

Aus der Medizinischen Klinik m. S.
Kardiologie und Angiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Erhöhte endogene Relaxin Expression
im Myokard spontan-hypertensiver
Ratten:
Auswirkungen auf Inotropie und
myokardiale Hypertrophie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Hans-Tilman Kinkel
Spraitbach

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. Th. Dschietzig
2. Prof. Dr. med. J. Scholze
3. Priv.-Doz. Dr. med. M. Heringlake

Datum der Promotion: 29.09.2008

Zusammenfassende Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den endogenen myokardialen Spiegeln und den inotropen Effekten des Peptidhormons Relaxin und ihren Veränderungen im Gefolge einer Myokardhypertrophie bei arteriellem Hypertonus. Die Untersuchungen werden am Modell der spontan-hypertensiven Ratte durchgeführt.

Relaxin ist ein vor 80 Jahren erstmals beschriebenes Peptidhormon. Wurden zunächst umfassende Einflüsse auf das Bindegewebe, die Uterusmuskulatur und die Brustdrüse während der Schwangerschaft entdeckt und Relaxin als „Schwangerschaftshormon“ klassifiziert, so fand man in den letzten dreißig Jahren zahlreiche Effekte von Relaxin auf Hypophyse, das Gefäßsystem, die Nierenfunktion, das Herz und die Blutgerinnung sowie Effekte auf das Bindegewebe auch außerhalb der Schwangerschaft.

2001 wurde Relaxin als kompensatorischer Mediator im komplexen Zusammenspiel zahlreicher neurohumoraler Faktoren im Rahmen der Herzinsuffizienz beim Menschen beschrieben.

Eine Hypertrophie des Herzmuskels als Antwort auf erhöhte hämodynamische Belastung des Herzens wird durch eine Vielzahl verschiedener physiologischer (Sportler) und pathologischer Stimuli ausgelöst.

In den letzten Jahren zeigte sich zunehmend, dass auch die nichtmyozytären Anteile des Herzens, also insbesondere die Fibroblasten mit der von ihnen regulierten extrazellulären Matrix (ECM), einen wesentlichen Anteil an dem zunächst physiologischen, dann jedoch verhängnisvollen Umbau des Herzens im Rahmen der sich entwickelnden Herzinsuffizienz haben.

Sind Hypertrophie der Myozyten und Fibrose des Herzens möglicherweise zunächst als eine vorteilhafte Anpassung anzusehen, so sind sie im weiteren Verlauf verbunden mit einer Erhöhung des Risikos für die Entwicklung einer diastolischen und systolischen Herzinsuffizienz und maligner Herzrhythmusstörungen.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals nachgewiesen, dass die linksatriale und linksventrikuläre Relaxinexpression bei spontan-hypertensiven Ratten (SHR)

verglichen mit normotensiven Artgenossen auf mRNA- und rRLX-3-Protein-Ebene erhöht ist und innerhalb der Gruppe der SHR invers mit der ventrikulären und atrialen Myokardmasse korreliert.

Positiv inotrope Effekte von Relaxin auf atriales, nicht aber auf ventrikuläres Myokard, konnten bestätigt werden und unterschieden sich – im Gegensatz zu den deutlich verminderten positiv-inotropen Wirkungen des β -Agonisten Isoprenalin - in der Gruppe der SHR nicht von den positiv-inotropen Effekten in der Kontrollgruppe.

Damit gelang erstmals im Tiermodell der Nachweis einer erhaltenen atrialen positiven Inotropie durch Relaxin bei chronischer Hypertonie und Hypertrophie.

Die Befunde weisen darauf hin, dass die erhöhte endogene linkskardiale Relaxinexpression bei chronischer arterieller Hypertension der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie/Fibrose entgegenwirkt.

1. Relaxin.....	10
1.1. Geschichte des Relaxins	10
1.2. Struktur	11
1.3. Gen-Expression und Synthese	12
1.4. Relaxin-Rezeptoren	13
1.5. Signaltransduktion:	15
1.6. Relaxin: Wirkungen.....	18
1.6.1. Reproduktionstrakt.....	18
1.6.2. Bindegewebe	19
1.6.3. Gehirn/Hypophyse	20
1.6.4. kardiovaskuläre Effekte und renale Effekte	20
1.6.4.1. vaskuläre Effekte	20
1.6.4.2. renale Effekte.....	20
1.6.4.3. kardiale Effekte	21
1.6.5. Blutgerinnung	23
1.6.6. Lunge.....	23
2. Myokardiale Hypertrophie.....	24
2.1. Bedeutung der Myokardhypertrophie.....	24
2.2. Molekulare Signalwege.....	25
2.2.1. Calcineurin-NFAT-Kaskade	25
2.2.2. PI3K/Akt/GSK-3-Kaskade.....	26
2.2.3. MEF2/HDAC	26
2.2.4. Die G-Protein-gekoppelten Wege	27
2.2.5. MAP-Kinasen-Kaskaden.....	28
2.2.6. Proteinkinase C (PKC).....	29
2.2.7. Gp130/STAT3.....	29
3. Myokardiale Fibrose	30

3.1. Einleitung.....	30
4. Relaxin und Myokardhypertrophie/-fibrose	33
4.1. Relaxin und Myokardhypertrophie	33
4.2. Relaxin und Myokardfibrose	34
5. Material und Methoden.....	36
5.1. Tiere	36
5.2. Messung der Blutdrücke	36
5.3. Organentnahme und atriale und ventrikuläre Muskelstreifenpräparationen.....	37
5.3.1. Reagenzien	37
5.3.2. Arbeitsschritte.....	38
5.3.3. Stimulation mit exogenem Relaxin.....	40
5.3.4. Stimulation mit exogenem Isoproterenol.....	41
5.4. Bestimmung der Massen	41
5.5. Gen-Expression von rRLX-3 (PCR für mRNA)	42
5.5.1. Reagenzien	42
5.5.2. Arbeitsschritte	43
5.6. Nachweis von rRLX-3-Peptid (Western-Blot).....	44
5.6.1. Reagenzien	45
5.6.2. Arbeitsschritte	48
5.7. Statistische Methoden	50
6. Ergebnisse.....	52
6.1. Tiergewichte	52
6.2. Systolischer Blutdruck	53
6.3. Inotrope Effekte von Relaxin und Isoprenalin	54
6.4. Organgewichte des Herzens	57
6.5. RLX-mRNA- und rRLX-3-Proteinkonzentrationen	58
6.6. Korrelation von Massenindex und Proteinkonzentration.....	62
7. Diskussion	63

8. Literatur	68
9. Tabellenanhang	84
10. Danksagung	97
11. Eidesstattliche Erklärung	98
12. Lebenslauf	99

Abkürzungsverzeichnis:

- β -MHC β -major histocompatibility complex
- ACE angiotensin converting enzyme
- ANP atrial natriuretic peptide
- APS Ammoniumpersulfat
- AT-II Angiotensin II
- BDM butanedione monoxime
- BFGF basic fibroblast growth factor
- Big-ET big endothelin
- CaMK Ca-Calmodulin dependent proteinkinase
- cAMP cyclic adenosine monophosphate
- cDNA complementary deoxyribonucleic acid
- c-JUN protoonkogen c-Jun
- cGMP cyclic guanosine monophosphate
- c-myc Onkogen c-myc
- Da Dalton
- DCMP Dilatative Kardiomyopathie
- DNA deoxyribonucleic acid
- DTT Dithiotreitol
- ECM extrazelluläre Matrix
- EDTA ethylenediamine tetraacetic acid
- ERK extracellular (signal) regulated kinase
- ET-1 Endothelin-1
- ET_A Endothelin-Rezeptor A
- ET_B Endothelin-Rezeptor B
- FSH Follikelstimulierendes Hormon
- GAPDH Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
- GFR glomeruläre Filtrationsrate
- Gp130 glycoproteine 130
- GPCR G protein-coupled receptor
- GR Glukokortikoidrezeptor
- GSK-3 β glycogen synthase kinase 3 β
- H1 humanes Relaxin 1
- H2 humanes Relaxin 2
- H3 humanes Relaxin 3
- HDAC Histon-Deacetylase
- ICMP ischämische Kardiomyopathie
- IGF-1 insulin like growth factor 1
- IL-1 Interleukin 1
- IL-6 Interleukin 6
- INSL insulin-like peptide
- I κ B Inhibitor κ B
- JNK jun N-terminal kinase
- LDLa low density lipoprotein a
- LGR leucin-rich G protein-coupled receptor (alter Name des RXFP)
- LH Lutenisierendes Hormon
- LRR leucin-rich region

- M Mol/l
- MEF2 myocyte enhancing factor 2
- MEK-1 MAPK/ERK-Kinase 1
- MEKK-1 MAPK/ERK-Kinase-Kinase 1
- MAPK mitogen activated protein kinase
- MMP matrix metalloproteinase
- mRNA messenger ribonucleic acid
- NFκB nuclear factor κB
- NFAT nuclear factor of activated T-cells
- NOSIII nitric oxide synthase III
- NPR-A natriuretic peptide receptor A
- NYHA I-IV New York Heart Association I-IV Classification
- OD optische Dichte
- p38-MAPK p38-mitogen-activated protein-kinase
- PC-1/2 prohormone convertase 1/2
- PCNA proliferating cell nuclear antigen
- PCR polymerase chain reaction
- PDE Phosphodiesterase
- PI3K Phosphoinositide-3-Kinase
- PKA Proteinkinase A
- PKCξ Proteinkinase C ξ
- PLC Phospholipase C
- Raf-1 Raf-1 (mitogen activated protein kinase kinase kinase of ERK)
- RLN Relaxingen
- RLX Relaxin
- RLX(-/-) Relaxin-„knock-out“-Maus
- rRLX Relaxin (Ratte)
- rRLX-3 Relaxin-3 (Ratte)
- RNA Riboukleinsäure
- ROS reaktive Sauerstoffradikale
- rpm Umdrehungen pro Minute
- RXFP Relaxin-Rezeptor (neue Bezeichnung)
- SD Standardabweichung
- SDS sodium dodecyl sulfate
- SHR spontan-hypertensive Ratten
- SMA α smooth muscle actin α
- STAT signal transducers and activators of transcription
- TAK1 TGF activated kinase 1
- TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
- TGFβ transforming growth factor β
- THP-1 human acute monocytic leukemia cell line
- TIMP tissue inhibitor of metalloproteinases
- TNFα- tumor necrosis factor α
- TPA tissue plasminogen activator
- TSH Thyroidea-stimulierendes Hormon
- VEGF vascular endothelium growth factor
- WKY Wistar-Kyoto-Ratte

1. Relaxin

1.1. Geschichte des Relaxins

1926 erschien in der Zeitschrift „Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine“ ein Beitrag von Frederick Hisaw, in dem dieser folgendes Experiment veröffentlichte: er hatte nichtschwangeren weiblichen Meerschweinchen das Serum von schwangeren Artgenossinnen injiziert und beobachtet, dass sich daraufhin das Ligamentum interpubicum der nichtschwangeren Tiere verlängerte (1). Auf der Suche nach dem dafür verantwortlichen Stoff gelang es ihm und seinen Mitarbeitern in den folgenden Jahren, aus dem Corpus luteum schwangerer Säue eine Substanz zu isolieren, die Proteineigenschaften aufwies und auf das Ligamentum interpubicum die zuvor beschriebene verlängernde Wirkung hatte. Er nannte diese Substanz „Relaxin“.

In den folgenden Jahrzehnten wurden weitere Eigenschaften des Relaxins entdeckt: 1945 zeigte Hamolsky, dass Relaxin bei Ratten die Entwicklung der Brustdrüse fördert (2); 1950 zeigte Krantz, dass Relaxin einen wehenhemmenden Effekt auf den Uterus ausübt (3) und 1953 fand Graham, dass die Gabe von Relaxin bei Schweinen das Gewebe der Cervix uteri weicher machte (4).

Eine erste Nachweismethode für Relaxin etablierte 1960 Steinetz, der das Maß der verlängernden Wirkung von Relaxin auf das Ligamentum interpubicum bei Mäusen als proportional der Relaxinkonzentration erkannte und hierüber einen Bioassay entwickelte (5).

In den Siebzigerjahren des 20. Jahrhunderts gelang die Entwicklung zuverlässiger Methoden zur Isolation und Aufreinigung von Relaxin (6,7), sodass durch die nunmehr verfügbaren größeren Mengen des isolierten Proteins 1976 und 1977 Schwabe und James in voneinander unabhängigen Arbeitsgruppen die Entschlüsselung der Aminosäuresequenz von Schweinerelaxin gelang (8,9). Ebenfalls in diese Dekade fiel die Entwicklung ständig verbesserter Radioimmunoassays (RIAs) zum quantitativen Nachweis von Relaxin in Konzentrationsbereichen, die dem Bioassay bis dahin entgangen waren (10,11) und die letztlich die Bestimmung der Relaxinplasmaspiegel auch beim Menschen ermöglichten (12).

Während sich die Forschung zunächst ganz auf Relaxin als Schwangerschaftshormon konzentrierte, fand man in den vergangenen 25 Jahren Relaxineffekte auf eine Vielzahl von Zielorganen und Organsystemen.

Waren in den Achtzigerjahren des vergangenen Jahrhunderts zunächst zwei Isoformen beim Menschen (H1 und H2) und die dazu gehörigen Gene von Hudson und Crawford beschrieben worden (13,14), wies Bathgate 2001 die Existenz einer dritten Relaxinform (H3) beim Menschen nach (15).

Konnten Buellbach und Schwabe in den Jahren 1988 bis 2001 die Rezeptorbindungsstellen von Relaxin definieren (16,17,18), so blieb die Entdeckung der zwei spezifischen Relaxinrezeptoren LGR7 und LGR8 (heute als RXFP-1 und RXFP-2 bezeichnet) der Arbeitsgruppe um Hsu im Jahre 2002 vorbehalten (19).

Im Folgenden wird eine kurze Übersicht über das derzeitige Wissen in Bezug auf Struktur, Expression und Synthese, Rezeptoren und Signaltransduktion sowie biologische Wirkungen des Relaxins gegeben.

1.2. Struktur

Humanes Relaxin, ein etwa 6000 Da großes Peptid, gehört in eine Gruppe strukturell ähnlicher Peptide. Diese Peptidfamilie, die „relaxin like peptide family“ umfasst nach dem derzeitigen Stand sieben Mitglieder: die drei Relaxine 1-3 (H1-H3-Relaxine), sowie die vier „insulin-like-peptides 3-6“ (INSL 3-6) (20).

Die Relaxine bestehen aus zwei Peptidketten, A- und B-Kette, die kovalent über zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Charakteristisch ist ferner eine Disulfidbrücke innerhalb der A-Kette. Im Menschen – wie auch bei Primaten, nicht aber bei anderen Säugetieren – sind drei verschiedene Relaxine bekannt: RLX1, RLX2 und RLX3. Beim Menschen werden die entsprechenden Formen H1-, H2- bzw. H3-Relaxin bezeichnet. Bei anderen Säugetieren wie Mäusen, Ratten, Eseln und Meerschweinchen sind bisher nur zwei Relaxine (1 und 3) nachgewiesen, (wobei H2-RLX dem Relaxin-1 der Nichtprimaten entspricht.). Die Primärstrukturen von RLX1 und RLX2 wurden bereits 1983 und 1984 von Hudson et al. vorgelegt (13,14), die Primärstruktur von RLX3 durch seine Entdecker um Bathgate im Jahr 2002 (15).

Während die Aminosäuresequenzen der Relaxine bei unterschiedlichen Spezies nur eine Homologie von 30-70% aufweisen, lassen sich die charakteristischen

Disulfidbrücken bei allen Relaxinen zeigen, sodass von einer sehr ähnlichen Tertiärstruktur ausgegangen werden kann. Innerhalb der B-Kette liegt die Rezeptorbindungsstelle (18).

1.3. Gen-Expression und Synthese

Die Gene für Relaxin werden mit den Abkürzungen RLN1, RLN2 und RLN3 bezeichnet. Die Gen-Produkte, also die Relaxinpeptide, werden bei menschlichen Relaxinen H1-Relaxin, H2-Relaxin und H3-Relaxin genannt (wobei „h“ für „human“ steht).

Ratten haben zwei bekannte Relaxine, die als R1 (bzw. rRLX-1) und R3 (bzw. rRLX-3) bezeichnet werden.

Die menschlichen Relaxingene RLN1 und RLN2 liegen nebeneinander auf dem 9. Chromosom (9p24) (13,14), während RLN3 auf Chromosom 19 lokalisiert ist (19p13.3) (15).

Relaxin wird primär als Prä-Pro-Relaxin transkribiert und translatiert, im Cytoplasma durch Abspaltung eines vorgeschalteten sogenannten „Signalpeptides“ zu Pro-Relaxin prozessiert und durch Abspaltung des die A- und B-Kette zunächst noch verbindenden C-Peptides, wahrscheinlich vermittelt der Prohormon-Convertase-1 (eventuell auch der PC-2), zum reifen Relaxin überführt (21,22).

Die Transkription von H1 ist heute in Prostata, Dezidua und Trophoblast, Brustdrüse, Herz und Gefäßwand (23,24,25) nachgewiesen. Der Nachweis einer H1-Translation in diesen Geweben ist nach wie vor nicht gelungen – sei es, weil ausreichend sensitive Nachweismethoden fehlen, sei es, weil sie nicht stattfindet.

Die Transkription und auch Translation des H2 lässt sich in Corpus luteum, Endometrium, Dezidua, Plazenta, Trophoblast, Brustdrüse und Prostata (22,23,26,27,28,29,30) nachweisen. Dschietzig wies 2001 die von Taylor und Clark bereits 1994 teilweise vermutete H2-Expression und –Sekretion in Kardiomyozyten und Gefäßwand nach (25,31).

Über die Expression des H3-Genes beim Menschen liegt bisher nur die Arbeit von Bathgate vor, in der schwache Transkription in mehreren Organen des Menschen gezeigt wurde (15).

In Ratten lässt sich ferner in verschiedenen Regionen des Gehirns Expression beider RLX-Isoformen (rRLX-1 und rRLX-3) nachweisen (15,21,31,32,33,34). Die Expression von rRLX-3, nicht aber von rRLX-1 konnte von Kompra (35) in Vorhof und Ventrikel des Rattenherzen nachgewiesen werden. Taylor wies 1994 rRLX-Sekretion in atrialen Rattenkardiomyozyten nach (31).

Im Blut zirkulierend wurde beim Menschen bisher nur H2 nachgewiesen (20). Daher wird in dieser Arbeit auf den Menschen bezogen, sofern nicht anders bezeichnet, unter „Relaxin“ stets H2-RLX verstanden. Es scheint allerdings durchaus möglich, dass die anderen Relaxinformen dem Nachweis im Blut bisher lediglich methodenbedingt entgangen sind.

Auf die Ratte bezogen wird –sofern nicht anders gekennzeichnet – unter „Relaxin“ das dem H2-RLX entsprechende rRLX-3 verstanden.

Die höchsten Plasmaspiegel (bis 1ng/ml) werden beim Menschen während der 10.-12. Schwangerschaftswoche gefunden. Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft fällt die Konzentration auf ca. 400 pg/ml (36,37,38). Außerhalb der Schwangerschaft erreichen die Plasmaspiegel von Relaxin bei prämenopausalen Frauen in den letzten Tagen prae menstruationem mit 50 pg/ml die höchsten Werte, während sie bei postmenopausalen Frauen und bei Männern deutlich unter 5 pg/ml liegen (25,39). Dschietzig zeigte 2001 bei Patienten mit Herzinsuffizienz (DCMP und ICMP, klinisch Stadien NYHA II-IV) in Abhängigkeit von der Schwere der Herzinsuffizienz eine signifikante Erhöhung der RLX-Plasmaspiegel auf bis zu 16fache Werte gesunder Kontrollpersonen (absolut maximal 50 pg/ml) (20,25).

Während über die Regulation der Relaxinexpression in den Reproduktionsorganen wenig bekannt ist (Östrogen verstärkt die durch den Prolaktinrezeptor medierte Induktion im Corpus luteum ohne selbst induktiv zu wirken (40); LH induziert RLX in Granulosazellen präovulatorischer Follikel (41); Choriogonadotropin stimuliert die RLX-Produktion im Corpus luteum (42)), sind über die Regulation der RLX-Expression in Nichtreproduktionsorganen bisher keine Veröffentlichungen zu finden.

1.4. Relaxin-Rezeptoren

2002 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Hsu die Entdeckung von Rezeptoren für Liganden aus der Familie der „relaxin like peptides“ (19). Diese Rezeptoren gehören

- ursprünglich als LGR7 und LGR8 bezeichnet - zur Familie der „leucin rich G protein coupled receptors“ (LGR), von denen jeweils spezifische Subtypen auch als Rezeptoren für FSH, LH und TSH fungieren. Zunächst erkannte die Arbeitsgruppe um Hsu 2003, dass LGR8 als Rezeptor für INSL3 dient, während LGR7 den Rezeptor für H2-Relaxin darstellt (43). Im Jahr 2003 veröffentlichte Liu die Annahme, dass für H3 die „G protein coupled receptors 135 und 142“ (GPCR 135/142) als spezifische Rezeptoren anzusehen sein könnten (44,45). In den nächsten Jahren wurde GPCR142 als INSL5-Rezeptor definiert, GPCR135 als Rezeptor für H3-Relaxin (46).

2006 schlug Bathgate auf der International Union of Pharmacology LVII folgende Neubezeichnung für die Rezeptoren der „relaxin like peptide“-Familie vor (46):

Neuer Name	Ehemaliger Name	Agonistischer Ligand
RXFP1	LGR7	H2-RLX > H1-RLX > H3-RLX >> INSL3
RXFP2	LGR8	INSL3 > H2-RLX = H1-RLX >> H3-RLX
RXFP3	GPCR135	H3-RLX
RXFP4	GPCR142	INSL5 = H3-RLX

In dieser Arbeit wird nur auf den RXFP1 eingegangen, und die anhängigen Signaltransduktionswege werden – soweit bekannt – beschrieben.

Die Struktur des 757 Aminosäuren großen Rezeptors ist schematisch wie folgt aufgebaut:

- C-terminales Ende, intrazellulär
- 7 transmembranöse Domänen
- „hinge-like region“
- cystatin rich cap
- 10 leucine rich repeats
- cystatin-rich cap
- LDLa Module

Anders als Rezeptoren der Insulin-Peptide (die Thyrosinkinase-Rezeptoren ansteuern) sind die RXFP1 (und auch -2) G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die sowohl eine cAMP-Akkumulation via Aktivierung der Adenylatcyclase, wie auch eine Stimulation der Proteinkinase A (PKA) erzeugen können. Einzelheiten folgen weiter unten.

An der Bindung des Liganden an den LRR-Regionen sind z.T. die transmembranösen (insb. exoloop2) und auch die hinge-like Region beteiligt, wenngleich nicht essentiell, wohingegen die LDLa-Region der Ektodomäne essentiell für die Signaltransduktion nach intrazellulär ist (47).

Über das Vorkommen des RXFP1 (LGR7)-Rezeptors ist bisher bekannt, dass zumindest eine Expression des Genes in Rattenkardiomyozyten und –fibroblasten des Herzen ventrikulär und atrial stattfindet (35,48). Ferner ist die Expression in endometrialen Stromazellen und Stromazellen der Brustdrüse, Placenta, in Lebersternzellen, Gehirn und Arterien nachgewiesen (49,50,51,52,53,54)

Als weiterer – völlig andersartiger – Rezeptor steht der Glukokortikoidrezeptor (GR) dem Relaxin als Bindungsstelle zur Verfügung. Der GR ist ein intrazellulärer Rezeptor. Durch Bindung mit Relaxin wird dieser Ligand-Rezeptor-Komplex nach intranukleär transferiert und aktiviert. Auf diesem Wege kann Relaxin die TNF α -, IL-1 und IL-6-Synthese in Makrophagen supprimieren (55). Der Weg, auf dem Relaxin in die Zelle eintritt, ist bisher nicht geklärt.

Relaxin vermag im Tierexperiment die Entwicklung einer experimentell erzeugten Pankreatitis abzuschwächen. Hier wies Cosen-Binker nach, dass sowohl der NO-abhängige, als auch der GR-abhängige Signalweg eine Rolle spielen, jedoch auch ein weiterer – bisher unbekannter – Signalweg involviert ist, da Relaxin anti-pankreatitisch auch noch bei Blockade der zwei erstgenannten Wege wirkt (56).

1.5. Signaltransduktion

Ein wohl etablierter Weg der Signaltransduktion ist die Erhöhung der cAMP-Spiegel im Cytoplasma der RXFP1-tragenden Zellen (57,58,59,60,61) in unterschiedlichen Geweben unterschiedlicher Spezies. Auch die von Toth 1996 nachgewiesene Wirkung des Relaxins auf die ANP-Produktion in Rattenherzen ist cAMP-abhängig (62), ebenso wie die VEGF-Erhöhung durch Relaxin in Wundrändern (63,64).

Der Weg, auf dem Relaxin die Erhöhung des cAMP-Spiegels erreicht, ist derzeit nicht

umfassend geklärt. Dessauer und Nguyen beschrieben 2004 und 2005, dass zum einen die direkte RXFP1-Aktivierung zu einer schnellen Aktivierung der Adenylatzyklase führt. Dieser in wenigen Minuten ablaufenden Aktivierung kann eine zweite nach 15-20 Minuten folgen, die wohl durch eine Veränderung der Kopplung des RXFP1 von G_S -Kopplung zu G_I -Kopplung bedingt ist. Infolge der Aktivierung von G_I kommt es zu einer Aktivierung der Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K), die in der Folge zu einer Translokation der Proteinkinase C ξ (PKC ξ) in die Zellmembran mit erneuter Aktivierung der Adenylatzyklase führt (65,66).

Eine Stimulation von RXFP2 durch H2-Relaxin oder INSL3 führt zu einer G_S -vermittelten cAMP-Erhöhung und einer G_o -vermittelten Hemmung der cAMP-Freisetzung in HEK293T-Zellen. Eine zweite, verzögerte Wirkung konnte für den RXFP2-abhängigen Signalweg nicht nachgewiesen werden (66).

In männlichen und weiblichen Keimzellen sowie Oozyten konnte Kawamura 2004 eine RXFP2- G_I -vermittelte cAMP-Absenkung nachweisen (67).

Toth wies am isolierten Rattenherzen nach, dass durch Blockade der PKC mit Staurosporin der positiv chronotrope Effekt von Relaxin und die Stimulation der ANP-Freisetzung aus dem Herzen komplett gehemmt werden können. Durch Blockade des Calcium/Calmodulin-Signalwegs konnte der positiv chronotrope Effekt von RLX inkomplett gehemmt werden, der Effekt auf die ANP-Freisetzung blieb unbeeinflusst (62).

Bartsch und Ivell zeigten in Endometriumzellen und der menschlichen Monozyten-Makrophagen-Zelllinie THP-1, dass über eine Stimulation des Rezeptors mit Relaxin auch eine Aktivierung einer Thyrosinkinase erfolgen kann, die ihrerseits über eine Hemmung der Phosphodiesterase (insbesondere PDE4) cAMP intrazellulär zu erhöhen vermag (68,69).

In endometrialen Stromazellen und THP-1-Zellen beschreibt Bartsch 2004 eine RLX-vermittelte cAMP-Erhöhung, die über eine Phosphodiesterasehemmung ausgelöst zu werden scheint (70). Nguyen hatte allerdings einen Einfluss von PDE-Blockierung auf cAMP-Erhöhung nach RXFP-1-mediierter RLX-Stimulation nicht finden können (71).

