

**Gefäßprotektive Effekte von humanem rekombinantem  
Relaxin-2 im Atherosklerose-Mausmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Hannah Schatten

aus Aachen

2018

Angefertigt mit der Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. René Pascal Andrié

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Eicke Latz

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.07.2018

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II für Innere Medizin (Kardiologie,  
Angiologie, Pneumologie und Internistische Intensivmedizin)

Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

<b>1.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>9</b>
2.1.	Bedeutung der Atherosklerose .....	9
2.2.	Relaxin-2 – mehr als ein Schwangerschaftshormon .....	9
2.3.	Effekte von Relaxin-2 bei kardiovaskulären Erkrankungen.....	10
2.4.	Einfluss von Relaxin-2 auf die Entwicklung von Atherosklerose .....	11
2.4.1.	Endotheliale Dysfunktion .....	12
2.4.2.	Inflammation und oxidativer Stress .....	16
2.4.3.	Vaskuläres Remodeling, Plaqueprogression und -komposition .....	17
2.5.	Zielsetzung .....	20
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
3.1.	Tiere und Behandlungsprotokoll .....	21
3.2.	Metabolische Parameter .....	23
3.3.	Relaxin-2-Plasmakonzentrationen .....	24
3.4.	Endothelfunktion .....	25
3.5.	Beurteilung der Inflammation .....	28
3.6.	Oxidativer Stress <i>ex vivo</i> .....	28
3.7.	Oxidativer Stress <i>in vitro</i> .....	29
3.7.1.	Zellkultur und Stimulation der Zellen .....	29
3.7.2.	L-012-Chemilumineszenzassay .....	31
3.7.3.	DCF-Messung .....	32
3.8.	Progression und Komposition der atherosklerotischen Plaques .....	33

3.8.1.	Herstellung der Gewebeschnitte .....	33
3.8.2.	Ausdehnung und Läsionstyp der atherosklerotischen Plaques .....	33
3.8.2.1.	Ölrot-Färbung: Darstellung der atherosklerotischen Läsionen .....	33
3.8.3.	Komposition der atherosklerotischen Plaques.....	35
3.8.3.1.	Siriusrot-Färbung.....	35
3.8.3.2.	ASMAC-Färbung .....	37
3.8.3.3.	CD3-Färbung.....	38
3.8.3.4.	CD68-Färbung.....	39
3.8.3.5.	Ly6G-Färbung .....	40
3.9.	Genexpressionsanalyse.....	41
3.9.1.	RNA-Isolierung aus Aortenbögen.....	41
3.9.2.	Reverse Transkription von RNA in cDNA.....	42
3.9.3.	Real-time PCR .....	42
3.10.	Statistische Analyse.....	44
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
4.1.	Metabolische Parameter .....	45
4.2.	Relaxin-2-Plasmakonzentrationen .....	46
4.3.	Endothelfunktion .....	47
4.4.	Beurteilung der Inflammation .....	50
4.5.	Oxidativer Stress <i>ex vivo</i> .....	52
4.6.	Oxidativer Stress <i>in vitro</i> .....	53
4.6.1.	L-012 Chemilumineszenzassay.....	53

4.6.2.	DCF-Messung .....	55
4.7.	Progression und Komposition der atherosklerotischen Plaques .....	57
4.7.1.	Ausdehnung und Läsionstyp der atherosklerotischen Plaques .....	57
4.7.1.1.	Ölrot-Färbung: Darstellung der atherosklerotischen Läsionen .....	57
4.7.2.	Komposition der atherosklerotischen Plaques.....	62
4.7.2.1.	Siriusrot-Färbung.....	62
4.7.2.2.	ASMAC-Färbung .....	63
4.7.2.3.	CD3-Färbung.....	65
4.7.2.4.	CD68-Färbung.....	67
4.7.2.5.	Ly6G-Färbung .....	69
4.8.	Genexpressionsanalyse.....	70
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>72</b>
5.1.	Endotheliale Dysfunktion .....	73
5.2.	Inflammation und oxidativer Stress.....	75
5.3.	Progression und Komposition atherosklerotischer Plaques .....	77
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>79</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellen.....</b>	<b>81</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungen.....</b>	<b>82</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>84</b>
<b>10.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>93</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis

-/-	Knockout
µl	Mikroliter
8-OHdG	8-Hydroxydesoxyguanosin
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
ANP	atriales natriuretisches Peptid
<i>ApoE</i>	Apolipoprotein E
ASMAC	glattmuskuläres alpha-Aktin
AT1-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1a
bpm	Schläge pro Minute
BSA	bovines Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
COX-2	Cyclooxygenase-2
CuZnSOD	Kupfer/Zink-abhängige Superoxiddismutase
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCF	Dichlorodihydrofluorescein
dest.	destilliert
EDHF	endothelialer hyperpolarisierender Faktor
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ET-1	Endothelin-1
ET-3	Endothelin-3
ET <sub>A</sub> -Rezeptor	Endothelin-Rezeptor Typ A
ET <sub>B</sub> -Rezeptor	Endothelin-Rezeptor Typ B
fMLP	N-formyl-Met-Leu-Phe
g	Gramm
h	Stunden
HAoSMC	humane aortale glatte Muskelzellen
HCASMC	humane koronare arterielle glatte Muskelzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HUVEC	humane Endothelzellen der Nabelschnurvene
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KGW	Körpergewicht
LDL	Low Density Lipoprotein
M	molare Masse
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein 1
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MMP	Matrixmetalloproteinase
mN	Millinewton
MnSOD	Mangan-abhängige Superoxiddismutase
n	Stichprobenumfang
n.s.	nicht signifikant
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PECAM	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
PLC $\beta$	Phospholipase C $\beta$
RELAX-AHF	RELAXin in Acute Heart Failure
RLU/s	relative Lichteinheiten pro Sekunde
RLX	Relaxin-2
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

rpm	Umdrehungen pro Minute
RXFP 1	Relaxin/insulin-like family peptide receptor 1
RXFP 2	Relaxin/insulin-like family peptide receptor 2
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
THP-1	Tamm-Horsfall Protein 1
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen

## **2. Einleitung**

### **2.1. Bedeutung der Atherosklerose**

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen einen bedeutenden ökonomischen Faktor dar. In Europa besteht in 47 % der Todesfälle eine kardiovaskuläre Todesursache (CEBR, 2014). Es entstehen direkte Kosten im Gesundheitssystem sowie indirekte Kosten durch vorzeitige Morbidität und Mortalität. In Deutschland betragen die Kosten im Gesundheitssystem durch kardiovaskuläre Erkrankungen 2014 schätzungsweise 30,6 Milliarden €. Frühzeitige Morbidität (659 Millionen €) und Mortalität (6 Milliarden €) führten zu weiteren Kosten von 6,7 Milliarden € (CEBR, 2014). Vor dem Hintergrund der hohen Mortalität und Morbidität durch Folgeerkrankungen der Atherosklerose kommen Innovationen in den Therapiemöglichkeiten aus medizinischer, gesellschaftlicher und wirtschaftlicher Sicht eine große Bedeutung zu.

Bisherige Therapiemöglichkeiten fokussieren sich auf die Behandlung von arterieller Hypertonie, Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie und die Vermeidung thrombotischer Komplikationen durch Kontrolle der Blutgerinnung (Luisi, 2000; Weber und Noels, 2011). Ein möglicher neuer Therapieansatz ist Relaxin-2, das über verschiedene Signalwege direkt auf Ebene der Gefäße wirkt.

### **2.2. Relaxin-2 – mehr als ein Schwangerschaftshormon**

Relaxin-2 wurde zunächst als Schwangerschaftshormon bekannt, das bei Frauen im Corpus luteum produziert wird. Das experimentell verwendete Serelaxin ist die rekombinante Form des natürlich vorkommenden Peptidhormons Relaxin-2. Im Folgenden wird es ebenfalls als Relaxin-2 bezeichnet. Relaxin-2 bewirkt systemische hämodynamische und renale Anpassungsvorgänge während der Schwangerschaft. Mit Anstieg der Relaxin-2-Plasmaspiegel im ersten Trimenon erhöht sich die globale arterielle Compliance und der systemische Gefäßwiderstand sinkt (Du et al., 2010; Teichman et al., 2009). Relaxin-2 fungiert als renaler und systemischer Vasodilatator und erhöht das Herzzeitvolumen (Leo et al., 2014). Darüber hinaus besitzt es eine parakrine und autokrine Funktion (Du et al., 2010; Teichman et al., 2009). Seine Effekte vermittelt Relaxin-2 über zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Relaxin-Rezeptor 1 und 2 (RXFP 1 und 2) (Hsu et al., 2002; Teichman et al., 2009). Relaxin-2 bindet bevorzugt an RXFP 1 (Diez und

Ruilope, 2016). RXFP 2 zeigt eine etwa zehnfach verminderte Affinität zu Relaxin-2. Seine Verteilung und die angeschlossenen Signalwege scheinen jedoch ähnlich zu sein (Teichman et al., 2009). RXFP 1 findet sich sowohl auf glatten Gefäßmuskelzellen als auch auf Endothelzellen. Die Verteilung ist abhängig vom Gefäßtyp (Jelinic et al., 2014). Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgt durch zirkulierendes oder in unmittelbarer Umgebung produziertes Relaxin-2 (Du et al., 2010).

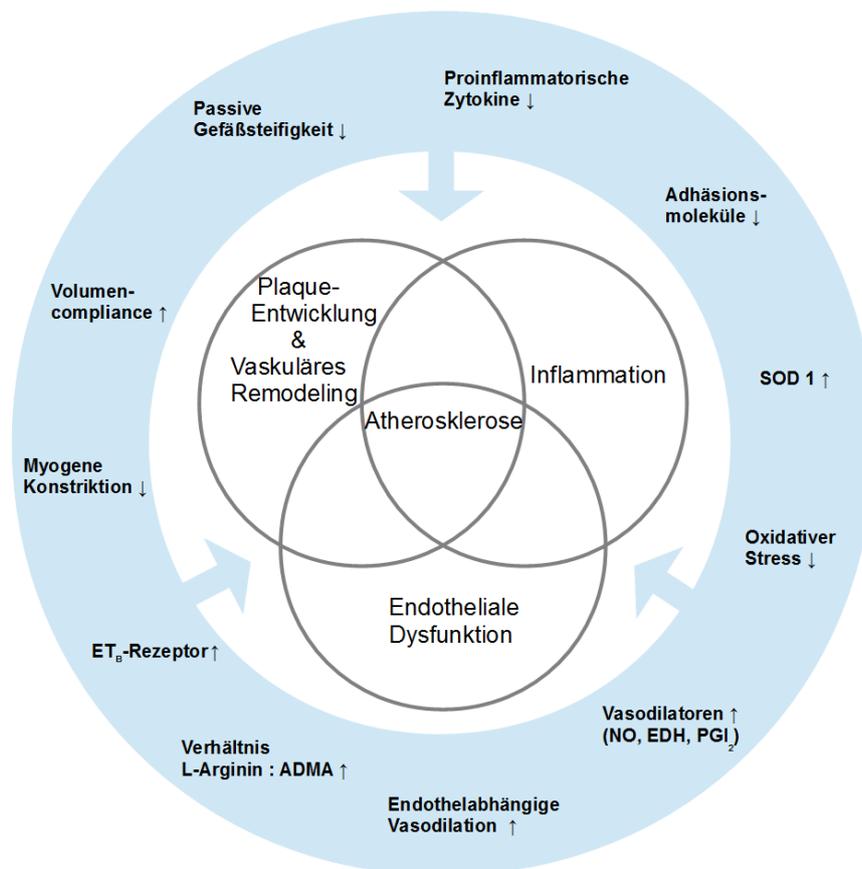
### **2.3. Effekte von Relaxin-2 bei kardiovaskulären Erkrankungen**

In der Behandlung von Patienten mit akutem Herzversagen konnten bereits signifikante Effekte von Relaxin-2 nachgewiesen werden. In der doppelt-verblindeten placebo-kontrollierten RELAX-AHF Studie wurden Patienten, die mit akutem Herzversagen hospitalisiert wurden, innerhalb von sechzehn Stunden mit einer 48-stündigen Relaxin-Infusion behandelt. Innerhalb der ersten fünf Tage verbesserte sich die angegebene Dyspnoe und es zeigte sich eine signifikante Reduktion des Bedarfes an intravenösen Diuretika und vasoaktiven Medikamenten sowie der Zeichen kardial bedingter Stauung (Teerlink et al., 2013). Eine geringere Organschädigung unter Relaxin-2-Therapie zeigte sich durch Analyse kardialer, renaler und hepatischer Biomarker. Diese kurzzeitigen Effekte sind mit einer verminderten Langzeit-Mortalität des akuten Herzversagens verbunden (Metra et al., 2013; Teerlink et al., 2013). Die Länge des initialen Krankenhausaufenthaltes und der Behandlung auf Intensivstation wurden signifikant verkürzt. Die RELAX-AHF Studie zeigte außerdem eine signifikante Reduktion der Mortalität während des Krankenhausaufenthalts um 27 % und der 180-Tage Mortalität um 37 % (prospektiver Sicherheitsendpunkt) (Teerlink et al., 2013). In der anschließenden Phase-III-Studie RELAX-AHF-2 wurde der „kardiovaskuläre Tod in den ersten 180 Tagen“ und die „Verschlechterung der Herzinsuffizienz während der ersten fünf Tage“ bei Patienten mit akutem Herzversagen als primärer Endpunkte definiert. Der klinische Nutzen einer zusätzlichen Behandlung mit Relaxin-2 bei Patienten mit akutem Herzversagen konnte hier nicht belegt werden (Novartis International AG, 2017).

## 2.4. Einfluss von Relaxin-2 auf die Entwicklung von Atherosklerose

Relaxin-2 beeinflusst den Verlauf eines akuten Herzversagens über verschiedene Mechanismen. Einige dieser Mechanismen sind von großer Bedeutung bei der Entstehung der Atherosklerose. Bisherige Studien belegten bereits einen positiven Einfluss von Relaxin-2 auf endotheliale Dysfunktion (Dschietzig et al., 2012), iNOS-Expression, eNOS-Aktivität (Bani et al., 1998; Dschietzig et al., 2012; Leo et al., 2014), oxidativen Stress (Sasser et al., 2014) und Inflammation (Brecht et al., 2011; Teichman et al., 2010).

Endotheliale Dysfunktion, Inflammation sowie vaskuläres Remodeling und Plaque-Progression sind maßgebliche Faktoren bei Initiierung und Fortschreiten von Atherosklerose. Abb. 1 zeigt, basierend auf aktuellen Forschungsarbeiten, potentielle Wirkungsmechanismen des Hormons Relaxin-2 auf diese drei Elemente.



**Abb. 1:** Maßgebliche Faktoren bei der Initiierung und dem Fortschreiten der Atherosklerose und potentielle Wirkungsmechanismen des Hormons Relaxin-2. Zugrunde liegen sämtliche in der Einleitung erwähnten Arbeiten. Graphik adaptiert nach (Kofler et al., 2005).

Im Folgenden wird der aktuelle Stand der Forschung zu Relaxin-2 präsentiert. Die Ergebnisse legen nahe, dass Relaxin-2 der Entstehung und dem Fortschreiten von Atherosklerose entgegenwirken kann. Auf dieser Grundlage basiert die Hypothese, Relaxin-2 könnte als Medikament gegen Atherosklerose und auf Atherosklerose beruhende Krankheiten eingesetzt werden.

