klinische Relevanz ausgewählter Fibrose-assoziiierter Biomarker – der MMP/TIMP-Verhältnisse – an Patienten mit pulmonaler Hypertonie evaluiert werden. Ziel war es, einen mit dem Krankheitsverlauf assoziierten biologischen Marker zu identifizieren, welcher ebenfalls mit den antifibrotischen Effekten von Serelaxin verknüpft ist.

Anmerkung:

Teile dieser Doktorarbeit wurden bereits in einer Vollpublikation¹⁹⁵ [Nachtrag: in Vollpublikationen^{195, 324, 325}] sowie in Abstracts veröffentlicht. Eine detaillierte Auflistung aller bisherigen und geplanten Veröffentlichungen folgt in Kapitel 7.

2 Methoden

2.1 Antifibrotischer Signalweg von Serelaxin am Beispiel eines murinen Nierenfibrose-Modells

Die folgenden Versuche wurden durch Novartis Pharma GmbH finanziell unterstützt. Die Durchführung der Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Jens Schlossmann (Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg).

2.1.1 Verwendete Mauslinie und *knock out* Mutanten

Die verwendete Mauslinie hatte den genetischen Hintergrund 129/Sv. Die Tiere stammten aus einer Eigenzucht der Universität Regensburg. Sie wurden in der SPF (Spezifiziert Pathogen-Frei)-Tierhaltung der Universität Regensburg gezüchtet und über das Tierverwaltungsprogramm TiBUR (TierBestand Universität Regensburg) verpaart bzw. für die Versuchsdurchführung angefordert. Die Tierhaltung erfolgte in einem 12 Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus. Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

Für die Versuchsdurchführung fanden die Wildtypen (cGKI^{+/+}) sowie cGKI-*knock out* Mäuse (cGKI^{-/-}) Verwendung. Heterozygote Tiere (cGKI^{+/-}) wurden für die Zucht verwendet, sobald sie ein Alter von ca. sechs Wochen erreicht haben. Jeweils zwei heterozygote Weibchen wurden mit je einem heterozygoten Männchen verpaart. Der Nachwuchs wurde nach drei bis vier Wochen von der Mutter abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt. Die Genotypisierung der Nachkommen erfolgte aus Schwanzbiopsien mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Die Experimente wurden gemäß deutscher Tierschutzbestimmungen/ FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Association) durchgeführt und von der lokalen zuständigen Behörde (Regierung der Oberpfalz; #54-2532.1-26/13) genehmigt.

Charakterisierung der cGKI anhand des murinen knock out-Modells

Zur Aufklärung des NO-cGMP-Signalweges und der Beteiligung der cGKI wurde ein Mausmodell verwendet, bei dem die Proteinkinase cGKI selektiv ausgeschaltet wurde. Zum ersten Mal wurde dieses Mausmodell von Pfeifer et al.¹⁹⁶ erwähnt, welcher die Bedeutung der

cGKI bei der Relaxation von glatten Muskelzellen im vaskulären sowie im gastrointestinalen System *in vivo* beschrieb. Diese speziellen *knock out* Mäuse weisen aufgrund ihrer schweren vaskulären und intestinalen Funktionsstörungen eine deutlich geringere Lebenserwartung auf, 50 % versterben bereits sechs Wochen nach der Geburt. Die Wildtyp und cGKI-KO Mäuse weisen bei Geburt keinen unterschiedlichen Phänotyp auf, jedoch konnte nach ca. sechs Wochen ein um ca. 30 % verringertes Körpergewicht im Vergleich zum Wildtypen beobachtet werden. Während der Blutdruck sehr junger Tiere bei cGKI-KO Mäusen im Vergleich zu Wildtypen erhöht war, konnte man bei Tieren ca. sechs Wochen nach Geburt keine Unterschiede mehr feststellen.¹⁹⁶ Auch der renale Phänotyp unterscheidet sich nicht makroskopisch bzgl. Größe und Integrität der Nieren.¹⁹⁶

2.1.2 Unilaterale Ureterligation

Die Tiere wurden mithilfe des Inhalationsnarkotikums Isofluran (2,5 % Isofluran in Sauerstoff mit einem Fluss von 60 ml/min) für die Dauer des operativen Eingriffes betäubt.

Um die Körpertemperatur der Maus aufrecht zu erhalten, wurde der operative Eingriff auf einer Wärmedecke, temperiert auf 37°C, durchgeführt. Die Bauchdecke des Tieres wurde lateral mit einem ca. 1 cm langen Schnitt geöffnet und der Bauchraum mit vier Spannklemmen für den Eingriff freigelegt. Der Ureter befand sich unterhalb des Magen-Darmtraktes. Mithilfe eines nicht-resorbierbaren Fadens wurde der Ureter durch je einen Doppel-Knoten an zwei Stellen abgeschnürt und anschließend die Bauchdecke wieder mit einem resorbierbaren Faden und das Oberfell mit Klammern verschlossen. Den Tieren konnte optional Ketoprofen (5 mg/kg subkutan) post-operativ verabreicht werden. Futter sowie Wasser standen den Tieren nach dem Eingriff wieder *ad libitum* zur Verfügung.

Die operative Intervention der unilateralen Ureterligation (UUO) ist als mäßige Belastung, die durch die Ureterligation in den folgenden 7 Tagen möglichen auftretenden Beschwerden als geringe Belastung einzuschätzen. Als Abbruchkriterien galten eine starke Gewichtsabnahme (um 20 % gegenüber Versuchsbeginn), Wundinfektion, geringe Beweglichkeit der Tiere oder Verweigerung der Futter- oder Wasseraufnahme.

2.1.3 Behandlung

Die Behandlung der Tiere erfolgte mit Serelaxin, Zaprinast oder einer Kombinationsbehandlung aus beiden Substanzen.

Für die Behandlung mit Serelaxin musste eine kontinuierliche intraperitoneale Infusion durch osmotische Minipumpen (Alzet[®]) sichergestellt werden. Für die 3- bzw. 7-tägige Behandlung wurde das Modell 1007D verwendet (Volumen: 100 µl). Die Dosis betrug dabei 0,5 mg/kg/d mit einer Flussrate von 0,5 µl/h.

Die Serelaxin-Stammlösung lag in einer Konzentration von 4,75 mg/ml vor. Um die richtige Konzentration der Serelaxin-Lösung zu erreichen, musste die Stammlösung mit 20 nM Natrium-Acetat-Lösung (pH 5) verdünnt und nach Sterilfiltration in osmotische Minipumpen gefüllt werden. Diese Arbeitsschritte erfolgten unter *Laminar Air Flow*-Bedingungen.

Die Tagesdosis Zaprinast wurde durch eine intraperitoneale Injektion von 10 mg/kg verabreicht. Dazu wurde das pulverförmige Zaprinast in dem unten aufgeführten Lösungsmittel im Ultraschallbad mit einer Zielkonzentration von 10 mg/ml gelöst:

Lösungsmittel für Zaprinast:

1 g H₂O

0,6 g Glycerol

9,4 g Polyethylenglycol 400

2.1.4 Organentnahme

Die Betäubung der Tiere erfolgte mithilfe des Inhalationsnarkotikums Isofluran (2,5 % Isofluran in Sauerstoff mit einem Fluss von 60 ml/min) für die Dauer des operativen Eingriffes.

Retrobulbär wurde den Tieren mit Hilfe von Mikrohämatokrit-Kapillaren ca. 0,5 ml Blut entnommen. Nach der Zentrifugation (4°C, 10 Minuten, 1520 g) wurde das Serum abpipettiert und bei -80°C bis zur Analyse eingefroren.

Vor der Öffnung des Bauchraumes fand eine Desinfizierung der Materialien und Geräte mit 70 % Ethanol statt. Als Kontroll-Nierengewebe für die fibrotische Niere (vgl. Abbildung 9 A) diente die jeweilige kontralaterale gesunde Niere (vgl. Abbildung 9 B). Der obere und untere Teil der Niere wurde abgetrennt, bei -80°C eingefroren und für die quantitative RT-PCR, Western Blotting und Zymographie verwendet. Der mittlere Teil der Niere, welcher noch über die *arteria renalis* und *vena renalis* mit dem Blutkreislauf verbunden war, wurde retrograd perfundiert und anschließend in 70 % Methanol bis zur immunhistochemischen Untersuchung sowie für die Sirius Red/ Fast Green Färbung aufbewahrt.

Zur Einführung des Perfusionskatheters wurde nach der Freilegung der Aorta unterhalb der *arteria renalis* der Blutkreislauf abgeklemmt. Die Perfusion fand mit 0,9 % NaCl/ 0,1 % Heparin (10 I.E./ml) und anschließend mit 3 % Paraformaldehyd-Lösung statt. Paraformaldehyd diente dabei als Fixierlösung, welches eine reversible Quervernetzung der Proteine bewirkte und somit die Größe und räumliche Struktur des ursprünglichen Gewebes konservierte.

(A) linke Niere – 7 Tage nach UUO



(B) kontralaterale Niere – gesund (Kontrolle)



Abbildung 9 (A) fibrotisches und (B) gesundes Nierengewebe 7 Tage nach unilateraler Ureterligation

2.1.5 Material

2.1.5.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte

Es wurden die in diesem Kapitel aufgeführten Verbrauchsmaterialien (vgl. Tabelle 4), Chemikalien (vgl. Tabelle 5) und Geräte (vgl. Tabelle 6) verwendet.

Tabelle 4 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Borsilikat; Dicke: 1; 24 x 50 mm	VWR International	Darmstadt
Einbettringe		VWR International	Darmstadt
Einmalhandschuhe	Rotiprotect® latex	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Einmalspritzen	Nitril	VWR International	Darmstadt
	1 ml, 5 ml	Braun	Melsungen
	Insulinspritzen 0,5 ml	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg
Falcon Tubes	15 ml, 20 ml	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht
Fettstift	ImmoEdge Pen	Vector Laboratories	Burlingame, USA
Filterpapier	Whatman™	GE Healthcare	Buckinghamshire, UK

Futter HPLC Minivial	Pellets mit 0,24 % Natrium - 1,5 ml Short Thread Vial 32 x 11,6 mm (clear), wide opening - ND9 Short Thread Screw Caps (black) with Septa Silicone Rubber/PTFE - 250 µl Conical Glass Insert (total volume 340 µl), 31 x 6mm - Membranfilter TE 36, PTFE 0,45 µm Ø 47 mm	ssniff BGB Analytik	Soest Rheinfelden
Mikrohämatokrit- Kapillaren	heparinisiert	Schleicher & Schüll (jetzt GE Healthcare/ Whatman)	Dassel
Multipette	Multipette plus	Eppendorf	Hamburg
Nahtmaterial	Seide, nicht resorbierbar (7/0 USP, 0,5 metric) resorbierbarer Faden; Vicryl, 3-0 (2 Ph. Eur.) nicht-resorbierbarer Faden; Prolene, 4-0 (1,5 Ph. Eur.) Wundklammern	Resorba Ethicon Ethicon	Nürnberg Norderstedt Norderstedt
Objektträger	Polysine™	Galy Pierre	Bretigny sur Orge, FR
Osmotische	Modell 1007D; 2002	Meinzel-Gläser	Braunschweig
Minipumpen		Alzet	Cupertino, USA
Pipetten		Sarstedt AG & Co.	Nürnbrecht
Pipettenspitzen	Rainin Pipet Lite Classic	Mettler Toledo	Gießen
PVDF-Membran	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co.	Nürnbrecht
Reagiergefäße	Immobilon	Millipore GmbH	Schwalbach
	1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG & Co.	Nürnbrecht
	2 ml - Safe Lock	Eppendorf AG	Hamburg
Skalpelle		Feather Safety Razor	Osaka, JP/USA
Sterilfilter	Filtropur S 0.2	Sarstedt AG & Co.	Nürnbrecht

Tabelle 5 Liste der verwendeten Chemikalien

Acetonitril (LiChrosolv)	Merck	Darmstadt
Acrylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Fluka)	Steinheim
6-Aminohexansäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Fluka)	Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Benzamidinhydrochlorid	VWR International	Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Gerbu Biotechnik GmbH	Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Merck	Darmstadt
Chloroform	Merck	Darmstadt
Brilliant Blue R	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Bio-Rad DC Protein Assay (Lowry)	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Diethylether	VWR International	Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Fluka)	Steinheim
DTT	Gerbu Biotechnik	Gaiberg
Direct Red 80 (Sirius Red)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
dNTP (2,5mM)	Fermentas	St. Leon-Rot
EDTA (Titrplex III)	Merck	Darmstadt
EGTA (Ethylenglykoltetraacetat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Elisa-Kits		
- Human-MMP2	Invitrogen Life Technologies	Darmstadt
- Human MMP9	Invitrogen Life Technologies	Darmstadt
- Quantikine® Human relaxin-2	R & D Systems	Wiesbaden
- Quantikine® Human TIMP1	R & D Systems	Wiesbaden
- Quantikine® Human TIMP4	R & D Systems	Wiesbaden
- cGMP	IBL/ Cayman Chemical Company	Hamburg
Entwickler – Western Blot		USA
- Clarity™ Western ECL Substrate (Luminol, Peroxid-Lösung)	Bio-Rad Laboratories GmbH	
- ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent	Amersham	München
Essigsäure	Merck	Darmstadt
Ethanol	Merck	Darmstadt
Fast Green FCF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
First Strand Buffer (5x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Gelatine (porcine skin 300 bloom)	Promega	Wisconsin, USA
Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Glucose	Merck	Darmstadt
Glycergel Mounting Medium	Dako	Hamburg
Glycerol 87 %	AppliChem GmbH	Darmstadt
Glycin	Merck	Darmstadt
Heparin-Natrium 25000	Ratiopharm	Ulm
Inaktivierungslösung RNase (RNase Zap)	Ambion	Californien, USA
Isofluran	Baxter GmbH	Unterschleißheim
Isopropanol (2-Propanol)	Merck	Darmstadt
Ketoprofen (Gabrilen®)	Mibe GmbH	Brehna
K ₂ HPO ₄	Merck	Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck	Darmstadt
Kreatinin 98 %	Alfa Aesar GmbH & Co. KG	Karlsruhe

Leupeptin Hemisulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Lightcycler® 480 SYBR Green 1 Master	Roche Diagnostics	Mannheim
Magnesiumchlorid(MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	Merck	Darmstadt
Methanol (LiChrosolv)	Merck	Darmstadt
N, N`-Methylenbisacrylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Fluka)	Steinheim
Natriumacetat-Trihydrat	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Natriumchlorid-Lösung 0,9 %	Braun	Melsungen
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck	Darmstadt
Natriumazid	Merck	Darmstadt
Natriumhydroxid	VWR International	Darmstadt
NaOH 1 N	Merck	Darmstadt
Oligo (dT) ₁₈ Primer	Thermo Scientific	Rockford, USA
Paraformaldehyde	Merck	Darmstadt
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Paraffin- Paraplast embedding media	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Perchlorsäure (70-72 %)	Merck	Darmstadt
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Fluka)	Steinheim
Polyethylenglykol 400	Clariant	München
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Protein-Größenmarker		
- Page Ruler Plus, Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific	Rockford, USA
- Page Ruler, Unstained Protein Ladder	Thermo Scientific	Rockford, USA
- SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Ladder	Invitrogen life technologies GmbH	Darmstadt
RNAasin	Promega	Wisconsin, USA
RT (M-MLV)	Promega	Wisconsin, USA
Sauerstoff	Linde AG	München
Salzsäure (HCl)	Merck	Darmstadt
SDS ultrapure	AppliChem GmbH	Darmstadt
Serelaxin	Novartis Pharma AG	Basel, CH
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Trichloressigsäure	Merck	Darmstadt
Trizma® base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Trizol (PeqGold TriFast)	PeqLab	Erlangen
Tricin	Gerbu Biotechnik	Heidelberg
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Tween-20	Merck-Schuchardt	Hohenbrunn
Wasserstoffperoxid	Merck	Darmstadt
Xylol	Merck	Darmstadt
Zaprinast	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg
ZnCl ₂	Merck	Darmstadt

Tabelle 6 Liste der verwendeten Geräte

Autoklav	Varioklav H+P	Labortechnik GmbH	Oberschleißheim
Blotting Apparatur	Semidry SD20 SemiDryMaxi, 20*20cm System	VWR International	Darmstadt
Dispensette	0,2-2 mL	Brand	Wertheim
Eismaschine	AF 100	Scotsman	Mailand, IT
Elektrophorese Power Supply	Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Elektrophorese-System	Mini Protean Tetracell	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Gelentwickler	ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
HPLC-Apparatur	<i>siehe Tabelle 16</i>		
Isofluran-Verdampfer	Vapor 19.3	Drägerwerk AG	Lübeck
Kreisschüttler	KS 260 basic	IKA Werke	Staufen
Gefrierschrank	-80°C Ultra Low Temperature Freezer	New Brunswick Scientific GmbH	Nürtingen
Light Cycler	Roche Lightcycler® 480 System	Roche Diagnostics	Mannheim
Magnetrührer	Heidolph MR 3001	Heidolph Instruments	Schwabach
Mehrfachdispenser	Stepmate	VWR International	Darmstadt
Mikroskop	Stemi DV 4 Spot Axio Observer Z1	Carl Zeiss Carl Zeiss	Jena Jena
Operationsbesteck	FST	FST	Bad Oyenhausen
PCR Gerät	Biometra T1 Thermocycler	Biometra GmbH	Göttingen
pH-Meter	pH 526	WTW	Weilheim
Photometer	Biophotometer plus Tecan Sunrise Remote™	Eppendorf AG Tecan Group Ltd.	Hamburg Männedorf, CH
Plattformschüttler	Plattenleser Titramax 101	Heidolph Instruments	Schwabach
Reinstwassersystem	Arium® basic	Sartorius Stedim Biotech GmbH	Göttingen
Rotationsmikrotom	Microm HM 355S	Thermo Scientific	Waltham, USA
Schüttelinkubator	Classic Series	New Brunswick Scientific GmbH	Nürtingen
Sterilbank	Labgard Class II, Type A/B3	Nuaire	Minnesota, USA
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG	Hamburg
Thermoschrank	Thermo Electron Corporation	Heraeus	Hanau
Ultraschallbad	Branson 220	Branson Ultrasonics	Connecticut, USA
Ultraturrax	TP 18_10	IKA Werke	Staufen
Vortexer	Reax top	Heidolph Instruments	Schwabach
Waagen	Sartorius BP 211 D Sartorius Extend	Sartorius Sartorius	Göttingen Göttingen
Wärmedecke, -pumpe	TP22G, T/Pump	Gaymar Industries Inc.	New York, USA
Wasserbad	VWR mod 1112A	VWR International	Darmstadt

Zentrifugen	Sorvall Super T21	Kendro Laboratory Products GmbH	Hanau
	Mikro 220R	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen
	Mikrofuge 22	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen
	Centrifuge 5417 R	Eppendorf	Hamburg
	Centrifuge + Vortex CM-70M	NeoLab	Heidelberg

2.1.5.2 Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie

In Tabelle 7 werden Primär-Antikörper für Western Blotting sowie Immunhistochemie mit Angaben zu Spezies, Verdünnung und Hersteller aufgelistet. Tabelle 8 zeigt die jeweiligen Sekundär-Antikörper. Angaben zu Verdünnungslösungen sind in Tabelle 10 zu finden.

Tabelle 7 Liste der verwendeten primären Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie

	Spezies	MG [kDa]	Verdünnung		Hersteller
			IH	WB	
α -SMA	<i>mouse</i>	42	1:20		Beckman Coulter
CTGF	<i>goat</i>	38		1:500	Santa Cruz
eNOS	<i>rabbit</i>	140		1:500	Santa Cruz
ERK1/2	<i>rabbit</i>	44, 42		1:1000	Cell Signaling
P-ERK1/2	<i>rabbit</i>	44, 42		1:1000	Cell Signaling
Fibronectin (ab2413)	<i>rabbit</i>	220	1:100		Abcam
GAPDH	<i>rabbit</i>	37		1:1000	Cell Signaling
Kollagen1A1 (ab21286)	<i>rabbit</i>	95	1:200		Abcam
PAI-1	<i>rabbit</i>	50		1:1000	Santa Cruz
PDE5a	<i>rabbit</i>	95		1:500	Santa Cruz
P-PDE5a – Ser(92)	<i>rabbit</i>	120		1:500	FabGennix
P-Smad2 – Ser(465/467)	<i>rabbit</i>	60		1:500	Cell Signaling
TGF- β 1	<i>goat</i>	25		1:300	Santa Cruz
Timp-1	<i>rabbit</i>	17		1:1000	Sigma
P-VASP – Ser(239)	<i>rabbit</i>	48, 50		1:1000	Cell Signaling

MG – Molekulargewicht; IH – Immunhistochemie; WB – Western Blot

Tabelle 8 Liste der verwendeten sekundären Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie

	Verdünnung		Hersteller
	IH	WB	
Alexa Fluor 488 <i>donkey anti-mouse</i> IgG	1:300		Life Technology
Alexa Fluor 647 <i>donkey anti-rabbit</i> IgG	1:300		Life Technology
<i>donkey anti-goat</i> IgG HRP		1:10 000	Santa Cruz
<i>donkey anti-rabbit</i> IgG HRP		1:50 000	dianova

MG – Molekulargewicht; IH – Immunhistochemie; WB – Western Blot

2.1.5.3 Primer für quantitative RT-PCR

Alle Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Oligonukleotid-Sequenzen sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9 Liste der verwendeten Primer-Sequenzen

Gen	<i>forward</i>	<i>reverse</i>
<i>18s-rRNA</i>	5'-aaatcagttatggttccttggtc-3' (24)	5'-gctctagaattaccacagttatccaa-3' (26)
<i>α-SMA</i>	5'-actctctccagccatcttca-3' (22)	5'-ataggtggttctgtggatgc-3' (20)
<i>cGKIα</i>	5'-cgccaggcgttccggaagt-3' (20)	5'-gtgcagagcttcacgcctt-3' (19)
<i>Kollagen1a1</i>	5'-catgttcagcttgtggacct-3' (21)	5'-gcagctgacttcagggatgt-3' (20)
<i>CTGF</i>	5'-tgacctggaggaaacattaaga-3' (23)	5'-agccctgtatgtcttcacactg-3' (22)
<i>Fibronectin</i>	5'-tgccgctctagcttctcc-3' (19)	5'-ggaatttctgcttatgcagagtc-3' (24)
<i>MMP2</i>	5'-taacctggatgccgtcgt-3' (18)	5'-ttcaggaataagcacccttgaa-3' (23)
<i>MMP9</i>	5'-acgacatagacggcatcca-3' (19)	5'-gctgtggttcagttgtggtg-3' (20)
<i>nNOS</i>	5'-catcaggcaccccaagt-3' (18)	5'-cagcagcatgttgacaca-3' (19)
<i>iNOS</i>	5'-cttggccacggacgagac-3' (18)	5'-tcattgtactctgaggctgac-3' (22)
<i>eNOS</i>	5'-atccagtgccctgcttca-3' (18)	5'-gcagggcaagttaggatcag-3' (20)
<i>PAI-1</i>	5'-aggatcgaggtaaacgagagc-3' (21)	5'-gcgggctgagatgacaaa-3' (18)
<i>TGF-β</i>	5'-tggagcaacatgtggaactc-3' (20)	5'-cagcagccggtaccaag-3' (18)
<i>TIMP1</i>	5'-gcaaagagcttctcaaagacc-3' (22)	5'-agggatagataaacagggaaaca-3' (25)

2.1.5.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Herstellungsprotokolle der einzelnen Puffer und Lösungen, die für die Versuche in Kapitel 2.1 benötigt wurden.

Tabelle 10 Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Sonstiges	
DEPC-Wasser	1 l Wasser; 1 ml DEPC; nach 24 Stunden autoklavieren
Fixierlösung	5,37 g/l NaCl; 3,42 g/l K ₂ HPO ₄ ; 0,38 g/l EGTA; 0,41 g/l MgCl ₂ ; 34,2 g/l Glucose; 30 g/l Paraformaldehyd; pH 7,4 (NaOH)
Probenvorbereitung Western Blot und Zymographie	
Lysepuffer	50mM Tris; 2 % SDS; Protease-Inhibitoren (Leupeptin 0,5 µg/ml; PMSF 300 µM, Benzamidin Hydrochlorid 1 mM; EDTA 5 mM) 1 Tablette PhosSTOP; 5 ml; pH 7,5
Protease-Inhibitoren	<p><i>Stocklösungen:</i></p> <p>Leupeptin: 1 mg/ml H₂O (6 Monate haltbar bei -20°C) PMSF 34,84 mg/ml Isopropanol (2 Jahre haltbar bei -20°C) Benzamidin Hydrochlorid: 15,7 mg/ml H₂O (frisch ansetzen) EDTA: 0,5 M (pH 8,0)</p> <p><i>Gebrauchskonzentrationen:</i></p> <p>Leupeptin 0,5 µg/ml PMSF 300 µM Benzamidine 1 mM EDTA 5 mM</p>
Western Blot	
Acrylamid-Lösung (SDS-PAGE)	30 % Acrylamid; 0,2 % Bisacrylamid
Acrylamid-Lösung (Tricin-Gel)	24,25 % Acrylamid; 0,75 % Bisacrylamid; ad 100 ml H ₂ O
Blotting-Puffer A1	36,3 g/l Tris; 20 % Methanol; pH 10,4
Blotting-Puffer A2	3,6 g/l Tris; 20 % Methanol; pH 10,4
Blotting-Puffer K	3 g/l Tris; 5,8 g/l 6-Aminohexansäure; 20 % Methanol; pH 7,6
Elektrophoresepuffer 10x	30 g/l Tris; 144 g/l Glycin; 10 g/l SDS (pH 8,3)
Elektrophorese-Puffer Anode (Tricin-Gel) 10X	2 M Tris; ad 1l Reinstwasser; pH 8,9
Elektrophorese-Puffer Kathode (Tricin-Gel) 10X	0,1 M Tris; 0,1 M Tricin; 0,1 % SDS; ad 1000 ml H ₂ O; pH 8,25

Gel-Puffer Tricin-Gel	3 M Tris; 15 ml 0,3 % SDS; ad 500 ml Reinstwasser; pH 8,45
Lämmli 6-fach	Lösung A: 3,02 g Tris; 0,2 g SDS; ad 50 ml H ₂ O (pH 6,8 mit HCl); 7 ml Lösung A; 3,6 ml Glycerin; 1 g SDS; 0,93 g DTT; 1,2 g Bromphenolblau; ad 10 ml H ₂ O
Ponceau-Lösung	0,2 % Ponceau S; 2 % Trichloressigsäure
Primär-AK-Verdünnungslsg.	3 % bovines Serumalbumin; 0,05 % Natriumazid in TBST
Sekundär-AK-Verdünnungslsg.	1 % BSA in TBST
Stripping-Lösung	20 ml 1 N NaOH; 180 ml H ₂ O; 4 mg SDS; 1 mg DTT
TBS-Puffer 10x	24,2 g/l Tris; 80 g/l NaCl pH=7,6
TBST-Puffer	TBS 1 x; 0,1 % Tween-20
Zymographie	
Acrylamid-Lösung	75 ml 40 % Acrylamid-Lösung (30 %); 0,8 % bis-Acrylamid; ad 100 ml H ₂ O
Coomassie Entfärber	300 ml Methanol; 100 ml Essigsäure; ad 1000 ml H ₂ O
Coomassie Färbe-Lösung	0,75 g Brilliant blue R; 227,5 ml Methanol; 45 ml Essigsäure; ad 500 ml H ₂ O
Gelatine-Lösung 5mg/ml	Erhitzte Gelatine in 60°C warmem Wasserbad, abkühlen
Lämmli 4-fach	Tris 1,2 g; SDS 2,5 g; in wenig H ₂ O lösen (pH 6,7); Glycerin 20 ml; 2 mg Bromphenolblau; ad 50 ml H ₂ O
Inkubationspuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10mM CaCl ₂ ; 0,02 % NaN ₃ ; 0,25 % Triton X-100; 1 µM ZnCl ₂
Waschpuffer	1x TBS (pH 7,6); 2,5 % Triton X-100
Immunhistochemie	
PBS-Puffer 10X	Lösung A: 4,56 g K ₂ HPO ₄ ; 16,36 g NaCl; ad 1,5 l H ₂ O; Lösung B: 1,36 g KH ₂ PO ₄ ; ad 1 l H ₂ O; Lösung A mit Lösung B titrieren (pH 7,5); ad 2 l mit H ₂ O
Tris/EDTA	1,2 g/l Tris; 0,372 EDTA; pH 8,5
Sirius Red / Fast Green Färbung	
0,2 % Fast Green Lösung	0,2 % Fast Green FCF; 100 ml Pikrinsäure (13 g/l)
0,2 % Sirius Red-Lösung	0,2 % Direct Red 80; 100 ml Pikrinsäure (13 g/l)
HPLC	
Mobile Phase	5 mM Natriumacetat (eingestellt auf pH 5.1 mit Essigsäure)/ Acetonitril 800:200 (v/v)

2.1.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms GraphPad Prism 6.0. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben, das Signifikanz-Niveau zwischen zwei Mittelwerten basierend auf dem ungepaarten Student's t-Test. Für die graphische Darstellung dienen Balkendiagramme, in welchen die Signifikanzniveaus folgendermaßen gekennzeichnet wurden: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.1.7 Enzyme-linked immunosorbent assay

Das Prinzip eines ELISAs (*enzyme-linked immunosorbent assay*) beruht auf einer Sandwich-Reaktion. Ein primärer Antikörper gegen das zu bestimmende Protein wird an eine stationäre Phase, meist eine Mikrotiter-Platte, gebunden. Nach Bindung des Proteins an den Primär-Antikörper wird ein Detektionsantikörper, welcher an ein Reporterenzym gekoppelt ist, beigefügt. Dieser bindet wiederum an das Antigen (Protein). Das an den Detektionsantikörper gekoppelte Enzym katalysiert nach Zugabe eines Chromogens eine Farbreaktion, deren Farbintensität mittels Photometer gemessen wird und proportional zur gesuchten Proteinmenge ist. Durch den Vergleich mit einer Standardkurve bekannter Proteinkonzentrationen kann die Konzentration des Proteins in einer Probe bestimmt werden.

2.1.7.1 Bestimmung der Serelaxin-Konzentration

Die Bestimmung der humanen Relaxin-2-Konzentrationen im Serum der Versuchstiere wurde mithilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits *Quantikine® ELISA – Human Relaxin-2 Immunoassay* gemäß des vom Hersteller zur Verfügung gestellten Protokolls durchgeführt. Die Serumproben der unbehandelten Tiere wurden unverdünnt eingesetzt, die der mit Serelaxin behandelten Tiere in 100-facher Verdünnung. Als Reporterenzym diente die Meerrettich-Peroxidase, welche Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid oxidierte, sichtbar durch einen blauen Farbumschlag. Zum Stoppen der Reaktion wurde Schwefelsäure hinzugegeben, um einen Farbumschlag von blau nach gelb zu erreichen, welcher bei 450 nm im Photometer mit der Software Magellan, Version 5 vermessen wurde. Die Referenzwellenlänge war 570 nm. Die lineare Standardkurve wurde durch Logarithmieren der x- (Konzentration) bzw. der y-Achse (optische Dichte) berechnet. Die untere Nachweisgrenze für Serelaxin lag bei 4,57 pg/ml.

2.1.7.2 Bestimmung der cGMP-Konzentrationen

Die Bestimmung der cGMP-Spiegel im Nierengewebe wurde mithilfe des kommerziell erhältlichen *Cyclic GMP EIA Kits* durchgeführt. Er beruht auf einer Konkurrenz von cGMP mit einer konstanten Menge cGMP-Acetylcholinesterase-Konjugat (cGMP-Tracer) um einen cGMP-spezifischen Antikörper. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex bindet dann an einen immobilisierten monoklonalen *anti-rabbit*-Antikörper auf der Mikrotiter-Platte. Die Menge an gebundenem cGMP-Tracer wird von der Menge des anwesenden freien cGMP bestimmt. Die überschüssigen nicht gebundenen Teile werden ausgewaschen und Ellmann's Reagenz als Substrat für die Acetylcholinesterase hinzugegeben. Die Farbintensität ändert sich in Abhängigkeit von der Acetylcholinesterase-Konzentration, welche photometrisch bei 412 nm mit einem Photometer ermittelt wurde. Die quantitative Bestimmung erfolgte anhand der Standardkurve. Das Gewebe für die cGMP-Bestimmung wurde 1,5 Stunden nach Injektion der Tagesdosis von Zaprinast entnommen und gewogen. Die Probenaufbereitung erfolgt wie im Protokoll angegeben mit der 10-fachen Menge an Trichloressigsäure und der anschließenden Extraktion an mit Wasser-gesättigtem Ether. Die Standardkurve wurde ebenfalls durch Verdünnung mit Ether-gesättigter 5 % Trichloressigsäure erstellt. Vor der Durchführung des Assays wurde die Probe mit Acetanhydrid in 4 M KOH acetyliert. Die Durchführung und Auswertung erfolgten gemäß des vom Hersteller zur Verfügung gestellten Protokolls.

2.1.8 Quantitative RT-PCR

Die RNA wurde nach der *single-step* Methode von Chomczynski und Sacchi^{197, 198} isoliert. Je ein Drittel der Niere wurde für die RNA-Bestimmung verwendet. Dazu wird das Gewebe in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß mit 1 ml PeqGold TriFast (Trizol) versetzt und im Ultra Turrax homogenisiert. PeqGold TriFast enthält Guanidiniumthiocyanat, welches die Zellen lysiert und RNAsen inaktiviert. Phenol als weiterer Bestandteil trägt zur Lösung der RNA bei. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde Chloroform hinzugefügt. Nach heftigem Schütteln und einer anschließenden 3-minütigen Inkubationszeit wurde die Probe bei 12000 g bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert, wobei drei Phasen entstanden. In der unteren organischen Phase sammelten sich Proteine, in der oberen wässrigen Phase die gelöste RNA. DNA reichert sich an der Phasengrenze an. Nach dem Abpipettieren der wässrigen Phase mit der gelösten RNA wurde diese mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten und einer Zentrifugationszeit (4°C, 12000 g,

10 Minuten) erhielt man das RNA-Pellet. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert (4°C, 7500 g, 5 Minuten) und anschließend der Überstand mit einer Pipette abgenommen. Das Pellet wurde für 5-10 Minuten getrocknet und anschließend in ca. 500 µl RNase-freiem DEPC-Wasser (DEPC: Diethylpyrocarbonat) rekonstituiert.

Die Bestimmung des RNA-Gehalts erfolgte am Photometer bei einer Absorptions-Wellenlänge von 260 nm. Für die Bestimmung der Reinheit diente der Quotient A_{260}/A_{280} , welcher bei ca. 2,0 liegen sollte.

Die Reverse Transkriptase (RT) schrieb die gewonnene RNA in cDNA (komplementäre DNA) um. Eine definierte Menge RNA (2 µg) wurde dazu in 9 µl DEPC-Wasser verdünnt, 1 µl oligo dT (0,5 µg/µl) dazugegeben, gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe für 5 Minuten auf 65°C erhitzt, um das Primer-Annealing zu ermöglichen. Danach wurde sie sofort auf Eis gestellt, um die Reverse Transkription zu ermöglichen. Es wurden 12 µl des in Tabelle 11 dargestellten Mixes hinzugefügt, gemischt, kurz zentrifugiert und schließlich im Thermo-Cycler inkubiert (1 Stunde bei 37°C, 2 Minuten bei 95°C, danach 4°C).

Tabelle 11 Bestandteile für den Reverse Transkriptase-Mix

Bestandteil	Menge [µl]	Firma
dNTP (2,5mM)	4,0	Fermentas
5x first strand buffer	4,0	Invitrogen
DEPC-Wasser	2,5	
RNAsin	0,5	Promega
RT (M-MLV)	1,0	Invitrogen

Die Quantifizierung der Polymerase-Kettenreaktion erfolgte durch den Zusatz des SYBR Green Farbstoffes, welcher mit der doppelsträngigen DNA interkalierte und dabei seine Fluoreszenz erhöhte. Diese Fluoreszenzerhöhung korrelierte mit der Vervielfältigung der DNA-Menge.

Für die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion diente der Lightcycler mit dem Lightcycler® 480 SYBR Green I Master (2x). In die zum System gehörige 96-Loch-Platte wurden jeweils 18 µl des SYBR Green I Masters (1x, mit DEPC-Wasser verdünnt), 2 µl cDNA, sowie jeweils 1 µl des *sense* bzw. des *antisense* Primers pipettiert und vor der Reaktion für 2 Minuten bei 2500 U (Raumtemperatur) zentrifugiert.

Für die Real-Time-PCR fand die *18s rRNA* als Referenz-Gen Verwendung. Die Reaktion lief nach folgendem Protokoll ab:

10 Minuten	95°C	45 Zyklen
15 Sekunden	95°C	
15 Sekunden	58°C	
20 Sekunden	72°C	

Die Quantifizierung der mRNA basierte auf der Cycle Time (CT)- Methode^{199, 200}. Dazu wurde die Fluoreszenz von SYBR Green logarithmisch gegen die Zyklenzahl der Polymerase-Kettenreaktion aufgetragen und ein Schwellenwert im Bereich des exponentiell anwachsenden Emissionsbereichs festgelegt. Sobald dieser Schwellenwert erreicht wurde, erhielt man den dazugehörigen CT-Wert. In diesem Fall bestimmte man den relativen Gehalt des Zielgens (Z) in Bezug auf ein Referenzgen (R), hier *18s rRNA*. Diese Normalisierung mit dem Referenzgen ermöglichte den Vergleich unterschiedlicher Proben aus verschiedenen Reaktionsansätzen.

Die Berechnung erfolgte mit der $\Delta\Delta^{CT}$ -Methode nach folgenden Formeln:

$$\Delta^{CT} = CT (Z) - CT (R)$$

$$\Delta\Delta^{CT} = \Delta^{CT} (\text{fibrotische Niere}) - \Delta^{CT} (\text{kontralaterale Niere})$$

Das Expressionsverhältnis r wird nach Pfaffl et al.¹⁹⁹ folgendermaßen berechnet:

$$r = 2^{-\Delta\Delta^{CT}}$$

2.1.9 Western Blotting und Zymographie

Für Western Blotting und Zymographie wurden die Proben in gleicher Weise lysiert, der Proteingehalt mit der Methode nach Lowry bestimmt und die Proben bei -80°C bis zur weiteren Analyse weggefroren.

Das Nierengewebe wurde gewogen und mit der 10-fachen Menge 2 % SDS-Puffer (+Protease-Inhibitoren, PhosSTOP) bei Raumtemperatur im Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurden die Proben im Kühlschrank (mindestens 4°C) für 45 Minuten inkubiert und zentrifugiert (14292 g, 40 Minuten, 7°C), der Überstand abpipettiert und auf Eis gestellt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach 20-facher Verdünnung der einzelnen Proben mit H₂O über die Verwendung des Bio-Rad DC Protein Assays.

2.1.9.1 Western Blotting

Die Methode Western Blotting wurde im Jahr 1979 unabhängig voneinander von Burnette²⁰¹ und Stark²⁰² entdeckt und ist heute eine weit verbreitete Methode in der Diagnostik. Es geht darum, in einer vorgeschalteten Gel-Elektrophorese ein Proteingemisch nach den entsprechenden Molekulargewichten aufzutrennen und die dadurch gewonnenen Proteinbanden mittels Elektrophorese auf eine Membran zu transferieren, auf welcher diese dann durch verschiedene Methoden sichtbar gemacht werden können.

Abhängig vom Molekulargewicht des Antikörpers wurde ein geeignetes Gel (Tricin-SDS-Polyacrylamidgel: vgl. Tabelle 12; SDS-Polyacrylamidgel: vgl. Tabelle 13) mit der dafür passenden Porengröße ausgewählt. Die Gele wurden in Gelapparaturen mit folgender Zusammensetzung polymerisiert:

Tabelle 12 Zusammensetzung des Tricin-SDS-Polyacrylamidgels

<i>Menge für 4 Gele</i>	Trenngel	Spacergel	Sammelgel
Acrylamidlösung	10 ml	2 ml	1 ml
Gel-Puffer	5 ml	1,6 ml	1,55 ml
Glycerin	2 ml	---	---
H ₂ O	---	1,3 ml	3,7 ml
TEMED	14 µl	6 µl	12 µl
10 % APS	90 µl	20 µl	60 µl

Tabelle 13 Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels

<i>Menge für 4 Gele</i>	Trenngel			
	5 %	11,5 %	12 %	14 %
Acrylamidlösung	0,83 ml	6,5 ml	7,1 ml	7,9 ml
1,8 M Tris/HCl (pH 8,8)	---	3,6 ml	3,6 ml	3,6 ml
0,6 M Tris/HCl (pH 6,8)	0,5 ml	---	---	---
H ₂ O	3,6 ml	6,5 ml	5,9 ml	5,1 ml
10 % SDS	50 µl	167 µl	167 µl	167 µl
TEMED	10 µl	20 µl	20 µl	20 µl
10 % APS	50 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Während der Polymerisation wurden die einzelnen Gelschichten jeweils mit Isopropanol überschichtet, um einen geraden Abschluss des Gels zu erreichen. Bis zur Verwendung wurden die Gele in feuchter Umgebung bei 4°C gelagert.

Eine definierte Proteinmenge (50 µg) wurde mit 6-fach Lämmli und H₂O verdünnt und zur Denaturierung für 3 Minuten bei 95°C mit dem Thermomixer erhitzt und gemixt, kurz abzentrifugiert und in die vorgeformten Probestaschen des Gels gefüllt. Das Lämmli-Reagens²⁰³ enthält SDS, welches sich als Detergens um die Proteine lagert und durch seine negative Ladung die Eigenladung der Proteine kompensiert. Als Marker dienten PageRuler Plus Protein Ladder (Prestained oder Unstained, für SDS-Polyacrylamidgel) bzw. Seebue® Plus2 Pre-Stained Standard (für Tricin-SDS-Polyacrylamidgel).

Vor dem Start der Gel-Elektrophorese im Mini Protean™ System, wurde die Elektrophorese-Kammer mit dem entsprechenden Elektrophoresepuffer (vgl. Tabelle 10) gefüllt:

- SDS-Polyacrylamidgel: 150 V für 90 Minuten
- Tricin-SDS-Polyacrylamidgel: 30 V für 30 Minuten; 150 V für 60 Minuten

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Semidry Verfahren²⁰⁴ auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurden 3 Filterpapiere getränkt in Blotting-Puffer A1, 2 Filterpapiere in Blotting-Puffer A2, in Methanol getränkte PVDF-Membran, das Elektrophorese-Gel und 5 Filterpapiere in Blotting-Puffer K luftblasenfrei übereinandergestapelt und in die Blotting Apparatur zwischen zwei Graphit-Platten (Anode-Kathode) gelegt. Die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran fand bei 60 mA (0,8 mA/cm²) pro Gel für 60 Minuten statt.

Zur Antikörper-Detektion wurde die PVDF-Membran auf dem Kreisschüttler mit 1 % bovinem Serumalbumin (in TBST) blockiert, um unspezifische Proteinbindungen abzusättigen. Nach dreimaligem Waschen in TBST inkubierte die Membran über Nacht bei 4°C in der Primär-Antikörper-Lösung (vgl. Tabelle 7). Alternativ konnten Proteinbanden mit Ponceau-Lösung unspezifisch angefärbt werden. Am darauffolgenden Tag wurde überschüssiger Primär-Antikörper mit TBST abgewaschen und die Membran im Sekundär-Antikörper für 2 Stunden inkubiert (vgl. Tabelle 8). Nach mehrmaligem Waschen mit TBST wurde die Chemolumineszenz-Reaktion gestartet, indem man Luminol-Enhancer-Lösung und Peroxidlösung in gleichem Volumenverhältnis für 3 Minuten auf der PVDF-Membran verteilte und anschließend mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System und der Software ImageLab 5.2.1 entwickelte. Die an den Sekundär-Antikörper gebundene Meerrettich-

Peroxidase katalysierte dabei die Oxidation des Luminols, dessen Oxidationsprodukt schließlich zur Chemilumineszenz führte.

Für die Detektion weiterer Proteine auf der Membran, wurde diese auf dem Kreisschüttler dreimal in TBST gewaschen und für 20 Minuten in Stripping-Lösung geschwenkt. Nach wiederum dreimaligem Waschen mit TBST, Blockieren mit 1 % bovinem Serumalbumin und nach einem weiteren Waschvorgang, wurde die Membran in Primär-Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert und wie beschrieben nach der Inkubation mit Sekundär-Antikörper detektiert.

2.1.9.2 Zymographie

Die Zymographie ist eine Substrat-Gel-Elektrophorese zur Detektion der proteolytischen Aktivität von Gelatinasen (MMP2 und MMP9) und wurde von Heussen und Dowdle im Jahr 1980 entwickelt.²⁰⁵ Für die Bestimmung von MMP9 wurden 70 µg Protein pro Probe vorgelegt, für die Bestimmung von MMP2 35 µg Protein pro Probe. Die Lyse des Gewebes erfolgte wie auf Seite 56 beschrieben. Das SDS im Lysepuffer führte zur Denaturierung der Proteine sowie zur Dissoziation der MMP/TIMP-Komplexe.

Die Probenverdünnung erfolgte ähnlich wie beim Western Blotting mit Lämmli 4x und Reinstwasser. Im Gegensatz zur in Kapitel 2.1.9.1 beschriebenen Methode wurde der Probe kein reduzierendes DTT oder Mercaptoethanol zugesetzt und die Probe wurde nicht erhitzt, um die Proteine möglichst schonend zu behandeln.

Das Gel für die Elektrophorese hatte folgende Zusammensetzung:

Tabelle 14 Zusammensetzung des Zymographie-Gels

<i>Menge für 4 Gele</i>	Sammelgel	Trenngel 7,5 %
Acrylamidlösung	0,83 ml	4,25 ml
1,8 M Tris/HCl	---	3,6 ml
0,6 M Tris/HCl	0,5 ml	---
Gelatine-Lösung	---	3,4
H ₂ O	3,6 ml	5,35 ml
10 % SDS	50 µl	167 µl
TEMED	10 µl	20 µl
10 % APS	50 µl	200 µl

Die Proteine wurden nach Molekulargewicht bei 130 V für 140 Minuten im Eiswasserbad elektrophoretisch aufgespalten und waren auf folgenden Bandenhöhen zu erwarten:

	<u>Molekulargewicht [kDa]</u>
MMP9 – latent	92
MMP9 – aktiv	82
MMP2 – latent	72
MMP2 – aktiv	62

Nach der Auftrennung wurden die Proteine durch die Entfernung von SDS durch zweistündiges Waschen mit dem nichtionischen Detergens Triton X (Wasch-Puffer) renaturiert. Außerdem wurde die autokatalytische Abspaltung der Pro-Domänen aus den latenten Gelatinasen unterstützt, so dass alle Proteine in aktiver Form vorlagen und die im Gel enthaltene Gelatine abbauen konnten. Diese Reaktion lief bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator in Inkubationspuffer ab, welcher durch die enthaltenen Calcium-Ionen die enzymatische Aktivität der MMPs erhöhen sollte. Am nächsten Tag wurde das Gel dreimal mit Wasser gewaschen und für 30 Minuten mit Coomassie Färbe-Lösung gefärbt. Die im Gel enthaltene Gelatine verfärbte sich blau, degradierte Gelatine entfärbte sich. Nach mehrmaligem Waschen mit Coomassie Entfärber-Lösung wurde das Gel mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System und der Software ImageLab 5.2.1 quantitativ vermessen.

2.1.10 Immunhistochemie und Sirius Red/ Fast Green-Färbung

Die mit Fixierlösung perfundierten Nieren wurden in einer aufsteigenden Methanol-Reihe (70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 2 x 100 % für je 30 Minuten) langsam dehydriert, anschließend in 100 % Isopropanol für zweimal 30 Minuten, sowie weitere 30 Minuten bei ca. 45°C in 100 % Isopropanol getränkt. Zur schonenden und vollständigen Durchdringung der Nieren mit Paraffin mussten die Nieren für 30 Minuten in ein Isopropanol-Paraffin-Gemisch (1:1) bei ca. 55°C und für weitere 24 Stunden in reines Paraffin gelegt werden (bei ca. 55°C), bevor sie in Einbettungen mit reinem Paraffin übergossen wurden.

Nach einer mindestens 24-stündigen Aushärtung bei 4°C im Kühlschrank wurden mithilfe des Rotationsmikrotoms 4 µm dicke Paraffin-Schnitte angefertigt und nach Strecken im 38°C temperierten Wasserbad auf Objektträger aufgezogen. Die Nieren sollten optimalerweise einen Querschnitt des Nierengewebes darstellen. Diese Objektträger wurden anschließend für mindestens 24 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet.

Zur Entparaffinierung wurden die Objektträger für zweimal 10 Minuten in Xylol getaucht, bevor diese dreimal für 5 Minuten mit 100 % Isopropanol und weitere zweimal für 5 Minuten mit 100 % Methanol behandelt wurden.

2.1.10.1 Immunhistochemie

Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden für 1 Stunde in Tris/EDTA (pH 8,5) gekocht. Dieser Schritt war notwendig, um die Permeabilität des durch Paraformaldehyd fixierten Gewebes zu erhöhen und die Epitope der cytosolischen Proteine für die Bindung an den Primär-Antikörper freizulegen. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Schnitte für 15 Minuten in 3 % H₂O₂ in Methanol getaucht, um die endogene Peroxidaseaktivität durch Zugabe des Substrats im Überschuss zu hemmen. Damit das spätere Chromogen durch das Enzym Peroxidase umgesetzt wurde, musste vor der Farbreaktion das endogene Enzym ausgeschaltet werden. Anschließend wurden die Objektträger zweimal in PBS für je 5 Minuten gewaschen und mit der Wasserstrahlpumpe getrocknet. Nach dem Einkreisen der Gewebeschnitte mit einem Fettstift wurden die einzelnen Schnitte mit 10 % *horse serum* (in 1 % BSA in PBS) für 20-30 Minuten blockiert, um unspezifische Bindungen des Primär-Antikörpers abzufangen. Der Primär-Antikörper wurde in (2,5 % *horse serum* in 1 % BSA in PBS verdünnt (vgl. Tabelle 15), ca. 30-50 µl auf jeden Gewebeschnitt aufgetragen und über Nacht bei 4°C im Feuchtkammerschüttler inkubiert.

Tabelle 15 immunhistochemische Färbungen verschiedener Antikörper

	Inkubation von 10 % <i>horse serum</i> in 1 % BSA in PBS	Verdünnung Primär-AK	Lösung zur Verdünnung des Primär-AK
α-SMA	30 Minuten	1:20	2,5 % <i>horse serum</i> in 1 % BSA in PBS
Fibronectin	30 Minuten	1:100	2,5 % <i>horse serum</i> in 1 % BSA in PBS
Kollagen1A1	20 Minuten	1:200	1 % BSA in PBS

Am darauffolgenden Tag wurde die Primär-Antikörper-Lösung mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Schnitte dreimal für je 5 Minuten mit 1 % BSA in PBS gewaschen. 50 µl der Sekundär-Antikörper-Lösung wurde für 2 Stunden auf den Gewebeschnitten inkubiert.

Vor der Herstellung der Sekundär-Antikörper-Lösung wurde der Antikörper und der Sekundär-Antikörper in der gewünschten Verdünnung (vgl. Tabelle 8) mit 1 % BSA in PBS bei 4°C und 16060 g für 10 Minuten zentrifugiert, um Kristalle zu entfernen, die bei der

Quantifizierung gestört hätten. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (je 5 Minuten) wurden die Gewebeschnitte letztendlich mit Glycerin und einem Deckglas konserviert. Um die Fluoreszenz bis zum Mikroskopieren zu erhalten, sollte ab der Inkubation mit der Sekundär-Antikörper-Lösung unter Lichtausschluss gearbeitet werden.

Die Bildaufnahmen wurden mit dem Axio Observer Z1 Mikroskop erstellt, indem man mithilfe der AxioVision Rel. 4.5 Software (Zeiss, Jena) Übersichtsbilder des Nierengewebes erstellte. Diese Übersichtsbilder entstanden durch das Zusammensetzen mehrerer einzelner Bildausschnitte. Die Quantifizierung erfolgte mit der Software Metamorph Offline Version 7.7.0.0.

2.1.10.2 Sirius Red/ Fast Green-Färbung

Nach der Rehydrierung der Gewebeschnitte wurden diese mit PBS (dreimal 5 Minuten) gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden auf dem Objektträger mit der Wasserstrahlpumpe getrocknet und mit dem Fettstift umrandet, bevor auf die Gewebeschnitte 80 µl einer Lösung aus 0,1 % Sirius Red/ 0,1 % Fast Green (in Pikrinsäure) gegeben wurden und die Schnitte für 30 Minuten unter Lichtausschluss inkubierten. Dabei wurden Kollagen-Anteile rot und Proteine grün gefärbt. Anschließend wurde der Farbstoff mit Wasser solange gewaschen, bis das Wasser klar blieb (ca. 4 Waschschrte). Nach der Trocknung der Schnitte gab man zur Entfärbung im Dunkeln 80 µl einer 1:1 Mischung aus 0,1 N NaOH und Methanol dazu. Nach 5 Minuten wurden 50 µl der Lösung vom Überstand entnommen und bei 530 nm (Sirius Red) und 605 nm (Fast Green) spektrophotometrisch vermessen. Die Auswertung erfolgte über die Software Magellan 5.

2.1.11 Kreatinin-Bestimmung

Die Kreatinin-Spiegel im Mäuseserum wurde mit Hilfe der HPLC bestimmt. Dazu wurde die bereits in der Literatur beschriebene Methode ²⁰⁶⁻²⁰⁸ – im Folgenden als Methode (A) bezeichnet – in Zusammenarbeit mit Prof. Kees (Universität Regensburg) weiterentwickelt und optimiert. Die optimierte Methode wird im Folgenden als Methode (B) bezeichnet.