Palejwala beschrieb 1998 und 2001, dass in menschlichen Fibroblasten des unteren Uterus-Segments eine Stimulation mit Relaxin zu einer Stimulation von Thyrosinkinasen und der Serin-Threonin-Kinase c-Raf ohne intracelluläre cAMP-Erhöhung führt, nimmt jedoch die c-Raf-vermittelte Aktivierung der mitogen-

aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskade (MEK-ERK1/2) an (72,73).

Ein weiterer - völlig anderer - Mechanismus der Signaltransduktion wurde in den Neunzigerjahren des vergangenen Jahrhunderts von Masini 1994 (in Mastzellen von Ratten und Meerschweinchen) (74), Bani-Sacchi (Meerschweinchen- und Rattenmyozyten) (75) und später auch von Bani (76,77,78,79) in anderen Geweben gefunden: ein NO-abhängiger Signalweg. Dabei scheinen die Details, wie Relaxin zu einer erhöhten NO-Produktion führt, von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich zu sein. Nistri und Bani zeigten 2003, dass über den Weg RXFP1 – G-Protein – PI3-K – Akt eine NOSIII-Aktivierung erzeugt werden kann, und über den Weg RXFP1 – cAMP-Erhöhung – Proteinkinase A (PKA) – Inaktivierung von I κ B und Aktivierung von NF- κ B eine gesteigerte NOSII-Expression zustande kommen kann. NO selbst führt dann einer cGMP-Erhöhung intrazellulär (80).

Novak beschrieb 2002, dass die verminderte myogene Reaktivität renaler Arterien bei RLX-behandelten Ratten durch NO und den ET_B-Rezeptor vermittelt wird (81).

Dschietzig beschrieb 2003 in endothelialen (Nabelschnurvene) und epithelialen (HeLa) Zellen eine NF κ B-vermittelte Stimulation der ET_B-Expression durch Relaxin. Diese erhöhte Expression wird durch einen Ras-unabhängigen Raf-1-MEK-1-ERK-1/2-NF κ B-Signalweg vermittelt. In glatten Gefäßmuskelzellen, in denen die Stimulation von ET_B-Rezeptoren zu vasokonstriktischen Wirkungen führt, blieb die Expression des Rezeptors durch Relaxin unbeeinflusst (82).

Zhang konnte 2002 in der THP-1-Zelllinie ebenfalls die Existenz einer RLX-ERK1/2-Kaskade nachweisen, wiesen aber keinen Einfluss auf den PI3K-Akt-Signalweg nach. Zhang ging nicht auf Endothelin ein (83).

Jüngst wies Anand-Ivell in THP-1-Zellen (nicht aber in transfizierten HEK293T-Zellen) einen RXFP-1-abhängigen Tyrosinkinaseweg für Relaxin nach, der weder PKA, noch den MAPK-Signalweg, noch PI3K als intrazellulären Signalweg verwendet. Dieser Befund unterstreicht, dass in verschiedenen Zelltypen die RXFP-1-Stimulation durch Relaxin unterschiedliche intrazelluläre Signalwege anspricht (84).

Ein Mechanismus, der von Jeyabalan und Novak 2004 enthüllt wurde, ist so zu beschreiben: Über eine Aktivierung der Matrix-Metallo-Proteinase 2 (MMP2) durch Relaxin wird vermehrt big-Endothelin (big-ET) zu aktivem Endothelin (ET) prozessiert, welches über eine Aktivierung der Endothelinrezeptoren B (ET_B) in Endothelzellen (arteriolär) zu einer verstärkten Aktivierung der NOSIII führt (85).

Palejwala hatte bereits in der oben erwähnten Arbeit 2001 einen Tyrosinkinase-abhängigen Weg zur Erhöhung der MMP-Expression in Zellen des unteren Uterinsegments beim Menschen nachweisen können, ohne dabei aber auf Endothelin als weiteren Faktor einzugehen (73).

Ebenfalls mit dem Einfluss von Relaxin auf die Expression von MMPs befasst sich Ho, der in THP-1 eine Erhöhung der MMP-9-Expression, nicht aber der MMP-2-Expression nachweisen konnte. Er weist nach, dass dieser Effekt in diesen Zellen über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB vermittelt wird (86).

Die endotheliale Stimulation von ET_B-Rezeptoren führt zu einer NO- und prostacyclinvermittelten Vasodilatation, ferner fungiert der ET_B-Rezeptor als Clearancerezeptor für Endothelin-1 und reduziert dadurch die ET-1-vermittelten vasokonstriktorischen Effekte an glatten Gefäßmuskelzellen (87).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Enthüllung der RLX-abhängigen Signalwege sicher noch am Beginn steht, bereits jetzt aber eine außergewöhnliche Vielfalt in Abhängigkeit vom betreffenden Gewebe und möglicherweise auch von der untersuchten Spezies zu Tage tritt.

1.6. Relaxin: Wirkungen

1.6.1. Reproduktionstrakt

Die Wirkungen als Schwangerschaftshormon sind mannigfaltig. Umfassende Übersichten bieten (88,89,90,91,92).

In Kürze: Relaxin führt durch Veränderung der extrazellulären Matrix zu einer Erweichung des Ligamentum interpubicum und der Cervix uteri (73,93).

Relaxin befördert die Dezidualisation - zumindest auch - durch Induktion von Prolaktin (94). Ferner erleichtert es die Einnistung einer befruchteten Eizelle (95). Am Menschen ist die Wehen hemmende Wirkung, die Relaxin bei verschiedenen anderen Spezies hat, nicht deutlich nachweisbar. Sehr wohl aber fördert Relaxin das Wachstum und die Differenzierung der weiblichen Brustdrüse auch beim Menschen in der Schwangerschaft (2,96,97,98).

1.6.2. Bindegewebe

Nachdem die Erweichung des Ligamentum interpubicum die zu seiner Entdeckung führende Wirkung des Relaxins ist, wurden die Wirkungen auf das Bindegewebe sehr umfangreich untersucht. Too et al. zeigten 1984, dass Relaxin die Freisetzung von tissue plasminogen activator (TPA), Kollagenase und Proteoglykanase aus Rattengranulosazellen erhöht (99). Relaxin vermag die Sekretion von MMP in verschiedenen Geweben zu erhöhen und die Expression von TIMP zu supprimieren, und damit letztlich den Kollagengehalt der Gewebe zu verringern (73).

Unemori zeigte eine Reduktion der Expression von TIMP und der Kollagensynthese bei Hautfibroblasten unter dem Einfluss von Relaxin (100). In einer weiteren Arbeit zeigt Unemori wenig später, dass die Kollagen I- und III-Synthese auch in Lungenfibroblasten durch Relaxin gehemmt wird (über eine Hemmung der Kollagensyntheseaktivierung durch TGF β und Steigerung der MMP-1-Synthese) (101). Palejwala zeigte 2001 in Fibroblasten des menschlichen Uterus die Erhöhung von MMP1-3 und die Reduktion von TIMP-1 auf mRNA- und Proteinebene durch Relaxin (73).

Zusammenfassend liegen bisher zahlreiche Befunde aus verschiedenen Geweben verschiedener Spezies vor, die einhellig eine Reduktion der Kollagensynthese und eine direkte oder indirekte Aktivierung kollagenabbauender Systeme (MMPs) durch Relaxin zeigen.

In-vivo-Versuche von Unemori (1996) konnten zeigen, dass Relaxin die Entstehung einer bleomycininduzierten Lungenfibrose in Kaninchen zu unterdrücken vermag (101). Gleiches fand seine Arbeitsgruppe 2001 für die Nephrosklerose und die Hepatosklerose (102,103).

Der Versuch, Relaxin als Therapeutikum bei systemischer Sklerodermie des Menschen zu etablieren, scheiterte trotz initial vielversprechender Ergebnisse. Signifikante Wirkungen in adäquaten Dosierungen ließen sich nicht zeigen (104), bei Patienten mit systemischer Sklerodermie liegen sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Patienten erhöhte endogene RLX-Spiegel vor, die als endogene Gegenregulation in Antwort auf die aus anderem Grunde verstärkte Fibrosierung zu werten sein können (105).

1.6.3. Gehirn/Hypophyse

Es gibt im Gehirn – insbesondere in der Hypophyse – RLX-Bindungsstellen (32,106,107). Die hypophysäre Freisetzung von Oxytocin wird wohl durch Relaxin gehemmt (108), wenngleich dazu auch gegenteilige Befunde veröffentlicht wurden (109,110). Relaxin beeinflusst die Freisetzung von Vasopressin zumindest zum Teil via des zentralen Angiotensin-II-Systems und wirkt dipsogen (111,112,113,114,115).

Die Freisetzung von Prolaktin und – mit weniger Evidenz – auch Wachstumshormon aus dem Hypophysenvorderlappen wird durch Relaxin stimuliert (116,117).

1.6.4. Kardiovaskuläre Effekte und renale Effekte

1.6.4.1. Vaskuläre Effekte

Relaxin wirkt vasodilatierend. Erste Hinweise darauf fanden bereits 1984 Bani und Bigazzi in Gefäßen der Brustdrüse (Maus) (118). 1985 belegten St.Louis und Massicotte eine systemische Vasodilatation durch Relaxin bei Ratten (119). Für zahlreiche weitere Organe erfolgte später der Nachweis vasodilatierender Effekte (75,120,121,122). Dabei wurde zum Teil ein NO-abhängiger Mechanismus nachgewiesen. Weitere vaskuläre Effekte werden im folgenden Abschnitt 1.6.4.2. beschrieben.

Relaxin scheint auch angiogene Wirkungen zu haben. Unemori belegte 1999 und 2000 eine cAMP-abhängige VEGF- und BFGF-Erhöhung nach Stimulation mit Relaxin in Endometriumzellen und Makrophagen aus Wundrändern (63,64).

Schöndorf untersuchte 2007 den Einfluss von oralen Antidiabetika auf die RLX- und VEGF-Spiegel bei Typ-II-Diabetikern und fand erstaunlicherweise eine hochsignifikante Korrelation der im Serum bestimmten Konzentrationen beider Proteine ausschließlich bei Männern ($p < 0,02$), nicht aber bei Frauen ($p = 0,71$) (123).

1.6.4.2. Renale Effekte

Relaxin ist *der* relevante renale Vasodilatator in der Schwangerschaft, der damit für die Erhöhung der GFR verantwortlich ist. Dschietzig konnte 2003 nachweisen, dass die

vasodilatierenden Effekte von Relaxin durch eine vermehrte Expression renovaskulärer ET_B-Rezeptoren vermittelt werden. Nach Bindung an seinen Rezeptor auf vaskulären Endothelzellen wird diese RLX-Wirkung über die Raf-1-MEK-1-ERK-1/2-NF-κB-Kaskade vermittelt und führt neben einer erhöhten Endothelinclearance zu einer erhöhten endothelialen NO-Freisetzung. Beides führt zu renaler Vasodilatation (82).

Ein weiterer – bereits erwähnter - Einfluss auf das Endothelinsystem wird in der Arbeit von Jeyabalan 2004 gezeigt: Relaxin führt über eine Steigerung der MMP2-Aktivität, die die Prozessierung von Big-Endothelin zu ET₁₋₃₂ zur Folge hat, zu einer weiteren ET_B-Stimulation mit konsekutiver NO-Synthese und renaler Vasodilatation (85).

Ebenfalls Jeyabalan beschreibt 2006 in renalen Arterien bei Ratten unter chronischem RLX-Einfluss (z.B. in der Schwangerschaft) eine Aktivierung und erhöhte Expression der MMP-2, weist jedoch auch eine innerhalb weniger Stunden einsetzende Aktivierung der MMP-9 nach, wohingegen die MMP-2-Aktivität bei RLX-Stimulation in diesem kurzen Zeitrahmen stabil bleibt. Beide Effekte vermitteln über den bereits erwähnten Effekt von MMPs auf das Endothelin-System eine ET_B-Stimulation mit anschließender NO-Freisetzung (124).

Ferner sei hier auch nochmals die durch Relaxin gesteigerte ANP-Produktion erwähnt (62).

1.6.4.3. Kardiale Effekte

Relaxin wirkt auch auf die Koronararterien vasodilatierend (75). Durch diese Effekte – und möglicherweise auch durch seine pro-angiogenetische Wirkung – ist eine protektive Wirkung bei kardialer Ischämie anzunehmen, die von der Arbeitsgruppe um Masini und Bani in mehreren Arbeiten 1996-1998 gezeigt werden konnte (125,126,127).

Relaxin wirkt in Rattenherzen positiv chronotrop (62,75,128,129,130) und wirkt auf atriales, nicht jedoch auf ventrikuläres Myokard positiv inotrop (130,131). Beide Effekte wurden auch vom Autor dieser Arbeit so gefunden.

Han wies einen cAMP-abhängigen Effekt auf die L-Typ-Kalzium-Kanäle in den kardialen Schrittmacherzellen von Kaninchen nach, der die positive Chronotropie des

Relaxins erklären kann (132).

Piedras-Renteria zeigte 1997, dass dem positiv inotropen Effekt bei Rattenvorhöfen ein verzögerter Kalziumausstrom zu Grunde liegt, der durch die verzögerte Repolarisation (gehemmte Kalium-Kanäle) zu einer intrazellulären Kalzium-Akkumulation führt (133,134).

Relaxin führt zu erhöhter kardialer ANP-Freisetzung (62).

Dschietzig konnte bei Ratten nachweisen, dass Relaxin auch in der pulmonalen Strombahn ET_B-Rezeptoren hochreguliert, welche als ET-Clearancerezeptoren fungieren, und somit in der Herzinsuffizienz, wenn erhöhte kardiale Endothelin-1-Produktion auftritt, die ET_A-vermittelte Vasokonstriktion partiell zu antagonisieren im Stande ist (25).

Auch die kardialen Wirkungen von Relaxin sind in verschiedenen Spezies vermutlich unterschiedlich. Conrad und Novak zitieren in ihrer Übersicht über die Wirkungen des Relaxins eine persönliche Kommunikation von Summers, wonach dieser an menschlichen Vorhöfen keine inotropen Effekte von Relaxin nachweisen konnte. Ebenso wird in dieser Übersicht, Bezug nehmend auf unveröffentlichte Befunde von Summers, berichtet, dass der Nachweis von RLX-Bindungsstellen mit radioaktiv markiertem Relaxin weder am Sinusknoten, noch an anderer Stelle des menschlichen Herzen gelang (135), wohingegen Hsu mittels PCR eine minimale Expression des RXFP1-Rezeptors im menschlichen Herzen nachweisen konnte, die jedoch aus heutiger Sicht durchaus einer Expression auf kardialen Fibroblasten geschuldet sein kann und nicht als Nachweis einer myozytären RXFP1-Expression gewertet werden muss (19).

Die Gabe von Relaxin vermag in vivo bei Ratten und Schweinen unter Bedingungen von myokardialer Ischämie und Reperfusion die Myokardschädigung zu verringern (127,136). Die zugrundeliegenden Mechanismen scheinen zumindest teilweise auf anti-apoptischen und anti-inflammatorischen Wirkungen von Relaxin unter den Bedingungen der Ischämie zu beruhen. Möglicherweise vermögen auch die von Bani bereits 1995 gefundenen anti-aggregativen Effekte auf Thrombozyten und die Neurophilenaggregation an Endothelien (mit den sich ergebenden Zytokinausschüttungen) die protektiven Wirkungen zu akzentuieren (137). Ferner kommt die NOS-Aktivierung mit erhöhten NO-Spiegeln durch Relaxin (76-79) und die Mastzellstabilisierung (74) als Faktor der protektiven Gesamtwirkung in Betracht.

1.6.5. Blutgerinnung

Bani und Bigazzi belegten 1995 eine NO-vermittelte Hemmung der Plättchenaggregation in vitro und eine reduzierte Thrombozytenfreisetzung aus Megakaryozyten in vivo in Ratten (137).

Bereits erwähnt wurde der positive Effekt auf die TPA-Freisetzung in den Organen des Reproduktionstraktes während der Schwangerschaft. Ob dieser Effekt beim Menschen auch außerhalb der Schwangerschaft die Hämostase beeinflusst, ist nicht bekannt (99).

1.6.6. Lunge

Relaxin zeigte in einzelnen Studien einen mastzellstabilisierenden Effekt und könnte somit anti-asthmatisch wirken (138). Dafür fand dieselbe Arbeitsgruppe um Bani 1997 erste Evidenz in Meerschweinchen (139).

Die Lungenstrombahn ist in der Herzinsuffizienz Quelle erhöhter Endothelin-1-Produktion durch pulmonale Endothelien. Dieser Effekt wird von Relaxin supprimiert (23). Ferner wird auch in der pulmonalen Strombahn durch RLX-induzierte Steigerung der ET_B-Expression ein ET-1-antagonisierender Effekt (ET_B ist der ET-1-Clearance-Rezeptor in der Lunge) hervorgerufen (25).

2. Myokardiale Hypertrophie

2.1. Bedeutung der Myokardhypertrophie

Die Hypertrophie des Myokards, in erster Linie eine Hypertrophie der einzelnen Myozyten, nicht aber eine relevante Zunahme der Zellzahl, ist eine Antwort auf eine erhöhte biomechanische Belastung des Herzens, sei es beim Sportler, bei chronischer Hypertonie, bei valvulären Vitien oder „intrinsisch“, wie etwa bei der familiären hypertrophen Kardiomyopathie. Ihre wesentlichen morphologischen Merkmale sind die Volumenzunahme der einzelnen Myozyten und der gesteigerte Proteingehalt der Zellen. Ferner kommt es zu einer Reorganisation der Sarkomere (140). Ist sie zunächst als positive Reaktion zur Reduktion der erhöhten Wandspannung bei erhöhter Belastung zu sehen, so ist andererseits festzustellen, dass die Ausbildung einer Myokardhypertrophie als erster Schritt der Entwicklung einer Herzinsuffizienz zu sehen ist und der Ausbildung einer Myokardhypertrophie diesbezüglich ein hoher negativ-prädiktiver Wert zukommt (141,142,143,144).

Unter medikamentöser Therapie, z.B. durch ACE-Hemmer, kann eine Myokardhypertrophie reversibel sein und eine Verbesserung der Prognose bezüglich der Entstehung einer Herzinsuffizienz erreicht werden. Dabei besteht bis heute allerdings kein Konsens, ob die Verbesserung der Prognose direkte Folge der Rückbildung der Hypertrophie ist oder nur aus anderen Gründen zu Stande kommt, die mit der Rückbildung der Hypertrophie lediglich einhergehen. Bezüglich der ACE-Hemmer ist interessanterweise zu bemerken, dass die Reduktion der Hypertrophie mit konsekutiver Verbesserung der Prognose der Patienten der HOPE-Studie unabhängig von der Reduktion eines erhöhten Blutdruckes war, der als auslösend für die Hypertrophie in dieser Studie angesehen worden war (145). Dies kann als Indiz dafür gewertet werden, dass die Reduktion der Hypertrophie als solche den die Prognose verbessernden Faktor darstellt.

2.2. Molekulare Signalwege

1979 zeigte Vandeburgh in einem in-vitro-Modell, dass Dehnung von Skelettmuskelzellen zu einer Hypertrophie mit Erhöhung der intrazellulären Proteinkonzentration führt (146). Mann, 1989, zeigte selbiges für Kardiomyozyten (147).

Die folgenden Jahre erbrachten eine Vielzahl an Einsichten in die molekularen Mechanismen, die der Entstehung einer Myokardhypertrophie zu Grunde liegen oder zu Grunde liegen könnten.

Ich möchte mich hier auf eine kurze Zusammenfassung beschränken.

2.2.1. Calcineurin-NFAT-Kaskade

Calcineurin ist eine Serin-Threonin-Phosphatase. Sie ist kalziumabhängig, was bedeutet, dass sie einzig durch eine anhaltende zytoplasmatische Erhöhung der Kalziumkonzentration aktiviert werden kann. Als gegenregulatorische Mechanismen sind zahlreiche intrazytoplasmatische Inhibitoren bekannt (Übersicht bei (148)). Calcineurin vermag Transkriptionsfaktoren der NFAT-Gruppe zu dephosphorylieren und damit zu aktivieren und auch den MEF2-Transkriptionsfaktor zu aktivieren. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass durch die Aktivierung von Calcineurin und/oder NFAT eine Myokardhypertrophie auszulösen ist. Besondere Beachtung verdient dabei die Arbeit von Molkentin 1998, der zeigen konnte, dass transgene Mäuse, die aktivierte Formen von Calcineurin oder NFAT3 überexprimierten, binnen zweier Monate an kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz verstarben. Eine sehr interessante Wechselbeziehung besteht zwischen dem Calcineurin-Weg und der MAPK-Kaskade (149,150) (siehe 2.2.5.).

Eine ebensolche Verbindung wurde von Vega 2002 zwischen der Calcineurin-NFAT-Kaskade und dem GSK-3-abhängigen Signalweg nachgewiesen (151).

Wenngleich in-vivo-Studien mit den Calcineurininhibitoren Ciclosporin A und FK506, vermutlich methodisch bedingt, widersprüchliche Resultate ergaben, so zeigten doch zahlreiche Studien mit Modellen von Tieren, die physiologische Calcineurininhibitoren überexprimieren, weitgehend übereinstimmend eine zentrale Bedeutung des Calcineurin-NFAT-Signalwegs für die Entstehung kardialer Hypertrophie (149,152,153,154,155,156).

2.2.2. PI3K/Akt/GSK-3-Kaskade

Die Phosphoinositide-3-Kinasen sind eine ganze Familie von Kinasen, die z.B. durch Tyrosinkinase-Rezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden können (siehe auch 2.2.4.). Eine Aktivierung dieser Kinasen führt über eine Aktivierung von Akt/Proteinkinase B (PKB) zu einer Myokardhypertrophie. Im weiteren Verlauf der intrazellulären Signaltransduktion führt eine Aktivierung der Akt/PKB zu einer Aktivierung der mTor (mammalian target of rapamycin) und einer GSK-3 β -Phosphorylierung. GSK-3 β , welches ansonsten über eine Phosphorylierung von NFAT-Transkriptionsregulatorproteinen zu deren Ausschleusung aus dem Zellkern führen würde, wird dadurch gehemmt, so dass das NFAT-vermittelte prohypertrophe Transkriptionsmuster in den Vordergrund rückt (157). Für eine GSK-Inaktivierung scheint Akt/PKB zwar essentiell, aber in vivo nicht hinreichend zu sein (158). Eine Hemmung von mTor mit Rapamycin verminderte die Hypertrophie im Tiermodell bei druckbelasteten Mäusen um 67% (159).

Darüber hinaus konnte eine Phosphorylierung von c-Jun, c-myc, STAT und NF- κ B durch GSK-3 β nachgewiesen werden (160,161,162,163).

Das in den beiden vorangegangenen Sätzen Zusammengefasste lässt eine sehr breite Bedeutung der GSK-3 β für die Entstehung der kardialen Hypertrophie vermuten.

2.2.3. MEF2/HDAC

Der nukleäre Transkriptionsfaktor MEF2 scheint einer der wesentlichen nukleären Schnittstellen zu sein, an denen verschiedene hypertrophe Stimuli zusammenlaufen. Er wird über Assoziation mit Histon-Deacetylasen (HDACs) reguliert. Eine Regulation dieses Transkriptionsfaktors wird sowohl über die Ca/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMK), den Calcineurin-Weg und den MAP-Kinasen-Weg angesteuert (149,164,165,166,167).

Ferner wies Narduz eine Aktivierung von c-jun durch MEF2 nach und stellt somit eine weitere Querverbindung zu dem oben genannten Weg dar. (168).

2.2.4. Die G-Protein-gekoppelten Wege

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren spielen in der Regulation der kardialen Funktion (und auch Hypertrophie) eine zentrale Rolle. Sowohl adrenerge als auch muscarinerge Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelt; und auch ET-1 sowie AT-II-Rezeptorstimulation führt zu G-Protein-gekoppelter Signaltransduktion.

Im Wesentlichen kann man drei Typen von G-Protein-Subtypen unterscheiden: G_s , G_i , G_q/G_{11} .

G_s -gekoppelt ist der β_1 -Rezeptor und auch zum Teil der β_2 -Rezeptor (169,170). Seine Stimulation führt zu einer Stimulation der kardialen Adenylatzyklase und damit Erhöhung von cAMP. Konsekutiv führt das zu einer Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) (140). Ein wesentlicher maladaptiver Effekt dieser Kaskade ist neben der Hypertrophie auch die Induktion einer Fibrose und wohl auch die Auslösung degenerativer und pro-apoptotischer Effekte (171,172).

G_q/G_{11} -gekoppelte Rezeptoren sind sowohl der Angiotensin-II-Rezeptor als auch der Endothelin-1- und der α_1 -adrenerge-Rezeptor. Ihr weiterer Signalweg führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) (173). Die Stimulation dieser Kaskade ist ein suffizienter Induktor kardialer Hypertrophie (174,175). Im weiteren Verlauf der Signaltransduktion wird über Aktivierung der MEKK-1-MKK4/7 eine aktivierende Phosphorylierung der JNK- und p38-MAP-Kinasen erreicht, die sich allerdings zum Teil als widersprüchlich in der Auslösung einer Hypertrophie erweisen (176,177,178,179).

Die antihypertrophe Wirkung von AT-II-Rezeptor-Blockern (HOPE-Studie (145)) wird der Suppression eben dieses Mechanismus zugeschrieben.

Sowohl für AT-II wie auch für ET-1 und Phenylephrin wurde ferner gezeigt, dass diese G-Protein-gekoppelt reaktive Sauerstoff-Radikale (ROS) intrazellulär in Rattenmyozyten zu erzeugen vermögen und auf diese Weise die Aktivierung und nukleäre Translokation von $\text{NF}\kappa\text{B}$ befördern (180).

Stimulation von G_i -gekoppelten Rezeptoren, wie etwa des muskarinergen Rezeptors und auch zum Teil des β_2 -Rezeptors, wirkt über eine Hemmung der Adenylatzyklase. Erstaunlicherweise kann dieser Mechanismus allerdings nicht als rein kompensatorischer (und damit positiver) Mechanismus gesehen werden, seitdem Redfern 2000 zeigte, dass eine konstitutionelle Überexpression eines G_i -gekoppelten

Rezeptors ebenfalls zur Ausprägung einer Herzinsuffizienz führt (181).

Die Kopplung der Rezeptoren kann sich individuell verändern („switch“), so ist nachgewiesen, dass β_2 -Rezeptoren von einer G_s -Kopplung zu einer G_i -Kopplung umschalten können (169).

2.2.5. MAP-Kinase-Kaskaden

Das System lässt sich in die drei Subgruppen der JNKs, der p38-MAPK und der ERKs unterteilen.

ERK1/2 wird durch MEK1 aktiviert. Zeigt die konstitutionellen Überexpression von MEK-1-ERK-1/2 phänotypisch eine konzentrische, kompensierte Hypertrophie (182), so führt eine konstitutionelle Überexpression der MEK-5-ERK-5 zu einer exzentrischen Hypertrophie und Dilatation des Ventrikelmuskels (183). Durch Blockierung der ERK1/2 kann eine hypertrophe Reaktion auf Phenylephrin unterdrückt werden (184). Yue et al. zeigten, dass sich durch Inhibition der ERK-1/2 mittels eines direkten Inhibitors auch durch ET-1 keine Hypertrophie mehr auslösen ließ (185).