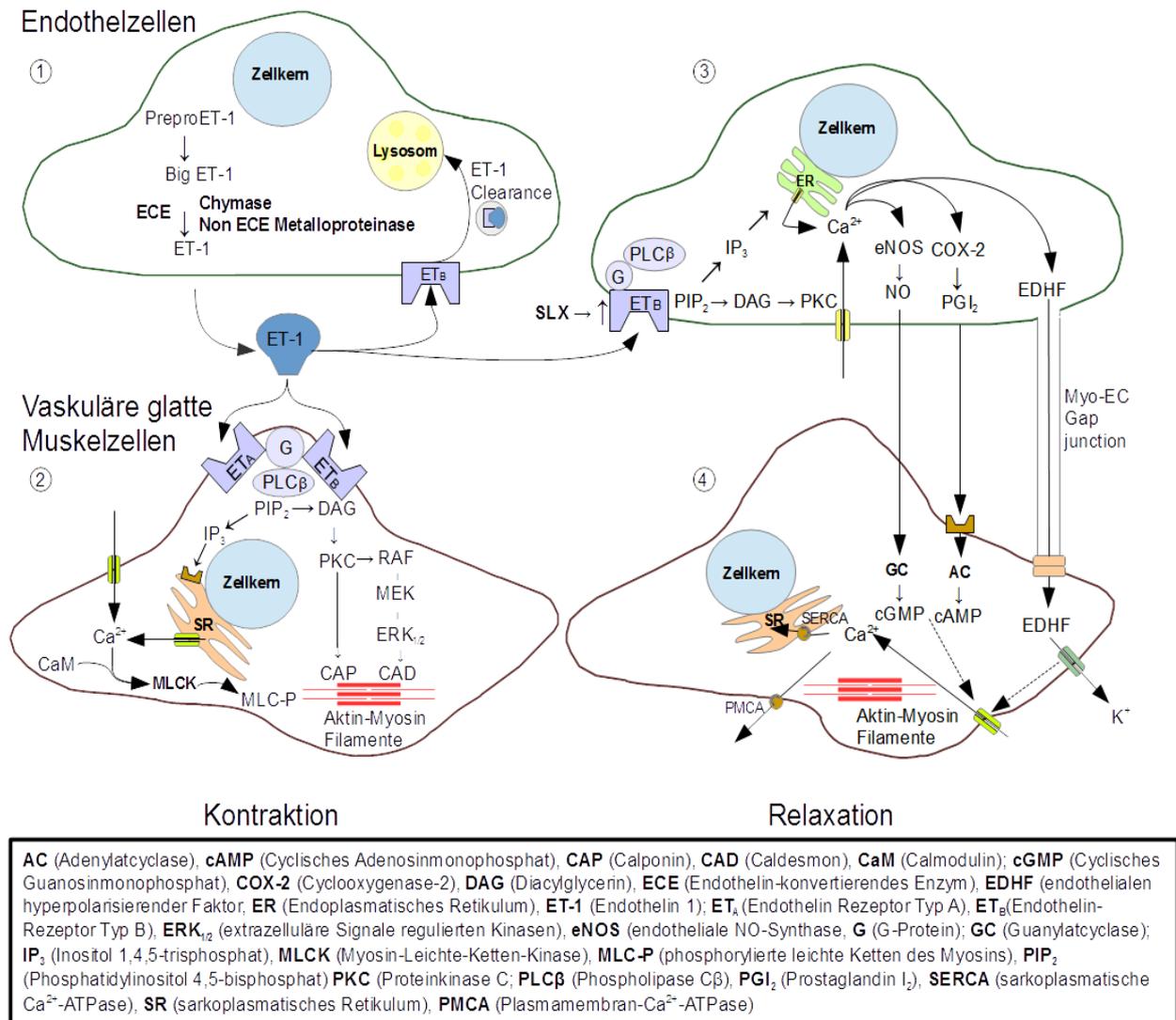
#### 2.4.1. Endotheliale Dysfunktion

Endotheliale Dysfunktion ist eine Hauptkomponente und ein frühes Anzeichen für die Entwicklung von Atherosklerose. Intaktes Endothel vermag die physiologische vaskuläre Funktion zu regulieren. Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger Indikator für vaskuläre Gesundheit. Die Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasodilatation ist charakteristisch für endotheliale Dysfunktion und wird vor allem über NO vermittelt. Über Stickstoffmonoxid vermittelt intaktes Endothel darüber hinaus fibrinolytische, antithrombotische, antiinflammatorische und antiproliferative Effekte (Davignon und Ganz, 2004; Osto et al., 2007). Relaxin-2 vermag die Endothelfunktion zu verbessern. Kürzlich demonstrierten Pini et al. (2016) die protektive Wirkung von Relaxin-2 *ex vivo* bei der Entstehung von endothelialer Dysfunktion, aortalen Remodelings und Herabregulierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durch Zigarettenrauch. Die Relaxin-2-Behandlung der Meerschweinchen über osmotische Pumpen, sowie die Exposition gegenüber dem Zigarettenrauch erfolgte hier über acht Wochen (Pini et al., 2016). Weiterhin demonstrierten auch Leo et al. (2014) eine signifikant verbesserte endothelabhängige Vasodilatation nach Injektion von Relaxin-2 an Ratten (Leo et al., 2014).

Die vermittelnden Mechanismen der Vasodilatation durch Relaxin-2 sind zeitabhängig. Es sind kurzfristige Mechanismen und langfristige — bei denen Relaxin-2 nicht mehr im Blut nachweisbar ist — zu unterscheiden (Diez und Ruilope, 2016).

Kurzfristig erhöht sich die Sensitivität gegenüber dem endothelabhängigen Agonist Bradykinin und führt zur Vasodilatation. Drei Stunden nach Relaxin-2-Infusion konnte dieser Effekt in mesenterialen Arterien demonstriert werden. Weiterhin zeigte sich die Aktivität der NO-Synthase erhöht (Leo et al., 2014).

Kurzfristige Vasodilatation vermittelt Relaxin-2 weiterhin durch Antagonisierung der vasoconstrktorischen Wirkungen von Angiotensin II und Endothelin-1 (ET-1) (Dschietzig et al., 2003; Teichman et al., 2009).



**Abb. 2:** Signalwege der Endothelin-Rezeptoren Typ A und Typ B im vaskulären System  
 (1) ET-1 wird von den Endothelzellen freigesetzt und kann den Endothelin-Rezeptor Typ A (ET<sub>A</sub>-Rezeptor) und Typ B (ET<sub>B</sub>-Rezeptor) aktivieren. Die Internalisierung von ET-1/ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Komplexen führt zur Clearance von ET-1 aus dem Kreislauf.  
 (2) Durch Aktivierung der ET<sub>B</sub>-Rezeptoren auf vaskulären glatten Muskelzellen kommt es zur Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und der Sensitivität der Myofilamente für Ca<sup>2+</sup> mit folgender Kontraktion.  
 (3) Aktivierung des ET<sub>B</sub>-Rezeptors auf Endothelzellen führt zur Vasodilatation durch Relaxation der glatten Muskelzellen. Dies geschieht über Aktivierung der PLCβ. Das Produkt IP<sub>3</sub> führt zur Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem endoplasmatischen Retikulum. Die erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Konzentration aktiviert die eNOS und die COX-2. Außerdem gelangt EDHF aus den Endothelzellen in die glatten Muskelzellen.

(4) Das freigesetzte NO diffundiert in die vaskulären glatten Muskelzellen und stimuliert die Guanylatcyclase. PGI<sub>2</sub> führt in den vaskulären glatten Muskelzellen zur Aktivierung der Adenylatcyclase. Die resultierenden erhöhten cGMP/cAMP-Konzentrationen bewirken einen verminderten Einstrom und eine verstärkte Entfernung von Ca<sup>2+</sup> aus der Zelle. Außerdem wird die Sensitivität der Myofilamente für Ca<sup>2+</sup> verringert und führt zur Relaxation. Durch EDHFs werden in den vaskulären glatten Muskelzellen K<sup>+</sup>-Kanäle aktiviert und die Hyperpolarisation führt zur Vasodilatation.

Adaptiert nach (Mazzuca und Khalil, 2012) und ergänzt nach (Bremnes et al., 2000; Dschietzig et al., 2003; Galie, 2004; Oksche et al., 2000).

Langfristig vermittelt Relaxin-2 seine vasodilatatorische Wirkung über verschiedene Mechanismen. Relaxin-2 verstärkt die endothelabhängige durch Bradykinin hervorgerufene PGI<sub>2</sub>-vermittelte Vasodilatation 24 Stunden nach Relaxin-2-Infusion, wenn Relaxin-2 schon nicht mehr im Blut nachweisbar ist (Leo et al., 2014). Außerdem steigert es die Expression der iNOS (Leo et al., 2014) und führt zu einer erhöhten Aktivität der endothelialen NO-Synthase über den PI3K/Akt-Signalweg und Phosphorylierung der eNOS an Ser1177 (Dschietzig et al., 2012; Leo et al., 2014) und an Ser633 (Dschietzig et al., 2012).

Weiterhin vermittelt Relaxin-2 seine vasodilatatorischen Effekte über eine erhöhte Expression von Endothelin-Rezeptor Typ B (ET<sub>B</sub>-Rezeptor) (Dschietzig et al., 2003). Die vermittelnden Signalwege sind in Abb. 2 dargestellt und beschrieben.

Endothelin-Rezeptor Typ B ist vor allem auf Endothelzellen vorhanden (Mazzuca und Khalil, 2012). An HeLa-Zellen und humanen Endothelzellen konnte eine erhöhte Expression des ET<sub>B</sub>-Rezeptors nach Inkubation mit Relaxin-2 festgestellt werden (Dschietzig et al., 2009; Dschietzig et al., 2003; Sarwar et al., 2015). Die Aktivierung der ET<sub>B</sub>-Rezeptoren auf Endothelzellen führt unter anderem über eine lokal erhöhte Freisetzung von NO, Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) und endothelialen hyperpolarisierenden Faktor (endothelium-derived hyperpolarizing factor; EDHF) zur Vasodilatation (Kong et al., 2010; Mazzuca und Khalil, 2012).

In humanen vaskulären glatten Muskelzellen führt die Aktivierung des ET<sub>B</sub>-Rezeptors zur Kontraktion. (Dschietzig et al., 2003; Mazzuca und Khalil, 2012). In vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) wird jedoch keine Hochregulierung des ET<sub>B</sub>-Rezeptors durch Relaxin-2 beobachtet (Dschietzig et al., 2003).

Weiterhin sorgt der ET<sub>B</sub>-Rezeptor der Endothelzellen für die Clearance von ET-1 aus dem Kreislauf (Dschietzig et al., 2003; Bagnall et al., 2006; Mazzuca und Khalil, 2012). Der ET-1/ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Komplex wird internalisiert, zum Lysosom transportiert und dort abgebaut (Bremnes et al., 2000; Oksche et al., 2000). Dadurch sinkt das im Kreislauf verfügbare ET-1 (Dschietzig et al., 2003; Mazzuca und Khalil, 2012; Galie, 2004; Bremnes et al., 2000).

In einem Modell der Durchflussskammer wurde, durch die Imitation der hämodynamischen Zustände eines Linksherzversagens, die Sekretion von ET-1 in pulmonal-arteriellen Endothelzellen stimuliert. Dies konnte durch eine Relaxin-2-Behandlung verhindert werden (Dschietzig et al., 2001). Durch Vorbehandlung von Aorten, mesenterialen Arterien und renalen Arterien von Ratten mit Relaxin-2 konnte die maximale Kontraktion als Reaktion auf ET-1 signifikant gesenkt werden. Der vasodilatatorische Effekt des ET<sub>B</sub>-selektiven Agonist Endothelin-3 (ET-3) wurde durch die Vorbehandlung mit Relaxin-2 signifikant verstärkt (Dschietzig et al., 2003). Conrad und Novak führen dies auf eine Hochregulation des ET<sub>B</sub>-Rezeptors durch Relaxin-2 zurück. Dies führt zur einer Verstärkung der vasodilatatorischen Effekte von ET-3 über den ET<sub>B</sub>-Rezeptor, während die vasokonstriktorische Wirkung von ET-1 vermindert wird (Conrad und Novak, 2004).

Eine weitere entscheidende Komponente, die die NO-Produktion beeinflusst, ist das Verhältnis des Substrates der NO-Synthase, L-Arginin, zu dem endogene NOS Inhibitor asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) (Sasser et al., 2014). ADMA wird als neuer Risikomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen in Erwägung gezogen (Sibal et al., 2010). Eine Assoziation zwischen erhöhten ADMA-Konzentrationen und kardiovaskulären Ereignissen bis hin zum kardiovaskulär bedingten Tod ist bereits belegt (Schnabel et al., 2005). Relaxin-2 vermochte das durch Angiotensin II gestörte Verhältnis im Plasma von Ratten mit Angiotensin II-induzierter Hypertonie wiederherzustellen (Sasser et al., 2014).

Die myogene Konstriktion kleiner Arterien wird durch Relaxin-2-Behandlung abgeschwächt. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei die Matrixmetalloproteinase (MMP) 2 und 9, der endothelialer ET<sub>B</sub>-Rezeptor, die NOS und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF). Die Synthese von VEGF wird durch Relaxin in verschiedenen Geweben stimuliert. Die genaue Lokalisation von VEGF im vasodilatatorischen Signalweg

von Relaxin ist noch nicht bekannt. Durch Neutralisierung von VEGF durch spezifische Antikörper bzw. durch Zugabe eines VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitors konnte die Wirkung von Relaxin-2 jedoch aufgehoben werden und so die Involvierung von VEGF belegt werden (McGuane et al., 2011).

#### 2.4.2. Inflammation und oxidativer Stress

Inflammation ist ein weiterer maßgeblicher Faktor bei der Entwicklung von Atherosklerose. Relaxin-2 wirkt antiinflammatorisch, unter anderem durch eine signifikant verringerte Freisetzung von IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  durch THP-1 Zellen (Tamm-Horsfall Protein 1) als Reaktion auf Endotoxine. Die THP-1 Zellen sind abgeleitet von einer Zelllinie der akuten monozytären Leukämie. Die antiinflammatorischen Effekte wurden hier durch die agonistische Wirkung von Relaxin-2 am Glukokortikoidrezeptor vermittelt (Dschietzig et al., 2004; Dschietzig et al., 2009). Weiterhin vermindert Relaxin die Histaminfreisetzung durch Mastzellen in einem Meerschweinchen-Modell (Bani et al., 1997; Teichman et al., 2010). Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Ausschüttung von zytoplasmatischer Granula durch N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) wird durch Präinkubation mit Schweine-Relaxin signifikant reduziert. Außerdem verringert Relaxin-2 die chemotaktische Migration von neutrophilen Granulozyten (Masini et al., 2004). Relaxin attenuierte die TNF- $\alpha$ -vermittelte verringerte eNOS-Aktivität, Superoxid-Bildung und Suppression der Superoxiddismutase 1 (SOD1) (Dschietzig et al., 2012).

Die Bedeutung von vaskulären Adhäsionsmolekülen und Chemokinen für Entwicklung und weiteres Fortschreiten von Atherosklerose wurde bereits umfangreich beschrieben (Boring et al., 1998; Galkina und Ley, 2007; Kumar et al., 2013; Namiki et al., 2002; Rudijanto, 2007). Relaxin-2 vermag schon diese ersten Schritte vaskulärer Inflammation zu durchbrechen. In einer *in-vitro*-Studie zeigte Relaxin-2 die Fähigkeit TNF- $\alpha$ -induzierte MCP-1- (Monozyten-chemotaktisches Protein 1) und VCAM-1- (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1) Expression in humanen aortalen glatten Muskelzellen (HAoSMC) und humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) zu verringern. Dies macht den Einfluss von Relaxin-2 auf die Monozytenaktivierung und -adhäsion am Endothel deutlich. In HUVECs zeigte sich auch eine Verringerung der TNF- $\alpha$ -induzierten PECAM-Expression (Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül) und somit die

Fähigkeit von Relaxin-2 die Diapedese der Monozyten zu vermindern (Brecht et al., 2011).