Methode (A): In einem 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß wurden zu 10 µl Serum 500 µl Acetonitril pipettiert, gemischt und 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (2 Minuten, 10800 g) und 450 µl Überstand in neue 2 ml Eppendorf-Gefäße (ohne Deckel) pipettiert. Die Lösung wurde eingedampft (60 Minuten, 60°C; Jouan Vakuum

Verdampfer RC 10.22, Fa. Jouan, Unterhaching) und der Rückstand in 100 µl mobiler Phase aufgenommen. Nach nochmaligem Zentrifugieren (2 Minuten; 10800 g), um eventuelle Partikel abzutrennen, wurde der Überstand in HPLC-Minivials überführt und ein Aliquot von 10-20 µl in das HPLC-Gerät injiziert. Die Trennung erfolgte an einer stark sauren Kationenaustauschersäule (Agilent Zorbax 300-SCX, i.D. 150x4,6 mm, Fa. Agilent, 76337 Waldbronn) und war geschützt mit einer Vorsäule (i.D. 4x3 mm, gefüllt mit Nucleoshell RP18 Kieselgel; Column Protection System, Fa. Macherey-Nagel, 52355 Düren). Die mobile Phase bestand aus 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat/ Acetonitril/ Methanol 100:12:8 (v/v/v). Bei einem Fluss von 1,0 ml/min (Säulentemperatur 35°C) eluierte Kreatinin nach 3,4 Minuten.

Methode (B): In ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß wurden 50 µl 7 % Perchlorsäure pipettiert und 10 µl Serum zugefügt. Nach 2-3 Sekunden Vortexen und 15 Minuten Inkubieren im Kühlschrank bei 4-5°C wurde das ausgefällte Protein durch Zentrifugation abgetrennt (2 Minuten, 10800 g). Der Überstand wurde in ein HPLC-Minivial überführt und ein Aliquot von 5 µl injiziert. Das Trennsystem bestand aus einer stark sauren Kationenaustauschersäule und war geschützt mit einer Vorsäule, die mobile Phase bestand aus 5 mM Natriumacetat (pH 5,1 mit Essigsäure)/ Acetonitril 80:20 (v/v). Bei einem Fluss von 1,0 ml/min eluierte Kreatinin nach 6,3-6,5 Minuten. Verwendete Geräte und Materialien werden in Tabelle 16 (sowie in Kapitel 2.1.5) aufgeführt.

Tabelle 16 Geräte und Materialien der neu entwickelten HPLC-Methode (Methode B)

Degasser	DG-4000 (Recipe Chemicals, München, D)
Pumpe	LC 20AT (Shimadzu, Duisburg, D)
Autosampler	SIL-20AC HT (Shimadzu, Duisburg, D)
Säulenofen	ERC 125 (ERC, Riemerling, D)
UV-Detektor	SPD-10 AV (Shimadzu, Duisburg, D); gesetzt auf 234 nm
Steuergerät	CBM-20A (Shimadzu, Duisburg, D)
Auswertsystem	LC-Solution (Shimadzu, Duisburg, D)
Kationenaustauschersäule	Agilent Zorbax 300-SCX, i.D. 150x4.6 mm, Agilent, Waldbronn, D
Vorsäule	Column Protection System mit Säule i.D. 4x3 mm, gefüllt mit Nucleoshell RP18 2,7µ Kieselgel; Macherey-Nagel, Düren, D
Mobile Phase	5 mM Natriumacetat (pH 5,1 mit Essigsäure)/ Acetonitril 800:200 (v/v)
Säulentemperatur	35°C
Fluss	1,0 ml/min

Da kein kreatininfreies Serum zur Verfügung stand, wurden die Methoden in 5 % BSA validiert. Linearität wurde nachgewiesen von 0,2 - 20 mg/l. Die Nachweisgrenze "on column" war (A) 200 bzw. (B) 85 pg Kreatinin, die Bestimmungsgrenze jeweils 0,2 mg/l bei einem Injektionsvolumen von (A) 15 bzw. (B) 5 µl. Eine weitere Erniedrigung der Bestimmungsgrenze war nicht möglich, weil das verwendete BSA selbst ca. 5 ng Kreatinin/ 5 mg Albumin enthielt und einen Leerwert erzeugte. Die Kalibrierung erfolgte über Kreatinin 2 mg/l in 5 % BSA, je ein Kalibrator pro 10-15 Serumproben, mindestens aber drei, wurden mitgeführt. Zur Qualitätskontrolle wurde Kreatinin 10, 3 und 0.5 mg/l in 5 % BSA in Doppelbestimmung mitgeführt. Die Intra-Assay- und Inter-Assay-Variation, bestimmt über die Qualitätskontrollen, waren besser als (A) 5 % bzw. (B) 6 %; die Richtigkeit (\pm SD), ausgedrückt als Quotient der berechneten und der Sollkonzentration war (A) $103,2 \pm 4,3$ % bzw. (B) $99,5 \pm 4,0$ %, die Recovery war (A) $96,8 \pm 12,0$ % bzw. (B) $102,5 \pm 2,2$ %.

2.2 Fibrose-assoziierte Biomarker in der pulmonalen Hypertonie

Die folgenden Versuche wurden durch Novartis Pharma GmbH finanziell unterstützt. Die Durchführung der Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Biomedizinischen Forschungszentrum Gießen (AG Pulmonary Pharmacotherapy, Prof. Schermuly) und dem Zentrum für Pulmonale Hypertonie der Uniklinikum Gießen und Marburg GmbH, Rhön-Klinikum AG (Dr. Dr. Henning Gall).

2.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die Versuche wurden unter Verwendung der in Tabelle 17 gelisteten Geräte und der in Tabelle 18 aufgeführten Verbrauchsmaterialien bzw. Kits durchgeführt.

Tabelle 17 Liste der verwendeten Geräte

Gefrierschrank	-80°C	Thermo Scientific	Rockford, USA
Photometer	Infinite M200 Pro	Tecan Group Ltd.	Männedorf, CH
Zentrifuge	Micro Star 17R	VWR International	Darmstadt
Wippschüttler	Shaker DRS-12	NeoLab	Heidelberg
Thermo-Inkubationsschüttler	Thriller	PeqLab	Erlangen

Tabelle 18 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

ELISA-Kits	Human-MMP2	Invitrogen Life Technologies	Darmstadt
	Human MMP9	Invitrogen Life Technologies	Darmstadt
	Quantikine® Human TIMP1	R & D Systems	Wiesbaden
	Quantikine® Human TIMP4	R & D Systems	Wiesbaden
Monovetten		Sarstedt	Nürnbrecht

2.2.2 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv besteht aus stationär behandelten Patienten des Zentrums für Pulmonale Hypertonie im Uniklinikum Gießen und Marburg GmbH, Rhön-Klinikum AG. Die Diagnose der pulmonalen Hypertonie wurde anhand der in den ESC/ERS-Leitlinien gültigen Kriterien¹⁶⁴ basierend auf einer Rechtsherzkatheter-Untersuchung durch das Klinikpersonal gestellt. Vor dieser Untersuchung wurde auf freiwilliger Basis eine schriftliche

Einverständniserklärung für die Sammlung klinischer Parameter sowie für die Aufbewahrung von Blutproben für zukünftige Biomarker-Untersuchungen ebenfalls durch das Klinikpersonal eingeholt. Zur Überwachung des Krankheitsverlaufs wurden regelmäßig weitere Rechtsherzkatheter-Untersuchungen stationär durchgeführt, wobei ebenfalls Blutproben entnommen wurden. Die Rechtsherzkatheter-Untersuchung erfolgte durch Punktion der Jugularvene und Einführung eines vierlumigen Swan-Ganz-Katheters. Das Herzzeitvolumen wurde mittels Thermodilution nach Fegler et al.²⁰⁹ ermittelt. Die retrospektive Datenakquisition wurde von der lokalen Ethikkommission der Universitätsklinik Giessen positiv bewertet (s. Stellungnahme der Ethikkommission, Sitzung vom 27.09.2012; Az.: 151/12).

Insgesamt wurden 35 Patienten konsekutiv ausgewählt, von denen Blutproben und die entsprechenden klinischen Parameter von mindestens zwei aufeinander folgenden Visiten vorlagen. Außerdem musste die Diagnose einer idiopathischen pulmonalerteriellen Hypertonie (iPAH) oder einer pulmonalen Hypertonie aufgrund einer Linksherzerkrankung (PH-LHD) gestellt werden.

2.2.3 Klinische Parameter

Zusätzlich zur hämodynamischen Untersuchung wurden die im Rahmen der ärztlichen Routine-Untersuchung erhobenen Daten zum Zeitpunkt der Katheterisierung aus der Patientenakte für die Auswertung der Biomarker-Untersuchung herangezogen. Darunter befanden sich z. B. Patienten-Anamnese, Vitalzeichen, Laborwerte, Leistungsparameter oder bildgebende Verfahren. Die für die Auswertung ausgewählten Parameter sind in Tabelle 19 gelistet.

Tabelle 19 Patientenbezogene Parameter für die Datenauswertung

Hämodynamik	
mPAP	Mittlerer pulmonalarterieller Druck
PAWP	Pulmonalarterieller Verschlussdruck
CI	Herzindex
PVR	Pulmonalvaskulärer Widerstand
weitere klinische Parameter	
6MWD	6 Minuten-Gehtest
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
TAPSE	<i>Trikuspid Annular Plain Systolic Excursion</i>
BNP	<i>Brain Natriuretic Peptide</i>
eGFR	Geschätzte glomeruläre Filtrationsrate

Weiterhin wurde, falls der Patient im Beobachtungszeitraum verstarb, der Todeszeitpunkt dokumentiert und ob bzw. wann der Patient eine klinische Verschlechterung (sog. *Clinical Worsening* Ereignis) zu verzeichnen hatte. Als *Clinical Worsening* definierte man ein Ereignis des Patienten, welches sich durch Tod, Lungentransplantation oder die Intensivierung der für die pulmonale Hypertonie spezifischen Medikation äußerte. Informationen zum Lebensstatus und klinischer Verschlechterung wurden bis Juli 2015 in die Datenauswertung einbezogen.

2.2.4 Blutentnahme

Die Blutproben wurden mittels Citrat-Monovetten während der Rechtsherzkatheter-Untersuchung vom Klinikpersonal aus der Pulmonalarterie entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelegt. Nach maximal 5 Stunden wurden die Blutproben bei 3000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und das Plasma bei -20°C eingefroren. Die längerfristige Aufbewahrung erfolgte bei -80°C.

2.2.5 Bestimmung der Biomarker

Für die Bestimmung der Plasma-Konzentrationen von MMP2, MMP9, TIMP1 und TIMP4 wurden ELISA-Kits verwendet (vgl. Kapitel 2.1.7). Die Ergebnisse der Plasmaspiegel bei Visite 1 wurden von der Ambulanz für pulmonale Hypertonie (Prof. Ghofrani, Uniklinikum Gießen und Marburg) und der AG Pulmonary Pharmacotherapy (Prof. Schermuly) des

Biomedizinischen Forschungszentrums Gießen zur Verfügung gestellt. Die Plasmaspiegel bei Visite 2 wurden im Rahmen dieser Arbeit bestimmt.

Die Bestimmung der MMP2-, MMP9-, TIMP1- sowie TIMP4-Konzentrationen im Plasma der Patienten wurden mithilfe kommerziell erhältlicher ELISA-Kits (siehe Tabelle 18) gemäß des vom Hersteller zur Verfügung gestellten Protokolls durchgeführt. Zur Probenmessung wurde Citrat-Plasma in den folgenden Verdünnungen – jeweils als Duplikate – gemessen:

<u>Plasma-Biomarker</u>	<u>Verdünnung</u>
MMP2	2-fach
MMP9	80-fach
TIMP1	50-fach
TIMP4	2-fach

Die Biomarker-Konzentrationen wurden photometrisch mithilfe der Software Magellan, Version 7.1 (Tecan Group Ltd.) bestimmt.

Aufgrund fehlender Validierung der TIMP1 und TIMP4 ELISA-Kits für Citrat-Plasma durch den Hersteller wurde durch Mitarbeiter der AG Schermuly mittels *spike in recovery* Experimenten eine laborinterne Validierung der ELISA-Kits für die Citrat-Plasmaproben durchgeführt.

Als Reporterenzym wurde in allen ELISA-Kits Meerrettich-Peroxidase eingesetzt, durch welches das Chromogen Tetramethylbenzidin mit Wasserstoffperoxid zum Farbstoff oxidiert wurde. Zum Stoppen der Reaktion wurde Schwefelsäure hinzugegeben, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb eintrat. Die Absorption wurde bei 450 nm im Photometer gemessen. Für TIMP1 und TIMP4 wurde eine Referenzwellenlänge von 570 nm verwendet. Die Standardkurve wurde als 4-Parameter Regressionskurve (für MMP2, MMP9, TIMP1) bzw. durch Logarithmieren der Achsen und linearer Regression (für TIMP4) berechnet. Die Proben-Konzentration wurde mithilfe der Standardkurve anhand der optischen Dichte der Plasmaproben berechnet.

2.2.6 Statistische Auswertung

Für die Auswertung in dieser Arbeit wurden nicht die einzeln bestimmten Biomarker MMP2, MMP9, TIMP1 und TIMP4, sondern die jeweiligen MMP/TIMP-Verhältnisse verwendet:

- MMP2/TIMP1
- MMP2/TIMP4
- MMP9/TIMP1
- MMP9/TIMP4

Die Verhältnisse von MMPs zu TIMPs gelten als Maß für die tatsächliche Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen.

Patienten-Charakteristika wie Alter und Geschlecht wurden deskriptiv dargestellt. Kategorische Daten wurden als Frequenzen und Prozent dargestellt. Für kontinuierliche Variablen wurden Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, Minimum (Min) und Maximum (Max) präsentiert.

Alle Variablen wurden bei Visite 1 (V1; Diagnose) und bei Visite 2 (V2; Folgevisite) erhoben. Zusätzlich wurde für jeden einzelnen Patienten die relative Veränderung von V1 zu V2 folgendermaßen berechnet:

$$\Delta x = (V2(x) - V1(x)) / V1(x) ,$$

wobei x durch ein MMP/TIMP-Verhältnis bzw. einen klinischen Parameter aus Tabelle 19 ersetzt werden konnte.

Unterschiede in ausgewählten Variablen zwischen Gruppen wurden mithilfe des Mann-Whitney-U- (für ungepaarte Stichproben) bzw. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (für gepaarte Stichproben) berechnet. Der zeitliche Verlauf der einzelnen Parameter wurde zusätzlich für jeden einzelnen Patienten graphisch dargestellt. Für die Veranschaulichung von Häufigkeiten wurden Histogramme erstellt.

Um den statistischen Zusammenhang zwischen zwei Variablen – klinischem Parameter und Biomarker – zu beurteilen, wurde aufgrund der geringen Fallzahl in den beiden Gruppen ($n < 35$) der Spearman-Korrelationskoeffizient berechnet.

Die Interpretation der Spearman-Korrelationskoeffizienten r wurde folgendermaßen eingeteilt:

Tabelle 20 Einteilung und Interpretation des Spearman-Korrelationskoeffizienten r (angelehnt an Mukaka et al.²¹⁰)

r	Interpretation
bis 0,3	sehr geringe Korrelation
bis 0,5	geringe Korrelation
bis 0,7	mittlere Korrelation
bis 0,9	hohe Korrelation
über 0,9	sehr hohe Korrelation

Für die Analyse des Überlebens sowie der klinischen Verschlechterung wurden Kaplan-Meier-Kurven zur Veranschaulichung angewandt. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der Log-Rang-Test durchgeführt.

Um die prädiktive Aussagekraft der einzelnen Biomarker auf das Überleben [3-Jahres-Überleben] bzw. das Eintreten einer klinischen Verschlechterung zu untersuchen, wurde die *area under the curve* (AUC) einer *receiver operating characteristics* (ROC)-Analyse betrachtet und daraus ein Grenzwert des Biomarkers mit optimaler Sensitivität und Spezifität ermittelt.

Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet (gekennzeichnet als * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die statistische Auswertung wurde mithilfe von SPSS, Version 22 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Antifibrotischer Signalweg von Serelaxin am Beispiel eines murinen Nierenfibrose-Modells

3.1.1 Serelaxin-Konzentrationen im Serum

An den WT und cGKI-KO Mäusen wurde mittels unilateraler Ureterligation eine Nierenfibrose induziert. Zeitgleich zur UUO wurde bei behandelten Tieren die kontinuierliche Verabreichung von Serelaxin bzw. die einmal tägliche Injektion von Zaprinast gestartet. Die Organentnahme erfolgte je nach Versuchsanordnung nach 3 bzw. 7 Tagen.

Serelaxin wurde den Tieren über osmotische Minipumpen mit einer Geschwindigkeit von 0,5 mg/kg/d und einer Flussrate von 0,5 µl/Stunde für die Dauer der UUO verabreicht. Sowohl in WT als auch in cGKI-KO Mäusen konnten ohne Serelaxingabe nach 7-tägiger UUO nur sehr geringe bzw. nicht nachweisbare Konzentrationen an Serelaxin bzw. endogenem Relaxin detektiert werden (WT: $11,36 \pm 1,41$ pg/ml, n=11; cGKI-KO: $< 4,57$ pg/ml, n=5).

Die Serelaxin-Serumspiegel stiegen nach intraperitonealer Verabreichung für 3 bzw. 7 Tage signifikant an. Die Relaxin-Konzentrationen im Serum unterschieden sich nicht signifikant zwischen einer 3- bzw. 7-tägigen Behandlung (WT 3 Tage: $22,0 \pm 4,0$ ng/ml, n=14; 7 Tage: $20,4 \pm 2,3$ ng/ml, n=8; cGKI-KO 3 Tage: $15,2 \pm 5,9$ ng/ml, n=4; 7 Tage: $13,4 \pm 3,1$ ng/ml, n=4).

3.1.2 Einfluss von Serelaxin auf cGMP und die cGMP-abhängige Proteinkinase cGKI

Serelaxin vermittelt seine Wirkung im Körper über NO und den *second messenger* cGMP.¹⁵⁰ Gesundes Nierengewebe unbehandelter Wildtyp-Tiere wies eine cGMP-Konzentration von $25,89 \pm 5,17$ pmol/g auf. Induzierte man an der kontralateralen Niere eine Fibrose mittels UUO, stieg die cGMP-Konzentration in diesem Gewebe nach 7 Tagen auf $42,48 \pm 5,71$ pmol/g an. Im fibrotischen Gewebe des Wildtyps war eine signifikante Erhöhung nach 7-tägiger Behandlung sowohl mit Serelaxin ($94,99 \pm 12,49$ pmol/g) oder mit Zaprinast ($218,10 \pm 20,00$ pmol/g) als auch mit deren Kombination ($116,11 \pm 18,87$ pmol/g) zu beobachten

(Abbildung 10; jeweils $p < 0,001$). Während die cGMP-Spiegel nach Serelaxintherapie vergleichbar mit denen der Kombinationstherapie waren, wurde durch den Phosphodiesterase 5-Inhibitor Zaprinast (1,5 Stunden nach Injektion der Tagesdosis) der cGMP-Gehalt der Niere im Vergleich zu den beiden anderen Therapieoptionen auf fast das Doppelte erhöht (je $p < 0,01$).

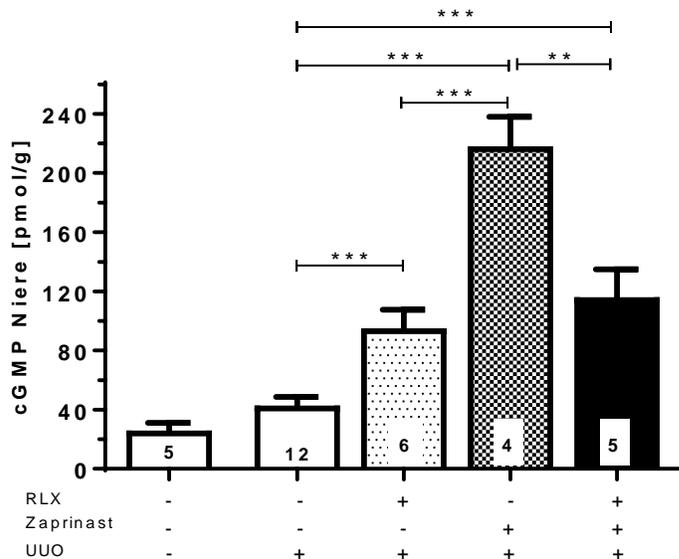


Abbildung 10 cGMP-Konzentrationen im Nierengewebe von WT Mäusen ohne Behandlung sowie nach 7-tägiger Behandlung mit Serelaxin, Zaprinast oder deren Kombination nach UUU Im jeweiligen Balken ist die Anzahl der Versuchstiere angegeben; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; cGKI – cGMP-abhängige Proteinkinase, RLX – Serelaxin; UUU – unilaterale Ureterligation; WT – Wildtyp

Ein repräsentativer Western Blot in Abbildung 11 A zeigt die Veränderung der Aktivität der cGMP-abhängigen Proteinkinase cGKI anhand der Phosphorylierung des vasodilatatorischen Phosphoproteins (*vasodilator stimulating phosphoprotein*; VASP), welches eine cGKI-spezifische Phosphorylierungsstelle an Serin(239) enthält. Bei Tieren, die mit Serelaxin behandelt wurden, erhöhte sich die Phosphorylierung am cGKI-spezifischen Serin(239) sowohl im gesunden als auch im fibrotischen Nierengewebe.

Abbildung 11 B fasst die VASP-Phosphorylierung an Serin(239) ausschließlich in der fibrotischen Niere zusammen. Nach Behandlung mit Serelaxin stieg die VASP-Phosphorylierung statistisch nicht signifikant im WT an (0,94-fach \pm 0,12 vs. 1,68-fach \pm 0,32; $p = 0,062$). Im cGKI-KO wurde keine Veränderung der VASP-Phosphorylierung beobachtet (0,79-fach \pm 0,22 vs. 0,86-fach \pm 0,17).

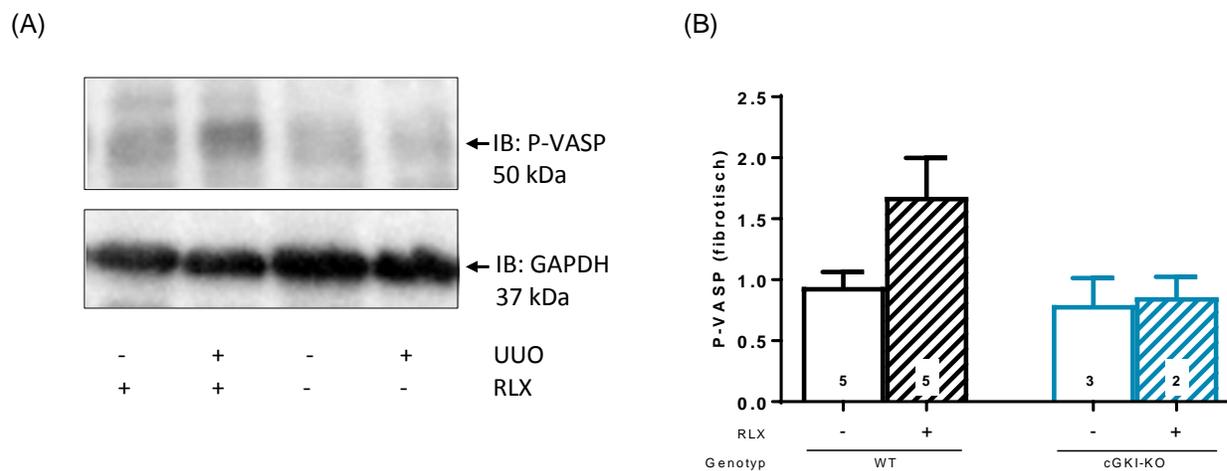


Abbildung 11 (A) Repräsentativer Immunoblot von unbehandelten oder mit Serelaxin behandelten WT Mäusen 7 Tage nach UUU und (B) Proteinexpression von P-VASP (Ser(239)) in fibrotischem WT und cGKI-KO Mäusen mit bzw. ohne Serelaxin-Behandlung 7 Tage nach UUU P-VASP (Ser(239)) wurde durch Western Blotting quantifiziert (50 µg Gesamtprotein-Menge; Normalisierung auf GAPDH); für die statistische Auswertung wurde ausschließlich fibrotisches Gewebe berücksichtigt, Veränderungen wurden auf den Mittelwert der unbehandelten WT Versuchstiere bezogen, welcher als 1 definiert war; im jeweiligen Balken wird die Anzahl der Versuchstiere angegeben; cGKI – cGMP-abhängige Proteinkinase I, GAPDH – Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; KO – knock out, RLX – Serelaxin, VASP – vasodilatatorisches Phosphoprotein; WT – Wildtyp

3.1.3 Einfluss von Serelaxin auf die Progression der renalen Fibrose – 3 vs. 7 Tage

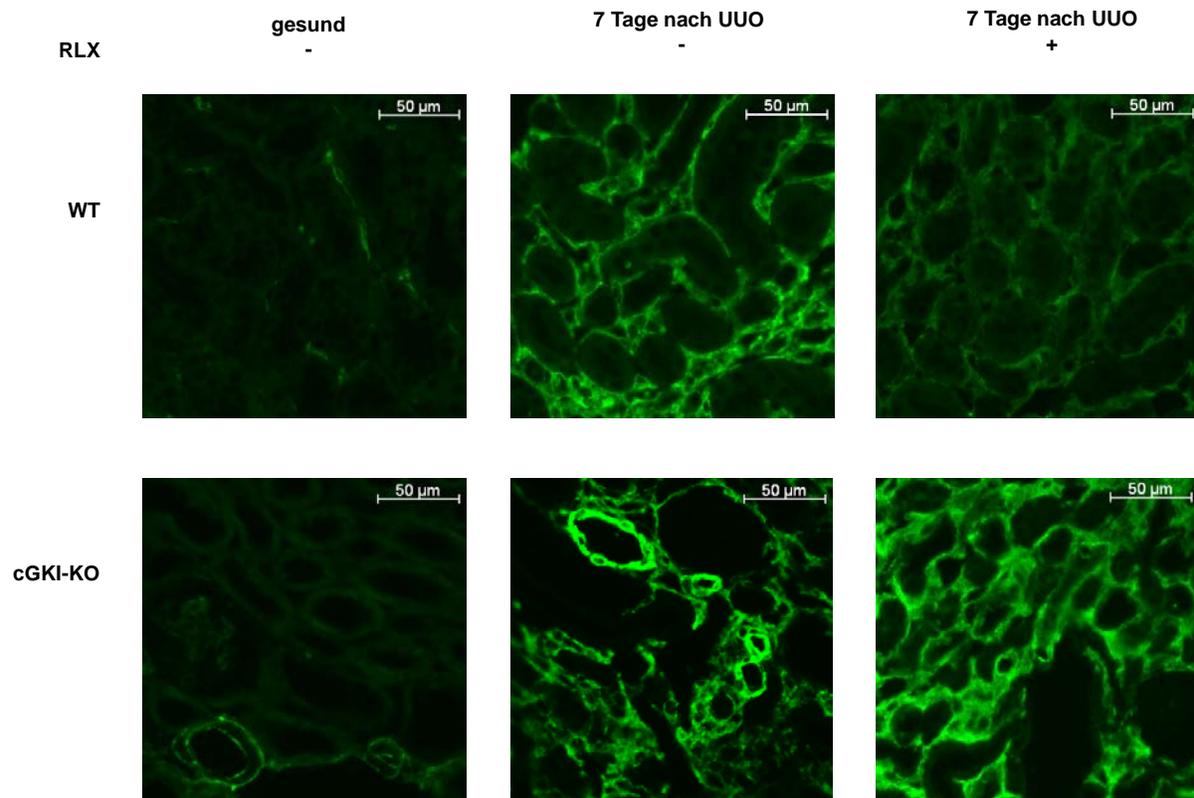
Für ausgewählte Moleküle liegen Ergebnisse der Gen- sowie Proteinexpression vor. Der Schwerpunkt der folgenden Kapitel (Kapitel 3.1.3 – Kapitel 3.1.4.3) liegt auf der Darstellung und Regulation der Proteinexpression. Liefert die Proteinexpression Ergebnisse, die von denen der Genexpression diverser Marker abweichen, wird in den folgenden Kapiteln ebenfalls auf die Ergebnisse der Genexpression eingegangen. Ergebnisse der Genexpression werden im Anhang, Kapitel 11.2 detailliert aufgelistet.

3.1.3.1 Einfluss von Serelaxin auf die Myofibroblasten-Differenzierung

In fibrotischem Gewebe kommt es zur Differenzierung und unkontrollierten Proliferation von Myofibroblasten, welche durch ihre sezernierenden und kontraktilen Eigenschaften den Aufbau von extrazellulärer Matrix fördern. Diese Myofibroblasten zeichnen sich durch die Expression des Markers α -SMA aus.

In den immunhistochemischen Färbungen aus Abbildung 12 A ist zu erkennen, dass α -SMA sowohl im WT als auch im cGKI-KO im gesunden Gewebe ausschließlich in Gefäßwänden vorkommt. Eine deutlich erhöhte Färbung von α -SMA in der fibrotischen Niere im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe kam aufgrund der Differenzierung zu Myofibroblasten zustande (Erhöhung nach 7-tägiger UUO: WT: $60,11 \pm 7,56$ %, n=8; cGKI-KO: $58,22 \pm 7,46$ %, n=5; vgl. Abbildung 12 B).

(A)



(B)

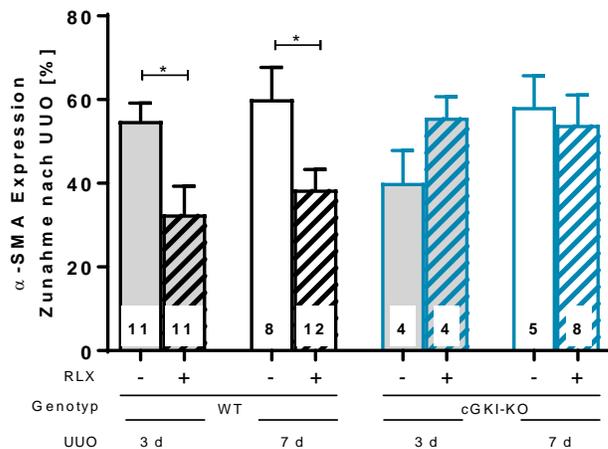


Abbildung 12 Einfluss von Serelaxin auf die Proteinexpression von α -SMA in fibrotischem Nierengewebe von WT und cGKI-KO Mäusen nach 3- bzw. 7-tägiger UUU α -SMA wurde mittels Immunhistochemie bestimmt; (A) zeigt repräsentative immunhistochemische Aufnahmen von WT und cGKI-KO Mäusen nach 7-tägiger UUU; (B) zeigt die statistische Auswertung von WT und cGKI-KO Mäusen nach 3- und 7-tägiger UUU; im jeweiligen Balken wird die Anzahl der Versuchstiere angegeben; * $p < 0,05$; α -SMA – α -smooth muscle actin, cGKI – cGMP-abhängige Proteinkinase I, cGMP – zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat, KO – knock out, RLX – Serelaxin, UUU – unilaterale Ureterligation, WT – Wildtyp

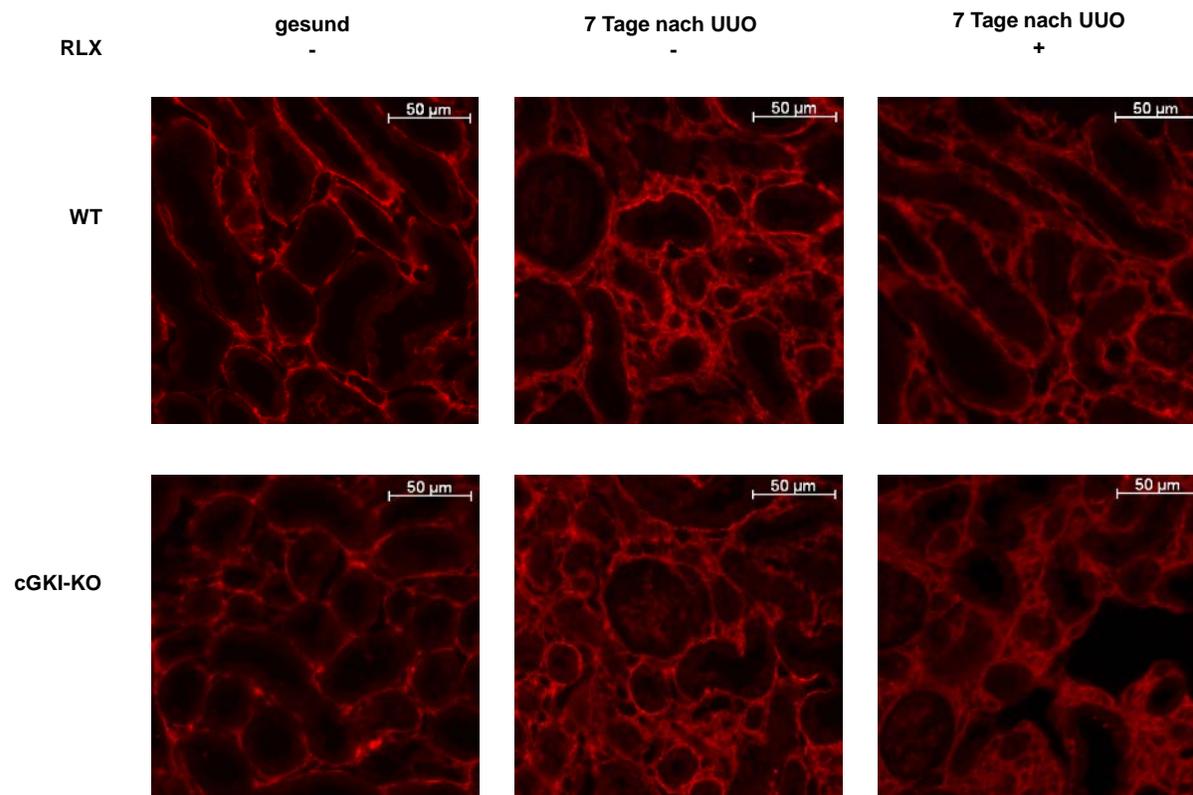
Abbildung 12 B zeigt die signifikant reduzierte Proteinfärbung im fibrotischen Gewebe nach Serelaxin-Behandlung sowohl nach 3 Tagen ($54,88 \pm 4,29 \%$ vs. $32,54 \pm 6,77 \%$, $p=0,011$) als auch nach 7 Tagen im WT ($60,11 \pm 7,56 \%$ vs. $38,49 \pm 4,79 \%$; $p=0,020$). Unter Abwesenheit der cGKI (im cGKI-KO) blieb der reduzierende Effekt durch Serelaxin im fibrotischen Gewebe aus (Erhöhung nach 3 Tagen: $40,12 \pm 7,71 \%$ vs. $55,69 \pm 5,01 \%$; nach 7 Tagen: $58,22 \pm 7,46 \%$ vs. $53,99 \pm 7,08 \%$).

Ähnlich wurde die Genexpression dieses Markers für beide Zeitintervalle im Nierengewebe reguliert (vgl. Anhang, Kapitel 11.2).

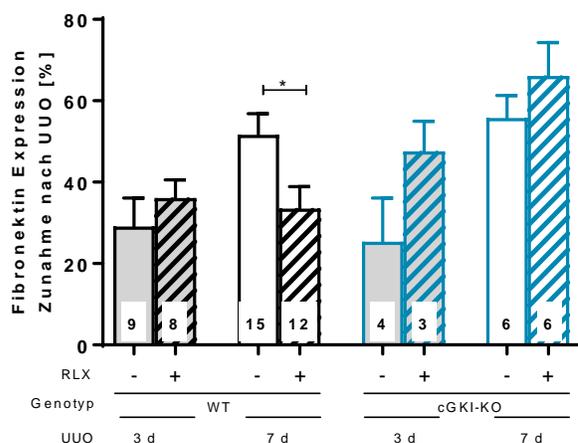
3.1.3.2 Einfluss von Serelaxin auf die Akkumulation von extrazellulärer Matrix

Durch das vermehrte Angebot an ECM-produzierenden Zellen im fibrotischen Gewebe sind Bestandteile der extrazellulären Matrix erhöht. Im WT erhöhte sich nach 7-tägiger UUO Kollagen1A1 um $49,45 \%$ ($\pm 4,07$; $n=17$; vgl. Abbildung 13 A) und Fibronectin um $51,60 \%$ ($\pm 5,21$; $n=15$) sowie Gesamtkollagen um $21,35 \%$ ($\pm 0,99$; $n=37$). Die Genexpression von Kollagen1A1 und Fibronectin stieg in fibrotischem Gewebe sowohl in der WT als auch der cGKI-KO Maus an (vgl. Anhang, Kapitel 11.2.1).

(A) Immunhistochemische Aufnahmen von Kollagen1A1



(B) Fibronektin



(C) Gesamtkollagen

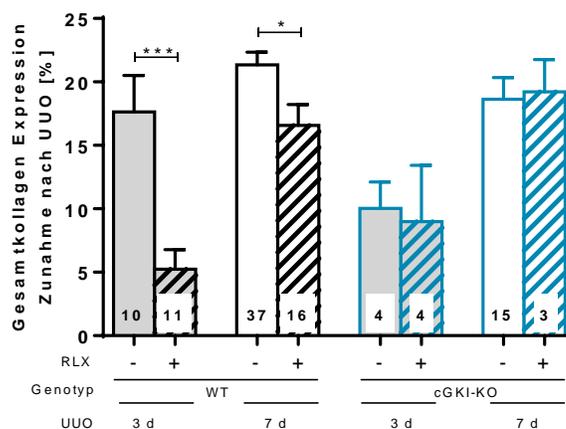


Abbildung 13 Einfluss von Serelaxin auf die Proteinexpression von Fibronektin, Kollagen1A1 und Gesamtkollagen in Nierengewebe von WT und cGKI-KO Mäusen Fibronektin und Kollagen1A1 wurden mittels Immunhistochemie, Gesamtkollagen mittels Sirius Red/ Fast Green Färbung bestimmt; (A) zeigt repräsentative immunhistochemische Aufnahmen von Kollagen1A1; (B) und (C) zeigen die statistischen Auswertungen von Fibronektin sowie Gesamtkollagen nach 3- bzw. 7-tägiger UUU; im jeweiligen Balken wird die Anzahl der Versuchstiere angegeben; * p<0,05; *** p<0,001; cGKI – cGMP-abhängige Proteinkinase I, cGMP – zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat, KO – knock out, RLX – Serelaxin, UUU – unilaterale Ureterligation, WT – Wildtyp

Im fibrotischen WT Gewebe stieg das Gesamtkollagen nach 3 Tagen UO ohne Behandlung um $17,64 \pm 2,88 \%$ und nach 3-tägiger UO mit Serelaxin-Behandlung nur noch um $5,24 \pm 1,55 \%$ an (verglichen mit gesundem Gewebe; $p=0,001$).

Für die Protein-Expression von Fibronectin wurde durch Serelaxin keine Verringerung des Bindegewebsbestandteils nach 3 Tagen im WT erzielt ($29,08 \pm 6,99 \%$ vs. $36,13 \pm 4,44 \%$). Nach 7 Tagen wurde durch die Verabreichung von Serelaxin die Protein-Expression von Fibronectin ($51,60 \pm 5,21 \%$ vs. $33,50 \pm 5,37 \%$; $p=0,024$) sowie Kollagen1A1 ($49,45 \pm 4,07 \%$ vs. $36,66 \pm 4,46 \%$; $p=0,042$) im WT deutlich reduziert. Auch das Gesamtkollagen wurde im WT durch die Gabe von Serelaxin signifikant verringert ($21,35 \pm 0,99 \%$ vs. $16,56 \pm 1,66 \%$; $p=0,013$; Abbildung 13 C). Im cGKI-KO-Modell konnte für keine dieser ECM-Bestandteile ein Therapie-Effekt beobachtet werden (Kollagen1A1: $45,30 \pm 11,18 \%$ vs. $47,92 \pm 6,91 \%$; Fibronectin: $55,76 \pm 5,54 \%$ vs. $66,11 \pm 8,20 \%$; Gesamtkollagen: $18,64 \pm 1,69 \%$ vs. $19,22 \pm 2,55 \%$; vgl. Abbildung 13).

Die Auswirkung von Serelaxin auf die Genexpression dieser Marker werden im Anhang (vgl. Kapitel 11.2) gelistet. Unterschiede zur Protein-Expression waren lediglich für Fibronectin sichtbar. Hier konnte im Gegensatz zur Proteinexpression die Genexpression bereits nach 3 Tagen signifikant reduziert werden ($p=0,033$; vgl. Anhang, Kapitel 11.2.2).

3.1.3.3 Einfluss von Serelaxin auf die Regulation von Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen spielen durch ihre Fähigkeit, extrazelluläre Matrix (z. B. Fibronectin, Kollagen Typ 1 und 4) abzubauen, in der Fibrose eine wichtige Rolle. MMPs werden als latente Form sezerniert und müssen durch weitere Enzyme in die aktive Form gespalten werden. MMPs wurden mittels Zymographie quantifiziert (MMP9 – latent: 92 kDa, aktiv: 82 kDa; MMP2 – latent: 72 kDa, aktiv: 62 kDa). Die latente und aktive MMP2 (jeweils $p=0,002$) sowie die latente MMP9 waren in fibrotischem Gewebe signifikant hochreguliert ($p=0,0004$), während aktives MMP9 reduziert wurde ($p=0,021$; vgl. Tabelle 21/ Abbildung 14 A).

Diese Tendenz war auch in der Genexpression von MMP2 zu erkennen, die Genexpression von MMP9 blieb nahezu unverändert (vgl. Anhang, Kapitel 11.2).

Tabelle 21 x-fache Proteinexpression von MMPs in fibrotischem Nierengewebe im Vergleich zu gesundem Nierengewebe nach 7-tägiger UO Q (fib/ges) stellt den Quotienten der mittels Zymographie ermittelten Proteinexpression aus unbehandelten Wildtypen dar: [fibrotisches Nierengewebe/gesundes Nierengewebe]

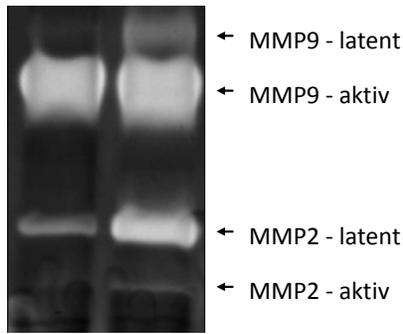
	Q(fib/ges)	n
MMP2 (latent)	5,89 ± 1,32	12
MMP2 (aktiv)	4,19 ± 0,84	12
MMP9 (latent)	2,96 ± 0,42	12
MMP9 (aktiv)	0,69 ± 0,10	12

Für die Beurteilung des Behandlungseffektes wurde bei der zymographischen Untersuchung ausschließlich fibrotisches Gewebe ausgewertet, wobei der Mittelwert aller unbehandelten fibrotischen WT Tiere gleich 1 gesetzt wurde. Nach 3-tägiger Serelaxin-Behandlung wurde die Proteinexpression weder der latenten noch der aktiven Form von MMP2 im WT verändert (latent: 1,00-fach ± 0,20 vs. 0,94-fach ± 0,12; aktiv: 1,00-fach ± 0,21 vs. 0,82-fach ± 0,15; vgl. Abbildung 14 C). Bei MMP9 wurde die aktive Form von MMP9 signifikant reduziert (1,00-fach ± 0,14 vs. 0,69-fach ± 0,020; $p=0,048$; vgl. Abbildung 14 D).

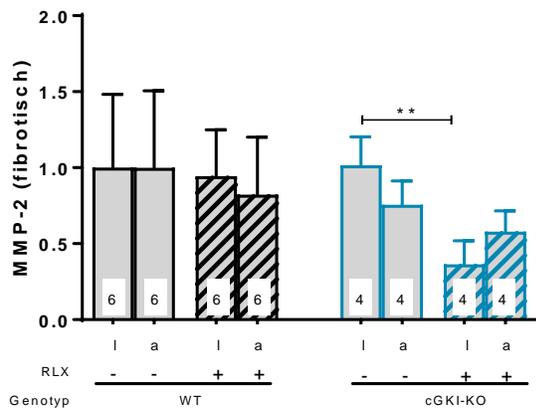
Die Abbildung 14 B, E, F zeigt nach 7-tägiger Versuchsdauer ein verändertes Bild. Durch die Behandlung mit Serelaxin wurden im WT sowohl latentes als auch aktives MMP2 signifikant vom Ausgangswert 1-fach auf 0,39-fach ± 0,12 bzw. 0,37-fach ± 0,10 verringert ($p=0,0004$; $p=0,0009$, respektiv). Die aktive Form von MMP9 wurde durch die Behandlung mit Serelaxin tendenziell erhöht (1,00-fach ± 0,15 vs. 1,24-fach ± 0,21), während die latente Form signifikant reduziert wurde (0,98-fach ± 0,19 vs. 0,37-fach ± 0,10; $p=0,013$). Ein ähnliches Bild zeigte sich in der Genexpression der MMPs, wobei hier nicht zwischen latenter und aktiver Form unterschieden werden konnte. MMP2 wurde durch Serelaxin-Behandlung im Vergleich zum unbehandelten WT sowohl nach 3- als auch nach 7-tägiger Behandlung gesenkt, MMP9 blieb unverändert (vgl. Anhang, Kapitel 11.2).

Im cGKI-KO war nach 7-tägiger Serelaxin-Behandlung die latente und aktive Form von MMP2 nicht statistisch signifikant verändert (latent: 0,67-fach ± 0,20 vs. 1,01-fach ± 0,036, aktiv: 0,65-fach ± 0,19 vs. 0,72-fach ± 0,11). Für latentes MMP9 ergab sich eine signifikante Erhöhung (0,56-fach ± 0,07 vs. 0,97-fach ± 0,14; $p=0,028$).

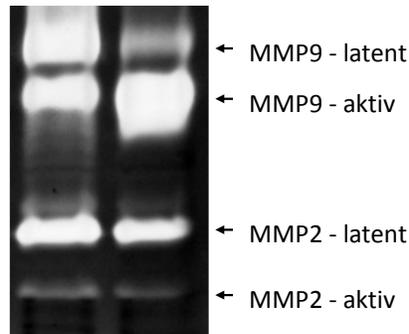
(A) unbehandelter WT



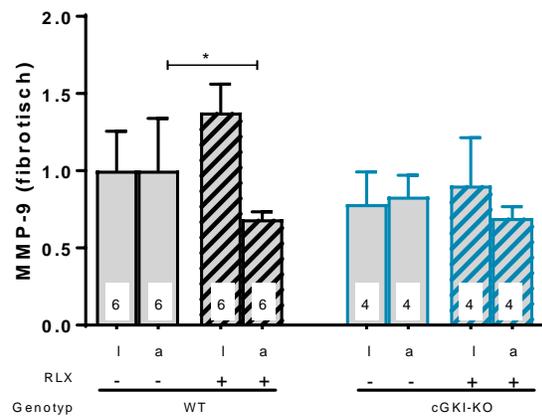
(C) MMP2 – 3 tägige UUO



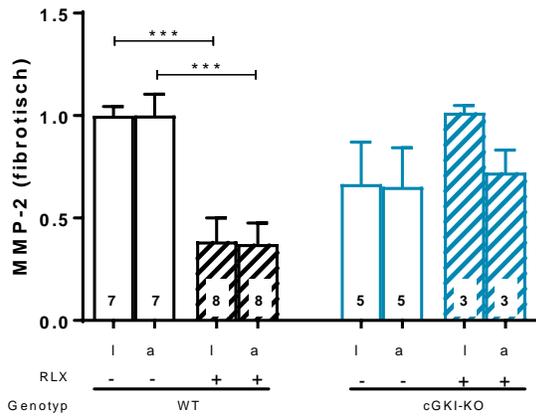
(B) fibrotischer WT



(D) MMP9 – 3-tägige UUO



(E) MMP2 – 7-tägige UUO



(F) MMP9 – 7-tägige UUO

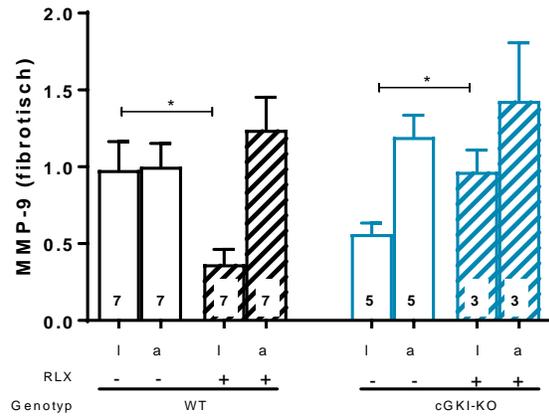


Abbildung 14 (A) Repräsentativer Zymographie-Blot (70 µg Gesamtprotein-Menge) mit fibrotischem und gesundem Nierengewebe eines WT Versuchstiers nach 7-tägiger UUO; (B) Repräsentativer Zymographie-Blot von unbehandeltem und mit Serelaxin behandeltem fibrotischem WT Nierengewebe nach 7-tägiger UUO; Einfluss von Serelaxin auf die Proteinexpression und Aktivität von MMP2 und MMP9 in fibrotischem Nierengewebe von WT und cGKI-KO Mäusen nach 3- [für (C, D)] bzw. 7-[für (E, F)] tägiger UUO Latente und aktive Form von MMP2 und MMP9 wurden mittels Zymographie (70 µg Gesamtprotein-Menge für MMP2, 35 µg Gesamtprotein-Menge für MMP9) bestimmt; die Expression in fibrotischem Gewebe wurde auf den Mittelwert aller unbehandelten fibrotischen WT bezogen, welcher als 1 definiert worden ist; in jeweiligen Balken wird die Anzahl der Versuchstiere angegeben; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; a – aktiv, cGKI – cGMP-abhängige Proteinkinase I, cGMP – zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat, KO – knock out, l – latent; MMP – Matrix-Metalloproteinase; RLX – Serelaxin, UUO – unilaterale Ureterligation, WT – Wildtyp

3.1.3.4 Antifibrotische Signaltransduktion von Serelaxin

Wie bereits erwähnt, ist Serelaxin in der Lage, die cGMP-Spiegel im Nierengewebe zu erhöhen. Aufgrund der fehlenden antifibrotischen Wirkung auf die Myofibroblasten-Differenzierung sowie auf die Kollagene und Fibronectin im cGKI-KO Mausmodell, wird eine Beteiligung der cGMP-abhängigen Proteinkinase cGKI an der antifibrotischen Wirkung von Serelaxin vermutet. In diesem Kapitel wird beschrieben, über welche Signalkaskade Serelaxin in der Lage ist, unter Beteiligung der NO-cGMP-cGKI Achse extrazelluläre Matrix zu reduzieren.

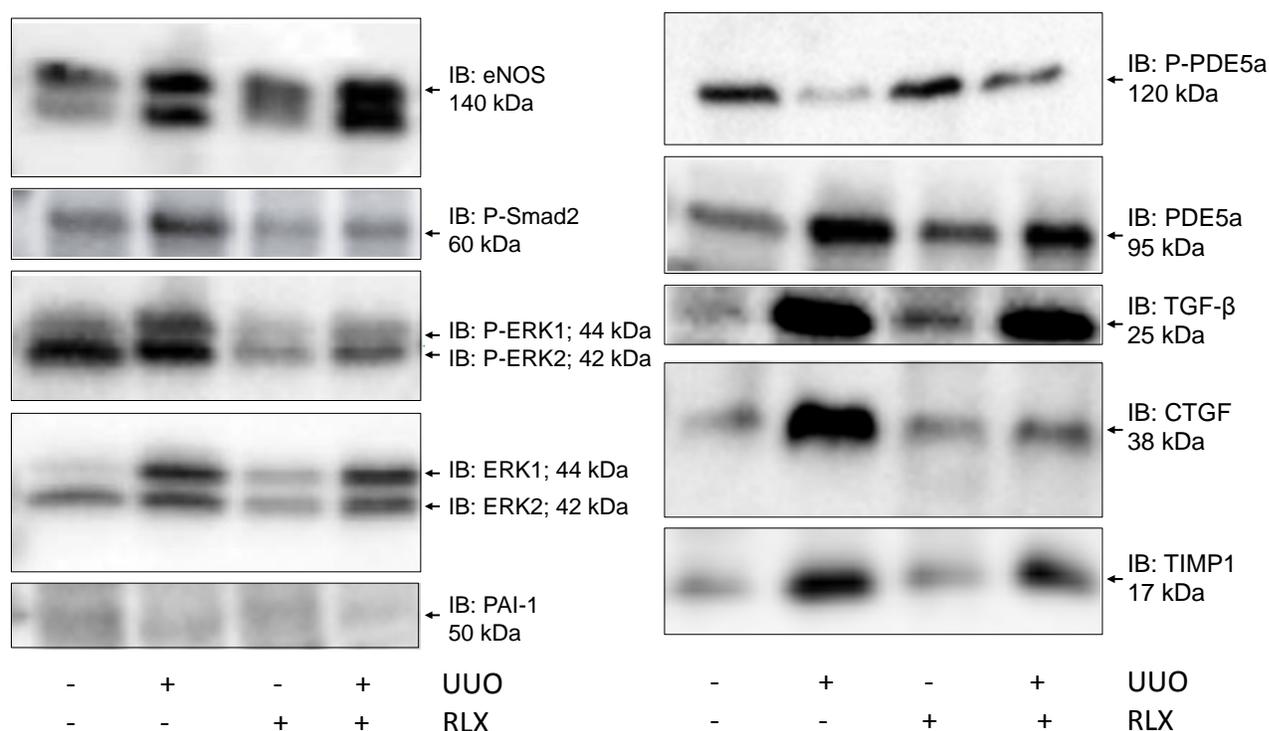


Abbildung 15 Repräsentative Immunoblots (jeweils 50 µg Gesamtprotein-Menge) zur Darstellung der Veränderung von Protein-Expressionsmustern in fibrotischem (nach UUO) im Vergleich zu gesundem (kontralateral) WT Gewebe ohne Behandlung nach 7-tägiger Versuchsanordnung CTGF – connective tissue growth factor, eNOS – endotheliale NO-Synthase, ERK – extracellular signal regulated kinase, MMP – Matrix-Metalloproteinase, P- – Phospho-; PAI-1 – plasminogen activator inhibitor-1; PDE5a – Phosphodiesterase 5a, RLX – Serelaxin, Smad – small mothers against decapentaplegic protein, TGF-β – transforming growth factor-β, TIMP-1 – tissue inhibitor of MMPs; UUO – unilaterale Ureterligation

Abbildung 15 zeigt für die einzelnen Enzyme repräsentative Immunoblots von gesundem und fibrotischem WT Gewebe im direkten Vergleich nach 7-tägiger Versuchsdauer. Die eNOS (endotheliale NO-Synthase) sowie die profibrotischen Zytokine TGF-β und CTGF wurden in der Fibrose (nach 7-tägiger UUO) im WT signifikant erhöht. Auch die Phosphorylierung der

TGF- β -Substrate Smad2 und ERK1/2 waren in fibrotischem Gewebe erhöht. Die Phosphodiesterase 5a, welche für den Abbau von cGMP zuständig ist, war ebenfalls in der Fibrose erhöht, wobei dessen Phosphorylierung, welche zur Aktivierung des Enzyms führt, in fibrotischem Gewebe verringert war. Die quantitativen Veränderungen in fibrotischem Gewebe im Vergleich zu gesundem Nierengewebe werden in Tabelle 22 erfasst. Ausschließlich für TGF- β wurde die Genexpression bestimmt, welche ebenfalls nach 7-tägiger UUO erhöht war (siehe Anhang, Kapitel 11.2).