Die Arbeitsgruppe um Molkentin schließlich enthüllte 2005 eine komplexe synergistische Wechselbeziehung zwischen dem Calcineurinweg und der MEK-1-ERK1/2-Kaskade, resultierend in der Erhöhung der NFAT-Transkription und – Aktivierung (148).

JNKs werden durch Phosphorylierung durch MKK4/7 aktiviert, die ihrerseits durch MEKK1 aktiviert werden. Wie oben bereits erwähnt, ist dies ein wesentlicher Signalweg für die G_q -getragenen Stimuli (177,186). Sadoshima veröffentlichte 2002 allerdings Experimente, in denen sich eine MEKK1-JNK-Aktivierung als protektiv und nicht pro-hypertroph erwies (187).

Die p38-MAPK werden über die MKK3/6 aktiviert, die ihrerseits durch die TAK1 reguliert wird. Auch dieser Signalweg ließ sich durch ET-1 und Phenylephrin aktivieren und führte zu einer pro-hypertrophen Wirkung (188,189). Als nukleäre Ziele konnte neben MEF2 auch NFAT3 nachgewiesen werden (190,191).

2.2.6. Proteinkinase C (PKC)

Auch die Proteinkinasen C sind eine ganze Familie unterschiedlicher Isoformen (α - λ) (192), deren Aktivierung sich zum Teil in einigen Studien als suffizient erwiesen haben, eine hypertrophe Antwort auszulösen. Sie sind möglicherweise auch in die Signaltransduktion nach Stimulation mit ET-1 oder Phenylephrin verwickelt, jedoch gibt es dazu widersprüchliche Befunde (193,194,195,196).

2.2.7. Gp130/STAT3

Gp130 ist ein membranständiger Rezeptor, für den mehrere unterschiedliche Liganden bekannt sind. Insbesondere die Interleukine 6 und 11 und Cardiotrophin-1 können an diesem Rezeptor binden und pro-hypertrophe Effekte, letztlich vermittelt durch eine Aktivierung von NF- κ B, auslösen. Darüber hinaus kann eine Bindung an Gp130 aber auch zu einer Aktivierung der MAP-Kinasesignalwegs (ERK) und über den STAT3-Signalweg führen und neuere Befunde legen eine Querverbindung zum lokalen Angiotensinsystem im Herzen nahe (197,198,199,200).

Die Bedeutung dieses Rezeptors für die Entstehung einer Myokardhypertrophie konnte in verschiedenen Tiermodellen nachgewiesen werden (200,201,202), jedoch ist die Ausschaltung dieses Rezeptors mit der Entstehung einer schweren dilatativen Herzinsuffizienz unter Stressbedingungen verbunden, da über den Rezeptor neben pro-hypertrophen Stimuli auch anti-apoptische Stimuli vermittelt werden (203).

Zusammenfassend lässt zu mit dem derzeitigen Wissenstand sagen, dass kardiale Hypertrophie sowohl eine Anpassung an physiologische Mehrarbeit sein kann, aber auch Reaktion auf eine pathologische Belastung, etwa nach Myokardinfarkt oder bei chronischer arterieller Hypertension. Die molekularen Signalwege, mittels derer die Hypertrophie jeweils ausgelöst wird, scheinen sich zum Teil zu überschneiden und gegenseitig zu beeinflussen.

3. Myokardiale Fibrose

3.1. Einleitung

In den vergangenen Jahren gewinnt bei der Erforschung der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz zunehmend neben den Veränderungen der Kardiomyozyten der Blick auf die nicht-myozytären Teile des Herzmuskelgewebes an Bedeutung.

Einzelne Kardiomyozyten sind im Herzmuskel in die extrazelluläre Matrix (ECM) eingebunden. Diese wird von Fibroblasten und den sich unter Aktivierung aus Fibroblasten entwickelnden Myofibroblasten gebildet und reguliert. Die ECM des Herzen ist dabei eine höchst differenzierte Struktur. Einzelne Myozyten werden dabei von nicht fibrillärem Kollagen IV umgeben. Diese werden dann von Kollagenfibrillen umschlungen und mit benachbarten Myozyten verbunden. Diese erste Hülle der einzelnen Myozyten bezeichnet die Literatur als „Endomysium“. Bündel solcher Myozyten-Endomysium-Strukturen werden ihrerseits wieder von Kollagenfibrillen zusammengehalten. Diese stellen das „Perimysium“ dar. Diese Bündel werden nun wieder von Kollagenfaszien („Epimysium“) zu größeren Einheiten zusammengebunden. Die Arteriolen des Herzmuskels werden neben ihrer eigenen kollagenen Tunica adventitia durch Kollagenfasern in die ECM eingebettet.

Insgesamt finden sich als Bestandteile der ECM vorwiegend die Kollagene Typ I (80%) und Typ III (10%). Ferner Kollagene der anderen Typen, Elastin, Laminin, Proteoglykane und Glycosaminoglycane. In dieser ECM lassen sich eine große Anzahl von Cytokinen, Hormonen und anderen Funktionsproteinen (wie Proteasen etc.) nachweisen (204,205).

Die ECM unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau, die sehr fein aufeinander abgestimmt reguliert werden müssen. Die Kollagene werden zunächst von den Fibroblasten gebildet und als „rohe“ Precursor-Kollagene in die ECM sezerniert. In der ECM werden sie proteolytisch prozessiert zu reifen Kollagenen, die dann zu Fibrillen durch Hydroxyprolin- und Hydroxylysin-Brücken verwoben werden.

Die Kollagenbiosynthese wird von verschiedenen Faktoren reguliert, aber offensichtlich spielen doch vor allem TGF β und die Prolyl-4-Hydroxylase (in der ECM) eine herausragende Rolle. Der Kollagenabbau geschieht durch verschiedenen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die ihrerseits von TIMPs in ihrer Aktivität reguliert werden (206,207,208).

Den kardialen Fibroblasten kommt herausragende Bedeutung bei der Bewältigung von pathologischen Zuständen des Herzmuskels zu. Dabei obliegt den Fibroblasten nicht nur die Synthese und die Sekretion von Kollagenen, sondern auch eine wesentliche Rolle in der Kommunikation mit Myozyten und den Zellen des Immunsystems. Eine umfassende Übersicht über die hierbei bekannten Details bei (209).

Eine spezialisierte aktivierte Form der kardialen Fibroblasten stellt der Myofibroblast dar. Diese Form der Fibroblasten exprimiert smooth-muscle-actin- α (SMA α) und weitere kontraktile Proteine und spielt in der Narbenbildung eine besondere Rolle.

Merkmale einer Fibrose des Myokards sind die erhöhte Zahl von Fibroblasten (sei es durch Proliferation, chemotaktische Immigration und Differenzierung von Vorläuferzellen oder verminderte Apoptose) und deren Aktivierung, in deren Folge es zu einer Vermehrung der ECM und Veränderung ihrer Komposition kommt. Ferner üben aktivierte Fibroblasten über verschiedene Zytokine pro-inflammatorische und auf Myozyten pro-hypertrophe Effekte aus (209).

Am Beginn einer solchen Aktivierung können zum Beispiel eine erhöhte Konzentration reaktiver Radikale bei chronischem O₂-Mangel oder vermehrter Wandspannung stehen, wie bei ischämischer oder hypertensiver Herzerkrankung. Bei der hypertensiven Herzerkrankung sind neben dem physikalischen Faktor der erhöhten Wandspannung die biochemischen Faktoren AT II, ET-1, Interleukin-1, IL-1, IGF-I, Katecholamine und TGF β als fibroblastenaktivierend und –differenzierend nachgewiesen worden (214,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219). Initial scheint es dabei morphologisch zunächst zu einer noch organisierten Akkumulation von Kollagenen in Endo- und Perimysium zu kommen, die in fortgeschrittenen Stadien in eine zunehmend chaotischere Anhäufung von ECM-Bestandteilen an Stellen apoptotischer Myozyten oder auch fern ab davon übergeht. Klinisch manifestiert sich die Fibrose des Herzmuskels zunächst in einer diastolischen Relaxationsstörung und diastolischen Herzinsuffizienz, die dann sukzessive in eine systolische Herzinsuffizienz übergeht. Ferner geht bei der hypertensiven Herzerkrankung die chronische Aktivierung der Fibroblasten mit einer Hypertrophie der Myozyten einher. Ein weiterer klinisch höchst relevanter Effekt der ECM-Vermehrung besteht in der zunehmenden rhythmogenen Labilität des Syncytiums Herz. Durch die Anhäufung von Kollagenen – die freilich nicht die elektrischen

Erregungen des Herzen leiten können - kommt es zu Unterbrechungen der Erregungsausbreitung und Erhöhung der Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von ventrikulärer Tachykardien, Kammerflattern, oder -flimmern.

Weiter erschwert die fortschreitende (auch periarteriöläre) Fibrosierung die Versorgung des Myokards mit O₂ und Nährstoffen.

Letztlich führt die Fibrose – Hand in Hand mit der Hypertrophie der Myozyten – zu einer progredienten Herzinsuffizienz.

4. Relaxin und Myokardhypertrophie/-fibrose

4.1. Relaxin und Myokardhypertrophie

Du zeigte 2003, dass Relaxin-Knock-Out-Mäuse RLX(-/-) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen des selben Alters keine erhöhte Myokardmasse der Ventrikel aufweisen, männliche, allerdings nur männliche RLX(-/-) atrial um 30% erhöhte Massen aufwiesen, die allerdings mit einer Zunahme der Fibrosierung und nicht mit einer Myozytenhypertrophie korrelierten. Zumindest bei Mäusen wirkt ein RLX-Mangel alleine also wohl nicht pro-hypertroph (220).

Lekgabe konnte in einer Arbeit an ovariectomierten, weiblichen RLX(-/-)-Mäusen jedoch durchaus eine Erhöhung der myokardialen Masse und eine gesteigerte Expression von hypertrophiespezifischen Markern zeigen und schließt somit neben anti-fibrotischen Wirkungen auch auf eine anti-hypertrophe Wirkung von Relaxin (221).

Ein spezifischer RXFP1-blockierender Antagonist, mit dessen Hilfe sich der Basaleinfluss von Relaxin unter physiologischen Bedingungen untersuchen ließe, ist bisher nicht verfügbar.

Die hier vorgelegte Arbeit widmet sich den endogenen, myokardialen RLX-Spiegeln unter den Bedingungen chronischer Myokardhypertrophie bei spontan-hypertensiven Ratten (SHR). Eine weitere Arbeit von Lekgabe wird dahingehend im Diskussionsteil erörtert (222).

Ein direkter Nachweis einer RLX-Wirkung auf die Hypertrophie von adultem Rattenmyokard steht aus. Indirekte Effekte lassen jedoch eine anti-hypertrophe Wirkung von Relaxin erwarten:

1. die Stimulation der ANP-Freisetzung aus Myozyten durch Relaxin. Eine Unterbrechung des kardialen ANP-Systems, entweder durch Hemmung der pro-ANP-Bildung, durch Hemmung der pro-ANP-convertase oder durch Blockierung des Rezeptors NPR-A führen direkt zu einer Myokardhypertrophie (223,224,225). Aktivierung von Proteinkinase G, dem durch cGMP-aktivierten „second messenger“ im intrazellulären ANP-Signalweg wirkt stark anti-hypertroph bei Mäusen (226).
2. die anti-ET-1, anti-IGF-I und anti-AT-II-Wirkungen lassen einen

antihypertrophen Effekt von Relaxin in vivo erwarten (47). Diese Effekte werden über Fibroblasten vermittelt, die in der Herzinsuffizienz eben jene (und andere) pro-hypertrophe Faktoren sezernieren. Interessanterweise scheint bei neonatalen Rattenkardiomyozyten der noradrenalininduzierte, pro-hypertrophe Effekt durch Relaxin nicht antagonisierbar, wohl aber der pro-hypertrophe Effekt, der durch die Zugabe von Fibroblasten zum Medium entsteht (227).

Die bisherigen Erkenntnisse über die RXFP-1-Verteilung lassen vermuten, dass dieser Rezeptor auf Rattenkardiomyozyten zumindest nicht massiv exprimiert wird, möglicherweise auch gar nicht. Der dem RXFP-1 abhängige Signalweg mit der folgenden Erhöhung von cAMP und auch die durch die erfolgreiche Hemmbarkeit der positiven Chronotropie durch Staurosporin suggerierte Abhängigkeit der RLX-Wirkung am Herzen von der PKC lassen weiterhin Zweifel an einer direkten und RXFP-1-medierten, anti-hypertrophen Wirkung von Relaxin aufkommen: diese beiden Signalkaskaden sind – bei Stimulation durch andere Substanzen – als direkt pro-hypertroph beschrieben worden (Literatur siehe Kapitel 1.5. und 2.2.1-7.).

Auch die von Bartsch und Ivell beschriebene thyrosinkinaseabhängige Phosphodiesterasehemmung in menschlichen Endometriumzellen und THP-1 würde in Kardiomyozyten eher pro-hypertroph wirken. Ebenso der RXFP1 – G-Protein – PI3-K–Akt-Signalweg der von Nistri und Bani als verantwortlich für die NOSIII-Aktivierung in gefunden wurde (Literatur siehe Kapitel 1.5. und 2.2.1-7.).

Hingegen konnte – bisher als einziger Mechanismus, der eine direkt antihypertrophe Wirkung von Relaxin am Kardiomyozyten erklären könnte - von Dschietzig, Bartsch und dem Autor dieser Arbeit 2005 die Hemmung der ERK1/2-Kaskade durch Relaxin in Rattenkardiomyozyten nachgewiesen werden (230).

4.2. Relaxin und Myokardfibrose

2003 zeigte Du, dass RLX-defiziente Mäuse einen erhöhten Kollagengehalt des Myokards aufweisen und etablierte damit dieses Modell als ein Tiermodell für Myokardfibrose. Ein weiteres etabliertes Modell für Myokardfibrose stellen Mäuse dar, die kardial β_2 -adrenerge Rezeptoren überexprimieren (220,228).

In drei wegweisenden Arbeiten zeigten Samuel 2004, Mookerjee 2005 und Lekgabe

2005, dass Relaxin die Myokardfibrose – und auch die Fibrosierung in der Niere – bei Mäusen und Ratten zu antagonisieren vermag (47,222,229).

Samuel 2004 stimulierte in vitro kardiale Fibroblasten mit TGF- β , AT-II und IGF-I und fand eine erhöhte Differenzierungsrate von Fibroblasten zu Myofibroblasten, erhöhte SMA α -Expression, erhöhte Kollagensynthese und –ablagerung sowie erhöhte Fibroblastenproliferation. Durch Zugabe von Relaxin zum Kulturmedium fand sich zwar mit Relaxin alleine kein Effekt auf Fibroblastendifferenzierung und –proliferation sowie Produktion von Kollagenen, wohl aber konnte Relaxin alle durch TGF- β , AT-II und IGF-I erzeugten Effekte auf die Fibroblasten weitgehend antagonisieren und darüber hinaus die Expression von MMP-2 unter dem Einfluss von TGF- β und AT-II erhöhen (219).

Mookerjee 2005 bestätigte diese in-vitro-Befunde (229), während Lekkabe 2005 in-vivo-Befunde folgen ließ: Lekkabe verwandte spontan-hypertensive Ratten und belegte eine Myokardfibrose durch Nachweis erhöhten Kollagengehalts, erhöhter Expression von PCNA (als Marker der Fibroblastenproliferation), SMA α (als Marker der Fibroblastendifferenzierung zu Myofibroblasten) und kompensatorischer MMP-9(Gelatinase)-Expression. Behandlung der Tiere mit Relaxin für nur zwei Wochen normalisierte den Kollagengehalt des Myokards und normalisierte PCNA- und SMA α -Expression als Marker für Proliferation und Differenzierung und erhöhte die MMP-2-Expression, ohne die erhöhte MMP-9(Gelatinase)-Expression zu verändern (222). Interessanterweise zeigte Samuel 2004 in seinen in-vitro-Versuchen, dass die anti-fibrotischen Wirkungen von Relaxin im Herzen von Ratten nicht von einer intrazellulären cAMP-Erhöhung abhängig sind. Möglicherweise liegt hier eine Interaktion mit dem MAPK-ERK1/2-Weg als Signalweg zugrunde (219). Hinweise auf eine derartige Interaktion fanden auch Dschietzig, Bartsch und der Autor dieser Arbeit bei den Untersuchungen zur Hypertrophie bei SHR (230).

In der vorgelegten Arbeit soll nun die endogene, myokardiale RLX-Transkription und RLX-Translation unter den Bedingungen der hypertensiv bedingten Hypertrophie sowie Einfluss der endogenen RLX-Synthese auf die Entwicklung einer Hypertrophie des Herzens spontan-hypertensiver Ratten untersucht werden.

Ebenfalls soll die Wirkung von Relaxin auf die Inotropie des Herzens unter den Bedingungen der bereits hypertrophierten Herzmuskulatur untersucht werden.

5. Material und Methoden

5.1. Tiere

Für alle Organentnahmen wurden männliche Wistar-Kyoto-Ratten von Charles-River Inc. verwandt. Die spontan-hypertensiven Ratten (SHR), ebenfalls ausschließlich männlich, wurden ebenfalls von Charles-River Inc. bezogen.

Die Organentnahmen wurden dem Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin angezeigt und unter der Genehmigungsnummer O 0309/93 zugelassen.

Aus jeder Gruppe wurden jeweils insgesamt sieben Tiere verwandt. Die Tiere beider Gruppen wurden abwechselnd für Organentnahmen verwandt.

Zunächst wurde der Blutdruck der Tiere bestimmt, dann das Herz und die anderen Organe entnommen. Es folgte die Entnahme der Muskelstreifenpräparationen aus den Herzen sowie das Zerteilen der Herzen mit dem Wiegen der Organteile.

5.2. Messung der Blutdrücke

Zur Messung der Blutdrücke wurde verwendet:

Blood Pressure System for Mice and Rats with Manual Inflation von IITC Life Science; Woodland Hills, CA, mit Einkanalrekorder.

Der Blutdruck der Ratten wurde am Schwanz der Tiere nicht invasiv mit dem oben genannten Gerät gemessen. Das zu Grunde liegende Prinzip ist photoelektrisch und geht auf die von Olmstedt 1951 veröffentlichte Entwicklung zurück. (231)

Die Methode wurde von Whitesall 2004 im Vergleich zu invasiven Methoden validiert. (232)

Die Ratten wurden gemäß den Vorschriften des Systemherstellers in eine Halteapparatur verbracht. Um ruhige Untersuchungsbedingungen zu erreichen, wurden die Tiere sehr vorsichtig über drei Tage an die Prozedur gewöhnt. Die Messungen fanden bei 30°C Raumtemperatur statt.

Nachdem das zu messende Tier in dem Halteapparat zur Ruhe gekommen war,

wurde die Druckmanschette um den Schwanz des Tieres am Halteapparat befestigt und anschließend jeweils zehn Messungen des systolischen Blutdrucks mittels Einkanalrekorder aufgezeichnet. In den von uns durchgeführten Messungen kam es dabei zu ausgesprochen wenigen Artefakten, sodass alle Messreihen im ersten Anlauf verwertbare Ergebnisse erbrachten. Die zehn Messungen über jeweils 20 Sekunden wurden anschließend gemittelt.

Anschließend wurden die Tiere mit Natrium-Thiopental (Trapanal®) anästhesiert und die Messungen 30 Sekunden nach Trapanalinjektion unter identischen Bedingungen wiederholt.

5.3. Organentnahme und atriale und ventrikuläre Muskelstreifenpräparationen

Verwendete Instrumente sind Standardinstrumente wie Scheren, Skalpelle und Pinzetten, die allesamt bezogen wurden über die Firma Aesculap (Tuttlingen/D)

5.3.1. Reagenzien

Natrium-Thiopental (Trapanal® 0.5g/20ml) Byk Gulden

Isotone NaCl-Lösung

Krebs-Henseleit-Puffer:

127	mM NaCl	Sigma
4,6	mM KCl	Sigma
1,1	mM MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma
1,2	mM KH ₂ PO ₄	Sigma
8,3	mM Glucose	Sigma
2	mM Pyruvat	Sigma
24,8	mM NaHCO ₃	Sigma
1,7	mM CaCl ₂	Sigma

2,3 – butanedion monoxime (BDM)	Sigma
H2-Relaxin	Immundiagnostik(Bensheim/D)
Isoproterenol	Sigma

5.3.2. Arbeitsschritte

Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von Trapanal® (1ml/100g Körpergewicht Ratte = 25mg/100g Körpergewicht Ratte) anästhesiert. Unmittelbar nach Erlöschen der Atmung (ca. 2-3 Minuten nach Injektion) und Prüfung des Erlöschens der Schmerzreflexe durch Stich in die Fußsohle wurden durch Dekapitationsschnitt die Blutgefäße des Halses eröffnet. Anschließend wurde das Brustfell entfernt, der äußere Brustkorb mit isotonem NaCl-Eiswasser abgespült, der Thorax eröffnet, zur sofortigen Vor- und Nachlastsenkung bei kollabierender Lunge die Aa. pulmonales und Aorta, sowie die herznahen Venen eröffnet und das schlagende Herz vom umgebenden Perikard getrennt. Das derart mobilisierte Herz wurde dem Brustkorb entnommen und in isotones NaCl-Eiswasser (0°C) zur Kältekardioplegie verbracht. Anschließend wurde das Herz über die Aorta an eine Langendorff-Anlage angeschlossen.

In einer Langendorff-Anlage wird das isolierte Herz retrograd über die Aorta mit Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert. Bei infolge des retrograden Flusses im Aortenstumpf geschlossener Aortenklappe erfolgt die nichtzirkulierende Perfusion des Koronarsystems für 5 Minuten um Blutfreiheit zu erreichen und intramyokardial erhöhte Katecholaminspiegel auszuwaschen. Anschließend wurde eine Kardioplegie mit BDM (5mM in Krebs-Henseleit-Puffer) erreicht. Nach Eintritt der völligen Kardioplegie wurde das Herz in eine Silikonschale mit carbogenbegastem Krebs-Henseleit-Puffer mit 5mM BDM gelegt. Unter dem Mikroskop wurden aus beiden Vorhöfen Muskelstreifen entlang der Faszikelausrichtung geschnitten. Der maximale Durchmesser der Muskelstreifen betrug 0,2 mm, die Länge 7-12 mm.

Die Präparation von ventrikulären Myokardstreifen entsprach in den ersten Schritten der Gewinnung der atrialen Proben. Im linken Ventrikel wurden Streifen im Faserverlauf aus den Papillarmuskeln oder feine Trabekel aus dem Herz entnommen. Im Bereich des rechten Ventrikels konnten weitgehend ganze rechtsventrikuläre Papillarmuskeln verwandt werden, da diese bei den Tieren in der

Regel nicht dicker als 0,3 mm sind. Jedoch sind die entwickelten Kräfte in den Versuchen mit rechtsventrikulärem Myokard sehr viel niedriger, da die Präparationen nur 3 mm Länge erreichen.

Die verbliebenen Herzgewebe wurden ebenso wie Aorta, Pulmonalarterie, Lunge und Niere für die biochemischen Untersuchungen zerteilt, gewogen und eingefroren.

Die derart gewonnen Muskelstreifenpräparate wurden berührungsfrei in einer Silikonkanüle in die Anlage zur Inotropiemessung von Güth Scientific Instruments verbracht und dort bei minimaler Vorspannung zur Stabilisierung für 30 Minuten aufgehängt. Dabei befanden sich die Muskelstreifenpräparate in einer Glasküvette von 0,7 cm Innendurchmesser, die linear von einer BDM-freien Krebs-Henseleit-Lösung mit 1 ml/min durchströmt wurde. Unmittelbar vor Eintritt in die Glasküvette wurde das Krebs-Henseleit-Medium auf 30°C angewärmt. Die Flussrate wurde durch ml-genaue Messung des aus der Anlage austretenden Perfusats verifiziert.

Das Krebs-Henseleit-Perfusat wurde zu Beginn jedes Versuchs standardisiert nach oben angegebener Rezeptur zubereitet und für 20 Minuten bei Zimmertemperatur mit Carbogen begast. Zu Beginn jedes Versuches wurden jeweils 500 ml begasteten KH-Puffers in dem Reservoir abgedeckt vor der Glasküvette bereitgestellt. Bei einer Versuchsdauer von insgesamt ca. 150 Minuten und einem Fluss von 1 ml/min verblieben so am Ende eines Versuchs ca. 350 ml in dem Reservoir, die nach dem Versuch verworfen wurden.

Nach einer halben Stunde zur Stabilisierung wurde die optimale standardisierte Vorspannung durch langsame Dehnung ermittelt. Prinzip: Bei Dehnung des Myokards nimmt die Inotropie des Muskelstreifens bis zu einem Punkt zu, an dem die Überlappung und Kalziumsensitivität der Sarkomere ein für die Kontraktion optimales Maß erreicht hat. Wird über diese Vordehnung hinaus weiter gedehnt, nimmt die vom Muskel bei einer stimulierten Kontraktion maximal entwickelte Kraft wieder ab. Der Vorspannung, bei der die vom Muskelstreifen entwickelte Kontraktionskraft maximal ist, V_{max} , näherte ich mich in kleinen Schritten langsam in circa 15 Minuten an. Nach Überschreiten der V_{max} wurde die Vorspannung des Muskels auf $V_{max}/2$, also die Hälfte der Vorspannung bei Maximalkraft, eingestellt und der Muskel für 15 Minuten zur Stabilisierung unter unveränderter elektrischer Stimulation mit monophasischen Rechteckimpulsen ohne weitere Manipulationen belassen.

5.3.3. Stimulation mit exogenem Relaxin

H2-Relaxin wurde von der Firma Immundiagnostik (Bensheim/D) als Reinprotein bezogen.

Die Zugabe von Relaxin zum Krebs-Henseleit-Medium erfolgte in den Stufen 10^{-12} mol/l bis 10^{-7} mol/l. Zwischen jedem Dosierungsschritt wurde die Ausbildung eines neuen F_{\max} -Plateaus nach 2-3 Minuten abgewartet und nach 5 Minuten die nächste Konzentrationsstufe zugegeben.

Nach Erreichen der letzten RLX-Konzentration im Perfusionsmedium wurde der Muskel noch für 60 Minuten unter dem Einfluss von 10^{-7} mol/l Relaxin belassen um eventuell auftretende Späteffekte zu erkennen.

Mit den Kontrollen wurde identisch verfahren. Anstelle von RLX in Krebs-Henseleit-Lösungen wurden „leere“ Krebs-Henseleit-Dosen zum Medium zugegeben.

Die Dosierung des Relaxin erfolgte über Verdünnungsreihen. Dabei wurde RLX zunächst in der Konzentration von 10^{-3} mol/l in Krebs-Henseleit-Lösung gelöst. (Eine Minute auf Shaker „IKA MS2 minishaker“® (VWR Darmstadt/D)). Durch Verdünnungsreihen im Verhältnis 1:10 wurde eine Konzentrationsreihe von 10^{-4} mol/l bis 10^{-9} mol/l hergestellt.