Eng verknüpft mit chronischer Inflammation in atherosklerotischen Läsionen ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Im Wechselspiel beeinflussen und verstärken oxidativer Stress und Inflammation die Bildung und das Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen (Hajjar und Gotto, JR, 2013; Husain et al., 2015). Relaxin-2 ist in der Lage oxidativen Stress zu reduzieren.

Relaxin-2 konnte die durch Angiotensin II-induzierte, gesteigerte Aktivität der Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) und Lipid-peroxidation verringern (Sasser et al., 2014). Masini et al. (2004) demonstrierten Relaxin-2s Fähigkeit, die Bildung des freien Radikal  $O_2^-$  durch neutrophile Granulozyten zu vermindern (Masini et al., 2004). Bei der Analyse des Einflusses von Relaxin-2 auf Ischämie/Reperfusionsschäden der Niere wurde festgestellt, dass die Konzentration von 8-OHdG (8-Hydroxydesoxyguanosin), einem Marker der DNA-Schädigung durch freie Radikale, signifikant verringert wird. Weiterhin zeigten mit Relaxin-2 behandelte Mäuse eine Steigerung der Expression und Aktivität der endogenen antioxidativen Enzyme Mangan-abhängige Superoxiddismutase (MnSOD) und Kupfer/Zink-abhängige Superoxiddismutase (CuZnSOD) (Collino et al., 2013). Relaxin-2 vermochte auch, durch Extrakte aus Zigarettenrauch induzierten oxidativen Stress in aortalen Endothelzellen von Meer-schweinchen *in vitro* zu reduzieren (Pini et al., 2016).

#### 2.4.3. Vaskuläres Remodeling, Plaqueprogression und -komposition

Bei der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen unterliegen die betroffenen Gefäße Umbauprozessen, dem vaskulären Remodeling. Man nimmt an, dass initial eine Verletzung des Endothels vorliegt, einhergehend mit endothelialer Dysfunktion mit gesteigerter Permeabilität und Leukozytenadhäsion. Monozyten gelangen durch das Endothel in die Intima, entwickeln sich zu Makrophagen und bilden durch Aufnahme von Lipoproteinen Schaumzellen. Durch Apoptose von Schaumzellen entsteht der lipidgefüllte nekrotische Kern der Läsion. Glatte Muskelzellen aus der Media oder zirkulierende Vorläuferzellen wandern in die Intima, proliferieren, produzieren extrazelluläre Matrix und tragen zur Größenzunahme der Läsion bei (Kumar et al., 2013; Lusis, 2000; Rudijanto, 2007).

Der Einfluss einer Behandlung mit Relaxin-2 auf Plaqueprogression und -komposition wurden in der vorliegenden Studie erstmals untersucht. Die Stabilität der atherosklerotischen Plaques hängt vor allem von der Zusammensetzung, der Infiltration durch Immunzellen und dem Grad der Inflammation ab. Zur Ruptur neigende Plaques zeichnen sich durch hochgradige Infiltration durch Makrophagen und T-Lymphozyten, großen nekrotischen Kern und dünne fibröse Kappe mit geringem Anteil an glatten Muskelzellen und extrazelluläre Matrix aus (Rudijanto, 2007; Silvestre-Roig et al., 2014). Im Gegensatz dazu tragen glatte Muskelzellen in stabilen Plaques durch Produktion von extrazellulärer Matrix, unter anderem Kollagen und Elastin, zur Verdickung und Stabilisierung der fibrösen Kappe bei (Silvestre-Roig et al., 2014).

Verknüpft mit Atherosklerose ist die arterielle Gefäßsteifigkeit (van Popele et al., 2001; Yambe et al., 2004). Der Einfluss von Relaxin-2 auf vaskuläres Remodeling und arterielle Steifigkeit ist gegenwärtig ein umstrittenes Thema (Debrah et al., 2011; Jelinic et al., 2014; Xu et al., 2010). In spontan hypertensiven Ratten konnten Zeichen des vaskulären Remodelings der Aorta durch Relaxin-2-Behandlung teilweise aufgehoben werden. Ohne Relaxin-2-Behandlung bestanden ein erhöhter Aortendurchmesser, eine vergrößerte Fläche des Gefäßquerschnitts und ein erhöhter Kollagengehalt. Die Dichte vaskulärer glatter Muskelzellen und der Elastingehalt der Media waren ohne Relaxin-2-Behandlung geringer. Durch die Relaxin-2-Behandlung konnten weiterhin die globale arterielle Compliance und die Compliance der A. carotis verbessert werden (Xu et al., 2010). Im Gegensatz dazu konnte in mesenterialen und femoralen Arterien von Ratten keine Veränderung in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix bezüglich Kollagen- und Elastingehalt festgestellt werden. In thorakalen Aorten ließ sich eine Verringerung des Kollagengehalts feststellen, diese war jedoch nicht signifikant. Äußerer und innerer Durchmesser, sowie Wanddicke von mesenterialen und femoralen Arterien blieben ebenfalls unbeeinflusst. Dennoch konnte die passive Gefäßsteifigkeit und Volumencompliance von mesenterialen Arterien durch Relaxin-2-Behandlung signifikant verbessert werden (Jelinic et al., 2014). Protektive Wirkung zeigte Relaxin-2 in einer Studie durch Pini et al. (2016) an Meerschweinchen. Durch Zigarettenrauch induzierter Verlust der Endothelzellen, Wandverdickung und strukturelle Veränderungen der Tunica media konnten hier durch Relaxin-2-Behandlung fast komplett verhindert werden (Pini et al., 2016).

Als weiterer potentieller Mediator der Wirkungen von Relaxin-2 mag das atriale natriuretische Peptid (ANP) dienen, dessen Sekretion in isolierten Rattenherzen durch Relaxin-2 stimuliert wird (Toth et al., 1996). ANP verhindert erwiesenermaßen die durch Thrombin hervorgerufene Permeabilitätssteigerung humaner aortaler Endothelzellen. Diese Steigerung der Permeabilität erleichtert unter anderem den Übertritt von Low Density Lipoprotein (LDL) über die endotheliale Barriere und fördert somit die Entstehung atherosklerotischer Plaques. Die Hemmung des Abbaus von ANP durch den Neprilysin- und Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmer Omapatrilat reduzierte hier weiterhin signifikant die Fläche atherosklerotischer Plaques und Durchlässigkeit des Endothel *ex vivo* in weißen Neuseeland-Kaninchen (Ichiki et al., 2013).

Die dargestellten Studien zeigen die Wirkung von Relaxin-2 auf grundlegende Faktoren der Initiierung und des Fortschreitens von Atherosklerose auf und untermauern die Hypothese, Relaxin-2 könnte als Medikament gegen Atherosklerose und auf Atherosklerose beruhende Krankheiten eingesetzt werden.

## 2.5. Zielsetzung

Ziel der hier präsentierten Studie war es, den Effekt von Relaxin-2 auf die Bildung atherosklerotischer Läsionen zu ermitteln. Anhand einer erstmals durchgeführten *ex vivo*-Studie, ergänzt durch *in vitro*-Experimente im humanen Zellmodell, wurden therapeutische Effekte von Relaxin-2 evaluiert.

Für die Untersuchungen wählten wir das *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mausmodell, welches sich durch die spontane Entwicklung von Hypercholesterinämie, endothelialer Dysfunktion und atherosklerotischer Läsionen auf Grund des genetischen Knockouts der Mäuse besonders gut eignet (Davignon, 2005; d'Uscio et al., 2001; Meir und Leitersdorf, 2004; Meyrelles et al., 2011).

Mittels histologischer und immunhistologischer Färbungen wurde Größe und Zusammensetzung atherosklerotischer Plaques untersucht. Durch Genexpressionsanalysen, Beurteilung der Inflammation und Messung der Endothelfunktion analysierten wir die regulierenden Mechanismen. Der Einfluss von Relaxin-2 auf oxidativen Stress wurde sowohl an diesem *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mausmodell, sowie *in vitro* an humanen koronaren arteriellen glatten Muskelzellen (HCASMCs) durchgeführt.

### 3. Material und Methoden

Im Folgenden Kapitel wird dargestellt, welche Materialien und Methoden in den Versuchen dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

#### 3.1. Tiere und Behandlungsprotokoll

##### Materialien

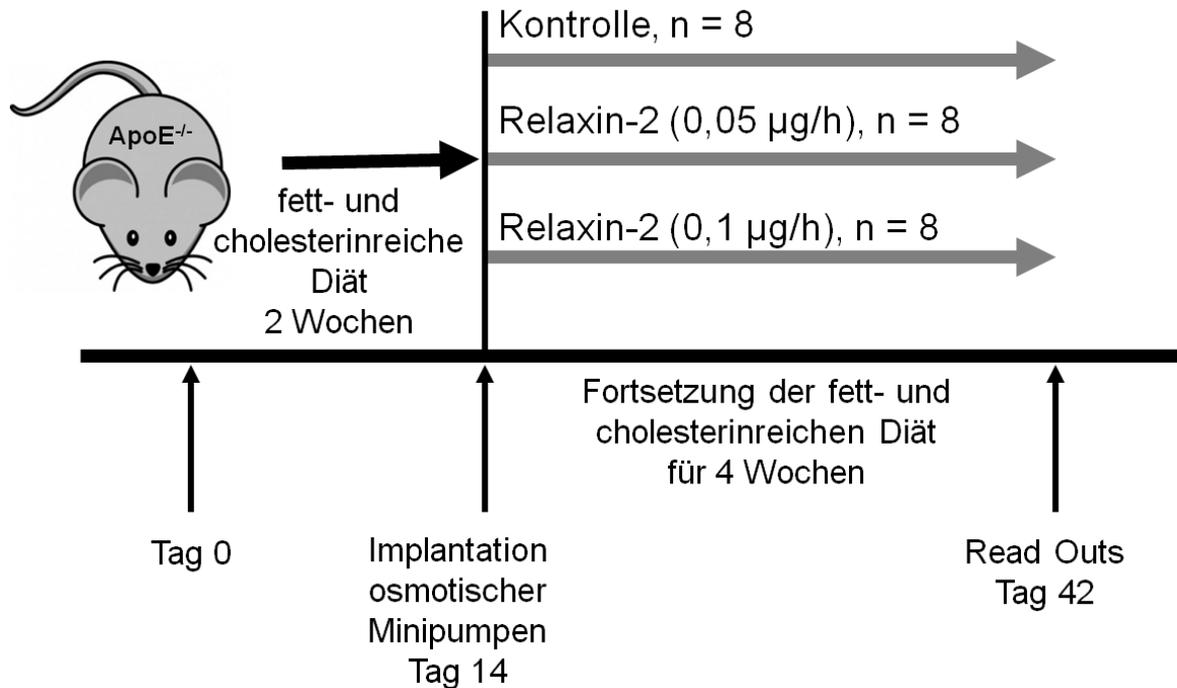
- Futterpellets (SM R/M-H, 10 mm, 20,85 % Rohfett, 19,5 % Casein, 1,25 % Cholesterin) (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland)
- Osmotische Pumpen: Alzet Micro-osmotic pump Model 1004 (Durect Corporation, Cupertino, Kanada)
- Serelaxin (RLX030, Novartis, Basel, Schweiz)
- Natriumacetat, wasserfrei (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Xylazin 2 % (Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland)
- Ketamin 10 % (MEDISTAR Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg, Deutschland)
- Isotonische Kochsalzlösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. H., Deutschland)
- Novaminsulfon-ratiopharm 500 mg/ml Tropfen (ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland)

##### Durchführung

Die Haltung der Apolipoprotein-E-defizienten (*ApoE*<sup>-/-</sup>, genetischer Hintergrund: C57BL/6J, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) sechs bis acht Wochen alten, weiblichen Mäuse erfolgte unter Standardbedingungen in Plexiglaskäfigen bei 22 °C und einem zwölf Stunden dauernden Hell-Dunkel Zyklus. Das Behandlungsprotokoll ist in Abb. 3 dargestellt.

Die Tiere erhielten eine fettreiche Diät (20,9 % Fett) mit 19,5 % Casein und 1,25 % Cholesterin für eine Zeitspanne von sechs Wochen. Wasser und Futterpellets standen ad libitum zur Verfügung. Nach zwei Wochen wurden den Mäusen subkutan hinter dem Schulterblatt osmotische Minipumpen mit einer Pumprate von 0,11 µl/h implantiert. Die Implantation erfolgte unter Xylazin und Ketamin (1 ml Ketamin, 0,8 ml Xylazin, 8,2 ml

isotonische Kochsalzlösung) adaptiert an das Körpergewicht (KGW) in einer Dosis von  $200 \mu\text{l} / 20 \text{ g KGW} + 0,1 \mu\text{l/g KGW}$ . Postoperativ erhielten die Tiere über fünf Tage N-vaminsulfon in einer Dosis von 25 Tropfen pro 250 ml im Trinkwasser.



**Abb. 3:** Behandlungsprotokoll: Vierundzwanzig weibliche, sechs bis acht Wochen alte ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden zwei Wochen lang mit einer fett- und cholesterinreichen Diät ernährt. Zufällig erfolgte dann die Aufteilung der vierundzwanzig Mäuse in drei Gruppen zu je acht Mäusen (n = 8). Zwei Gruppen erhielten eine kontinuierliche Zufuhr von Relaxin-2 über subkutan implantierte osmotische Minipumpen. Die Konzentrationen betragen 0,1 µg/h bzw. 0,05 µg/h. Eine dritte Gruppe diente als Kontrollgruppe und erhielt ausschließlich Natriumacetat-Lösung, das verwendete Lösungsmittel für Relaxin-2. Modifiziert nach (Tiyerili et al., 2016).

Über die Pumpen wurden zwei Gruppen von Mäusen kontinuierlich Serelaxin, die rekombinante Form des Peptidhormons Relaxin-2 (RLX), in einer höheren Dosis (0,1 µg/h) bzw. in einer niedrigeren Dosis (0,05 µg/h) appliziert. Eine dritte Gruppe diente als Kontrollgruppe und erhielt ausschließlich die als Lösungsmittel für Relaxin-2 verwendete Natriumacetat-Lösung (pH 5; 19,7 mM, gelöst in Ampuwa). Die Aufteilung in die drei verschiedenen Gruppen, bestehend aus jeweils acht Mäusen, erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Die korrekte Funktion der Pumpe wurde durch Bestimmung der Relaxin-2-Konzentration im Blutplasma überprüft. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation

getötet und Gewebeproben und Blut wurden entnommen.

Alle Tierexperimente wurden nach Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV) in Recklinghausen durchgeführt (Aktenzeichen: 84-02.04.2014.A159).

### **3.2. Metabolische Parameter**

#### Materialien

- EDV Tail-Cuff System (Coda 6, Kent Torrington, CT, USA)
- Präparierbesteck
- Elektronische Waage EW3000-2M (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland)
- Accu-Chek® Sensor (Roche, Mannheim, Deutschland)
- 1 ml Spritzen
- Heparin-Natrium-25000-ratiopharm® (ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland)

#### Durchführung

Um die Vergleichbarkeit der Mäuse sicherzustellen, die innerhalb des Versuches eine unterschiedliche Behandlung erfuhren, wurden Blutdruck, Herzfrequenz, Körpergewicht, Nüchtern-Blutzucker und Plasma-Cholesterin gemessen.