Tabelle 22 x-fache Proteinexpression von Signalproteinen in fibrotischem Nierengewebe im Vergleich zu gesundem Nierengewebe nach 7-tägiger UUO Q (fib/ges) stellt den Quotienten der nach Immunoblot quantifizierten Proteinexpressionen (bezogen auf GAPDH) aus unbehandelten Wildtypen dar: [fibrotisches Nierengewebe/gesundes Nierengewebe]

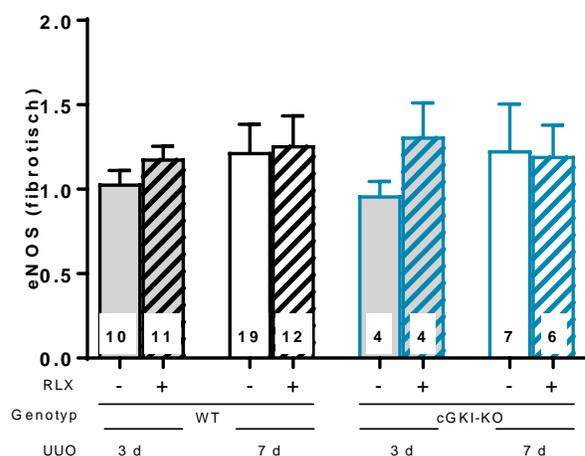
	Q(fib/ges)	n
eNOS	3,15 \pm 0,38	7
P-Smad2	1,93 \pm 0,24	12
P-ERK1	1,78 \pm 0,24	7
ERK1	8,91 \pm 2,47	8
P-ERK2	1,27 \pm 0,19	7
ERK2	3,71 \pm 0,78	10
PAI-1	0,92 \pm 0,03	7
PDE5a	6,01 \pm 1,33	10
P-PDE5a	0,68 \pm 0,12	7
TGF- β	5,31 \pm 1,08	12
CTGF	3,31 \pm 0,77	12
TIMP1	2,31 \pm 0,47	4

Der Einfluss von Serelaxin auf die Protein-Expression der untersuchten Signalmoleküle wurde mittels Western Blot ausschließlich in fibrotischem Gewebe untersucht. Dabei wurde der Mittelwert aller unbehandelten fibrotischen WT-Gewebe als 1 definiert und die restlichen Gewebeproben im Bezug darauf berechnet. Abbildung 16 bis Abbildung 19 stellen die Veränderungen der Proteinexpressionen im Vergleich zum unbehandelten fibrotischen WT Gewebe graphisch dar.

RXFP1-Signaltransduktion via eNOS oder ERK1/2-Phosphorylierung

Serelaxin vermittelt seine Wirkung über den G-Protein-gekoppelten Relaxin-Rezeptor RXFP1.² Als Mediatoren für die Signalübertragung auf den *second messenger* cGMP wurden

im Rahmen dieser Arbeit die endotheliale NO-Synthase sowie die ERK1/2-Phosphorylierung näher beleuchtet.



	WT unbehandelt	WT RLX	cGKI-KO unbehandelt	cGKI-KO RLX
3d – eNOS	1,03 ± 0,08	1,18 ± 0,07	0,96 ± 0,08	1,31 ± 0,20
7d – eNOS	1,22 ± 0,16	1,26 ± 0,17	1,23 ± 0,27	1,20 ± 0,18

Abbildung 16 Einfluss von Serelaxin auf die Protein-Expression von eNOS in unbehandelten oder mit Serelaxin behandelten fibrotischen WT und cGKI-KO Mäusen nach 3- bzw. 7-tägiger Versuchsanordnung Marker wurden mittels Western Blotting (50 µg Gesamtprotein-Menge, Normalisierung auf GAPDH) bestimmt; Mittelwert aller unbehandelten WT wurde als 1 definiert und die einzelnen Werte darauf bezogen; im jeweiligen Balken wird die Anzahl der Versuchstiere angegeben; die Tabelle zeigt die x-fache Veränderung der Marker in fibrotischem Nierengewebe nach 3- bzw. 7-tägiger UUU bezogen auf unbehandelten fibrotischen WT; cGKI – cGMP-abhängige Proteinkinase I, cGMP – zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat, eNOS – endotheliale NO-Synthase, GAPDH – Glycerinaldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase, KO – knock out, RLX – Serelaxin, UUU – unilaterale Ureterligation, WT – Wildtyp

Aus Abbildung 16 geht hervor, dass Serelaxin sowohl nach 3-tägiger als auch nach 7-tägiger Behandlung keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression von eNOS mit oder ohne Behandlung weder im WT noch im cGKI-KO zeigte. Die ERK1/2-Phosphorylierung wurde durch 3-tägige Serelaxin-Behandlung im WT noch nicht verändert, während nach 7 Tagen eine deutliche Reduktion der ERK1-Phosphorylierung beobachtet wurde (vgl. Abbildung 18). Dieser Rückgang wurde jedoch nicht im cGKI-KO-Modell beobachtet, was eine Beteiligung der ERK1-Phosphorylierung in der Signalkaskade erst nach Aktivierung der cGKI vermuten lässt.

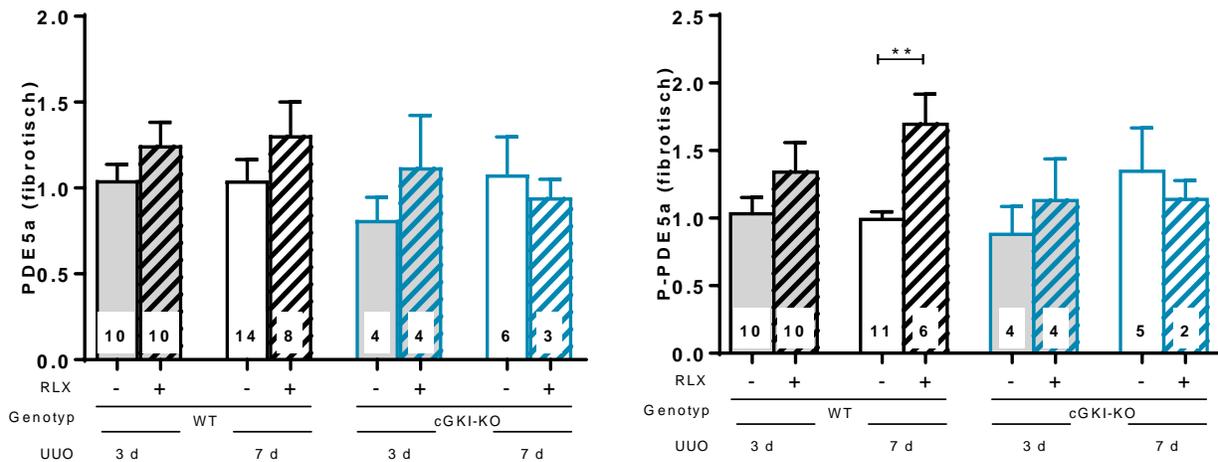
PDE5a und P-PDE5a

Neben der cGKI wurde die cGMP-spezifische PDE5a als weitere Zielstruktur von cGMP untersucht (vgl. Abbildung 17).

Die cGMP-degradierenden Enzyme PDE5a sowie dessen phosphorylierte Form waren mit Serelaxin nach 3-tägiger Versuchsdauer sowie nach 7-tägiger Versuchsdauer tendenziell, jedoch nicht signifikant, erhöht. Nach 7 Tagen nahm jedoch die Phosphorylierung an der cGMP-spezifischen Phosphorylierungsstelle Serin(92) signifikant durch die Serelaxin-Behandlung zu, was auf eine erhöhte Aktivität dieser PDE hindeutete ($p=0,001$). Dieser Behandlungseffekt war im cGKI-KO-Modell nicht zu beobachten.

(A) PDE5a

(B) P-PDE5a



	WT unbehandelt	WT RLX	cGKI-KO unbehandelt	cGKI-KO RLX
3d – PDE5a	1,05 ± 0,09	1,25 ± 0,13	0,81 ± 0,13	1,12 ± 0,30
3d – P-PDE5a	1,03 ± 0,12	1,34 ± 0,22	0,88 ± 0,21	1,13 ± 0,31
7d – PDE5a	1,04 ± 0,12	1,31 ± 0,19	1,08 ± 0,22	0,95 ± 0,10
7d – P-PDE5a	0,99 ± 0,06	1,70 ± 0,22 **	1,35 ± 0,32	1,14 ± 0,14

Abbildung 17 Einfluss von Serelaxin auf die Protein-Expression von PDE5a und P-PDE5a in unbehandelten oder mit Serelaxin behandelten fibrotischen WT und cGKI-KO Mäusen nach 3- bzw. 7-tägiger Versuchsanordnung Marker wurden mittels Western Blotting (50 µg Gesamtprotein-Menge, Normalisierung auf GAPDH) bestimmt; Mittelwert aller unbehandelten WT wurde als 1 definiert und die einzelnen Werte darauf bezogen; im jeweiligen Balken wird die Anzahl der Versuchstiere angegeben; die Tabelle zeigt die x-fache Veränderung der Marker in fibrotischem Nierengewebe nach 3- bzw. 7-tägiger UUO bezogen auf unbehandelten fibrotischen WT; ** $p < 0,01$; cGKI – cGMP-abhängige Proteinkinase I, cGMP – zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat, GAPDH – Glycerinaldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase, KO – knock out, P- – Phospho-; PDE5a – Phosphodiesterase 5a, RLX – Serelaxin, UUO – unilaterale Ureterligation, WT – Wildtyp

TGF- β & abhängige Signaltransduktion via Smad2- oder ERK1/2-Phosphorylierung

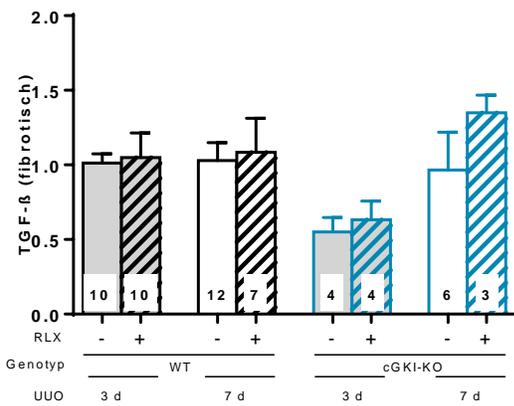
In dieser Arbeit wurden die aktiven Homodimere (bei 24 kDa) von TGF- β quantifiziert. Diese wurden weder durch 3-tägige noch durch 7-tägige Behandlung mit Serelaxin verändert. Lediglich die Genexpression von TGF- β wurde im WT nach 7-tägiger Behandlung signifikant reduziert ($p=0,009$; vgl. Anhang, Kapitel 11.2).

Jedoch zeigte Serelaxin eine inhibierende Wirkung auf die Weiterleitung des TGF- β -Signals über ERK1 und Smad2. Sowohl der Smad-abhängige als auch der Smad-unabhängige Pfad wurde durch eine reduzierte Phosphorylierung von Smad2 und ERK1 nach 7-tägiger Serelaxin-Behandlung abgeschwächt ($p=0,029$; $p=0,033$). Dieser Effekt von Serelaxin wurde für beide Proteine ausschließlich im WT und nicht im cGKI-KO beobachtet, was auf eine Beteiligung von Proteinen hindeutet, die der Proteinkinase cGKI nachgeschaltet sind. Die Proteinexpression von ERK2 war im WT nach Serelaxin-Gabe unverändert.

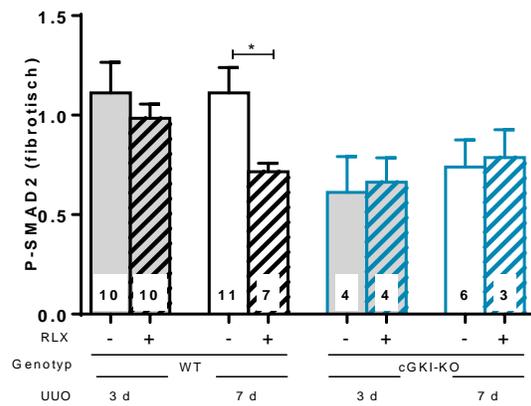
Nach 3-tägiger Behandlung mit Serelaxin war keine Veränderung der Smad2- bzw. ERK1/2-Phosphorylierung zu sehen, nur eine Tendenz zur verminderten Phosphorylierung von Smad2 im WT.

Sowohl die ERK1- als auch die ERK2-Phosphorylierung waren im cGKI-KO nach 7-tägiger Behandlung mit Serelaxin signifikant erhöht ($p=0,033$; $p=0,017$; vgl. Abbildung 18).

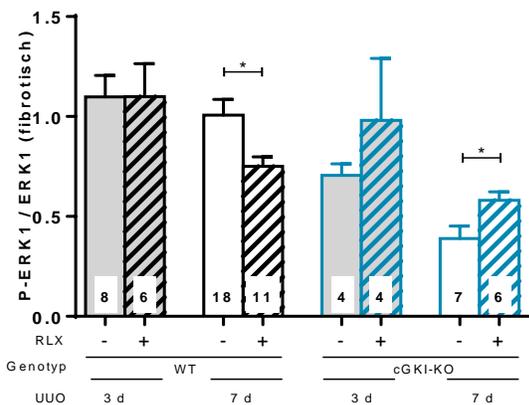
(A) TGF-β



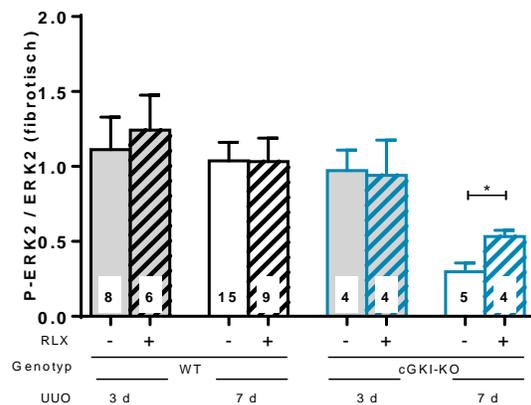
(B) P-Smad2



(C) P-ERK1 / ERK1



(D) P-ERK2 / ERK2



	WT unbehandelt	WT RLX	cGKI-KO unbehandelt	cGKI-KO RLX
3d – TGF-β	1,01 ± 0,06	1,05 ± 0,17	0,55 ± 0,10	0,63 ± 0,12
3d – P-Smad2	1,11 ± 0,15	0,98 ± 0,07	0,61 ± 0,18	0,66 ± 0,12
3d – P-ERK1/ERK1	1,10 ± 0,11	1,10 ± 0,17	0,71 ± 0,06	0,98 ± 0,31
3d – P-ERK2/ERK2	1,11 ± 0,22	1,24 ± 0,23	0,97 ± 0,14	0,94 ± 0,23
7d – TGF-β	1,03 ± 0,12	1,08 ± 0,23	0,97 ± 0,25	1,35 ± 0,12
7d – P-Smad2	1,11 ± 0,13	0,72 ± 0,04 *	0,74 ± 0,14	0,79 ± 0,14
7d – P-ERK1/ERK1	1,01 ± 0,08	0,75 ± 0,05 *	0,39 ± 0,06	0,58 ± 0,04 *
7d – P-ERK2/ERK2	1,04 ± 0,12	1,03 ± 0,16	0,30 ± 0,06	0,53 ± 0,04 *

Abbildung 18 Einfluss von Serelaxin auf die Protein-Expression von TGF-β, P-Smad2, P-ERK1/ERK1 und P-ERK2/ERK2 in unbehandelten oder mit Serelaxin behandelten fibrotischen WT und cGKI-KO Mäusen nach 3- bzw. 7-tägiger Versuchsanordnung Marker wurden mittels Western Blotting (50 µg Gesamtprotein-Menge, Normalisierung auf GAPDH) bestimmt; Mittelwert aller unbehandelten WT wurde als 1 definiert und die einzelnen Werte darauf bezogen; im jeweiligen Balken wird die Anzahl der Versuchstiere angegeben; die Tabelle zeigt die x-fache Veränderung der Marker in fibrotischem Nierengewebe nach 3- bzw. 7-tägiger UUU bezogen auf unbehandelten fibrotischen WT; * p<0,05; cGKI – cGMP-abhängige Proteinkinase I, cGMP – zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat, ERK – extracellular signal regulated kinase, GAPDH – Glyceraldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase, KO – knock out, P- Phospho-, RLX – Serelaxin, Smad – *small mothers against decapentaplegic protein*, TGF-β – transforming growth factor-β, UUU – unilaterale Ureterligation, WT – Wildtyp

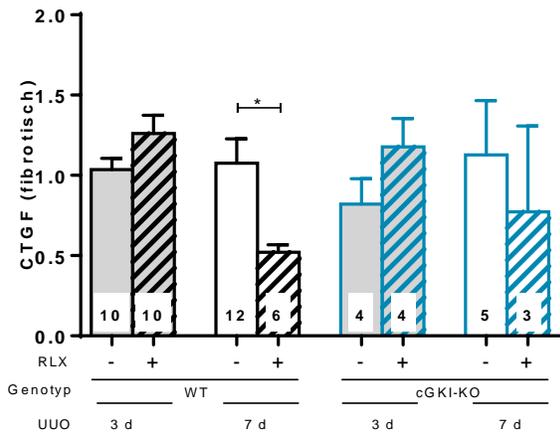
Signalmoleküle (PAI-1, TIMP1, CTGF)

Neben TGF- β wurden als profibrotische Zytokine PAI-1, TIMP1 und CTGF untersucht, deren Transkription durch TGF- β induziert wird (vgl. Kapitel 1.1.2).

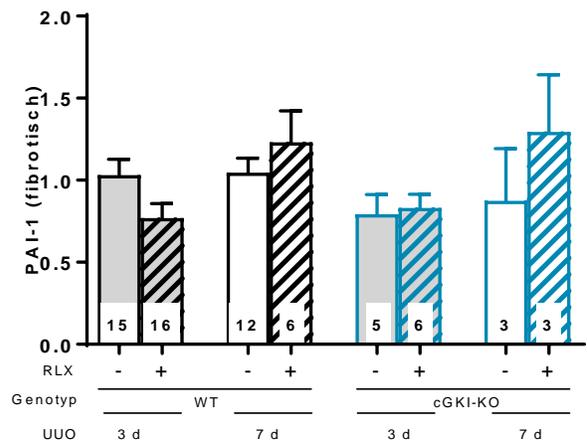
Die CTGF Konzentration im fibrotischen Nierengewebe wurde im WT, jedoch nicht im cGKI-KO, nach 7-tägiger Behandlungsphase reduziert ($p=0,023$). Nach 3 Tagen war nur eine tendenzielle Erhöhung dieses Zytokins zu beobachten.

Das profibrotische Zytokin PAI-1 wurde in der frühen Phase der fibrotischen Umbauprozesse (nach 3 Tagen) durch Serelaxin tendenziell reduziert, TIMP1 tendenziell erhöht. Dieser Effekt war aber nach 7-tägiger Behandlung wieder nivelliert (vgl. Abbildung 19).

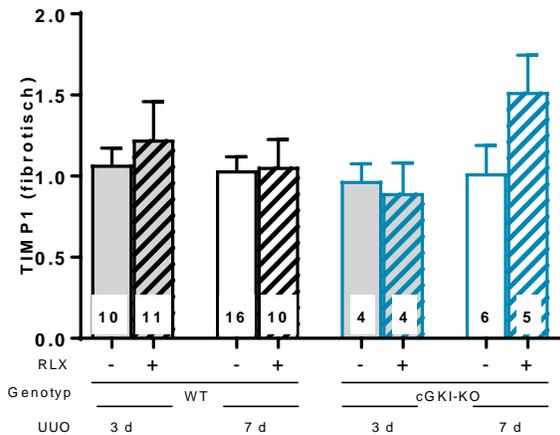
(A) CTGF



(B) PAI-1



(C) TIMP1



	WT unbehandelt	WT RLX	cGKI-KO unbehandelt	cGKI-KO RLX
3d – CTGF	1,04 ± 0,07	1,26 ± 0,11	0,82 ± 0,16	1,18 ± 0,18
3d – PAI-1	1,03 ± 0,10	0,77 ± 0,09	0,79 ± 0,12	0,83 ± 0,08
3d – TIMP1	1,07 ± 0,10	1,23 ± 0,23	0,97 ± 0,10	0,90 ± 0,19
7d – CTGF	1,08 ± 0,15	0,52 ± 0,05 *	1,13 ± 0,34	0,77 ± 0,54
7d – PAI-1	1,05 ± 0,09	1,23 ± 0,19	0,78 ± 0,32	1,30 ± 0,35
7d – TIMP1	1,04 ± 0,08	1,06 ± 0,17	1,02 ± 0,17	1,52 ± 0,23

Abbildung 19 Einfluss von Serelaxin auf die Protein-Expression von CTGF, PAI-1 und TIMP1 in unbehandelten oder mit Serelaxin behandelten fibrotischen WT und cGKI-KO Mäusen nach 3- bzw. 7-tägiger Versuchsanordnung Marker wurden mittels Western Blotting (50 µg Gesamtprotein-Menge, Normalisierung auf GAPDH) bestimmt; Mittelwert aller unbehandelten WT wurde als 1 definiert und die einzelnen Werte darauf bezogen; im jeweiligen Balken wird die Anzahl der Versuchstiere angegeben; die Tabelle zeigt die x-fache Veränderung der Marker in fibrotischem Nierengewebe nach 3- bzw. 7-tägiger UUU bezogen auf unbehandelten fibrotischen WT; * p<0,05; cGKI – cGMP-abhängige Proteinkinase I, cGMP – zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat, CTGF – connective tissue growth factor, GAPDH – Glycerinaldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase, KO – knock out, MMP – Matrix-Metalloproteinase; PAI-1 – plasminogen activator inhibitor 1, RLX – Serelaxin, TIMP – tissue inhibitor of MMPs; UUU – unilaterale Ureterligation, WT – Wildtyp

3.1.4 Einfluss von Zaprinast und der Kombination aus Zaprinast und Serelaxin auf die Progression der renalen Fibrose – 7 Tage

Basierend auf den Ergebnissen aus Kapitel 3.1.3 wurde die folgende Versuchsreihe mit 7-tägiger Behandlung durchgeführt. Zaprinast kann durch die Blockade der cGMP-abbauenden Phosphodiesterase 5 über einen anderen molekularen Wirkmechanismus als Serelaxin die cGMP-Konzentrationen erhöhen. Zum Vergleich werden die Ergebnisse der Serelaxin-Behandlung nochmals mitgeführt (in grau).

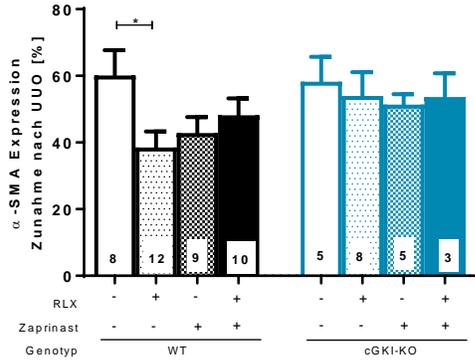
3.1.4.1 Myofibroblasten-Differenzierung und Akkumulation von extrazellulärer Matrix

In Abbildung 20 ist deutlich zu erkennen, dass die Proteinexpression von α -SMA durch die Behandlung mit Serelaxin, Zaprinast oder deren Kombination im Vergleich zur Kontrolle abgenommen hat, nur in der mit Serelaxin behandelten Gruppe war die Veränderung signifikant ($p=0,020$). Im cGKI-KO konnte die Zunahme des α -SMA von 58,22 % durch keine der Behandlungen auf unter 50 % gesenkt werden (vgl. Abbildung 20).

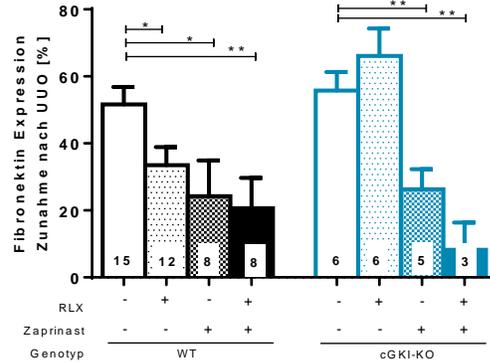
Die extrazelluläre Matrix wurde durch die Expression von Fibronectin, Kollagen1A1 und Gesamtkollagen beurteilt (vgl. Abbildung 20). Es wurde deutlich, dass im WT die Protein-Expression von Fibronectin (RLX: $p=0,024$; Zaprinast: $p=0,016$; Kombination: $p=0,004$), Kollagen1A1 (RLX: $p=0,042$; Zaprinast: $p=0,033$; Kombination: $p=0,011$) und Gesamtkollagen (RLX: $p=0,014$; Zaprinast, Kombination: je $p<0,001$) in jedem der drei Behandlungsarme signifikant reduziert wurde. Keiner dieser Marker wurde durch die Serelaxin-Behandlung im cGKI-KO Modell reduziert. Dahingegen konnte im cGKI-KO die Protein-Expression sowohl von Fibronectin (Zaprinast: $p=0,005$; Kombination: $p=0,002$) als auch Gesamtkollagen (Zaprinast: $p<0,001$; Kombination: $p=0,030$) durch Zaprinast und die Kombination mit Serelaxin gesenkt werden. Auch Kollagen1A1 wurde durch Zaprinast ($p=0,15$) bzw. die Kombination ($p=0,26$) tendenziell reduziert.

Mit Ausnahme von Kollagen1A1 brachten die Gen- und Protein-Expression übereinstimmende Ergebnisse. Die mRNA von Kollagen1A1 wurde nicht durch die Behandlung mit Zaprinast oder der Kombinationstherapie im WT gesenkt (vgl. Kapitel 11.2.1).

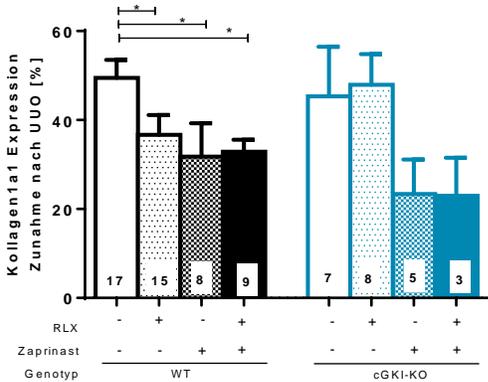
(A) α-SMA



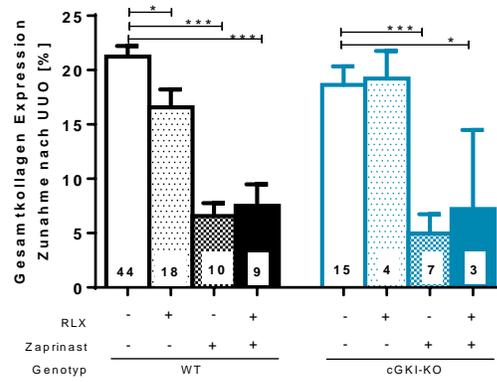
(B) Fibronektin



(C) Kollagen1A1



(D) Gesamtkollagen



WT [%]	unbehandelt	Serelaxin	Zaprinast	Kombination
α-SMA	60,11 ± 7,56	38,49 ± 4,791 *	42,87 ± 4,75	48,16 ± 5,08
Fibronektin	51,60 ± 5,21	33,50 ± 5,366 *	24,21 ± 10,67 *	20,66 ± 9,01 **
Kollagen1A1	49,45 ± 4,07	36,66 ± 4,461 *	31,75 ± 7,52 *	32,89 ± 2,69 *
Gesamtkollagen	21,25 ± 0,96	16,56 ± 1,658 *	6,57 ± 1,20 ***	7,51 ± 1,99 ***
cGKI-KO [%]				
α-SMA	58,22 ± 7,46	53,99 ± 7,08	51,34 ± 3,15	53,65 ± 7,13
Fibronektin	55,76 ± 5,54	66,11 ± 8,20	26,30 ± 6,00 **	8,21 ± 8,13 **
Kollagen1A1	45,30 ± 11,18	47,92 ± 6,91	23,37 ± 7,76	22,96 ± 8,55
Gesamtkollagen	18,64 ± 1,69	19,22 ± 2,55	4,96 ± 1,77 ***	7,21 ± 7,27 *

Abbildung 20 Effekt von Serelaxin, Zaprinast und Kombination aus beiden Behandlungen auf die Protein-Expression von α-SMA, Fibronektin, Kollagen1A1 und Gesamtkollagen nach 7-tägiger UUO α-SMA, Fibronektin und Kollagen1A1 wurden mittels Immunhistochemie, Gesamtkollagen mittels Sirius Red/ Fast Green Färbung bestimmt; im jeweiligen Balken wird die Anzahl der Versuchstiere angegeben; die Tabelle zeigt die prozentuale Zunahme der Protein-Expression nach UUO in WT und cGKI-KO in Abhängigkeit von der Behandlung (Serelaxin, Zaprinast, Kombination); * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; α-SMA – α-smooth muscle actin, cGKI – cGMP-abhängige Proteinkinase I, cGMP – zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat, KO – knock out, RLX – Serelaxin, UUO – unilaterale Ureterligation, WT – Wildtyp

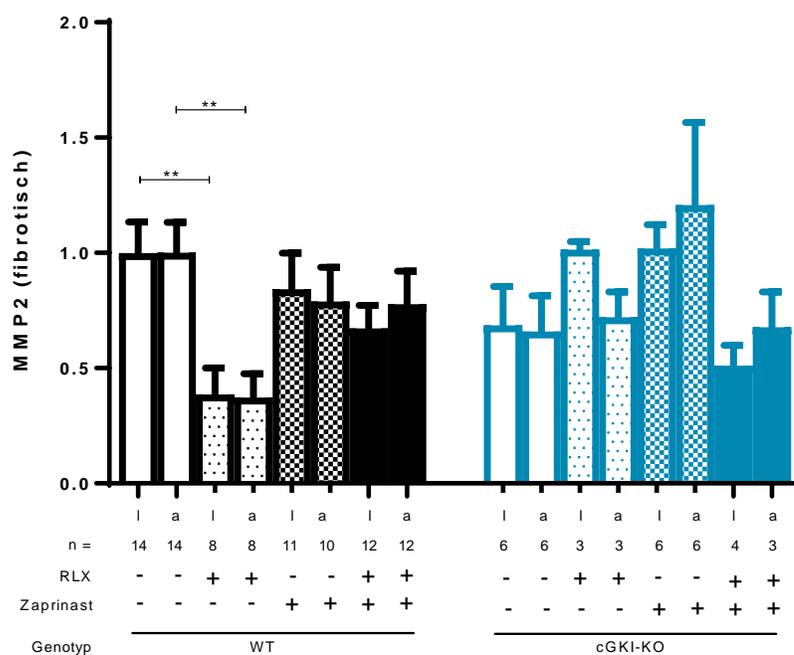
3.1.4.2 Regulation von Matrix-Metalloproteinasen

Die Expression und Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen variierte in den einzelnen Behandlungsarmen. In Kapitel 3.1.3.3 wird dies für die mit Serelaxin behandelte Versuchsgruppe ausführlich erläutert. Abbildung 21 zeigt die Veränderung der Matrix-Metalloproteinasen in fibrotischem Gewebe unter Berücksichtigung der einzelnen Behandlungsgruppen.

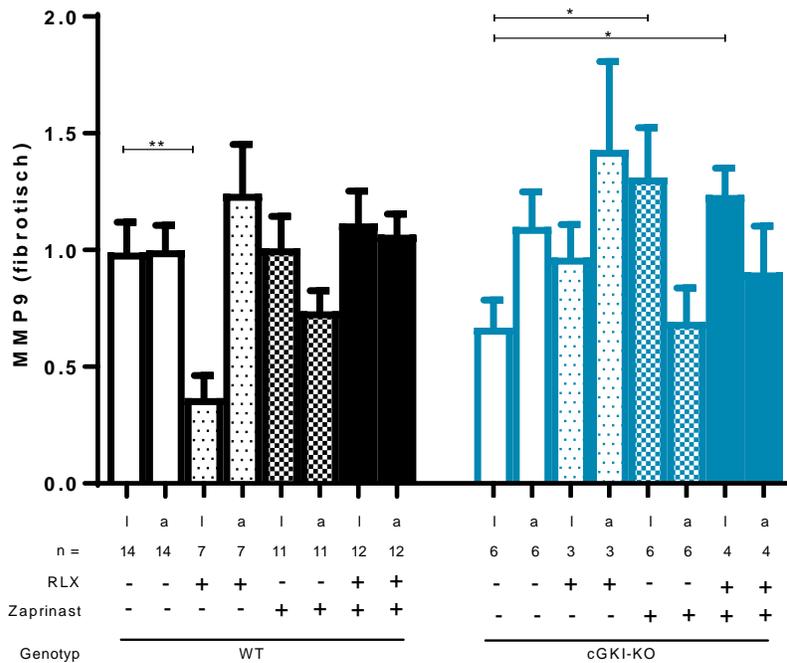
Abbildung 21 A zeigt graphisch die signifikante Reduktion der latenten sowie aktiven MMP2-Konzentrationen im fibrotischen Nierengewebe durch Serelaxin-Behandlung, welche durch Zaprinast bzw. durch Kombinationstherapie nicht erreicht werden konnte. In diesen beiden Behandlungsarmen war lediglich eine tendenzielle Reduktion des Enzyms erkennbar (vgl. Abbildung 21). Damit übereinstimmend waren die Ergebnisse der Genexpression von MMP2 (vgl. Anhang, Kapitel 11.2.1).

Ebenfalls wurde die signifikante Reduktion der latenten MMP9 unter Serelaxin-Behandlung ($p=0,013$) nicht in mit Zaprinast und Kombination behandelten Mäusen beobachtet (vgl. Abbildung 21 B).

(A) MMP2



(B) MMP9



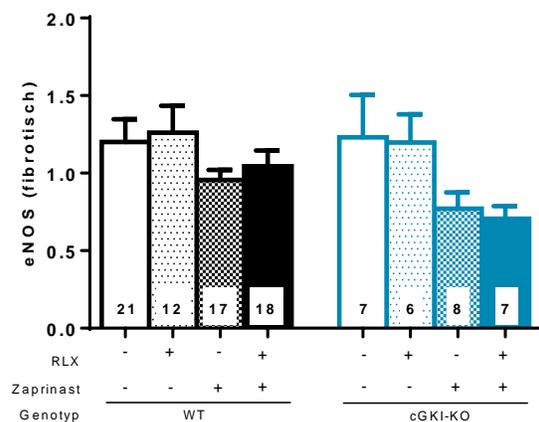
WT	unbehandelt	RLX	Zaprinast	Kombination
MMP2 latent	1,00 ± 0,13	0,39 ± 0,11 **	0,84 ± 0,16	0,67 ± 0,10
MMP2 aktiv	1,00 ± 0,13	0,37 ± 0,10 **	0,79 ± 0,15	0,78 ± 0,14
MMP9 latent	0,99 ± 0,13	0,37 ± 0,10 **	1,01 ± 0,14	1,12 ± 0,14
MMP9 aktiv	1,00 ± 0,11	1,24 ± 0,21	0,74 ± 0,09	1,07 ± 0,09
cGKI-KO				
MMP2 latent	0,69 ± 0,17	1,01 ± 0,04	1,02 ± 0,10	0,51 ± 0,09
MMP2 aktiv	0,66 ± 0,16	0,72 ± 0,11	1,21 ± 0,36	0,68 ± 0,15
MMP9 latent	0,67 ± 0,12	0,97 ± 0,14	1,31 ± 0,21 *	1,24 ± 0,11 *
MMP9 aktiv	1,10 ± 0,15	1,43 ± 0,38	0,69 ± 0,15	0,90 ± 0,20

Abbildung 21 Protein-Aktivität von (A) MMP2 und (B) MMP9 in fibrotischem Nierengewebe von WT und cGKI-KO Versuchstieren in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe (Serelaxin, Zaprinast, Kombination) Latente und aktive Formen von MMP2 und MMP9 wurden mittels Zymographie (70 µg Gesamtprotein-Menge für MMP2; 35 µg Gesamtprotein-Menge für MMP9) bestimmt; Expression in fibrotischem Gewebe wurde auf den Mittelwert aller unbehandelten fibrotischen WT bezogen, welcher als 1 definiert worden ist; die Tabelle zeigt die x-fache Protein-Expression und Aktivität von MMP2 und MMP9 in fibrotischem Nierengewebe von WT und cGKI-KO Versuchstieren in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe (Serelaxin, Zaprinast, Kombination); * p<0,05; ** p<0,01; a – aktiv, cGKI – cGMP-abhängige Proteinkinase I, cGMP – zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat, KO – knock out, l – latent; MMP – Matrix-Metalloproteinase; RLX – Serelaxin, UUO – unilaterale Ureterligation, WT – Wildtyp

3.1.4.3 Antifibrotische Signaltransduktion

RXFP1-Signaltransduktion via eNOS

Serelaxin zeigte keinen Einfluss auf die Expression der eNOS. Die Expression der eNOS ging im Zaprinast- und Kombinationsarm sowohl im WT als auch im cGKI-KO statistisch nicht signifikant zurück (vgl. Abbildung 22).



WT	unbehandelt	RLX	Zaprinast	Kombination
eNOS	1,20 ± 0,15	1,26 ± 0,17	0,96 ± 0,06	1,04 ± 0,11
cGKI-KO				
eNOS	1,23 ± 0,27	1,20 ± 0,18	0,77 ± 0,10	0,71 ± 0,08

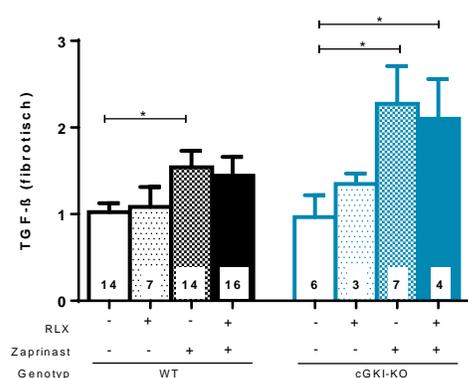
Abbildung 22 Einfluss von Serelaxin, Zaprinast und Kombination aus beiden Behandlungen auf die Protein-Expression von eNOS in unbehandelten oder behandelten fibrotischen WT und cGKI-KO Mäusen nach 7-tägiger Versuchsanordnung Marker wurden mittels Western Blotting (50 µg Gesamtprotein-Menge, Normalisierung auf GAPDH) bestimmt; Mittelwert aller unbehandelten WT wurde als 1 definiert und die einzelnen Werte darauf bezogen; im jeweiligen Balken wird die Anzahl der Versuchstiere angegeben; die Tabelle zeigt die x-fache Veränderung der Marker in fibrotischem Nierengewebe nach 7-tägiger UUO bezogen auf unbehandelten fibrotischen WT; cGKI – cGMP-abhängige Proteinkinase I, cGMP – zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat, eNOS – endotheliale NO-Synthase, GAPDH – Glycerinaldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase, KO – knock out, RLX – Serelaxin, UUO – unilaterale Ureterligation, WT – Wildtyp

TGF-β und abhängige Signaltransduktion via Smad2- oder ERK1/2-Phosphorylierung

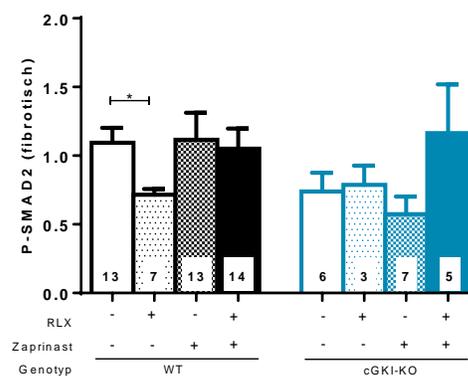
Die TGF-β-Expression konnte in keinem Behandlungsarm (Serelaxin, Zaprinast, Kombination) reduziert werden. Bei mit Zaprinast behandelten Tieren stieg die Konzentration des Zytokins im fibrotischen Nierengewebe des WT (p=0,024) und des cGKI-KO (p=0,031) signifikant an. Die TGF-β Genexpression zeigte jedoch in mit Serelaxin sowie in mit Zaprinast behandelten WT Tieren eine Reduktion (p=0,009; p=0,004), die Kombination aus beiden

Behandlungen reduzierte ebenfalls die TGF- β Genexpression (nicht signifikant, vgl. Anhang, Kapitel 11.2.1).

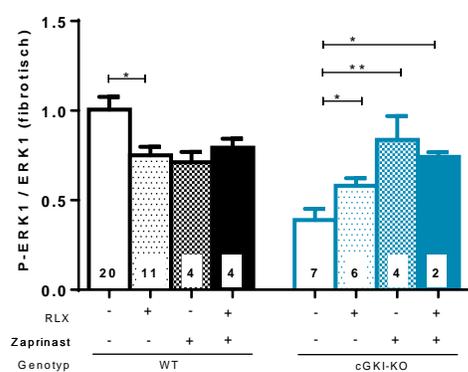
Serelaxin hemmte die Weiterleitung des TGF- β -Signals durch die reduzierte Phosphorylierung von ERK1 und Smad2 in Abhängigkeit von cGKI im WT ($p=0,029$; $p=0,033$). Serelaxin zeigte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der ERK2 im WT. Nach Behandlung mit Zaprinast bzw. der Kombination aus beiden Pharmaka war eine Tendenz zu reduzierter ERK1- und ERK2-Phosphorylierung im WT zu beobachten. Keine Veränderung war dagegen bei der Smad2-Phosphorylierung zu sehen (vgl. Abbildung 23).

(A) TGF- β 

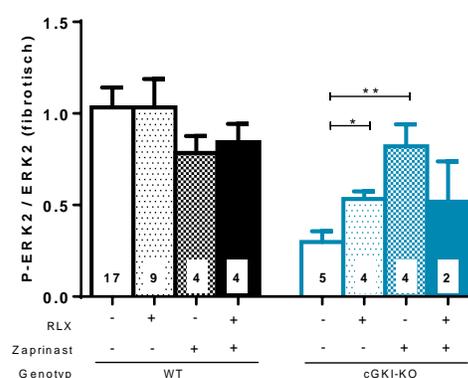
(B) P-Smad2



(C) P-ERK1/ERK



(D) P-ERK2/ERK2

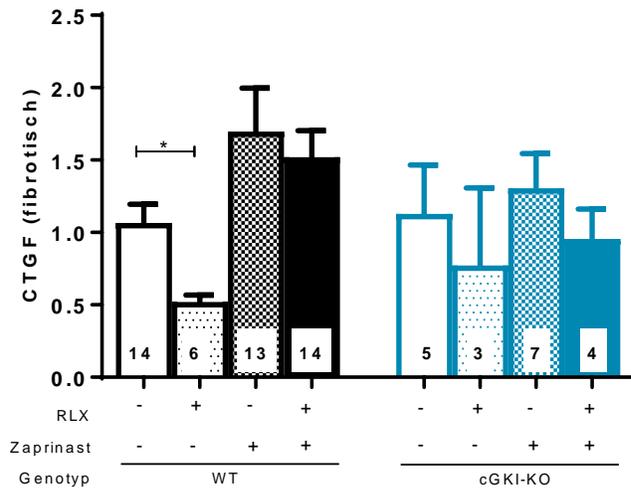


WT	unbehandelt	RLX	Zaprinast	Kombination
TGF- β	1,02 \pm 0,10	1,08 \pm 0,23	1,54 \pm 0,19 *	1,44 \pm 0,22
P-Smad2	1,09 \pm 0,11	0,72 \pm 0,04 *	1,11 \pm 0,20	1,05 \pm 0,15
P-ERK1/ERK1	1,01 \pm 0,07	0,75 \pm 0,05 *	0,71 \pm 0,06	0,79 \pm 0,05
P-ERK2/ERK2	1,03 \pm 0,11	1,03 \pm 0,16	0,78 \pm 0,09	0,84 \pm 0,10
cGKI-KO				
TGF- β	0,97 \pm 0,25	1,35 \pm 0,12	2,27 \pm 0,44 *	2,10 \pm 0,46 *
P-Smad2	0,74 \pm 0,14	0,79 \pm 0,14	0,57 \pm 0,13	1,16 \pm 0,36
P-ERK1/ERK1	0,39 \pm 0,06	0,58 \pm 0,04 *	0,84 \pm 0,13 **	0,74 \pm 0,03 *
P-ERK2/ERK2	0,30 \pm 0,06	0,53 \pm 0,04 *	0,82 \pm 0,12 **	0,52 \pm 0,22

Abbildung 23 Einfluss von Serelaxin, Zaprinast und Kombination aus beiden Behandlungen auf die Protein-Expression von TGF- β , P-Smad2, P-ERK1/ERK1 und P-ERK2/ERK2 in unbehandelten oder behandelten fibrotischen WT und cGKI-KO Mäusen nach 7-tägiger Versuchsanordnung Marker wurden mittels Western Blotting (50 μ g Gesamtprotein-Menge, Normalisierung auf GAPDH) bestimmt; Mittelwert aller unbehandelten WT wurde als 1 definiert und die einzelnen Werte darauf bezogen; im jeweiligen Balken wird die Anzahl der Versuchstiere angegeben; die Tabelle zeigt die x-fache Veränderung der Marker in fibrotischem Nierengewebe nach 7-tägiger UUU bezogen auf unbehandelten fibrotischen WT; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; cGKI – cGMP-abhängige Proteinkinase I, cGMP – zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat, ERK – extracellular signal regulated kinase, GAPDH – Glycerinaldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase, KO – knock out, P- – Phospho-, RLX – Serelaxin, Smad – *small mothers against decapentaplegic protein*, TGF- β – transforming growth factor- β , UUU – unilaterale Ureterligation, WT – Wildtyp

Signalmolekül (CTGF)

CTGF, neben TGF- β ein profibrotisches Zytokin, wurde durch die Serelaxin-Behandlung signifikant reduziert ($p=0,023$). CTGF wurde im Unterschied zu Serelaxin-behandelten Versuchstieren bei Zaprinast und Kombination im WT tendenziell erhöht (vgl. Abbildung 24).



WT	unbehandelt	RLX	Zaprinast	Kombination
CTGF	1,07 ± 0,13	0,52 ± 0,05 *	1,70 ± 0,30	1,52 ± 0,19
cGKI-KO				
CTGF	1,13 ± 0,34	0,77 ± 0,54	1,31 ± 0,24	0,95 ± 0,21

Abbildung 24 Einfluss von Serelaxin, Zaprinast und Kombination aus beiden Behandlungen auf die Protein-Expression von CTGF in unbehandelten oder behandelten fibrotischen WT und cGKI-KO Mäusen nach 7-tägiger Versuchsanordnung Marker wurden mittels Western Blotting (50 μ g Gesamtprotein-Menge, Normalisierung auf GAPDH) bestimmt; Mittelwert aller unbehandelten WT wurde als 1 definiert und die einzelnen Werte darauf bezogen; im jeweiligen Balken wird die Anzahl der Versuchstiere angegeben; die Tabelle zeigt die x-fache Veränderung der Marker in fibrotischem Nierengewebe nach 7-tägiger UUO bezogen auf unbehandelten fibrotischen WT; * $p < 0,05$; cGKI – cGMP-abhängige Proteinkinase I, cGMP – zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat, CTGF – *connective tissue growth factor*, GAPDH – Glyceraldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase, KO – knock out, RLX – Serelaxin, UUO – unilaterale Ureterligation, WT – Wildtyp

3.1.5 Einfluss von Serelaxin auf die Nierenfunktion während der Progression der renalen Fibrose

3.1.5.1 Entwicklung der Analysen-Methode

Die Konzentrationen von Kreatinin im Serum der Mäuse wurden mit Hilfe der HPLC-Methode und photometrischer Detektion bestimmt. Die Trennung an dem stark sauren Ionenaustauscher Zorbax SCX (5 µm) erwies sich dabei im Hinblick auf Selektivität gegenüber Trennsystemen mit C18-Materialien (z. B. Gemini NX-C18 3µ, Fa. Phenomenex, Aschaffenburg) oder auch Hilic-Materialien (Nucleodur Hilic 3µm, Fa. Macherey-Nagel, Düren), an denen Kreatinin in Humanserum gesunder Probanden bestimmt werden konnte, überlegen. In Plasma von Intensivpatienten wurden aber in einigen Fällen Interferenzen beobachtet (F. Kees, persönliche Mitteilung).

Zunächst wurde eine für Mausserum publizierte Methode nachgearbeitet.^{206, 207} Dabei wird das Eiweiß mit Acetonitril (MeCN) aus dem Serum entfernt, der Überstand im Vakuum eingedampft, in mobiler Phase aufgenommen und ein Aliquot in die HPLC-Apparatur injiziert. Allerdings wurde in den Chromatogrammen ein breiter Zusatzpeak beobachtet (Abbildung 25 A), der nach Kreatinin eluierte, im Laufe der Analysen aber mit dem Nachweis von Kreatinin interferierte (Abbildung 25 B). Durch Erniedrigung der Ionenstärke im Eluenten konnte zwar wieder eine Trennung erreicht werden, jedoch eluierte Kreatinin nun an der Flanke eines weiteren, breiten Peaks (Abbildung 25 C).

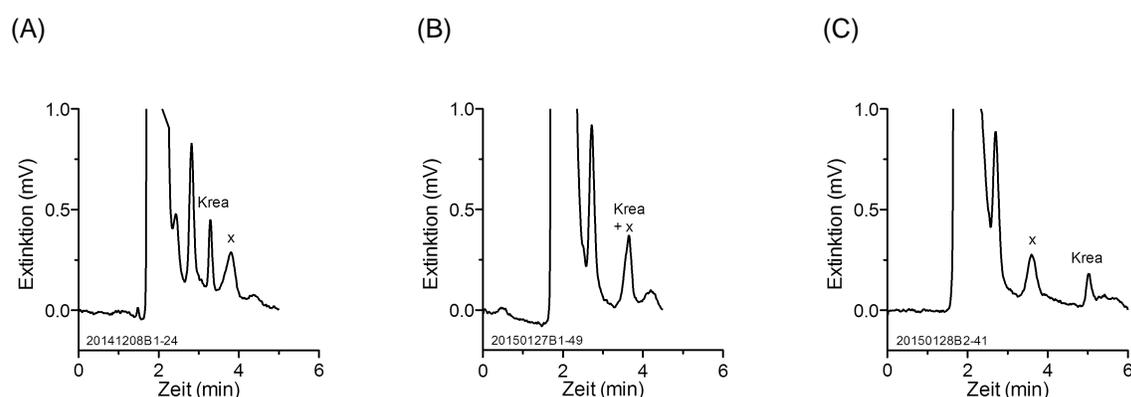


Abbildung 25 Chromatogramme von Kreatinin in Plasma von Mäusen In (A) eluiert Kreatinin (Krea) als scharfer Peak getrennt von einem später eluierendem breiten Peak (x). In (B) ist die Retentionszeit von Kreatinin etwas verlängert, 3,7 vs. 3,3 Minuten, und überlagert vom breiten Peak x. Nach Reduktion der Ionenstärke des Phosphatpuffers auf 0,004 M eluiert Kreatinin nun in (C) an der Vorderflanke eines weiteren breiten Peaks. Trennsystem: Säule Zorbax SCX 5 µm, 150x4,6 mm; Eluent (A) 0,1 M NaH₂PO₄/MeOH/MeCN = 100:8:12 (v/v/v); Fluss 1,0 ml/min; Säulentemperatur 35°C; MeCN – Acetonitril; MeOH – Methanol

Bei den weiteren Analysen wurde die Probenvorbereitung auf einen einfachen Enteiweißungsschritt mit Trichloressigsäure oder Perchlorsäure reduziert; der zeitaufwendige Eindampfschritt entfiel bei gleicher Präzision und Empfindlichkeit der Methode. In einem Eluenten aus 5 mM Natriumacetat (pH 5,1 mit Essigsäure)/ Acetonitril eluierte Kreatinin weit abgetrennt von der Front völlig störungsfrei nach ca. 6,5 Minuten (Abbildung 26).