Zur Testung der RLX-Wirkung auf die Inotropie der Muskelstreifenpräparationen wurde dann jeweils im Verhältnis 1:1000 aus den RLX-Stammlösungen nach folgendem Schema zum Perfusat zugegeben:

Zeitpunkt	ml und Molarität in Reservoir vor Zugabe	Zugabe von ml einer RLX-Stammlösung	RLX-Konzentration im Medium
Beginn	440 ml, 0 mol/l	440µl, 10^{-9} mol/l	10^{-12} mol/l
Nach 5 Minuten	435 ml, 10^{-12} mol/l	391µl, 10^{-8} mol/l	10^{-11} mol/l
Nach 10 Minuten	430 ml, 10^{-11} mol/l	391µl, 10^{-7} mol/l	10^{-10} mol/l
Nach 15 Minuten	425 ml, 10^{-10} mol/l	386µl, 10^{-6} mol/l	10^{-9} mol/l
Nach 20 Minuten	420 ml, 10^{-9} mol/l	381µl, 10^{-5} mol/l	10^{-8} mol/l
Nach 25 Minuten	415ml, 10^{-8} mol/l	377µl, 10^{-4} mol/l	10^{-7} mol/l

5.3.4. Stimulation mit exogenem Isoproterenol

Nachdem die Muskelstreifen sich für eine Stunde unter RLX-Einfluss befanden, wurde das Perfusat auf eine RLX-freie, carbogenbegaste Krebs-Henseleit-Lösung umgestellt und eine Stabilisierungszeit von 10 Minuten abgewartet. Die Stimulationsparameter blieben unverändert. Anschließend wurde zur Testung der erhaltenen inotropen Kapazität der Muskelstreifen eine Stimulation mit kumulativen Dosen exogenen Isoproterenols (einem selektiven Agonisten der adrenergen β -Rezeptoren) nach folgendem Schema durchgeführt:

Zeitpunkt	ml und Molarität in Reservoir vor Zugabe	Zugabe von ml einer Isoproterenol-Stammlösung	Isoproterenolkonzentration im Medium
Beginn	200 ml, 0 mol/l	200 μ l, 10^{-8} mol/l	10^{-11} mol/l
Nach 3 Minuten	197 ml, 10^{-11} mol/l	177 μ l, 10^{-7} mol/l	10^{-10} mol/l
Nach 6 Minuten	194 ml, 10^{-10} mol/l	176 μ l, 10^{-6} mol/l	10^{-9} mol/l
Nach 9 Minuten	191 ml, 10^{-9} mol/l	173 μ l, 10^{-5} mol/l	10^{-8} mol/l
Nach 12 Minuten	188 ml, 10^{-8} mol/l	171 μ l, 10^{-4} mol/l	10^{-7} mol/l
Nach 15 Minuten	185 ml, 10^{-7} mol/l	168 μ l, 10^{-3} mol/l	10^{-6} mol/l

5.4. Bestimmung der Massen

Nach der Entnahme der Muskelstreifenpräparationen wurden die Organteilgewichte von linkem Vorhof, linkem Ventrikel, rechtem Vorhof und rechtem Ventrikel der jeweils sieben SHR, resp. WKY bestimmt. Dabei wurden die rechten Vorhöfe bzw. rechten Ventrikel abpräpariert, sodass der dünne Rechtsherzanteil des Vorhof- bzw. Ventrikelseptum jeweils beim linken Herzen verblieb.

Anschließend wurden die Organteile weiter zerteilt und für die folgenden biochemischen Untersuchungen (PCR und Western-Blots) eingefroren.

5.5. Gen-Expression von rRLX-3 (PCR für mRNA)

5.5.1. Reagenzien

RNA-Präparation:

Flüssiger Stickstoff

Trizol Invitrogen

Chloroform Sigma

Isopropanol Sigma

70% Ethanol Sigma

DEPC-H₂O

cDNA-Synthese:

1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR Roche

(25mM MgCl₂, dNTP's, Oligo-p(dT)₁₅, RNase-Inhibitor, Reverse Transkriptase)

PCR:

MgCl₂ (wird mit der Polymerase geliefert) Perkin Elmer

Forward primer (35)

- 5'-GGAATTCTTCGCTGATGGAGA-3' TIB MOLBIOL

Reverse primer (35)

- 5'-ATAGCTGACAGCAGGTTGGAC-3' TIB MOLBIOL

dNTP's Eppendorf

DNA-polymerase Perkin Elmer

(inkl. 10x Reaktionspuffer)

Foreward primer für GAPDH:

- 5'-ATG ACA TCA AGA AGG TGG TG-3' TIB MOLBIOL

Reverse Primer für GAPDH:

- 5'-CAT ACC AGG AAA TGA GCT TG-3' TIB MOLBIOL

5.5.2. Arbeitsschritte

Zur Extraktion von RNA wird das Gewebe gleichmäßig unter flüssigem Stickstoff zermörsert und anschließend bei Raumtemperatur für ca. 10 Minuten in 1 ml/100mg Gewebe Trizol lysiert. Nach Zugabe von 0,2 Vol%/ml Chloroform und erneuter Inkubation bei Raumtemperatur für 3 Minuten wird die Lösung für 15 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthält die zu untersuchende RNA und wird daher vorsichtig abgenommen. Nun wird die RNA durch Zugabe von 0,5Vol%/ml Isopropanol für 30 Minuten auf Eis gefällt, anschließend erneut zentrifugiert (45 min/13000 rpm). Nach Abgießen des Überstands wäscht man das RNA-Pellet mit 70%igen Ethanol und zentrifugiert erneut bei 13000 rpm für 5 Minuten. Nach Abgießen des Überstands wird das Pellet kurz trocknen gelassen (ca. 2 Minuten). Das derart präparierte Pellet wird sodann in DEPC-H₂O aufgenommen. Mittels eines Photometers (Eppendorf) wird die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, wobei 1 OD 40µg/ml RNA entsprechen.

Für die cDNA-Synthese werden 2µg der nach oben beschriebenen Verfahren präparierten RNA eingesetzt. Für die cDNA-Synthese verwendete ich das „1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR“ von Roche. Hierbei werden in Mischung gebracht: 2µg RNA, 4µl 25 mM MgCl₂, 2 µl dNTP's, 2µl Oligo-p(dT)₁₅ primer, 1µl RNase Inhibitor, 0,5µl Reverse Transkriptase. Mit sterilem Wasser wird die Lösung auf ein Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt und anschließend in einem PCR-Cycler (Mastercycler®/Eppendorf) für 10 Minuten auf 25°C, für 60 Minuten auf 42°C und abschließend für 5 Minuten auf 94°C temperiert.

Aus der c-DNA wird mittels der spezifischen primer für Relaxin (35) in einer weiteren PCR (Doppelstrang-DNA) Relaxin amplifiziert. Dazu bringt man 2(ggf.5)µl c-DNA mit 3mM MgCl₂, 5µl 10xReaktionspuffer, 1µl forward primer, 1 µl reverse primer, 1µl 10mM dNTP's und 0,25µl DNA-Polymerase in Mischung und füllt auf 50µl mit sterilem Wasser auf. Diese Mischung wird zunächst für 10 Minuten auf 94°C erwärmt, durchläuft dann 30 Zyklen des Schemas: 94°C-52°C-72°C für jeweils eine Minute, bevor eine zehnmütige 72°C-Phase und letztlich Kühlung auf 4°C die PCR abschließen.

Die negativ geladene DNA wird nun in einem Agarosegel elektrophoretisch (60 Minuten bei 100 V) ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Agarosegel (2% Agarose in TAE-Puffer) enthält 0,7 µg/ml Ethidiumbromid, ein Farbstoff der sich in die DNA einlagert und die Fluoreszenz der DNA im ultravioletten Licht deutlich verstärkt. Zur Detektion der gesuchten Bande wird ein Gemisch von DNA-Fragmenten bekannter Größe verwandt, das in einer Bahn des Agarosegels aufgetrennt wird.

Die Expression von Relaxin wird normiert auf die Expression des nichtregulierten sog. „Housekeeping“-Gens GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase/Ratte), für das aus jeder der cDNA-Proben ebenfalls eine PCR durchgeführt wird.

5.6. Nachweis von rRLX-3-Peptid (Western-Blot)

Das Prinzip eines Western-Blot zur Identifikation und semiquantitativen Bestimmung der Konzentration eines definierten Proteins besteht darin, dass die Proteine eines Proteingemischs in Lösung zunächst elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt werden, anschließend auf eine Membran übertragen und fixiert werden, wo sie spezifische Antikörper binden. In einem weiteren Schritt wird ein mit einem Enzym gekoppelter Antikörper an den ersten spezifischen Antikörper gebunden. Das angekoppelte Enzym vermag eine Reaktion zu katalysieren, dessen Produkt auf photometrischem Wege quantifiziert werden kann und somit eine semiquantitative Aussage über die Konzentration des zu untersuchenden Proteins im ursprünglichen Gemisch zulässt.

5.6.1. Reagenzien

Gewebeextrakte:

Flüssiger Stickstoff

Lysepuffer:

20	mM Hepes-KOH pH 7,9	Sigma
350	mM NaCl	Sigma
20%	Glycerol	Sigma
1	mM MgCl ₂	Sigma
0,5	mM EDTA	Sigma
1%	Triton X-100	Sigma
1	mM DTT	Sigma
1	mM Pefabloc	Roche
1	M Natriumfluorid	Sigma
(4,199 g NaF / 100 ml = 1 M, verwendet: 10 mM)		
100	mM Na(ortho)vanadat	Sigma
(1,839 g Na ₃ VO ₄ / 100 ml = 100mM, verwendet: 1 mM)		

SDS-Page-Gel:

Trenngel: (Dosierungen für ein Gel):

3,28	ml	H ₂ O	
1,56	ml	1,5M Tris-Cl pH 8,8	Sigma
62,5	µl	10% SDS	SERVA
1,28	ml	40% Acrylamidlösung	Roth
5	µl	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma
50	µl	10% Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma

Sammelgel:

3,65	ml	H ₂ O	
625	ml	Tris-Cl pH 6,8	Sigma
50	µl	10% SDS (Natriumdodecylsulfat)	SERVA
625	µl	40% Acrylamidlösung	Roth
5	µl	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma
50	µl	10% Ammoniumpersulfat	Sigma

10x-SDS-Laufpuffer:

30,3	g	Tris p.a.	Merck
144	g	Glycine	Merck
1	g	SDS (Natriumdodecylsulfat)	SERVA
H ₂ O		auf 1000 ml auffüllen	

SDS-Probenpuffer:

655	µl	1 M Tris-Cl pH 6,8	Sigma
1,13	ml	87% Glycerol	Sigma
500	µl	β-Mercaptoethanol	Sigma
2,3	ml	10% SDS	SERVA
10	mg	Bromphenolblau	Sigma

Blotten:

Immobilon-P-Membran®	Milipore
Methanol 100% (zur Aktivierung)	Merck

Blotpuffer: (1 Liter)

100 ml 10x SDS- Laufpuffer

200 ml Methanol

Sigma

700 ml H₂O

Blockierung:

Rotibloc® Blockierungslösung (1:10 mit PBS aus Konzentrat)

Roth

Westernwaschpuffer:

100 ml 20x TBS

4 ml 10% Tween20

1896 ml H₂O

(20x TBS: 1 M Tris (121,14 g)+3 M NaCl (175,32 g) auf 1000 ml mit H₂O)

Spezifischer Antikörper gegen rRLX-3: (233)

Polyklonaler AK aus Kaninchen

Gabe von Dr. R. Bathgate (Howard Florey Institute, Melbourne, Australia)

monoklonaler Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper

Santa Cruz

Zur Normierung:

monoklonaler Maus-anti-Aktin-AK

Santa Cruz

Entwicklung:

Lumi-Light® Western-Blot Substrate

Roche

CL-XPosure® Clear Blue X-Ray-Film

Pierce

5.6.2. Arbeitsschritte

Zunächst werden Gewebeextrakte hergestellt. Dazu werden von den betreffenden Organteilen jeweils gleiche Mengen bezogen auf das Nassgewicht verwandt. Die Gewebe werden in flüssigem Stickstoff gefroren und mechanisch zermörsert, anschließend mit 2 ml Tris-Cl-pH-7,5-Puffer mit Inhibitoren (DTT, Pefabloc®) gewaschen und für 4 Minuten bei 400 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml Lysepuffer (4°C) aufgenommen. Das zerkleinerte Gewebe wird anschließend für 30 min auf Eis inkubiert, um eine vollständige Lyse zu erreichen. Daraufhin für 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert um die Zelltrümmer (als Pellet) abzutrennen. In dem Überstand befindet sich in der flüssigen Phase das zu untersuchende lösliche Protein. Dieses kann bei -70°C gelagert werden.

Im zweiten Schritt wird die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt: Dazu fand das Bio-RAD-Protein-Assay® (BIORAD) Verwendung. Nach Herstellung einer Eichgeraden wurde mit 1µl Gewebelysat die Konzentration der Gesamtproteine an der Eichgeraden abgelesen. Das zugrunde liegende Konzept ist ein Wechsel der Absorption durch Bildung von Proteinkomplexen in Abhängigkeit von der Konzentration der enthaltenen Proteine. Dabei verändert sich das Absorptionsmaximum eines Farbstoffs (Coomassie Brilliant Blue G-250®) durch Bindung an aromatische Aminosäurereste (v.a. Arginin) von Proteinen von 465 nm zu 595 nm. Mittels eines Photospektrometers kann kurz nach Vermischen von 1ml des Testreagenz mit 1 µl der Proteinlösung die Absorption bei 595 nm gemessen und vermittels einer Eichgeraden – hergestellt durch vier Messungen mit Proteinlösungen bekannter Konzentration – die Konzentration abgeschätzt werden. Da es in unseren Versuchen lediglich um vergleichend semiquantitative Messungen der Proteingemische untereinander ging, konnte eine mögliche leichte Ungenauigkeit in der absoluten Proteinmenge – bedingt durch verschiedene Proteinzusammensetzung der Eichlösungen und der Zellextrakte – in Kauf genommen werden.

SDS-Poliacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE):

Die Proteine des Proteingemischs werden zunächst denaturiert und in Ihrer Ladung ausgeglichen. Durch SDS als Detergens, das sich an Proteine anlagert und diese denaturiert, resultieren Komplexe, die durch die Sulfatgruppen des SDS eine gleichmäßig verteilte, negative Ladung haben. Durch das in dem SDS-Laufpuffer

enthaltene β -Mercaptoethanol werden Proteinuntereinheiten, die durch Disulfidbrücken kovalent verbunden sind (z.B. bei Relaxin) getrennt. Kurzes Aufkochen schließt den vorbereitenden Denaturierungsprozess ab.

Zur elektrophoretischen Auftrennung des Proteingemisches wird zunächst ein Trenngel angefertigt. Dieses wird zwischen zwei senkrecht stehenden Glasplatten gegossen, wo es binnen einer halben Stunde polymerisiert. Ein Gel, welches durch eine niedrigere Acrylamidkonzentration und einen anderen Puffer eine kleinere Porengröße und einen niedrigeren pH-Wert (pH 6,8) aufweist, das sogenannte Sammelgel, wird dann auf das Trenngel aufgegossen. In das Sammelgel werden mit Hilfe eines kleinen Kammes kleine Kammern eingegossen, in die später die Proteinproben appliziert werden. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels (ca. 2 Stunden) wird der Kamm entfernt.

Dann werden die Proteinlösungen mit den denaturierten Proteinen in dem Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei werden die Proben in die Taschen des Sammelgels gegeben. In dem Sammelgel beginnen bei angelegter Spannung (40 mA für eine zwei Gele fassende Elektrophoresekammer) die Chlorid-Ionen, das ionisierte Glycinat und die Proteine in Richtung der Anode zu wandern. Mit Eintritt in das Sammelgel (pH 6,8) kommt es zur Umwandlung vom anionischen Glycinat in das ungeladene Glycin. Infolgedessen sinkt die Stromstärke hier ab, während die Spannung zunimmt. Die Proteine laufen in dieser hohen Spannung schnell zu der durch die Chlorid-Ionen gebildeten Bande auf, hinter der sie in einer schmalen Front konzentriert werden. Im Bereich der Chlorid-Ionen werden die Proteine verlangsamt da die Spannung hier durch die reichlich vorhandenen negativen Ladungen der Chlorid-Ionen steil abfällt. Mit Eintritt in das Trenngel (pH 8,8) ist die Laufgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld wegen der durch die SDS-Denaturierung gleich verteilten negativen Ladung und der im Trenngel limitierend wirkenden, kleinen Porengröße nur noch von der Größe der Proteine (Molekülmasse) abhängig. Zum Sichtbarmachen der im elektrischen Feld laufenden Proteinbanden wird der Farbstoff Bromphenolblau zugesetzt.

Nachdem das Proteingemisch derart innerhalb des Trenngels im elektrischen Feld nach seiner jeweiligen Größe aufgetrennt wurde, erfolgt das eigentliche Blotting. Das Gel wird aus der ersten Elektrophoresekammer entnommen und in eine zweite Kammer überführt, in der der Stromfluss nunmehr senkrecht zur Geloberfläche

angelegt wird. Konkret wurden drei in Blotpuffer getränkte Filterpapiere auf die Kathode gelegt, das Elektrophoresegel aufgelegt, die (zuvor durch Bad in 100% Methanol aktivierte) Blotmembran (Immobilon-P-Membran®) darüber gelegt und anschließend der Kontakt zur Anode erneut durch drei blotpuffergetränkte Filterpapiere hergestellt. Nach Anlegen einer niedrigen Spannung (10 V) kommt es bei dem sehr geringen Widerstand zu einem hohen Stromfluss (500-800 mA) mit dem die Proteine in einer Stunde auf die Blotmembran wandern. Anschließend wird die Membran für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungslösung gelegt.

Nach Abwaschen der Blockierungslösung wird die Membran mit dem ersten spezifischen RLX-Antikörper (1:1000 verdünnt in Blockierungslösung) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. An drei jeweils fünfminütige Waschschriffe mit reiner Blockierungslösung schließt sich die Inkubation mit dem zweiten Antikörper an, der mit einer HRP (horseradish-peroxidase) konjugiert ist. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (1:10000 verdünnt in Blocklösung) erfolgt erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Bevor die Membran nunmehr entwickelt werden kann, wird sie erneut in Blockierungslösung für 3 x 5 Minuten und anschließend für 3 x 10 Minuten gewaschen.

Das Entwickeln der Membran folgt den Herstellerangaben des LumiLight® Western-Blotting Substrate von Roche. Für die zehnminütige Entwicklung in der Dunkelkammer wurde ein CL-XPosure/ClearBlue® X-Ray-Film von Pierce verwendet.

Der so belichtete Film kann nunmehr eingescannt und mit herkömmlichen computergestützten Densimetrien quantifiziert werden.

5.7. Statistische Methoden

Die Ergebnisse werden als arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichung (SD) angegeben.

Da nicht von einer Voraussetzung der Normalverteilung und Varianzgleichheit ausgegangen werden konnte, erfolgte der Vergleich zwischen WKY und SHR (Gewicht, Indizes, PCR, Western) anhand eines Mann-Whitney-Rangsummentests.

Der Zusammenhang zwischen rRLX-3-Konzentration und dem Myokardgewicht von

linkem Vorhof bzw. linkem Ventrikel wurde in einem einfachen linearen Regressionsmodell gemessen. Die jeweilige rRLX-3-Konzentration und die Teilorgangewichte wurden so transformiert, dass die Angaben als prozentuale Abweichung vom dazugehörigen Mittelwert der Kontrolltiere in das Modell aufgenommen wurden. Die lineare Regression und die Bestimmung des entsprechenden Bestimmtheitsmaßes r^2 wurden mit dem Programm SigmaStat® (Jandel Scientific) durchgeführt.

Die Darstellung und der Vergleich der nicht-linearen Isoprenalin- und RLX-Kurven wurden im Programm SigmaPlot® (Jandel Scientific) durchgeführt.

Die Werte wurden über die Gesamtgruppen mittels eines Kruskal-Wallis-ANOVA verglichen und anschließend wurde mit einem Student-Newman-Keuls-Test nach signifikanten Unterschieden innerhalb einzelner Paare gesucht.

Ein α -Fehler kleiner 5% wurde wie üblich als Signifikanzniveau festgelegt (entsprechend $p < 0,05$).

6. Ergebnisse

6.1. Tiergewichte

Die Gewichte der Tiere gehen aus folgender Tabelle hervor:

WKY	Gewicht in g	SHR	Gewicht in g	Signifikanz
Tier 1	633	Tier 8	375	
Tier 2	656	Tier 9	351	
Tier 3	599	Tier 10	410	
Tier 4	612	Tier 11	404	
Tier 5	705	Tier 12	366	
Tier 6	644	Tier 13	335	
Tier 7	650	Tier 14	398	
Mittelwert (+/-SD)	643 (+/-34)	Mittelwert (+/-SD)	377(+/-28)	P< 0,001

Die unterschiedlichen Gewichte der gleich alten Tiere ist auf das bekanntermaßen schwächere Wachstum der SHR zurückzuführen.

6.2. Systolischer Blutdruck

Die gemessenen systolischen Blutdrücke bei den SHR lagen bei 188 (+/-15) mmHg in wachem und 150 (+/-13) mmHg in narkotisiertem Zustand.

Bei den WKY war in wachem Zustand ein systolischer Blutdruck von 112 (+/-10) mmHg und in narkotisiertem Zustand von 97 (+/-9) mmHg zu messen.

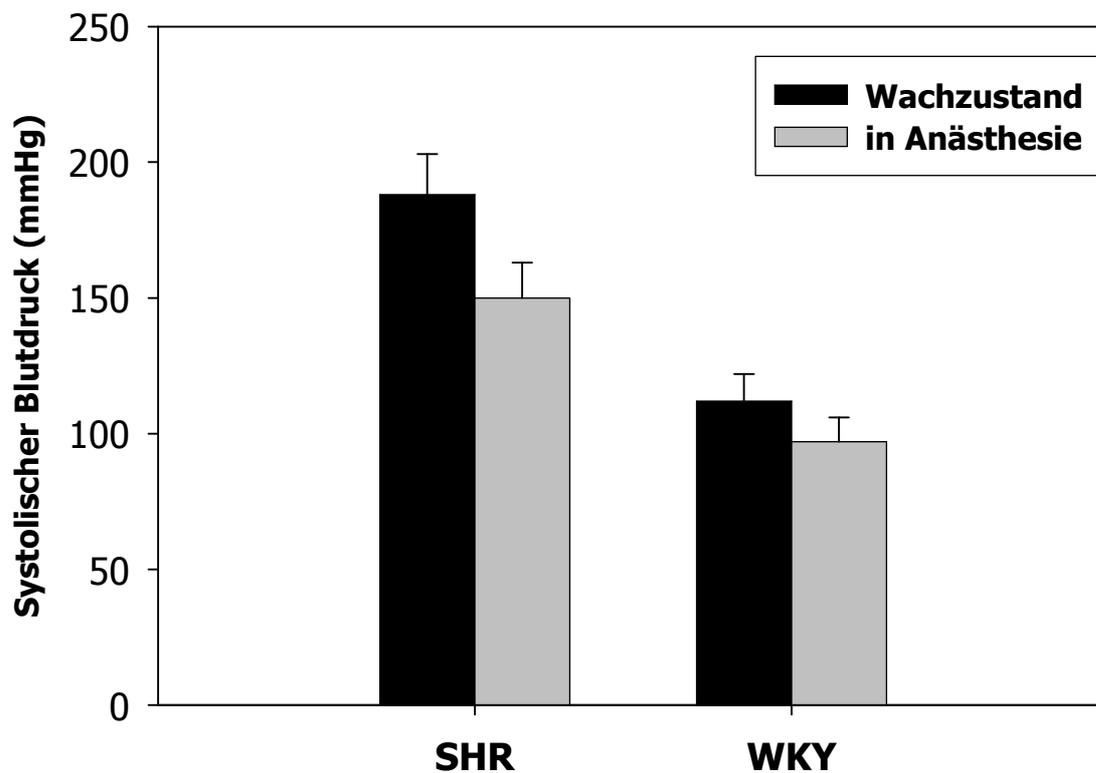


Abb.1: Mittelwerte der systemischen, arteriellen, systolischen Blutdrücke der SHR (spontan hypertensive Ratten) und WKY (Wistar-Kyoto Ratte). Die Blutdrücke wurden unblutig am Schwanz der Tiere gemessen (siehe Text). Anästhesie mit Natrium-Thiopental (Trapanal®) 25 mg/kg Körpergewicht, n=7 pro Gruppe.

Die Rohdaten sind im Tabellenanhang als Tabelle I wiedergegeben.

6.3. Inotrope Effekte von Relaxin und Isoprenalin

Bei den sieben atrialen und sieben ventrikulären Muskelstreifenpräparation der SHR und WKY wurden jeweils die entwickelten Kontraktionskräfte gemessen und ins Verhältnis zur Ausgangskontraktionskraft ohne RLX-Stimulation (=100%) gesetzt.

Im Vergleich von SHR und WKY zueinander ergaben sich weder in den Vorhöfen noch in den Ventrikeln signifikante Unterschiede in der Reaktion auf exogenes Relaxin.

In beiden Gruppen zeigte sich kein positiv inotroper Effekt auf Ventrikelmyokard.

In beiden Gruppen zeigte sich aber ein positiv inotroper Effekt auf die atrialen Muskelstreifenpräparationen, der als früher Effekt in jeder Konzentrationsstufe nach ca. 2 Minuten sein Plateau erreichte, und dann auf dem erreichten Niveau konstant blieb. Der Effekt ist dosisabhängig. Erste Tendenzen zur positiven Inotropie zeigen sich bereits bei Dosierungen von 10^{-11} mol/l Relaxin; erste signifikante Effekte im Vergleich zum Ausgangswert der entsprechenden Gruppe zeigen sich bei 10^{-10} mol/l Relaxin, die ansteigend bis zu einer Konzentration von 10^{-8} mol/l auftreten. Eine weitere Erhöhung auf 10^{-7} mol/l wird von keinem weiteren Kraftzuwachs der Muskelstreifenpräparationen gefolgt.

Unter derartigen experimentellen in-vito-Bedingungen lässt sich eine Kraftsteigerung auf ca. 200% bei atrialen Rattenmyokardpräparationen erzielen.