Blutdruck und Herzfrequenz wurden mit Hilfe des EDV Tail-Cuff Systems gemessen. Die Messungen wurden vor Beginn der fett- und cholesterinreichen Diät und in der letzten Woche der Behandlung durchgeführt. Die Messung erfolgte an wachen Mäusen und auf vorgewärmter Unterlage. Der Blutdruck wurde zunächst an sechs Tagen zur Gewöhnung an das Verfahren gemessen. Schließlich erfolgte die eigentliche Messung an drei Tagen.

In den letzten beiden Behandlungswochen fand die zweite Reihe der Blutdruckmessung statt. Hier wurde an fünf Tagen zur Gewöhnung an das Verfahren gemessen und dann folgten die eigentlichen Messungen an fünf Tagen.

Zur Auswertung wurde zunächst für jeden Messtag und jede Maus der Mittelwert der systolischen bzw. diastolischen Messwerte gebildet. Aus den erhaltenen Werten wurde

der Mittelwert für jede der drei Gruppen über die jeweiligen Mäuse der Gruppe und Tage der Messung ermittelt und zum Vergleich herangezogen.

Das Körpergewicht wurde vor Beginn der fett- und cholesterinreichen Diät und dann wöchentlich mit Hilfe einer elektronischen Waage gemessen.

Der Blutzucker wurde am Ende der Versuchsdurchführung mit Hilfe eines Accu-Chek® Sensors im Vollblut der nüchternen Mäuse bestimmt.

Es wurde Blut aus der Vena cava inferior entnommen. Die Spritze zur Entnahme des Blutes wurde zuvor mit Heparin gespült und dann mit einer neuen Spitze verwendet. Das Plasma wurde nach zehnmütiger Zentrifugation bei 2000 rpm (Umdrehungen pro Minute) und 4 °C gewonnen und bei -80 °C eingefroren.

Die Bestimmung der Cholesterinspiegel im Blutplasma wurde durch das Labor des Instituts für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie übernommen und erfolgte durch ein gaschromatographisches Messverfahren.

### **3.3. Relaxin-2-Plasmakonzentrationen**

#### Materialien

- Human Relaxin-2 Immunoassay (Quantikine® ELISA, R&D Systems, Minneapolis, USA)
- Microplate-Reader Infinite® M200 (Tecan, Männedorf, Schweiz)

#### Durchführung

Die Relaxin-2-Konzentrationen im Blutplasma wurden durch ein Relaxin-2 Immunoassay bestimmt. Die Analyse erfolgte im Blutplasma, das am Ende des Tierexperiments gewonnen wurde. Das Plasma wurde für den Relaxin-2 Immunoassay 1:100 in Calibrator Diluent RD6-6 verdünnt. Relaxin-2 wurde auf der mitgelieferten 96-Well-Platte durch einen Relaxin-2 spezifischen monoklonalen Antikörper gebunden. Nach dem Waschen wurde ein weiterer Relaxin-2 spezifischer polyklonaler enzymmarkierter Zweitantikörper hinzugegeben. Es folgte ein zweiter Waschschrift und durch anschließende Zugabe eines Substrats fand eine kolorimetrisch messbare Umsetzung des Substrats in Abhän-

gigkeit von der Menge Relaxin-2 statt, welches im initialen Schritt gebunden werden konnte. Die Proben wurden jeweils im Duplikat mit einem ELISA-Reader analysiert.

### 3.4. Endothelfunktion

#### Materialien

- Präparierte Aortenringe der Aorta descendens
- Tyrode-Puffer (pH 7,4; in mmol/l: NaCl 118,0, CaCl<sub>2</sub> 2,5, KCl 4,73, MgCl<sub>2</sub> 1,2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 25,0, EDTA 0,026, D(+)-Glukose 5,5)
- Organbad-Apparatur (IOA-5301 Isolierte Organ Apparatur, Seeheim/Ober-Beerbach, Deutschland)
- Ampuwa (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. H., Deutschland)
- Stammlösungen:
  - Kaliumchlorid (KCl) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
  - (R)-(-)-Phenylephrin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
  - Carbachol: Carbamoylcholinchlorid 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
  - Nitroglycerin (Nitrolingual®infus, G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Deutschland)

#### Durchführung

Die Endothelfunktion wurde in einem Organbad-Experiment ermittelt. Die Aorta descendens wurde in modifizierten Tyrode-Puffer getaucht, in 3 mm große Stücke geteilt und von Fett und losem Bindegewebe befreit. Anschließend wurden die Aortenringe in einem Organbad mit Tyrode-Puffer aufgehängt. Bei einer Temperatur von 37 °C wurden kontinuierlich 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> zugeführt. Die Kraft, welche auf den Aortenring wirkte, betrug zu Beginn 1 mN. Über einen Zeitraum von sechzig Minuten wurde schrittweise die Spannung auf 10 mN erhöht. Anschließend wurden die Stammlösungen (KCl, Phenylephrin, Carbachol, Nitroglycerin), wie in Tab. 1 protokolliert, hinzugegeben.

**Tab. 1:** Pipettierschema und Endkonzentrationen im Organbad zum Erhalt der Dosis-Wirkungs-Kurven

Stammlösung [M]	Konzentration im Bad	Pipettiervolumen [ $\mu$ l]
<b>KCl</b>		
2	$2 \cdot 10^{-2}$	50
	$4 \cdot 10^{-2}$	100
<b>Spülen</b>		
<b>Phenylephrin</b>		
$10^{-6}$	$10^{-9}$	5
	$10^{-8}$	50
$10^{-4}$	$10^{-7}$	5
	$10^{-6}$	50
$10^{-2}$	$10^{-5}$	5
	$10^{-4}$	50
<b>Carbachol</b>		
$10^{-6}$	$10^{-9}$	5
	$10^{-8}$	50
$10^{-4}$	$10^{-7}$	5
	$10^{-6}$	50
$10^{-2}$	$10^{-5}$	5
	$10^{-4}$	50
<b>Spülen</b>		
<b>Phenylephrin</b>		
	$10^{-4}$	50
<b>Nitroglycerin</b>		
$10^{-6}$	$10^{-9}$	5
	$10^{-8}$	50
$10^{-4}$	$10^{-7}$	5
	$10^{-6}$	5
$10^{-3}$	$10^{-5}$	50

Die angegebenen Konzentrationen der Lösungen wurden in der Vorbereitung des Experiments durch entsprechende Verdünnung mit Ampuwa hergestellt. Sobald die Vasokonstriktion bzw. Vasodilatation abgeschlossen war, wurde die Spannung abgelesen und die Konzentration der Stammlösung im Organbad erhöht. Wir erhielten kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die jeweiligen Wirkstoffe.

Die Intaktheit und die kontraktile Funktionsfähigkeit der glatten Muskelzellen in den aortalen Segmenten wurden anhand einer durch KCl ausgelösten Kontraktion getestet. Hohe KCl-Konzentrationen im Organbad verursachen eine Depolarisation der Zellmembran mit konsekutiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch Öffnung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle.

Die Integrität des Endothels und Endothelfunktion wurde durch Prä-Kontraktion mit Phenylephrin und anschließender Zugabe von Carbachol getestet. Phenylephrin führt als Agonist am  $\alpha_1$ -Adrenozeptor zur Vasokonstriktion. Carbachol, Agonist der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren, führt zur endothelabhängigen Vasodilatation. Die Darstellung erfolgte als prozentualer Anteil der Phenylephrin-induzierten Kontraktion. Bei endothelialer Dysfunktion zeigt sich die Vasodilatation unter Carbachol beeinträchtigt.

Nach erneuter Zugabe von Phenylephrin wurde Nitroglycerin hinzugefügt. Durch Nitroglycerin konnte die Fähigkeit des Gefäßes zur Vasodilatation unabhängig von der Funktion des Endothels getestet werden.

### 3.5. Beurteilung der Inflammation

#### Materialien

- ELISA-Kit: IL-6 Single-Analyte ElisArray Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- ELISA-Kit: IL-10 Single-Analyte ElisArray Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- ELISA-Reader (Tecan Infinite M200 plate reader, Tecan, Männedorf, Schweiz)

#### Durchführung

Die Konzentrationen des proinflammatorisch-wirkenden IL-6 und des antiinflammatorisch-wirkenden IL-10 wurden mit Hilfe eines ELISA-Kits im Blutplasma bestimmt. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Herstellerangaben und durch Messung mit einem ELISA-Reader Tecan Infinite M200. Die Proben wurden jeweils im Duplikat analysiert.

### 3.6. Oxidativer Stress *ex vivo*

#### Materialien

- Aortenringe der Aorta descendens
- Szintillationszähler (Lumat LB 9501, Berthold, Wildbad, Deutschland)
- Krebs-HEPES-Puffer (pH 7,4; in mmol/l: NaCl 99,01, KCl 4,69, CaCl<sub>2</sub> 1,87, MgSO<sub>4</sub> 1,20, NaHEPES 20,0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,03, NaHCO<sub>3</sub> 25,0, D(+)-Glucose 11,1)
- L-012 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)
- PBS (pH 7,4; in g/l: KCl 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,4, NaCl 80, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14,4)
- DMSO (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- KH-Puffer, steril filtriert (pH 7,4; in g/l: NaCl 5,786, KCl 0,3497, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0,2749, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,2958, NaHEPES 5,206, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1794, NaHCO<sub>3</sub> 2,1)

#### Durchführung

Die Quantifizierung der Superoxidfreisetzung in den Aortensegmenten der Versuchstiere wurde durch L-012 Chemilumineszenz vorgenommen. Die freipräparierten, 2 mm langen aortalen Segmente wurden in eine Szintillationsküvette gegeben und in 10 µl L-012-Reagenz und 90 µl modifizierten Krebs-HEPES-Puffer inkubiert. Das L-012-Reagenz

wurde durch Lösen von 3,1 mg in 100 µl DMSO und anschließender Verdünnung von 1:100 in PBS angesetzt.

Die Messung erfolgte über fünfzehn Minuten in einminütigen Intervallen durch einen Szintillationszähler. Anschließend wurden die aortalen Segmente getrocknet und das Trockengewicht bestimmt. Die relative Chemilumineszenz wurde als Quotient des gemessenen Lumineszenz-Signals fünf Minuten nach Beginn der Messung in relativen Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s) und des Trockengewichts der aortalen Segmente in mg ermittelt.

### **3.7. Oxidativer Stress *in vitro***

#### 3.7.1. Zellkultur und Stimulation der Zellen

##### Materialien

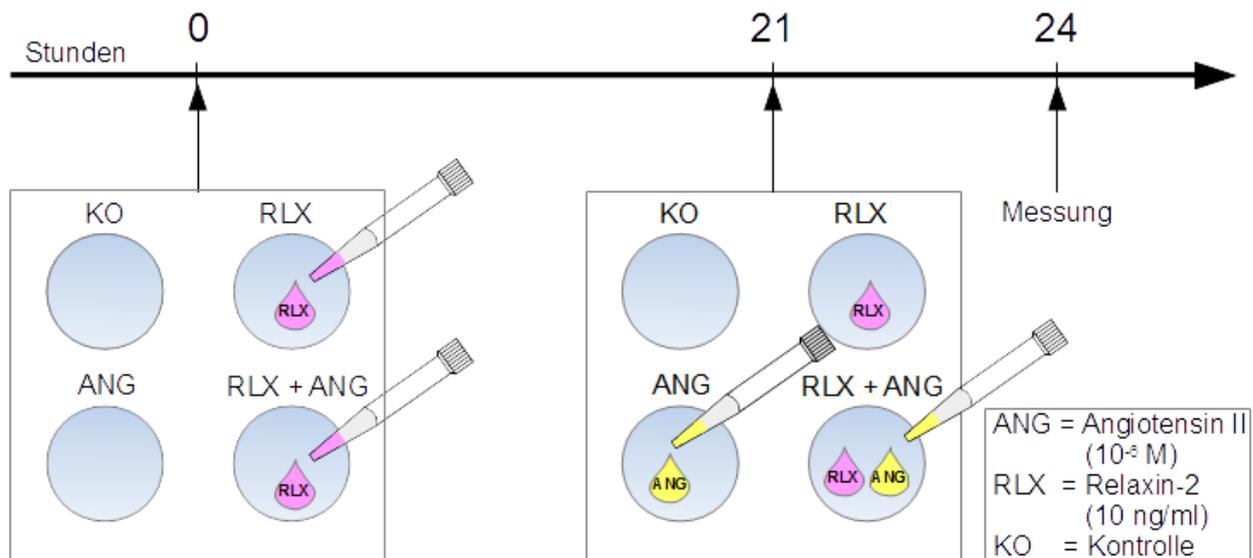
- Humane koronare arterielle Muskelzellen (human coronary arterial smooth muscle cells, HCASMC; PromoCell, Heidelberg, Deutschland)
- Wachstumsmedium (Smooth muscle cell growth medium, basal, phenol red free (prf), provitro, Berlin, Deutschland)
- Supplement Mix (Smooth muscle cell growth medium FCS, Supplement Mix, provitro, Berlin, Deutschland)
- Zellkulturschalen Ø 6 cm und Ø 10 cm (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz)
- Antibiotika (Antibiotics, provitro, Berlin, Deutschland)
- Angiotensin II human (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Rekombinantes Relaxin-2 human, exprimiert in E. coli (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

##### Durchführung

Humane koronare arterielle glatte Muskelzellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Wachstumsmedium, versetzt mit Supplement Mix und Antibiotika, in Zellkulturschalen kultiviert. Das Wachstumsmedium wurde alle zwei Tage gewechselt. Die Experimente wurden mit Zellen der Passagen sechs bis acht durchgeführt. Die Stimulation erfolgte für

die L-012-Messung und die Dichlorodihydrofluorescein-Messung (DCF) nach dem gleichen Schema.

Es lagen insgesamt vier Gruppen vor, die nach dem in Abb. 4 dargestellten Protokoll stimuliert wurden.



**Abb. 4:** Stimulation von HCASMCs zur Erfassung von reaktiven Sauerstoffspezies

Zwei Gruppen (RLX und RLX+ANG) wurden 24 Stunden mit Relaxin-2 (10 ng/ml) stimuliert. Drei Stunden vor der Messung wurde eine mit Relaxin-2 stimulierte Gruppe zusätzlich mit  $10^{-6}$  M Angiotensin II stimuliert (RLX+ANG), um die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies anzuregen. Zeitgleich wurde eine Gruppe (ANG) ausschließlich mit  $10^{-6}$  M Angiotensin II stimuliert. Weiterhin wurde eine Gruppe als Kontrollgruppe (KO) nicht stimuliert.

### 3.7.2. L-012-Chemilumineszenzassay

#### Materialien

- PBS (pH 7,4; in g/l: KCl 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,4, NaCl 80, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14,4)
- Trypsin-EDTA 0,05 %, phenol red (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
- KH-Puffer, steril filtriert (pH 7,4; in g/l: NaCl 5,786, KCl 0,3497, CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 0,2749, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,2958, NaHEPES 5,206, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1794, NaHCO<sub>3</sub> 2,1, D(+)-Glukose 180,2)
- Szintillationszähler (Lumat LB 9501, Berthold, Wildbad, Deutschland)
- L-012 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)
- Reaktionsgefäß Safe-Lock Tubes (Eppendorf Tubes, Hamburg, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen 50 ml (CELLSTAR® Centrifuge Tubes, Greiner Bio-One Int. AG, Frickenhausen, Deutschland)
- Neubauer-Zählkammer (Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland)

#### Durchführung

Humane koronare arterielle glatte Muskelzellen wurden, wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben, in Zellkulturschalen mit 6 cm Durchmesser kultiviert und stimuliert. Die Stimulation erfolgte entsprechend der Schilderung in Kapitel 3.7.1 und Abb. 4. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch 1 ml Trypsin-EDTA mit anschließender fünfminütiger Inkubation im Brutschrank von der Zellkulturschale gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Zellmedium gestoppt und die abgelösten Zellen konnten in ein Zentrifugenröhrchen überführt werden. Es wurden 20 µl des Mediums mit den gelösten Zellen zur Ermittlung der Zellzahl in ein Eppendorfgefäß gegeben. Dann wurden die Zentrifugenröhrchen für acht Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit einem Gemisch aus 10 µl L-012-Reagenz und 90 µl KH-Puffer resuspendiert und in eine Messküvette überführt. Das L-012-Reagenz wurde wie in Kapitel 3.6 beschrieben angesetzt.