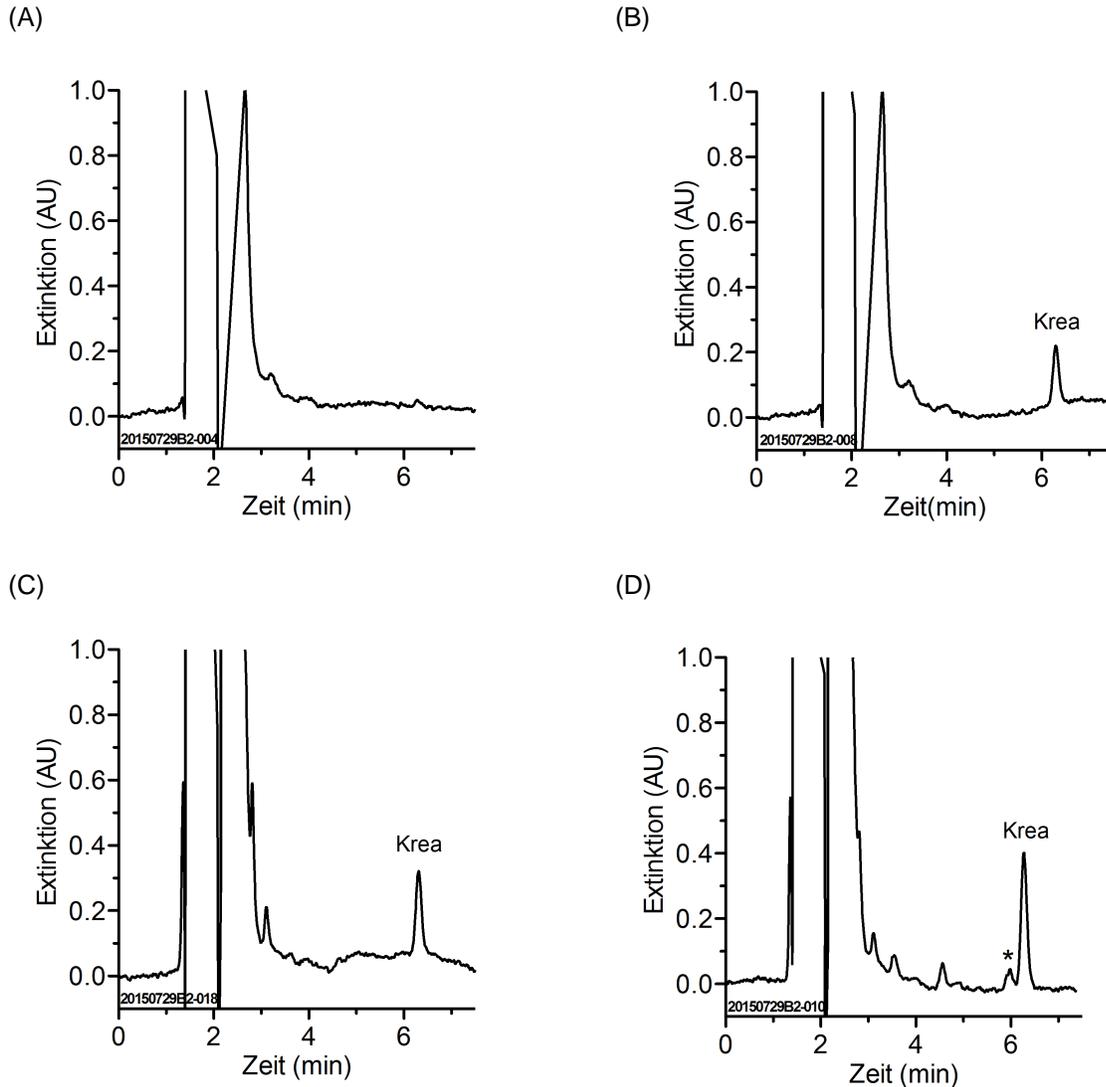


Abbildung 26 Chromatogramme von Kreatinin in 5 % BSA und Plasma von Mäusen (A) Blank-BSA, (B) BSA dotiert mit 0,5 mg/l Kreatinin und Plasma von Mäusen mit (C) 0,77 mg/l bzw. (D) 1,27 mg/l Kreatinin. Trennsystem: Säule Zorbax SCX 5 µm, 150x4,6 mm; Eluent 5 mM NaOAc, pH 5.1 mit HOAc/MeCN = 800:200 (v/v); Fluss 1,0 ml/min; Säulentemperatur 35°C; BSA – bovines Serumalbumin, HOAc – Essigsäure, MeCN – Acetonitril, NaOAc – Natriumacetat

Wie Abbildung 26 C zeigt, könnte die Analysenzeit durch Erhöhung der Elutionskraft des Eluenten (Erhöhung des Acetonitril-Anteils oder der Ionenstärke des Eluenten) noch verkürzt

werden, jedoch zeigte sich in einigen wenigen Maus-Seren ein Zusatzpeak (*; Abbildung 26 D), der dann möglicherweise nicht mehr von Kreatinin abgetrennt wäre. Die Zusatzpeaks stammen möglicherweise aus hämolytischen Seren, was aber nicht nachgewiesen werden konnte.

3.1.5.2 Einfluss von Serelaxin auf das Serumkreatinin

Es wurden zu definierten Zeitpunkten nach unilateraler Ureterligation entnommene murine Serum-Proben analysiert. Die Kreatinin-Serumkonzentrationen gesunder WT Mäuse (ohne UUO), welche als Kontrolle dienten, lagen bei 0,837 mg/l (\pm 0,049), die nach 3- bzw. 7-tägiger UUO auf ungefähr 1,0 mg/l anstiegen (3 Tage: 0,973 mg/l \pm 0,064; 7 Tage: 1,004 mg/l \pm 0,049).

Durch die Behandlung mit Serelaxin wurde in WT Mäusen nach 3 Tagen eine signifikante Erhöhung des Serumkreatinins auf 1,191 mg/l (\pm 0,025) detektiert (* $p=0,013$). 7 Tage nach der Induktion einer UUO im WT wurde mit einer Konzentration von 0,803 mg/l (\pm 0,069) gegenüber unbehandelten Wildtypen eine signifikante Senkung des Serumkreatinins beobachtet ($p=0,046$). Im cGKI-KO konnte durch Serelaxin weder nach 3 noch nach 7 Tagen eine signifikante Änderungen der Serumkonzentrationen erreicht werden (3 Tage: 0,990 mg/l \pm 0,081 vs. 0,900 mg/l \pm 0,073; 7 Tage: 0,847 mg/l \pm 0,043 vs. 0,778 mg/l \pm 0,051; vgl. Abbildung 27).

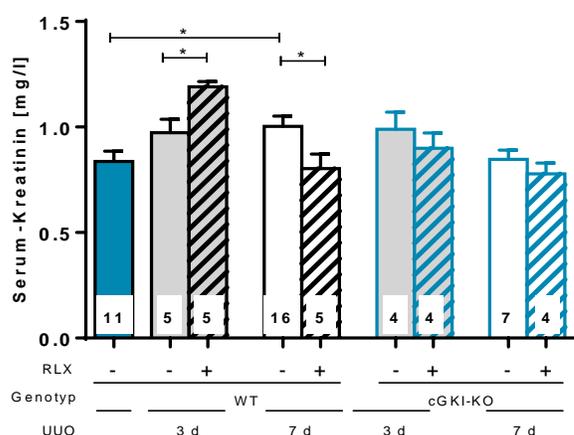


Abbildung 27 Kreatinin-Serumkonzentration von WT und cGKI-KO Mäusen unbehandelt bzw. nach 3- oder 7-tägiger Behandlung mit Serelaxin Kreatinin-Serumkonzentrationen wurden mithilfe einer HPLC-Methode ermittelt; * $p < 0,05$; cGKI – cGMP-abhängige Proteinkinase I; cGMP – zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat, d – Tage, KO – knock out; RLX – Serelaxin, UUO – unilaterale Ureterligation, WT – Wildtyp

Abbildung 28 zeigt, dass im fibrotischen WT (unbehandelt: 1,004 mg/l \pm 0,049) nur durch Serelaxin, wie eben erwähnt, das Serumkreatinin signifikant gesenkt werden konnte. Weder Zaprinast (1,022 mg/l \pm 0,055) noch die Kombination aus beiden Pharmaka (0,958 mg/l \pm 0,044) konnte die Nierenfunktion, indiziert durch verringerte Serumkreatinin-Konzentrationen, verbessern. Im cGKI-KO zeigte sich in allen Behandlungsgruppen (Serelaxin, Zaprinast, Kombination) kein Effekt. Im cGKI-KO konnte auch hier kein Effekt durch Behandlung nachgewiesen werden (unbehandelt: 0,847 mg/l \pm 0,043; Zaprinast: 0,783 mg/l \pm 0,063; Kombination: 0,898 mg/l \pm 0,044).

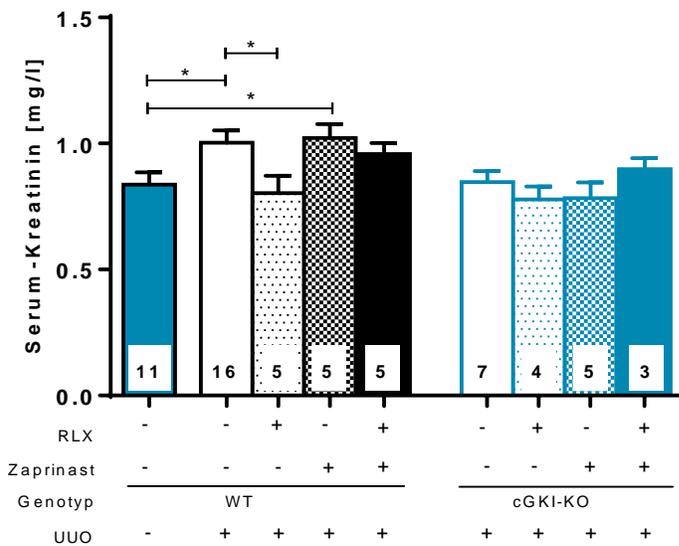


Abbildung 28 Kreatinin Serumkonzentration von WT und cGKI-KO Mäusen unbehandelt bzw. nach 7-tägiger Behandlung mit Serelaxin, Zaprinast oder Kombination aus beiden Behandlungen Kreatinin-Serumkonzentrationen wurden mithilfe einer HPLC-Methode ermittelt; *p<0,05; cGKI – cGMP-abhängige Proteinkinase I; cGMP – zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat, d – Tage, KO – knock out; RLX – Serelaxin, Uuo – unilaterale Ureterligation, WT – Wildtyp

3.2 Fibrose-assoziierte Biomarker in der pulmonalen Hypertonie

Im Folgenden wurde bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie ein biologischer Marker identifiziert, der mit dem Krankheitsverlauf assoziiert ist und welcher ebenfalls mit den antifibrotischen Effekten von Serelaxin verknüpft ist.

3.2.1 Charakterisierung der Patienten-Population

3.2.1.1 Patienten-Charakteristika

Insgesamt wurden konsekutiv 35 Patienten mit pulmonaler Hypertonie in die Untersuchung eingeschlossen, wovon 24 Patienten eine idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (iPAH) und 11 Patienten eine pulmonale Hypertonie aufgrund einer Linksherzerkrankung (PH-LHD) aufwiesen.

Tabelle 23 fasst die Patienten-Charakteristika der beiden Patienten-Populationen zusammen.

Tabelle 23 Patienten-Charakteristika der iPAH und PH-LHD-Patienten

Patienten		iPAH	PH-LHD
Anzahl	n	24	11
Alter [Jahre]	MW \pm SD	62,2 \pm 16,0	80,5 \pm 4,1
Geschlecht			
Frauen	n; %	12 (50 %)	6 (55 %)
Männer	n; %	12 (50 %)	5 (45 %)
WHO Schweregrad-Einteilung (funktionelle Klasse)			
II	n; %	6 (25 %)	2 (18 %)
III	n; %	16 (67 %)	5 (45 %)
IV	n; %	2 (8 %)	4 (36 %)

MW – Mittelwert; SD – Standardabweichung; iPAH – idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie; PH-LHD – pulmonale Hypertonie aufgrund einer Linksherzerkrankung

Die Geschlechterverteilung war in beiden Patienten-Populationen gleichmäßig (50 % bzw. 55 % Frauen für iPAH bzw. PH-LHD). Wie aus Tabelle 23 hervorgeht, waren Patienten mit iPAH jünger als Patienten mit PH-LHD ($p < 0,001$). Vom Schweregrad der Erkrankung waren die Patienten in die WHO-Klassen II – IV eingeteilt.

Klinische Parameter der Baseline-Visite (V1) wurden zusammen mit Parametern aus V2 in Tabelle 24 für das iPAH-Kollektiv und in Tabelle 25 für das PH-LHD-Kollektiv zusammengefasst, in welchen alle erhobenen Parameter als Mittelwert \pm Standardabweichung bzw. Median [Min; Max] angegeben wurden.

Die Parameter aus der Rechtsherzkatheter-Messung (vgl. Tabelle 24 (für iPAH) und Tabelle 25 (für PH-LHD) – Hämodynamik) lagen von allen Patienten vor. Erhöhte Werte von mPAP und PVR in beiden Kollektiven sind typisch für diese Erkrankung. Gemäß der Definition einer PH-LHD war hier zusätzlich der pulmonalarterielle Verschlussdruck (PAWP) erhöht, welcher in dem iPAH-Kollektiv im Normbereich lag. Es lag in beiden Kollektiven eine leicht bis mäßig eingeschränkte Nierenfunktion vor.²¹¹

3.2.1.2 Klinischer Verlauf der einzelnen Patienten

Die Patienten wurden zwischen 2003 und 2012 mit einer pulmonalen Hypertonie diagnostiziert und waren bis zum Todeszeitpunkt bzw. bis Juli 2015 in regelmäßigen Abständen in der Klinik. Die mediane Nachbeobachtungszeit [Min; Max] betrug 52,66 [11,5; 138,6] Monate. Nach Entitäten getrennt ergab sich eine mediane Nachbeobachtungszeit [Min; Max] von 72,02 [11,5; 138,6] Monaten für das iPAH-Kollektiv sowie 36,33 [13,6; 52,7] Monaten für das PH-LHD-Kollektiv.

Der Beobachtungszeitraum begann mit der Diagnosestellung (V1). Als Visite 2 (V2) wurde die erste Folgevisite nach V1 bezeichnet, welche innerhalb des Beobachtungszeitraums stattgefunden hat. Die mediane Zeit [Min; Max] zwischen V1 und V2 betrug jeweils 5,85 [1,79; 71,3] und 9,49 [3,17; 31,1] Monate für iPAH und PH-LHD entsprechend.

Die Mittelwerte \pm Standardabweichung bzw. Mediane [Min-Max] erhobener hämodynamischer und sonstiger klinischer Parameter sind jeweils für V1 und V2 in Tabelle 24 (für iPAH) und in Tabelle 25 (für PH-LHD) aufgeführt. Betrachtete man die jeweiligen Kollektive, haben sich die Parameter in der Zeit von V1 bis V2, berechnet mit Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, nicht signifikant verändert.

Tabelle 24 Klinische Parameter aus V1 und V2 für Patienten mit iPAH

iPAH						
Hämodynamik			N	MW ± SD	Median	[Min-Max]
mPAP [mmHg]	V1	24	42,9 ± 13,8	43,5	[25; 85]	
	V2	24	43,9 ± 13,3	44,5	[23; 74]	
PAWP [mmHg]	V1	24	8,38 ± 3,66	8,5	[2; 16]	
	V2	24	7,42 ± 3,32	7,5	[2; 14]	
CI [l/min/m ²]	V1	24	2,25 ± 0,59	2,20	[1,43; 3,80]	
	V2	24	2,33 ± 0,83	2,09	[1,41; 4,57]	
PVR [dyn*s*cm ⁻⁵]	V1	24	716 ± 373	640	[179; 1667]	
	V2	24	766 ± 430	617	[220; 1900]	
weitere klinische Parameter						
6MWD [m]	V1	24	313 ± 121	280	[115; 573]	
	V2	21	306 ± 148	343	[0; 518]	
LVEF [%]	V1	14	63,5 ± 10,9	64	[46; 82]	
	V2	13	70,6 ± 12,4	74	[50; 86]	
TAPSE [mm]	V1	17	17,4 ± 3,91	16	[12; 25]	
	V2	19	17,7 ± 5,43	18	[6; 28]	
BNP [pmol/l]	V1	20	276 ± 374	154	[11; 1635]	
	V2	21	220 ± 232	176	[11; 893]	
eGFR [ml/min/1,73m ²]	V1	22	60,6 ± 16,4	59,0	[29; 98]	
	V2	21	59,5 ± 17,5	59,1	[22; 102]	

mPAP – mittlerer pulmonalarterieller Druck, PAWP – pulmonalarterieller Verschlussdruck, CI – Cardiac Index, PVR – Pulmonalvaskulärer Widerstand, BNP – Brain Natriuretic Peptide, 6MWD – 6-Minuten-Gehtest, LVEF – linksventrikuläre Ejektionsfraktion, TAPSE – Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion, eGFR – geschätzte glomeruläre Filtrationsrate, MW – Mittelwert, SD – Standardabweichung, iPAH – idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie, PH-LHD – pulmonale Hypertonie aufgrund einer Linksherzerkrankung

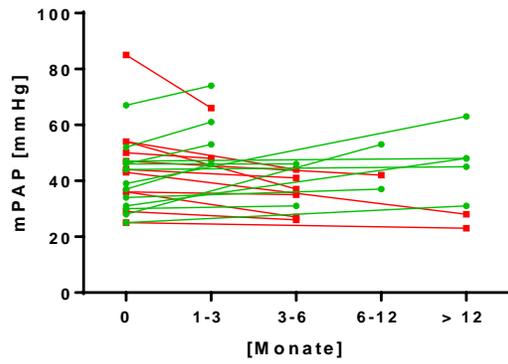
Tabelle 25 Klinische Parameter aus V1 und V2 für Patienten mit PH-LHD

PH-LHD						
Hämodynamik		N	MW ± SD	Median	[Min-Max]	
mPAP [mmHg]	V1	11	40,6 ± 8,2	41,0	[29; 54]	
	V2	11	38,9 ± 12,0	39,0	[19; 57]	
PAWP [mmHg]	V1	11	12,82 ± 4,00	13,0	[7; 21]	
	V2	11	14,00 ± 6,93	11,0	[5; 26]	
CI [l/min/m ²]	V1	11	2,48 ± 0,43	2,42	[2,02; 3,45]	
	V2	11	2,33 ± 0,62	2,36	[1,55; 3,35]	
PVR [dyn*s*cm ⁻⁵]	V1	11	489 ± 191	449	[295; 780]	
	V2	11	458 ± 173	452	[229; 825]	
weitere klinische Parameter						
6MWD [m]	V1	9	202 ± 97	230	[0; 305]	
	V2	9	190 ± 110	195	[0; 350]	
LVEF [%]	V1	6	62,2 ± 8,1	62	[50; 75]	
	V2	5	57,0 ± 4,5	60	[50; 60]	
TAPSE [mm]	V1	9	17,7 ± 4,0	17	[13; 26]	
	V2	6	16,8 ± 3,1	18	[12; 20]	
BNP [pmol/l]	V1	10	264 ± 171	291	[34; 557]	
	V2	7	180 ± 129	114	[35; 358]	
eGFR [ml/min/1,73m ²]	V1	11	56,7 ± 16,9	52,1	[29; 77]	
	V2	11	54,2 ± 15,8	57,6	[33; 77]	

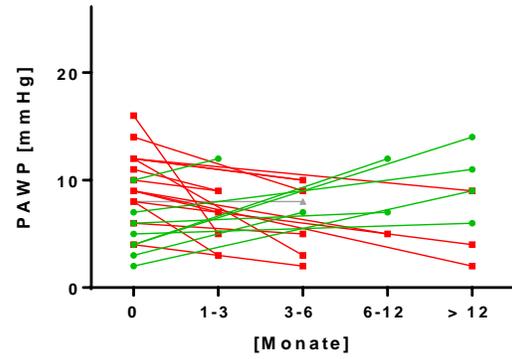
mPAP – mittlerer pulmonalarterieller Druck, PAWP – pulmonalarterieller Verschlussdruck, CI – Cardiac Index, PVR – Pulmonalvaskulärer Widerstand, BNP – Brain Natriuretic Peptide, 6MWD – 6-Minuten-Gehtest, LVEF – linksventrikuläre Ejektionsfraktion, TAPSE – Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion, eGFR – geschätzte glomeruläre Filtrationsrate, MW – Mittelwert, SD – Standardabweichung, iPAH – idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie, PH-LHD – pulmonale Hypertonie aufgrund einer Linksherzerkrankung

Betrachtete man die Patienten einzeln, gab es sowohl Patienten mit einer Verbesserung als auch Patienten mit einer Verschlechterung des Krankheitsverlauf von V1 bis V2. Der Verlauf aller klinisch erhobenen Parameter wird in Abbildung 29 (für iPAH) und Abbildung 30 (für PH-LHD) graphisch dargestellt, wobei die jeweilige Linie dem Verlauf einer Variable in jedem einzelnen Patienten entspricht. Aufgrund der unterschiedlichen Zeitintervalle zwischen V1 und V2 wurden die einzelnen Patienten in Gruppen gemäß der jeweiligen Zeitspanne (iPAH: 1-3 Monate, 3-6 Monate, 6-12 Monate, mehr als 12 Monate; PH-LHD: 0-9 Monate, mehr als 9 Monate) zwischen V1 und V2 unterteilt.

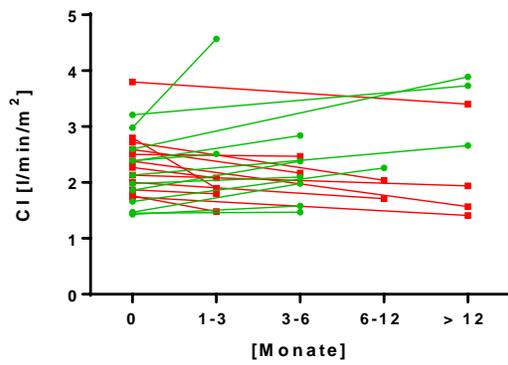
(A) mPAP



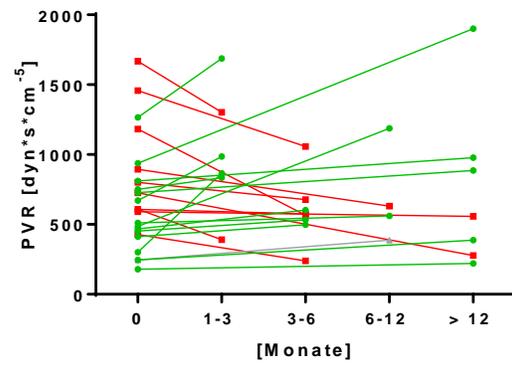
(B) PAWP



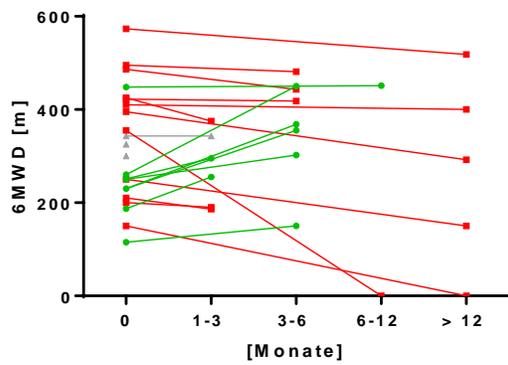
(C) CI



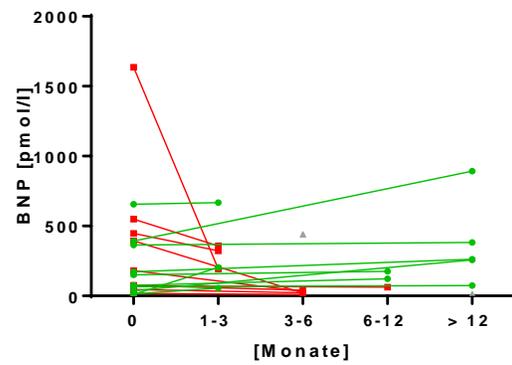
(D) PVR



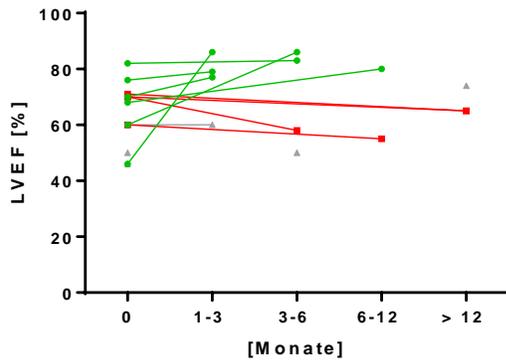
(E) 6MWD



(F) BNP



(G) LVEF



(H) TAPSE

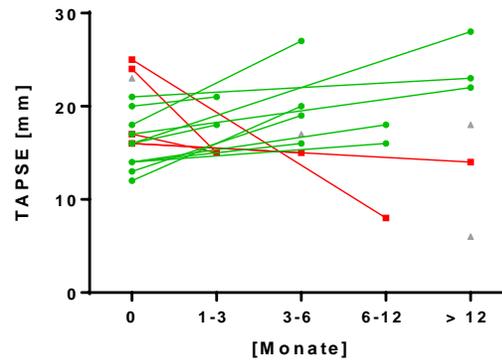
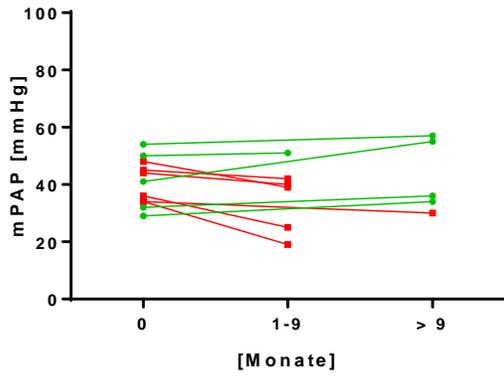
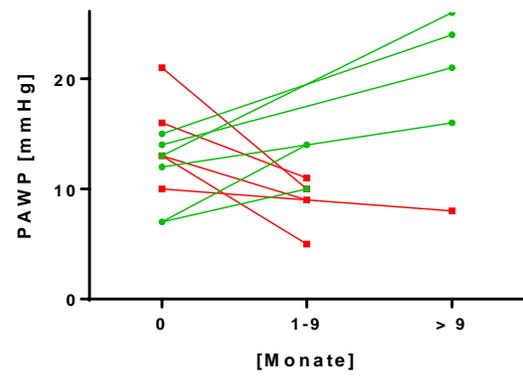


Abbildung 29 Veränderung der klinischen Parameter (mPAP, PAWP, CI, PVR, 6MWD, BNP, LVEF, TAPSE) jedes einzelnen Patienten von Diagnose (Visite 1; 0 Monate) bis zur Folgevisite V2 in iPAH-Patienten gemäß der jeweiligen Zeitspanne zwischen V1 und V2 (rot: Reduktion des Markers von V1 bis V2, grün: Erhöhung des Markers von V1 bis V2); mPAP – mittlerer pulmonalarterieller Druck, PAWP – pulmonalarterieller Verschlussdruck, CI – Cardiac Index, PVR – Pulmonalvaskulärer Widerstand, BNP – Brain Natriuretic Peptide, 6MWD – 6-Minuten-Gehtest, LVEF – linksventrikuläre Ejektionsfraktion, TAPSE – Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion, eGFR – geschätzte glomeruläre Filtrationsrate, iPAH – idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie

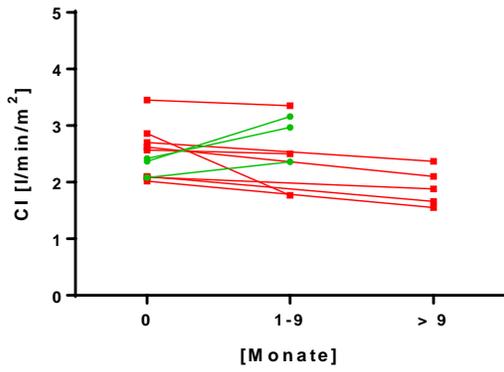
(A) mPAP



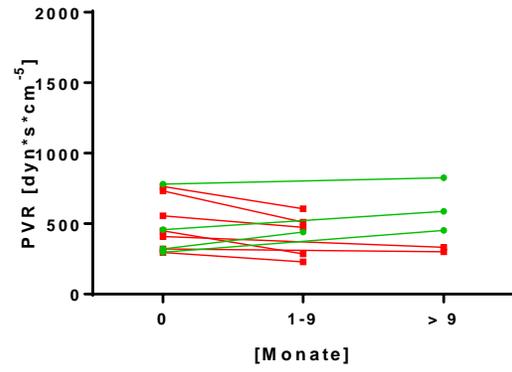
(B) PAWP



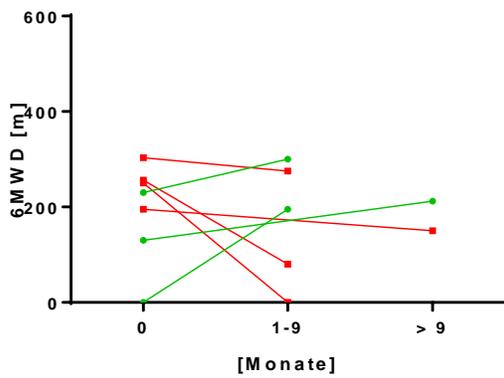
(C) CI



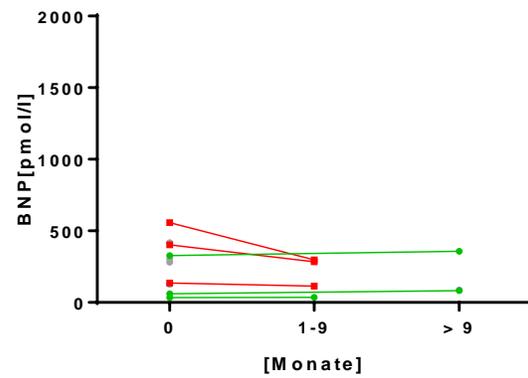
(D) PVR



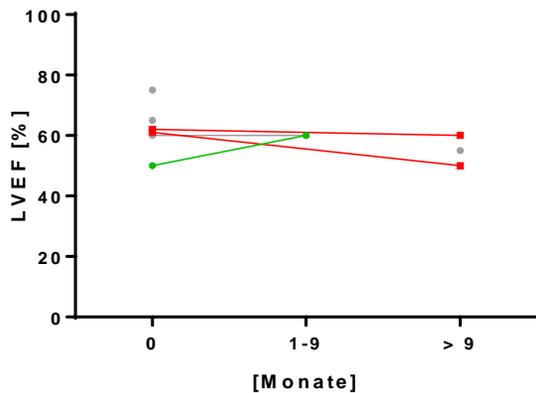
(E) 6MWD



(F) BNP



(G) LVEF



(H) TAPSE

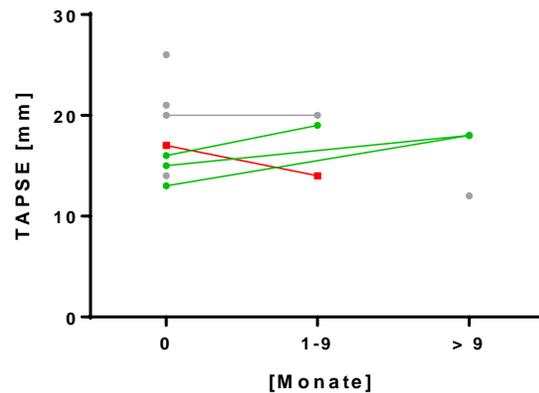


Abbildung 30 Veränderung der klinischen Parameter (mPAP, PAWP, CI, PVR, 6MWD, BNP, LVEF, TAPSE) jedes einzelnen Patienten von Diagnose (Visite 1, 0 Monate) bis zur Folgevisite V2 in PH-LHD-Patienten gemäß der jeweiligen Zeitspanne zwischen V1 und V2 (rot: Reduktion des Markers von V1 bis V2, grün: Erhöhung des Markers von V1 bis V2); mPAP – mittlerer pulmonalarterieller Druck, PAWP – pulmonalarterieller Verschlussdruck, CI – Cardiac Index, PVR – Pulmonalvaskulärer Widerstand, BNP – Brain Natriuretic Peptide, 6MWD – 6-Minuten-Gehtest, LVEF – linksventrikuläre Ejektionsfraktion, TAPSE – Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion, eGFR – geschätzte glomeruläre Filtrationsrate, PH-LHD – pulmonale Hypertonie aufgrund einer Linksherzerkrankung

Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs in den beiden untersuchten Kollektiven wurde für keine der Variablen eine Normalverteilung angenommen.

Da die beiden Kollektive unterschiedliche Pathophysiologien aufweisen, wurden Patienten mit iPAH bzw. PH-LHD im Folgenden separat voneinander ausgewertet.

3.2.2 Plasma-Konzentrationen ausgewählter Biomarker

Bei den hier dargestellten Patienten wurden während der Rechtsherzkatheter-Untersuchung Blutproben aus der Pulmonalarterie entnommen, das Plasma abgetrennt und für Biomarker-Testungen bereitgehalten. Im Citrat-Plasma wurden Proteinspiegel von MMP2, MMP9, TIMP1 und TIMP4 zum Zeitpunkt V1 und V2 gemessen.

Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs wurde auch bei den Biomarkern bzw. bei den berechneten MMP/TIMP-Verhältnissen keine Normalverteilung angenommen.

Tabelle 26 (für iPAH) und Tabelle 27 (für PH-LHD) zeigen die Plasmaspiegel der gemessenen Biomarker (MMP2, MMP9, TIMP1 und TIMP4), sowie die MMP/TIMP-Verhältnisse für V1 und V2. Im iPAH-Kollektiv blieb MMP2 im Beobachtungszeitraum

unverändert, während MMP9 und TIMP4 signifikant erhöht ($p=0,004$; $p<0,001$) und TIMP1 signifikant reduziert wurden ($p=0,004$). Im PH-LHD-Kollektiv zeigte sich dieselbe Tendenz, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Im iPAH-Kollektiv war MMP9/TIMP1 von V1 bis V2 signifikant erhöht ($p<0,001$) und MMP2/TIMP4 signifikant reduziert ($p=0,003$). Auch bei der Veränderung der MMP/TIMP-Verhältnisse zeigte sich bei PH-LHD-Patienten dieselbe Tendenz, ohne statistische Signifikanz.

Tabelle 26 Plasmaspiegel von MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-4 sowie der jeweiligen MMP/TIMP-Verhältnisse von Visite 1 (V1) und Visite 2 (V2) bei Patienten mit iPAH

iPAH		n	MW ±	SD	Median	[Min-Max]
MMP2 [ng/mL]	V1	24	25,25 ±	7,44	25,47	[13,55; 49,38]
	V2	24	24,95 ±	9,20	23,08	[13,74; 50,91]
MMP9 ** [ng/mL]	V1	23	27,38 ±	10,91	24,94	[15,19; 58,25]
	V2	24	34,70 ±	12,37	31,69	[19,28; 61,77]
TIMP1 ** [ng/mL]	V1	24	108,9 ±	48,31	93,76	[49,78; 243,9]
	V2	24	93,73 ±	39,43	82,2960	[46,74; 199,5]
TIMP4 *** [ng/mL]	V1	24	1,204 ±	0,560	1,100	[0,504; 3,383]
	V2	24	1,513 ±	0,883	1,236	[0,566; 4,680]
MMP2/TIMP1	V1	24	0,25 ±	0,07	0,258	[0,137; 0,373]
	V2	24	0,28 ±	0,08	0,268	[0,149; 0,452]
MMP2/TIMP4 **	V1	24	23,56 ±	10,20	21,47	[8,847; 51,80]
	V2	24	19,22 ±	8,68	18,28	[6,826; 40,97]
MMP9/TIMP1 ***	V1	23	0,28 ±	0,12	0,257	[0,075; 0,526]
	V2	24	0,41 ±	0,17	0,345	[0,149; 0,896]
MMP9/TIMP4	V1	23	26,56 ±	14,37	21,56	[8,413; 61,10]
	V2	24	28,61 ±	18,10	24,86	[8,309; 88,29]

iPAH – idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie, MMP – Matrix-Metalloproteinase, MW – Mittelwert, SD – Standardabweichung, TIMP – tissue inhibitor of MMPs; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ bzgl. Veränderung der Parameter von V1 bis V2

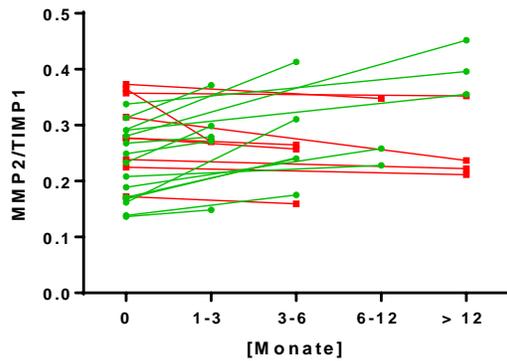
Tabelle 27 Plasmaspiegel von MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-4 sowie der jeweiligen MMP/TIMP-Verhältnisse von Visite 1 (V1) und Visite 2 (V2) bei Patienten mit PH-LHD

PH-LHD		n	MW ±	SD	Median	[Min-Max]
MMP2 [ng/mL]	V1	11	28,75 ±	10,33	27,90	[14,94; 51,94]
	V2	11	27,05 ±	9,54	27,22	[13,35; 46,26]
MMP9 [ng/mL]	V1	11	29,70 ±	6,72	30,28	[21,83; 40,19]
	V2	10	34,24 ±	9,87	32,53	[21,51; 52,29]
TIMP1 [ng/mL]	V1	11	115,97 ±	38,77	106,2	[83,62; 208,5]
	V2	11	101,37 ±	29,16	100,4	[71,49; 177,4]
TIMP4 [ng/mL]	V1	11	2,110 ±	1,063	2,182	[0,678; 4,114]
	V2	11	2,276 ±	0,930	2,708	[1,052; 3,877]
MMP2/TIMP1	V1	11	0,25 ±	0,08	0,25	[0,173; 0,426]
	V2	11	0,28 ±	0,10	0,28	[0,133; 0,461]
MMP2/TIMP4	V1	11	17,60 ±	10,40	13,63	[5,115; 34,53]
	V2	11	14,38 ±	8,31	15,77	[4,769; 30,83]
MMP9/TIMP1	V1	11	0,27 ±	0,09	0,261	[0,163; 0,440]
	V2	10	0,37 ±	0,19	0,318	[0,178; 0,731]
MMP9/TIMP4	V1	11	17,83 ±	9,82	15,04	[7,714; 38,31]
	V2	10	18,76 ±	10,62	14,75	[7,760; 38,64]

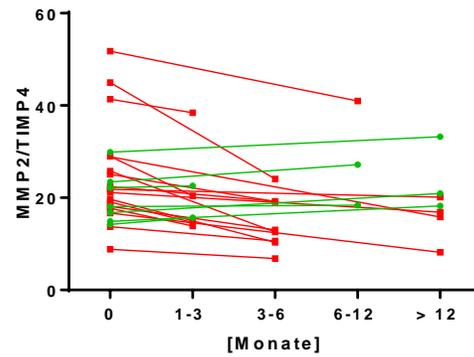
iPAH – idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie, MMP – Matrix-Metalloproteinase, MW – Mittelwert, SD – Standardabweichung, TIMP – tissue inhibitor of MMPs

Der zeitliche Verlauf der MMP/TIMP-Verhältnisse in einzelnen Patienten wird in Abbildung 31 (für iPAH) und Abbildung 32 (für PH-LHD) graphisch dargestellt.

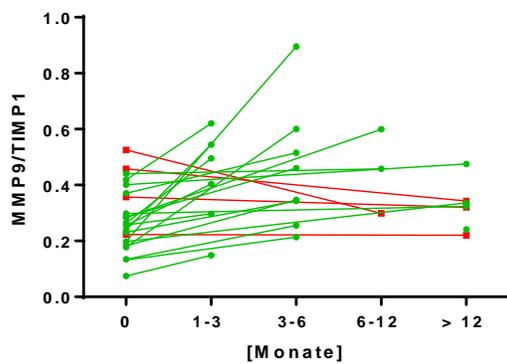
(A) MMP2/TIMP1



(B) MMP2/TIMP4



(C) MMP9/TIMP1



(D) MMP9/TIMP4

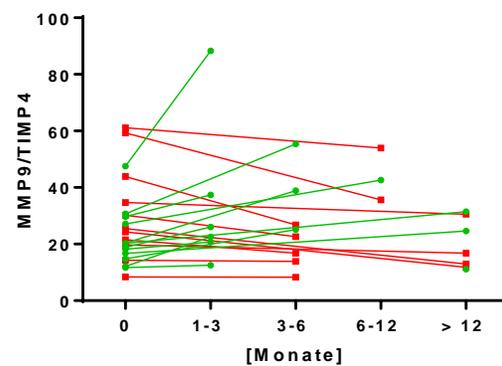
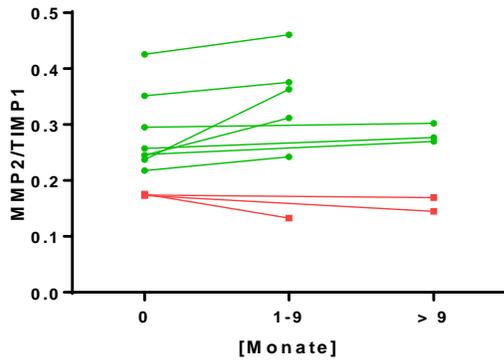
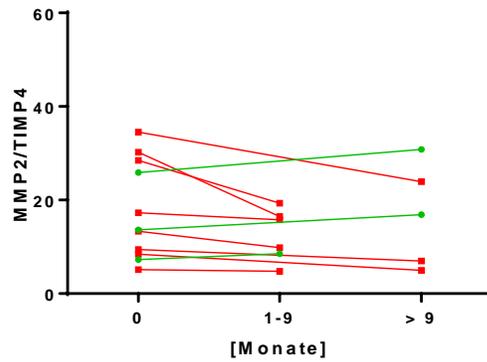


Abbildung 31 Veränderung der Biomarker-Verhältnisse MMP2/TIMP1, MMP2/TIMP4, MMP9/TIMP1 und MMP9/TIMP4 jedes einzelnen Patienten von Diagnose (Visite 1, 0 Monate) bis zur Folgevisite V2 für iPAH gemäß der jeweiligen Zeitspanne zwischen V1 und V2 (rot: Reduktion des Markers von V1 bis V2, grün: Erhöhung des Markers von V1 bis V2); MMP – Matrix-Metalloproteinase; TIMP – Tissue Inhibitor of MMPs

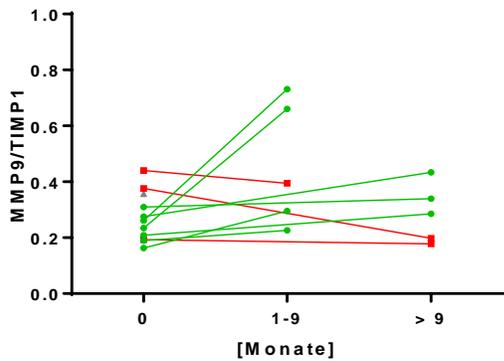
(A) MMP2/TIMP1



(B) MMP2/TIMP4



(C) MMP9/TIMP1



(D) MMP9/TIMP4

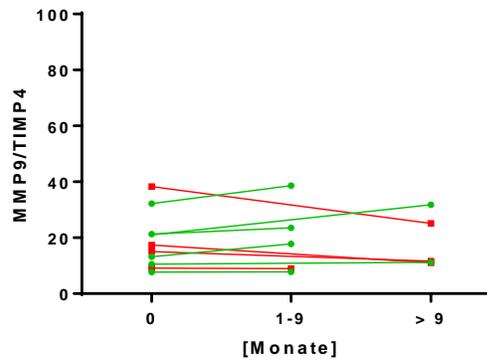


Abbildung 32 Veränderung der Biomarker-Verhältnisse MMP2/TIMP1, MMP2/TIMP4, MMP9/TIMP1 und MMP9/TIMP4 jedes einzelnen Patienten von Diagnose (Visite 1, 0 Monate) bis zur Folgevisite V2 für PH-LHD gemäß der jeweiligen Zeitspanne zwischen V1 und V2 (rot: Reduktion des Markers von V1 bis V2, grün: Erhöhung des Markers von V1 bis V2); MMP – Matrix-Metalloproteinase; TIMP – Tissue Inhibitor of MMPs

3.2.3 Korrelations-Analysen

Um den Zusammenhang von MMP/TIMP mit routinemäßig erhobenen klinischen Parametern patientenindividuell zu untersuchen, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt.

Im Folgenden sind Korrelationen aufgrund der geringen Fallzahl pro Patientenkollektiv mithilfe des Spearman-Korrelationskoeffizienten r für nicht-normalverteilte Variablen berechnet worden.

3.2.3.1 Korrelationen von MMP/TIMP-Verhältnissen mit klinischen Parametern im iPAH-Kollektiv – Folgevisite (V2)

Tabelle 28 fasst die Spearman-Korrelationskoeffizienten und die dazugehörigen p-Werte bei der Folgevisite (V2) für Patienten mit iPAH zusammen. In diesem Kollektiv fand man eine signifikante mittlere Korrelation ($r > 0,5$) von MMP2/TIMP4 mit dem Pulmonalarteriendruck (mPAP), dem pulmonalvaskulären Widerstand (PVR) sowie der TAPSE. Für MMP9/TIMP1 haben sich keine Korrelationen im untersuchten Patientenkollektiv ergeben. MMP2/TIMP1 und MMP9/TIMP4 zeigten signifikante geringere Korrelationen ($r < 0,5$) mit verschiedenen klinischen Parametern, wie mPAP, PAWP und TAPSE (vgl. Tabelle 28).

Tabelle 28 Korrelationen von MMP/TIMP-Verhältnissen mit klinischen Parametern bei V2 für iPAH-Patienten (n=24) r – Spearman-Korrelationskoeffizient; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Hämodynamik (n=24)	MMP2/TIMP1 r (p)	MMP2/TIMP4 r (p)	MMP9/TIMP1 r (p)	MMP9/TIMP4 r (p)
mPAP	0,148 (0,389)	0,583 (0,003)**	0,089 (0,680)	0,421 (0,041)*
PAWP	-0,439 (0,032)*	0,049 (0,818)	-0,221 (0,300)	-0,014 (0,950)
CI	-0,333 (0,112)	-0,326 (0,120)	-0,018 (0,933)	-0,143 (0,504)
PVR	0,397 (0,054)	0,644 (0,001)**	0,114 (0,596)	0,396 (0,056)
weitere klinische Parameter				
6MWD (n=21)	0,149 (0,520)	0,029 (0,902)	0,352 (0,118)	0,257 (0,260)
LVEF (n=13)	-0,052 (0,865)	0,033 (0,915)	0,146 (0,634)	0,154 (0,615)
TAPSE (n=19)	-0,485 (0,035)*	-0,633 (0,004)**	-0,109 (0,656)	-0,296 (0,219)
BNP (n=21)	0,177 (0,444)	0,308 (0,175)	-0,358 (0,111)	-0,179 (0,437)

mPAP – mittlerer pulmonalarterieller Druck, PAWP – pulmonalarterieller Verschlussdruck, CI – Cardiac Index, PVR – Pulmonalvaskulärer Widerstand, BNP – Brain Natriuretic Peptide, 6MWD – 6-Minuten-Gehtest, LVEF – linksventrikuläre Ejektionsfraktion, TAPSE – Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion, eGFR – geschätzte glomeruläre Filtrationsrate, iPAH – idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie, MMP – Matrix-Metalloproteinase, TIMP – tissue inhibitor of MMPs; V2 – Visite 2

3.2.3.2 Korrelationen von MMP/TIMP-Verhältnissen mit klinischen Parametern im iPAH-Kollektiv – relative Veränderung von V1 zu V2

Tabelle 29 fasst die Spearman-Korrelationskoeffizienten r und die dazugehörigen p -Werte bei Patienten mit iPAH zusammen, wobei die relativen Veränderungen der einzelnen Parameter für die Berechnungen verwendet worden sind. Hier ist zu beobachten, dass $\Delta(\text{MMP2/TIMP4})$ eine signifikante Korrelation mit ΔmPAP zeigte, was auch für diese Variablen bei V2 gezeigt werden konnte (vgl. Kapitel 3.2.3.1).

Außerdem korrelierten $\Delta(\text{MMP2/TIMP4})$ sowie $\Delta(\text{MMP9/TIMP1})$ mit den in der PH verwendeten Verlaufsparemetern ΔBNP und $\Delta(\text{MMP9/TIMP1})$ zusätzlich mit Δ6MWD .

Die Veränderung von MMP2/TIMP1 und MMP9/TIMP4 von V1 zu V2 korrelierte signifikant mit LVEF bei einem $r \sim 0,7$.

Tabelle 29 Korrelationen der relativen Veränderung von MMP/TIMP-Verhältnissen mit klinischen Parametern von V1 bis V2 für iPAH-Patienten (n=24) r – Spearman-Korrelationskoeffizient; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Hämodynamik (n=24) [#]	$\Delta(\text{MMP2/TIMP1})$ r (p)	$\Delta(\text{MMP2/TIMP4})$ r (p)	$\Delta(\text{MMP9/TIMP1})$ r (p)	$\Delta(\text{MMP9/TIMP4})$ r (p)
ΔmPAP	0,117 (0,588)	0,425 (0,038)*	-0,091 (0,680)	0,018 (0,936)
ΔPAWP	0,013 (0,953)	0,361 (0,083)	0,143 (0,515)	0,228 (0,295)
ΔCI	-0,103 (0,630)	-0,176 (0,412)	-0,072 (0,744)	-0,023 (0,918)
ΔPVR	0,030 (0,888)	0,211 (0,322)	-0,120 (0,587)	-0,066 (0,764)
weitere klinische Parameter				
Δ6MWD (n=21) [#]	0,258 (0,259)	-0,288 (0,205)	0,553 (0,011)*	0,347 (0,133)
ΔLVEF (n=11)	0,682 (0,021)*	0,073 (0,832)	0,573 (0,066)	0,718 (0,013)*
ΔTAPSE (n=16) [#]	-0,025 (0,927)	-0,081 (0,766)	-0,057 (0,840)	-0,157 (0,576)
ΔBNP (n=19) [#]	-0,082 (0,737)	0,502 (0,029)*	-0,668 (0,002)**	-0,377 (0,123)

mPAP – mittlerer pulmonalarterieller Druck, PAWP – pulmonalarterieller Verschlussdruck, CI – Cardiac Index, PVR – Pulmonalvaskulärer Widerstand, BNP – Brain Natriuretic Peptide, 6MWD – 6-Minuten-Gehtest, LVEF – linksventrikuläre Ejektionsfraktion, TAPSE – Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion, eGFR – geschätzte glomeruläre Filtrationsrate, iPAH – idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie, MMP – Matrix-Metalloproteinase, TIMP – tissue inhibitor of MMPs; V2 – Visite 2; [#]für MMP9/TIMP1 und MMP9/TIMP4: 1 Patient weniger als angegeben

3.2.3.3 Korrelationen von MMP/TIMP-Verhältnissen mit klinischen Parametern im PH-LHD-Kollektiv – Folgevisite V2

Tabelle 30 fasst die Korrelationskoeffizienten und die dazugehörigen p-Werte bei der Folgevisite bei Patienten mit PH-LHD zusammen. Diese Patienten wiesen eine hoch signifikante Korrelation ($r > 0,7$) von MMP2/TIMP4 mit dem pulmonalarteriellen Druck (mPAP), dem pulmonalarteriellen Verschlussdruck (PAWP) und dem pulmonalvaskulären Widerstand (PVR) auf. MMP9/TIMP4 korrelierte ebenfalls stark mit dem pulmonalarteriellen Druck (mPAP) sowie dem pulmonalvaskulären Widerstand (PVR).

Tabelle 30 Korrelationen von MMP/TIMP-Verhältnissen mit klinischen Parametern bei V2 für PH-LHD-Patienten r – Spearman-Korrelationskoeffizient; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Hämodynamik ($n=11$) [#]	MMP2/TIMP1		MMP2/TIMP4		MMP9/TIMP1		MMP9/TIMP4	
	r	(p)	r	(p)	r	(p)	r	(p)
mPAP	0,136	(0,689)	0,791	(0,004)**	-0,224	(0,533)	0,721	(0,019)*
PAWP	0,046	(0,894)	0,815	(0,002)**	-0,456	(0,185)	0,474	(0,166)
CI	0,000	(1,000)	-0,373	(0,259)	0,333	(0,347)	0,091	(0,803)
PVR	-0,109	(0,750)	0,745	(0,008)**	-0,248	(0,489)	0,721	(0,019)*
weitere klinische Parameter								
6MWD ($n=9$) #	0,243	(0,529)	0,644	(0,061)	-0,096	(0,821)	0,419	(0,301)
LVEF ($n=5$)	-0,224	(0,718)	0,671	(0,215)	-0,447	(0,450)	0,224	(0,718)
TAPSE ($n=6$)	-0,203	(0,700)	0,348	(0,499)	0,464	(0,354)	0,696	(0,125)
BNP ($n=7$) #	0,357	(0,432)	0,357	(0,432)	-0,714	(0,111)	-0,257	(0,623)

mPAP – mittlerer pulmonalarterieller Druck, PAWP – pulmonalarterieller Verschlussdruck, CI – Cardiac Index, PVR – Pulmonalvaskulärer Widerstand, BNP – Brain Natriuretic Peptide, 6MWD – 6-Minuten-Gehtest, LVEF – linksventrikuläre Ejektionsfraktion, TAPSE – Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion, eGFR – geschätzte glomeruläre Filtrationsrate, PH-LHD – pulmonale Hypertonie aufgrund einer Linksherzerkrankung, MMP – Matrix-Metalloproteinase, TIMP – tissue inhibitor of MMPs; V2 – Visite 2; [#]für MMP9/TIMP1 und MMP9/TIMP4: 1 Patient weniger als angegeben

3.2.3.4 Korrelationen von MMP/TIMP-Verhältnissen mit klinischen Parametern im PH-LHD-Kollektiv – relative Veränderung von V1 zu V2

Bei der Korrelations-Analyse der relativen Veränderungen der Marker von V1 bis V2 wurde nur ein signifikanter Zusammenhang von MMP2/TIMP4 mit dem 6-Minuten-Gehtest beobachtet (vgl. Tabelle 31). Dieser war signifikant und wird gemäß Mukaka et al.²¹⁰ (vgl. Kapitel 2.2.6) als hoch relevant bewertet.