Graphisch ergibt sich folgendes Bild:

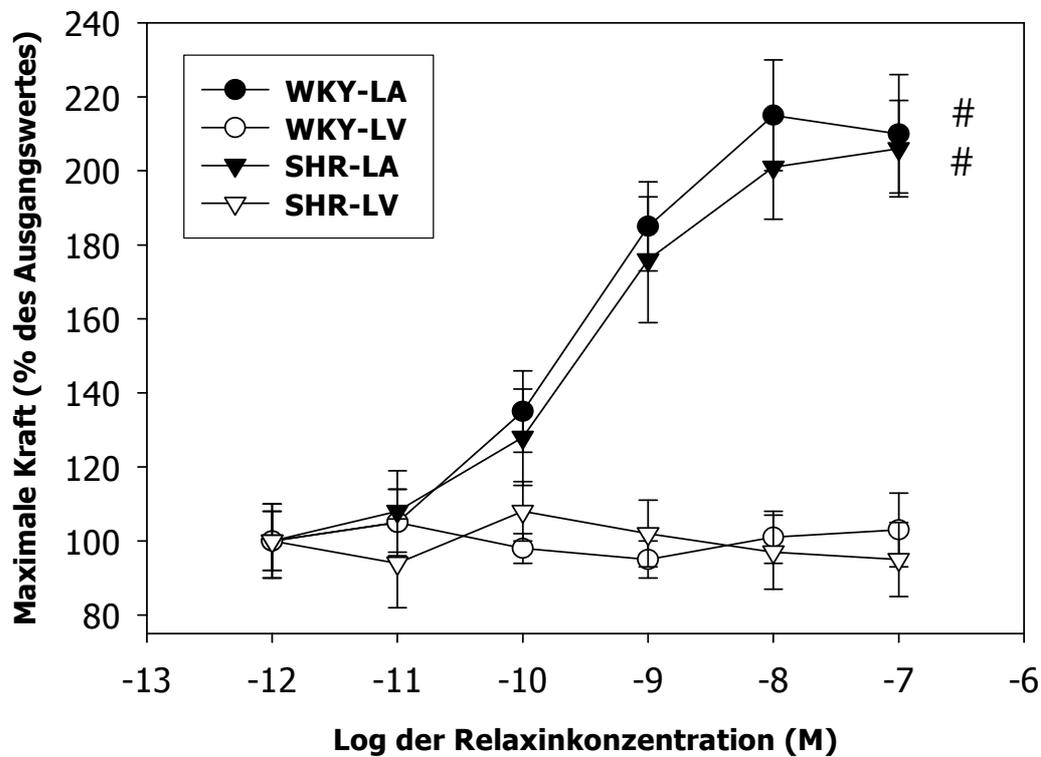


Abb.2: Inotrope Reaktion auf Stimulation mit exogenem Relaxin bei SHR und WKY. Gemessen an elektrisch mit Rechteckimpulsen stimulierten, isolierten Muskelstreifen/-faszikelpräparationen. Maximale Kraftentwicklung jeweils zwei Minuten nach Erreichen der entsprechenden Dosierungsstufe; 30°C; Ca-Konzentration des Krebs-Henseleit-Mediums 1,7 mmol

n=7 pro Gruppe

= $p < 0,001$ (im Vergleich zum Ausgangswert)

Die Rohdaten sind im Tabellenanhang als Tabelle II-IV wiedergegeben.

Unter gleichen Bedingungen durchgeführte Dosis-Wirkungs-Kurven mit dem kardialen β -Agonisten Isoproterenol wurden ebenfalls durchgeführt. Sie sollen hier als Vergleich dienen.

Graphisch ergibt sich aus den Werten der obigen beiden Tabellen folgendes Bild:

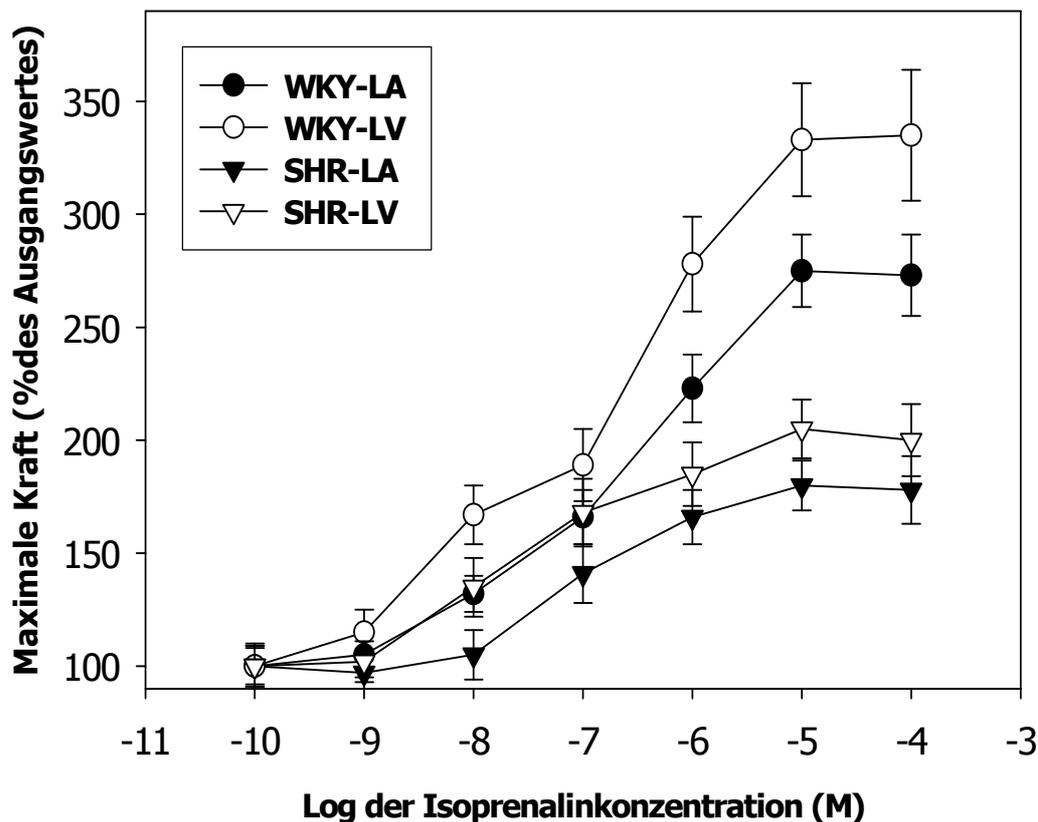


Abb.3: Inotrope Reaktion auf Stimulation mit exogenem Isoprenalin bei SHR und WKY. Gemessen an elektrisch mit Rechteckimpulsen stimulierten, isolierten Muskelstreifen/-faszikelpräparationen. Maximale Kraftentwicklung jeweils zwei Minuten nach Erreichen der entsprechenden Dosierungsstufe, 30°C, Ca-Konzentration des Krebs-Henseleit-Mediums 1,7 mmol

n=7 pro Gruppe

Rohdaten sind im Tabellenanhang in den Tabellen V-VII wiedergegeben.

Wie den Tabellen (siehe Anhang) und dem Diagramm zu entnehmen ist, ist das Ausmaß der Kontraktilitätssteigerung unter Stimulation mit Isoprenalin bei SHR auf atrialer Ebene mit 273(+/-18)% (WKY) bzw. 178(+/-15)% (SHR) und ventrikulärer Ebene mit 335(+/-29)% (WKY) bzw. 200(+/-16%) (SHR) gegenüber den nicht hypertensiven WKY signifikant reduziert. Die positiv inotrope Wirkung des Relaxin

auf atriale Muskelstreifenpräparationen ist im Bereich des Wirkmaximums bei SHR unter gegebenen in-vitro-Bedingungen vergleichbar der durch maximale β -Stimulation erreichbaren Inotropiesteigerung. Bei WKY liegt der maximale RLX-Effekt auf die atriale Inotropie im Bereich von 70-80% der durch maximale Isoprenalinstimulation erreichbaren Inotropiesteigerung.

6.4. Organgewichte des Herzens

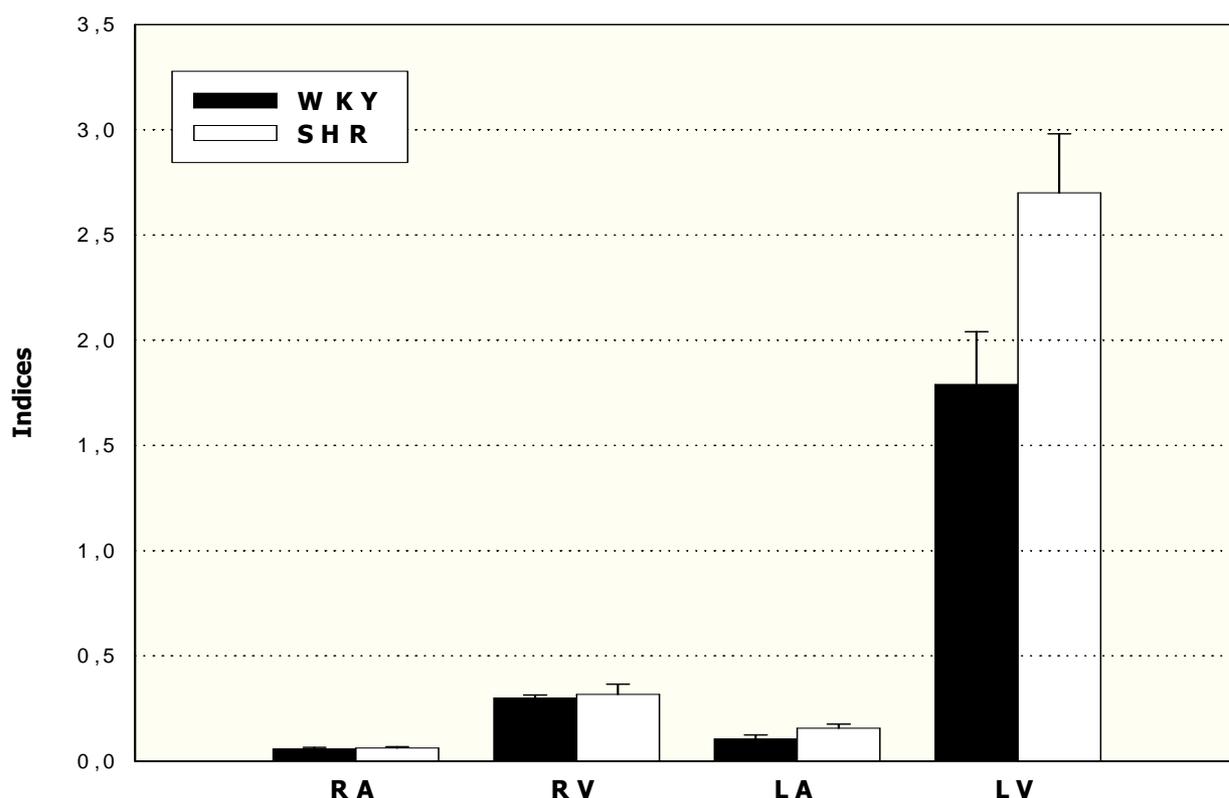
Alle Teilorgane wurden einzeln gewogen. Als Index der betreffenden Organteile wurde jeweils der Quotient des Organteilgewichts bezogen auf das Körpergewicht des betreffenden Tieres berechnet.

Die Rohdaten der einzelnen Tiere sind im Tabellenanhang in Tabelle VIII wiedergegeben.

Im Mittel ergaben sich für die beiden Gruppen folgende Werte (in Klammern die Standardabweichungen):

Typ	Gewicht (g)	RA (g)	RA-Index	LA (g)	LA-Index	RV (g)	RV-Index	LV (g)	LV-Index
WKY	643 (34)	36 (4)	0,057 (0,008)	67 (8)	0,105 (0,02)	192 (8)	0,299 (0,014)	1147 (107)	1,79 (0,25)
SHR	377 (28)	24 (2)	0,063 (0,005)	58 (5)	0,156 (0,02)	119 (11)	0,317 (0,048)	1013 (62)	2,70 (0,28)
p	p<0,001	p<0,001	p=0,10	p=0,053	p<0,001	p<0,001	p=0,62	p=0,011	p<0,001

Organteilgewichtindices Herz



Es zeigt sich bei den Massenindices der linken Herzteile als Maß der Massenvermehrung (Hypertrophie/Fibrose) ein hochsignifikanter Unterschied, wohingegen die rechtskardialen Anteile sich nicht signifikant unterscheiden.

6.5. RLX-mRNA- und rRLX-3-Proteinkonzentrationen

Zur Darstellung der RLX-mRNA-Konzentrationen wurden die nach PCR erhaltenen Werte auf GAPDH normiert und anschließend ins Verhältnis zu den jeweiligen Mittelwerten der WKY gesetzt.

Mit der Western-Blot-Technik wurden wie oben beschrieben für die vier Teile des Herzens, die Aorta, die Pulmonalarterie und auch für Lunge und Niere die jeweiligen rRLX-3-Proteinkonzentrationen bestimmt.

Es zeigt sich, dass im Myokard des linken Ventrikels bei SHR die nachgewiesene Menge an RLX-mRNA gegenüber der bei WKY-Ratten gefundenen auf 258% erhöht ist; ebenfalls signifikant und relevant erhöht ist die RLX-mRNA-Konzentration in den

linken Vorhöfen der SHR (232%).

Auch auf dem Niveau der rRLX-3-Proteinkonzentration zeigt sich, dass im Myokard des linken Ventrikels bei SHR die nachgewiesene Menge an rRLX-3-Protein gegenüber der bei WKY gefundenen auf 239% erhöht ist; ebenfalls signifikant und relevant erhöht ist die rRLX-3-Protein-Konzentration in den linken Vorhöfen der SHR (254%).

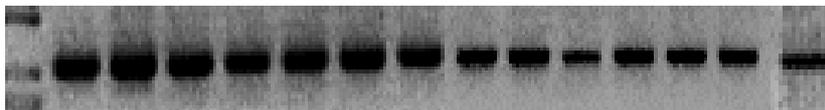
Die Ergebnisse der anderen Organe erreichen weder für die RLX-mRNA-PCR, noch für die rRLX-3-Protein-Western-Blots Signifikanzniveau, wengleich in Aorta und Niere ein Trend zu leicht vermehrter RLX-Transkription und ein leichter Trend zu jedoch nur leicht vermehrter rRLX-3-Transkription zu sehen ist.

Keinerlei Trend lässt sich für die rechten Herzhöhlen darstellen.

Für die linken Vorhöfe und Ventrikel werden die Originalbefunde der RLX-mRNA-PCR und rRLX-3-Western-Blots dargestellt:

(jeweils links die sieben SHR (Nr. 8-14), rechts die sieben WKY (Nr. 1-7))

PCR der linken Vorhöfe:



Tier: 8 9 10 11 12 13 14 1 2 3 4 5 6 7

Abb.4: RLX-mRNA-Transkription im linken Vorhof, Originalbefunde der PCR-Befunde. Tiere Nr.8-14 sind SHR, Tiere Nr.1-7 sind WKY.

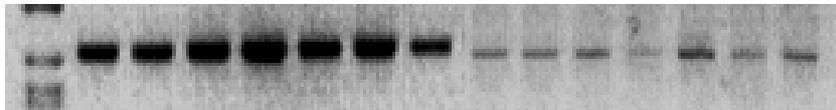
Western-Blots der linken Vorhöfe:



Tier: 8 9 10 11 12 13 14 1 2 3 4 5 6 7

Abb.5: RLX-Protein im linken Vorhof, Originalbefunde der Western-Blot-Befunde. Tiere Nr.8-14 sind SHR, Tiere Nr.1-7 sind WKY.

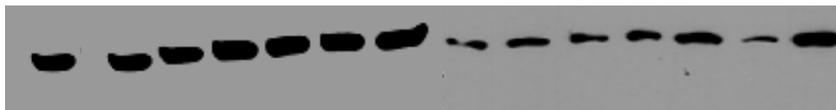
PCR der linken Ventrikel:



Tier: 8 9 10 11 12 13 14 1 2 3 4 5 6 7

Abb.6: RLX-mRN-Transkription im linken Ventrikel, Originalbefunde der PCR-Befunde. Tiere Nr.8-14 sind SHR, Tiere Nr.1-7 sind WKY.

Western-Blots der linken Ventrikel:



Tier:8 9 10 11 12 13 14 1 2 3 4 5 6 7

Abb.7: RLX-Protein im linken Ventrikel, Originalbefunde der Western-Blot-Befunde. Tiere Nr.8-14 sind SHR, Tiere Nr.1-7 sind WKY.

Graphische Darstellung der mRNA- und Protein-Konzentrationen:

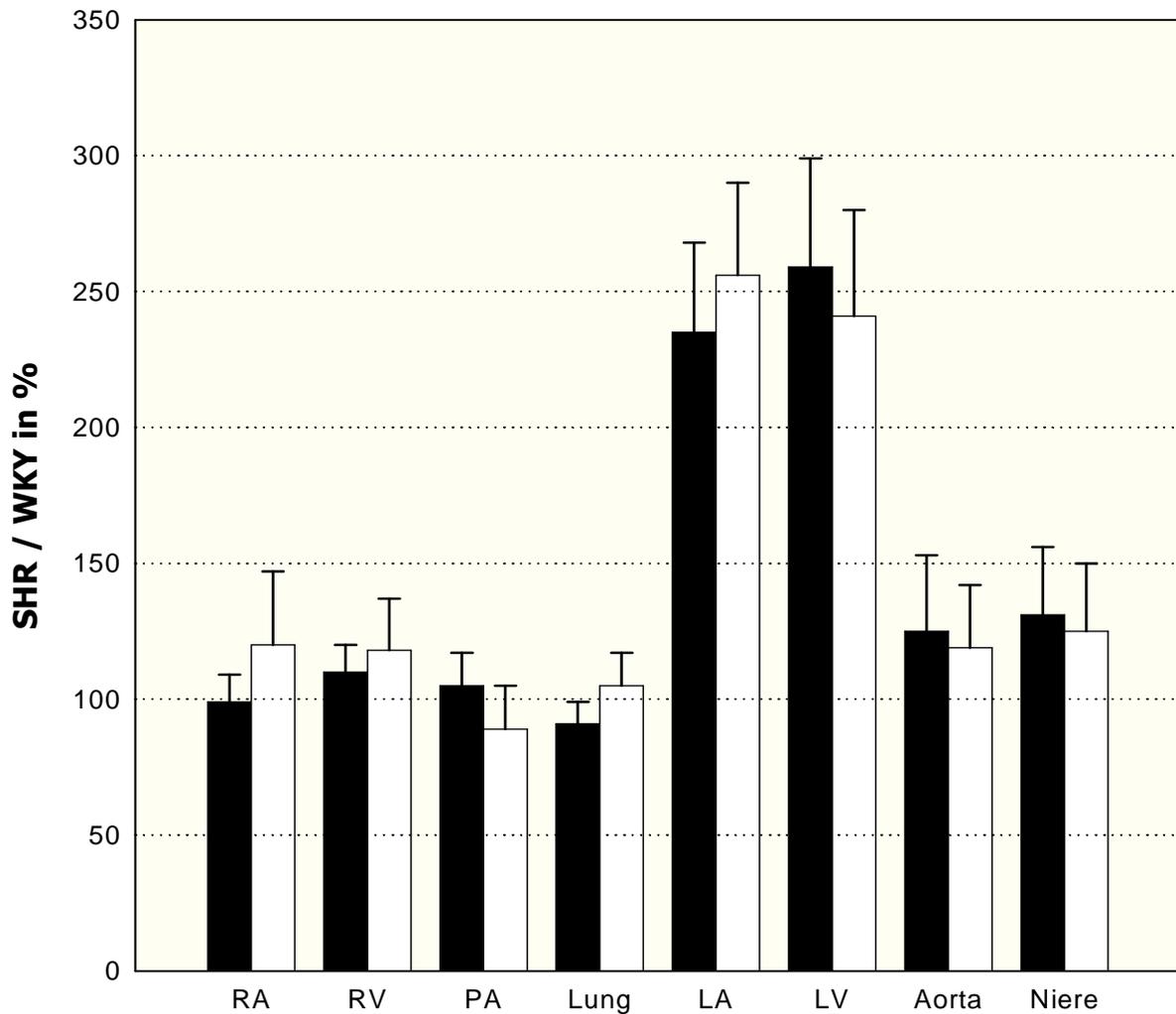


Abb.8: Verhältnis der mRNA-Konzentrationen (dunkle Säulen) und Proteinkonzentrationen (helle Säulen) in den verschiedenen Geweben bei SHR und WKY. Als Säulen wiedergegeben sind die Quotienten der jeweiligen Mittelwerte der Konzentration von SHR zu WKY in %. n=7

Die Rohdaten sind im Tabellenanhang in den Tabellen IX bis XXIV wiedergegeben.

6.6. Korrelation von Massenindex und Proteinkonzentration

Vermittels einer linearen Regression lässt sich bei den Tieren der Gruppe der SHR eine Korrelation von Myokardgewicht für linken Vorhof/linken Ventrikel und den gefundenen RLX-Proteinkonzentrationen im betreffenden Gewebe erkennen. Dazu wurde zunächst für jede der sieben SHR ein Massenindex für Atrium und Ventrikel berechnet. Dieser ergibt sich als Quotient des individuellen Organ(teil)-Gewichtsindices auf den Mittelwert der entsprechenden Organ(teil)-Gewichtindices der WKY bezogen.

Ebenso wurde für die Proteinkonzentrationen verfahren. Die individuellen Proteinkonzentrationen von linkem Vorhof bzw. linkem Ventrikel der sieben SHR wurden auf den Mittelwert der Proteinkonzentrationen in linkem Atrium bzw. linken Ventrikel der sieben WKY bezogen.

Aus den so erhaltenen zwei Koordinaten lässt sich eine lineare Regression ermitteln. Als entsprechende Bestimmtheitsmaße r^2 wurden für die Vorhöfe 0,75 ($p=0,012$) und für die Ventrikel 0,77 ($p=0,009$) ermittelt.

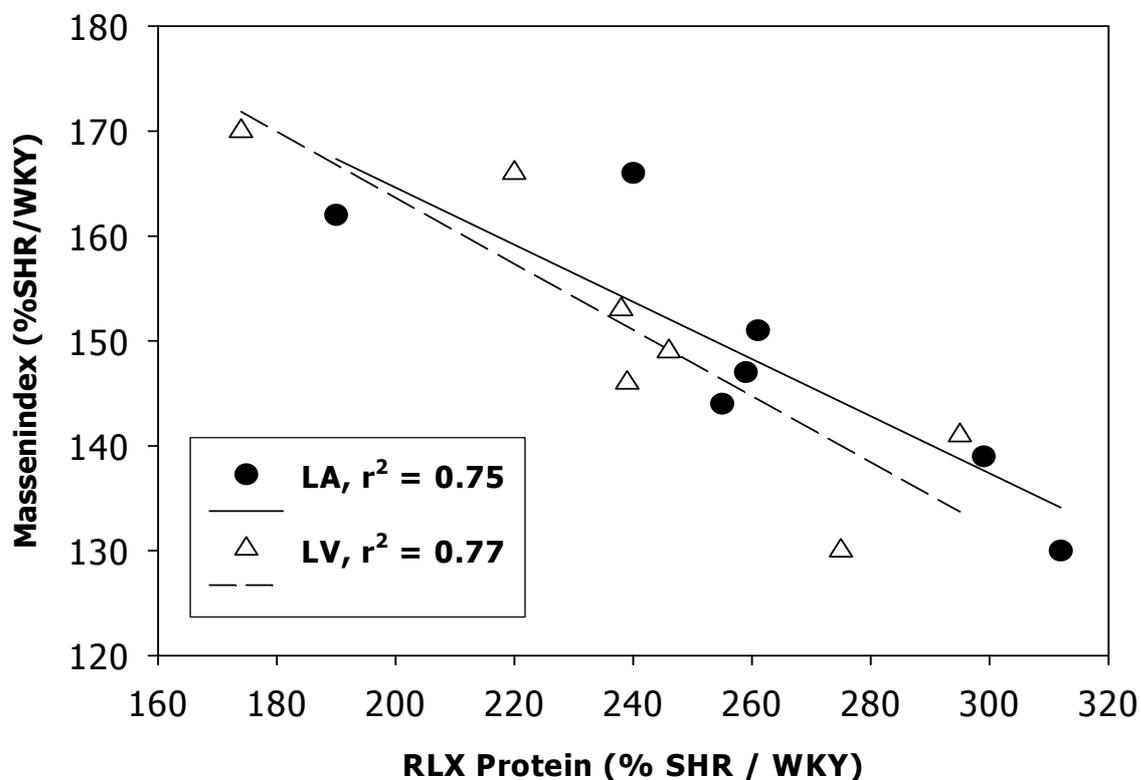


Abb.9: Lineare Regressionen zur Bestimmung der Korrelation von Massenindices und Proteinkonzentrationen für die linken Vorhöfe (dunkle Punkte, LA) und linken Ventrikel (helle Dreiecke, LV) der 7 SHR (Nr. 8-14)

7. Diskussion

In der vorgelegten Arbeit wird erneut gezeigt, dass bei Ratten rRLX-3 im Myokard aller vier Herzhöhlen transkribiert und translatiert wird. Ferner konnte gezeigt werden, dass exogenes Relaxin auf das Myokard der beiden Vorhöfe ausgeprägt positiv inotrop wirkt, nicht jedoch auf das Myokard der Ventrikel. Diese Befunde stellen eine Bestätigung der bereits von Kakouris 1992 und Wade 1994 gezeigten Wirkungen dar (130, 131).

Erstmals konnte in den Versuchen gezeigt werden, dass die positiv inotrope atriale Wirkung auch bei hypertrophen Herzen hypertensiver Ratten erhalten ist, während die positiv inotrope Wirkung des β -Agonisten Isoprenalin in diesem Stadium der Hypertrophie bereits abgeschwächt ist. Dies ist insofern ein sehr relevanter Befund, da er belegt, dass auch unter pathologischen Zuständen Relaxin prinzipiell ein relevanter Mediator kardialer Anpassung sein kann, und nicht – oder zumindest später im Krankheitsverlauf - durch eine eventuelle Hemmung der Ansprechbarkeit der Signalkaskade zum Erliegen kommt, wie dies etwa bei β -adrenergen Stimuli zu beobachten ist. Dies ist insbesondere unter dem Aspekt interessant, dass Mercado-Simmen bereits 1982 eine Verringerung der RLX-Bindungsstellen im Myometrium von Ratten durch Relaxin selbst nachweisen konnte (234). Unsere Ergebnisse dürfen zumindest als Hinweis gelten, dass eine derartige Verringerung der Rezeptorzahl am atrialen Myokard unter erhöhten RLX-Spiegeln nicht, beziehungsweise in diesem Stadium der Hypertrophie noch nicht, stattfindet.

Unseren Befunden einer ausbleibenden Wirkungsabschwächung am Herzen stehen zumindest die Befunde der Arbeitsgruppe um Kompra entgegen, die eine Reduktion der linksatrialen, positiv inotropen Wirkung von Relaxin im Zustand nach Myokardinfarkt nachwies, die mit einer reduzierten RXFP-1-Expression korrelierte. Die positiv chronotrope Wirkung wurde nicht beeinflusst (35).

Es erscheint möglich, dass in der Tat in dem von Kompra gewählten Modell andere molekularbiologische Konsequenzen zu beobachten sind als in dem in meiner Arbeit beobachteten Modell. Schließlich hat Kompra ein Infarktmodell mit linksventrikulärer manifester Herzinsuffizienz erzeugt, wohingegen die von mir verwendeten Tiere eine durch erhöhte Nachlast hypertrophe, aber kompensierte Herzbelastung ohne manifeste Insuffizienz aufwiesen. Freilich ist mit den vorgelegten Ergebnissen nicht auszuschließen, dass es in einem fortgeschritteneren Modell hypertoniegeschädigter

Herzen, die eine manifeste Insuffizienz aufweisen, ebenfalls eine Reduzierung der RLX-Effekte auftritt.

Angeregt durch frühere Befunde unserer Arbeitsgruppe, wonach bei herzinsuffizienten Patienten erhöhte Plasma-RLX-Spiegel nachweisbar sind (25), fahndeten wir in dieser Arbeit nach einem Zusammenhang von Relaxin und hypertoniebedingter Myokardhypertrophie mit der Frage, ob Relaxin bei Ratten mit hypertensiver kardialer Hypertrophie regulierend in das Krankheitsgeschehen eingreift. Dazu wurden die Konzentrationen von Relaxin in den spontanhypertensiven Ratten mit denen bei Referenztieren verglichen. Sowohl auf Ebene der mRNA (Transkription) als auch auf Proteinebene (Translation) fanden sich dabei im linken Ventrikel und im linken Vorhof, also den beiden bei Linkshypertrophie belasteten Herzhöhlen, signifikant und relevant um den Faktor 2,3 bis 2,6 erhöhte rRLX-3-Proteinspiegel, bzw. RLX-mRNA-Spiegel, die plausibel parallel korrelierten. In den anderen untersuchten Organen, den rechten Vorhöfen und Ventrikeln, Aorta, Lunge und Niere fanden sich keine signifikanten Unterschiede der RLX-Translation und -Transkription.