Die Messung erfolgte mit Hilfe des Szintillationszählers. In einminütigen Abständen wurden für eine Dauer von zehn Minuten relative Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s) erfasst. Die statistische Auswertung erfolgte durch Darstellung der RLU/s fünf Minuten nach Beginn der Messung bezogen auf die Zellzahl. Die Quantifizierung der Zellen erfolgte mit

Hilfe einer Neubauer-Zählkammer in 10  $\mu$ l Medium und wurde auf 1 ml Medium extrapoliert.

### 3.7.3. DCF-Messung

#### Materialien

- E1-Puffer, steril filtriert (pH 7,5; in g/l: NaCl 7,89, KCl 0,49, CaCl<sub>2</sub> 0,256, MgCl<sub>2</sub> 0,203, D(+)-Glucose 1,98, NaHEPES 5,21)
- 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (Life Technologies Europe BV, Bleiswijk, Niederlande)
- Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit einer AxioCam MRc (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)

#### Durchführung

Die intrazelluläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wurde durch DCF-Messungen quantifiziert. Die humanen koronaren arteriellen glatten Muskelzellen wurden, wie in Kapitel 3.7.1 und Abb. 4 beschrieben, auf Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser kultiviert und stimuliert. Das Kulturmedium wurde entfernt und mit 1 ml E1-Puffer gewaschen. Der E1-Puffer wurde wieder abgenommen und im nächsten Schritt wurden 2 ml E1-Puffer und 5  $\mu$ l DCF in die Kulturschale gegeben und dreißig Minuten unter Ausschluss von Licht bei 37 °C inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Substanzen aus der Kulturschale wieder entfernt, es wurde mit E1-Puffer gewaschen und dann erneut 2 ml E1-Puffer zugegeben.

Die Fluoreszenzaufnahme und die anschließende Auswertung erfolgte an einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop, einer AxioCam MRc und mit Hilfe der AxioVision Software Rel. 4.8. Die Aufnahmen erfolgten an mindestens drei verschiedenen Stellen bei gleichen Parametern für die Belichtung. Die gemessenen Fluoreszenzsignale wurden in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt. Man erhielt die relative Produktion reaktiver Sauerstoffspezies als prozentualen Anteil der Kontrolle.

### 3.8. Progression und Komposition der atherosklerotischen Plaques

#### 3.8.1. Herstellung der Gewebeschnitte

##### Materialien

- Tissue Freezing Medium® (Leica Instruments, Nussloch, Deutschland)
- Leica CM1900 Kryostat (Leica Instruments, Nussloch, Deutschland)
- Polysine® Slides (Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland)

##### Durchführung

Die auf Trockeneis gekühlten Herzen der Versuchstiere wurden in Einbettmedium Tissue Freezing Medium® eingebettet. Mit Hilfe eines Kryostat wurden bei -23 °C 7 µm dicke Gewebeschnitte der Aortenwurzel angefertigt. Die Schnittpräparate wurden auf sialynisierte Objektträger aufgenommen und anschließend bei -80 °C gelagert.

#### 3.8.2. Ausdehnung und Läsionstyp der atherosklerotischen Plaques

##### 3.8.2.1. Ölrot-Färbung: Darstellung der atherosklerotischen Läsionen

##### Materialien

- Ölrot (Oil red O, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Isopropanol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Aqua dest.
- Paraformaldehyd (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Ampuwa (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. H., Deutschland)
- Hämatoxylin nach Gill II (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Aquatex® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Deckgläser Stärke No. 1, 18 x 18 mm (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen; Deutschland)
- Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit einer AxioCam MRc (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)

## Durchführung

Der Nachweis atherosklerotischer Läsionen erfolgte durch eine Ölrot-Färbung. Die Stammlösung wurde durch Lösen von 0,5 g Ölrot in 100 ml Isopropanol hergestellt. Die Gebrauchslösung wurde frisch aus 60 ml Stammlösung und 40 ml Aqua dest. angesetzt. Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden aufgetaut und bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte 45 Minuten in 4 % Paraformaldehyd (PFA) (40 g PFA gelöst in 500 ml Ampuwa, 500 ml doppelt konzentriertes PBS und 500 µl 1 M NaOH) fixiert. Nach zehnmütigem Waschen unter fließendem Aqua dest. folgte ein dreiminütiges Spülen in 60 % Isopropanol. Danach wurden die Objektträger fünfzehn Minuten lang mit der Ölrot-Lösung gefärbt. Nach erneutem Waschen mit Aqua dest. folgte die Färbung mit Hämatoxylin für zwei Minuten. Diese wurde genutzt, um die Zellkerne darzustellen. Als nächstes wurden die Objektträger ein drittes Mal mit Aqua dest. gespült und für fünfzehn Minuten in lauwarmen Leitungswasser gewaschen. Zum Schluss wurden die Objektträger mit Aquatex eingedeckt.

Die Aufnahme und Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte erfolgte mit einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop, einer AxioCam MRc und AxioVision Software Rel. 4.8. Die Analyse erfolgte verblindet. Durch Vermessung der lipidgefärbten Fläche konnte die Bildung atherosklerotischer Plaques quantifiziert werden. Die Darstellung erfolgte absolut in mm<sup>2</sup> und prozentual als Anteil der Fläche des gesamten Gefäßquerschnitts.

Die atherosklerotischen Läsionen wurden anhand der Ölrot-Färbung nach Läsionstyp eingeteilt (Tab. 2). Dabei wurden jeweils vier Querschnitte der Aortenwurzel jeder Maus verblindet beurteilt. Die Beurteilung erfolgte anhand der durch van Vlijmen et al. (1994) beschriebenen, für Mäuse adaptierten Klassifikation der Atherosklerose (van Vlijmen et al., 1994). Zusätzlich wurde eine Einteilung in frühe atherosklerotische Läsionen (Typ 0-2) und fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen (Typ 3-5) vorgenommen (Volger et al., 2001).

**Tab. 2:** Klassifikation der Stadien der Atherosklerose adaptiert für Mäuse

<b>Läsions-Typ</b> nach van Vlijment et al. (1994).	<b>Kriterien</b>
Typ 1	≤ 10 Schaumzellen
Typ 2	> 10 Schaumzellen in der Intima
Typ 3	Fibröse Kappe, Schaumzellen auch in der Media
Typ 4	Beeinträchtigte Media, ohne Verlust des Aufbaus
Typ 5	Schwer betroffene Media, Bruch elastischer Fasern, Cholesterinspalten, regelmäßig Kalzifikationen und Nekrosen

### 3.8.3. Komposition der atherosklerotischen Plaques

#### 3.8.3.1. Siriusrot-Färbung

##### Materialien

- Direct Red 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 1,2 % Pikrinsäure (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol absolut (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Aqua dest.
- Hämatoxylin nach Gill II (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Xylol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Entellan® (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)
- Deckgläser Stärke No. 1, 18 x 18 mm (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland)
- Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit einer AxioCam MRc (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)

## Durchführung

Der Kollagenanteil der Gefäßwand wurde mit Hilfe der Siriusrot-Färbung quantifiziert. Eine Woche vor der Färbung wurde die Siriusrot-Lösung durch Lösen von 0,1 g Direct Red 80 in 100 ml 1,2 prozentiger Pikrinsäure hergestellt. Nachdem die Gewebeschnitte aufgetaut und getrocknet waren, wurden sie jeweils zehn Minuten in eine absteigende Ethanolreihe (100 %, 90 %, 70 %) gegeben und anschließend mit Aqua dest. gewaschen. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte durch zweiminütige Färbung mit Hämatoxylin. Nachdem die Gewebeschnitte unter fließendem Aqua dest. gespült wurden, folgte eine fünfzehnminütige Färbung mit Siriusrot. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte jeweils zehn Minuten in eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 90 %, 100 %) gegeben und schließlich weitere zehn Minuten in Xylol belassen. Abschließend wurde ein Deckgläschen mit Entellan® benetzt und auf den Objektträger aufgebracht.

Die Aufnahmen der Gewebeschnitte erfolgten an einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit einer AxioCam MRc unter Verwendung eines Polarisationsfilters. Die Quantifizierung des Kollagenanteils erfolgte verblindet mit Hilfe der AxioVision Software Rel. 4.8. Es wurde der prozentuale Anteil der kollagen-positiven Fläche am Gesamtquerschnitt der Gefäßwand berechnet.

### 3.8.3.2. ASMAC-Färbung

#### Material

- Aceton (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Fettstift: Dako Pen S2002 (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark)
- PBS (pH 7,4; in g/l: KCl 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,4, NaCl 80, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14,4)
- Bovines Serum Albumin Fraktion V pH 7,0 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Monoklonaler muriner anti-Actin, alpha-Smooth Muscle-Cy3 Antikörper (C6198-2ML) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Vectashield mounting medium mit DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)
- Deckgläser Stärke No. 1, 18 x 18 mm (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland)
- Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit einer AxioCam MRc (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)

#### Durchführung

Der Gehalt an vaskulären glatten Muskelzellen auf Höhe der Aortenwurzel wurde durch eine Färbung gegen glattmuskuläres alpha-Aktin ermittelt.

Die Gewebeschnitte wurden dreißig Minuten bei -20 °C in Aceton fixiert und anschließend mit einem Fettstift umrandet. Nach fünfminütigem Waschen mit PBS wurde mit 0,5 % bovinen Serum Albumin (BSA) in PBS geblockt und für dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Nächstes wurde der verdünnte Antikörper (1:400 in PBS mit 0,5 % BSA) auf die Objektträger gegeben und dort für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht belassen. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit PBS gewaschen und ein Deckglas mit Vectashield mounting medium mit DAPI aufgebracht.

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit einer AxioCam MRc und der AxioVision Software Rel. 4.8 erstellt und verblindet ausgewertet.

### 3.8.3.3. CD3-Färbung

#### Materialien

- Aceton (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- PBS (pH 7,4; in g/l: KCl 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,4, NaCl 80, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14,4)
- BSA Fraktion V pH 7,0 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Fettstift: Dako Pen S2002 (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark)
- primärer Antikörper: Rabbit polyclonal to CD3 antibody (ab5690) (Abcam, Cambridge, Großbritannien)
- sekundärer Antikörper: Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG (Dianova, Hamburg, Deutschland)
- Vectashield mounting medium mit DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)
- Deckgläser Stärke No. 1, 18 x 18 mm (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland)
- Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit einer AxioCam MRc (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)

#### Durchführung

Die T-Zell-Infiltration in den Gewebeschnitten auf Klappenebene wurde durch eine immunhistochemische Färbung gegen den Marker CD3 ermittelt.

Die getrockneten Objektträger wurden zwanzig Minuten bei -20 °C in Aceton fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Dann folgte ein BSA-Block, um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren und damit Hintergrundsignale zu minimieren. Nachdem eine halbe Stunde mit 1 % BSA in PBS geblockt wurde, konnte der 1:50 in der Block-Lösung verdünnte primäre Antikörper aufgebracht werden. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am folgenden Tag wurde dreimal mit PBS gewaschen und mit dem 1:500 in 1 % BSA in PBS verdünnten sekundären Antikörper eine Stunde unter Ausschluss vom Licht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen konnten die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit Vectashield mounting medium eingedeckt werden. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte durch, im Eindeckmedium enthaltenes, 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI).

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit einer AxioCam MRc und der AxioVision Software Rel. 4.8 erstellt und verblindet ausgewertet.

#### 3.8.3.4. CD68-Färbung

##### Materialien

- Aceton (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- PBS (pH 7,4; in g/l: KCl 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,4, NaCl 80, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14,4)
- BSA Fraktion V pH 7,0 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Fettstift: Dako Pen S2002 (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark)
- primärer Antikörper:  $\alpha$ -CD68 rat IgG2a (SM15500) (Acris antibodies GmbH, Herford, Deutschland)
- sekundärer Antikörper: Cy3 AffiniPure Donkey anti-Rat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, USA)
- Vectashield mounting medium mit DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)
- Deckgläser Stärke No. 1, 18 x 18 mm (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland)
- Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit einer AxioCam MRc (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)

##### Durchführung

Die Akkumulation von Makrophagen wurde durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Gewebeschnitte wurden bei Raumtemperatur getrocknet und zunächst zwanzig Minuten bei -20 °C in Aceton fixiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und mit Hilfe eines Fettstifts umrandet. Es folgte ein halbstündiges Blocken mit 2 % BSA in PBS. Als primärer Antikörper diente  $\alpha$ -CD68 rat IgG2a 1:100 in 1 % BSA in PBS verdünnt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag konnte nach dreimaligem Waschen mit PBS der sekundäre Antikörper Cy3 AffiniPure Donkey anti-Rat IgG 1:500 in der Block-Lösung verdünnt aufgebracht werden. Anschließend folgten eine einstündige Inkubation bei Dunkelheit und

ein erneutes dreimaliges Waschen mit PBS. Zum Schluss konnte ein Deckglas mit Vectashield mounting medium mit DAPI aufgebracht werden.

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit einer AxioCam MRc und der AxioVision Software Rel. 4.8 erstellt und verblindet ausgewertet.

### 3.8.3.5. Ly6G-Färbung

#### Material

- Aceton (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- PBS (pH 7,4; in g/l: KCl 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,4, NaCl 80, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14,4)
- Fettstift: Dako Pen S2002 (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark)
- Normal goat serum (Dianova, Hamburg, Deutschland)
- primärer Antikörper: Rat Anti-Mouse Ly6G (551459) (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA)
- sekundärer Antikörper: Cy3 AffiniPure Donkey anti-Rat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, USA)
- Vectashield mounting medium mit DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA USA)
- Deckgläser Stärke No. 1, 18 x 18 mm (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland)
- Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit einer AxioCam MRc (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)

#### Durchführung

Die Infiltration neutrophiler Granulozyten wurde durch die Ly6G-Färbung dargestellt.

Die Gewebeschnitte wurden hierzu zunächst dreißig Minuten in Aceton fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde jeder Gewebeschnitt mit Hilfe eines Fettstifts umrandet. Anschließend wurde mit 10 % Normal Goat Serum in PBS 65 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Der primäre Antikörper Ly6G wurde, 1:200 in 1 % Normal Goat Serum in PBS verdünnt, auf die Gewebeschnitte gegeben und dort über Nacht belassen. Am nächsten Tag konnte nach dreimaligem Waschen mit PBS der 1:500 mit PBS verdünnte sekundäre Antikörper Cy3 AffiniPure Donkey anti-Rat IgG auf die Ge-

webeschnitte gegeben werden. Es folgte eine Inkubationszeit von achtzig Minuten bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden eine dünne Spur Vectashield mounting medium mit DAPI auf einem Deckglas verteilt und auf den Objektträger aufgebracht.