Tabelle 31 Korrelationen der relativen Veränderung von MMP/TIMP-Verhältnissen mit klinischen Parametern von V1 bis V2 für PH-LHD-Patienten (n=11) r – Spearman-Korrelationskoeffizient; * p<0,05

Hämodynamik	Δ MMP2/TIMP1		Δ MMP2/TIMP4		Δ MMP9/TIMP ¹		Δ MMP9/TIMP4	
(n=11) #	r	(p)	r	(p)	r	(p)	r	(p)
Δ mPAP	-0,200	(0,555)	-0,209	(0,537)	-0,285	(0,425)	-0,345	(0,328)
Δ PAWP	0,032	(0,926)	-0,068	(0,842)	-0,249	(0,478)	-0,164	(0,650)
Δ CI	-0,145	(0,670)	-0,373	(0,259)	0,515	(0,128)	0,176	(0,627)
Δ PVR	-0,064	(0,853)	-0,091	(0,790)	-0,127	(0,726)	-0,164	(0,651)
weitere klinische Parameter								
Δ 6MWD (n=6) #	0,429	(0,397)	-0,829	(0,042)*	0,000	(1,000)	0,000	(1,000)
Δ LVEF (n=4)	0,000	(1,000)	0,200	(0,800)	-0,400	(0,600)	0,000	(1,000)
Δ TAPSE (n=5)	-0,600	(0,285)	0,000	(1,000)	-0,500	(0,391)	-0,500	(0,391)
Δ BNP (n=6) #	-0,429	(0,397)	-0,143	(0,787)	-0,400	(0,505)	-0,100	(0,873)

mPAP – mittlerer pulmonalarterieller Druck, PAWP – pulmonalarterieller Verschlussdruck, CI – Cardiac Index, PVR – Pulmonalvaskulärer Widerstand, BNP – Brain Natriuretic Peptide, 6MWD – 6-Minuten-Gehtest, LVEF – linksventrikuläre Ejektionsfraktion, TAPSE – Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion, eGFR – geschätzte glomeruläre Filtrationsrate, PH-LHD – pulmonale Hypertonie aufgrund einer Linksherzerkrankung, MMP – Matrix-Metalloproteinase, TIMP – tissue inhibitor of MMPs; V2 – Visite 2; #für MMP9/TIMP1 und MMP9/TIMP4: 1 Patient weniger als angegeben

3.2.4 Prädiktiver Wert der MMP/TIMP-Verhältnisse

3.2.4.1 Klinische Verschlechterung bei iPAH-Patienten

Im iPAH-Kollektiv trat eine klinische Verschlechterung bei 17 von insgesamt 24 Patienten auf. Die mediane Zeit bis zur klinischen Verschlechterung betrug 23,11 Monate (Abbildung 33).

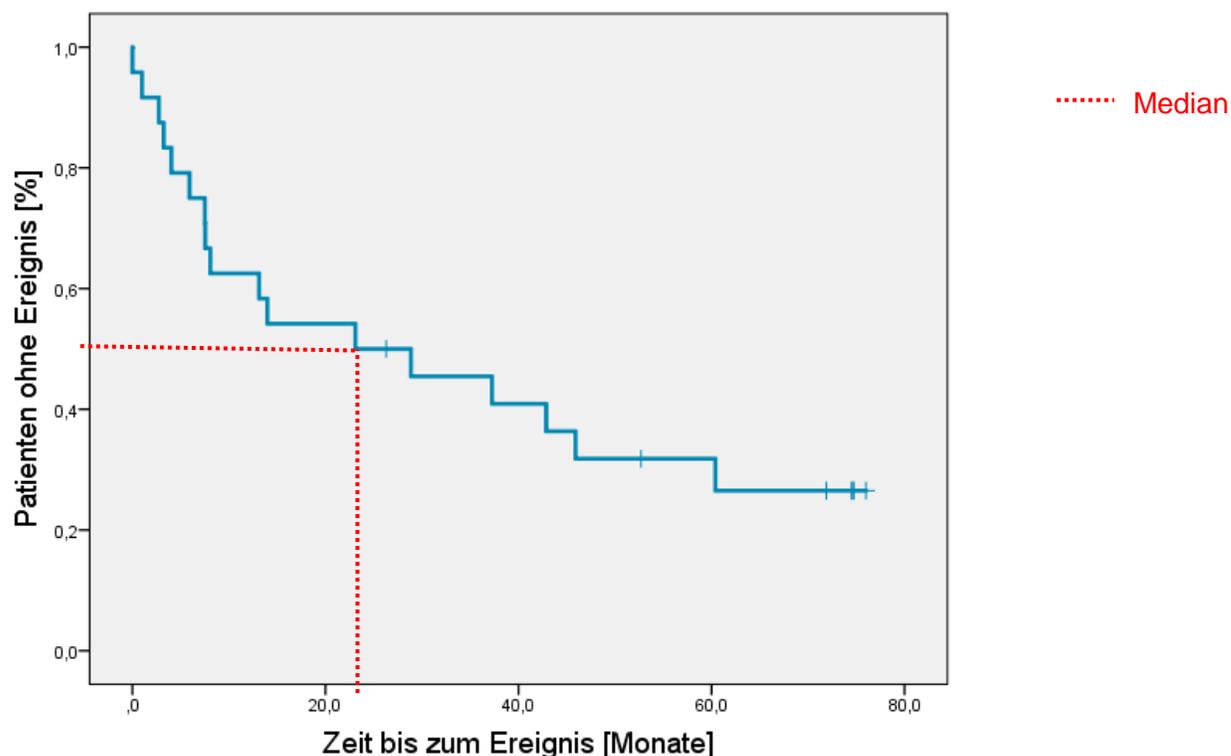


Abbildung 33 Kaplan-Meier Kurve für das Eintreten einer klinischen Verschlechterung (Ereignis) bei iPAH-Patienten (n=24)

Da bei einigen Patienten (n=6) die klinische Verschlechterung bereits vor V2 lag, wurden diese, nachdem die prädiktive Aussagekraft der MMP/TIMP-Verhältnisse bei V2 untersucht werden sollte, für diese Analyse ausgeschlossen. Somit wurden für diese Analyse nur 18 Patienten berücksichtigt, von welchen 11 Patienten eine klinische Verschlechterung aufwiesen.

Zur Ermittlung eines Schwellenwertes mit optimaler Sensitivität und Spezifität für die Vorhersage einer klinischen Verschlechterung wurde eine *receiver operating characteristics-*

Analyse für alle MMP/TIMP-Verhältnisse durchgeführt. Die Ergebnisse der ROC-Analyse sind in Tabelle 32 zusammengefasst. Die AUC für MMP2/TIMP4 war mit 0,818 ($p=0,026$) sehr hoch und zeigte als einziger Marker ein signifikantes Ergebnis (Abbildung 34).

Tabelle 32 ROC-Analyse der MMP/TIMP-Verhältnisse an V2 zur Vorhersage von klinischer Verschlechterung in iPAH-Patienten (n=18) * $p<0,05$

V2	AUC	Standardfehler	p	95 % CI
MMP2/TIMP1	0,571	0,136	0,618	[0,304;0,839]
MMP2/TIMP4	0,818	0,101	0,026 *	[0,619;1,000]
MMP9/TIMP1	0,481	0,147	0,892	[0,192;0,769]
MMP9/TIMP4	0,701	0,126	0,160	[0,453; 0,949]

AUC – area under the curve; CI – confidence interval; MMP – Matrix-Metalloproteinase; TIMP – tissue inhibitor of MMP

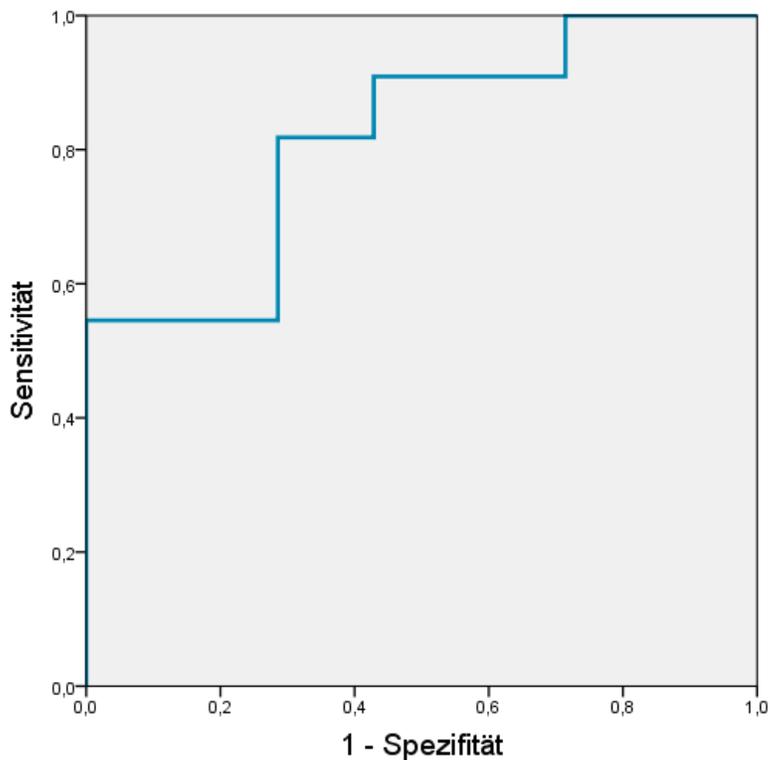


Abbildung 34 ROC-Kurve für MMP2/TIMP4 an V2 zur Vorhersage einer klinischen Verschlechterung (Ereignis) MMP – Matrix-Metalloproteinase, TIMP – tissue inhibitor of MMPs

Aus dieser Berechnung wurde ein Schwellenwert für MMP2/TIMP4 von 14,26 mit einer höchstmöglichen Sensitivität (81,8 %) und Spezifität (71,4 %) für die Beurteilung der Vorhersagekraft für eine klinische Verschlechterung eines Patienten festgelegt.

Abbildung 35 zeigt in einer Kaplan-Meier Kurve die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer klinischen Verschlechterung, stratifiziert nach MMP2/TIMP4-Verhältnis im Plasma der Patienten. In Patienten mit einem MMP2/TIMP4-Wert $> 14,26$ betrug die mediane Zeit bis zur klinischen Verschlechterung 23,11 Monate. Im Patienten unter diesem Schwellenwert wurde der Median nicht erreicht, wobei die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten einer klinischen Verschlechterung signifikant niedriger war als für Patienten über diesem Schwellenwert ($p=0,032$).

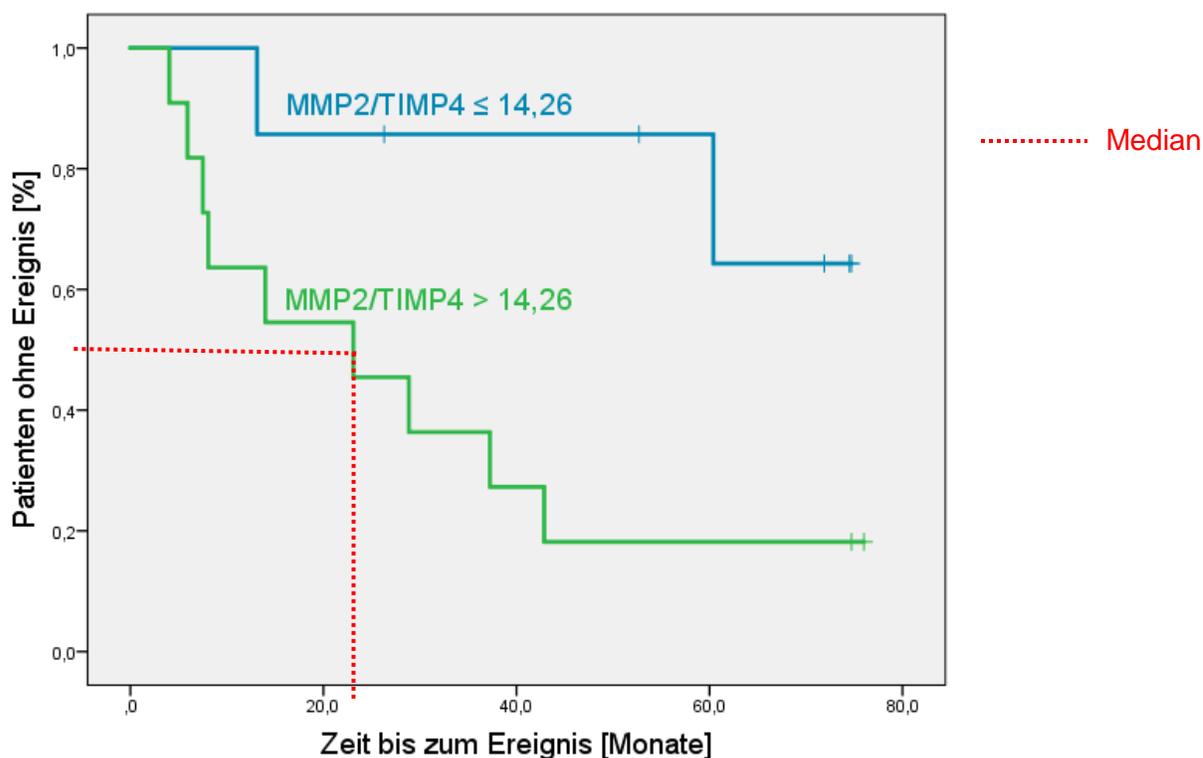


Abbildung 35 Kaplan-Meier Kurve für das Eintreten einer klinischen Verschlechterung (Ereignis) bei iPAH-Patienten in Abhängigkeit vom MMP2/TIMP4-Verhältnis an V2 (grün: $MMP2/TIMP4 > 14,26$, $n=11$; blau: $MMP2/TIMP4 < 14,26$, $n=7$; $p=0,032$); MMP – Matrix-Metalloproteinase, TIMP – tissue inhibitor of MMPs

3.2.4.2 Überleben bei iPAH-Patienten

In dem iPAH-Kollektiv sind 8 der 24 Patienten während des Beobachtungszeitraums gestorben. Die mediane Überlebenszeit betrug 85,3 Monate nach Diagnosestellung. Abbildung 36 zeigt den kumulativen Überlebensstatus aller iPAH-Patienten.

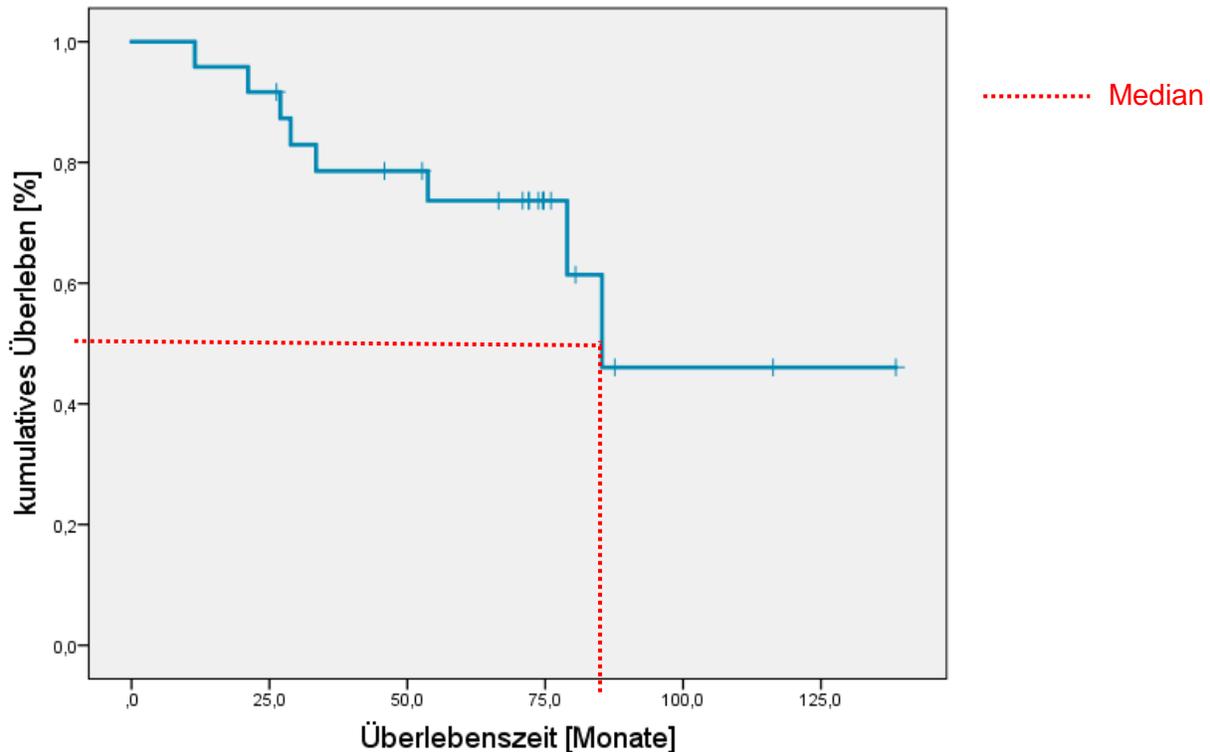


Abbildung 36 Kaplan-Meier Überlebenskurve für iPAH-Patienten (n=24)

Zur Testung der Vorhersagekraft des Überlebens durch ein MMP/TIMP-Verhältnis wurde analog zur Analyse der klinischen Verschlechterung der Patienten eine ROC-Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 33 dargestellt. Auch im Bezug auf die Vorhersage des Überlebens lieferte erneut das Verhältnis von MMP2 zu TIMP4 eine sehr hohe AUC von 0,922 sowie ein signifikantes Ergebnis ($p=0,005$).

Tabelle 33 ROC-Analyse der MMP/TIMP-Verhältnisse an V2 zur Vorhersage des Überlebens in iPAH-Patienten (n=24) ** p<0,01

V2	AUC	Standardfehler	p	95 % CI
MMP2/TIMP1	0,633	0,137	0,371	[0,365;0,902]
MMP2/TIMP4	0,922	0,057	0,005 **	[0,810;1,000]
MMP9/TIMP1	0,544	0,161	0,766	[0,228;0,861]
MMP9/TIMP4	0,722	0,170	0,136	[0,388;1,000]

AUC – area under the curve; CI – confidence interval; MMP – Matrix-Metalloproteinase; TIMP – tissue inhibitor of MMP

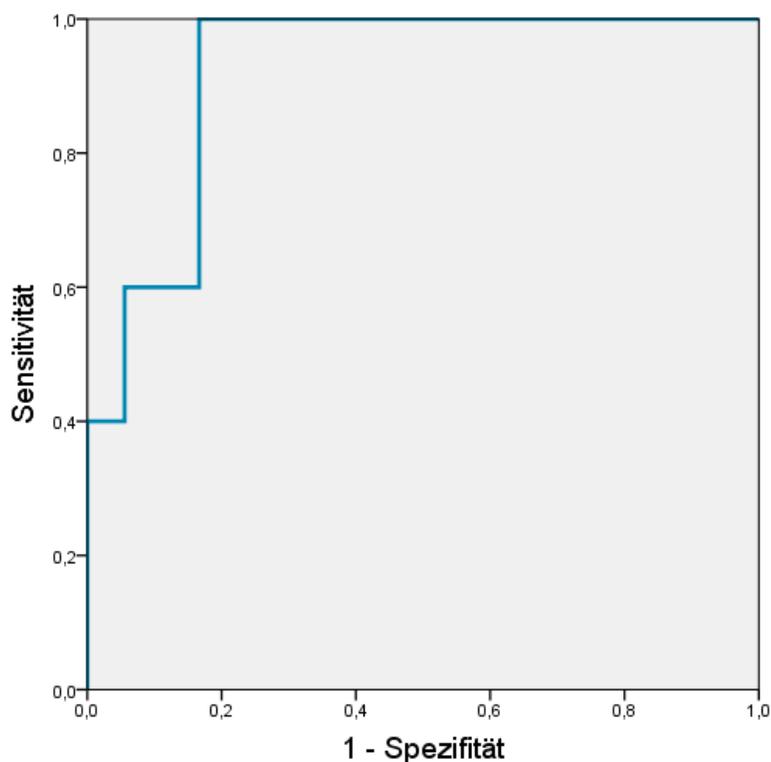


Abbildung 37 ROC-Kurve für MMP2/TIMP4 an V2 zur Vorhersage des Überlebens MMP – Matrix-Metalloproteinase, TIMP – tissue inhibitor of MMPs

Mit bestmöglicher Sensitivität (100,0 %) und Spezifität (83,3 %) wurde mittels ROC-Analyse ein Schwellenwert bei 20,29 für MMP2/TIMP4 für die Vorhersage des Überlebens festgelegt (vgl. Abbildung 37). In Abbildung 38 wird gezeigt, dass Patienten, bei denen das Verhältnis von MMP2 zu TIMP4 über dem Schwellenwert von 20,29 liegt, eine signifikant geringere Überlebensdauer aufwiesen als Patienten mit $\text{MMP2/TIMP4} \leq 20,29$ ($p=0,01$).

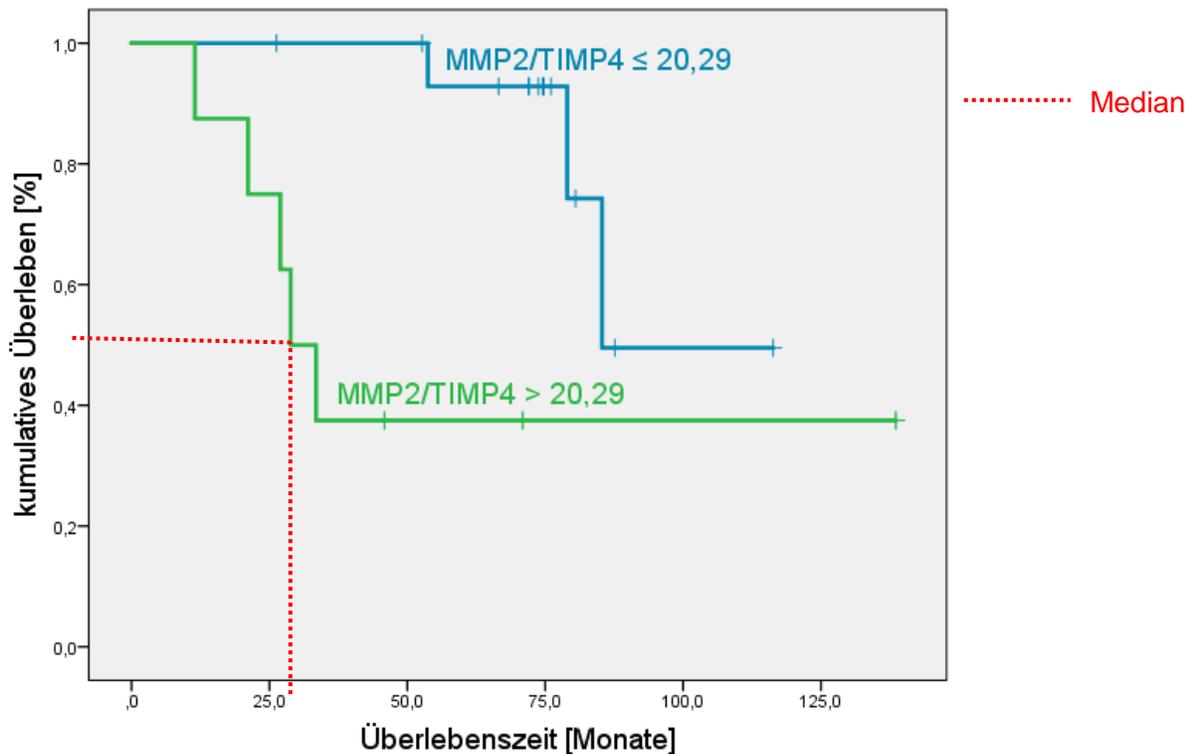


Abbildung 38 Kaplan-Meier Kurve für Überleben bei iPAH-Patienten in Abhängigkeit vom MMP2/TIMP4-Verhältnis an V2 (grün: MMP2/TIMP4 > 20,29, n=8; blau: MMP2/TIMP4 < 20,29, n=16; p=0,01); MMP – Matrix-Metalloproteinase, TIMP – tissue inhibitor of MMPs

3.2.4.3 Ausblick: Transformation von MMP2 und TIMP4 bei Patienten mit iPAH

Wie schon bekannt ist, hat sich das MMP2/TIMP4-Verhältnis als bester Prädiktor sowohl für die klinische Verschlechterung als auch für das Überleben herausgestellt. Allerdings konnte dabei beobachtet werden, dass es einige Ausreißer bei diesem Parameter gab. Deshalb wurden einige Transformationen der Daten vorgenommen, wie z. B. Wurzel-, Quadrat- und logarithmische Transformationen. Wie in Abbildung 39 ersichtlich ist, war eine Logarithmus der Parameter MMP2 und (TIMP4*1000) zur Basis 10 (\log_{10})-Transformation optimal [jeweils in ng/ml], da man hier annähernd eine Normalverteilung erhielt (vgl. Abbildung 39; (A) MMP2/TIMP4 und (B) $\log_{10}(\text{MMP2})/\log_{10}(\text{TIMP4} \cdot 1000)$).

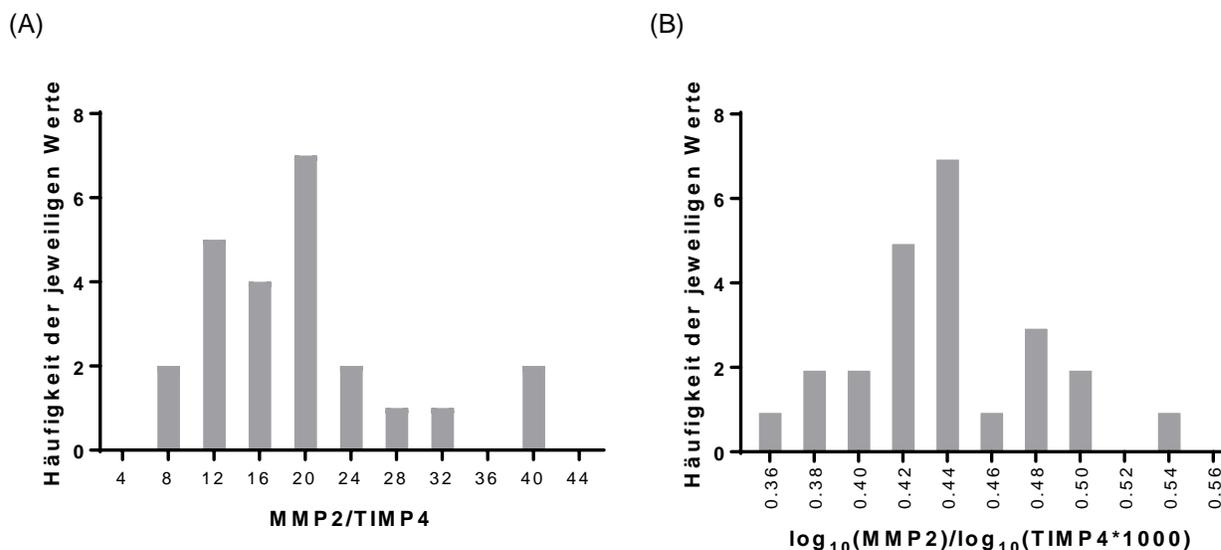


Abbildung 39 Histogramm zur Darstellung der Häufigkeiten der jeweiligen Werte von (A) MMP2/TIMP4 und (B) $\log_{10}(\text{MMP2})/\log_{10}(\text{TIMP4} \cdot 1000)$

Zur Testung der Vorhersagekraft der klinischen Verschlechterung sowie des Überlebens wurde für das \log_{10} -transformierte MMP/TIMP-Verhältnis [$\log_{10}(\text{MMP2})/\log_{10}(\text{TIMP4} \cdot 1000)$] eine ROC-Analyse durchgeführt. Auch $\log_{10}(\text{MMP2})/\log_{10}(\text{TIMP4} \cdot 1000)$ wies im Bezug auf die Vorhersage der klinischen Verschlechterung (AUC: 0,870; $p=0,01$) sowie des Überlebens (AUC: 0,944; $p=0,003$) eine sehr hohe AUC sowie ein signifikantes Ergebnis auf.

Legte man den Schwellenwert von $\log_{10}(\text{MMP2})/\log_{10}(\text{TIMP4} \cdot 1000)$ bei 0,4167 für die Vorhersage der klinischen Verschlechterung fest, erhielt man eine Sensitivität von 90,9 % und eine Spezifität von 85,7 %. Für die Vorhersage der Überlebensdauer wurde der bestmögliche Schwellenwert bei 0,4445 festgelegt, um eine Sensitivität von 100 % sowie eine Spezifität von 83,3 % zu erreichen.

3.2.4.4 Klinische Verschlechterung und Überleben bei Patienten mit PH-LHD

Prognostische Analysen im Bezug auf die klinische Verschlechterung oder Überleben wurden aufgrund der geringen Fallzahl ($n=11$) im PH-LHD-Kollektiv nicht durchgeführt.

Von den insgesamt 11 Patienten mit PH-LHD trat während des Beobachtungszeitraums bei 9 Patienten eine klinische Verschlechterung (*Clinical Worsening Ereignis*) auf (vgl. Abbildung

40). Nach 27,27 Monaten (Median) ist für die Hälfte der Patienten dieses Ereignis eingetreten.

Drei Patienten verstarben im Beobachtungszeitraum (vgl. Abbildung 41).

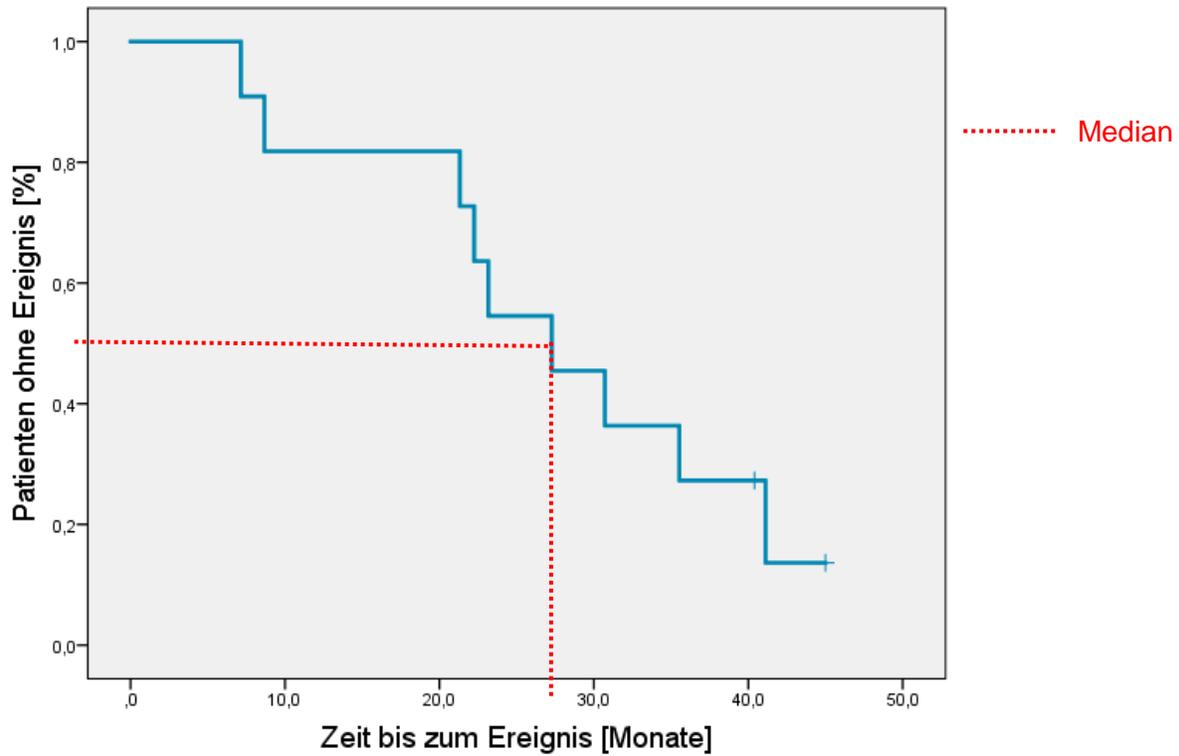


Abbildung 40 Kaplan-Meier Kurve für das Eintreten einer klinischen Verschlechterung (Ereignis) bei PH-LHD-Patienten (n=11)

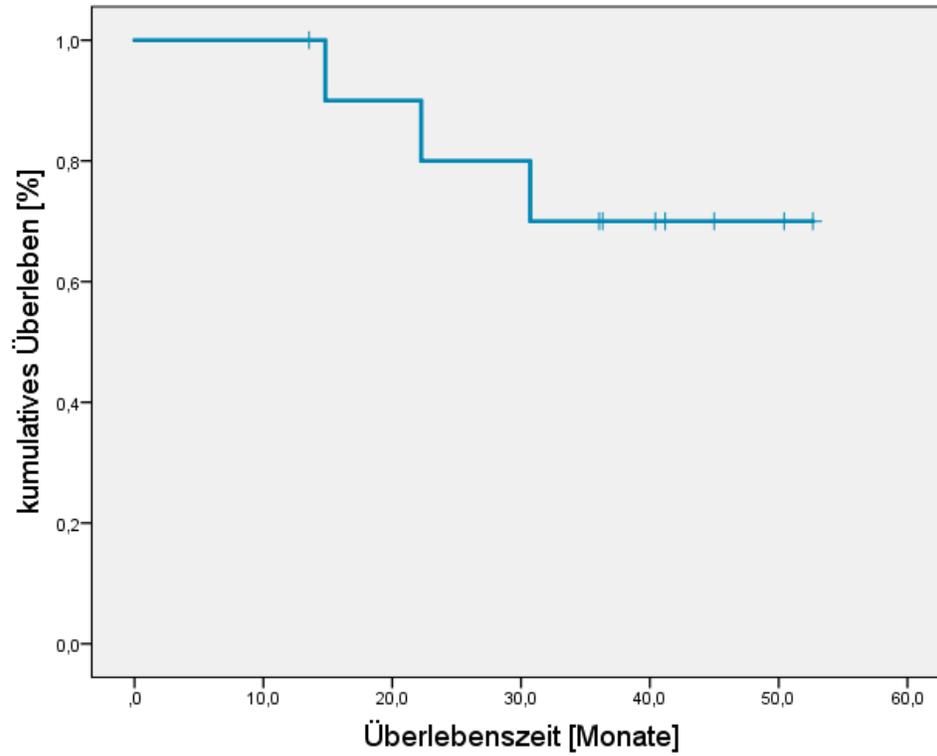


Abbildung 41 Kaplan-Meier Überlebenskurve für PH-LHD-Patienten (n=11)

4 Diskussion

4.1 Antifibrotischer Signalweg von Serelaxin am Beispiel eines murinen Nierenfibrose-Modells

4.1.1 Einfluss von Serelaxin auf die Progression der renalen Fibrose bei 7-tägiger UUU

In der vorliegenden Arbeit wurde der antifibrotische Signalweg von Serelaxin am Beispiel der Nierenfibrose untersucht und folgende Erkenntnisse gewonnen: die cGMP-Konzentrationen im fibrotischen Nierengewebe waren nach 7-tägiger Serelaxin-Behandlung erhöht. Mithilfe eines cGKI-spezifischen *knock out* Mausmodells wurde eine Beteiligung der NO-cGMP-abhängigen Proteinkinase cGKI nachgewiesen, welche den profibrotischen TGF- β -abhängigen Signaltransduktionsweg inhibierte. Durch die hemmende Wirkung auf die Smad2- und ERK1-Phosphorylierung hat Serelaxin Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie Kollagene oder Fibronectin, reduziert (siehe Abbildung 42).

Die ECM-reduzierende Wirkung von Serelaxin wurde bereits in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen unter Beweis gestellt. In *relaxin*-defizienten Mäusen entstand eine stärker ausgebildete Fibrose als in WT Mäusen. Dies wurde sowohl altersbedingt in verschiedenen Organen, unter anderem in den Nieren,¹³⁸ der Lunge¹³⁹ oder dem Herz¹³⁷ als auch im Modell der experimentell induzierten Fibrose, wie z. B. durch unilaterale Ligation des Ureters, beobachtet.¹⁴⁶ Das Ausmaß der Fibrose in *relaxin*-defizienten Mäusen war jedoch reversibel und hatte sich nach mehrtägiger Infusion von rekombinantem Relaxin wieder an das des Wildtyps angeglichen.^{138, 139, 146} Die Infusion von rekombinantem Relaxin konnte auch in diversen Nierenfibrose-Modellen, wie z. B. der renalen papillären Fibrose,¹⁴² spontan hypertensiven Ratten,¹⁴⁴ nach Entfernung von Nierengewebe¹⁴³ oder nach unilateraler Ureterligation,¹⁵¹ die antifibrotische Wirkung bestätigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Nierenfibrose mittels unilateraler Ureterligation für eine Dauer von 7 Tagen induziert. In diesem Modell kommt es typischerweise zu einer Infiltration von Makrophagen, bevor in einem weiteren Schritt die Myofibroblasten-Differenzierung aus verschiedenen Zelltypen begünstigt wird.¹⁹⁴ Innerhalb von 7 Tagen entwickelt sich eine interstitielle Fibrose mit einer Akkumulation von extrazellulärer Matrix,¹⁹⁴ welche auch in dieser Arbeit durch die Erhöhung von Fibronectin, Kollagen1A1 und Gesamtkollagen

gemessen wurde. Auch der für Myofibroblasten spezifische Marker α -SMA war signifikant erhöht. Profibrotische TGF- β -abhängige Signaltransduktions-Mechanismen sowie die Gen- und Proteinexpression diverser Proteine waren im fibrotischen Gewebe anders reguliert als im gesunden Gewebe der kontralateralen Niere. Profibrotische Zytokine, wie z. B. TGF- β oder CTGF, waren in fibrotischem Gewebe deutlich erhöht.

Das TGF- β -Signal wird unter anderem sowohl über Smad als auch über MAP-Kinasen weitergeleitet (vgl. Kapitel 1.1.2), um die Myofibroblasten-Differenzierung sowie die Gentranskription von zahlreichen, an fibrotischen Prozessen beteiligten Molekülen zu regeln.¹¹ In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten²¹²⁻²¹⁴ waren in diesem Experiment im fibrotischen Nierengewebe der Smad-abhängige Signalweg, indiziert durch erhöhte Smad2-Phosphorylierung, sowie der Smad-unabhängige, durch ERK1/2-Phosphorylierung gemessen, aktiviert.

Die Behandlung mit Serelaxin wurde gleichzeitig mit der Ligation des Ureters gestartet und für die Dauer von 7 Tagen als kontinuierliche Infusion verabreicht. Die in dieser Arbeit gewählte Dosierung von Serelaxin mit 0,5 mg/kg/d wurde bereits in verschiedenen UUO-induzierten Fibrose-Modellen verwendet.^{95, 146, 151, 155, 215} Endogene Relaxin-Spiegel in unbehandelten Tieren waren kaum detektierbar. Nach Verabreichung von rekombinantem Relaxin stiegen die Serelaxin-Konzentrationen im Plasma an, die mit therapeutischen Konzentrationen aus klinischen Studien bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz (ca. 11,2 ng/ml) vergleichbar waren. In diesem Patientenkollektiv wurde bereits eine organprotektive Wirkung von Serelaxin beobachtet.^{78, 216} Auch die cGMP-Konzentrationen waren im fibrotischen Nierengewebe erhöht und stiegen in mit Serelaxin behandelten Mäusen noch weiter an. Häufig wurde eine Beteiligung der NO-cGMP-Signaltransduktion an der antifibrotischen Wirkung in verschiedenen Organen, wie z. B. der Niere, beobachtet. Eine Erhöhung der cGMP-Konzentrationen wurde bereits durch verschiedene pharmakologische Modulatoren, z. B. Stimulatoren oder Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase oder NO-Donoren, erreicht.^{64, 217} Inhibitoren der Phosphodiesterase 5 haben ebenfalls gezeigt, dass sie ihre antifibrotische Wirkung über die gesteigerte Verfügbarkeit von cGMP vermitteln.^{218, 219}

Die cGMP-abhängige Kinase cGKI war bei Schinner et al.⁶⁴ sowie Cui et al.⁶³ ebenfalls an der cGMP-vermittelten antifibrotischen Wirkweise in einem UUO-Nierenfibrose-Modell beteiligt. Dabei zeigte die cGKI eine erhöhte Aktivität (gemessen an einer gesteigerten VASP-Phosphorylierung an Serin(239)). Eine Beteiligung dieser Kinase an der Wirkung von Serelaxin wurde in früheren Veröffentlichungen bisher noch nicht thematisiert. In dieser Arbeit

wird eine gesteigerte Aktivität der cGKI durch Serelaxin beschrieben. Außerdem blieben antifibrotische Effekte der Substanz im cGKI-KO aus. Daraus kann man schließen, dass das NO-cGMP-cGKI-Signal an der antifibrotischen Wirkweise von Serelaxin beteiligt ist.

Mäuse, denen der Relaxin-Rezeptor RXFP1 fehlte, wiesen bezüglich der Fibrose einen mit *relaxin*-defizienten Mäusen vergleichbaren Phänotyp auf.^{150, 220, 221} Dieser Rezeptor ist unter anderem in der Niere lokalisiert,^{86, 222} wo er sowohl *in vitro*¹⁵² als auch *in vivo*¹⁵⁰ in Fibroblasten und Myofibroblasten von Ratten nachgewiesen wurde. Möglicherweise wird der antifibrotische Effekt von Serelaxin über diesen Rezeptor vermittelt. Wie RXFP1 die NO-Ausschüttung begünstigt, ist bisher unbekannt. Jedoch wurde eine Beteiligung der neuronalen NO-Synthase (nNOS) in renalen Myofibroblasten diskutiert, die endotheliale NO-Synthase spielte dabei keine Rolle.^{95, 150} Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in welcher die eNOS-Expression durch die Serelaxin-Verabreichung nicht verändert wurde. Die in Endothelzellen exprimierte eNOS ist vor allem für die vasodilatative Wirkung von Relaxin verantwortlich.²²³ Dennoch kann eine Beteiligung der eNOS an der nephroprotektiven Wirkung von Serelaxin nicht ausgeschlossen werden, da die Aktivität der NO-Synthasen im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Durch erhöhte Calcium-Konzentrationen wird möglicherweise die Aktivität der Calcium-sensitiven Enzyme eNOS und nNOS gesteigert. Morisada et al.²²⁴ haben ein komplexes Zusammenspiel aller NO-Synthasen (eNOS, nNOS und iNOS) beschrieben, die einer renalen interstitiellen Fibrose entgegenwirkten.

Zusätzlich kann das Angebot von NO bzw. cGMP auch über Phosphodiesterasen, die den Abbau von cGMP begünstigen, gesteuert werden. Wie bereits in anderen Nierenfibrose-Modellen beobachtet,²²⁵ war die Expression der PDE5a und die Phosphorylierung der PDE5a an Serin(92) – einer cGKI-spezifischen Phosphorylierungsstelle²²⁶ – in fibrotischem Gewebe stark erhöht. Diese Phosphorylierung erhöht die Aktivität des Enzyms sowie die Affinität von cGMP zur allosterischen Bindungsstelle^{227, 228} und stellt somit eine Art autoregulatorischen Feedback-Mechanismus für die cGMP-Menge dar. Da es sich um eine cGKI-spezifische Phosphorylierung handelt, blieb – wie erwartet – der Behandlungseffekt im cGKI-KO-Modell nach Serelaxin-Behandlung aus. Dass die Phosphorylierung im cGKI-KO nicht komplett aufgehoben wurde, ist möglicherweise mit der Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) zu erklären.²²⁹

TGF- β ist ein wichtiger profibrotischer Mediator und in fibrotischem Gewebe verglichen zu gesundem Gewebe stark hochreguliert. Serelaxin ist in der Lage, TGF- β -Konzentrationen im

Nierengewebe zu reduzieren.¹⁴² Dem gegenüber stehen die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die Publikation von Hewitson et al.,¹⁵¹ welche über unveränderte Expressionsmuster von TGF- β in fibrotischem Nierengewebe nach Serelaxin-Verabreichung berichteten. Die profibrotischen TGF- β -Effekte werden über den Smad-abhängigen²³⁰ bzw. -unabhängigen Weg, z. B. über ERK1/2,⁵⁰ vermittelt (vgl. Kapitel 1.1.2). Suzuki et al.⁴⁹ und Piek et al.⁴⁸ belegten, dass beispielsweise die Bildung von Fibronectin über den TGF- β -abhängigen ERK1/2-Signalweg abläuft. Dieser Weg wird durch Serelaxin gehemmt, indem unter Behandlung weniger ERK1 phosphoryliert wird. Die ERK2-Phosphorylierung bleibt allerdings unverändert.

ERK1 und ERK2 sind zwei Isoformen, die in Mäusen eine 84-prozentige Sequenzhomologie aufweisen. Beide Proteine werden von MEK1/2 aktiviert und besitzen dieselbe Substratspezifität.²³¹ Beide Isoformen werden ubiquitär exprimiert, wobei ERK2 eine höhere Expression aufweist. Es gibt Hinweise darauf, dass die beiden Isoformen redundante Funktionen einnehmen.^{232, 233} Dem gegenüber steht die Meinung, dass ERK1 und ERK2 unterschiedliche Funktionen haben – beispielsweise in Hepatozyten.²³⁴ Außerdem sind *erk1*-defiziente Mäuse vital und fertil,^{235, 236} *erk2*-defiziente Mäuse sind hingegen nicht lebensfähig.²³⁷ ERK1 begünstigt vor allem das Zellüberleben, ERK2 überwiegend die Proliferation.²³⁸ Roskoski et al.²³⁹ bieten eine Zusammenfassung über die Funktionen unterschiedlicher MAP-Kinasen. Die differenzierte Funktion dieser Kinasen in verschiedenen Geweben ist jedoch unter fibrotischen Umständen noch wenig erforscht.

In Übereinstimmung mit früheren Veröffentlichungen^{150, 155} wurde in dieser Arbeit eine reduzierte Phosphorylierung des Smad2-Proteins beobachtet. Somit kam es sowohl über den Smad-abhängigen als auch den ERK1/2-abhängigen Weg zu einem verringerten TGF- β -Effekt nach Serelaxin-Gabe. Da weder die Smad2- noch die ERK1/2-Phosphorylierung durch Serelaxin im cGKI-KO gehemmt wurde, lässt sich eine Beteiligung der cGKI an der Hemmung der TGF- β -Signaltransduktion vermuten. Auch andere Arbeitsgruppen vermuten, dass eine Hemmung der ERK1-Phosphorylierung über die Bildung von cGMP reguliert wird.²⁴⁰ Dem gegenüber stehen Untersuchungen der ERK-Phosphorylierung unter dem Einfluss von Serelaxin. Hier wurde in kultivierten renalen Myofibroblasten von Ratten eine erhöhte,^{95, 150} in humanen Fibroblasten-Zelllinien eine unveränderte ERK1/2 Phosphorylierung¹⁴⁹ beobachtet. Möglicherweise besteht eine Abhängigkeit von Zelltyp oder Spezies. Chow et al.⁹⁵ und Wang et al.⁹⁴ postulierten einen RXFP1-P-ERK1/2-nNOS-NO-sGC-cGMP-abhängigen Signalweg. Da aber die ERK1-Phosphorylierung nur im WT und

nicht im cGKI-KO reduziert worden ist, wird in dieser Arbeit die ERK1/2-Phosphorylierung anders als bei Chow et al.⁹⁵ *downstream* der cGMP-abhängigen Kinase cGKI vermutet.

Die Gelatinasen MMP2 und MMP9 werden ebenfalls durch TGF- β gesteuert. Sie sind am Abbau der extrazellulären Matrix und an Remodeling-Prozessen in der Niere beteiligt. Da diese, wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben, nicht nur Matrix-degradierende Eigenschaften haben, sondern an weiteren, z. B. auch profibrotischen, Prozessen beteiligt sind, ist ihre Regulation sehr komplex. Die Literatur beschreibt unterschiedliche Regulationsmechanismen der Gelatinasen durch Serelaxin bei fibrotischen Umbauprozessen.^{95, 146, 149, 151} Ein Anstieg der MMP-Expression bzw. –Aktivität erhöht einerseits die Möglichkeit, extrazelluläre Matrix abzubauen. Andererseits stimuliert es die TGF- β -Aktivität und baut Kollagen Typ 4, den Hauptbestandteil der Basalmembran, ab. MMP2 und MMP9 haben in *in vivo* Experimenten durch den Abbau der Basalmembran die EMT begünstigt.²⁴¹⁻²⁴³ Dabei haben Tan et al.²⁴³ nachgewiesen, dass der Anstieg von MMP9 nach UUO biphasisch eintritt. Der frühe Anstieg erfolgte bis zu Tag 5, der späte erst ab Tag 11. Dies steht auch im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit (keine erhöhten MMP9 Konzentrationen in fibrotischem Gewebe verglichen mit gesundem Gewebe nach 7 Tagen). Ähnliche Ergebnisse zeigten Hewitson et al., die nach 3 Tagen noch unveränderte, nach 9 Tagen dann erst reduzierte MMP9-Konzentrationen detektierten.¹⁵¹ In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Serelaxin-Gabe das Gesamt-MMP9 kaum verändert, es wurde lediglich vermehrt latentes MMP9 in die aktive Form gespalten. Die durch Serelaxin erhöhte Verfügbarkeit von NO könnte daran beteiligt sein, pro-MMP9 in die aktive Form von MMP9 zu spalten.

Die Proteinexpression von MMP2 war in fibrotischem Nierengewebe stark erhöht. Die vermehrte MMP2-Expression wurde auch in anderen Arbeiten nach UUO detektiert.^{146, 151, 215} Es gibt Hinweise darauf, dass die Genexpression von MMP2 über die TGF- β -Signalkaskade durch Smad2 vermittelt wird.⁴⁸ Somit könnte die Abnahme der aktiven und latenten Form von MMP2 bei Serelaxin-Verabreichung durch die – wie oben erläutert – verringerte Smad2-Phosphorylierung zustande gekommen sein.

TIMP1 ist ein endogener Inhibitor der MMP2- und MMP9-Aktivität, dessen Gewebeexpression in dieser Arbeit nach UUO erhöht war. Durch die Serelaxin-Gabe wurden die TIMP1-Spiegel nicht verändert. In anderen Arbeiten wurden TIMP1-Konzentrationen sowohl *in vitro* in humanen Fibroblasten¹⁵³ als auch *in vivo* in einem experimentellen Modell der diabetischen Kardiomyopathie²⁴⁴ und der UUO¹⁵¹ gesenkt. Wie auch für MMPs bereits

beobachtet wurde, könnte auch bei der TIMP1-Regulation das Ausmaß der Fibrose bzw. die Behandlungsdauer eine Rolle spielen.

Weiterhin wurde PAI-1 untersucht, dessen Proteinexpression in der UUO hochreguliert wird.^{51, 245} Eine Überexpression von PAI-1 war bei Matsuo et al. nach 14 Tagen mit einer stärker ausgeprägten interstitiellen Fibrose assoziiert.²⁴⁵ Allerdings konnten diese in der UUO bis Tag 7 keine erhöhte Expression des Proteins detektieren – erst an Tag 14. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde kein Anstieg der PAI-1-Konzentrationen in fibrotischem Nierengewebe gegenüber gesundem Gewebe an Tag 7 nachgewiesen. Die Behandlung mit Serelaxin blieb diesbezüglich ebenfalls ohne Effekte. Da Serelaxin meist nur entsprechende Wirkung bei Dysregulationen gezeigt hat, ist hier auch kein Therapieeffekt zu erwarten.^{140, 154,}

246

Die Gentranskription von CTGF wird durch TGF- β getriggert. CTGF selbst wirkt profibrotisch und potenziert die von TGF- β ausgehenden Effekte, wohingegen gleichzeitig die renoprotektive Wirkung von BMP7 inhibiert wird. Außerdem interagiert es mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und Bestandteilen der extrazellulären Matrix, um deren Umsatz zu beeinflussen.²⁴⁷ Jedoch sind aktuell viele Fragen zu diesem profibrotischen Zytokin noch nicht beantwortet. Yokoi et al.²⁴⁸ haben analog zur vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass die CTGF-Expression in Ratten nach 7-tägiger UUO erhöht ist. Durch eine Behandlung, bei Yokoi et al. mit einem *antisense*-Oligonukleotid, konnten die CTGF-Effekte nivelliert und somit die Nierenfibrose verbessert werden. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden CTGF-Konzentrationen im fibrotischen Nierengewebe durch Serelaxin-Behandlung signifikant reduziert. Allerdings wurde im Bezug auf die CTGF-Proteinexpression kein Behandlungseffekt in der cGKI-KO Maus gezeigt, weswegen auch hier eine Beteiligung der cGKI an der Regulation des Proteins vermutet wird. Zum Einfluss von Serelaxin auf CTGF sind kaum Literatur-Daten verfügbar. Die Genexpression von CTGF blieb in renalen kortikalen Fibroblasten-Zelllinien nach Serelaxin-Gabe jedoch unverändert.¹⁵² Vermutlich sind hier die Serelaxin-Effekte auch spezies- und zeitabhängig.