Interessanterweise ließ sich eine signifikante, inverse Korrelation von RLX-Protein und kardialer Masse sowohl für die linken Vorhöfe, wie auch für die linken Ventrikel der SHR herstellen, die zeigt, dass, je niedriger die RLX-Spiegel im Gewebe sind, desto ausgeprägter die Massenerhöhung des linken Herzens ist.

Dieser Befund, der erstmals in einer Spezies nachgewiesen wird, lässt sich verschieden interpretieren. Eine nahe liegende Erklärung wäre zum einen die seit längerem bekannte Vasodilatation durch Relaxin, die die Ursache der Entwicklung der hypertensiven Herzerkrankung abzumildern im Stande wäre. Man könnte annehmen, dass auch SHR mit höheren RLX-Spiegeln einen weniger hohen Blutdruck haben, und somit die konsekutive Hypertrophie des Herzens schwächer oder zumindest später manifest wird. Daher wurde versucht eine Korrelation zwischen den gemessenen systolischen Blutdrücken und den RLX-Konzentrationen im Gewebe zu finden. Hier zeigte sich, dass keine Korrelation besteht, und somit der direkte Zusammenhang zwischen Blutdruck und RLX-Konzentration nicht als Erklärung in Betracht kommt (Daten nicht gezeigt).

Jedoch könnte man die durch Relaxin erhöhte ANP-Produktion als einen Weg

verstehen, auf dem Relaxin mittelbar antihypertroph wirkt. Eine anti-hypertrophe Wirkung von ANP in adulten Rattenkardiomyozyten wurde von Rosenkranz 2003 beschrieben (235). Sie ist demnach sicher nicht ausschließlich mittelbar über die erhöhte Natriuresis und verstärkte vasodilatatorische Wirkung des ANP erklärbar.

Ein weiterer Ansatz wäre, dass Relaxin direkt am Herzen – und somit also sozusagen auto- oder zumindest parakrin – anti-hypertroph wirkt. In einer anderen Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurde untersucht, inwiefern Relaxin in Myozyten von Ratten in der Lage ist, bekannte pro-hypertrophe Signalwege *in vitro* zu beeinflussen. Hierbei zeigte sich, dass Relaxin *in vitro* in Rattenherzen in der Lage war, eine phenylephrininduzierte Hypertrophie zu unterdrücken und dass diese Hemmung des pro-hypertrophen Stimulus durch eine Hemmung der aktivierten ERK-1/2-Kinase erfolgt (230).

Zudem muss gefragt werden, ob die Zunahme der Masse des linken Herzens im Wesentlichen eine Hypertrophie der Myozyten darstellt oder vorwiegend eine Fibrosierung, und inwiefern der Effekt von Relaxin, die Zunahme der Herzmasse unter Druckbelastung zu reduzieren, einem der beiden Teilaspekte vorwiegend zugeschrieben werden kann.

2007 konnte die Arbeitsgruppe um Moore zeigen, dass Relaxin einen antihypertrophen Effekt nur dann auf neonatale Rattenkardiomyozyten ausübt, wenn ihr Kulturmedium mit kardialen Fibroblasten konditioniert wurde (227). Die Autoren interpretieren diese Befunde so, dass es möglich erscheint, dass ein antihypertropher Effekt des Relaxins auf Kardiomyozyten mittelbar über die direkt RLX-vermittelte Hemmung der Fibroblastenaktivierung und –proliferation erzeugt wird. Durch diese Hemmung kommt es zu einer verminderten Freisetzung von IL-6, BFGF, TGF β , ET-1 und TNF- α , und somit zu einer Reduktion bekannter pro-hypertropher Stimuli.

In einer Untersuchung an Ratten *in vivo*, die 2005 von der Arbeitsgruppe um Lekgabe veröffentlicht wurde, zeigte sich, dass eine zweiwöchige Behandlung mit Relaxin bei spontan-hypertensiven Ratten keinen Effekt auf die Expression der Hypertrophiemarker ANP und β -MHC (jeweils auf mRNA-Ebene) hatte, sehr wohl aber auf verschiedene anti-fibrotische Systeme: sowohl der Kollagengehalt (Kollagen I, III, V) der linken Ventrikel als auch die Marker für Fibroblastproliferation und –differenzierung (PCNA und SMA α) waren durch die RLX-Behandlung deutlich

reduziert. Außerdem fand die Arbeitsgruppe die in SHR ohnehin im Vergleich zu WKY erhöhte MMP-2-Expression durch Relaxin weiter erhöht. Diese Befunde sprechen für eine ausgeprägte anti-fibrotische, jedoch nicht für eine direkte myozytär anti-hypertrophe Wirkung von Relaxin. In einer zweiten Arbeit derselben Arbeitsgruppe wurde dann aber bei ovariectomierten RLX(-/-)-Mäusen im Vergleich zu ovariectomierten RLX(+/-)-Mäusen sehr wohl eine erhöhte Expression von Hypertrophie markern (β -MHC und ANF) gefunden, wohingegen die kardiale Kollagendeposition in allen Gruppen unabhängig davon war, ob es sich um RLX(-/-) oder RLX(+/-) handelte. Dies lässt den Schluss zu, dass zumindest unter den Bedingungen des Östrogenmangels Relaxin einen direkten anti-hypertrophen Einfluss bei Mäusen ausübt. In der Diskussion um den hierbei in Frage kommenden Signalweg kann die von Dschietzig nachgewiesene Bindung von Relaxin an den Glukokortikoidrezeptor (55) nicht außer Acht gelassen werden. Die Arbeitsgruppe um Pillai (236) zeigte bereits 1999 – wenngleich für den Uterus – einen RLX-Effekt, der letztlich über die Aktivierung von Östrogenrezeptoren vermittelt wird.

Letztlich sind die Befunde in der vorgelegten Arbeit ein direkter Hinweis darauf, dass Relaxin in SHR mit manifester Linksherzhypertrophie invers mit dem Gewicht des Myokards korreliert. In der Zusammenschau der in den letzten Jahren vorgelegten Arbeiten ist anzunehmen, dass diese Korrelation sowohl einer Verminderung der ECM im Sinne einer Fibrosehemmung, als auch einer - möglicherweise mittelbaren - Hemmung der Myozytenhypertrophie zugeschrieben werden kann.

Wesentlich für die Beantwortung der Frage, ob diese Befunde richtungweisend für den Einsatz von Relaxin als anti-fibrotisch oder anti-hypertroph wirksames Therapeutikum bei Patienten mit Herzinsuffizienz sind, wird jedoch die Übertragbarkeit der Befunde auf den Menschen sein. Hierzu werden weitere Studien folgen müssen. Insbesondere werden auch Studien erforderlich sein, die die Existenz und Verteilung der Rezeptoren beim Menschen konkret nachweisen. Hsu gelang zwar der Nachweis von RXFP1 in menschlichem Myokard, allerdings wohl in niedriger Zahl (19). Es kann sich dabei um den Nachweis von Rezeptoren sowohl auf Kardiomyozyten, sehr gut aber auch ausschließlich auf kardialen Fibroblasten handeln. Summers wird bei Nowack mit der persönlichen Kommunikation zitiert, dass ihm ein Nachweis von RLX-Bindungsstellen am menschlichen Myozyten nicht gelungen sei (135). Eine endgültige – und publizierte – Antwort auf die Frage nach der RXFP-1-Verteilung auf menschlichen Kardiomyozyten steht jedoch noch aus.

Weiterhin wird auch die Frage nach geschlechtsspezifischen Unterschieden zu beantworten sein. Beachtung mögen dabei die Befunde von Du 2003 finden, der zeigte, dass männliche RLX(-/-)-Mäuse alle Zeichen einer Myokardfibrose aufweisen, weibliche RLX(-/-) hingegen nicht (220). Somit scheint sich auch im Bezug auf Fibrose eine möglicherweise einander substituierende Wechselbeziehung zwischen Östrogenen und Relaxin zu ergeben. Dafür sprechen zumindest partiell eben auch die Befunde, die Lekkabe erheben konnte (221). Durch Studien an ovariectomierten RLX(+/-)- und RLX(-/-)-Mäusen konnte gezeigt werden, dass ovariectomierte RLX(-/-)-Mäuse im Gegensatz zu RLX(+/-)-Mäusen 8-10 Monate nach Ovariectomie eine signifikante Hypertrophie des Herzens aufweisen. Lekkabe bestimmte dabei das Organengewicht und auch auf molekularbiologischer Ebene die Expression von ANP und β -MHC als Hypertrophiemarker. Interessanterweise fand Lekkabe in dieser Arbeit bezüglich kardialer Fibrosierung keine unterschiedlichen Werte für Kollagendeposition bei RLX(-/-)-Mäusen im Vergleich zu RLX(+/-)-Mäusen, unabhängig davon ob sie ovariectomiert waren oder nicht.

Ebenfalls sei erneut auf die von Schöndorf gefundenen Unterschiede der RLX- und VEGF-Konzentrationen bei männlichen und weiblichen Diabetikern hingewiesen (123).

In der hier vorgelegten Arbeit wurden ausschließlich männliche Ratten verwendet. Selbstverständlich wäre die Wiederholung der Versuche mit einer Kontrollgruppe weiblicher WKY und SHR durchaus interessant.

Die Entwicklung einer Herzinsuffizienz geht – wie oben beschrieben – in den frühen Stadien insbesondere mit der Ausbildung einer kardialen Fibrose einher, die dann zunächst eine diastolische Herzinsuffizienz verursacht. Von den bisher therapeutisch am Menschen eingesetzten Medikamenten konnten myokardial anti-fibrotische Effekte für die Aldosteronantagonisten (237,238,239) und die AT-II-Inhibitoren/AT₁-Rezeptorblocker nachgewiesen werden (240). Dadurch, dass Relaxin in vielen Belangen einen völlig anderen Wirkungsmechanismus aufzuweisen scheint, etwa im Bezug auf die intrazellulären Signalwege, die direkte ANP-Stimulation und die Wirkungen auf das ET-1-System, könnte sich in naher Zukunft Relaxin als synergistisch wirkendes Medikament zur anti-fibrotischen und anti-hypertensiven Therapie bei Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz entwickeln.

8. Literatur

- 1 **Hisaw F. L.** Experimental relaxation of the pubic ligament of guinea pigs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1926, 23, S. 661-663
- 2 **Hamolsky M. and Sparrow R. C.** Influence of relaxin on mammary development in sexually immature female rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1945, 60, S. 8-9
- 3 **Krantz J. C., Bryant H. H. and Carr C. J.** The action of aqueous corpus luteum extract upon uterine activity. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1950, 90, S. 372-375
- 4 **Graham E. F. and Dracy A. E.** The effect of relaxin and mechanical dilatation of the bovine cervix. *J. Dairy Sci.* 1953, 36, S. 772-777
- 5 **Steinetz BG, Beach VL, Kroc RL, Stasilli NR, Nussbaum RE, Nemith PJ, Dun RK.** Bioassay of relaxin using a reference standard: a simple and reliable method utilizing direct measurement of interpubic ligament formation in mice. *Endocrinology.* 1960 Jul;67:102-15.
- 6 **Sherwood CD, O'Byrne EM.** Purification and characterization of porcine relaxin. *Arch Biochem Biophys.* 1974 Jan;160(1):185-96.
- 7 **Sherwood OD.** Purification and characterization of rat relaxin. *Endocrinology.* 1979 Apr;104(4):886-92
- 8 **Schwabe C, McDonald JK, Steinetz BG.** Primary structure of the A chain of porcine relaxin *Biochem Biophys Res Commun.* 1976 May 17;70(2):397-405.
- 9 **James R, Niall H, Kwok S, Bryand-Greenwood G.** Primary structure of porcine relaxin: homology with insulin and related growth factors. *Nature.* 1977 Jun 9;267(5611):544-6.
- 10 **Sherwood OD, Rosentreter KR, Birkhimer ML.** Development of a radioimmunoassay for porcine relaxin using ¹²⁵I-labeled polytyrosyl-relaxin. *Endocrinology.* 1975 May;96(5):1106-13.
- 11 **Sherwood OD, Crnekovic VE.** Development of a homologous radioimmunoassay for rat relaxin. *Endocrinology.* 1979 Apr;104(4):893-7
- 12 **O'Byrne EM, Carriere BT, Sorensen L, Segaloff A, Schwabe C, Steinetz BG.J** Plasma immunoreactive relaxin levels in pregnant and nonpregnant women. *Clin Endocrinol Metab.* 1978 Nov;47(5):1106-10.
- 13 **Crawford RJ, Hudson P, Shine J, Niall HD, Eddy RL, Shows TB** Two human relaxin genes are on chromosome 9 *EMBO J.* 1984 Oct;3(10):2341-5
- 14 **Hudson P, Haley J, John M, Cronk M, Crawford R, Haralambidis J, Tregear G, Shine J, Niall H.** Structure of a genomic clone encoding biologically active human relaxin. *Nature.* 1983 Feb 17-23;301(5901):628-31.
- 15 **Bathgate RA, Samuel CS, Burazin TC, Layfield S, Claasz AA, Reytomas IG, Dawson NF, Zhao C, Bond C, Summers RJ, Parry LJ, Wade JD, Tregear GW.** Human relaxin gene 3 (H3) and the equivalent mouse relaxin (M3) gene. Novel members of the relaxin peptide family. *J Biol Chem.* 2002 Jan 11;277(2):1148-57. Epub 2001 Oct 31
- 16 **Bullesbach EE, Schwabe C.** On the receptor binding site of relaxins. *Int J Pept Protein Res.* 1988 Nov;32(5):361-7
- 17 **Bullesbach EE, Yang S, Schwabe C.** The receptor-binding site of human relaxin II. A dual prong-binding mechanism *J Biol Chem.* 1992 Nov 15;267(32):22957-60
- 18 **Bullesbach EE, Schwabe C** The relaxin receptor-binding site geometry suggests a novel gripping mode of interaction. *J Biol Chem.* 2000 Nov 10;275(45):35276-80
- 19 **Hsu SY, Nakabayashi K, Nishi S, Kumagai J, Kudo M, Sherwood OD, Hsueh AJ.** Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science.* 2002 Jan 25;295(5555):671-4

-
- 20 **Dschietzig T, Bartsch C, Baumann G, Stangl K.**
Relaxin-a pleiotropic hormone and its emerging role for experimental and clinical therapeutics.
Pharmacol Ther. 2006 Oct;112(1):38-56
- 21 **Gunnensen JM, Roche PJ, Tregear GW, Crawford RJ.**
Characterization of human relaxin gene regulation in the relaxin-expressing human prostate adenocarcinoma cell line LNCaP.FGC.
J Mol Endocrinol. 1995 Oct;15(2):153-66.
- 22 **Gunnensen JM, Fu P, Roche PJ, Tregear GW.**
Expression of human relaxin genes: characterization of a novel alternatively-spliced human relaxin mRNA species.
Mol Cell Endocrinol. 1996 Apr 19;118(1-2):85-94
- 23 **Hansell DJ, Bryant-Greenwood GD, Greenwood FC.**
Expression of the human relaxin H1 gene in the decidua, trophoblast, and prostate.
J Clin Endocrinol Metab. 1991 Apr;72(4):899-904
- 24 **Tashima LS, Mazoujian G, Bryant-Greenwood GD.**
Human relaxins in normal, benign and neoplastic breast tissue.
J Mol Endocrinol. 1994 Jun;12(3):351-64
- 25 **Dschietzig T, Richter C, Bartsch C, Laule M, Armbruster FP, Baumann G, Stangl K.**
The pregnancy hormone relaxin is a player in human heart failure.
FASEB J. 2001 Oct;15(12):2187-95.
- 26 **Bigazzi M, Nardi E, Bruni P, Petrucci F.**
Relaxin in human decidua.
J Clin Endocrinol Metab. 1980 Oct;51(4):939-41.
- 27 **Hudson P, John M, Crawford R, Haralambidis J, Scanlon D, Gorman J, Tregear G, Shine J, Niall H.**
Relaxin gene expression in human ovaries and the predicted structure of a human preprorelaxin by analysis of cDNA clones.
EMBO J. 1984 Oct;3(10):2333-9.
- 28 **Sakbun V, Ali SM, Greenwood FC, Bryant-Greenwood GD.**
Human relaxin in the amnion, chorion, decidua parietalis, basal plate, and placental trophoblast by immunocytochemistry and northern analysis.
J Clin Endocrinol Metab. 1990 Feb;70(2):508-14.
- 29 **Fields PA, Lee AB, Haab LM, Hwang JJ, Sherwood OD.**
Evidence for a dual source of relaxin in the pregnant rat: immunolocalization in the corpora lutea and endometrium.
Endocrinology. 1992 May;130(5):2985-90.
- 30 **Essig M, Schoenfeld C, D'Eletto RT, Amelar R, Steinetz BG, O'Byrne EM, Weiss G.**
Relaxin in human seminal plasma.
Ann N Y Acad Sci. 1982;380:224-30
- 31 **Taylor MJ, Clark CL.**
Evidence for a novel source of relaxin: atrial cardiocytes.
J Endocrinol. 1994 Nov;143(2):R5-8.
- 32 **Osheroff PL, Ho WH.**
Expression of relaxin mRNA and relaxin receptors in postnatal and adult rat brains and hearts. Localization and developmental patterns.
J Biol Chem. 1993 Jul 15;268(20):15193-9
- 33 **Burazin TC, Bathgate RA, Macris M, Layfield S, Gundlach AL, Tregear GW.**
Restricted, but abundant, expression of the novel rat gene-3 (R3) relaxin in the dorsal tegmental region of brain.
J Neurochem. 2002 Sep;82(6):1553-7
- 34 **Tanaka M, Iijima N, Miyamoto Y, Fukusumi S, Itoh Y, Ozawa H, Ibata Y.**
Neurons expressing relaxin 3/INSL 7 in the nucleus incertus respond to stress.
Eur J Neurosci. 2005 Mar;21(6):1659-70.
- 35 **Kompa A.R., Samuel C.S. Summers R.J.**
Inotropic responses to human gene 2 (B29) relaxin in a rat model of myocardial infarction (MI): effect of pertussis toxin
British Journal of Pharmacology 2002, 137, 710-8
- 36 **Seki K, Uesato T, Tabei T, Kato K.**
The secretory patterns of relaxin and human chorionic gonadotropin in human pregnancy.
Endocrinol Jpn. 1985 Oct;32(5):741-4.

-
- 37 **Petersen LK, Vogel I, Agger AO, Westergard J, Nils M, Ulbjerg N**
Variations in serum relaxin (hRLX-2) concentrations during human pregnancy.
Acta Obstet Gynecol Scand. 1995 Apr;74(4):251-6.
- 38 **Seeger H, Zwirner M, Voelter, Lippert TH**
Relaxin and human chorionic gonadotropin concentrations in blood serum during the first trimester of normal and pathological pregnancy.
Gynecol Obstet Invest. 1988;25(3):209-12.
- 39 **Wreje U, Kristiansson P, Aberg H, Bystrom B, von Schoultz B.**
Serum levels of relaxin during the menstrual cycle and oral contraceptive use.
Gynecol Obstet Invest. 1995;39(3):197-200.
- 40 **Peters CA, Maizels ET, Robertson MC, Shiu RP, Soloff MS, Hunzicker-Dunn M.**
Induction of relaxin messenger RNA expression in response to prolactin receptor activation requires protein kinase C delta signaling.
Mol Endocrinol. 2000 Apr;14(4):576-90.
- 41 **Loeken MR, Channing CP, D'Eletto R, Weiss G.**
Stimulatory effect of luteinizing hormone upon relaxin secretion by cultured porcine preovulatory granulosa cells.
Endocrinology. 1983 Feb;112(2):769-71
- 42 **Ottobre JS, Nixon WE, Stouffer RL.**
Induction of relaxin secretion in rhesus monkeys by human chorionic gonadotropin: dependence on the age of the corpus luteum of the menstrual cycle.
Biol Reprod. 1984 Dec;31(5):1000-6
- 43 **Hsu SY, Nakabayashi K, Nishi S, Kumagai J, Kudo M, Bathgate RA, Sherwood OD, Hsueh AJ.**
Relaxin signaling in reproductive tissues.
Mol Cell Endocrinol. 2003 Apr 28;202(1-2):165-70.
- 44 **Liu C, Chen J, Sutton S, Roland B, Kuei C, Farmer N, Sillard R, Lovenberg TW.**
Identification of relaxin-3/INSL7 as a ligand for GPCR142
J Biol Chem. 2003 Dec 12;278(50):50765-70
- 45 Liu C, Eriste E, Sutton S, Chen J, Roland B, Kuei C, Farmer N, Jornvall H, Sillard R, Lovenberg TW.
Identification of relaxin-3/INSL7 as an endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPCR135.
J Biol Chem. 2003 Dec 12;278(50):50754-64.
- 46 **Bathgate RA, Ivell R, Sanborn BM, Sherwood OD, Summers**
International Union of Pharmacology LVII: recommendations for the nomenclature of receptors for relaxin family peptides.
RJ.Pharmacol Rev. 2006 Mar;58(1):7-31
- 47 **Samuel CS, Du XJ, Bathgate RA, Summers RJ.**
'Relaxin' the stiffened heart and arteries: the therapeutic potential for relaxin in the treatment of cardiovascular disease.
Pharmacol Ther. 2006 Nov;112(2):529-52.
- 48 **Samuel CS, Unemori EN, Mookerjee I, Bathgate RA, Layfield SL, Mak J, Tregear GW, Du XJ**
Relaxin Modulates Cardiac Fibroblast Proliferation, Differentiation, and Collagen Production and Reverses Cardiac Fibrosis in Vivo
Endocrinology Vol. 145, No. 9 4125-4133
- 49 **Ivell R, Balvers M, Pohnke Y, Telgmann R, Bartsch O, Milde-Langosch K, Bamberger AM, Einspanier AR**
Immunoexpression of the relaxin receptor LGR7 in breast and uterine tissues of humans and primates.
Reprod Biol Endocrinol. 2003 Nov 24;1:114
- 50 **Lowndes K, Amano A, Yamamoto SY, Bryant-Greenwood, GD**
The human relaxin receptor (LGR7): expression in the fetal membranes and placenta.
Placenta. 2006 Jun-Jul;27(6-7):610-8
- 51 **Bennett RG, Mahan KJ, Gentry-Nielsen MJ, Tuma DJ.**
Relaxin receptor expression in hepatic stellate cells and in cirrhotic rat liver tissue.
Ann N Y Acad Sci. 2005 May;1041:185-9
- 52 **Piccenna L, Shen PJ, Ma S, Burazin TC, Gossen JA, Mosselman S, Bathgate RA, Gundlach AL.**
Localization of LGR7 gene expression in adult mouse brain using LGR7 knock-out/LacZ knock-in mice: correlation with LGR7 mRNA distribution.
Ann N Y Acad Sci. 2005 May;1041:197-204.

-
- 53 Burazin TC, Johnson KJ, Ma S, Bathgate RA, Tregear GW, Gundlach AL.**
Localization of LGR7 (relaxin receptor) mRNA and protein in rat forebrain: correlation with relaxin binding site distribution.
Ann N Y Acad Sci. 2005 May;1041:205-10
- 54 Novak J, Parry LJ, Matthews JE, Kerchner LJ, Indovina K, Hanley-Yanez K, Doty KD, Debrah DO, Shroff SG, Conrad KP.**
Evidence for local relaxin ligand-receptor expression and function in arteries
FASEB J. 2006 Nov;20(13):2352-62.
- 55 Dschietzig T, Bartsch C, Greinwald M, Baumann G, Stangl K.**
The pregnancy hormone relaxin binds to and activates the human glucocorticoid receptor.
Ann N Y Acad Sci. 2005 May;1041:256-71
- 56 Laura Iris Cosen-Binker, Marcelo Gustavo Binker, Rodica Cosen, Gustavo Negri, Osvaldo Tiscornia**
Relaxin prevents the development of severe acute pancreatitis
World J Gastroenterol 2006 March 14;12(10):1558-1568
- 57 Braddon SA.**
Relaxin-dependent adenosine 6',5'-monophosphate concentration changes in the mouse pubic symphysis.
Endocrinology. 1978 Apr;102(4):1292-9
- 58 Cheah SH, Sherwood OD.**
Target tissues for relaxin in the rat: tissue distribution of injected 125I-labeled relaxin and tissue changes in adenosine 3',5'-monophosphate levels after in vitro relaxin incubation
Endocrinology. 1980 Apr;106(4):1203-9.
- 59 Sanborn BM, Kuo HS, Weisbrodt NW, Sherwood OD.**
The interaction of relaxin with the rat uterus. I. Effect on cyclic nucleotide levels and spontaneous contractile activity.
Endocrinology. 1980 Apr;106(4):1210-5.
- 60 Hsu CJ, McCormack SM, Sanborn BM.**
The effect of relaxin on cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentrations in rat myometrial cells in culture.
Endocrinology. 1985 May;116(5):2029-35
- 61 Parsell DA, Mak JY, Amento EP, Unemori EN.**
Relaxin binds to and elicits a response from cells of the human monocytic cell line, THP-1.
J Biol Chem. 1996 Nov 1;271(44):27936-41
- 62 Toth M, Taskinen P, Ruskoaho H.**
Relaxin stimulates atrial natriuretic peptide secretion in perfused rat heart.
J Endocrinol. 1996 Sep;150(3):487-95
- 63 Unemori EN, Erikson ME, Rocco SE, Sutherland KM, Parsell DA, Mak J, Grove BH.**
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 Mar;14(3):800-6.
- 64 Unemori EN, Lewis M, Constant J, Arnold G, Grove BH, Normand J, Deshpande U, Salles A, Pickford LB, Erikson ME, Hunt TK, Huang X.**
Relaxin induces vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis selectively at wound sites.
Wound Repair Regen. 2000 Sep-Oct;8(5):361-70
- 65 Dessauer CW, Nguyen BT.**
Relaxin stimulates multiple signaling pathways: activation of cAMP, PI3K, and PKCzeta in THP-1 cells.
Ann N Y Acad Sci. 2005 May;1041:272-9
- 66 Halls ML, Bathgate RA, Summers RJ**
Relaxin family peptide receptors RXFP1 and RXFP2 modulate cAMP signaling by distinct mechanisms.
Mol Pharmacol. 2006 Jul;70(1):214-26
- 67 Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, Chun SY, Pisarska M, Morita H, Toppari J, Fu P, Wade JD, Bathgate RA, Hsueh AJ.**
Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 May 11;101(19):7323-8
- 68 Bartsch O, Bartlick B, Ivell R.**
Relaxin signalling links tyrosine phosphorylation to phosphodiesterase and adenylyl cyclase activity.
Mol Hum Reprod. 2001 Sep;7(9):799-809
- 69 Ivell R, Anand-Ivell R, Bartsch O.**
Relaxin signaling from natural receptors.
Ann N Y Acad Sci. 2005 May;1041:280-7