Die Fluoreszenzaufnahme und die Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte wurde mit einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop, einer AxioCam MRc und der Zeiss AxioVision Software 4.8 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte verblindet.

### **3.9. Genexpressionsanalyse**

#### **3.9.1. RNA-Isolierung aus Aortenbögen**

##### **Materialien**

- Aortengewebe
- Trizol™ LS Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Reaktionsgefäß: Safe-Lock Tubes (Eppendorf Tubes, Hamburg, Deutschland)
- Homogenisator homgen<sup>plus</sup> (Schütt, Düsseldorf, Deutschland)
- RNase Away® (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
- Chloroform (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
- Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R (Thermo Scientific, Osterode, Deutschland)
- Isopropanol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol absolut (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- UltraPure™ DNase/RNase-freies destilliertes Wasser (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Spectrophotometer NanoDrop 2000c (Peqlab, Erlangen, Deutschland)

##### **Durchführung**

Zur Isolation von RNA wurde das aortale Gewebe nach Zugabe von 200 µl TRIzol LS Reagent in ein Eppendorf Reaktionsgefäß vorsichtig mit einem Homogenisator zerkleinert. Dann wurden weitere 300 µl Trizol LS und 100 µl Chloroform hinzugefügt. Der Homogenisator wurde nach jeder Probe mit RNase Away gereinigt. Die Proben wurden fünfzehn Sekunden lang auf dem Vortexer geschüttelt und anschließend dreißig Minuten

bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden drei Phasen sichtbar. Die oberste klare Phase wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, eine gleiche Menge Isopropanol hinzugefügt und anschließend invertiert. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben zwanzig Minuten bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Am Boden des Eppendorf Reaktionsgefäßes wurde ein Pellet sichtbar und der Überstand wurde grob abpipettiert. Nach Zugabe von 500 µl 75 % Ethanol wurde die Probe kurz auf dem Vortexer geschüttelt, erneut fünf Minuten bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Nach zwanzigminütigem Trocknen bei Raumtemperatur wurden 20 µl RNase/DNase-freies Wasser hinzugefügt und die Proben wurden zehn Minuten im Thermomixer auf 56 °C erwärmt. Die Konzentration und Qualität der RNA-Probe wurde mit einem Spectrophotometer NanoDrop 2000c gemessen.

### 3.9.2. Reverse Transkription von RNA in cDNA

#### Materialien

- Omniscript® RT Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Mastercycler® pro (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

#### Durchführung

Zur Herstellung der cDNA wurde das Omniscript® RT Kit verwendet. Es wurde jeweils 1 µg der isolierten RNA gemäß den Angaben des Herstellers in einem Mastercycler® pro reverstranskribiert.

### 3.9.3. Real-time PCR

#### Materialien

- TaqMan® Sonden (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Tab. 3)
- TaqMan® Gene Expression Master Mix (Life Technologies Europe BV, Bleiswijk, Niederlande)
- PCR 96-Well TW-MT-Platte, farblos (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland)
- 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

## Durchführung

Zur Quantifizierung der vaskulären Expression von ET<sub>B</sub>-Rezeptor, Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1a (AT1-Rezeptor), eNOS und VEGF A in dem aortalen Gewebe wurde eine Real-Time PCR durchgeführt. Hierzu wurden 180 µl Gene Expression Master Mix und 18 µl Taqman Sonden in einem Eppendorf Reaktionsgefäß gemischt. Die Wahl der Taqman Sonden war abhängig von der Zielstruktur. Eine Übersicht findet sich in Tab. 3.

Außerdem wurden 20 µl cDNA mit 160 µl RNase/DNase-freiem Wasser verdünnt. Jeweils 9 µl verdünnte cDNA und 11 µl Gene Expression Master Mix wurden laut festgelegtem Schema in die 96-Well-Platte pipettiert. Abschließend wurde eine Folie auf die 96-Well-Platte aufgebracht. Nach kurzer Zentrifugation erfolgte die Quantifizierung mit einem 7500 Fast Real-time PCR System in einer Messung mit 45 Zyklen. Als endogenes Kontroll-Gen diente das Housekeeping-Gen 18 S. Die Bestimmung jeder Probe erfolgte als Triplikat. Die Normalisierung der Proben erfolgte gegen die Expression von 18 S. Die Expression der jeweiligen untersuchten Zielstruktur wurde auf die Expression in der Kontrollgruppe bezogen.

**Tab. 3:** Taqman Sonden und Zielstruktur für die quantitative PCR

Zielstruktur	Sonde
Endothelin-Rezeptor Typ B (ET <sub>B</sub> -Rezeptor)	Mm00432989_m1
Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1a (AT1-Rezeptor)	Mm01957722_s1
Endotheliale NO-Synthase (eNOS)	Mm00435217_m1
Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A (VEGF A)	Mm00437306_m1
18 S	4319413E

### **3.10. Statistische Analyse**

Die Darstellung der erhobenen Daten erfolgt als Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test für ungepaarte Stichproben bei Betrachtung zweier Gruppen. Bei der Begutachtung von mehr als zwei Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Tukey Post-hoc-Test durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism Software (Version 5.03, GraphPad Software, Inc., San Diego, Kalifornien, USA). Für statistische Signifikanz wurde  $p < 0,05$  gefordert.

## 4. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der unter Kapitel 3 beschriebenen Versuche in gleicher Chronologie dargestellt.

### 4.1. Metabolische Parameter

Die Messung von Blutdruck, Herzfrequenz, Körpergewicht, Nüchtern-Blutzucker und Plasma-Cholesterin stellte die Vergleichbarkeit der Mäuse sicher, die innerhalb des Versuches eine unterschiedliche Behandlung erfuhren. Indirekte vaskuläre Effekte durch eine metabolische Veränderung konnten als Ursachen der im Folgenden beschriebenen Effekte der Behandlung mit Relaxin-2 ausgeschlossen werden.

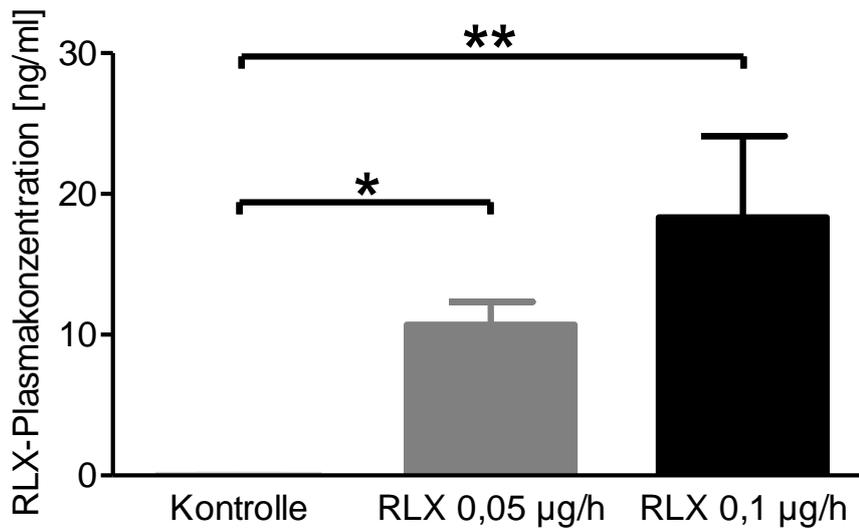
Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefasst. Die Untersuchung metabolischer Faktoren und kardiovaskulärer Risikoparameter nach der in Kapitel 3.1 beschriebenen sechswöchigen fettreichen Diät zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tieren der drei Gruppen (0,1 µg/h RLX, 0,05 µg/h RLX und Kontrollgruppe). Sowohl vor als auch während der fettreichen Diät konnten keine Differenzen im Körpergewicht der Mäuse festgestellt werden. Die Gewichtszunahme war in allen Gruppen vergleichbar. Ebenso bestanden zwischen den drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Blutdrucks vor Beginn der fettreichen Diät bzw. in der letzten Woche der Behandlung. Es lagen weiterhin keine Unterschiede bezüglich Cholesterinwert, Nüchtern-Blutzucker und Herzfrequenz vor.

Tab. 4: **Metabolische Parameter:** Blutdruck, Herzfrequenz sowie kardiovaskuläre Risikofaktoren (Körpergewicht, Gesamtcholesterin und Nüchtern-Blutzucker). Angegeben wird der Mittelwert  $\pm$  SEM. Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

<i>ApoE</i> <sup>(-/-)</sup> (n = 8 pro Gruppe)	<b>Kontrolle</b>	<b>0,05 <math>\mu</math>g/h Relaxin-2</b>	<b>0,1 <math>\mu</math>g/h Relaxin-2</b>
<b>Systolischer Blutdruck [mmHg]</b>	154 $\pm$ 8	153 $\pm$ 12	151 $\pm$ 13
<b>Herzfrequenz [bpm]</b>	689 $\pm$ 54	682 $\pm$ 63	657 $\pm$ 51
<b>Körpergewicht am Endpunkt [g]</b>	23,7 $\pm$ 2,0	24,2 $\pm$ 1,1	24,8 $\pm$ 1,3
<b>Gesamtcholesterin [mg/dl]</b>	825 $\pm$ 11	840 $\pm$ 19	866 $\pm$ 15
<b>Nüchternblutzucker [mg/dl]</b>	157 $\pm$ 17	152 $\pm$ 13	156 $\pm$ 21

#### 4.2. Relaxin-2-Plasmakonzentrationen

Die Messung der Relaxin-2-Plasmakonzentrationen erfolgte nach vierwöchiger kontinuierlicher Freisetzung von Relaxin-2 über subkutan implantierte osmotische Minipumpen. Abb. 5 stellt die Relaxin-2-Plasmakonzentrationen in den drei verschiedenen Versuchsgruppen dar. In beiden mit Relaxin-2 behandelten Gruppen wurde ein signifikant erhöhter Plasmaspiegel erwirkt. In der Kontrollgruppe ließen sich keine wesentlichen Relaxin-2-Plasmakonzentrationen nachweisen.

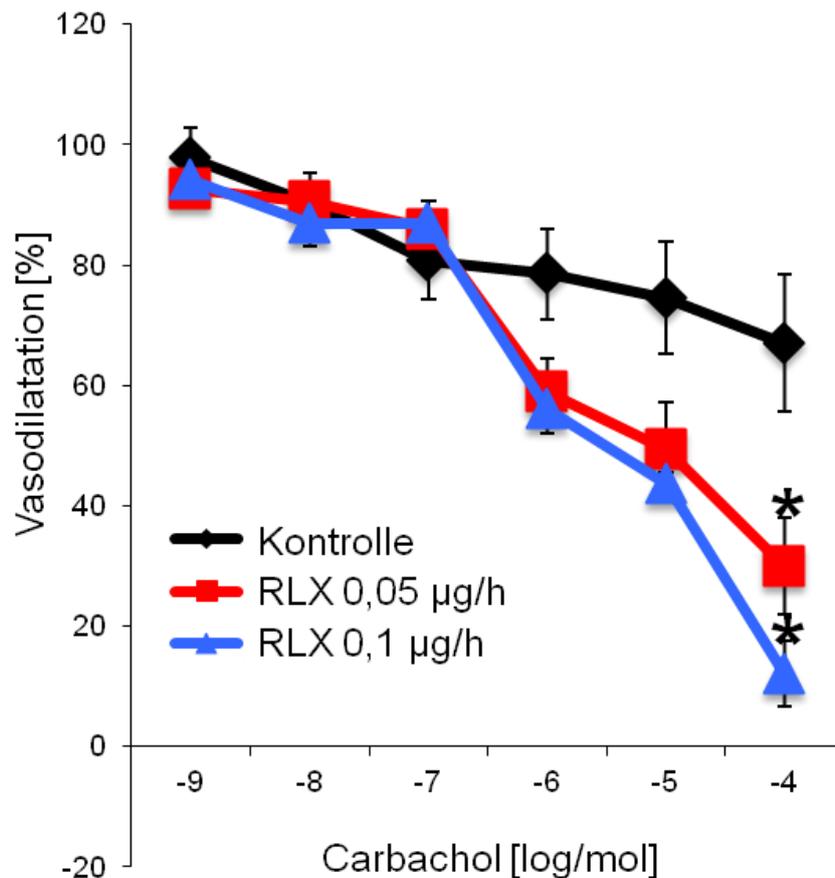


**Abb. 5:** Relaxin-2-Plasmakonzentrationen nach vierwöchiger Relaxin-2-Behandlung. Relaxin-2 wurde kontinuierlich über subkutan implantierte osmotische Minipumpen abgegeben. Die Plasmakonzentrationen in der Gruppe mit hochdosierter Relaxin-2-Behandlung (0,1 µg/h) betrug  $18,340 \pm 5,780$  ng/ml ( $n = 8$ ), in der Gruppe mit niedrigdosierter Relaxin-2-Behandlung (0,05 µg/h)  $10,700 \pm 1,623$  ng/ml ( $n = 8$ ). In der Kontrollgruppe waren keine wesentlichen Relaxin-2-Plasmakonzentrationen ( $0,027 \pm 0,013$  ng/ml;  $n = 8$ ) nachweisbar. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle. \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle. Modifizierte Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

#### 4.3. Endothelfunktion

In einem Organbad-Experiment wurde die Endothelfunktion an präparierten intakten Aortensegmenten untersucht. Bei der Überprüfung der Intaktheit und der kontraktiven Funktionsfähigkeit der glatten Muskelzellen in den aortalen Segmenten durch Zugabe von KCl in das Organbad zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Kontraktionsfähigkeit zwischen den Gruppen unter vierwöchiger Behandlung mit 0,1 µg/h bzw. 0,05 µg/h Relaxin-2 und der Kontrollgruppe. Weiterhin wiesen die drei Gruppen auch keine Unterschiede in der Phenylephrin-vermittelten Vasokonstriktion auf. Die Carbachol-induzierte endothelabhängige Vasodilatation zeigte nach sechs Wochen fett- und cholesterinreicher Diät der *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine Beeinträchtigung der endothelialen Funktion. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 dargestellt.

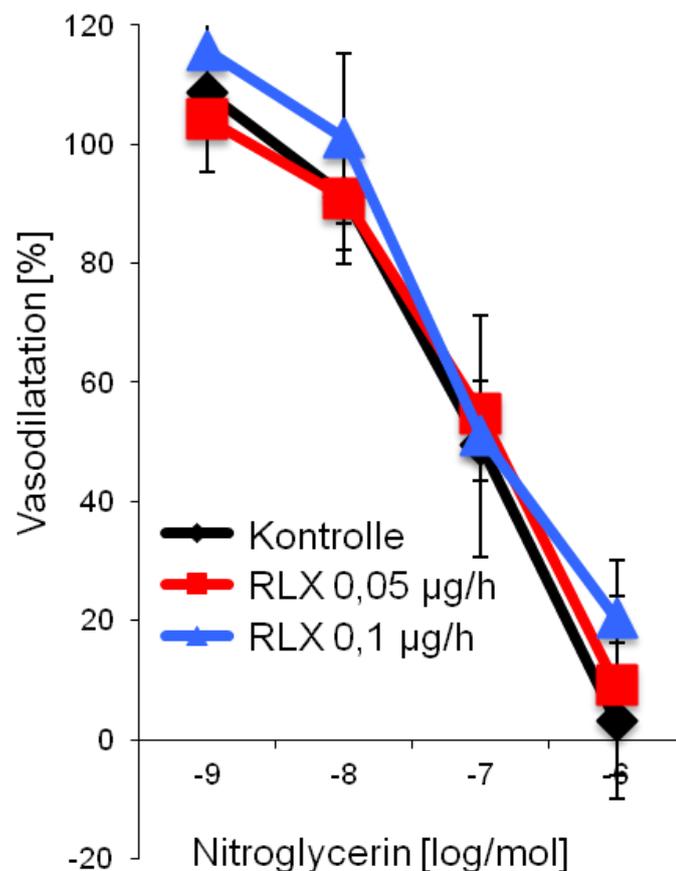
Durch die Relaxin-2-Behandlung konnte die endothelabhängige Vasodilatation unter Carbachol signifikant verbessert werden. Es zeigte sich eine maximale Relaxation von  $66,98 \pm 11,4$  % in der Kontrollgruppe ( $n = 8$ ),  $29,98 \pm 8,1$  % in der Gruppe mit der niedrigdosierten Relaxin-2-Behandlung ( $0,05 \mu\text{g/h}$ ) ( $n = 8$ ;  $p = 0,02$  vs. Kontrolle) und  $12,11 \pm 5,6$  % in der Gruppe mit der hochdosierten Relaxin-2-Behandlung ( $0,1 \mu\text{g/h}$ ) ( $n = 8$ ;  $p = 0,03$  vs. Kontrolle;  $p = 0,39$  vs. RLX  $0,05 \mu\text{g/h}$ ).