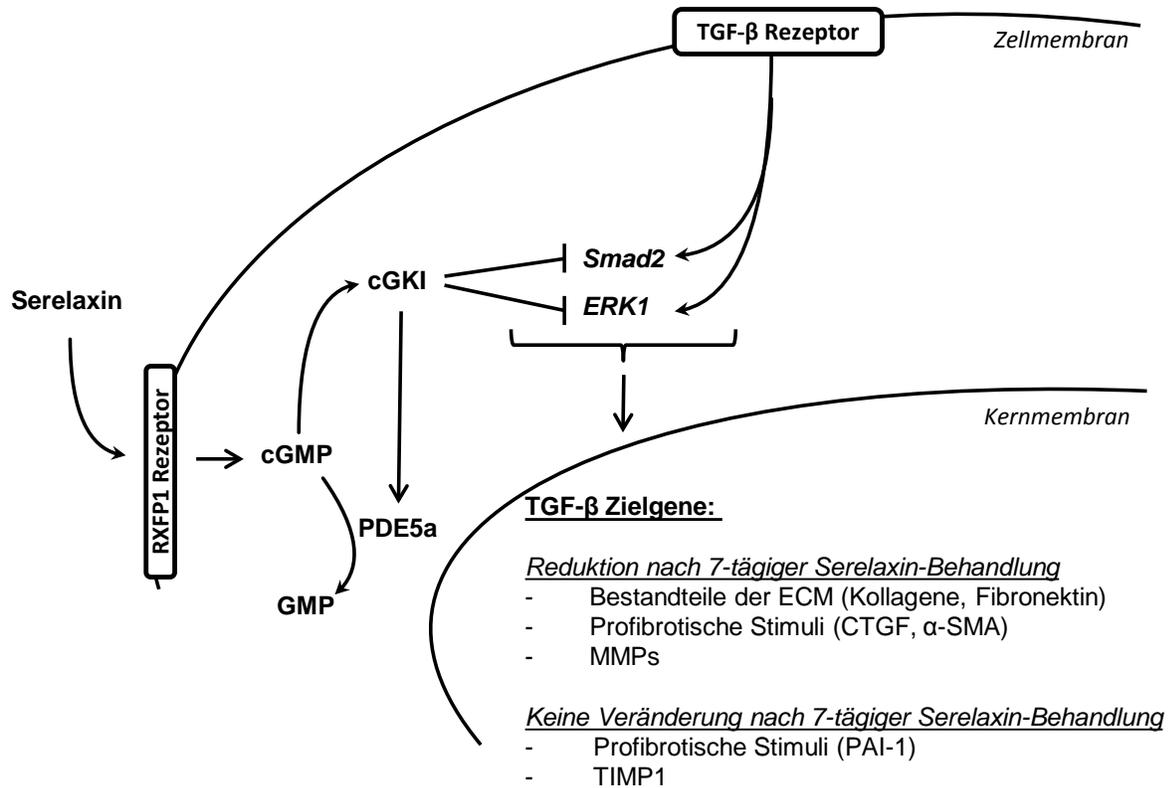


Abbildung 42 Hypothese zur antifibrotischen Signaltransduktion von Serelaxin in der Niere α -SMA – α -smooth muscle actin; cGKI – cyclic GMP-abhängige Proteinkinase I; cGMP – (zyklisches) Guanosin-Monophosphat; CTGF – connective tissue growth factor; ECM – extrazelluläre Matrix; MMP – Matrix-Metalloproteinase; PAI – plasminogen activator inhibitor; PDE5a – Phosphodiesterase 5a; RXFP1 – Relaxin Rezeptor; TGF- β – transforming growth factor- β ; TIMP – tissue inhibitor of MMPs (nach Wetzl et al.¹⁹⁵)

4.1.2 Kurzfristige (3 Tage) Effekte von Serelaxin auf die Progression der renalen Fibrose im Vergleich zur längerfristigen Behandlung (7 Tage)

Die Wirkweise von Serelaxin ist von verschiedenen Einflußfaktoren – z. B. Behandlungsdauer oder Dosis – abhängig, was Untersuchungen zum antiinflammatorischen bzw. antifibrotischen Effekt von Serelaxin gezeigt haben. Eine < 4-stündige Inkubation von dezydualen Makrophagen mit Serelaxin wirkte dabei entzündungshemmend, während eine 24-stündige Inkubation gegenteilige Effekte zeigte.^{98, 135} Hewitson et al.¹⁵¹ haben für den antifibrotischen Effekt von Serelaxin bei Mäusen mit unilateraler Ureterligation unterschiedliche Regulationen diverser Remodeling-Marker abhängig vom jeweiligen Behandlungszeitraum (3 vs. 9 Tage) beobachtet.

Im Kapitel 4.1.1 wurden die Ergebnisse nach 7-tägiger Behandlungsdauer bereits ausführlich diskutiert. Um frühzeitige Effekte von Serelaxin zu beurteilen, wurde die UUO für eine Dauer von 3 Tagen durchgeführt. Im UUO-Modell ist dieser Zeitraum für die Untersuchung kurzfristiger Effekte geeignet, da das Gewebe ab einer 72-stündigen UUO (entspricht 3 Tagen) renale fibrotische und apoptotische Veränderungen aufweist, die zur permanenten Verschlechterung der glomerulären Filtrationsrate führen.²⁴⁹

Die Serelaxin-Konzentrationen im Serum waren nach 3 und 7 Tagen mit ca. 20 ng/ml im WT und ca. 15 ng/ml im cGKI-KO nicht signifikant unterschiedlich – weder zwischen den verschiedenen Genotypen noch zwischen den Behandlungszeiträumen. Somit kann man eine konzentrationsabhängige Regulierung der Remodeling-Prozesse ausschließen.

Weiterhin muss beachtet werden, dass Serelaxin bisher überwiegend unter pathologisch veränderten Umständen pharmakologisch wirksam war. So blieben basal stattfindende Remodeling-Prozesse durch die Behandlung bisher kaum beeinflusst.^{140, 154} Ein weiteres Beispiel hierfür ist die blutdrucksenkende Eigenschaft von Serelaxin. In der RELAX-AHF Studie wurde bei Herzinsuffizienz-Patienten mit einem systolischem Blutdruck über 140 mmHg stärker gesenkt als bei Patienten, deren systolischer Blutdruckwert unter diesem Schwellenwert lag.²⁵⁰ Die glomeruläre Filtrationsrate wurde ebenfalls vor allem bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion und nicht bei gesunden Freiwilligen gesteigert.^{78, 120}

Der Myofibroblasten-Marker α -SMA war sowohl nach 3 als auch nach 7 Tagen im WT um 50-60 % erhöht, wobei seine Proteinexpression zu beiden Zeitpunkten durch die Behandlung mit Serelaxin gesenkt wurde.

Das Gesamtkollagen wies ebenfalls ein ähnliches Expressionsmuster nach 3 bzw. 7 Tagen auf. Die Zusammensetzung des Gesamtkollagens wurde hierbei nicht genauer untersucht. Es ist aber bekannt, dass die Kollagene Typ 1, 3 und 4 in fibrotischem Gewebe dominieren.⁶ Auch das Gesamtkollagen konnte bereits nach 3 Tagen stark verringert werden.

Fibronectin hingegen lag nach 3-tägiger UUO noch in geringeren Mengen als nach 7 Tagen vor (Daten nicht gezeigt), welches auch nach 3-tägiger Behandlungsdauer mit Serelaxin noch unverändert blieb. Vermutlich entfaltet Serelaxin seine Wirkung erst, sobald größere Mengen an Fibronectin vorliegen. Außerdem wird laut Suzuki et al.⁴⁹ und Piek et al.⁴⁸ die Gentranskription von Fibronectin über den Smad-unabhängigen TGF- β -Signalweg durch die Phosphorylierung von ERK1/2 gesteuert. Da nach 3-tägiger Serelaxin-Behandlung noch keine Reduktion der ERK-Phosphorylierung beobachtet werden konnte, ist auch noch kein

Effekt auf die Fibronectin-Synthese zu erwarten. Die TGF- β -Proteinexpression war durch die Serelaxin-Behandlung nach 3 Tagen ebenfalls unverändert. Die Smad2-Phosphorylierung konnte bereits nach 3-tägiger Behandlung im Vergleich zum unbehandelten Tier leicht reduziert werden. Deshalb wird vermutet, dass die TGF- β -vermittelten profibrotischen Effekte im frühen Stadium der unilateralen Ureterligation unter einer Abschwächung des Smad-abhängigen Pfades auftreten. Jedoch war die Phosphorylierung von Smad2 nicht – wie nach 7-tägiger Behandlung – signifikant reduziert. Möglicherweise wird nach 3 Tagen nur die direkte Smad2-Phosphorylierung gehemmt, die Phosphorylierung über den Crosstalk mit ERK1/2 bleibt zu diesem Zeitpunkt noch aus. Die Reduktion von α -SMA sowie Gesamtkollagen durch Serelaxin wurden nur im Wildtyp-Tier beobachtet, was darauf schließen lässt, dass bereits nach der kurzen Behandlungsdauer die cGKI eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielt.

Im Gegensatz zur 7-tägigen Behandlung blieb MMP2 im WT nach 3-tägiger Behandlungsphase durch die Serelaxin-Gabe noch unverändert. Die aktive Form von MMP9 wurde signifikant verringert, hingegen war die latente Form leicht erhöht. Da nach 7 Tagen die latente Form der MMP9 signifikant reduziert war, sind hier Aktivierungsmechanismen, wie z. B. durch NO oder Plasmin, für die Spaltung von pro-MMP9 erst zu einem späteren Zeitpunkt aktiv.

Ebenfalls blieben die CTGF-Konzentrationen nach 3-tägiger Behandlung noch unverändert. Auch in renalen kortikalen Fibroblasten-Zelllinien wurde bisher kein Einfluss auf die mRNA von CTGF nach Serelaxin-Gabe beobachtet.¹⁵² Da nach 7-tägiger Serelaxin-Behandlung eine Reduktion der CTGF-Proteinexpression beobachtet wurde, ist möglicherweise die Relaxin-vermittelte CTGF-Senkung erst nach längerer Verabreichung bzw. bei einer schwerwiegenderen Nierenfibrose gegeben. Ein Zusammenhang zwischen CTGF und der davon begünstigten ERK1/2-Phosphorylierung wird hier sichtbar, da nach 3 Tagen die CTGF-Proteinexpression sowie die ERK1/2-Phosphorylierung unverändert blieben, während nach 7 Tagen beides in geringerer Konzentration vorlag.

PAI-1 sowie TIMP1 waren nach 3 Tagen mit Behandlung verglichen mit den unbehandelten Kontroll-Mäusen nicht statistisch signifikant verändert. Da auch nach 7 Tagen kein Behandlungseffekt durch Serelaxin beobachtet werden konnte, scheinen diese Marker in der antifibrotischen Regulation von Serelaxin eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Abbildung 43 zeigt einen hypothetischen Signaltransduktionsweg für Serelaxin nach der 3-tägigen Behandlung in der durch UO induzierten Nierenfibrose. Rot markiert sind dabei veränderte Regulationen im Vergleich zur 7-tägigen Behandlung.

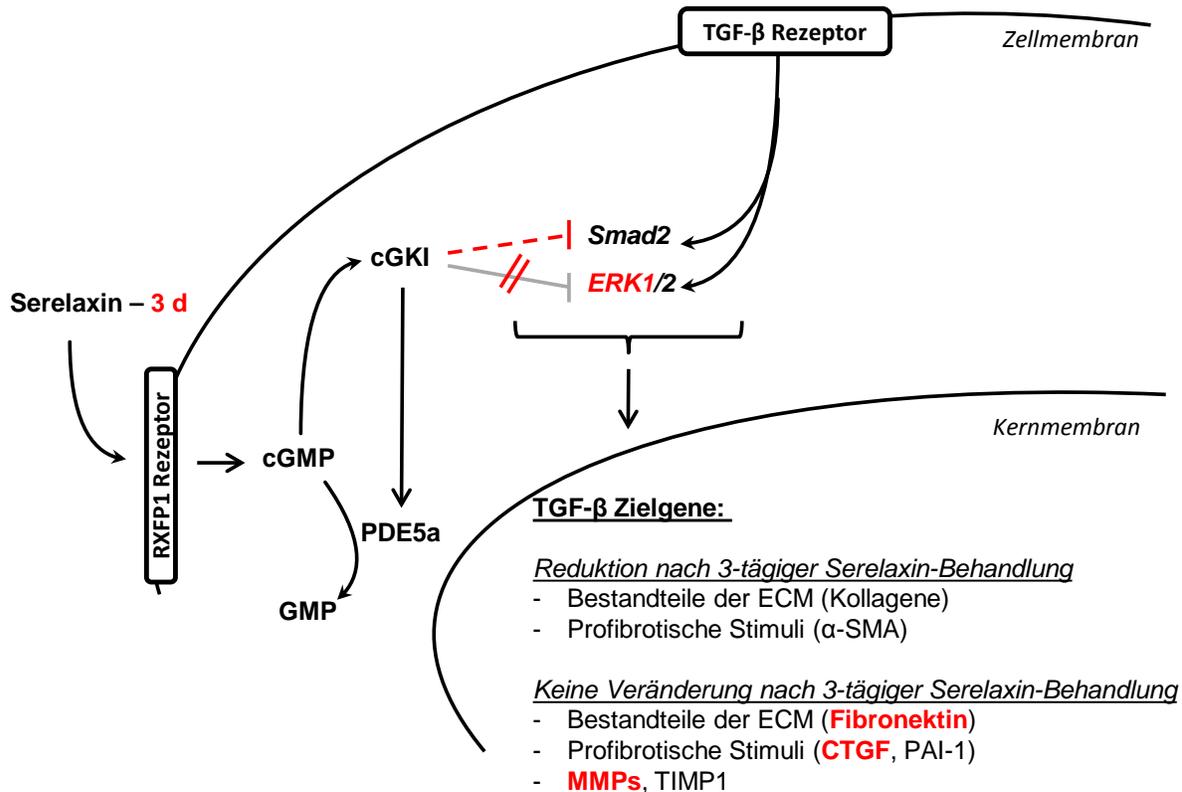


Abbildung 43 Hypothese zur kurzfristigen antifibrotischen Signaltransduktion von Serelaxin (nach 3-tägiger Behandlung) in der Niere (rot markiert sind veränderte Regulationen im Vergleich zu 7-tägiger Behandlung) α-SMA – α-smooth muscle actin; cGKI – cyclic GMP-abhängige Proteinkinase I; ©GMP – (zyklisches) Guanosin-Monophosphat; CTGF – connective tissue growth factor; ECM – extrazelluläre Matrix; MMP – Matrix-Metalloproteinase; PAI – plasminogen activator inhibitor; PDE5a – Phosphodiesterase 5a; RXFP1 – Relaxin Rezeptor; TGF-β – transforming growth factor-β; TIMP – tissue inhibitor of MMPs

4.1.3 Pharmakotherapeutische Modulation von cGMP – Vergleich von Serelaxin und Zaprinast in der Progression der renalen Fibrose

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl Serelaxin und Zaprinast, ein Inhibitor der Phosphodiesterase 5a, als auch die Kombination aus beiden Behandlungen ähnliche Effekte auf die Akkumulation der extrazellulären Matrix haben. Dennoch weisen

diese beiden Substanzen Unterschiede hinsichtlich ihrer Signaltransduktion auf, die im Folgenden diskutiert werden.

Es handelt sich hierbei um zwei Substanzen, die auf unterschiedliche Weise eine Erhöhung der cGMP-Konzentrationen erreichen.⁹⁹ Um den Effekt zweier Substanzen vergleichen zu können, dürfen auch die verwendeten Dosierungen nicht außer Acht gelassen werden. Die Dosierungen wurden nach ausführlicher Literatur-Recherche ausgewählt. Serelaxin hat bei 0,5 mg/kg/d seine antifibrotische Wirkung über die NO-cGMP-Achse bereits in anderen Experimenten gezeigt.^{95, 146, 151, 155, 215} Zaprinast hat im gewählten Dosisbereich den Anstieg von cGMP ohne signifikante Blutdrucksenkung gezeigt.²⁵¹

Serelaxin bewirkt über seinen Rezeptor RXFP1 sowie NO und die lösliche Guanylatzyklase, Zaprinast über die Inhibition der Phosphodiesterase 5 eine Erhöhung des *second messengers* cGMP. Sowohl RXFP1 als auch die PDE5 sind in der Niere lokalisiert.^{86, 252} Wie zu erwarten war, wurden in diesem Experiment die cGMP-Konzentrationen im fibrotischen Nierengewebe signifikant erhöht. Während diese in Mäusen mit Serelaxin-Behandlung und der Kombinations-Behandlung vergleichbar waren, stieg die Konzentration in mit Zaprinast behandelten Mäusen um fast das Doppelte an, was auf die unterschiedliche Verabreichung der Pharmaka zurückzuführen ist. Während für Serelaxin durch die kontinuierliche Verabreichung über osmotische Minipumpen konstante Konzentrationen erreicht wurden, erfolgte die Gewebeentnahme bei Mäusen mit Zaprinast-Behandlung ca. 90 Minuten nach der Bolus-Injektion der gesamten Tagesdosis. Dies erklärt jedoch noch nicht die signifikant reduzierten cGMP-Konzentrationen bei der Verabreichung von Zaprinast und Serelaxin als Kombinationstherapie im Vergleich zu Zaprinast als Monotherapie. Hier muss beachtet werden, dass durch die Serelaxin-Behandlung sowohl die Expression als auch die Aktivität (indiziert durch die Phosphorylierung) der PDE5a gesteigert wurde, was zu einem erhöhten Abbau von cGMP führte.

Höhere cGMP-Konzentrationen, wie sie in der Zaprinast-Behandlungsgruppe aufgetreten sind, sind in der Lage, neben den cGMP-abhängigen Kinasen – u.a. cGKI – auch die Proteinkinase A zu aktivieren.²⁵³ Tatsächlich wurden im Gegensatz zur Serelaxin-Gruppe in mit Zaprinast behandelten Tieren auch eine antifibrotische Wirkung im cGKI-KO beobachtet (Fibronectin, Kollagen1A1 und Gesamtkollagen). Aber auch in den Mäusen, denen beide Medikamente verabreicht worden sind, konnten antifibrotische Effekte im cGKI-KO für Fibronectin, Kollagen1A1 und Gesamtkollagen beobachtet werden, obwohl hier die cGMP-Konzentration mit dieser der Serelaxin-Gruppe vergleichbar war. Also können diese Effekte

nicht nur aufgrund der erhöhten cGMP-Spiegel auftreten. Zaprinast ist zusätzlich in der Lage, andere Phosphodiesterasen in Ihrer Aktivität zu hemmen, beispielsweise PDE1, PDE6, PDE9 und PDE11. PDE1 sowie PDE11 werden in der Niere exprimiert und unterstützen sowohl den cGMP als auch den cAMP-Abbau.^{254, 255} Der antifibrotische Effekt von Zaprinast und der Kombination aus beiden Behandlungen wird demzufolge möglicherweise neben der Beteiligung der cGMP-abhängigen cGKI über die PKA vermittelt. Schinner et al.⁹⁹ haben einen Review zu zyklischen Nucleotiden in der Nierenfibrose verfasst, der auch einen inhibierenden Effekt der PKA auf die TGF- β -vermittelte Gentranskription in der Fibrose beschreibt. Die TGF- β -Proteinexpression war in keiner der antifibrotisch wirksamen Behandlungsoptionen reduziert, für Zaprinast sogar signifikant erhöht. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte das erhöhte Angebot an aktivem MMP2 und MMP9 sein, welches in der Lage ist, latentes TGF- β in die aktive Form zu spalten. In dieser Arbeit wurden die aktiven Homodimere (bei 24 kDa) quantifiziert. Unter Zaprinast oder Kombination aus beiden Pharmaka ist weder die Proteinexpression von aktivem MMP2 noch die Aktivität von MMP9 gesenkt worden.

Mit dem PDE5-Inhibitor Sildenafil konnte gezeigt werden, dass die Proteinexpression von Matrix-Metalloproteinase 2 in glatten Gefäßmuskelzellen der Pulmonalarterie gesenkt wurde, indem es über die cGMP-cGKI zu einer verminderten Aktivierung der RhoA und somit der verringerten Proteinexpression von MMP2 kommt.²⁵⁶ Eine Beteiligung der ERK1/2 MAP-Kinase wurde hier ebenfalls diskutiert.²⁵⁷ Die Expression bzw. Aktivität von RhoA wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Weiterhin können die Ergebnisse, welche für den PDE5-Inhibitor Sildenafil beschrieben worden sind, nicht ohne Weiteres auf die Wirkweise von Zaprinast – einer Vorläufer-Substanz des Sildenafil – übertragen werden. Zu Zaprinast liegen in der Literatur keine Daten vor, welche die vorliegenden Ergebnisse untermauern bzw. diesen widersprechen.

TGF- β überträgt seine Wirkung über einen Smad-abhängigen bzw. –unabhängigen Signalweg. Während Serelaxin die Smad2- und die ERK1-Phosphorylierung inhibiert (wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben), wirkt Zaprinast und die Kombination aus Serelaxin und Zaprinast über eine Reduktion der ERK1- und ERK2-Phosphorylierung hemmend auf die TGF- β -Signalübertragung – ohne Einfluss auf den Smad-abhängigen Weg. Für Zaprinast waren bislang keine Daten bekannt, die dessen Beeinflussung des TGF- β -Signalweges beschreiben. Takimoto et al.²⁵⁸ und Kiss et al.²⁵⁹ wiesen für den PDE5-Inhibitor Sildenafil ebenfalls eine reduzierte ERK1/2-Phosphorylierung nach, welche mit der antifibrotischen

Wirkung dieser Substanz assoziiert war. Cui et al.⁶³ haben eine reduzierte Proteinexpression von TGF- β sowie verminderte Smad2-Phosphorylierung in einem UUO-Modell nach Behandlung mit dem PDE5-Inhibitor Sildenafil nachgewiesen. Allerdings wurde die UUO für einen Zeitraum von 14 Tagen und nicht wie im Rahmen dieser Arbeit für die Dauer von 7 Tagen durchgeführt. Diese Zeitspannen können in diesem schnell progressiven Fibrose-Modell nur sehr begrenzt miteinander verglichen werden. Auch Hohenstein et al.²²⁵ haben für Vardenafil, einen weiteren PDE5-Inhibitor, in einem Nephritis-Modell ebenfalls eine reduzierte Smad2/3-Phosphorylierung nachgewiesen.

Da die Protein-Expression von CTGF sowohl über den Smad-abhängigen als auch über den Smad-unabhängigen Weg beeinflusst wird,³⁵ sieht man nur eine Reduktion der CTGF-Proteinexpression in Tieren nach Serelaxin-Behandlung. Weder bei Zaprinast noch bei Kombinationstherapie konnte eine Reduktion der Smad2-Phosphorylierung gezeigt werden, wodurch dann auch keine verringerte CTGF-Proteinexpression folgte.

Zusammenfassend waren die antifibrotischen Effekte von Serelaxin und Zaprinast im UUO-Modell vergleichbar. Die Kombination der beiden cGMP-erhöhenden Therapieoptionen war nicht wirksamer als die Einzelsubstanzen. Dies lässt darauf schließen, dass die Proteinkinase cGKI bereits vollständig durch die Verabreichung von einer Substanz ihre antifibrotische Wirkung vermittelt.

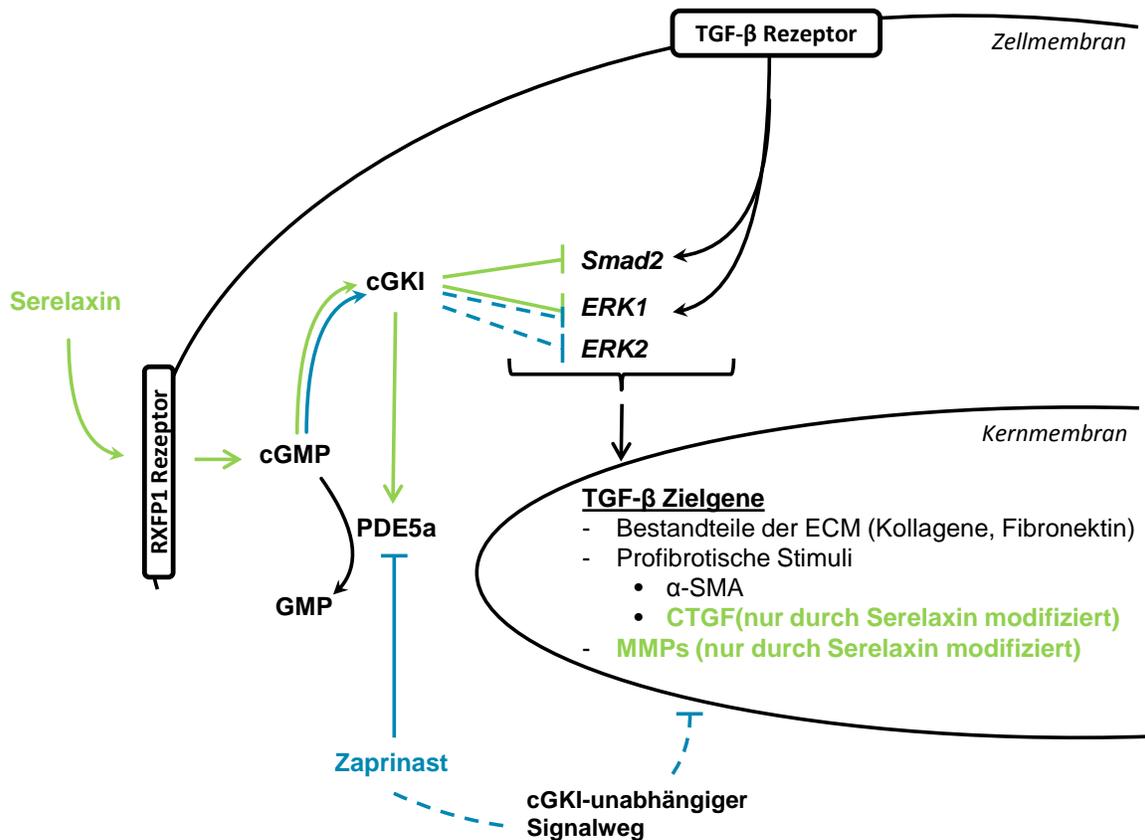


Abbildung 44 Hypothese zur antifibrotischen Signaltransduktion von Serelaxin (grün) und Zaprinast (blau) nach 7-tägiger Behandlung in der Niere α -SMA – α -smooth muscle actin; cGKI – cyclic GMP-abhängige Proteinkinase I; ©GMP – (zyklisches) Guanosin-Monophosphat; CTGF – connective tissue growth factor; ECM – extrazelluläre Matrix; MMP – Matrix-Metalloproteinase; PAI – plasminogen activator inhibitor; PDE5a – Phosphodiesterase 5a; RXFP1 – Relaxin Rezeptor; TGF- β – transforming growth factor- β ; TIMP – tissue inhibitor of MMPs

4.1.4 Einfluss von Serelaxin auf die Nierenfunktion während der Progression der renalen Fibrose

4.1.4.1 Entwicklung der Analysen-Methode

Die Konzentrationen von Kreatinin im Serum und die Kreatininclearance sind klinisch-chemische Routineparameter zur Charakterisierung der Nierenfunktion sowohl bei Menschen als auch bei Versuchstieren.²⁶⁰ In der klinischen Chemie wird Kreatinin mit Hilfe der Jaffé-Reaktion oder enzymatischer Methoden bestimmt, die beim Menschen hinreichend richtige Werte ergeben, obwohl neue Vergleichsuntersuchungen mit der HPLC zeigen, dass es bei

Patienten häufiger zu Interferenzen kommt, sowohl bei der Jaffé- als auch bei enzymatischen Methoden.^{261, 262}

Obwohl bereits 1985 gefordert wurde, Kreatinin in Serum oder Plasma von Mäusen mit Hilfe der HPLC zu bestimmen, weil die Konzentrationen mit der photometrischen Jaffé-Reaktion um ein Mehrfaches falsch hoch liegen, wurde die Jaffé-Reaktion auch in den letzten Jahren noch in Publikationen angewendet^{263, 264} – möglicherweise weil viele Autoanalyser in der klinischen Chemie die Jaffé-Reaktion bis heute nutzen.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit die HPLC als Bestimmungsmethode gewählt. Das Trennsystem mit dem stark sauren Kationenaustauscher erwies sich als überlegen gegenüber gebräuchlicheren C18-Materialien, insbesondere im Hinblick auf die Selektivität im Vergleich zu reversed-phase oder auch HILIC-Materialien (F. Kees, persönliche Mitteilung).

Die Probenvorbereitung der anfangs benutzten, bereits in der Literatur beschriebenen Methode²⁰⁶⁻²⁰⁸ beinhaltet einen Eindampfschritt und ist dadurch zeitaufwendiger. Zudem wurde auch ein breiter Zusatzpeak in den Chromatogrammen gefunden, der im Laufe der Analysen mit der Bestimmung von Kreatinin interferierte. Diese Interferenz soll nach Literaturangaben nur beobachtet werden, wenn das Serum mit einer Mischung aus Acetonitril/ 1 % Salz- oder Essigsäure und nicht nur mit Acetonitril enteivweißt wird,²⁰⁶ was in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Das Ionenaustauschermaterial reagiert aber sehr empfindlich auf Änderungen der Ionenstärke (vgl. Abb. Abbildung 25), sodass die unterschiedlichen Erfahrungen auf leichte Änderungen in der mobilen Phase zurückzuführen sind. Eine Lösung des Problems ergab sich durch den Wechsel der mobilen Phase von 0.1 M Phosphatpuffer auf 5 mM Acetatpuffer, wobei bemerkt werden muss, dass der Acetatpuffer schon bei Dunn et al.²⁰⁷ beschrieben wurde. Leider fehlen dort die Angaben zum Anteil Acetonitril, sodass beim Nacharbeiten der Methode Kreatinin zunächst überhaupt nicht nachgewiesen werden konnte, weil es offensichtlich nicht von der Säule eluierte. Der in der vorliegenden Arbeit nun neu entwickelte Eluent gestattete die empfindliche, präzise Bestimmung von Kreatinin in Mausserum aus 5-10 µl Serum. Die vereinfachte Probenvorbereitung durch alleinige Enteivweißung des Serums mit Perchlorsäure mit quantitativer Wiederfindung ist nicht nur schneller als die in der Literatur beschriebene Methode,^{206, 207} sondern erübrigt auch die Verwendung eines internen Standards. Diese einfache HPLC-Methode mit photometrischer Detektion kann erfolgreich mit HPLC-Methoden mit massenspektrometrischer Detektion²⁶² konkurrieren.

4.1.4.2 Einfluss von Serelaxin auf das Serumkreatinin

Zur Bestimmung der Funktionsfähigkeit der menschlichen Niere wird häufig die glomeruläre Filtrationsrate abgeschätzt, welche näherungsweise mit der Kreatinin-Clearance gleichzusetzen ist. Die glomeruläre Filtrationsrate errechnet sich aus dem Serumkreatinin sowie weiteren patientenindividuellen Parametern (z.B. Gewicht, Alter, Hautfarbe). Bei den Mäusen wurde in der vorliegenden Arbeit die Kreatinin-Konzentration im Serum bestimmt, eine einfachere Methode zur Abschätzung der Nierenfunktion. Die Bestimmung der Kreatinin-Clearance, verbunden mit Platzierung der Tiere im Stoffwechsellkäfig für die Urinsammlung, ist wesentlich aufwendiger und bringt keinen erheblichen Vorteil.

Während beim Menschen das Kreatinin fast ausschließlich glomerulär filtriert wird, trägt in der Maus die tubuläre Sekretion, welche unter pathologischen Bedingungen sogar noch erhöht ist, maßgeblich zur Ausscheidung von Kreatinin bei.²⁶⁵ In dieser Arbeit wurden signifikant erhöhte Kreatinin-Konzentrationen nach 7-tägiger UUO detektiert. Selbiges wurde in diversen Arbeiten nach Induktion einer UUO ebenfalls nachgewiesen.²⁶⁶⁻²⁷⁰ Die hier als erhöht beschriebenen Serumkreatinin-Konzentrationen liegen aber noch unter den Normalwerten der eben zitierten Arbeiten, in welchen Kreatinin mithilfe enzymatischer Reaktionen bzw. der Jaffé-Reaktion bestimmt wurde. Sowohl bei der Jaffé- als auch bei der enzymatischen Kreatinin-Bestimmung kann es zu falsch hohen Messwerten auf Grund von Interferenzen mit anderen Proteinen oder Glucose kommen.²⁶⁵ Daraus könnte man folgern, dass die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Veränderungen nur durch die hochempfindliche HPLC-Methode nachgewiesen werden konnten. Während der Behandlung mit Serelaxin stieg wohl das Serumkreatinin nach 3 Tagen an, wurde aber nach 7 Tagen Ureterligation wieder signifikant reduziert, was als eine Verbesserung der Nierenfunktion interpretiert werden kann. Verringerte Serumkreatinin-Konzentrationen wurden nach Serelaxin-Verabreichung auch bereits bei *Relaxin-knock out* Mäusen¹³⁸ sowie in einem murinen Model mit einer Erkrankung der glomerulären Basalmembran¹⁴¹ beobachtet. Andererseits sind für Serelaxin auch bei anderen Prozessen, z. B. bei Entzündungsvorgängen, durchaus zeit- und dosisabhängig konträre Wirkungen beschrieben worden.^{98, 135, 136} Möglicherweise spielen frühe Inflammationsprozesse eine Rolle für die nach 3 Tagen erhöhten Kreatinin-Konzentrationen im Serum. Ob die nach 7-tägiger Behandlung verringerte Kreatinin-Konzentration auf die vasodilatative Wirkung von Serelaxin zurückzuführen ist, welche einen erhöhten renalen Plasmafluss und eine verbesserte glomeruläre Filtrationsrate der gesunden kontralateralen Niere bewirkt, oder ob sie aufgrund des antifibrotischen Effektes und der damit verbundenen

strukturellen Veränderungen in der UO-Niere zustande kommt, wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Im Gegensatz zur Serelaxin-Behandlung konnte mit Zaprinast die Konzentration des Serumkreatinins nach 7-tägiger Behandlung nicht reduziert werden. Möglicherweise spielen hierbei zusätzlich zur antifibrotischen Wirkung von Serelaxin auch dessen antiinflammatorische, antiapoptotische, antioxidative und angiogene Effekte eine Rolle, die sich positiv auf die Nierenfunktion auswirken (vgl. Kapitel 1.2.4). Warum allerdings eine Reduktion des Serumkreatinins durch die Kombination aus Serelaxin und Zaprinast ausblieb, wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Möglicherweise spielen hier auch weitere pharmakologische Wirkungen von Serelaxin eine Rolle, denen Zaprinast möglicherweise entgegen wirkt.

4.1.5 Die Modulation des zyklischen Nukleotids cGMP bei fibrotischen Erkrankungen

Das zyklische Nukleotid cGMP ist sowohl in klinischen als auch präklinischen Experimenten während fibrotischer Umbauprozesse erhöht. *In vivo* und *in vitro* Experimente zeigten, dass cGMP in der Therapie der Fibrose eine wichtige Rolle spielt, da über die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase I die TGF- β -Signaltransduktion gehemmt wird.⁶²⁻⁶⁴ Auch in der pulmonalen Hypertonie sind cGMP-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht^{271, 272} und korrelieren zugleich mit dem pulmonalvaskulären Widerstand (PVR).²⁷³

Eine Möglichkeit zur Therapie der pulmonalarteriellen Hypertonie ist die Erhöhung von cGMP durch Pharmaka, wie z. B. Phosphodiesterase-5-Inhibitoren. Phosphodiesterase-5-Hemmer sind eine Wirkstoff-Klasse, welche in der Monotherapie von Patienten mit WHO-Schweregrad II oder III eine 1A bzw. 1B Empfehlung in der europäischen ESC/ERS-Leitlinie aufweist.¹⁶⁴ Hierdurch wird durch eine Vasodilatation in Lungengefäßen sowie durch die antifibrotische Wirkung auf das vaskuläre Remodeling das Fortschreiten der Erkrankung verzögert. Diese Substanzklasse zeigte in dem präklinischen Nierenfibrose-Modell in der vorliegenden Arbeit ähnliche antifibrotische Eigenschaften wie Serelaxin. Außerdem erhöhte es – ähnlich wie Serelaxin – signifikant die cGMP-Konzentrationen in fibrotischem Gewebe. Durch die Modulation weiterer Signalwege ist Serelaxin darüber hinaus antioxidativ, antiinflammatorisch und angiogen wirksam (vgl. Kapitel 1.2). Allerdings gibt es mit Iloprost auch ein PAH-

Therapeutikum, das nicht direkt über die Modulation von cGMP wirkt. Hier wurde sogar eine rasche Abnahme der cGMP-Konzentration bei Patienten mit PAH beobachtet, was hier auf die Reduktion der natriuretischen Peptide im Blut zurückzuführen ist.²⁷²

4.2 Fibrose-assoziierte Biomarker als prognostische Biomarker in der pulmonalen Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie ist durch vaskuläres Remodeling charakterisiert, welches zu einem Anstieg der pulmonalvaskulären Drücke führt. Infolgedessen wird die Nachlast am rechten Herzen erhöht, was das kardiale Remodeling verursacht. Aufgrund des hohen Leidensdrucks, der raschen Krankheitsprogression und der invasiven Verlaufskontrolle durch den Rechtsherzkatheter, ist es umso wichtiger, einen weniger invasiv messbaren prädiktiven Parameter zu evaluieren, welcher zur Verlaufskontrolle der Patienten mit pulmonaler Hypertonie geeignet ist und im besten Fall mit dem Risiko eines Rechtsherzversagen in dieser Patienten-Population assoziiert ist.

Mithilfe dieser retrospektiven Datenanalyse wurde ermittelt, ob Fibrose-assoziierte Biomarker, wie z. B. MMP/TIMP-Verhältnisse, in der pulmonalen Hypertonie hinsichtlich ihrer prognostischen Wertigkeit von klinischer Relevanz sind.

4.2.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Die untersuchten Patienten sind Teil des von Tiede et al.²⁷⁴ untersuchten Kollektivs, welche MMP2, MMP9, TIMP1 sowie TIMP4 bei Diagnosestellung bereits früher evaluiert haben. Darauf aufbauend sind in dieser Arbeit Patienten mit der Diagnose einer iPAH oder PH-LHD enthalten, für welche mindestens eine Rechtsherzkatheter-Untersuchung bei einer Nachfolge-Untersuchung vorlag.

Insgesamt konnten 35 Patienten in die Analyse eingeschlossen werden, 24 davon mit einer idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie (iPAH) und 11 mit pulmonaler Hypertonie aufgrund einer Linksherzinsuffizienz (PH-LHD). Einerseits liegt hier eine pulmonale präkapilläre Erkrankung vor (iPAH), bei welcher es vor allem zu einer Schädigung des rechten Herzens kommt. Andererseits werden Patienten mit pulmonaler Hypertonie, welche sich aufgrund einer Linksherzinsuffizienz entwickelt hat, näher betrachtet (PH-LHD).

In beiden Kollektiven wurde ein erhöhter mittlerer pulmonalarterieller Druck (mPAP > 25 mmHg) gemessen. Laut Literatur liegt bei gesunden Menschen der mPAP bei 14 mmHg mit einer Obergrenze von 20 mmHg.²⁷⁵ Für die pulmonale Hypertonie wird laut ESC/ERS Guidelines¹⁶⁴ ein mPAP \geq 25 mmHg in Ruhe definiert.

Hämodynamisch konnten die beiden Formen der pulmonalen Hypertonie aufgrund ihres PAWP unterschieden werden. Der PAWP ist ein Maß für die Druckverhältnisse im linken Vorhof. Die pulmonalarterielle Hypertonie, zu welcher die iPAH zählt, wird durch einen PAWP < 15 mmHg definiert, während Patienten mit PH-LHD, resultierend aus einer Dysfunktion des linken Herzens, durch einen PAWP > 15 mmHg charakterisiert werden. Wie somit zu erwarten war, unterschieden sich die Kollektive zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (V1) hinsichtlich des PAWP signifikant. Allerdings lag der mittlere PAWP der PH-LHD-Patienten unter 15 mmHg. Der für diese Erkrankung ungewöhnlich niedrige Wert des PAWPs war auf wenige Patienten zurückzuführen, die trotz bestehender PH-LHD zum Zeitpunkt der Messung einen normalen PAWP aufwiesen. Der PAWP kann z. B. durch forcierte Diurese bei Patienten mit Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion kurzzeitig abgesenkt werden.²⁷⁶ Die Patienten, für welche die linksventrikuläre Ejektionsfraktion dokumentiert worden ist, wiesen eine Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion auf. Außerdem wird angenommen, dass es sich überwiegend um Patienten mit einer kombinierten prä- und postkapillären pulmonalen Hypertonie handelt, da der pulmonalvaskuläre Widerstand über 3 Wood Units (entspricht ca. 240 dyn*sec/cm⁵) lag.¹⁶⁴

Weitere Baseline-Parameter sind typisch für das untersuchte Patientenkollektiv: bei Diagnosestellung waren die iPAH-Patienten bzgl. Alter, Schweregrad und Hämodynamik ungefähr mit den von Hoepfer et al.¹⁷⁵ veröffentlichten epidemiologischen Daten aus dem PH Register COMPERA vergleichbar. Für Patienten mit PH-LHD sind keine vergleichbaren Register-Daten bekannt. Die Geschlechterverteilung war nahezu ausgeglichen, das Alter der Patienten lag zwischen 27 und 85 Jahren in der iPAH sowie zwischen 55 und 70 Jahren in der PH-LHD.

Es wurde keine Medikation in die Auswertung einbezogen – einerseits aufgrund der geringen Fallzahl und andererseits aufgrund der heterogen verteilten Behandlungsmöglichkeiten. Der Zeitraum für die Patientenrekrutierung umfasste eine Zeitspanne von mehr als 10 Jahren, in denen Leitlinien aktualisiert, sowie neue Arzneimittel in dieser Indikation klinisch getestet und zugelassen worden sind. Die Medikation per se stellt keinen Prädiktor für Überleben bzw. klinische Verschlechterung dar, sollte jedoch indirekt die Risikofaktoren modifizieren, welche den Krankheitsverlauf, die Prognose sowie das klinische Erscheinungsbild widerspiegeln.

Aufgrund der unterschiedlichen Ätiologien war es sinnvoll, diese beiden Patientenkollektive getrennt voneinander auszuwerten, was jedoch mit einer Reduktion der Fallzahlen in den einzelnen Gruppen einherging und somit die statistische Aussagekraft reduzierte. Deshalb

war es im Rahmen dieser Analyse möglich, Hypothesen zu generieren, welche aber für konfirmatorische Aussagen weitere Forschungstätigkeiten auf diesem Gebiet erforderlich machen.

4.2.2 Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren bei kardiovaskulären Erkrankungen

Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren (TIMPs) wurden in der Literatur bereits häufig bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen, wie z. B. dem Myokardinfarkt, ischämischen Herzerkrankungen, Diabetes mellitus und Hypertonie als wichtige Biomarker beschrieben.²⁷⁷ Die kardiale und pulmonale Lokalisation der Gelatinasen MMP2 und MMP9 sowie TIMP1 wurde nachgewiesen, wobei es sich bei TIMP4 unter physiologischen Bedingungen um einen Biomarker mit überwiegend kardialer Expression handelt.^{60, 186} In der idiopathischen pulmonalen Fibrose konnte TIMP4 jedoch auch in pulmonalem Gewebe detektiert werden.⁶¹

Da diese Marker aber in vielen verschiedenen Organen, wie z. B. Lunge, Leber oder Niere,⁵⁵ eine wichtige Rolle spielen, ist ihre diagnostische Bedeutung gering. Tiede et al.²⁷⁴ haben diese Marker in Patienten erhoben, bei denen nach Auswertung der Rechtsherzkatheter-Untersuchung eine pulmonale Hypertonie ausgeschlossen worden ist. Auch hier war kein Unterschied der Plasma-Konzentrationen im Vergleich zu Patienten mit PH detektierbar. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag deswegen auf der Beurteilung des prognostischen Wertes oder der Veränderung während des Krankheitsverlaufs.

Auch in der pulmonalarteriellen Hypertonie, welche mit Remodeling-Prozessen sowohl in der Lunge als auch im Herz einhergeht, ist in der Literatur eine Erhöhung von MMP2, MMP9, TIMP1 und/ oder TIMP4 im Plasma sowie Urin verglichen mit gesunden Kontrollkollektiven beobachtet worden.^{187-189, 278} Zu Patienten mit pulmonaler Hypertonie aufgrund einer Linksherzinsuffizienz gibt es bisher wenige Informationen bezüglich dieser Biomarker, jedoch wurden erhöhte Spiegel von MMP2 bei Patienten mit Herzinsuffizienz in Verbindung mit pulmonaler Hypertonie im Vergleich zu hypertonen Patienten beschrieben.²⁷⁹ Aufgrund der erhöhten Biomarker-Werte im iPAH-Kollektiv und der fehlenden Signifikanz bei den Biomarker-Konzentrationen zwischen iPAH und PH-LHD, wurde auch in der PH-LHD eine Erhöhung aller untersuchten Fibrose-assoziierten Biomarker angenommen. Da die Blutproben aus der vorliegenden Arbeit während einer Rechtsherzkatheteruntersuchung aus

der Pulmonalarterie entnommen worden sind, waren in diesem Experiment keine Plasmaproben gesunder Probanden verfügbar.

Erste Hinweise existieren bereits, dass diese Biomarker mit dem Krankheitsverlauf assoziiert sind. Interessanterweise wurden diese Marker bereits im frühen Stadium der Krankheit verändert – zu einem Zeitpunkt, als bereits Remodeling stattfand, jedoch die Herzfunktion noch nicht eingeschränkt war. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz aufgrund einer Aortenstenose wurden im Myokard erhöhte Konzentrationen von Matrix-Metalloproteinasen sowie TIMPs detektiert, mit der Ausnahme von TIMP4, welches im drucküberladenen Myokardium im Vergleich zu Kontrollen erniedrigt war. Das Ausmaß der fibrotischen Veränderungen und die damit verbundene Entwicklung der Herzinsuffizienz standen im Zusammenhang mit erhöhten MMPs und TIMPs sowie erniedrigten TIMP4-Spiegeln.²⁸⁰ Weiterhin wurde wenige Jahre später von derselben Arbeitsgruppe bei terminaler Herzinsuffizienz eine erhöhte Expression dieser MMPs und TIMPs beobachtet, welche für TIMP4 ebenfalls eine Hochregulation bewirkte. TIMP4-Konzentrationen zeigten dabei eine positive Korrelation mit der Anhäufung der Kollagene Typ 1 und 3 im Myokard, die auf eine Ablagerung von extrazellulärer Matrix hinweist.²⁸¹ Bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz und dilatativer Kardiomyopathie wurden im Myokard bereits erhöhte Protein-Expressionen von MMPs und TIMPs, sowie erhöhte Aktivitäten der MMPs festgestellt.²⁸² Tiede et al.²⁷⁴ zeigten, dass in Patienten mit pulmonaler Hypertonie MMP2- und TIMP1-Konzentrationen im Citrat-Plasma der Pulmonalarterie zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein Maß für die Krankheitsschwere sowie für die Prognose bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie sein können.

Im Gegensatz zu den eben genannten Publikationen wurden in der vorliegenden Arbeit die untersuchten Marker nicht bei Diagnosestellung (V1) ausgewertet, sondern bei der Folgevisite bzw. dem Verlauf zwischen diesen beiden Zeitpunkten. In diversen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass die Prognose stark abhängig vom Therapieansprechen jedes einzelnen Patienten ist, was jedoch zum Zeitpunkt der Diagnose noch nicht berücksichtigt werden kann.^{180, 283, 284} Nickel et al.¹⁷⁹ haben ebenfalls an einem Beispiel von 109 Patienten mit iPAH gezeigt, dass die prognostische Wertigkeit von etablierten Biomarkern, wie z. B. WHO-Schweregrad-Klassifikation, Herzindex, venöse Sauerstoffsättigung und NT-proBNP, welche für eine Verwendung bei Diagnosestellung validiert worden sind, bei Anwendung an der Folgevisite im Vergleich zu Baseline weiter anstieg. Benza et al.¹⁷⁸ entwickelten ebenfalls einen Risiko-Score zur Abschätzung des 1-

Jahres-Überlebens, welcher unter anderem die funktionelle Klasse (gemäß WHO-Klassifikation), BNP, 6MWD, Hämodynamik- und Echokardiographie-Variablen berücksichtigt und sich an die Ergebnisse aus dem REVEAL-Register anlehnt. Obwohl er basierend auf Baseline-Daten erstellt worden ist, wurde bereits gezeigt, dass dieser Score jederzeit während des Krankheitsverlaufs angewendet werden kann.

Auch die Matrix-Metalloproteinasen konnten in *in vivo* Experimenten zeigen, dass sie durch Medikamente, die in der Therapie der pulmonalen Hypertonie eingesetzt werden, moduliert werden können. Schermuly et al.²⁸⁵ zeigten dies für das Prostazyklin-Analogon Iloprost in Monocrotalin-induzierter pulmonaler Hypertonie in Ratten. Hiremath et al.²⁷⁸ bestätigten dies ebenfalls an Patienten mit PH, bei denen das Prostazyklin-Analogon Treprostinil ebenfalls einen reduzierenden Effekt auf die Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 zeigte, was mit einer Erhöhung des Prognosemarkers 6MWD einherging.

Auch in der hier untersuchten Patienten-Population wurde gezeigt, dass sich die Biomarker von Visite 1 bis zur Nachfolge-Untersuchung V2 veränderten. Mehrere Arbeiten^{190, 281, 286-292} deuten darauf hin, dass bei Fibrose-assoziierten Erkrankungen nicht die Expression einzelner MMPs und TIMPs betrachtet werden kann, sondern dass eine Imbalance der MMP/TIMP-Verhältnisse, welche die tatsächlichen Aktivitäten der Matrix-Metalloproteinasen widerspiegeln, für die pathologischen Umbauprozesse verantwortlich ist. Diese wurden bisher in der pulmonalen Hypertonie nur unzureichend untersucht. In dieser Arbeit wurden genau diese MMP/TIMP-Verhältnisse analysiert. Im Beobachtungszeitraum gab es sowohl Patienten, deren MMP/TIMP-Verhältnisse sich von V1 bis V2 erhöht (vgl. Abbildung 31, Abbildung 32, grün) als auch reduziert (vgl. Abbildung 31, Abbildung 32, rot) haben.

4.2.3 Korrelationen von MMP/TIMP-Verhältnissen bei der Folgeuntersuchung im iPAH-Kollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurde ein starker Zusammenhang des mittleren pulmonalarteriellen Drucks und des pulmonalvaskulären Widerstands mit MMP2/TIMP4 sowie mit MMP9/TIMP1 festgestellt. In anderen Lungenerkrankungen sowie bei Bindegewebserkrankungen (Kollagenosen) wurde ein leicht erhöhter mPAP als prognostisch wertvoll erachtet.^{293, 294} Auch in der pulmonalen Hypertonie wurde diesem Parameter vor über 20 Jahren ein prognostischer Wert zugesprochen,¹⁷⁶ was jedoch in neueren Arbeiten^{178, 180, 295} sowie den aktuellen Leitlinien¹⁶⁴ teilweise revidiert wird. Möglicherweise beruht die fehlende

prognostische Aussagekraft des mPAP darauf, dass bei sinkendem pulmonalvaskulärem Widerstand durch die Erhöhung des Herzindex der mittlere pulmonalarterielle Druck zunächst unverändert bleibt.

Außerdem bestand ein starker Zusammenhang der eben genannten Marker mit dem pulmonalvaskulären Widerstand. Indirekt – als Indikator für ein Ansprechen von Patienten auf Epoprostenol – zeigte dieser sein prognostisches Potential.¹⁸⁰ In einer Meta-Analyse mit mehr als 800 Patienten wurde jedoch beobachtet, dass in einer Behandlungsgruppe, in welcher das Risiko für eine klinische Verschlechterung gesenkt werden konnte, mit einer Abnahme des mPAP und des PVR einherging.²⁹⁶ Der Herzindex, der rechtsatriale Druck sowie die venöse Sauerstoffsättigung werden in den Leitlinien¹⁶⁴ als sehr robuste Marker für den Verlauf der PAH bezeichnet. Ersterer zeigte in dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kollektiv keinen Zusammenhang mit den Biomarkern.