-
- 70 **Bartsch O, Bartlick B, Ivell R,**
Phosphodiesterase 4 inhibitionsynergizes with relaxin signalling to promote decidualisation of human endometrial stromal cells
J Clin Endocrinol Metab 89: 324-334
- 71 **Nguyen BT, Yang L, Sanborn BM, Dessauer CW.**
Phosphoinositide 3-kinase activity is required for biphasic stimulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate by relaxin.
Mol Endocrinol 17: 1075-1084
- 72 **Palejwala S, Stein D, Wojtczuk A, Weiss G, Goldsmith LT**
Demonstration of a relaxin receptor and relaxin-stimulated tyrosine phosphorylation in human lower uterine segment fibroblasts.
Endocrinology. 1998 Mar;139(3):1208-12
- 73 **Palejwala S, Stein DE, Weiss G, Monia BP, Tortoriello D, Goldsmith LT.**
Relaxin positively regulates matrix metalloproteinase expression in human lower uterine segment fibroblasts using a tyrosine kinase signaling pathway.
Endocrinology. 2001 Aug;142(8):3405-13
- 74 **Masini E, Bani D, Bigazzi M, Mannaioni PF, Bani-Sacchi T.**
Effects of relaxin on mast cells. In vitro and in vivo studies in rats and guinea pigs.
J Clin Invest. 1994 Nov;94(5):1974-80
- 75 **Bani-Sacchi T, Bigazzi M, Bani D, Mannaioni PF, Masini E.**
Relaxin-induced increased coronary flow through stimulation of nitric oxide production.
Br J Pharmacol. 1995 Sep;116(1):1589-94
- 76 **Bani D, Masini E, Bello MG, Bigazzi M, Sacchi TB.**
Relaxin activates the L-arginine-nitric oxide pathway in human breast cancer cells.
Cancer Res. 1995 Nov 15;55(22):5272-5
- 77 **Bani D, Failli P, Bello MG, Thiemermann C, Bani Sacchi T, Bigazzi M, Masini E.**
Relaxin activates the L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle cells in culture.
Hypertension. 1998 Jun;31(6):1240-7
- 78 **Bani D, Baronti R, Vannacci A, Bigazzi M, Sacchi TB, Mannaioni PF, Masini E.**
Inhibitory effects of relaxin on human basophils activated by stimulation of the Fc epsilon receptor. The role of nitric oxide.
Int Immunopharmacol. 2002 Jul;2(8):1195-204
- 79 **Bani D, Baccari MC, Nistri S, Calamai F, Bigazzi M, Bani Sacchi T.**
Relaxin upregulates the nitric oxide biosynthetic pathway in the mouse uterus. Involvement in the inhibition of myometrial contractility.
Endocrinology. 1999;140:4434-4441
- 80 **Nistri S, Bani D.**
Relaxin receptors and nitric oxide synthases: search for the missing link.
Reprod Biol Endocrinol. 2003 Feb 5;1:5.
- 81 **Novak J, Ramirez RJ, Gandley RE, Sherwood OD, Conrad KP.**
Myogenic reactivity is reduced in small renal arteries isolated from relaxin-treated rats.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2002 Aug;283(2):R349-55
- 82 **Dschietzig T, Bartsch C, Richter C, Laule M, Baumann G, Stangl K.**
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.
Circ Res. 2003 Jan 10;92(1):32-40
- 83 **Zhang Q, Liu SH, Erikson M, Lewis M, Unemori E**
Relaxin activates the MAP kinase pathway in human endometrial stromal cells.
J Cell Biochem. 2002;85(3):536-44.
- 84 **Anand-Ivell R, Heng K, Bartsch O, Ivell R.**
Relaxin signalling in THP-1 cells uses a novel phosphotyrosine-dependent pathway
Mol Cell Endocrinol. 2007 Jun 30;272(1-2):1-13.
- 85 **Jeyabalan A, Novak J, Danielson LA, Kerchner LJ, Opett SL, Conrad KP.**
Essential role for vascular gelatinase activity in relaxin-induced renal vasodilation, hyperfiltration, and reduced myogenic reactivity of small arteries.
Circ Res. 2003 Dec 12;93(12):1249-57

-
- 86 **Ho TY, Bagnell CA.**
Relaxin induces matrix metalloproteinase-9 through activation of nuclear factor kappa B in human THP-1 cells.
Ann N Y Acad Sci. 2005 May;1041:314-6
- 87 **Miyauchi T, Masaki T**
Pathophysiology of Endothelin in the cardiovascular System
Annual Review of Physiology 61: 391-415
- 88 **Sherwood OD, Downing SJ, Guico-Lamm ML, Hwang JJ, O'Day-Bowman MB, Fields PA.**
The physiological effects of relaxin during pregnancy: studies in rats and pigs.
Oxf Rev Reprod Biol. 1993;15:143-89
- 89 **Sherwood OD.**
Relaxin's physiological roles and other diverse actions.
Endocr Rev. 2004 Apr;25(2):205-34
- 90 **Goldsmith LT, Weiss G, Steinetz BG.**
Relaxin and its role in pregnancy.
Endocrinol Metab Clin North Am. 1995 Mar;24(1):171-86.
- 91 **Kelly AJ, Kavanagh J, Thomas J.**
Relaxin for cervical ripening and induction of labour.
Cochrane Database Syst Rev. 2001
- 92 **Weiss G, Goldsmith LT.**
Relaxin and the cervix.
Front Horm Res. 2001;27:105-12.
- 93 **Fevold H. L., Hisaw F. L. and Meyer R. K.**
The relaxative hormone of the corpus luteum. 1st purification and concentration.
J. Am. Chem. Soc. 1930, 52, S. 3340-3348
- 94 **Telgmann R, Gellersen B.**
Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene.
Hum Reprod Update. 1998 Sep-Oct;4(5):472-9
- 95 **Bani G, Maurizi M, Bigazzi M, Bani Sacchi T.**
Effects of relaxin on the endometrial stroma. Studies in mice.
Biol Reprod. 1995 Aug;53(2):253-62
- 96 **Bani G, Bigazzi M, Bani D.**
Effects of relaxin on the mouse mammary gland. I. The myoepithelial cells.
J Endocrinol Invest. 1985 Jun;8(3):207-15
- 97 **Bianchi S, Bani G, Bigazzi M.**
Effects of relaxin on the mouse mammary gland. III. The fat pad.
J Endocrinol Invest. 1986 Apr;9(2):153-60
- 98 **Bani G, Bigazzi M, Bani D.**
The effects of relaxin on the mouse mammary gland. II. The epithelium.
J Endocrinol Invest. 1986 Apr;9(2):145-52
- 99 **Too CK, Bryant-Greenwood GD, Greenwood FC.**
Relaxin increases the release of plasminogen activator, collagenase, and proteoglycanase from rat granulosa cells in vitro.
Endocrinology. 1984 Sep;115(3):1043-50
- 100 **Unemori EN, Amento EP.**
Relaxin modulates synthesis and secretion of procollagenase and collagen by human dermal fibroblasts.
J Biol Chem. 1990 Jun 25;265(18):
- 101 **Unemori EN, Pickford LB, Salles AL, Piercy CE, Grove BH, Erikson ME, Amento EP.**
Relaxin induces an extracellular matrix-degrading phenotype in human lung fibroblasts in vitro and inhibits lung fibrosis in a murine model in vivo.
J Clin Invest. 1996 Dec 15;98(12):2739-45
- 102 **Garber SL, Mirochnik Y, Brecklin CS, Unemori EN, Singh AK, Slobodskoy L, Grove BH, Arruda JA, Dunea G.**
Relaxin decreases renal interstitial fibrosis and slows progression of renal disease.
Kidney Int. 2001 Mar;59(3):876-82
- 103 **Williams EJ, Benyon RC, Trim N, Hadwin R, Grove BH, Arthur MJ, Unemori EN, Iredale JP.**
Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo.
Gut. 2001 Oct;49(4):577-83.

104 **Seibold JR, Korn JH, Simms R, Clements PJ, Moreland LW, Mayes MD, Furst DE, Rothfield N, Steen V, Weisman M, Collier D, Wigley FM, Merkel PA, Csuka ME, Hsu V, Rocco S, Erikson M, Hannigan J, Harkonen WS, Sanders ME.**

Recombinant human relaxin in the treatment of scleroderma. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial.

Ann Intern Med. 2000 Jun 6;132(11):871-9

105 **Giordano N, Papakostas P, Lucani B, Amendola A, Cipolli F, Agate V, Battisti E, Martini G, Nuti R.**

Serum relaxin in systemic sclerosis.

J Rheumatol. 2005 Nov;32(11):2164-6

106 **Osheroff PL, Phillips HS.**

Autoradiographic localization of relaxin binding sites in rat brain.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Aug 1;88(15):6413-7

107 **Osheroff PL, Ling VT, Vandlen RL, Cronin MJ, Lofgren JA.**

Preparation of biologically active ³²P-labeled human relaxin. Displaceable binding to rat uterus, cervix, and brain.

J Biol Chem. 1990 Jun 5;265(16):9396-401.

108 **Summerlee AJ, O'Byrne KT, Paisley AC, Breeze MF, Porter DG.**

Relaxin affects the central control of oxytocin release.

Nature. 1984 May 24-30;309(5966):372-4

109 **Dayanithi G, Cazalis M, Nordmann JJ**

Relaxin affects the release of oxytocin and vasopressin from the neurohypophysis.

Nature. 1987 Feb 26-Mar 4;325(6107):813-6.

110 **Way SA, Leng G.**

Relaxin increases the firing rate of supraoptic neurones and increases oxytocin secretion in the rat.

J Endocrinol. 1992 Jan;132(1):149-58

111 **Parry LJ, Summerlee AJ.**

Central angiotensin partially mediates the pressor action of relaxin in anesthetized rats.

Endocrinology. 1991 Jul;129(1):47-52

112 **Geddes BJ, Parry LJ, Summerlee AJ.**

Brain angiotensin-II partially mediates the effects of relaxin on vasopressin and oxytocin release in anesthetized rats.

Endocrinology. 1994 Mar;134(3):1188-92

113 **Yang RH, Bunting S, Wyss JM, Berecek KH, Zhang L, Jin H.**

Pressor and bradycardic effects of centrally administered relaxin in conscious rats.

Am J Hypertens. 1995 Apr;8(4 Pt 1):375-81

114 **Summerlee AJ, Hornsby DJ, Ramsey DG.**

The dipsogenic effects of rat relaxin: The effect of photoperiod and the potential role of relaxin on drinking in pregnancy.

Endocrinology. 1998 May;139(5):2322-8

115 **Hornsby DJ, Wilson BC, Summerlee AJ.**

Relaxin and drinking in pregnant rats.

Prog Brain Res. 2001;133:229-40

116 **Sortino MA, Cronin MJ, Wise PM.**

Relaxin stimulates prolactin secretion from anterior pituitary cells.

Endocrinology. 1989 Apr;124(4):2013-5.

117 **Bethea CL, Cronin MJ, Haluska GJ, Novy MJ.**

The effect of relaxin infusion on prolactin and growth hormone secretion in monkeys.

J Clin Endocrinol Metab. 1989 Nov;69(5):956-62.

118 **Bani G, Bigazzi M.**

Morphological changes induced in mouse mammary gland by porcine and human relaxin.

Acta Anat (Basel). 1984;119(3):149-54

119 **St-Louis J, Massicotte G.**

Chronic decrease of blood pressure by rat relaxin in spontaneously hypertensive rats.

Life Sci. 1985 Oct 7;37(14):1351-7

120 **Vasilenko P 3rd, Adams WC, Frieden EH.**

Comparison of systemic and uterine effects of relaxin and insulin in alloxan-treated, hyperglycemic rats.

Proc Soc Exp Biol Med. 1982 Mar;169(3):376-9

-
- 121 **Bigazzi M, Del Mese A, Petrucci F, Casali R, Novelli GP.**
The local administration of relaxin induces changes in the microcirculation of the rat mesocaecum.
Acta Endocrinol (Copenh). 1986 Jun;112(2):296-9
- 122 **Bani D, Nistri S, Quattrone S, Bigazzi M, Bani Sacchi T.**
The vasorelaxant hormone relaxin induces changes in liver sinusoid microcirculation: a morphologic study in the rat.
J Endocrinol. 2001 Dec;171(3):541-9
- 123 **Schöndorf T, Forst T, Hohberg C, Lübben G, Armbruster FP, Roth W, Borchert M, Köder C, Löbig M, Grabellus M, Pfützner A**
Relaxin expression correlates significantly with serum changes in VEGF in response to antidiabetic treatment in male patients with type 2 diabetes mellitus.
Clin Lab. 2007;53(3-4):193-8
- 124 **Jeyabalan A, Novak J, Doty KD, Matthews J, Fisher MC, Kerchner LJ, Conrad KP.**
Vascular matrix metalloproteinase-9 mediates the inhibition of myogenic reactivity in small arteries isolated from rats after short term administration of relaxin.
Endocrinology. 2006 Oct 19
- 125 **Masini E, Salvemini D, Mugnai L, Bello MG, Bani D, Mannaioni PF.**
The effect of relaxin on myocardial ischaemia-reperfusion injury and histamine release in vitro and in vivo.
Inflamm Res. 1996 Mar;45 Suppl 1:S27-8
- 126 **Masini E, Bani D, Bello MG, Bigazzi M, Mannaioni PF, Sacchi TB.**
Relaxin counteracts myocardial damage induced by ischemia-reperfusion in isolated guinea pig hearts: evidence for an involvement of nitric oxide.
Endocrinology. 1997 Nov;138(11):4713-20
- 127 **Bani D, Masini E, Bello MG, Bigazzi M, Sacchi TB.**
Relaxin protects against myocardial injury caused by ischemia and reperfusion in rat heart.
Am J Pathol. 1998 May;152(5):1367-76
- 128 **Thomas GR, Vandlen R**
The purely chronotropic effects of relaxin in the rat isolated heart.
J Pharm Pharmacol. 1993 Oct;45(10):927-8.
- 129 **Ward DG, Thomas GR, Cronin MJ.**
Relaxin increases rat heart rate by a direct action on the cardiac atrium.
Biochem Biophys Res Commun. 1992 Jul 31;186(2):999-1005
- 130 **Wade JD, Layden SS, Lambert PF, Kakouris H, Tregear GW.**
Primate relaxin: synthesis of gorilla and rhesus monkey relaxins.
J Protein Chem. 1994 Apr;13(3):315-21
- 131 **Kakouris H, Eddie LW, Summers RJ.**
Cardiac effects of relaxin in rats.
Lancet. 1992 May 2;339(8801):1076-8
- 132 **Han X, Habuchi Y, Giles WR.**
Relaxin increases heart rate by modulating calcium current in cardiac pacemaker cells.
Circ Res. 1994 Mar;74(3):537-41
- 133 **Piedras-Renteria ES, Sherwood OD, Best PM.**
Effects of relaxin on rat atrial myocytes. II. Increased calcium influx derived from action potential prolongation.
Am J Physiol. 1997 Apr;272(4 Pt 2):H1798-803
- 134 **Piedras-Renteria ES, Sherwood OD, Best PM.**
Effects of relaxin on rat atrial myocytes. I. Inhibition of I(to) via PKA-dependent phosphorylation.
Am J Physiol. 1997 Apr;272(4 Pt 2):H1791-7.
- 135 **Conrad KP, Novak J**
Emerging role of relaxin in renal and cardiovascular function
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004 Aug;287(2):R250-61
- 136 **Zhang J, Qi YF, Geng B, Pan CS, Zhao J, Chen L, Yang J, Chang JK, Tang CS.**
Effect of relaxin on myocardial ischemia injury induced by isoproterenol.
Peptides. 2005 Sep;26(9):1632-9
- 137 **Bani D, Bigazzi M, Masini E, Bani G, Sacchi TB.**
Relaxin depresses platelet aggregation: in vitro studies on isolated human and rabbit platelets.
Lab Invest. 1995 Nov;73(5):709-16.
- 138 **Masini E, Di Bello MG, Bani D, Bigazzi M, Bani Sacchi T, Mannaioni PF.**
Relaxin inhibits histamine release from mast cells: involvement of nitric oxide production.
Inflamm Res. 1995 Apr;44 Suppl 1:S12-3

-
- 139 **Bani D, Ballati L, Masini E, Bigazzi M, Sacchi TB.**
Relaxin counteracts asthma-like reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pigs.
Endocrinology. 1997 May;138(5):1909-15
- 140 **Frey N, Olson EN.**
Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly.
Annu Rev Physiol. 2003;65:45-79. Epub 2003 Jan 9.
- 141 **Levy D.**
Clinical significance of left ventricular hypertrophy: insights from the Framingham Study.
J Cardiovasc Pharmacol. 1991;17 Suppl 2:S1-6
- 142 **Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP.**
Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study.
N Engl J Med. 1990 May 31;322(22):1561-6
- 143 **Casale PN, Devereux RB, Milner M, Zullo G, Harshfield GA, Pickering TG, Laragh JH.**
Value of echocardiographic measurement of left ventricular mass in predicting cardiovascular morbid events in hypertensive men.
Ann Intern Med. 1986 Aug;105(2):173-8
- 144 **Vakili BA, Okin PM, Devereux RB.**
Prognostic implications of left ventricular hypertrophy.
Am Heart J. 2001 Mar;141(3):334-41.
- 145 **Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G.**
Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators.
N Engl J Med. 2000 Jan 20;342(3):145-53.
- 146 **Vandenburgh H, Kaufman S.**
In vitro model for stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle.
Science. 1979 Jan 19;203(4377):265-8
- 147 **Mann DL, Kent RL, Cooper G 4th.**
Load regulation of the properties of adult feline cardiocytes: growth induction by cellular deformation.
Circ Res. 1989 Jun;64(6):1079-90
- 148 **Sanna B, Bueno OF, Dai YS, Wilkins BJ, Molkentin JD.**
Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth.
Mol Cell Biol. 2005 Feb;25(3):865-78
- 149 **Passier R, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, Overbeek P, Richardson JA, Grant SR, Olson EN.**
CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo.
J Clin Invest. 2000 May;105(10):1395-406.
- 150 **Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN.**
A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy.
Cell. 1998 Apr 17;93(2):215-28.
- 151 **Vega RB, Yang J, Rothermel BA, Bassel-Duby R, Williams RS.**
Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity.
J Biol Chem. 2002 Aug 16;277(33):30401-7
- 152 **Zhang W, Kowal RC, Rusnak F, Sikkink RA, Olson EN, Victor RG**
Failure of calcineurin inhibitors to prevent pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats.
Circ Res. 1999 Apr 2;84(6):722-8.
- 153 **Sussman MA, Lim HW, Gude N, Taigen T, Olson EN, Robbins J, Colbert MC, Gualberto A, Wieczorek DF, Molkentin JD.**
Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition.
Science. 1998;281:1690-1693
- 154 **Meguro T, Hong C, Asai K, Takagi G, McKinsey TA, Olson EN, Vatner SF.**
Cyclosporine attenuates pressure-overload hypertrophy in mice while enhancing susceptibility to decompensation and heart failure.
Circ Res. 1999 Apr 2;84(6):735-40
- 155 **De Windt LJ, Lim HW, Bueno OF, Liang Q, Delling U, Braz JC, Glascock BJ, Kimball TF, del Monte F, Hajjar RJ, Molkentin JD.**
Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98: 3322-3327

-
- 156 **Ding B, Price RL, Borg TK, Weinberg EO, Halloran PF, Lorell BH.**
Pressure overload induces severe hypertrophy in mice treated with cyclosporine, an inhibitor of calcineurin.
Circ Res. 1999; 84: 729-734
- 157 **Haq S, Choukroun G, Kang ZB, Ranu H, Matsui T, Rosenzweig A, Molkenkin JD, Alessandrini A, Woodgett J, Hajjar R, Michael A, Force T.**
Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy.
J Cell Biol. 2000 Oct 2;151(1):117-30
- 158 **Dorn GW 2nd, Force T**
Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy.
J Clin Invest. 2005 Mar;115(3):527-37.
- 159 **Shioi T, McMullen JR, Tarnavski O, Converso K, Sherwood MC, Manning WJ, Izumo S.**
Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice.
Circulation. 2003 Apr 1;107(12):1664-70.
- 160 **Boyle WJ, Smeal T, Defize LH, Angel P, Woodgett JR, Karin M, Hunter T.**
Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity.
Cell. 1991 Feb 8;64(3):573-84
- 161 **Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR.**
Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability.
Genes Dev. 2000 Oct 1;14(19):2501-14
- 162 **Gross ER, Hsu AK, Gross GJ.**
The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 beta.
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006 Aug;291(2):H827-34
- 163 **Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR**
Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation
Nature. 2000 Jul 6;406(6791):86-90
- 164 **McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN.**
Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Dec 19;97(26):14400-5
- 165 **Keren A, Tamir Y, Bengal E.**
The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development.
Mol Cell Endocrinol. 2006 Jun 27;252(1-2):224-30. Epub 2006 Apr 27
- 166 **Kolodziejczyk SM, Wang L, Balazsi K, DeRepentigny Y, Kothary R, Megency LA.**
MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium.
Curr Biol. 1999 Oct 21;9(20):1203-6
- 167 **Lu J, McKinsey TA, Nicol RL, Olson EN**
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 11;97(8):4070-5.
Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases.
- 168 **Nadruz W Jr, Kobarg CB, Constancio SS, Corat PD, Franchini KG.**
Load-induced transcriptional activation of c-jun in rat myocardium: regulation by myocyte enhancer factor 2.
Circ Res. 2003 Feb 7;92(2):243-51.
- 169 **Post SR, Hilal-Dandan R, Urasawa K, Brunton LL, Insel PA.**
Quantification of signalling components and amplification in the beta-adrenergic-receptor-adenylate cyclase pathway in isolated adult rat ventricular myocytes.
Biochem J. 1995 Oct 1;311 (Pt 1):75-80.
- 170 **Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ.**
Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A.
Nature. 1997 Nov 6;390(6655):88-91
- 171 **Dorn GW 2nd.**
Adrenergic pathways and left ventricular remodeling.
J Card Fail. 2002 Dec;8(6 Suppl):S370-3
- 172 **Iwase M, Bishop SP, Uechi M, Vatner DE, Shannon RP, Kudej RK, Wight DC, Wagner TE, Ishikawa Y, Homcy CJ, Vatner SF.**
Adverse effects of chronic endogenous sympathetic drive induced by cardiac GS alpha overexpression.
Circ Res. 1996 Apr;78(4):517-24

173 **Adams JW, Brown JH.**

G-proteins in growth and apoptosis: lessons from the heart.

Oncogene. 2001 Mar 26;20(13):1626-34.

174 **D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, Liggett SB, Dorn GW 2nd.**

Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Jul 22;94(15):8121-6

175 **Adams JW, Sakata Y, Davis MG, Sah VP, Wang Y, Liggett SB, Chien KR, Brown JH, Dorn GW 2nd.**

Enhanced Galphaq signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Aug 18;95(17):10140-5

176 **Nemoto S, Sheng Z, Lin A**

Opposing effects of Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinases on cardiomyocyte hypertrophy.

Mol Cell Biol. 1998 Jun;18(6)

177 **Choukroun G, Hajjar R, Fry S, del Monte F, Haq S, Guerrero JL, Picard M, Rosenzweig A, Force T.**

Regulation of cardiac hypertrophy in vivo by the stress-activated protein kinases/c-Jun NH(2)-terminal kinases.

J Clin Invest. 1999 Aug;104(4):391-8

178 **Ramirez MT, Sah VP, Zhao XL, Hunter JJ, Chien KR, Brown JH.**

The MEKK-JNK pathway is stimulated by alpha1-adrenergic receptor and ras activation and is associated with in vitro and in vivo cardiac hypertrophy.

J Biol Chem. 1997 May 30;272(22):14057-61

179 **Yano M, Kim S, Izumi Y, Yamanaka S, Iwao H.**

Differential activation of cardiac c-jun amino-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase in angiotensin II-mediated hypertension.

Circ Res. 1998 Oct 5;83(7):752-60

180 **Hirotsu S, Otsu K, Nishida K, Higuchi Y, Morita T, Nakayama H, Yamaguchi O, Mano T, Matsumura Y, Ueno H, Tada M, Hori M.**

Involvement of nuclear factor- κ B and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy.

Circulation. 2002; 105: 509-515

181 **Redfern CH, Degtyarev MY, Kwa AT, Salomonis N, Cotte N, Nanevich T, Fidelman N, Desai K, Vranizan K, Lee EK, Coward P, Shah N, Warrington JA, Fishman GI, Bernstein D, Baker AJ, Conklin BR.**

Conditional expression of a Gi-coupled receptor causes ventricular conduction delay and a lethal cardiomyopathy.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 25;97(9):4826-31

182 **Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkentin JD.**

The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice.

EMBO J. 2000 Dec 1;19(23):6341-50

183 **Nicol RL, Frey N, Pearson G, Cobb M, Richardson J, Olson EN.**

Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy.

EMBO J. 2001 Jun 1;20(11):2757-67

184 **Glennon PE, Kaddoura S, Sale EM, Sale GJ, Fuller SJ, Sugden PH.**

Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes.

Circ Res. 1996 Jun;78(6):954-61

185 **Yue TL, Gu JL, Wang C, Reith AD, Lee JC, Mirabile RC, Kreutz R, Wang Y, Maleeff B, Parsons AA, Ohlstein EH.**

Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy.

J Biol Chem. 2000 Dec 1;275(48):37895-901

186 **Minamino T, Yujiri T, Terada N, Taffet GE, Michael LH, Johnson GL, Schneider MD.**

MEKK1 is essential for cardiac hypertrophy and dysfunction induced by Gq.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Mar 19;99(6):3866-71

187 **Sadoshima J, Montagne O, Wang Q, Yang G, Warden J, Liu J, Takagi G, Karoor V, Hong C, Johnson GL, Vatner DE, Vatner SF.**

The MEKK1-JNK pathway plays a protective role in pressure overload but does not mediate cardiac hypertrophy.

J Clin Invest. 2002 Jul;110(2):271-9

188 **Clerk A, Michael A, Sugden PH.**

Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J Cell Biol.* 1998 Jul 27;142(2):523-35.

189 **Ueyama T, Kawashima S, Sakoda T, Rikitake Y, Ishida T, Kawai M, Namiki M, Yokoyama M.**

Endothelin-1 activates p38 mitogen-activated protein kinase via endothelin-A receptor in rat myocardial cells. *Mol Cell Biochem.* 1999 Sep;199(1-2):119-24

190 **Han J, Molkentin JD.**

Regulation of MEF2 by p38 MAPK and its implication in cardiomyocyte biology.

Trends Cardiovasc Med. 2000 Jan;10(1):19-22.

191 **Yang TT, Xiong Q, Enslin H, Davis RJ, Chow CW.**

Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases.

Mol Cell Biol. 2002 Jun;22(11):3892-904

192 **Hofmann J**

Protein kinase C isozymes as potential targets for anticancer therapy.

Curr Cancer Drug Targets. 2004 Mar;4(2):125-46.

193 **Henrich CJ, Simpson PC.**

Differential acute and chronic response of protein kinase C in cultured neonatal rat heart myocytes to alpha 1-adrenergic and phorbol ester stimulation.

J Mol Cell Cardiol. 1988 Dec;20(12):1081-5

194 **Bowman JC, Steinberg SF, Jiang T, Geenen DL, Fishman GI, Buttrick PM.**

Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates.