**Abb. 6:** Carbachol-induzierte endothelabhängige Vasodilatation

Die Messung erfolgte an intakten Aortenringen von *ApoE<sup>-/-</sup>*-Mäusen nach sechs Wochen fett- und cholesterinreicher Diät und vierwöchiger Behandlung mit Relaxin-2 in einer Konzentration von  $0,05 \mu\text{g/h}$  bzw.  $0,1 \mu\text{g/h}$  und in der Kontrollgruppe. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der maximalen Kontraktion unter Phenylephrin. Die Carbachol-vermittelte endothelabhängige Vasodilatation wurde durch Relaxin-2-Behandlung signifikant verbessert [maximale Relaxation: Kontrollgruppe:  $66,98 \pm 11,4$  % ( $n = 8$ ), RLX  $0,05 \mu\text{g/h}$ :  $29,98 \pm 8,1$ % ( $n = 8$ ;  $p = 0,02$  vs. Kontrolle), RLX  $0,1 \mu\text{g/h}$ :  $12,11 \pm 5,6$  % ( $n = 8$ ;  $p = 0,03$  vs. Kontrollgruppe;  $p = 0,39$  vs. RLX  $0,05 \mu\text{g/h}$ )]. Angegeben wird der Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. Kontrollgruppe. Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen bei der endothelunabhängigen Vasodilatation durch Zugabe von Nitroglycerin (Abb. 7). Somit ist sichergestellt, dass die signifikanten Unterschiede in der endothelabhängigen Vasodilatation durch Carbachol nicht auf eine unterschiedliche Reagibilität der Gefäße auf NO zurückzuführen sind.

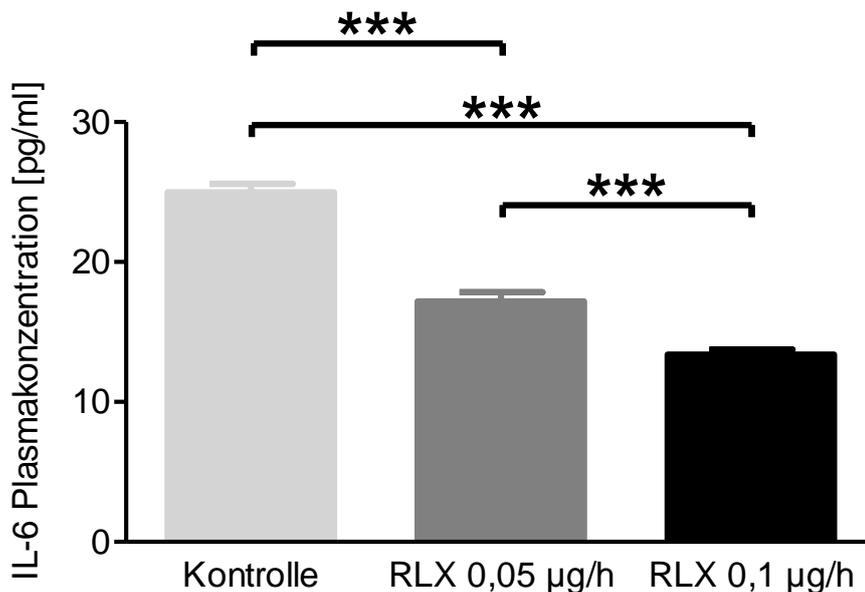


**Abb. 7:** Nitroglycerin-induzierte endothelunabhängige Vasodilatation

Die Messung erfolgte an intakten Aortenringen von *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach sechs Wochen fett- und cholesterinreicher Diät und vierwöchiger Behandlung mit Relaxin-2 in einer Konzentration von 0,05 µg/h bzw. 0,1 µg/h und in der Kontrollgruppe. Dargestellt wird der prozentuale Anteil der maximalen Kontraktion unter Phenylephrin. Die endothelunabhängige Vasodilatation durch Zugabe von Nitroglycerin zeigte keinen Unterschied. Alle Werte sind dargestellt als Mittelwert ± SEM. Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

#### 4.4. Beurteilung der Inflammation

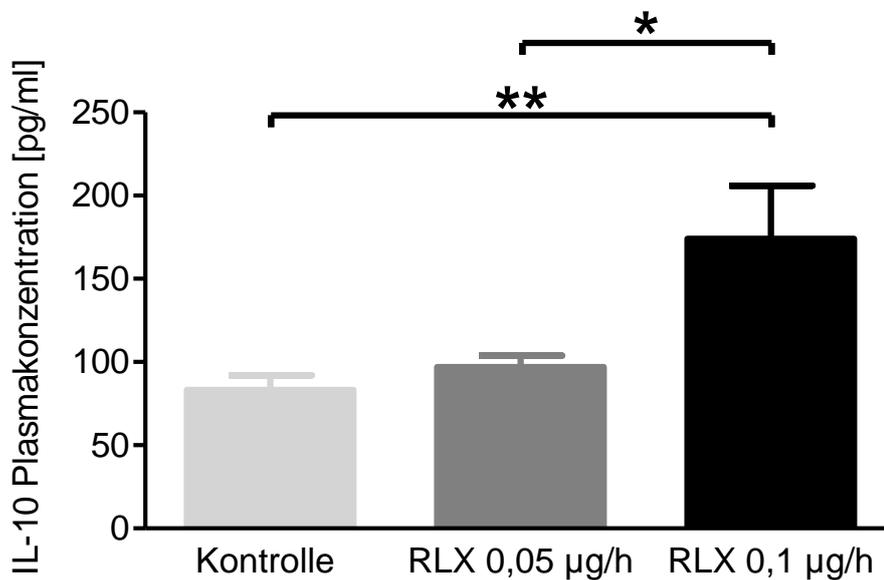
Zur Beurteilung der Inflammation wurden die Konzentrationen von IL-6 und IL-10 im Plasma der Versuchstiere bestimmt. Abb. 8 zeigt die ermittelten Konzentrationen von IL-6 in den drei Versuchsgruppen. Die Plasmakonzentration des proinflammatorisch wirkenden IL-6 betrug  $24,99 \pm 0,61$  pg/ml in der Kontrollgruppe (n = 6). Die Mäuse mit der niedrigdosierten Relaxin-2-Behandlung von  $0,05 \mu\text{g/h}$  lieferten eine Plasmakonzentration von  $17,18 \pm 0,66$  pg/ml (n = 7;  $p < 0,001$  vs. Kontrolle) und wiesen somit eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Das proinflammatorisch wirkende IL-6 zeigte sich im Plasma der Gruppe mit der hochdosierten Relaxin-2-Behandlung ( $0,1 \mu\text{g/h}$  RLX) mit  $13,38 \pm 0,35$  pg/ml (n = 7) abermals signifikant reduziert. Diese Reduktion zeigte sich mit einem Signifikanzwert von  $p < 0,001$  sowohl gegenüber der Gruppe mit der niedrigdosierten Relaxin-2-Behandlung, als auch gegenüber der Kontrollgruppe.



**Abb. 8:** Plasmakonzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6

Die Analyse im Plasma von *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen fand nach sechs Wochen fett- und cholesterinreicher Diät statt. Nach zusätzlicher vierwöchiger Behandlung mit Relaxin-2 in einer Konzentration von  $0,1 \mu\text{g/h}$  ( $13,38 \pm 0,35$  pg/ml; n = 7;  $p < 0,001$  vs. Kontrolle;  $p < 0,001$  vs.  $0,05 \mu\text{g/h}$  RLX) oder  $0,05 \mu\text{g/h}$  ( $17,18 \pm 0,66$  pg/ml; n = 7;  $p < 0,001$  vs. Kontrolle) zeigte sich eine signifikante Reduktion der IL-6-Plasmakonzentrationen. Angegeben wird der Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0,001$ . Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

Die Plasmakonzentrationen des antiinflammatorisch-wirkenden IL-10 in den drei Versuchsgruppen sind in Abb. 9 dargestellt. In der Gruppe, die eine vierwöchige Relaxin-2-Behandlung von 0,1 µg/h erfuhr stellte sich die Plasmakonzentration mit  $174,2 \pm 31,86$  pg/ml ( $n = 5$ ) signifikant erhöht dar. Dies zeigte sich sowohl gegenüber der Kontrollgruppe (Kontrolle:  $83,29 \pm 8,79$  pg/ml;  $n = 6$ ), als auch gegenüber einer Behandlung von 0,05 µg/h (0,05 µg/h RLX:  $96,94 \pm 6,93$  pg/ml). In der Gruppe mit der niedrigdosierte Relaxin-2-Behandlung von 0,05 µg/h zeigte sich keine signifikante Veränderung der IL-10-Plasmakonzentrationen.

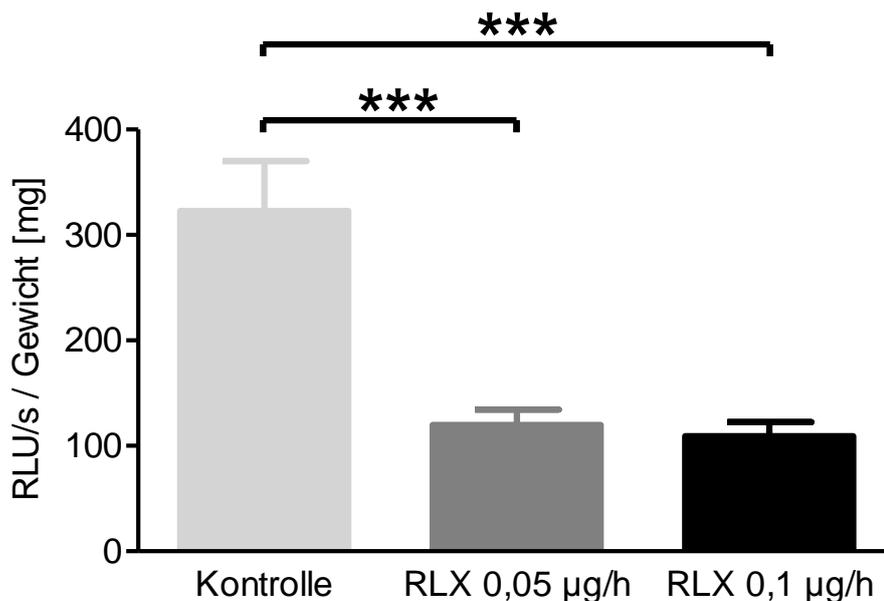


**Abb. 9:** Plasmakonzentration des antiinflammatorischen Zytokins IL-10

Die Analyse wurde mit Plasma von *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach sechs Wochen fett- und cholesterinreicher Diät durchgeführt. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung in der Gruppe mit vierwöchiger Relaxin-2-Behandlung von 0,1 µg/h ( $174,2 \pm 31,86$  pg/ml;  $n = 5$ ;  $p = 0,006$  vs. Kontrolle;  $p = 0,014$  vs. 0,05 µg/h RLX). In der Gruppe mit einer Behandlung von 0,05 µg/h Relaxin-2 ( $96,94 \pm 6,93$  pg/ml;  $n = 7$ ;  $p = 0,819$  vs. Kontrolle) zeigte sich keine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrolle ( $83,29 \pm 8,79$  pg/ml,  $n = 6$ ). Alle Werte sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$ . Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

#### 4.5. Oxidativer Stress *ex vivo*

Die vaskuläre Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurde an intakten Aorten-segmenten mit Hilfe eines L-012 Chemilumineszenzassays gemessen. In Abb. 10 ist die vaskuläre ROS-Freisetzung in RLU/s in den drei verschiedenen Gruppen dargestellt. In beiden Gruppen, die mit Relaxin-2 behandelt wurden, zeigte sich ein signifikant niedrigeres Lumineszenz-Signal (RLU/s). Mit Relaxin-2 behandelte Mäuse wiesen eine signifikant verringerte vaskuläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies auf. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit  $322,67 \pm 47,66$  RLU/s ( $n = 8$ ) waren in der Gruppe mit einer Behandlung von  $0,05 \mu\text{g/h}$  Relaxin-2  $119,76 \pm 14,85$  RLU/s ( $n = 8$ ;  $p < 0,001$  vs. Kontrolle) und mit einer Behandlung von  $0,1 \mu\text{g/h}$  nur  $109,33 \pm 13,31$  RLU/s ( $n = 8$ ;  $p < 0,001$  vs. Kontrolle;  $p = 0,967$  vs.  $0,05 \mu\text{g/h}$  RLX) messbar.



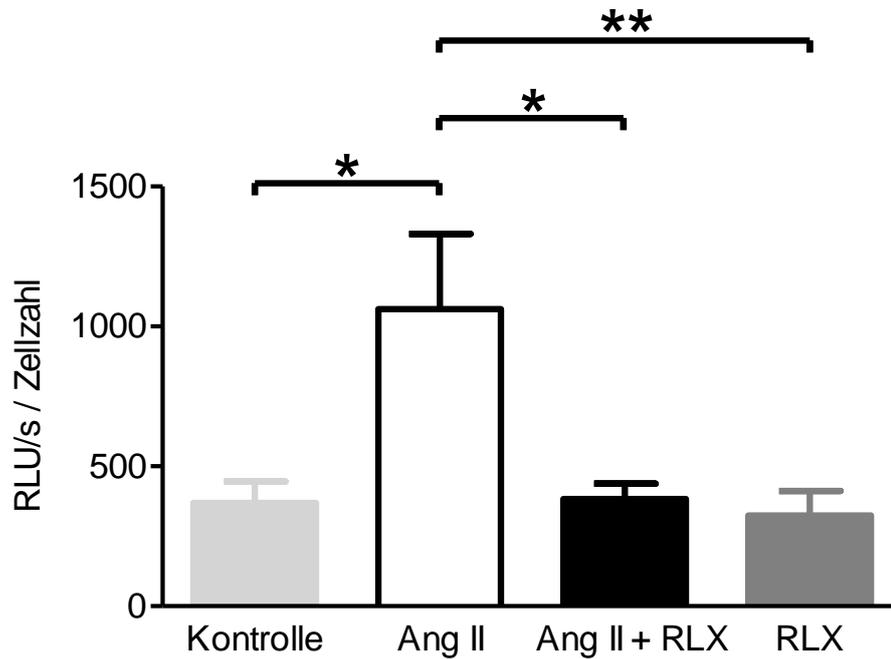
**Abb. 10:** Messung der vaskulären Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Messung erfolgte durch einen L-012 Chemilumineszenzassay mit isolierten Aortenringen von *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäuse nach sechswöchiger fett- und cholesterinreicher Diät. Die Darstellung erfolgt in relativen Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s) bezogen auf das Gewicht des aortalen Gewebes [mg] in der Kontrollgruppe, Behandlung mit  $0,05 \mu\text{g/h}$  und  $0,1 \mu\text{g/h}$  Relaxin-2 ( $n = 8$ ). Angegeben wird der Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrollgruppe. Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

## 4.6. Oxidativer Stress *in vitro*

### 4.6.1. L-012 Chemilumineszenzassay

Reaktive Sauerstoffspezies wurden auch *in vitro* im humanen Zellmodell durch einen L-012 Chemilumineszenzassay erfasst. Wie in Kapitel 3.7.2 beschrieben, erfolgte die Messung nach 24-stündiger Behandlung mit Relaxin-2 (10 ng/ml) oder dreistündiger Inkubation mit Angiotensin II ( $10^{-6}$  M). Eine dritte Gruppe wurde sowohl mit Angiotensin II als auch mit Relaxin-2 behandelt. Die vierte Gruppe diente als Kontrollgruppe. Die Messwerte wurden in Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s) erfasst und auf die Zellzahl bezogen. Die Mittelwerte jeder Gruppe sind in Abb. 11 dargestellt. Durch die Zugabe von Angiotensin II in das Zellmedium wurde eine signifikant erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies induziert. Hier zeigten sich  $1062,0 \pm 76,4$  RLU/s ( $n = 7$ ). Durch Präinkubation mit Relaxin-2 konnte die Produktion von ROS signifikant reduziert werden ( $383,0 \pm 54,9$  RLU/s;  $n = 7$ ). Bei ausschließlicher Behandlung mit Relaxin-2 ( $324,0 \pm 88,2$  RLU/s;  $n = 8$ ) zeigte sich kein Unterschied zur Kontrolle ( $379,3$  RLU/s  $\pm 76,4$ ;  $n = 7$ ), während die reaktiven Sauerstoffspezies im Vergleich zur Behandlung mit Angiotensin II signifikant niedriger waren.