Die ESC/ERS Leitlinien¹⁶⁴ empfehlen zur Verlaufskontrolle von pulmonaler Hypertonie den 6-Minuten-Gehtest (6MWD) sowie den kardialen Stressmarker BNP. Die hier untersuchten Variablen zeigten keinen Zusammenhang mit diesen Parametern. Aufgrund der geringen Patientenzahl konnte der 6MWD nicht für seine einflussnehmenden Faktoren wie z. B. Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht oder Komorbiditäten adjustiert werden. Dies macht den 6MWD zu einem störanfälligen Marker, der in dieser Analyse keinen signifikanten Zusammenhang mit dem klinischen Erscheinungsbild ergeben hat. BNP-Konzentrationen haben aber bereits mehrmals gezeigt, dass sie einen Zusammenhang mit den hier untersuchten klinischen Parametern aufweisen.^{182, 297} Möglicherweise spielt auch hier die geringe Fallzahl, welche Korrelationsanalysen sehr anfällig für Ausreißer macht, eine entscheidende Rolle. Interessanterweise trat eine Korrelation der etablierten Marker BNP und 6MWD mit MMP/TIMP-Verhältnissen nur für die Analyse der relativen Veränderungen von V1 bis V2 auf, obwohl bisher nur die Absolutwerte von 6MWD und BNP und nicht die jeweiligen relativen Veränderungen zwischen den Visiten einen prognostischen Wert aufzeigten.¹⁶⁴ Allerdings dienen die Veränderungen von 6MWD oder BNP (bzw. NT-proBNP) in der klinischen Praxis als relevante Therapieziele und werden aus diesem Grund auch in klinischen Studien häufig als Endpunkte gewählt.^{298, 299}

Weiterhin konnte bei der Nachfolge-Visite für eines der untersuchten MMP/TIMP-Verhältnisse eine starke Korrelation mit der TAPSE beobachtet werden. Diese ist ein Maß für die rechtsventrikuläre Funktion und stellt im Gegensatz zum 6-Minuten-Gehtest eine objektive und reproduzierbare Größe zur Beurteilung des klinischen Behandlungserfolges dar. Diese

Variable zeigte ebenfalls eine gute Korrelation mit dem Verhältnis von MMP2 zu TIMP4 sowie eine mittlere Korrelation mit dem Verhältnis von MMP2 zu TIMP1 bei der Folgeuntersuchung der Patienten. Forfia et al.¹⁸³ haben gezeigt, dass pro 1 mm verringerter TAPSE das Risiko zu versterben um 17 % ansteigt. Auch in pädiatrischen Studien zu pulmonaler Hypertonie-Patienten³⁰⁰ sowie in Patienten nach akutem Myokardinfarkt³⁰¹ wurde diesem Marker ebenfalls eine prognostische Bedeutung zugeteilt.

4.2.4 Prädiktiver Wert von MMP/TIMP-Verhältnissen bei der Folgeuntersuchung im iPAH-Kollektiv

Der Marker MMP2/TIMP4 bei der Folgevisite V2 hat im iPAH-Kollektiv gezeigt, dass er sowohl prädiktiv für das Überleben als auch für eine klinische Verschlechterung des Patienten ist. Für Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren ist bekannt, dass sie bei Baseline, sprich bei Diagnosestellung, die Krankheitsschwere sowie das Outcome in Patienten mit pulmonaler Hypertonie vorhersagen.²⁷⁴ Dabei wurde beobachtet, dass in der pulmonalen Hypertonie Patienten mit erhöhten (> Median) MMP2- oder TIMP1-Plasmaspiegeln eine geringere Change für das 5-Jahres-Überleben als Patienten mit Plasmaspiegel unterhalb des jeweiligen Medians (HR: 2,69 und 4,46, jeweils $p < 0,01$) haben. Gerade aufgrund der zugrundeliegenden Pathophysiologie ist es nicht verwunderlich, dass die an fibrotischen Umbauprozessen beteiligten Marker auch bei fortgeschrittener Krankheit prognostischen Nutzen haben könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Grenzwerte für MMP2/TIMP4 ermittelt (bzgl. klinischer Verschlechterung: 14,26; bzgl. Überleben: 20,29), da aktuell die Bedeutung dieses Markers noch evaluiert wird. Sollte dieser Marker Einzug in die klinische Routine erhalten, wäre es natürlich praktikabler, einen einzelnen MMP2/TIMP4 Grenzwert zu definieren, der sowohl die klinische Verschlechterung als auch das Überleben berücksichtigt.

Bei Schumann et al. haben die Plasma-Konzentrationen dieser beiden Einzel-Komponenten MMP2 und TIMP4 eine positive Korrelation mit der NYHA-Klasse gezeigt. Weiterhin konnte eine positive Korrelation mit der rechtsventrikulären Funktion sowie eine negative Korrelation mit der Trikuspidalklappeninsuffizienz in Patienten mit pulmonaler Hypertonie nachgewiesen werden.¹⁸⁸

Eine Korrelation des vielversprechenden Markers MMP2/TIMP4 mit dem bereits etablierten Biomarker BNP konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. BNP wurde von Leuchte

et al.¹⁸² als Prognose-Marker evaluiert und hat später Eingang in die klinische Praxis gefunden, wobei NT-proBNP trotz seiner Abhängigkeit von der Nierenfunktion als zuverlässigerer Marker im Bezug auf die Prognose gilt.¹⁸⁵ Bei Herzinsuffizienz-Patienten mit Linksherzhypertrophie und diastolischer Funktionseinschränkung wurde in einem Multimarker-Approach, in welchem pathophysiologisch ausschlaggebende Marker für die Prognose der Erkrankung getestet wurden, jedoch eine Überlegenheit der Kombination von verschiedenen MMPs und TIMPs, einschließlich MMP2 und TIMP4, gegenüber NT-proBNP dargestellt.³⁰²

4.2.5 Korrelationen von MMP/TIMP-Verhältnissen bei der Folgeuntersuchung im PH-LHD-Kollektiv

In dem hier untersuchten PH-LHD-Kollektiv litten die Patienten primär an einer linksventrikulären Herzinsuffizienz. Die pulmonale Hypertonie ist in Patienten mit manifestierter Herzinsuffizienz mit verringerter Leistungsfähigkeit verbunden.³⁰³ Gleichzeitig steigt die Mortalität bei Diagnose einer PH in diesen Patienten stark an.³⁰⁴ Dasselbe gilt auch für Patienten mit akut dekompensierter Herzinsuffizienz. Trotz erfolgreicher Behandlung der akuten Dekompensation hat die pulmonale Hypertonie als Komorbidität negativen Einfluss auf die Prognose des Patienten.³⁰⁵ Obwohl das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv sehr klein war (n=11), wurde ein guter Zusammenhang der Biomarker MMP2/TIMP4 und MMP9/TIMP4 mit den Hämodynamik-Variablen mPAP, PAWP und PVR beschrieben. Diese Parameter haben bereits in Herzinsuffizienz-Patienten mit reduzierter Ejektionsfraktion einen starken Zusammenhang im Hinblick auf die Prognose gezeigt.^{306, 307} Mit Ausnahme des PAWP waren diese Korrelationen ebenfalls im iPAH-Kollektiv zu beobachten, was eine universelle Verwendung der Biomarker in der pulmonalen Hypertonie bzw. in der Herzinsuffizienz vermuten lässt. Die Relevanz von PAWP als Marker für die linksventrikuläre Dysfunktion ist überwiegend in dem PH-LHD-Kollektiv gegeben.

Da, wie in Kapitel 4.2.1 bereits erwähnt, der pulmonalvaskuläre Widerstand sehr hoch war, kann man davon ausgehen, dass es sich bei einem Großteil der Patienten um eine kombinierte prä- und postkapilläre pulmonale Hypertonie handelt. Neuere Literatur hat darauf hingewiesen, dass bei diesen Patienten die pulmonalarterielle Kapazität, gemessen als Verhältnis von Schlagvolumen zu pulmonalarteriellem Druck, als Marker für die rechtsventrikuläre Nachlast, prognostisch wertvoller als die oben genannten Variablen (v.a. pulmonalvaskulärer Widerstand) ist.³⁰⁸

4.2.6 Bedeutung von MMP2/TIMP4 bei kardiovaskulären Erkrankungen bzw. Herzinsuffizienz

Das Verhältnis von MMP2 zu TIMP4 zeigte in der vorliegenden Arbeit einen Zusammenhang mit der Hämodynamik und war zusätzlich auch prädiktiv für das klinische Outcome.

Diese beiden Biomarker spielen in ihrem Zusammenspiel in der Ischämie eine große Rolle, da sie zusammen kolokalisiert mit Troponin I in den dünnen Myofilamenten der Kardiomyozyten-Sarkomere vorkommen. Die intrazelluläre Lokalisation von MMP2 haben Ali et al.³⁰⁹ in einem Review zusammengefasst. Während ischämischer Zustände ist die MMP2-Konzentration im Myokard erhöht, hingegen die TIMP4-Konzentration erniedrigt. Dies hat zur Folge, dass Troponin I abgebaut wird und sich daraus resultierend eine myokardiale Dysfunktion entwickelt.^{310, 311} Neben Troponin scheint auch Myosin durch erhöhte MMP2-Aktivität abgebaut zu werden.³¹² In *timp4*-defizienten Mäusen wurde nach Myokardinfarkt eine verstärkte linksventrikuläre strukturelle Veränderung beobachtet, was infolgedessen zu einer kardialen Dysfunktion führen kann.³¹³ Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass eine erhöhte MMP2-Konzentration vermehrt Elastin abbaut und ebenfalls zur systolischen bzw. diastolischen Dysfunktion führen kann. Dies resultiert in einem reduzierten Elastin/Kollagen-Verhältnis, was somit zur Steifigkeit des Myokardmuskels und einer damit verbundenen kardialen Dysfunktion führt.³¹⁴

In der Literatur wurde bereits des Öfteren der Zusammenhang von MMP2 mit TIMP4 herausgearbeitet. Zur Aktivierung des Propeptids pro-MMP2 bildet es einen Komplex mit TIMP2 und MT1-MMP. TIMP4 ist in der Lage, MT1-MMP sowie das aktivierte MMP2 zu inhibieren. Bei der Aktivierung von MMP2 hat TIMP4 jedoch keine direkt inhibierende Wirkung.³¹⁵⁻³¹⁷

In einer Untersuchung von Zile et al.³⁰² wurden 61 Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie und diastolischer Herzinsuffizienz mit 144 Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie ohne Herzinsuffizienz sowie 241 gesunden Kontrollen verglichen. Dabei erwiesen sich erhöhte MMP2 und TIMP4 Spiegel in Kombination mit erhöhtem PIIINP, einem Abspaltprodukt von Kollagen, sowie reduziertem MMP8 als guter Biomarker für die Diagnose einer diastolischen Dysfunktion und erwiesen sich dabei dem etablierten Biomarker NTproBNP überlegen. Diese Daten deuten auch darauf hin, dass die inhibitorische Eigenschaft von TIMP4 auf die MT1-MMP Aktivität bei der Entstehung des myokardialen Remodeling und der Dysfunktion eine Rolle spielt. In Schweinen wurde auch bereits eine

Korrelation von TIMP4-Konzentrationen mit der MT1-MMP-Expression und Aktivität gezeigt.^{318, 319}

Auch die Transformation der Parameter in Kapitel 3.2.4.3 bestätigte, dass MMP2 und TIMP4 geeignete Prädiktoren für die klinische Verschlechterung als auch für das Überleben sind. Möglicherweise ist der $\log_{10}(\text{MMP2})/\log_{10}(\text{TIMP4} \cdot 1000)$ durch Minimierung von Ausreißern sogar ein geeigneterer Parameter als das nicht-logarithmierte MMP2/TIMP4-Verhältnis. Auch dies sollte in zukünftigen prospektiven Versuchsanordnungen berücksichtigt werden, zumal statistische Test häufig nur für normal-verteilte Größen anwendbar sind.

4.2.7 Limitationen

Aufgrund des langen Rekrutierungszeitraums wurden die Patienten auch mit sehr unterschiedlichen Behandlungsregimes therapiert. Außerdem variierte der Beobachtungszeitraum zwischen V1 und V2 bei den einzelnen Patienten sehr stark (im iPAH-Kollektiv zwischen 1 Monat und 72 Monaten).

Die Blutproben wurden aus der Pulmonalarterie entnommen, was für die Etablierung der Marker im klinischen Alltag nicht praktikabel ist. Deswegen muss in einem weiteren Schritt untersucht werden, ob der Entnahmeort der Biomarker einen Einfluss auf die Plasmakonzentrationen hat. Die Entnahme aus peripheren Gefäßen könnte einen Einsatz des Rechtsherzkatheters für die Abschätzung des Krankheitsverlaufs sowie der Prognose ersetzen.

Außerdem darf bei der Interpretation der Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren (TIMPs) nicht die Probenaufbereitung außer Acht gelassen werden. In diesem Experiment wurde für die Messung der ausgewählten Biomarker Citrat-Plasma verwendet, obwohl die verwendeten ELISA-Kits vom Hersteller nicht für Citrat-Plasma validiert worden sind (die Kits wurden vor der Messung der Proben in Absprache mit dem Hersteller und nach einem entsprechenden Protokoll des Herstellers für die Citrat-Proben evaluiert). Die Entscheidung für Citrat-Plasma beruht auf einer Empfehlung von Manello et al.³²⁰ sowie einer gezielten Untersuchung von Jung et al.³²¹, welche die Verwendung von Serum und verschiedenen Plasma-Arten im Bezug auf die Verlässlichkeit der Ergebnisse getestet haben. MMP9 und TIMP1 liefern in Serum signifikant höhere Konzentrationen aufgrund ihrer erhöhten Sekretion aus Thrombozyten sowie Leukozyten bzw. deren Aktivierung während der Koagulation und

Fibrinolyse. Der Einfluss auf MMP2-Konzentrationen erwies sich in diesen Untersuchungen als geringer, während zu TIMP4 keine Daten vorliegen.

Die Interpretation der im Rahmen dieser Doktorarbeit gewonnenen Ergebnisse ist hypothesengenerierend und hat keinesfalls konfirmatorische Aussagenkraft. Dafür ist es noch notwendig, weitere prospektive Analysen in einem größeren Gesamtkollektiv zu betrachten um Ergebnisse aus dieser vorliegenden Arbeit zu bestätigen und zu validieren. Überdies sollten weitere Verlaufsmessungen zu späteren Zeitpunkten und, vor allem nach Therapieänderung, in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden.

Bei zukünftigen Analysen wäre eine weitere Überlegung komplexere Variablen aus den einzelnen Biomarkern zu generieren, allerdings ist dies bei der gewählten Versuchsanordnung (geringen Stichproben-Anzahl, retrospektive Analyse) nur eingeschränkt sinnvoll. Eine log-Transformation zur Basis 10 der einzelnen Biomarker wurde bereits in Kapitel 3.2.4.3 durchgeführt.

4.2.8 Matrix-Metalloproteinasen – Biomarker mit prädiktivem und therapeutischem Stellenwert

In der hier vorliegenden Arbeit haben sich Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren – Indikatoren für die Dynamik des Gewebeumbaus – in der pulmonalen Hypertonie als prognostisch wertvoll erwiesen. Etablierte Biomarker, wie z. B. BNP oder NT-proBNP werden bei einem erhöhten kardialen Druck ausgeschüttet und sind somit vor allem Indikatoren der fortgeschrittenen Erkrankung. Das MMP/TIMP-Verhältnis berücksichtigt hingegen vor allem fibrotische Umbauprozesse, und damit einen für die pulmonale Hypertonie wichtigen Pathomechanismus, der bereits im frühen Krankheitsgeschehen präsent ist. Bei Zile et al. war die Kombination von MMP2, MMP8, TIMP4 sowie PIIINP, einem Abspaltprodukt von Kollagen, im Bezug auf die diastolische Dysfunktion dem etablierten Marker NT-proBNP überlegen.³⁰² Auch Tiede et al.²⁷⁴ haben einen prognostischen Stellenwert für MMPs und TIMPs bei Diagnosestellung erkannt. Da jedoch viele Erkrankungen mit Fibrose und somit mit einer Dysregulation von MMPs und TIMPs einhergehen, sind diese Marker vor allem in der Verlaufskontrolle und weniger in der Diagnostik von Bedeutung. Etablierte Prognosemarker haben im Krankheitsverlauf eine größere Aussagekraft als zum Zeitpunkt der Diagnose.¹⁷⁹ Da die MMP/TIMP-Verhältnisse mit hämodynamischen Parametern korrelieren, ist es langfristig das Ziel, mithilfe eines Multimarker-Ansatzes die Aussagekraft von etablierten Biomarkern

aufzuwerten und somit die invasive Rechtsherzkatheter-Messung, welche für die Verlaufsbestimmung bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie aktuell noch essentiell ist, zu ersetzen. Somit ist es sinnvoll, diese Analyse in einem größeren Patientenkollektiv in einer prospektiven Analyse zu validieren.

Außerdem wurde in dieser Arbeit eine pharmakologische Modulation der Matrix-Metalloproteinasen durch Serelaxin im Tiermodell gezeigt, welche mit einer Abmilderung der Fibrose einherging. Im Tiermodell gab es bereits Hinweise darauf, dass Serelaxin die pulmonale Hypertonie abschwächt.³²² Zudem ist endogenes Relaxin bei Patienten mit pulmonalarterieller Hypertonie erhöht.¹¹³

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann die Hypothese abgeleitet werden, dass Serelaxin mitunter aufgrund seiner antifibrotischen Wirkweise günstige Effekte auf den Krankheitsverlauf bzw. die Prognose von Patienten mit pulmonaler Hypertonie aufweisen könnte. Außerdem können beispielsweise antiinflammatorische Eigenschaften von Serelaxin ebenfalls den Verlauf dieser Erkrankung günstig beeinflussen. Die vorliegenden Daten sind hypothesengenerierend und benötigen noch weiterer Aufklärung in präklinischen Versuchsansätzen, bevor dies in klinischen Studien an Patienten mit pulmonaler Hypertonie zukünftig untersucht werden kann.

5 Fazit/ Ausblick

Serelaxin zeigte bereits als therapeutischer Ansatz in verschiedenen Modellen organprotektive Eigenschaften. Allerdings wird seine pharmakologische Wirkung noch nicht umfassend verstanden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Signalweg, welcher für die antifibrotische Wirkung verantwortlich ist, weiter untersucht. Dabei konnte eine Aktivierung des Relaxin-Rezeptorsignals auf eine NO-cGMP-cGKI-Achse ermittelt werden, die über die Hemmung der Smad2- und ERK1-Phosphorylierung zu einer Unterbindung des TGF- β -Signals führte. Dadurch konnten auch die Matrix-Metalloproteinasen positiv moduliert werden. Die Beteiligung der cGMP-abhängigen Kinase cGKI war in diesem Zusammenhang in der Literatur noch nicht bekannt. Dennoch bleibt das Verständnis des Serelaxin-Signalings weiterhin lückenhaft und bedarf weiterer Experimente zur vollständigen Aufklärung.

Sowohl Serelaxin als auch der PDE5-Inhibitor Zaprinast sind in der Lage, die cGMP Konzentrationen zu erhöhen und somit vasodilatativ und antifibrotisch zu wirken. Durch die Modulation weiterer Signalwege ist Serelaxin darüber hinaus in der Lage, seine antioxidative, antiinflammatorische und angiogene Wirkung zu entfalten.

Serelaxin ist aufgrund seines pleiotropen Wirkmechanismus ein denkbarer Therapie-Ansatz zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie. Präklinische Hinweise zur Wirksamkeit existieren bereits. Deswegen wären hier klinische Studien in der Zukunft sicherlich sinnvoll.

Durch die Untersuchung der MMP/TIMP-Verhältnisse konnte im Rahmen dieser Arbeit in der pulmonalen Hypertonie ein Zusammenhang mit dem Verlauf von klinischen Parametern gezeigt werden. MMP2/TIMP4 war in den Untersuchungen ein Indikator für die Prognose von Patienten mit pulmonaler Hypertonie zum Zeitpunkt der Nachfolge-Untersuchung. Ähnliches konnte auch in einer Arbeit von Tiede et al.²⁷⁴ für Patienten mit pulmonaler Hypertonie gezeigt werden. Diese Daten sind vielversprechend, müssen aber, um eine konfirmatorische Aussagekraft zu erhalten, in größeren Patientenkollektiven prospektiv untersucht und validiert werden. Ein potentieller Einsatz der MMP/TIMP-Verhältnisse als neue Biomarker wäre sowohl für die Verlaufskontrolle bei diversen Fibrose-assoziierten Krankheiten als auch für das Therapiemonitoring von Serelaxin denkbar.

6 Zusammenfassung

Die Fibrose stellt aufgrund ihrer hohen Prävalenz in der Bevölkerung, der schlechten Prognose für die Patienten, sowie der komplexen Pathophysiologie ein sehr wichtiges Forschungsgebiet mit einem hohen Bedarf an neuen Therapeutika dar. Serelaxin zeigte in diversen Indikationen bereits eine organprotektive Wirkung, welche unter anderem auf die antifibrotischen Eigenschaften der Substanz zurückzuführen sind. Hier könnte der *second messenger* cGMP und die abhängige Proteinkinase cGKI eine entscheidende Rolle spielen. Auch in der Therapie der pulmonalen Hypertonie sind cGMP-modulierende Pharmaka, wie z. B. Inhibitoren der Phosphodiesterase 5 oder Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase, im Einsatz. Aufgrund der schlechten Prognose ist hier der Bedarf an weiteren innovativen Pharmaka als auch neuen prognostischen Markern – beispielsweise Fibrose-assoziierten Biomarkern – hoch.

Ziel der Arbeit war es, einerseits Erkenntnisse über cGKI – eine cGMP-abhängige Proteinkinase – und deren Substrate in der renalen Fibrose unter Einfluss von Serelaxin zu gewinnen. Dies wurde in Wildtyp- sowie cGKI-KO Mäusen mithilfe der unilateralen Ureterligation untersucht, welche ein etabliertes Modell für die tubulointerstitielle Nierenfibrose darstellt. Zusätzlich wurde getestet, ob durch die Gabe des PDE5-Inhibitors Zaprinast ähnliche bzw. additive antifibrotische Effekte in der Niere erzielt wurden. In einer weiteren Untersuchung wurde anschließend an Patienten mit pulmonaler Hypertonie die klinische Relevanz ausgewählter Fibrose-assoziiierter Biomarker – der MMP/TIMP-Verhältnisse – evaluiert, indem ein biologischer Marker identifiziert wurde, der mit dem Krankheitsverlauf sowie der Prognose assoziiert ist und zugleich mit den antifibrotischen Effekten von Serelaxin verknüpft ist.

Im renalen Nierenfibrose-Modell waren die cGMP-Konzentrationen im fibrotischen Nierengewebe nach 7-tägiger Behandlung mit Serelaxin, Zaprinast sowie der Kombination beider Pharmaka erhöht. In WT Mäusen konnten ähnliche über die NO-cGMP-abhängige Proteinkinase cGKI vermittelte antifibrotische Effekte in allen drei Behandlungsgruppen beobachtet werden. Die Verabreichung von Serelaxin führte hierbei vermutlich über die Hemmung der Smad2- und ERK1-Phosphorylierung zu einer Reduzierung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix (z. B. Kollagene, Fibronectin). Die 7-tägige Behandlung mit dem Phosphodiesterase-5-Hemmer Zaprinast resultierte in einer tendenziell verringerten ERK1- und ERK2-Phosphorylierung ohne Einfluss auf die Smad2-Phosphorylierung. Zusätzlich

wurde mit Zaprinast die antifibrotische Wirkung über cGKI-unabhängige Mechanismen vermittelt. Die Kombination der beiden cGMP-erhöhenden Therapieoptionen war nicht antifibrotisch wirksamer als die jeweiligen Einzelsubstanzen. Matrix-Metalloproteinasen – Proteine, die für den Umbau der extrazellulären Matrix verantwortlich sind – wurden nur durch die 7-tägige Serelaxin-Behandlung positiv moduliert, indem das in der Fibrose stark erhöhte Angebot an MMP2 reduziert wurde. Die in der Fibrose nahezu unveränderte MMP9-Proteinexpression wurde nach Serelaxin-Gabe lediglich vermehrt in die aktive Form überführt.

Weiterhin wurde in Patienten mit pulmonaler Hypertonie die klinische Relevanz von Matrix-Metalloproteinasen (MMP2, MMP9) und deren Inhibitoren (TIMP1, TIMP4) untersucht. Dazu wurde in einem Patientenkollektiv mit idiopathischer pulmonalarterieller Hypertonie (n=24) sowie pulmonaler Hypertonie aufgrund einer Linksherzinsuffizienz (n=11) nachgewiesen, dass durch den Fibrose-assoziierten Biomarker MMP2/TIMP4 ein Zusammenhang mit der Hämodynamik (mPAP, PVR) sowie der rechtsventrikulären Funktion (TAPSE) gezeigt werden konnte. Zusätzlich war MMP2/TIMP4 in Patienten mit iPAH prädiktiv für das klinische Outcome (klinische Verschlechterung, Tod).

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben also gezeigt, dass Serelaxin in der Nierenfibrose über die NO-cGMP-cGKI-Signalkaskade antifibrotisch wirkt, unter anderem durch die Modulation der Matrix-Metalloproteinasen. Zusätzlich haben sich Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie, einer kardiovaskulären Erkrankung charakterisiert durch fibrotischen Gewebeumbau, als prognostisch wertvoll erwiesen.

7 Veröffentlichungen

Poster

Role of cGMP dependent protein kinases in renal antifibrotic effect of serelaxin	Veronika Wetzl, Lothar Faerber, Franz Hofmann, Elisabeth Schinner, Jens Schlossmann	DGK Herbsttagung 2014 – Düsseldorf; Deutschland
cGMP dependent amelioration of renal interstitial fibrosis – comparison of serelaxin, zaprinast and its combination	Veronika Wetzl, Lothar Faerber, Elisabeth Schinner, Jens Schlossmann	DGPT 2015 – Kiel; Deutschland
Role of cGMP dependent protein kinase I in renal antifibrotic signaling of serelaxin and zaprinast	Veronika Wetzl, Lothar Faerber, Franz Hofmann, Elisabeth Schinner, Jens Schlossmann	cGMP Meeting 2015 – Trier; Deutschland
Short-term and Long-term Antifibrotic Effects of Serelaxin	Veronika Wetzl, Lothar Faerber, Franz Hofmann, Elisabeth Schinner, Jens Schlossmann	DGfN 2015 – Berlin; Deutschland
Prognostic value of MMP/TIMP imbalance at follow up assessment in pulmonary hypertension	Veronika Wetzl, Svenja Lena Tiede, Lothar Faerber, Norbert Weissmann, Ralph Theo Schermuly, Hossein Ardeschir Ghofrani, Henning Gall	DGK Jahrestagung 2016 – Mannheim; Deutschland
Prognostic value of MMP/TIMP imbalance at follow up assessment in idiopathic pulmonary arterial hypertension	Veronika Wetzl, Svenja Lena Tiede, Lothar Faerber, Norbert Weissmann, Ralph Theo Schermuly, Hossein Ardeschir Ghofrani, Henning Gall	ESC Heart Failure 2016 – Florenz; Italien

Vortrag

Antifibrotic function of cGKI in the kidney	Jens Schlossmann, Elisabeth Schinner, Veronika Wetzl, Lothar Faerber, Franz Hofmann	cGMP Meeting 2015 – Trier; Deutschland
---	---	--

Manuskript

Cyclic nucleotide signaling in kidney fibrosis	Elisabeth Schinner, Veronika Wetzl, Jens Schlossmann	International Journal of Molecular Sciences ⁹⁹
Role of cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase I in renal antifibrotic effects of serelaxin	Veronika Wetzl*, Elisabeth Schinner*, Frieder Kees, Franz Hofmann, Lothar Faerber, Jens Schlossmann	Frontiers in Pharmacology ¹⁹⁵
Inhibition of the TGF β signaling pathway by cGMP and cGMP-dependent kinase I in renal fibrosis	Elisabeth Schinner, Veronika Wetzl, Andrea Schramm, Frieder Kees, Peter Sandner, Johannes-Peter Stasch, Franz Hofmann, Jens Schlossmann	FEBS openbio ³²³
Differences in the renal antifibrotic cGMP/cGKI-dependent signaling of serelaxin, zaprinast and their combination	Veronika Wetzl*, Elisabeth Schinner*, Frieder Kees, Lothar Faerber, Jens Schlossmann	<i>eingereicht</i> [Nachtrag: veröffentlicht in Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology ³²⁴]

Veröffentlichungen

Plasma MMP2/TIMP4 ratio at follow-up assessment predicts disease progression of idiopathic pulmonary arterial hypertension

Veronika Wetzl*, Svenja Lena Tiede*, Lothar Faerber, Norbert Weissmann, Ralph Theo Schermuly, Hossein Ardeschir Ghofrani, Henning Gall

eingereicht
[Nachtrag: veröffentlicht in Lung³²⁵]

* geteilte Erstautorenschaft

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Natürlich möchte ich mich an erster Stelle bei Herrn Prof. Lothar Färber für die Überlassung des Themas, die ausdauernde Betreuung und Unterstützung sowie das entgegengebrachte Vertrauen während der Anfertigung dieser Arbeit ganz herzlich bedanken.

Vielen Dank an die Firma Novartis Pharma GmbH für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht an die Arbeitsgruppe von Prof. Schlossmann. Vor allem Prof. Jens Schlossmann und Dr. Elisabeth Schinner möchte ich für die hervorragende Betreuung im Labor in Regensburg danken. Vielen Dank auch an Herrn Prof. Frieder Kees für die Entwicklung der HPLC-Methode, Astrid Seefeld und Gertraud Wilberg für die Unterstützung bei zahlreichen Western Blots, PCR's, ELISA's und vielen anderen Laborfragen. Außerdem möchte ich die vielen gemeinsamen und kurzweiligen Mittags- und Kaffeepausen mit Lisa, Julia, Franzi, Andrea, Steffi und Johannes nicht missen. Auch Janina war immer für mich da – egal ob für fachliche Diskussionen, zur Aufmunterung oder einfach nur als Freundin für einen Kaffee zwischendurch.

Der AG Pulmonary Pharmacotherapy, Prof. Schermuly (Biomedizinisches Forschungszentrum Gießen) sowie dem Zentrum für Pulmonale Hypertonie der Uniklinikum Gießen und Marburg GmbH (Rhön-Klinikum AG), insbesondere Dr. Dr. Henning Gall und Dr. Svenja Tiede, gilt mein Dank für die Betreuung bei Laborfragen sowie bei der anschließenden Auswertung.

Ein sehr großes Dankeschön hat sich natürlich meine Mit-Doktorandin und langjährige Freundin Johanna Walz verdient, welche mir die letzten Jahre sowohl mit fachlichen Ratschlägen, moralischer Unterstützung und vielen lustigen Ratschabenden oder Telefonaten sehr, sehr schön machte. Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei meinen Mädels, die es immer wieder schafften, mich zwischendurch auf andere Gedanken zu bringen.

Außerdem möchte ich bei allen Kollegen der TA Critical Care bzw. TA Cardio-Metabolic für die Aufnahme in der Abteilung, für die lehrreiche, witzige und angenehme Arbeitsatmosphäre

während der letzten Jahre Danke sagen. Allen voran möchte ich mich bei Dr. Stephan Hupfer bedanken, der sich stets Zeit für konstruktive und ermutigende Gespräche genommen hat und sich für die Entstehung einer gelungenen Arbeit eingesetzt hat. Außerdem möchte ich Dr. Monika Baier danken, die bei Statistik-Fragen immer sofort Zeit für mich hatte. Danke auch an Dr. Ute Simon für die Ratschläge.

Meinen Geschwistern Matthias und Franziska möchte ich an dieser Stelle auch ein riesengroßes Danke sagen. Ihr ward auch immer da, egal ob für's gute Zureden, zum Mut machen oder zum Korrektur lesen. Schön, dass es euch gibt!

Besonders bedanken möchte ich mich bei Michael, der während der ganzen Zeit an meiner Seite stand, mich bei Laune gehalten hat und mich stets motiviert hat. Danke, dass du immer für mich da bist!

Mein allergrößter Dank geht an meine Mama und meinen Papa, die mir immer die nötige Rückendeckung gegeben haben und mich in all meinen Plänen bekräftigt haben. Ohne eure Unterstützung, euer offenes Ohr und euren ermutigenden Zuspruch wäre ich sicherlich nicht dort, wo ich heute bin!

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die Durchführung der in Kapitel 2.1 beschriebenen Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Schlossmann (Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg).

Die Durchführung der in Kapitel 2.2 beschriebenen Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Biomedizinischen Forschungszentrum Gießen (AG Pulmonary Pharmacotherapy, Prof. Schermuly) und dem Zentrum für Pulmonale Hypertonie der Uniklinikum Gießen und Marburg GmbH, Rhön-Klinikum AG (Dr. Dr. Henning Gall).

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

10 Zusätzliche Anmerkung

Diese Arbeit entstand in der Zeit von November 2012 bis April 2017 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Lothar Färber an der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg.

Lothar Färber ist Professor am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg sowie als Medizinischer Direktor bei Novartis Pharma GmbH Deutschland angestellt.

Diese Dissertation wurde finanziell durch Novartis Pharma GmbH Deutschland unterstützt. Veronika Wetzl ist seit 1. Mai 2016 bei Novartis Pharma angestellt.

11 Anhang

11.1 Anhang 1 – Einteilung der Matrix-Metalloproteinasen

Gruppen	MMPs
Kollagenasen	MMP1, MMP8, MMP13, MMP18
Gelatinasen	MMP2, MMP9
Stromelysine	MMP3, MMP10, MMP11, MMP19
Membranständige MMPs	MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24, MMP25
Matrilysine	MMP7, MMP26
Andere MMPs	MMP12, MMP20, MMP21, MMP23, MMP27, MMP28

11.2 Anhang 2 – mRNA-Expression

11.2.1 mRNA-Expression nach 7-tägiger UO

WT	unbehandelt	Serelaxin	Zaprinast	Kombination
<i>α-SMA</i>	5,66 ± 0,88 (n=8)	3,31 ± 0,69 (n=7) *	3,66 ± 0,64 (n=13)	4,80 ± 0,90 (n=18)
<i>Fibronektin</i>	3,05 ± 0,55 (n=10)	2,20 ± 0,09 (n=8)	1,97 ± 0,37 (n=12)	1,68 ± 0,25 (n=16) *
<i>Kollagen1A1</i>	14,52 ± 2,96 (n=8)	5,66 ± 1,14 (n=7)	10,69 ± 2,08 (n=12)	16,63 ± 2,52 (n=16)
<i>TGF-β</i>	6,12 ± 0,53 (n=10)	3,98 ± 0,50 (n=9) *	3,64 ± 0,54 (n=11) *	4,22 ± 0,56 (n=17)
<i>MMP2</i>	6,76 ± 0,58 (n=10)	4,25 ± 0,61 (n=9) *	4,95 ± 0,80 (n=12)	4,97 ± 0,85 (n=17)
<i>MMP9</i>	0,88 ± 0,05 (n=9)	0,77 ± 0,07 (n=8)	0,78 ± 0,04 (n=13)	0,78 ± 0,06 (n=18)
cGKI-KO				
<i>α-SMA</i>	2,38 ± 0,43 (n=9)	3,14 ± 0,44 (n=8)	3,27 ± 0,85 (n=7)	2,51 ± 1,04 (n=4)
<i>Fibronektin</i>	1,95 ± 0,32 (n=9)	2,14 ± 0,33 (n=8)	0,98 ± 0,09 (n=7) *	1,94 ± 0,42 (n=4)
<i>Kollagen1A1</i>	5,53 ± 1,39 (n=8)	5,24 ± 0,44 (n=7)	4,37 ± 0,70 (n=7)	5,96 ± 1,80 (n=4)
<i>TGF-β</i>	3,51 ± 0,41 (n=9)	4,73 ± 0,36 (n=8) *	2,71 ± 0,39 (n=7)	3,14 ± 0,82 (n=4)
<i>MMP2</i>	3,85 ± 0,66 (n=9)	3,86 ± 0,35 (n=8)	2,50 ± 0,58 (n=6)	2,95 ± 0,91 (n=4)
<i>MMP9</i>	0,90 ± 0,13 (n=9)	0,72 ± 0,06 (n=8)	0,73 ± 0,07 (n=6)	0,96 ± 0,29 (n=4)

* $p < 0,05$ (bezogen auf die unbehandelte Probe)

11.2.2 mRNA Expression nach 3-tägiger UO

WT	unbehandelt	Serelaxin
<i>α-SMA</i>	7,71 ± 1,61 (n=11)	4,58 ± 0,91 (n=11)
<i>Fibronektin</i>	2,98 ± 0,59 (n=11)	1,59 ± 0,14 (n=11) *
<i>Kollagen1A1</i>	15,36 ± 3,20 (n=11)	9,36 ± 1,85 (n=11)
<i>TGF-β</i>	5,03 ± 0,61 (n=11)	3,79 ± 0,43 (n=11)
<i>MMP2</i>	4,48 ± 0,48 (n=11)	2,85 ± 0,53 (n=11) *
<i>MMP9</i>	0,88 ± 0,04 (n=11)	0,76 ± 0,07 (n=11)
cGKI-KO		
<i>α-SMA</i>	3,07 ± 0,52 (n=4)	6,14 ± 2,51 (n=4)
<i>Fibronektin</i>	0,70 ± 0,11 (n=4)	1,94 ± 0,66 (n=4)
<i>Kollagen1A1</i>	4,87 ± 0,96 (n=4)	14,46 ± 4,79 (n=4)
<i>TGF-β</i>	1,69 ± 0,42 (n=4)	4,09 ± 0,37 (n=4) **
<i>MMP2</i>	1,63 ± 0,91 (n=4)	2,65 ± 0,89 (n=4)
<i>MMP9</i>	0,75 ± 0,17 (n=3)	0,85 ± 0,11 (n=4)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (bezogen auf die unbehandelte Probe)

12 Abkürzungsverzeichnis

6MWD	6-Minuten-Gehtest
α -SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
AC	Adenylatzyklase
AHF	Akute Herzinsuffizienz
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AUC	<i>area under the curve</i>
AT-II	Angiotensin-II
AT2-Rezeptor	Angiotensin-Rezeptor Typ 2
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BNP	B-Typ Natriuretisches Peptid
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-3'5'-Monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat
CI	Herzindex (<i>cardiac index</i>)
CNG-	zyklisches Nukleotid-aktiviert
CO	Herzeitvolumen (<i>cardiac output</i>)
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbant assay</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transformaton
EndMT	endothelial-mesenchymale Transformation
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK1/2	<i>extracellular signal kinase</i> (MAP-Kinase)
ERS	European Respiratory Society

ESC	European Society of Cardiology
ET-1	Endothelin-1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
FC	funktionelle Klasse
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
iPAH	idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KO	<i>knock out</i>
LAP	<i>latency-associated protein</i>
LGR	Relaxin-Rezeptor (früherer Name für RXFP)
LTBP	<i>latent TGF-β binding protein</i>
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MAPK / MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MeCN	Acetonitril
MEK	bestimmte MAPK-Kinase
MeOH	Methanol
MeCN	Acetonitril
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mPAP	mittlerer pulmonalarterieller Druck
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MT-MMP	membranständige MMP
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NT-proBNP	N-terminales pro-BNP
P-	phospho-
PAB	<i>pulmonary artery binding</i>
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAWP	pulmonalarterieller Verschlussdruck
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase

PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
pGC	partikuläre Guanylatzyklase
PH	pulmonale Hypertonie
PH-LHD	pulmonale Hypertonie aufgrund einer Linksherzinsuffizienz
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVR	pulmonalvaskulärer Widerstand
RAP	rechtsatrialer Druck
RLX	humanes Relaxin-2 bzw. Serelaxin
ROC	<i>receiver operating characteristics</i>
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
RT	reverse Transkriptase
RXFP	Relaxin-Rezeptor (<i>relaxin family peptide receptor</i>)
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	Standardfehler
Ser	Serin
sGC	lösliche Guanylatzyklase
Smad	<i>small mothers against decapentaplegic protein</i>
SvO ₂	venöse Sauerstoffsättigung
TAPSE	<i>tricuspid annular plane systolic excursion</i>
TβR	TGF-β Rezeptor
TBST	<i>tris-buffered saline with Tween20</i> – Pufferlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF-β	<i>transforming growth factor-β</i>
TIMP	endogener Inhibitor der MMPs (<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>)
TNF-α	Tumornekrose-Faktor-α
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
uPA	Urokinase
UUO	unilaterale Ureterligation
V1	Visite 1 (Diagnosestellung)
V2	erste Nachfolge-Visite nach Diagnosestellung
VAS	visuelle Analogskala
VASP	vasodilatatorischen Phosphoproteins (<i>vasodilator stimulating phosphoprotein</i>)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

Abkürzungsverzeichnis

WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
ZVD	zentralvenöser Druck

13 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Phasen der physiologischen Wundheilung	6
Abbildung 2 Aktivierung des latenten TGF- β -Komplexes	9
Abbildung 3 Signaltransduktions-Kaskaden von TGF- β	13
Abbildung 4 Struktur der Gelatinasen	14
Abbildung 5 NO-cGMP-Signaltransduktion	17
Abbildung 6 Aminosäuren-Sequenz von humanem und rekombinantem Relaxin-2	21
Abbildung 7 Signaltransduktion von Serelaxin	23
Abbildung 8 antifibrotische Signaltransduktion von Serelaxin am Beispiel der Nierenfibrose.....	29
Abbildung 9 (A) fibrotisches und (B) gesundes Nierengewebe 7 Tage nach unilateraler Ureterligation.....	44
Abbildung 10 cGMP-Konzentrationen im Nierengewebe von WT Mäusen ohne Behandlung sowie nach 7-tägiger Behandlung mit Serelaxin, Zaprinast oder deren Kombination nach UUO.....	72
Abbildung 11 (A) Repräsentativer Immunoblot von unbehandelten oder mit Serelaxin behandelten WT Mäusen 7 Tage nach UUO und (B) Proteinexpression von P-VASP (Ser(239)) in fibrotischem WT und cGKI-KO Mäusen mit bzw. ohne Serelaxin- Behandlung 7 Tage nach UUO	73
Abbildung 12 Einfluss von Serelaxin auf die Proteinexpression von α -SMA in fibrotischem Nierengewebe von WT und cGKI-KO Mäusen nach 3- bzw. 7-tägiger UUO.....	75
Abbildung 13 Einfluss von Serelaxin auf die Proteinexpression von Fibronectin, Kollagen1A1 und Gesamtkollagen in Nierengewebe von WT und cGKI-KO Mäusen	77
Abbildung 14 (A) Repräsentativer Zymographie-Blot (70 μ g Gesamtprotein-Menge) mit fibrotischem und gesundem Nierengewebe eines WT Versuchstiers nach 7-tägiger UUO; (B) Repräsentativer Zymographie-Blot von unbehandeltem und mit Serelaxin behandeltem fibrotischem WT Nierengewebe nach 7-tägiger UUO; Einfluss von Serelaxin auf die Proteinexpression und Aktivität von MMP2 und MMP9 in fibrotischem Nierengewebe von WT und cGKI-KO Mäusen nach 3- [für (C, D)] bzw. 7-[für (E, F)] tägiger UUO	80
Abbildung 15 Repräsentative Immunoblots (jeweils 50 μ g Gesamtprotein-Menge) zur Darstellung der Veränderung von Protein-Expressionsmustern in fibrotischem (nach	

UUO) im Vergleich zu gesundem (kontralateral) WT Gewebe ohne Behandlung nach 7-tägiger Versuchsanordnung.....	81
Abbildung 16 Einfluss von Serelaxin auf die Protein-Expression von eNOS in unbehandelten oder mit Serelaxin behandelten fibrotischen WT und cGKI-KO Mäusen nach 3- bzw. 7-tägiger Versuchsanordnung	83
Abbildung 17 Einfluss von Serelaxin auf die Protein-Expression von PDE5a und P-PDE5a in unbehandelten oder mit Serelaxin behandelten fibrotischen WT und cGKI-KO Mäusen nach 3- bzw. 7-tägiger Versuchsanordnung	84
Abbildung 18 Einfluss von Serelaxin auf die Protein-Expression von TGF- β , P-Smad2, P-ERK1/ERK1 und P-ERK2/ERK2 in unbehandelten oder mit Serelaxin behandelten fibrotischen WT und cGKI-KO Mäusen nach 3- bzw. 7-tägiger Versuchsanordnung.....	86
Abbildung 19 Einfluss von Serelaxin auf die Protein-Expression von CTGF, PAI-1 und TIMP1 in unbehandelten oder mit Serelaxin behandelten fibrotischen WT und cGKI-KO Mäusen nach 3- bzw. 7-tägiger Versuchsanordnung	88
Abbildung 20 Effekt von Serelaxin, Zaprinast und Kombination aus beiden Behandlungen auf die Protein-Expression von α -SMA, Fibronectin, Kollagen1A1 und Gesamtkollagen nach 7-tägiger UUO	90
Abbildung 21 Protein-Aktivität von (A) MMP2 und (B) MMP9 in fibrotischem Nierengewebe von WT und cGKI-KO Versuchstieren in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe (Serelaxin, Zaprinast, Kombination)	92
Abbildung 22 Einfluss von Serelaxin, Zaprinast und Kombination aus beiden Behandlungen auf die Protein-Expression von eNOS in unbehandelten oder behandelten fibrotischen WT und cGKI-KO Mäusen nach 7-tägiger Versuchsanordnung.....	93
Abbildung 23 Einfluss von Serelaxin, Zaprinast und Kombination aus beiden Behandlungen auf die Protein-Expression von TGF- β , P-Smad2, P-ERK1/ERK1 und P-ERK2/ERK2 in unbehandelten oder behandelten fibrotischen WT und cGKI-KO Mäusen nach 7-tägiger Versuchsanordnung.....	95
Abbildung 24 Einfluss von Serelaxin, Zaprinast und Kombination aus beiden Behandlungen auf die Protein-Expression von CTGF in unbehandelten oder behandelten fibrotischen WT und cGKI-KO Mäusen nach 7-tägiger Versuchsanordnung.....	96
Abbildung 25 Chromatogramme von Kreatinin in Plasma von Mäusen.....	97
Abbildung 26 Chromatogramme von Kreatinin in 5 % BSA und Plasma von Mäusen.....	98

Abbildung 27 Kreatinin-Serumkonzentration von WT und cGKI-KO Mäusen unbehandelt bzw. nach 3- oder 7-tägiger Behandlung mit Serelaxin	99
Abbildung 28 Kreatinin Serumkonzentration von WT und cGKI-KO Mäusen unbehandelt bzw. nach 7-tägiger Behandlung mit Serelaxin, Zaprinast oder Kombination aus beiden Behandlungen	100
Abbildung 29 Veränderung der klinischen Parameter (mPAP, PAWP, CI, PVR, 6MWD, BNP, LVEF, TAPSE) jedes einzelnen Patienten von Diagnose (Visite 1; 0 Monate) bis zur Folgevisite V2 in iPAH-Patienten gemäß der jeweiligen Zeitspanne zwischen V1 und V2	106
Abbildung 30 Veränderung der klinischen Parameter (mPAP, PAWP, CI, PVR, 6MWD, BNP, LVEF, TAPSE) jedes einzelnen Patienten von Diagnose (Visite 1, 0 Monate) bis zur Folgevisite V2 in PH-LHD-Patienten gemäß der jeweiligen Zeitspanne zwischen V1 und V2.....	108
Abbildung 31 Veränderung der Biomarker-Verhältnisse MMP2/TIMP1, MMP2/TIMP4, MMP9/TIMP1 und MMP9/TIMP4 jedes einzelnen Patienten von Diagnose (Visite 1, 0 Monate) bis zur Folgevisite V2 für iPAH gemäß der jeweiligen Zeitspanne zwischen V1 und V2	111
Abbildung 32 Veränderung der Biomarker-Verhältnisse MMP2/TIMP1, MMP2/TIMP4, MMP9/TIMP1 und MMP9/TIMP4 jedes einzelnen Patienten von Diagnose (Visite 1, 0 Monate) bis zur Folgevisite V2 für PH-LHD gemäß der jeweiligen Zeitspanne zwischen V1 und V2.....	112
Abbildung 33 Kaplan-Meier Kurve für das Eintreten einer klinischen Verschlechterung (Ereignis) bei iPAH-Patienten (n=24).....	117
Abbildung 34 ROC-Kurve für MMP2/TIMP4 an V2 zur Vorhersage einer klinischen Verschlechterung (Ereignis)	118
Abbildung 35 Kaplan-Meier Kurve für das Eintreten einer klinischen Verschlechterung (Ereignis) bei iPAH-Patienten in Abhängigkeit vom MMP2/TIMP4-Verhältnis an V2.....	119
Abbildung 36 Kaplan-Meier Überlebenskurve für iPAH-Patienten (n=24).....	120
Abbildung 37 ROC-Kurve für MMP2/TIMP4 an V2 zur Vorhersage des Überlebens.....	121
Abbildung 38 Kaplan-Meier Kurve für Überleben bei iPAH-Patienten in Abhängigkeit vom MMP2/TIMP4-Verhältnis an V2	122
Abbildung 39 Histogramm zur Darstellung der Häufigkeiten der jeweiligen Werte von (A) MMP2/TIMP4 und (B) $\log_{10}(\text{MMP2})/\log_{10}(\text{TIMP4} \cdot 1000)$	123

Abbildung 40 Kaplan-Meier Kurve für das Eintreten einer klinischen Verschlechterung (Ereignis) bei PH-LHD-Patienten (n=11)	124
Abbildung 41 Kaplan-Meier Überlebenskurve für PH-LHD-Patienten (n=11)	125
Abbildung 42 Hypothese zur antifibrotischen Signaltransduktion von Serelaxin in der Niere.....	132
Abbildung 43 Hypothese zur kurzfristigen antifibrotischen Signaltransduktion von Serelaxin (nach 3-tägiger Behandlung) in der Niere (rot markiert sind veränderte Regulationen im Vergleich zu 7-tägiger Behandlung).....	135
Abbildung 44 Hypothese zur antifibrotischen Signaltransduktion von Serelaxin (grün) und Zaprinast (blau) nach 7-tägiger Behandlung in der Niere	139

14 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Parameter zur Diagnostik der pulmonalen Hypertonie.....	34
Tabelle 2 Schweregrad der pulmonalen Hypertonie gemäß WHO-Klassifizierung	34
Tabelle 3 Substanzklassen zur Behandlung der PAH.....	36
Tabelle 4 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	44
Tabelle 5 Liste der verwendeten Chemikalien.....	46
Tabelle 6 Liste der verwendeten Geräte	48
Tabelle 7 Liste der verwendeten primären Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie	49
Tabelle 8 Liste der verwendeten sekundären Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie	50
Tabelle 9 Liste der verwendeten Primer-Sequenzen.....	50
Tabelle 10 Liste der verwendeten Puffer und Lösungen	51
Tabelle 11 Bestandteile für den Reverse Transkriptase-Mix	55
Tabelle 12 Zusammensetzung des Tricin-SDS-Polyacrylamidgels.....	57
Tabelle 13 Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels	57
Tabelle 14 Zusammensetzung des Zymographie-Gels	59
Tabelle 15 immunhistochemische Färbungen verschiedener Antikörper.....	61
Tabelle 16 Geräte und Materialien der neu entwickelten HPLC-Methode (Methode B)	63
Tabelle 17 Liste der verwendeten Geräte	65
Tabelle 18 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	65
Tabelle 19 Patientenbezogene Parameter für die Datenauswertung.....	67
Tabelle 20 Einteilung und Interpretation des Spearman-Korrelationskoeffizienten r	70
Tabelle 21 x-fache Proteinexpression von MMPs in fibrotischem Nierengewebe im Vergleich zu gesundem Nierengewebe nach 7-tägiger UUO.....	79
Tabelle 22 x-fache Proteinexpression von Signalproteinen in fibrotischem Nierengewebe im Vergleich zu gesundem Nierengewebe nach 7-tägiger UUO	82
Tabelle 23 Patienten-Charakteristika der iPAH und PH-LHD-Patienten	101
Tabelle 24 Klinische Parameter aus V1 und V2 für Patienten mit iPAH	103
Tabelle 25 Klinische Parameter aus V1 und V2 für Patienten mit PH-LHD	104
Tabelle 26 Plasmaspiegel von MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-4 sowie der jeweiligen MMP/TIMP-Verhältnisse von Visite 1 (V1) und Visite 2 (V2) bei Patienten mit iPAH.....	109

Tabelle 27 Plasmaspiegel von MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-4 sowie der jeweiligen MMP/TIMP-Verhältnisse von Visite 1 (V1) und Visite 2 (V2) bei Patienten mit PH-LHD	110
Tabelle 28 Korrelationen von MMP/TIMP-Verhältnissen mit klinischen Parametern bei V2 für iPAH-Patienten (n=24)	113
Tabelle 29 Korrelationen der relativen Veränderung von MMP/TIMP-Verhältnissen mit klinischen Parametern von V1 bis V2 für iPAH-Patienten (n=24)	114
Tabelle 30 Korrelationen von MMP/TIMP-Verhältnissen mit klinischen Parametern bei V2 für PH-LHD-Patienten.....	115
Tabelle 31 Korrelationen der relativen Veränderung von MMP/TIMP-Verhältnissen mit klinischen Parametern von V1 bis V2 für PH-LHD-Patienten (n=11)	116
Tabelle 32 ROC-Analyse der MMP/TIMP-Verhältnisse an V2 zur Vorhersage von klinischer Verschlechterung in iPAH-Patienten (n=18)	118
Tabelle 33 ROC-Analyse der MMP/TIMP-Verhältnisse an V2 zur Vorhersage des Überlebens in iPAH-Patienten (n=24)	121

15 Literaturverzeichnis

1. Bitterman PB, Henke CA. Fibroproliferative disorders. *Chest* 1991; **99**: 81S-84S.
2. Bathgate RA, Halls ML, van der Westhuizen ET, *et al.* Relaxin family peptides and their receptors. *Physiol Rev* 2013; **93**: 405-480.
3. Hurdman J, Condliffe R, Elliot CA, *et al.* ASPIRE registry: assessing the Spectrum of Pulmonary hypertension Identified at a REferral centre. *Eur Respir J* 2012; **39**: 945-955.
4. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 2004; **9**: 283-289.
5. Shah JM, Omar E, Pai DR, *et al.* Cellular events and biomarkers of wound healing. *Indian J Plast Surg* 2012; **45**: 220-228.
6. Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *JAmSocNephrol* 1996; **7**: 2495-2508.
7. Nagamoto T, Eguchi G, Beebe DC. Alpha-smooth muscle actin expression in cultured lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 1122-1129.
8. MacLean J, Pasumarthi KB. Signaling mechanisms regulating fibroblast activation, phenoconversion and fibrosis in the heart. *Indian J Biochem Biophys* 2014; **51**: 476-482.
9. Strutz F, Muller GA. Interstitial pathomechanisms underlying progressive tubulointerstitial damage. *Kidney Blood Press Res* 1999; **22**: 71-80.
10. Schultz Jel J, Witt SA, Glascock BJ, *et al.* TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin Invest* 2002; **109**: 787-796.
11. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb j* 2004; **18**: 816-827.
12. Saharinen J, Taipale J, Keski-Oja J. Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *EMBO J* 1996; **15**: 245-253.

13. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 1998; **30**: 293-298.
14. Lee MK, Pardoux C, Hall MC, *et al.* TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J* 2007; **26**: 3957-3967.
15. Mu Y, Gudey SK, Landstrom M. Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res* 2012; **347**: 11-20.
16. Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem* 2001; **276**: 17058-17062.
17. Ghosh AK, Quaggin SE, Vaughan DE. Molecular basis of organ fibrosis: potential therapeutic approaches. *Exp Biol Med (Maywood)* 2013; **238**: 461-481.
18. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 2009; **19**: 128-139.
19. Hartsough MT, Mulder KM. Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J Biol Chem* 1995; **270**: 7117-7124.
20. Mucsi I, Skorecki KL, Goldberg HJ. Extracellular signal-regulated kinase and the small GTP-binding protein, Rac, contribute to the effects of transforming growth factor-beta1 on gene expression. *J Biol Chem* 1996; **271**: 16567-16572.
21. Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, *et al.* Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res* 2001; **61**: 4222-4228.
22. Xie L, Law BK, Chytil AM, *et al.* Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia* 2004; **6**: 603-610.
23. Kretschmar M, Doody J, Timokhina I, *et al.* A mechanism of repression of TGFbeta/Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 1999; **13**: 804-816.
24. Liu C, Xu P, Lamouille S, *et al.* TACE-mediated ectodomain shedding of the type I TGF-beta receptor downregulates TGF-beta signaling. *Mol Cell* 2009; **35**: 26-36.
25. Funaba M, Zimmerman CM, Mathews LS. Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem* 2002; **277**: 41361-41368.

26. Matsuura I, Wang G, He D, *et al.* Identification and characterization of ERK MAP kinase phosphorylation sites in Smad3. *Biochemistry* 2005; **44**: 12546-12553.
27. Hall MC, Young DA, Waters JG, *et al.* The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem* 2003; **278**: 10304-10313.
28. Hough C, Radu M, Doré JJE. TGF-Beta Induced Erk Phosphorylation of Smad Linker Region Regulates Smad Signaling. *PLoS ONE* 2012; **7**: e42513.
29. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, *et al.* Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *NephrolDialTransplant* 2006; **21**: 16-20.
30. Rodríguez-Pascual F, Busnadiego O, González-Santamaría J. The profibrotic role of endothelin-1: Is the door still open for the treatment of fibrotic diseases? *Life Sciences* 2014; **118**: 156-164.
31. Muslin AJ. MAPK Signaling in Cardiovascular Health and Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *Clinical science (London, England : 1979)* 2008; **115**: 203-218.
32. Jones SC, Saunders HJ, Pollock CA. High glucose increases growth and collagen synthesis in cultured human tubulointerstitial cells. *Diabet Med* 1999; **16**: 932-938.
33. Rachfal AW, Brigstock DR. Structural and functional properties of CCN proteins. *Vitam Horm* 2005; **70**: 69-103.
34. Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF- β action on fibroblasts. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 1997; **8**: 171-179.
35. Chen Y, Blom IE, Sa S, *et al.* CTGF expression in mesangial cells: Involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC. *Kidney Int* 2002; **62**: 1149-1159.
36. Holmes A, Abraham DJ, Sa S, *et al.* CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* 2001; **276**: 10594-10601.
37. Black SA, Jr., Palamakumbura AH, Stan M, *et al.* Tissue-specific mechanisms for CCN2/CTGF persistence in fibrotic gingiva: interactions between cAMP and MAPK signaling pathways, and prostaglandin E2-EP3 receptor mediated activation of the c-JUN N-terminal kinase. *J Biol Chem* 2007; **282**: 15416-15429.

38. Cicha I, Goppelt-Struebe M. Connective tissue growth factor: context-dependent functions and mechanisms of regulation. *Biofactors* 2009; **35**: 200-208.
39. Grotendorst GR, Duncan MR. Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J* 2005; **19**: 729-738.
40. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, *et al.* Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 599-604.
41. O'Donovan HC, Hickey F, Brazil DP, *et al.* Connective tissue growth factor antagonizes transforming growth factor-beta1/Smad signalling in renal mesangial cells. *Biochem J* 2012; **441**: 499-510.
42. Yang M, Huang H, Li J, *et al.* Tyrosine phosphorylation of the LDL receptor-related protein (LRP) and activation of the ERK pathway are required for connective tissue growth factor to potentiate myofibroblast differentiation. *FASEB J* 2004; **18**: 1920-1921.
43. Nagai N, Klimava A, Lee WH, *et al.* CTGF is increased in basal deposits and regulates matrix production through the ERK (p42/p44mapk) MAPK and the p38 MAPK signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; **50**: 1903-1910.
44. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; **15**: 178-196.
45. Hayashida T, Decaestecker M, Schnaper HW. Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad signaling pathways enhances TGF-beta-dependent responses in human mesangial cells. *FASEB J* 2003; **17**: 1576-1578.
46. Li F, Zeng B, Chai Y, *et al.* The linker region of Smad2 mediates TGF-beta-dependent ERK2-induced collagen synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **386**: 289-293.
47. Burch ML, Zheng W, Little PJ. Smad linker region phosphorylation in the regulation of extracellular matrix synthesis. *Cell Mol Life Sci* 2011; **68**: 97-107.
48. Piek E, Ju WJ, Heyer J, *et al.* Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts. *J Biol Chem* 2001; **276**: 19945-19953.

49. Suzuki H, Uchida K, Nitta K, *et al.* Role of mitogen-activated protein kinase in the regulation of transforming growth factor-beta-induced fibronectin accumulation in cultured renal interstitial fibroblasts. *Clin Exp Nephrol* 2004; **8**: 188-195.
50. Inoki K, Haneda M, Ishida T, *et al.* Role of mitogen-activated protein kinases as downstream effectors of transforming growth factor-beta in mesangial cells. *Kidney Int Suppl* 2000; **77**: S76-80.
51. Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol* 2012; **227**: 493-507.
52. Eddy AA, Fogo AB. Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 2999-3012.
53. Guo B, Inoki K, Isono M, *et al.* MAPK/AP-1-dependent regulation of PAI-1 gene expression by TGF-beta in rat mesangial cells. *Kidney Int* 2005; **68**: 972-984.
54. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962; **48**: 1014-1022.
55. Giannandrea M, Parks WC. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Dis Model Mech* 2014; **7**: 193-203.
56. Kontogiorgis CA, Papaioannou P, Hadjipavlou-Litina DJ. Matrix metalloproteinase inhibitors: a review on pharmacophore mapping and (Q)SARs results. *Curr Med Chem* 2005; **12**: 339-355.
57. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *CircRes* 2003; **92**: 827-839.
58. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000; **14**: 163-176.
59. Oikonomidi S, Kostikas K, Tsilioni I, *et al.* Matrix metalloproteinases in respiratory diseases: from pathogenesis to potential clinical implications. *Curr Med Chem* 2009; **16**: 1214-1228.
60. Greene J, Wang M, Liu YE, *et al.* Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *JBiolChem* 1996; **271**: 30375-30380.

61. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, *et al.* TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; **279**: L562-574.
62. Wang Y, Kramer S, Loof T, *et al.* Enhancing cGMP in experimental progressive renal fibrosis: soluble guanylate cyclase stimulation vs. phosphodiesterase inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; **290**: F167-176.
63. Cui W, Maimaitiyiming H, Qi X, *et al.* Increasing cGMP-dependent protein kinase activity attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; **306**: F996-1007.
64. Schinner E, Schramm A, Kees F, *et al.* The cyclic GMP-dependent protein kinase I α suppresses kidney fibrosis. *Kidney Int* 2013; **84**: 1198-1206.
65. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 1995; **57**: 707-736.
66. Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull* 2004; **62**: 505-515.
67. Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *AnnMed* 2003; **35**: 21-27.
68. Sonnenburg WK, Beavo JA. Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *AdvPharmacol* 1994; **26**: 87-114.
69. Biel M, Michalakis S. Cyclic nucleotide-gated channels. *Handb Exp Pharmacol* 2009; **191**: 111-136.
70. Hofmann F, Bernhard D, Lukowski R, *et al.* cGMP regulated protein kinases (cGK). *HandbExpPharmacol* 2009; **191**: 137-162.
71. Joyce NC, DeCamilli P, Lohmann SM, *et al.* cGMP-dependent protein kinase is present in high concentrations in contractile cells of the kidney vasculature. *J CyclicNucleotideProtein PhosphorRes* 1986; **11**: 191-198.
72. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis--A Common Pathway to Organ Injury and Failure. *N Engl J Med* 2015; **373**: 96.
73. King TE, Jr., Bradford WZ, Castro-Bernardini S, *et al.* A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014; **370**: 2083-2092.

74. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, *et al.* Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014; **370**: 2071-2082.
75. Rosenbloom J, Mendoza FA, Jimenez SA. Strategies for anti-fibrotic therapies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2013; **1832**: 1088-1103.
76. Samuel CS, Summers RJ, Hewitson TD. Antifibrotic Actions of Serelaxin - New Roles for an Old Player. *Trends Pharmacol Sci* 2016; **37**: 485-479.
77. Teerlink JR, Cotter G, Davison BA, *et al.* Serelaxin, recombinant human relaxin-2, for treatment of acute heart failure (RELAX-AHF): a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2013; **381**: 29-39.
78. Metra M, Cotter G, Davison BA, *et al.* Effect of Serelaxin on Cardiac, Renal, and Hepatic Biomarkers in the Relaxin in Acute Heart Failure (RELAX-AHF) Development Program: Correlation With Outcomes. *JAmCollCardiol* 2013; **61**: 196-206.
79. Diez J. Serelaxin: a novel therapy for acute heart failure with a range of hemodynamic and non-hemodynamic actions. *Am J Cardiovasc Drugs* 2014; **14**: 275-285.
80. Novartis: Novartis provides update on Phase III study of RLX030 (serelaxin) in patients with acute heart failure. In (vol 22-03-2017), <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-provides-update-phase-iii-study-rlx030-serelaxin-patients-acute-heart>, Novartis International AG
81. Hisaw FL. The Corpus Luteum Hormone. I. Experimental Relaxation of the Pelvic Ligaments of the Guinea Pig. *PhysiolZool* 1929; **2**: 59-79.
82. Fevoldt H, Hisaw F, Meyer R. The relaxative hormone of the corpus luteum: its purification and concentration. *Journal of the American Chemical Society* 1930; **52**: 3340-3348.
83. Sherwood OD. Relaxin. In: Knobil E, Neill J, Greenwald G, Markert C, *et al.* (eds). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press: New York, 1994, pp 861-1008.
84. Teichman SL, Unemori E, Dschietzig T, *et al.* Relaxin, a pleiotropic vasodilator for the treatment of heart failure. *Heart FailRev* 2009; **14**: 321-329.
85. Cernaro V, Lacquaniti A, Lupica R, *et al.* Relaxin: new pathophysiological aspects and pharmacological perspectives for an old protein. *Med Res Rev* 2014; **34**: 77-105.

86. Hsu SY, Nakabayashi K, Nishi S, *et al.* Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science* 2002; **295**: 671-674.
87. Jelinic M, Leo CH, Post Uiterweer ED, *et al.* Localization of relaxin receptors in arteries and veins, and region-specific increases in compliance and bradykinin-mediated relaxation after in vivo serelaxin treatment. *FASEB J* 2014; **28**: 275-287.
88. Liu C, Chen J, Sutton S, *et al.* Identification of relaxin-3/INSL7 as a ligand for GPCR142. *J Biol Chem* 2003; **278**: 50765-50770.
89. Liu C, Eriste E, Sutton S, *et al.* Identification of relaxin-3/INSL7 as an endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPCR135. *J Biol Chem* 2003; **278**: 50754-50764.
90. Bathgate RA, Ivell R, Sanborn BM, *et al.* International Union of Pharmacology LVII: recommendations for the nomenclature of receptors for relaxin family peptides. *PharmacolRev* 2006; **58**: 7-31.
91. Palejwala S, Stein D, Wojtczuk A, *et al.* Demonstration of a relaxin receptor and relaxin-stimulated tyrosine phosphorylation in human lower uterine segment fibroblasts. *Endocrinology* 1998; **139**: 1208-1212.
92. Zhang Q, Liu SH, Erikson M, *et al.* Relaxin activates the MAP kinase pathway in human endometrial stromal cells. *J Cell Biochem* 2002; **85**: 536-544.
93. Du XJ, Bathgate RA, Samuel CS, *et al.* Cardiovascular effects of relaxin: from basic science to clinical therapy. *NatRevCardiol* 2010; **7**: 48-58.
94. Wang C, Kemp-Harper BK, Kocan M, *et al.* The Anti-fibrotic Actions of Relaxin Are Mediated Through a NO-sGC-cGMP-Dependent Pathway in Renal Myofibroblasts In Vitro and Enhanced by the NO Donor, Diethylamine NONOate. *Frontiers in Pharmacology* 2016; **7**: 91.
95. Chow BS, Chew EG, Zhao C, *et al.* Relaxin signals through a RXFP1-pERK-nNOS-NO-cGMP-dependent pathway to up-regulate matrix metalloproteinases: the additional involvement of iNOS. *PLoSOne* 2012; **7**: e42714.
96. Conrad KP, Novak J. Emerging role of relaxin in renal and cardiovascular function. *AmJPhysiol RegulIntegrComp Physiol* 2004; **287**: R250-R261.

97. Dschietzig T, Bartsch C, Richter C, *et al.* Relaxin, a pregnancy hormone, is a functional endothelin-1 antagonist: attenuation of endothelin-1-mediated vasoconstriction by stimulation of endothelin type-B receptor expression via ERK-1/2 and nuclear factor-kappaB. *CircRes* 2003; **92**: 32-40.
98. Dschietzig T, Bartsch C, Stangl V, *et al.* Identification of the pregnancy hormone relaxin as glucocorticoid receptor agonist. *FASEB J* 2004; **18**: 1536-1538.
99. Schinner E, Wetzl V, Schlossmann J. Cyclic nucleotide signalling in kidney fibrosis. *Int J Mol Sci* 2015; **16**: 2320-2351.
100. Bani G, Maurizi M, Bigazzi M, *et al.* Effects of relaxin on the endometrial stroma. Studies in mice. *Biol Reprod* 1995; **53**: 253-262.
101. Bani G, Bigazzi M, Bani D. The effects of relaxin on the mouse mammary gland. II. The epithelium. *J Endocrinol Invest* 1986; **9**: 145-152.
102. Bani G, Bigazzi M, Bani D. Effects of relaxin on the mouse mammary gland. I. The myoepithelial cells. *J Endocrinol Invest* 1985; **8**: 207-215.
103. Bianchi S, Bani G, Bigazzi M. Effects of relaxin on the mouse mammary gland. III. The fat pad. *J Endocrinol Invest* 1986; **9**: 153-160.
104. Bryant-Greenwood GD, Yamamoto SY, Lowndes KM, *et al.* Human decidual relaxin and preterm birth. *Ann N Y Acad Sci* 2005; **1041**: 338-344.
105. Sherwood OD. Relaxin's physiological roles and other diverse actions. *EndocrRev* 2004; **25**: 205-234.
106. Wolf JM, Cameron KL, Clifton KB, *et al.* Serum relaxin levels in young athletic men are comparable with those in women. *Orthopedics* 2013; **36**: 128-131.
107. Samuel CS, Tian H, Zhao L, *et al.* Relaxin is a key mediator of prostate growth and male reproductive tract development. *Lab Invest* 2003; **83**: 1055-1067.
108. Krajnc-Franken MA, van Disseldorp AJ, Koenders JE, *et al.* Impaired nipple development and parturition in LGR7 knockout mice. *MolCell Biol* 2004; **24**: 687-696.
109. McGuane JT, Debrah JE, Debrah DO, *et al.* Role of relaxin in maternal systemic and renal vascular adaptations during gestation. *AnnNYAcadSci* 2009; **1160**: 304-312.

110. Dschietzig T, Richter C, Bartsch C, *et al.* The pregnancy hormone relaxin is a player in human heart failure. *FASEB J* 2001; **15**: 2187-2195.
111. Hocher B, Ziebig R, Krause R, *et al.* Relaxin is an independent risk factor predicting death in male patients with end-stage kidney disease. *Circulation* 2004; **109**: 2266-2268.
112. Fisher C, Berry C, Blue L, *et al.* N-terminal pro B type natriuretic peptide, but not the new putative cardiac hormone relaxin, predicts prognosis in patients with chronic heart failure. *Heart* 2003; **89**: 879-881.
113. Mazurek JA, Horne BD, Kelesidis I, *et al.* Relaxin levels in pulmonary hypertension: a comparison between pulmonary arterial hypertension and diastolic heart failure-induced pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant* 2013; **32**: 371-374.
114. Bani D, Failli P, Bello MG, *et al.* Relaxin activates the L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle cells in culture. *Hypertension* 1998; **31**: 1240-1247.
115. Jeyabalan A, Novak J, Danielson LA, *et al.* Essential role for vascular gelatinase activity in relaxin-induced renal vasodilation, hyperfiltration, and reduced myogenic reactivity of small arteries. *CircRes* 2003; **93**: 1249-1257.
116. Conrad KP, Debrah DO, Novak J, *et al.* Relaxin modifies systemic arterial resistance and compliance in conscious, nonpregnant rats. *Endocrinology* 2004; **145**: 3289-3296.
117. Davison JM, Noble MC. Serial changes in 24 hour creatinine clearance during normal menstrual cycles and the first trimester of pregnancy. *BrJObstetGynaecol* 1981; **88**: 10-17.
118. Danielson LA, Conrad KP. Time course and dose response of relaxin-mediated renal vasodilation, hyperfiltration, and changes in plasma osmolality in conscious rats. *J ApplPhysiol* 2003; **95**: 1509-1514.
119. Conrad KP, Gandley RE, Ogawa T, *et al.* Endothelin mediates renal vasodilation and hyperfiltration during pregnancy in chronically instrumented conscious rats. *Am J Physiol* 1999; **276**: F767-776.
120. Smith MC, Danielson LA, Conrad KP, *et al.* Influence of recombinant human relaxin on renal hemodynamics in healthy volunteers. *JAmSocNephrol* 2006; **17**: 3192-3197.

121. Voors AA, Dahlke M, Meyer S, *et al.* Renal hemodynamic effects of serelaxin in patients with chronic heart failure: a randomized, placebo-controlled study. *Circ Heart Fail* 2014; **7**: 994-1002.
122. Dschietzig T, Teichman S, Unemori E, *et al.* Intravenous recombinant human relaxin in compensated heart failure: a safety, tolerability, and pharmacodynamic trial. *JCard Fail* 2009; **15**: 182-190.
123. Ponikowski P, Mitrovic V, Ruda M, *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre study to assess haemodynamic effects of serelaxin in patients with acute heart failure. *EurHeart J* 2014; **35**: 431-441.
124. Bani D, Masini E, Bello MG, *et al.* Relaxin protects against myocardial injury caused by ischemia and reperfusion in rat heart. *AmJPathol* 1998; **152**: 1367-1376.
125. Masini E, Bani D, Bello MG, *et al.* Relaxin counteracts myocardial damage induced by ischemia-reperfusion in isolated guinea pig hearts: evidence for an involvement of nitric oxide. *Endocrinology* 1997; **138**: 4713-4720.
126. Perna AM, Masini E, Nistri S, *et al.* Human recombinant relaxin reduces heart injury and improves ventricular performance in a swine model of acute myocardial infarction. *AnnNYAcadSci* 2005; **1041**: 431-433.
127. Moore XL, Tan SL, Lo CY, *et al.* Relaxin antagonizes hypertrophy and apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology* 2007; **148**: 1582-1589.
128. Unemori EN, Erikson ME, Rocco SE, *et al.* Relaxin stimulates expression of vascular endothelial growth factor in normal human endometrial cells in vitro and is associated with menometrorrhagia in women. *Hum Reprod* 1999; **14**: 800-806.
129. Unemori EN, Lewis M, Constant J, *et al.* Relaxin induces vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis selectively at wound sites. *WoundRepair Regen* 2000; **8**: 361-370.
130. Formigli L, Perna AM, Meacci E, *et al.* Paracrine effects of transplanted myoblasts and relaxin on post-infarction heart remodelling. *J Cell Mol Med* 2007; **11**: 1087-1100.
131. Bani D, Nistri S, Formigli L, *et al.* Prominent role of relaxin in improving postinfarction heart remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2009; **1160**: 269-277.

132. Dschietzig T, Bartsch C, Baumann G, *et al.* RXFP1-inactive relaxin activates human glucocorticoid receptor: further investigations into the relaxin-GR pathway. *Regul Pept* 2009; **154**: 77-84.
133. Masini E, Bani D, Bigazzi M, *et al.* Effects of relaxin on mast cells. In vitro and in vivo studies in rats and guinea pigs. *J Clin Invest* 1994; **94**: 1974-1980.
134. Masini E, Nistri S, Vannacci A, *et al.* Relaxin inhibits the activation of human neutrophils: involvement of the nitric oxide pathway. *Endocrinology* 2004; **145**: 1106-1112.
135. Horton JS, Yamamoto SY, Bryant-Greenwood GD. Relaxin modulates proinflammatory cytokine secretion from human decidual macrophages. *Biol Reprod* 2011; **85**: 788-797.
136. Figueiredo KA, Mui AL, Nelson CC, *et al.* Relaxin stimulates leukocyte adhesion and migration through a relaxin receptor LGR7-dependent mechanism. *JBiolChem* 2006; **281**: 3030-3039.
137. Du XJ, Samuel CS, Gao XM, *et al.* Increased myocardial collagen and ventricular diastolic dysfunction in relaxin deficient mice: a gender-specific phenotype. *CardiovascRes* 2003; **57**: 395-404.
138. Samuel CS, Zhao C, Bond CP, *et al.* Relaxin-1-deficient mice develop an age-related progression of renal fibrosis. *Kidney Int* 2004; **65**: 2054-2064.
139. Samuel CS, Zhao C, Bathgate RA, *et al.* Relaxin deficiency in mice is associated with an age-related progression of pulmonary fibrosis. *FASEB J* 2003; **17**: 121-123.
140. Unemori EN, Pickford LB, Salles AL, *et al.* Relaxin induces an extracellular matrix-degrading phenotype in human lung fibroblasts in vitro and inhibits lung fibrosis in a murine model in vivo. *JClinInvest* 1996; **98**: 2739-2745.
141. McDonald GA, Sarkar P, Rennke H, *et al.* Relaxin increases ubiquitin-dependent degradation of fibronectin in vitro and ameliorates renal fibrosis in vivo. *AmJPhysiol Renal Physiol* 2003; **285**: F59-F67.
142. Garber SL, Mirochnik Y, Brecklin CS, *et al.* Relaxin decreases renal interstitial fibrosis and slows progression of renal disease. *Kidney Int* 2001; **59**: 876-882.
143. Garber SL, Mirochnik Y, Brecklin C, *et al.* Effect of relaxin in two models of renal mass reduction. *AmJNephrol* 2003; **23**: 8-12.

144. Lekgabe ED, Kiriazis H, Zhao C, *et al.* Relaxin reverses cardiac and renal fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2005; **46**: 412-418.
145. Xu Q, Lekgabe ED, Gao XM, *et al.* Endogenous relaxin does not affect chronic pressure overload-induced cardiac hypertrophy and fibrosis. *Endocrinology* 2008; **149**: 476-482.
146. Hewitson TD, Mookerjee I, Masterson R, *et al.* Endogenous relaxin is a naturally occurring modulator of experimental renal tubulointerstitial fibrosis. *Endocrinology* 2007; **148**: 660-669.
147. Seibold JR, Korn JH, Simms R, *et al.* Recombinant human relaxin in the treatment of scleroderma. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2000; **132**: 871-879.
148. Khanna D, Clements PJ, Furst DE, *et al.* Recombinant human relaxin in the treatment of systemic sclerosis with diffuse cutaneous involvement: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2009; **60**: 1102-1111.
149. Heeg MH, Koziolok MJ, Vasko R, *et al.* The antifibrotic effects of relaxin in human renal fibroblasts are mediated in part by inhibition of the Smad2 pathway. *Kidney Int* 2005; **68**: 96-109.
150. Mookerjee I, Hewitson TD, Halls ML, *et al.* Relaxin inhibits renal myofibroblast differentiation via RXFP1, the nitric oxide pathway, and Smad2. *FASEB J* 2009; **23**: 1219-1229.
151. Hewitson TD, Ho WY, Samuel CS. Antifibrotic properties of relaxin: in vivo mechanism of action in experimental renal tubulointerstitial fibrosis. *Endocrinology* 2010; **151**: 4938-4948.
152. Masterson R, Hewitson TD, Kelynack K, *et al.* Relaxin down-regulates renal fibroblast function and promotes matrix remodelling in vitro. *NephrolDialTransplant* 2004; **19**: 544-552.
153. Unemori EN, Amento EP. Relaxin modulates synthesis and secretion of procollagenase and collagen by human dermal fibroblasts. *JBiolChem* 1990; **265**: 10681-10685.
154. Samuel CS, Unemori EN, Mookerjee I, *et al.* Relaxin modulates cardiac fibroblast proliferation, differentiation, and collagen production and reverses cardiac fibrosis in vivo. *Endocrinology* 2004; **145**: 4125-4133.

155. Chow BS, Kocan M, Bosnyak S, *et al.* Relaxin requires the angiotensin II type 2 receptor to abrogate renal interstitial fibrosis. *Kidney Int* 2014; **86**: 75-85.
156. Huang X, Gai Y, Yang N, *et al.* Relaxin regulates myofibroblast contractility and protects against lung fibrosis. *AmJ Pathol* 2011; **179**: 2751-2765.
157. Sassoli C, Chellini F, Pini A, *et al.* Relaxin prevents cardiac fibroblast-myofibroblast transition via notch-1-mediated inhibition of TGF-beta/Smad3 signaling. *PLoSOne* 2013; **8**: e63896.
158. Zhou X, Chen X, Cai JJ, *et al.* Relaxin inhibits cardiac fibrosis and endothelial-mesenchymal transition via the Notch pathway. *Drug Des Devel Ther* 2015; **9**: 4599-4611.
159. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, *et al.* 2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation. *JAmCollCardiol* 2009; **53**: e1-e90.
160. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, *et al.* 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2016; **37**: 2129-2200.
161. Gheorghiade M, Filippatos G, De LL, *et al.* Congestion in acute heart failure syndromes: an essential target of evaluation and treatment. *AmJMed* 2006; **119**: S3-S10.
162. Bock JS, Gottlieb SS. Cardiorenal syndrome: new perspectives. *Circulation* 2010; **121**: 2592-2600.
163. Teerlink JR, Metra M, Felker GM, *et al.* Relaxin for the treatment of patients with acute heart failure (Pre-RELAX-AHF): a multicentre, randomised, placebo-controlled, parallel-group, dose-finding phase IIb study. *Lancet* 2009; **373**: 1429-1439.
164. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, *et al.* 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* 2015; **46**: 903-975.
165. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; **54**: S43-54.
166. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013; **62**: D34-41.
167. Galie N, Hoeper MM, Humbert M, *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *EurRespirJ* 2009; **34**: 1219-1263.
168. Bazan IS, Fares WH. Pulmonary hypertension: diagnostic and therapeutic challenges. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2015; **11**: 1221-1233.
169. Chin KM, Kim NH, Rubin LJ. The right ventricle in pulmonary hypertension. *Coron Artery Dis* 2005; **16**: 13-18.
170. Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A, *et al.* The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest* 2009; **135**: 794-804.
171. Molaug M, Geiran O, Stokland O, *et al.* Dynamics of the interventricular septum and free ventricular walls during blood volume expansion and selective right ventricular volume loading in dogs. *Acta Physiol Scand* 1982; **116**: 245-256.
172. Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, *et al.* Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation* 2006; **114**: 1883-1891.
173. Haddad F, Kudelko K, Mercier O, *et al.* Pulmonary Hypertension Associated With Left Heart Disease: Characteristics, Emerging Concepts, and Treatment Strategies. *Progress in Cardiovascular Diseases* 2011; **54**: 154-167.
174. Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJ, *et al.* An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2007; **30**: 104-109.
175. Hoeper MM, Huscher D, Pittrow D. Incidence and prevalence of pulmonary arterial hypertension in Germany. *Int J Cardiol* 2016; **203**: 612-613.

176. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, *et al.* Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 1991; **115**: 343-349.
177. Barst RJ, Chung L, Zamanian RT, *et al.* Functional class improvement and 3-year survival outcomes in patients with pulmonary arterial hypertension in the REVEAL Registry. *Chest* 2013; **144**: 160-168.
178. 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**: 164-172.
179. 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**: 589-596.
180. Sitbon O, Humbert M, Nunes H, *et al.* Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol* 2002; **40**: 780-788.
181. 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**: 865-870.
182. Leuchte HH, Holzapfel M, Baumgartner RA, *et al.* Clinical significance of brain natriuretic peptide in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; **43**: 764-770.
183. Forfia PR, Fisher MR, Mathai SC, *et al.* Tricuspid annular displacement predicts survival in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; **174**: 1034-1041.
184. Sitbon O, McLaughlin VV, Badesch DB, *et al.* Survival in patients with class III idiopathic pulmonary arterial hypertension treated with first line oral bosentan compared with an historical cohort of patients started on intravenous epoprostenol. *Thorax* 2005; **60**: 1025-1030.
185. 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**: 402-409.

186. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002; **90**: 520-530.
187. Benisty JI, Folkman J, Zurakowski D, *et al.* Matrix metalloproteinases in the urine of patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2005; **128**: 572S-572S.
188. Schumann C, Lepper PM, Frank H, *et al.* Circulating biomarkers of tissue remodelling in pulmonary hypertension. *Biomarkers* 2010; **15**: 523-532.
189. Safdar Z, Tamez E, Chan W, *et al.* Circulating collagen biomarkers as indicators of disease severity in pulmonary arterial hypertension. *JACC Heart Fail* 2014; **2**: 412-421.
190. Qipshidze N, Tyagi N, Metreveli N, *et al.* Autophagy mechanism of right ventricular remodeling in murine model of pulmonary artery constriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; **302**: H688-H696.
191. Schafer S, Ellinghaus P, Janssen W, *et al.* Chronic inhibition of phosphodiesterase 5 does not prevent pressure-overload-induced right-ventricular remodeling. *Cardiovasc Res* 2009; **82**: 30-39.
192. Morin C, Hiram R, Rousseau E, *et al.* Docosapentaenoic acid monoacylglyceride reduces inflammation and vascular remodeling in experimental pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014; **307**: H574-586.
193. Bai Y, Wang HM, Liu M, *et al.* 4-Chloro-DL-phenylalanine protects against monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling and lung inflammation. *Int J Mol Med* 2014; **33**: 373-382.
194. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2009; **75**: 1145-1152.
195. Wetzl V, Schinner E, Kees F, *et al.* Involvement of cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase I in renal antifibrotic effects of serelaxin. *Frontiers in Pharmacology* 2016; **7**: 195.
196. Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, *et al.* Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J* 1998; **17**: 3045-3051.
197. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; **162**: 156-159.

198. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protocols* 2006; **1**: 581-585.
199. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: e45.
200. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998; **24**: 954-958, 960, 962.
201. Burnette WN. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 1981; **112**: 195-203.
202. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**: 3116-3120.
203. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.
204. Kyhse-Andersen J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984; **10**: 203-209.
205. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry* 1980; **102**: 196-202.
206. Yuen PS, Dunn SR, Miyaji T, *et al.* A simplified method for HPLC determination of creatinine in mouse serum. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **286**: F1116-1119.
207. Dunn SR, Qi Z, Bottinger EP, *et al.* Utility of endogenous creatinine clearance as a measure of renal function in mice. *Kidney Int* 2004; **65**: 1959-1967.
208. Fountain KJ, Kloss A, Garibyan I, *et al.* Analysis of creatinine in mouse and rat serum by ion exchange high performance liquid chromatography for in vivo studies of renal function. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; **846**: 245-251.

209. Fegler G. Measurement of cardiac output in anaesthetized animals by a thermodilution method. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 1954; **39**: 153-164.
210. Mukaka MM. A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal : The Journal of Medical Association of Malawi* 2012; **24**: 69-71.
211. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; **39**: S1-266.
212. Masaki T, Foti R, Hill PA, *et al.* Activation of the ERK pathway precedes tubular proliferation in the obstructed rat kidney. *Kidney Int* 2003; **63**: 1256-1264.
213. Pat B, Yang T, Kong C, *et al.* Activation of ERK in renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction: modulation by antioxidants. *Kidney Int* 2005; **67**: 931-943.
214. Chevalier RL. Pathogenesis of renal injury in obstructive uropathy. *Curr Opin Pediatr* 2006; **18**: 153-160.
215. Huuskes BM, Wise AF, Cox AJ, *et al.* Combination therapy of mesenchymal stem cells and serelaxin effectively attenuates renal fibrosis in obstructive nephropathy. *FASEB J* 2015; **29**: 540-553.
216. Dahlke M, Ng D, Yamaguchi M, *et al.* Safety and tolerability of serelaxin, a recombinant human relaxin-2 in development for the treatment of acute heart failure, in healthy Japanese volunteers and a comparison of pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy Japanese and Caucasian populations. *J Clin Pharmacol* 2015; **55**: 415-422.
217. Wang-Rosenke Y, Mika A, Khadzhynov D, *et al.* Stimulation of Soluble Guanylate Cyclase Improves Renal Recovery After Relief of Unilateral Ureteral Obstruction. *The Journal of Urology* 2011; **186**: 1142-1149.
218. Rodriguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, *et al.* Early treatment with cGMP phosphodiesterase inhibitor ameliorates progression of renal damage. *Kidney Int* 2005; **68**: 2131-2142.
219. Bae EH, Kim IJ, Joo SY, *et al.* Renoprotective effects of sildenafil in DOCA-salt hypertensive rats. *Kidney Blood Press Res* 2012; **36**: 248-257.
220. Kamat AA, Feng S, Bogatcheva NV, *et al.* Genetic targeting of relaxin and insulin-like factor 3 receptors in mice. *Endocrinology* 2004; **145**: 4712-4720.

221. Samuel CS, Royce SG, Chen B, *et al.* Relaxin family peptide receptor-1 protects against airway fibrosis during homeostasis but not against fibrosis associated with chronic allergic airways disease. *Endocrinology* 2009; **150**: 1495-1502.
222. Halls ML, Bathgate RA, Sutton SW, *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCV. Recent advances in the understanding of the pharmacology and biological roles of relaxin family peptide receptors 1-4, the receptors for relaxin family peptides. *Pharmacol Rev* 2015; **67**: 389-440.
223. McGuane JT, Debrah JE, Sautina L, *et al.* Relaxin induces rapid dilation of rodent small renal and human subcutaneous arteries via PI3 kinase and nitric oxide. *Endocrinology* 2011; **152**: 2786-2796.
224. Morisada N, Nomura M, Nishii H, *et al.* Complete disruption of all nitric oxide synthase genes causes markedly accelerated renal lesion formation following unilateral ureteral obstruction in mice in vivo. *J Pharmacol Sci* 2010; **114**: 379-389.
225. Hohenstein B, Daniel C, Wittmann S, *et al.* PDE-5 inhibition impedes TSP-1 expression, TGF- β activation and matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2008; **23**: 3427-3436.
226. Thomas MK, Francis SH, Corbin JD. Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP. *J Biol Chem* 1990; **265**: 14971-14978.
227. Rybalkin SD, Rybalkina IG, Feil R, *et al.* Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2002; **277**: 3310-3317.
228. Francis SH, Busch JL, Corbin JD, *et al.* cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* 2010; **62**: 525-563.
229. Corbin JD, Turko IV, Beasley A, *et al.* Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 2760-2767.
230. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 753-791.
231. Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P. Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Mol Cell Biol* 2008; **28**: 511-527.

232. Busca R, Christen R, Lovern M, *et al.* ERK1 and ERK2 present functional redundancy in tetrapods despite higher evolution rate of ERK1. *BMC Evol Biol* 2015; **15**: 179.
233. Fremin C, Saba-EI-Leil MK, Levesque K, *et al.* Functional Redundancy of ERK1 and ERK2 MAP Kinases during Development. *Cell Rep* 2015; **12**: 913-921.
234. Guegan JP, Fremin C, Baffet G. The MAPK MEK1/2-ERK1/2 Pathway and Its Implication in Hepatocyte Cell Cycle Control. *Int J Hepatol* 2012; **2012**: 328372.
235. Nekrasova T, Shive C, Gao Y, *et al.* ERK1-deficient mice show normal T cell effector function and are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2005; **175**: 2374-2380.
236. Pages G, Guerin S, Grall D, *et al.* Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 1999; **286**: 1374-1377.
237. Saba-EI-Leil MK, Vella FD, Vernay B, *et al.* An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep* 2003; **4**: 964-968.
238. Fremin C, Ezan F, Guegan JP, *et al.* The complexity of ERK1 and ERK2 MAPKs in multiple hepatocyte fate responses. *J Cell Physiol* 2012; **227**: 59-69.
239. Roskoski R, Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 2012; **66**: 105-143.
240. Beyer C, Zenzmaier C, Palumbo-Zerr K, *et al.* Stimulation of the soluble guanylate cyclase (sGC) inhibits fibrosis by blocking non-canonical TGFbeta signalling. *Ann Rheum Dis* 2015; **74**: 1408-1416.
241. Ronco P, Lelongt B, Piedagnel R, *et al.* Matrix metalloproteinases in kidney disease progression and repair: a case of flipping the coin. *Semin Nephrol* 2007; **27**: 352-362.
242. Cheng S, Pollock AS, Mahimkar R, *et al.* Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury. *FASEB J* 2006; **20**: 1898-1900.
243. Tan TK, Zheng G, Hsu TT, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 of tubular and macrophage origin contributes to the pathogenesis of renal fibrosis via macrophage recruitment through osteopontin cleavage. *Lab Invest* 2013; **93**: 434-449.

244. Samuel CS, Hewitson TD, Zhang Y, *et al.* Relaxin ameliorates fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Endocrinology* 2008; **149**: 3286-3293.
245. Matsuo S, Lopez-Guisa JM, Cai X, *et al.* Multifunctionality of PAI-1 in fibrogenesis: evidence from obstructive nephropathy in PAI-1-overexpressing mice. *Kidney Int* 2005; **67**: 2221-2238.
246. Samuel CS, Hewitson TD, Unemori EN, *et al.* Drugs of the future: the hormone relaxin. *Cell MolLife Sci* 2007; **64**: 1539-1557.
247. Lee SY, Kim SI, Choi ME. Therapeutic targets for treating fibrotic kidney diseases. *Transl Res* 2015; **165**: 512-530.
248. Yokoi H, Mukoyama M, Nagae T, *et al.* Reduction in connective tissue growth factor by antisense treatment ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 1430-1440.
249. Cochrane AL, Kett MM, Samuel CS, *et al.* Renal Structural and Functional Repair in a Mouse Model of Reversal of Ureteral Obstruction. *Journal of the American Society of Nephrology* 2005; **16**: 3623-3630.
250. Metra M. *Effects of serelaxin on blood pressure: results from the RELAX-AHF Trial.* ESC Heart Failure: Lisbon, Portugal, 2013.
251. Ibrahim MA, Satoh N, Ueda S. Possible impact of nitric oxide on the antihypertensive effect of captopril and zaprinast. *Adv Ther* 2003; **20**: 143-148.
252. Kotera J, Fujishige K, Omori K. Immunohistochemical localization of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in rat tissues. *J Histochem Cytochem* 2000; **48**: 685-693.
253. Francis SH, Corbin JD. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol* 1994; **56**: 237-272.
254. Wang X, Ward CJ, Harris PC, *et al.* Cyclic nucleotide signaling in polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2010; **77**: 129-140.
255. D'Andrea MR, Qiu Y, Haynes-Johnson D, *et al.* Expression of PDE11A in normal and malignant human tissues. *J Histochem Cytochem* 2005; **53**: 895-903.

256. Sun XZ, Li ZF, Liu Y, *et al.* Inhibition of cGMP phosphodiesterase 5 suppresses matrix metalloproteinase-2 production in pulmonary artery smooth muscles cells. *ClinExpPharmacolPhysiol* 2010; **37**: 362-367.
257. Kuo L, Chang HC, Leu TH, *et al.* Src oncogene activates MMP-2 expression via the ERK/Sp1 pathway. *J Cell Physiol* 2006; **207**: 729-734.
258. Takimoto E, Champion HC, Li M, *et al.* Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2005; **11**: 214-222.
259. Kiss T, Kovacs K, Komocsi A, *et al.* Novel mechanisms of sildenafil in pulmonary hypertension involving cytokines/chemokines, MAP kinases and Akt. *PLoS One* 2014; **9**: e104890.
260. Kasiske BL, Keane WF. Laboratory assessment of renal disease: clearance, urinalysis, and renal biopsy. In: Brenner & Rector's The Kidney. In: Brenner B (ed). *Brenner & Rector's The Kidney*. Saunders: Philadelphia, 1996, pp 1137-1174.
261. Owen LJ, Wear JE, Keevil BG. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for serum creatinine and comparison with enzymatic and Jaffe methods. *Ann Clin Biochem* 2006; **43**: 118-123.
262. Ou M, Song Y, Li S, *et al.* LC-MS/MS Method for Serum Creatinine: Comparison with Enzymatic Method and Jaffe Method. *PLoS One* 2015; **10**: e0133912.
263. Kremer H, Baron-Menguy C, Tesse A, *et al.* Human serum albumin improves endothelial dysfunction and survival during experimental endotoxemia: concentration-dependent properties. *Crit Care Med* 2011; **39**: 1414-1422.
264. Zhao L, Sun LN, Nie HB, *et al.* Berberine improves kidney function in diabetic mice via AMPK activation. *PLoS One* 2014; **9**: e113398.
265. Breyer MD, Qi Z. Better nephrology for mice--and man. *Kidney Int* 2010; **77**: 487-489.
266. Honma S, Shinohara M, Takahashi N, *et al.* Effect of cyclooxygenase (COX)-2 inhibition on mouse renal interstitial fibrosis. *Eur J Pharmacol* 2014; **740**: 578-583.
267. Li J, Gu T, Fu X, *et al.* Effect of salviannic acid A and C compatibility on inflammatory cytokines in rats with unilateral ureteral obstruction. *J Tradit Chin Med* 2015; **35**: 564-570.

268. Hu N, Duan J, Li H, *et al.* Hydroxysafflor Yellow A Ameliorates Renal Fibrosis by Suppressing TGF-beta1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *PLoS One* 2016; **11**: e0153409.
269. Bersani-Amado LE, Dantas JA, Damiao MJ, *et al.* Involvement of cytokines in the modulation and progression of renal fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction in C57BL/6 mice: effects of thalidomide and dexamethasone. *Fundam Clin Pharmacol* 2016; **30**: 35-46.
270. Zhao XF, Liu YH, Han ZM, *et al.* Effect of erythropoietin on the expression of dynamin-related protein-1 in rat renal interstitial fibrosis. *Exp Ther Med* 2015; **9**: 2065-2071.
271. Bogdan M, Humbert M, Francoal J, *et al.* Urinary cGMP concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Thorax* 1998; **53**: 1059-1062.
272. Wiedemann R, Ghofrani HA, Weissmann N, *et al.* Atrial natriuretic peptide in severe primary and nonprimary pulmonary hypertension: response to iloprost inhalation. *J Am Coll Cardiol* 2001; **38**: 1130-1136.
273. Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, *et al.* Lung cGMP release subsequent to NO inhalation in pulmonary hypertension: responders versus nonresponders. *Eur Respir J* 2002; **19**: 664-671.
274. 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.
275. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, *et al.* Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur Respir J* 2009; **34**: 888-894.
276. Vachiery JL, Adir Y, Barbera JA, *et al.* Pulmonary hypertension due to left heart diseases. *J Am Coll Cardiol* 2013; **62**: D100-108.
277. Hopps E, Caimi G. Matrix metalloproteases as a pharmacological target in cardiovascular diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; **19**: 2583-2589.
278. Hiremath J, Thanikachalam S, Parikh K, *et al.* Exercise improvement and plasma biomarker changes with intravenous treprostinil therapy for pulmonary arterial hypertension: a placebo-controlled trial. *J Heart Lung Transplant* 2010; **29**: 137-149.
279. Farrero M, Blanco I, Battle M, *et al.* Pulmonary hypertension is related to peripheral endothelial dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail* 2014; **7**: 791-798.

280. Polyakova V, Hein S, Kostin S, *et al.* Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure-overloaded human myocardium during heart failure progression. *JAmCollCardiol* 2004; **44**: 1609-1618.
281. Polyakova V, Loeffler I, Hein S, *et al.* Fibrosis in endstage human heart failure: severe changes in collagen metabolism and MMP/TIMP profiles. *IntJCardiol* 2011; **151**: 18-33.
282. Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, *et al.* Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1998; **97**: 1708-1715.
283. Provencher S, Sitbon O, Humbert M, *et al.* Long-term outcome with first-line bosentan therapy in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J* 2006; **27**: 589-595.
284. McLaughlin VV, Shillington A, Rich S. Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. *Circulation* 2002; **106**: 1477-1482.
285. Schermuly RT, Yilmaz H, Ghofrani HA, *et al.* Inhaled iloprost reverses vascular remodeling in chronic experimental pulmonary hypertension. *AmJRespirCrit Care Med* 2005; **172**: 358-363.
286. Badier-Commander C, Verbeuren T, Lebard C, *et al.* Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins: a possible explanation for extracellular matrix accumulation. *J Pathol* 2000; **192**: 105-112.
287. Muller M, Trocme C, Lardy B, *et al.* Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet Med* 2008; **25**: 419-426.
288. Chiang TY, Yu YL, Lin CW, *et al.* The circulating level of MMP-9 and its ratio to TIMP-1 as a predictor of severity in patients with community-acquired pneumonia. *Clin Chim Acta* 2013; **424**: 261-266.
289. Chaudhuri R, McSharry C, Brady J, *et al.* Low sputum MMP-9/TIMP ratio is associated with airway narrowing in smokers with asthma. *Eur Respir J* 2014; **44**: 895-904.
290. Tency I, Verstraelen H, Kroes I, *et al.* Imbalances between matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in maternal serum during preterm labor. *PLoS One* 2012; **7**: e49042.

291. Wang Y, Han DD, Wang HM, *et al.* Downregulation of osteopontin is associated with fluoxetine amelioration of monocrotaline-induced pulmonary inflammation and vascular remodelling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; **38**: 365-372.
292. Junbao D, Hui Y, Bing W, *et al.* Effect of L-arginine on collagen of high flow-induced pulmonary arterial remodeling. *Circ J* 2005; **69**: 603-608.
293. Hamada K, Nagai S, Tanaka S, *et al.* Significance of pulmonary arterial pressure and diffusion capacity of the lung as prognosticator in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2007; **131**: 650-656.
294. Kovacs G, Maier R, Aberer E, *et al.* Borderline pulmonary arterial pressure is associated with decreased exercise capacity in scleroderma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; **180**: 881-886.
295. McLaughlin VV, Sitbon O, Badesch DB, *et al.* Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2005; **25**: 244-249.
296. Bai Y, Sun L, Hu S, *et al.* Combination therapy in pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis. *Cardiology* 2011; **120**: 157-165.
297. Park MH, Scott RL, Uber PA, *et al.* Usefulness of B-type natriuretic peptide as a predictor of treatment outcome in pulmonary arterial hypertension. *Congest Heart Fail* 2004; **10**: 221-225.
298. Hoeper MM, Oudiz RJ, Peacock A, *et al.* End points and clinical trial designs in pulmonary arterial hypertension: clinical and regulatory perspectives. *J Am Coll Cardiol* 2004; **43**: 48S-55S.
299. Hassoun PM, Nikkho S, Rosenzweig EB, *et al.* Updating clinical endpoint definitions. *Pulmonary Circulation* 2013; **3**: 206-216.
300. Ploegstra MJ, Douwes JM, Roofthoof MT, *et al.* Identification of treatment goals in paediatric pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2014; **44**: 1616-1626.
301. Samad BA, Alam M, Jensen-Urstad K. Prognostic impact of right ventricular involvement as assessed by tricuspid annular motion in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2002; **90**: 778-781.

302. Zile MR, Desantis SM, Baicu CF, *et al.* Plasma biomarkers that reflect determinants of matrix composition identify the presence of left ventricular hypertrophy and diastolic heart failure. *CircHeart Fail* 2011; **4**: 246-256.
303. Butler J, Chomsky DB, Wilson JR. Pulmonary hypertension and exercise intolerance in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1999; **34**: 1802-1806.
304. Abramson SV, Burke JF, Kelly JJ, Jr., *et al.* Pulmonary hypertension predicts mortality and morbidity in patients with dilated cardiomyopathy. *Ann Intern Med* 1992; **116**: 888-895.
305. Aronson D, Eitan A, Dragu R, *et al.* Relationship between reactive pulmonary hypertension and mortality in patients with acute decompensated heart failure. *Circ Heart Fail* 2011; **4**: 644-650.
306. Miller WL, Grill DE, Borlaug BA. 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**: 290-299.
307. Tampakakis E, Leary PJ, Selby VN, *et al.* The diastolic pulmonary gradient does not predict survival in patients with pulmonary hypertension due to left heart disease. *JACC Heart Fail* 2015; **3**: 9-16.
308. Al-Naamani N, Preston IR, Paulus JK, *et al.* Pulmonary Arterial Capacitance Is an Important Predictor of Mortality in Heart Failure With a Preserved Ejection Fraction. *JACC Heart Fail* 2015; **3**: 467-474.
309. Ali MA, Fan X, Schulz R. Cardiac sarcomeric proteins: novel intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in heart disease. *Trends Cardiovasc Med* 2011; **21**: 112-118.
310. Schulze CJ, Wang W, Suarez-Pinzon WL, *et al.* Imbalance between tissue inhibitor of metalloproteinase-4 and matrix metalloproteinases during acute myocardial [correction of myoctardial] ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2003; **107**: 2487-2492.
311. Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, *et al.* Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 2002; **106**: 1543-1549.
312. Sawicki G, Leon H, Sawicka J, *et al.* Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. *Circulation* 2005; **112**: 544-552.

313. Koskivirta I, Kassiri Z, Rahkonen O, *et al.* Mice with tissue inhibitor of metalloproteinases 4 (Timp4) deletion succumb to induced myocardial infarction but not to cardiac pressure overload. *J Biol Chem* 2010; **285**: 24487-24493.
314. Mujumdar VS, Smiley LM, Tyagi SC. Activation of matrix metalloproteinase dilates and decreases cardiac tensile strength. *IntJCardiol* 2001; **79**: 277-286.
315. Bigg HF, Morrison CJ, Butler GS, *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 2001; **61**: 3610-3618.
316. Hernandez-Barrantes S, Shimura Y, Soloway PD, *et al.* Differential roles of TIMP-4 and TIMP-2 in pro-MMP-2 activation by MT1-MMP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **281**: 126-130.
317. English JL, Kassiri Z, Koskivirta I, *et al.* Individual Timp deficiencies differentially impact pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem* 2006; **281**: 10337-10346.
318. Deschamps AM, Yarbrough WM, Squires CE, *et al.* Trafficking of the membrane type-1 matrix metalloproteinase in ischemia and reperfusion: relation to interstitial membrane type-1 matrix metalloproteinase activity. *Circulation* 2005; **111**: 1166-1174.
319. Dixon JA, Gaillard WF, 2nd, Rivers WT, *et al.* Heterogeneity in MT1-MMP activity with ischemia-reperfusion and previous myocardial infarction: relation to regional myocardial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; **299**: H1947-1958.
320. Mannello F. Serum or plasma samples? The "Cinderella" role of blood collection procedures: preanalytical methodological issues influence the release and activity of circulating matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors, hampering diagnostic trueness and leading to misinterpretation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28**: 611-614.
321. Jung K, Klotzek S, Stephan C, *et al.* Impact of blood sampling on the circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 3, 7, 8, and 9. *ClinChem* 2008; **54**: 772-773.
322. Tozzi CA, Poiani GJ, McHugh NA, *et al.* Recombinant human relaxin reduces hypoxic pulmonary hypertension in the rat. *Pulm Pharmacol Ther* 2005; **18**: 346-353.
323. Schinner E, Wetzl V, Schramm A, *et al.* Inhibition of the TGF β signalling pathway by cGMP and cGMP-dependent kinase I in renal fibrosis. *FEBS Open Bio* 2017; **7**: 550-561.

324. Wetzl V, Schinner E, Kees F, *et al.* Differences in the renal antifibrotic cGMP/cGKI-dependent signaling of serelaxin, zaprinast, and their combination. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2017.
325. Wetzl V, Tiede SL, Faerber L, *et al.* Plasma MMP2/TIMP4 Ratio at Follow-up Assessment Predicts Disease Progression of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Lung* 2017; **195**: 489-496.