J Clin Invest. 1997 Nov 1;100(9):2189-95

195 **Huang L, Wolska BM, Montgomery DE, Burkart EM, Buttrick PM, Solaro RJ.**

Increased contractility and altered Ca(2+) transients of mouse heart myocytes conditionally expressing PKCbeta. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 May;280(5):C1114-20

196 **Tian R, Miao W, Spindler M, Javadpour MM, McKinney R, Bowman JC, Buttrick PM, Ingwall JS.**

Long-term expression of protein kinase C in adult mouse hearts improves postischemic recovery.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Nov 9;96(23):13536-41.

197 **Christian Freund, MSc; Ruth Schmidt-Ullrich, PhD; Anthony Baurand, PhD; Sandra Dunger, MSc; Wolfgang Schneider, MD; Peter Loser, PhD; Amina El-Jamali, PhD; Rainer Dietz, MD, PhD; Claus Scheidereit, PhD; Martin W. Bergmann, MD**

Requirement of Nuclear Factor-B in Angiotensin II- and Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy In Vivo *Circulation.* 2005;111:2319-2325.

198 **Craig R, Wagner M, McCardle T, Craig AG, Glembotski CC.** The cytoprotective effects of the glycoprotein 130 receptor-coupled cytokine, cardiotrophin-1, require activation of NF- κ B. *J Biol Chem.* 2001; 276: 37621-37629

199 **Lopez N, Diez J, Fortuno MA.**

Differential hypertrophic effects of cardiotrophin-1 on adult cardiomyocytes from normotensive and spontaneously hypertensive rats.

J Mol Cell Cardiol. 2006 Nov;41(5):902-13

200 **Kunisada K, Tone E, Fujio Y, Matsui H, Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T.**

Activation of gp130 transduces hypertrophic signals via STAT3 in cardiac myocytes.

Circulation. 1998 Jul 28;98(4):346-52

201 **Uozumi H, Hiroi Y, Zou Y, Takimoto E, Toko H, Niu P, Shimoyama M, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I.**

gp130 plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy.

J Biol Chem. 2001 Jun 22;276(25):23115-9.

202 **Yasukawa H, Hoshijima M, Gu Y, Nakamura T, Pradervand S, Hanada T, Hanakawa Y, Yoshimura A, Ross J Jr, Chien KR.**

Suppressor of cytokine signaling-3 is a biomechanical stress-inducible gene that suppresses gp130-mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways.

J Clin Invest. 2001 Nov;108(10):1459-67

203 **Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, Ross J Jr, Muller W, Chien KR.**

Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress.

Cell. 1999 Apr 16;97(2):189-98

204 **Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, Janicki JS.**

The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function.

Eur J Cardiothorac Surg. 2006 Oct;30(4):604-10

-
- 205 **Maquart FX, Pasco S, Ramont L, Hornebeck W, Monboisse JC.**
An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion.
Crit Rev Oncol Hematol. 2004 Mar;49(3):199-202
- 206 **Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH.**
Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1).
Mol Genet Metab. 2000 Sep-Oct;71(1-2):418-35
- 207 **Rosenkranz S.**
TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling.
Cardiovasc Res. 2004 Aug 15;63(3):423-32.
- 208 **Heeneman S, Cleutjens JP, Faber BC, Creemers EE, van Suylen RJ, Lutgens E, Cleutjens KB, Daemen MJ.**
The dynamic extracellular matrix: intervention strategies during heart failure and atherosclerosis.
J Pathol. 2003 Jul;200(4):516-25
- 209 **Brown RD et al.**
Proinflammatory Cytokines and Cardiac Extracellular Matrix: Regulation of Fibroblast Phenotype in, *Interstitial Fibrosis in Heart Disease*, pp.57-80. (Springer-Verlag), 2004
- 210 **Bhambi B, Eghbali M.**
Effect of norepinephrine on myocardial collagen gene expression and response of cardiac fibroblasts after norepinephrine treatment.
Am J Pathol. 1991 Nov;139(5):1131-42
- 211 **Chapman D, Weber KT, Eghbali M.**
Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium.
Circ Res. 1990 Oct;67(4):787-94
- 212 **Eghbali M.**
Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation.
Basic Res Cardiol. 1992;87 Suppl 2:183-9
- 213 **Eghbali M, Tomek R, Woods C, Bhambi B.**
Cardiac fibroblasts are predisposed to convert into myocyte phenotype: specific effect of transforming growth factor beta.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Feb 1;88(3):795-9
- 214 **Lijnen P, Papparella I, Petrov V, Semplicini A, Fagard R.**
Angiotensin II-stimulated collagen production in cardiac fibroblasts is mediated by reactive oxygen species.
J Hypertens. 2006 Apr;24(4):757-66
- 215 **Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ.**
Transforming growth factor-beta(1) induces angiotensin-converting enzyme synthesis in rat cardiac fibroblasts during their differentiation to myofibroblasts.
J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2000 Dec;1(4):342-52
- 216 **Lijnen P, Petrov V.**
Induction of cardiac fibrosis by aldosterone.
J Mol Cell Cardiol. 2000 Jun;32(6):865-79
- 217 **Butt RP, Laurent GJ, Bishop JE.**
Collagen production and replication by cardiac fibroblasts is enhanced in response to diverse classes of growth factors.
Eur J Cell Biol. 1995 Nov;68(3):330-5
- 218 **Hafizi S, Wharton J, Chester AH, Yacoub MH.**
Profibrotic effects of endothelin-1 via the ETA receptor in cultured human cardiac fibroblasts.
Cell Physiol Biochem. 2004;14(4-6):285-92
- 219 **Samuel CS, Unemori EN, Mookerjee I, Bathgate RA, Layfield SL, Mak J, Tregear GW, Du XJ.**
Relaxin modulates cardiac fibroblast proliferation, differentiation, and collagen production and reverses cardiac fibrosis in vivo.
Endocrinology. 2004 Sep;145(9):4125-33
- 220 **Du XJ, Samuel CS, Gao XM, Zhao L, Parry LJ, Tregear GW.**
Increased myocardial collagen and ventricular diastolic dysfunction in relaxin deficient mice: a gender-specific phenotype.
Cardiovasc Res. 2003 Feb;57(2):395-404

-
- 221 **Lekgabe ED, Royce SG, Hewitson TD, Tang ML, Zhao C, Moore XL, Tregear GW, Bathgate RA, Du XJ, Samuel CS.**
The Effects of Relaxin and Estrogen Deficiency on Collagen Deposition and Hypertrophy of Nonreproductive Organs.
Endocrinology. 2006 Dec;147(12):5575-5583
- 222 **Lekgabe ED, Kiriazis H, Zhao C, Xu Q, Moore XL, Su Y, Bathgate RA, Du XJ, Samuel CS.**
Relaxin reverses cardiac and renal fibrosis in spontaneously hypertensive rats.
Hypertension. 2005 Aug;46(2):412-8
- 223 **Franco V, Chen YF, Oparil S, Feng JA, Wang D, Hage F, Perry G.**
Atrial natriuretic peptide dose-dependently inhibits pressure overload-induced cardiac remodeling.
Hypertension. 2004 Nov;44(5):746-50
- 224 **Chan JC, Knudson O, Wu F, Morser J, Dole WP, Wu Q.**
Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jan 18;102(3):785-90
- 225 **Kishimoto I, Rossi K, Garbers DL.**
A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Feb 27;98(5):2703-6.
- 226 **Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA.**
Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy.
Nat Med. 2005 Feb;11(2):214-22
- 227 **Moore XL, Tan SL, Lo CY, Fang L, Su YD, Gao XM, Woodcock EA, Summers RJ, Tregear GW, Bathgate RA, Du XJ.**
Relaxin antagonizes hypertrophy and apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes.
Endocrinology. 2007 Apr;148(4):1582-9
- 228 **Milano C, Allen LF, Rockman HA, Dobler PC, McMinn TR, Chien KR, Johnson TD, Bond RA, and Lefkowitz RJ.**
Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the β_2 -adrenergic receptor.
Science 264: 582-586, 1994
- 229 **Mookerjee I, Unemori EN, DU XJ, Tregear GW, Samuel CS.**
Relaxin modulates fibroblast function, collagen production, and matrix metalloproteinase-2 expression by cardiac fibroblasts.
Ann N Y Acad Sci. 2005 May;1041:190-3
- 230 **Dschietzig T, Bartsch C, Kinkel T, Baumann G, Stangl K.**
Myocardial relaxin counteracts hypertrophy in hypertensive rats.
Ann N Y Acad Sci. 2005 May;1041:441-3
- 231 **Olmsted F., Corcoran A.C., Page I.H**
Blood Pressure in the Unanesthetized Rat. I
Circulation 1951;3:722-726
- 232 **Whitesall SE, Hoff JB, Vollmer AP, D'Alecy LG.**
Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Jun;286(6):H2408-15.
- 233 **Ma S., Bonaventure P., Ferraro T., Shen P.-J., Burazin T.C.D., Bathgate R.A.D., Liu C., Tregear G.W., Sutton S.W., Gundlach A.L.**
Relaxin-3 in GABA projection neurons of nucleus incertus suggests widespread influence on forebrain circuits via G-protein-coupled Receptor-135 in the rat
Neuroscience (2007) 144: 165-190
- 234 **Mercado-Simmen R. C., Bryant-Greenwood G. D. and Greenwood F. C.**
Relaxin receptor in the rat myometrium: regulation by estrogen and relaxin.
Endocrinology(1982) 110: 220 - 226
- 235 **Rosenkranz AC, Woods RL, Dusting GJ, Ritchie RH.**
Antihypertrophic actions of the natriuretic peptides in adult rat cardiomyocytes: importance of cyclic GMP.
Cardiovasc Res. 2003 Feb;57(2):515-22)
- 236 **Pillai SB, Rockwell LC, Sherwood OD, Koos RD.**
Relaxin stimulates uterine edema via activation of estrogen receptors: blockade of its effects using ICI 182,780, a specific estrogen receptor antagonist.
Endocrinology. 1999 May;140(5):2426-9

237 **Ohtani T, Ohta M, Yamamoto K, Mano T, Sakata Y, Nishio M, Takeda Y, Yoshida J, Miwa T, Okamoto M, Masuyama T, Nonaka Y, Hori M.**

Elevated Cardiac Tissue Level of Aldosterone and Mineralocorticoid Receptor in Diastolic Heart Failure: Beneficial Effects of Mineralocorticoid Receptor Blocker.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2006 Oct 5

238 **Izawa H, Murohara T, Nagata K, Isobe S, Asano H, Amano T, Ichihara S, Kato T, Ohshima S, Murase Y, Iino S, Obata K, Noda A, Okumura K, Yokota M.**

Mineralocorticoid receptor antagonism ameliorates left ventricular diastolic dysfunction and myocardial fibrosis in mildly symptomatic patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: a pilot study.

Circulation. 2005 Nov 8;112(19):2940-5

239 **Nagata K, Obata K, Xu J, Ichihara S, Noda A, Kimata H, Kato T, Izawa H, Murohara T, Yokota M.**

Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats.

Hypertension. 2006 Apr;47(4):656-64

240 **Shibasaki Y, Nishiue T, Masaki H, Tamura K, Matsumoto N, Mori Y, Nishikawa M, Matsubara H, Iwasaka T.**

Impact of the angiotensin II receptor antagonist, losartan, on myocardial fibrosis in patients with end-stage renal disease: assessment by ultrasonic integrated backscatter and biochemical markers.

Hypertens Res. 2005 Oct;28(10):787-95

9. Tabellenanhang

Tabelle I:

Systolische Blutdrücke der 14 einzelnen Tiere in wachem und in narkotisiertem Zustand in mmHg als Mittelwerte der pro Tier durchgeführten 10 Einzelmessungen:

WKY	wBDsys	nBDsys	SHR	wBDsys	nBDsys	p
Tier 1	112	92	Tier 8	189	152	
Tier 2	105	90	Tier 9	210	170	
Tier 3	98	92	Tier 10	178	136	
Tier 4	116	94	Tier 11	177	136	
Tier 5	121	105	Tier 12	205	163	
Tier 6	126	113	Tier 13	190	152	
Tier 7	104	93	Tier 14	169	140	
MW (+/-SD)	112(+/- 10)	97(+/-9)		188(+/-15)	150(+/-13)	< 0,05

wBDsys: systolischer Blutdruck im Wachzustand in mmHg

nBDsys: systolischer Blutdruck in narkotisiertem Zustand in mmHg

p: Signifikanz des Unterschieds WKY-SHR sowohl in narkotisiertem als auch in wachem Zustand $p < 0,05$

Tabelle II:

Maximal unter RLX-Stimulation entwickelte Kontraktionskraft der atrialen Muskelstreifenpräparationen der 14 einzelnen Versuche in % er Ausgangswerte:

WKY, atrial	Max. Kraft	SHR, atrial	Max. Kraft	p
Tier1	211	Tier 8	231	
Tier 2	224	Tier 9	185	
Tier 3	179	Tier 10	225	
Tier 4	240	Tier 11	185	
Tier 5	191	Tier 12	201	
Tier 6	227	Tier 13	217	
Tier 7	215	Tier 14	190	
MW(+/-SD)	212(+/-21)		205(+/-19)	p>0,05

Tabelle III:

Gemittelte atriale Kontraktionskräfte (in % des jeweiligen Ausgangswertes) für jede der RLX-Konzentrationsstufen:

RLX-Konzentration	WKY atrial (+/-SD)	SHR atrial (+/-SD)	p
0	100%	100%	
10 ⁻¹² mol/l	100%(8)	100%(10)	
10 ⁻¹¹ mol/l	105%(9)	108%(11)	
10 ⁻¹⁰ mol/l	135%(11)	128%(13)	
10 ⁻⁹ mol/l	185%(12)	176%(17)	
10 ⁻⁸ mol/l	215%(15)	201%(14)	
10 ⁻⁷ mol/l	210%(16)	206%(13)	p>0,05

Tabelle IV:

Gemittelte ventrikuläre Kontraktionskräfte (in % des jeweiligen Ausgangswertes) für jede der RLX-Konzentrationsstufen:

RLX-Konzentration	WKY ventrikulär (+/-SD)	SHR ventrikulär (+/-SD)	p
0	100%	100%	
10⁻¹² mol/l	100%(8)	100%(10)	
10⁻¹¹ mol/l	105%(9)	94%(12)	
10⁻¹⁰ mol/l	98%(5)	108%(8)	
10⁻⁹ mol/l	95%(4)	102%(9)	
10⁻⁸ mol/l	101%(7)	97%(10)	
10⁻⁷ mol/l	103%(10)	95%(10)	p>0,05

Tabelle V:

Maximal entwickelte Kontraktionskraft der atrialen Muskelstreifenpräparationen der vierzehn einzelnen Versuche unter Isoprenalinstimulation in % der Ausgangskraft:

WKY, atrial	Max. Kraft	SHR atrial	Max. Kraft	p
Tier 1	303	Tier 8	187	
Tier 2	259	Tier 9	155	
Tier 3	279	Tier 10	171	
Tier 4	244	Tier 11	160	
Tier 5	295	Tier 12	201	
Tier 6	245	Tier 13	187	
Tier 7	266	Tier 14	190	
MW (+/-SD)	270 (+/-23)		179 (+/-17)	p<0,001

Tabelle VI:

Gemittelte atriale Kontraktionskräfte für die jeweiligen Gruppen (in % des jeweiligen Ausgangswertes) für jede der Isoprenalinkonzentrationsstufen:

Isoprenalin-Konzentration	WKY atrial (+/-SD)	SHR atrial (+/-SD)	P
0	100%	100%	
10⁻¹⁰ mol/l	100%(9)	100%(9)	
10⁻⁹ mol/l	105%(10)	97%(10)	
10⁻⁸ mol/l	132%(8)	105%(11)	
10⁻⁷ mol/l	166%(12)	141%(13)	
10⁻⁶ mol/l	223%(15)	166%(12)	
10⁻⁵ mol/l	275%(16)	180%(11)	
10⁻⁴ mol/l	273%(18)	178%(15)	p<0,01

Tabelle VII:

Gemittelte ventrikuläre Kontraktionskräfte für die jeweiligen Gruppen (in % des jeweiligen Ausgangswertes) für jede der Isoprenalinkonzentrationsstufen:

Isoprenalin-Konzentration	WKY ventrikulär (+/-SD)	SHR ventrikulär (+/-SD)	P
0	100%	100%	
10⁻¹⁰ mol/l	100%(8)	100%(10)	
10⁻⁹ mol/l	115%(10)	102%(9)	
10⁻⁸ mol/l	167%(13)	135%(13)	
10⁻⁷ mol/l	189%(16)	168%(15)	
10⁻⁶ mol/l	278%(21)	185%(14)	
10⁻⁵ mol/l	333%(25)	205%(13)	
10⁻⁴ mol/l	335%(29)	200%(16)	p<0,01

Tabelle VIII:

Herzteilegewichte der einzelnen Tiere:

Tier	Gewicht (g)	RA (mg)	RA- Index	LA (mg)	LA- Index	RV (mg)	RV- Index	LV (mg)	LV- Index
WKY 1	633	30	0,047	73	0,12	190	0,300	1130	1,79
WKY 2	656	35	0,053	66	0,10	204	0,311	1098	1,67
WKY 3	599	38	0,063	72	0,12	186	0,311	1287	2,15
WKY 4	612	40	0,065	70	0,11	179	0,292	1305	2,13
WKY 5	705	33	0,047	54	0,08	191	0,271	1066	1,51
WKY 6	644	37	0,057	77	0,12	193	0,300	1032	1,60
WKY 7	650	41	0,063	59	0,09	200	0,308	1109	1,71
SHR 8	375	23	0,061	58	0,15	122	0,325	982	2,62
SHR 9	351	22	0,063	53	0,15	139	0,396	1053	3,00
SHR 10	410	26	0,063	55	0,13	110	0,268	1074	2,62
SHR 11	404	28	0,069	55	0,14	114	0,282	956	2,37
SHR 12	366	24	0,066	67	0,18	124	0,339	913	2,49
SHR 13	335	22	0,066	58	0,17	115	0,343	1058	3,16
SHR 14	398	21	0,053	63	0,16	106	0,266	1056	2,65

Tabelle IX: RLX-mRNA-Konzentration der einzelnen Tiere im rechten Atrium in Prozent vom WKY-Mittelwert:

Tier WKY	RLX-mRNA	Tier SHR	RLX-mRNA	WKY/SHR	p
1	101	8	98		
2	115	9	100		
3	97	10	109		
4	100	11	92		
5	98	12	95		
6	95	13	107		
7	94	14	92		
MW(+/-SD)	100(7)		99(7)	0,99	P=0,71

Tabelle X: RLX-mRNA-Konzentration der einzelnen Tiere im linken Atrium in Prozent vom WKY-Mittelwert:

Tier WKY	RLX-mRNA	Tier SHR	RLX-mRNA	WKY/SHR	p
1	98	8	220		
2	97	9	256		
3	111	10	245		
4	88	11	235		
5	84	12	231		
6	114	13	219		
7	108	14	220		
MW(+/-SD)	100(12)		232(14)	2,32	P<0,001

Tabelle XI: RLX-mRNA-Konzentration der einzelnen Tiere im rechten Ventrikel in Prozent vom WKY-Mittelwert:

Tier WKY	RLX-mRNA	Tier SHR	RLX-mRNA	WKY/SHR	p
1	100	8	118		
2	95	9	110		
3	98	10	116		
4	106	11	105		
5	108	12	107		
6	97	13	114		
7	96	14	95		
MW(+/-SD)	100(5)	Mittelwert	109(8)	1,09	P=0,053

Tabelle XII: RLX-mRNA-Konzentration der einzelnen Tiere im linken Ventrikel in Prozent vom WKY-Mittelwert:

Tier WKY	RLX-mRNA	Tier SHR	RLX-mRNA	WKY/SHR	p
1	109	8	266		
2	110	9	278		
3	117	10	300		
4	89	11	297		
5	85	12	238		
6	100	13	205		
7	90	14	220		
MW(+/-SD)	100(12)		258(37)	2,57	P<0,001

Tabelle XIII: RLX-mRNA-Konzentration der einzelnen Tiere in der Pulmonalarterie in Prozent vom WKY-Mittelwert:

Tier WKY	RLX-mRNA	Tier SHR	RLX-mRNA	WKY/SHR	p
1	96	8	113		
2	93	9	110		
3	114	10	114		
4	112	11	106		
5	105	12	98		
6	80	13	93		
7	100	14	92		
MW(+/-SD)	100(12)		104(9)	1,04	P=0,71

Tabelle XIV: RLX-mRNA-Konzentration der einzelnen Tiere in der Aorta in Prozent vom WKY-Mittelwert:

Tier WKY	RLX-mRNA	Tier SHR	RLX-mRNA	WKY/SHR	p
1	88	8	143		
2	110	9	154		
3	109	10	108		
4	86	11	122		
5	111	12	103		
6	105	13	104		
7	91	14	130		
MW(+/-SD)	100(11)		123(20)	1,23	P=0,10

Tabelle XV: RLX-mRNA-Konzentration der einzelnen Tiere in der Lunge in Prozent vom WKY-Mittelwert:

Tier WKY	RLX-mRNA	Tier SHR	RLX-mRNA	WKY/SHR	p
1	97	8	82		
2	98	9	99		
3	109	10	93		
4	114	11	96		
5	86	12	86		
6	88	13	88		
7	108	14	91		
MW(+/-SD)	100(11)		91(6)	0,91	P=0,13

Tabelle XVI: RLX-mRNA-Konzentration der einzelnen Tiere in den Nieren in Prozent vom WKY-Mittelwert:

Tier WKY	RLX-mRNA	Tier SHR	RLX-mRNA	WKY/SHR	p
1	87	8	144		
2	108	9	106		
3	109	10	151		
4	109	11	148		
5	94	12	126		
6	90	13	88		
7	103	14	155		
MW(+/-SD)	100(9)		131(26)	1,31	P=0,053

Tabelle XVII: rRLX-3-Proteinkonzentration der einzelnen Tiere im rechten Atrium in Prozent vom WKY-Mittelwert:

Tier WKY	rRLX-3	Tier SHR	rRLX-3	WKY/SHR	p
1	111	8	100		
2	115	9	101		
3	100	10	133		
4	97	11	96		
5	97	12	145		
6	96	13	134		
7	84	14	119		
MW(+/-SD)	100(10)		118(20)	1,18	P=0,07

Tabelle XVIII: rRLX-3-Proteinkonzentration der einzelnen Tiere im linken Atrium in Prozent vom WKY-Mittelwert:

Tier WKY	rRLX-3	Tier SHR	rRLX-3	WKY/SHR	p
1	107	8	210		
2	91	9	277		
3	114	10	277		
4	100	11	280		
5	113	12	281		
6	89	13	233		
7	86	14	220		
MW(+/-SD)	100(12)		254(32)	2,54	P<0,001

Tabelle XIX: rRLX-3-Proteinkonzentration der einzelnen Tiere im rechten Ventrikel in Prozent vom WKY-Mittelwert:

Tier WKY	rRLX-3	Tier SHR	rRLX-3	WKY/SHR	p
1	95	8	126		
2	100	9	130		
3	95	10	130		
4	106	11	105		
5	106	12	105		
6	97	13	127		
7	101	14	95		
MW(+/-SD)	100(5)		117(15)	1,17	P=0,07

Tabelle XX: rRLX-3-Proteinkonzentration der einzelnen Tiere im linken Ventrikel in Prozent vom WKY-Mittelwert:

Tier WKY	rRLX-3	Tier SHR	rRLX-3	WKY/SHR	p
1	80	8	205		
2	79	9	221		
3	121	10	310		
4	113	11	297		
5	94	12	238		
6	117	13	190		
7	96	14	210		
MW(+/-SD)	100(17)		239(47)	2,39	P<0,001

Tabelle XXI: rRLX-3-Proteinkonzentration der einzelnen Tiere in der Pulmonalarterie in Prozent vom WKY-Mittelwert:

Tier WKY	rRLX-3	Tier SHR	rRLX-3	WKY/SHR	p
1	96	8	109		
2	94	9	95		
3	112	10	91		
4	104	11	82		
5	105	12	75		
6	90	13	90		
7	99	14	78		
MW(+/-SD)	100(8)		89(12)	0,89	P=0,053

Tabelle XXII: rRLX-3-Proteinkonzentration der einzelnen Tiere in der Aorta in Prozent vom WKY-Mittelwert:

Tier WKY	rRLX-3	Tier SHR	rRLX-3	WKY/SHR	p
1	110	8	144		
2	89	9	117		
3	108	10	104		
4	87	11	115		
5	105	12	103		
6	105	13	98		
7	96	14	144		
MW(+/-SD)	100(9)		118(19)	1,18	P=0,13

Tabelle XXIII: rRLX-3-Proteinkonzentration der einzelnen Tiere in der Lunge in Prozent vom WKY-Mittelwert:

Tier WKY	rRLX-3	Tier SHR	rRLX-3	WKY/SHR	p
1	100	8	107		
2	101	9	109		
3	104	10	97		
4	110	11	103		
5	89	12	110		
6	92	13	104		
7	104	14	97		
MW(+/-SD)	100(7)		104(5)	1,04	P=0,38

Tabelle XXIV: rRLX-3-Proteinkonzentration der einzelnen Tiere in den Nieren in Prozent vom WKY-Mittelwert:

Tier WKY	rRLX-3	Tier SHR	rRLX-3	WKY/SHR	p
1	107	8	105		
2	107	9	144		
3	89	10	88		
4	110	11	109		
5	94	12	139		
6	102	13	151		
7	91	14	133		
MW(+/-SD)	100(9)		124(24)	1,24	P=0,10

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bedanken bei Herrn Prof. Dr. med. K. Stangl und Herrn Prof. Dr. med. G. Baumann, die mir durch unermüdlichen Vertrauensvorschuss und fachlichen Rat Gutes taten, und mir erlaubten, in Ihrem Labor der 1. Medizinischen Klinik der Charité in der Ziegelstrasse in Berlin zu forschen.

Besonderer Dank gilt natürlich in erster Linie meinen unersetzlichen Helferinnen Wanda Michaelis und Cornelia Bartsch, die stets als liebe Sterne in dunklen Laborstunden leuchteten und unschätzbare Unterstützung leisteten. Sie sind die Schwalbennester unter dem Dachfirst vor meinem Fenster des Labors, und der einzige Grund, zu Bedauern, dass die Arbeit nun abgeschlossen ist.

Die sehr fruchtbare Zusammenarbeit mit allen Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors sei hier besonders erwähnt

Meinem Freund und Betreuer PD Dr. med. Thomas Dschietzig danke ich mit einem Bier an anderer Stelle. Am Rande sei aber erwähnt, dass die Betreuung der Arbeit durch ihn exzellent war. Ein Vergnügen sogar.

Tief verneige ich mich vor meinen Kindern Coco-Lina und Lester-Louis, die sich obschon ich im Labor ihre Kindheit verbrachte, von ganz alleine und ohne mein Zutun zu den prächtigsten Menschen entwickelt haben, die ich kenne. Ihrer Mutter sei für ihre Rolle in diesem wunderbaren und rätselhaften Prozess natürlich auch gedankt.

Meine Frau Pat Palma ist ganz generell wundervoll; es soll an dieser Stelle aber gesondert erwähnt werden, dass sie mich unermüdlich versuchte, in die Geheimnisse der Datenverarbeitung einzuführen. Vielen, vielen Dank dafür.

11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die hier vorliegende Arbeit von mir selbst ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die verwendeten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 15. Dezember 2007

12. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen enthält die online Version keinen Lebenslauf.