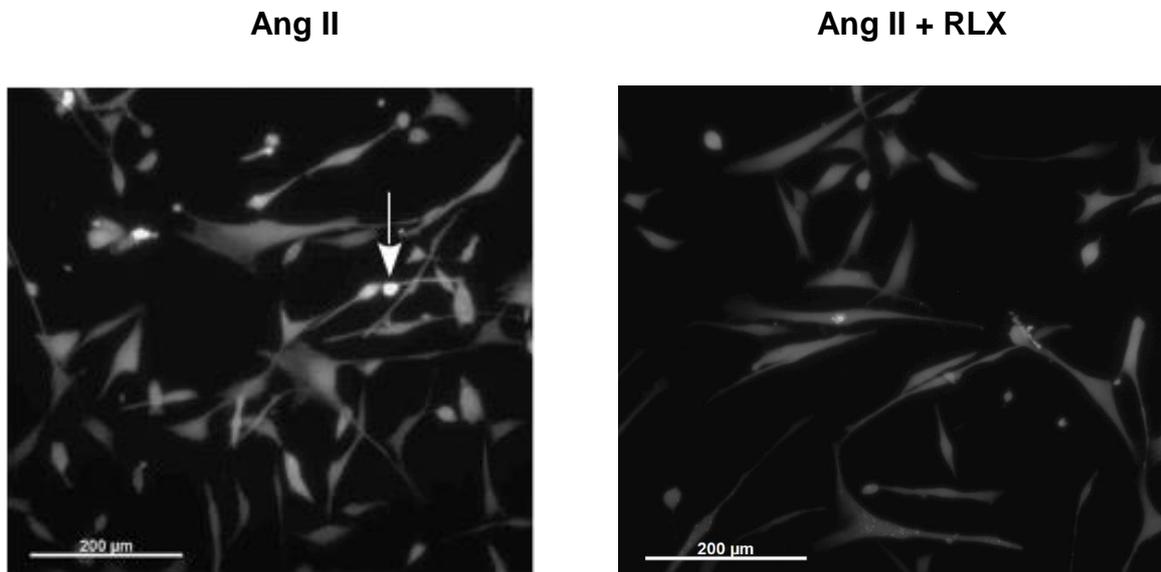


**Abb. 11:** Messung reaktiver Sauerstoffspezies *in vitro* an HCASMCs durch L-012 Chemilumineszenz nach 24 h Inkubation mit Relaxin-2 und/oder 3 h Angiotensin II bzw. in der Kontrollgruppe

Die dreistündige Behandlung mit Angiotensin II ( $1062,0 \pm 76,4$  RLU/s;  $n = 7$ ) führt zur gesteigerten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies im Vergleich zur Kontrolle ( $379,3 \pm 76,4$  RLU/s;  $n = 7$ ). Eine zusätzliche Relaxin-2-Behandlung 21 Stunden vor Zugabe von Angiotensin II ( $383,0 \pm 54,9$  RLU/s;  $n = 7$ ) verhindert die Steigerung der ROS-Produktion, während eine alleinige Behandlung mit Relaxin-2 ( $324,0 \pm 88,2$  RLU/s;  $n = 8$ ) keinen Effekt hatte. Dargestellt sind die relativen Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s) bezogen auf die Zellzahl. Angegeben wird der Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$ . Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

#### 4.6.2. DCF-Messung

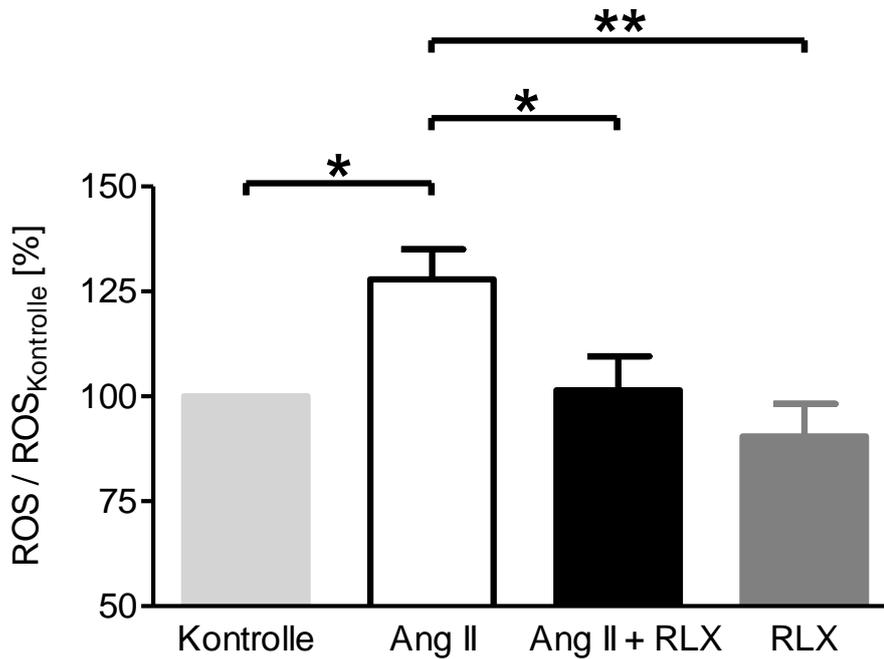
Die intrazelluläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in HCASMCs konnte mit Hilfe einer DCF-Messung visualisiert werden. Abb. 12 zeigt repräsentative Bilder der DCF-Messung.



**Abb. 12:** Repräsentative Bilder der DCF-Messung an HCASMCs

Es erfolgte eine dreistündige Inkubation ausschließlich mit Angiotensin II ( $10^{-6}$  M) bzw. zusätzlich 21 Stunden vorher eine Präinkubation mit Relaxin-2 (10 ng/ml). HCASMCs, die ausschließlich mit Angiotensin II stimuliert wurden, zeigen eine deutlich erhöhtes DCF-Fluoreszenzsignal (beispielhaft mit einem Pfeil markiert). Die Präinkubation mit Relaxin-2 führte zur Aufhebung dieses Effekts.

Die gemessenen Fluoreszenzsignale wurden in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt. In Abb. 13 wird die relative Produktion reaktiver Sauerstoffspezies als prozentualer Anteil der Kontrolle ( $ROS/ROS_{\text{Kontrolle}}$ ) dargestellt. Die Zellen, die drei Stunden ausschließlich mit Angiotensin II ( $10^{-6}$  M) stimuliert wurden, zeigten eine um  $27,9 \pm 7,2$  % erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Präinkubation mit Relaxin-2 vor Zugabe von Angiotensin ( $101,5 \pm 8,1$  %), konnte diesen Effekt aufheben. Die basale Produktion reaktiver Sauerstoffspezies betrug nach Behandlung mit Relaxin-2  $90,5 \pm 7,7$  % der Kontrollgruppe und konnte somit nicht beeinflusst werden.



**Abb. 13:** Messung reaktiver Sauerstoffspezies *in vitro* an HCASMCs in einem DCF-Assay (n = 4)

Dargestellt ist die relative Produktion reaktiver Sauerstoffspezies als prozentualer Anteil der Kontrolle (ROS / ROS<sub>Kontrolle</sub>). Eine dreistündige Inkubation mit Angiotensin II führt zur signifikant erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (127,9 ± 7,2 %). Eine Präinkubation mit Relaxin-2, 21 Stunden vor Zugabe von Angiotensin II verhindert diesen Anstieg signifikant (101,5 ± 8,1 %). Die alleinige Behandlung mit Relaxin-2 ergab keine signifikante Veränderung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (90,5 ± 7,7 %) gegenüber der Kontrolle. Angegeben wird der Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05. \*\*p < 0,01. Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

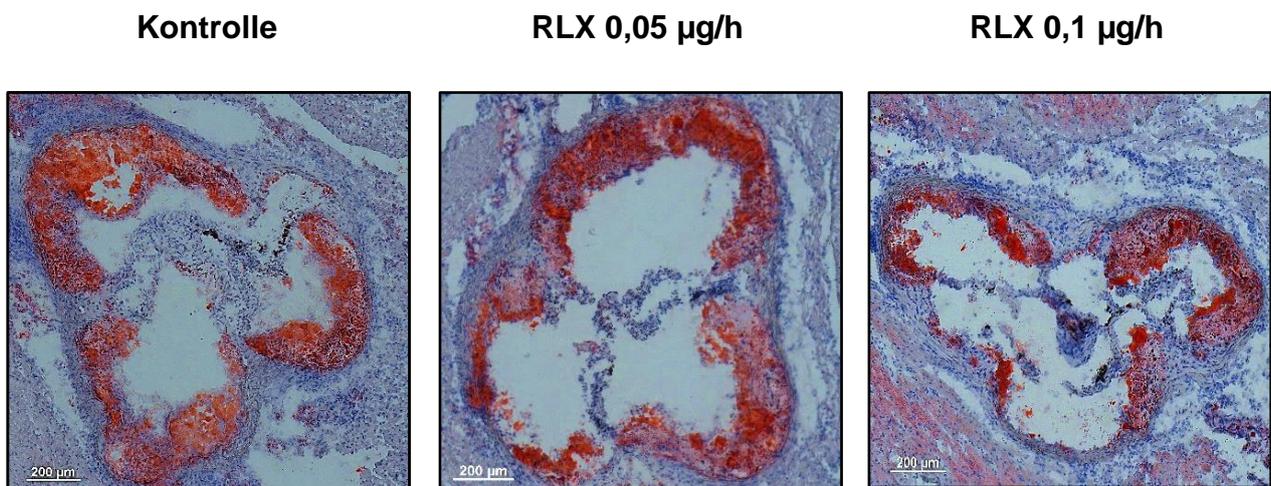
#### 4.7. Progression und Komposition der atherosklerotischen Plaques

Der Einfluss einer Behandlung mit Relaxin-2 auf Plaqueprogression und -komposition wurde in der vorliegenden Studie erstmals untersucht. Die atherosklerotischen Läsionen wurden anhand einer Ölrot-Färbung auf ihre Ausdehnung und den Läsionstyp untersucht. Die Komposition der atherosklerotischen Plaques wurde durch Siriusrot-, AS-MAC-, CD3-, CD68- und Ly6G-Färbung analysiert.

##### 4.7.1. Ausdehnung und Läsionstyp der atherosklerotischen Plaques

###### 4.7.1.1. Ölrot-Färbung: Darstellung der atherosklerotischen Läsionen

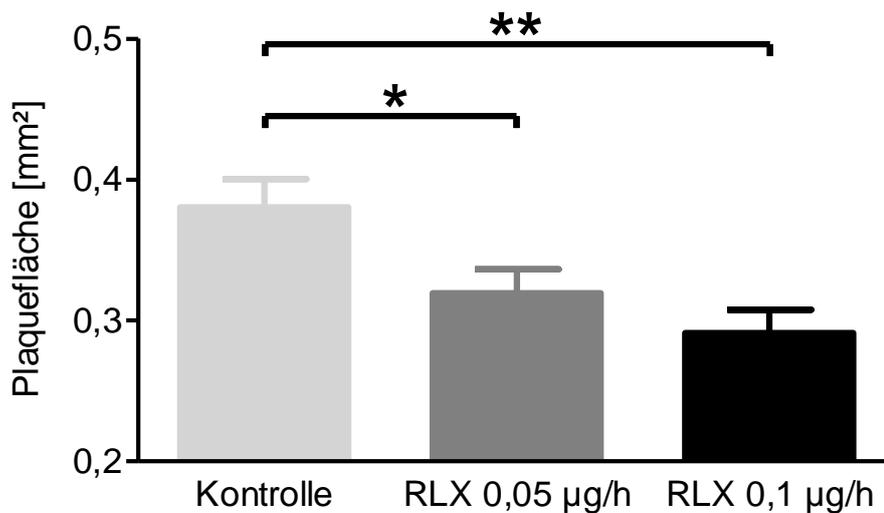
Die Quantifizierung atherosklerotischer Plaques erfolgte durch Vermessung der lipidgefärbten Fläche nach einer Ölrot-Färbung (siehe Kapitel 3.8.2.1). In Abb. 14 ist für jede Gruppe ein repräsentativer histologischer Querschnitt durch die Aortenwurzel dargestellt.



**Abb. 14:** Repräsentative Querschnitte der Aortenwurzel in Ölrot-Färbung zur Darstellung der atherosklerotischen Plaquebildung in *ApoE<sup>-/-</sup>*-Mäusen, Eigene Darstellungen in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016)

Die atherosklerotischen Läsionen wurden zum einem als absolute Fläche der Plaques, zum anderen prozentual als Anteil am Gefäßquerschnitt erfasst. Abb. 15 stellt die absolute Plaquefläche in den drei Versuchsgruppen dar. Die Kontrollgruppe lieferte eine absolute Plaquefläche von  $0,38 \pm 0,02 \text{ mm}^2$  ( $n = 5$ ). Dem gegenüber stehen die beiden

Relaxin-2 behandelten Gruppen mit  $0,32 \pm 0,02 \text{ mm}^2$  in der Gruppe mit  $0,05 \mu\text{g/h}$  Relaxin-2-Behandlung ( $n = 8$ ;  $p = 0,047$  vs. Kontrolle) und  $0,29 \pm 0,02 \text{ mm}^2$  in der Gruppe mit  $0,1 \mu\text{g/h}$  Relaxin-2-Behandlung ( $n = 6$ ;  $p = 0,002$  vs. Kontrolle;  $p = 0,490$  vs.  $0,05 \mu\text{g/h}$  RLX). Dies entspricht einer signifikant reduzierten absoluten Plaquefläche gegenüber der Kontrollgruppe unter Behandlung mit Relaxin-2.

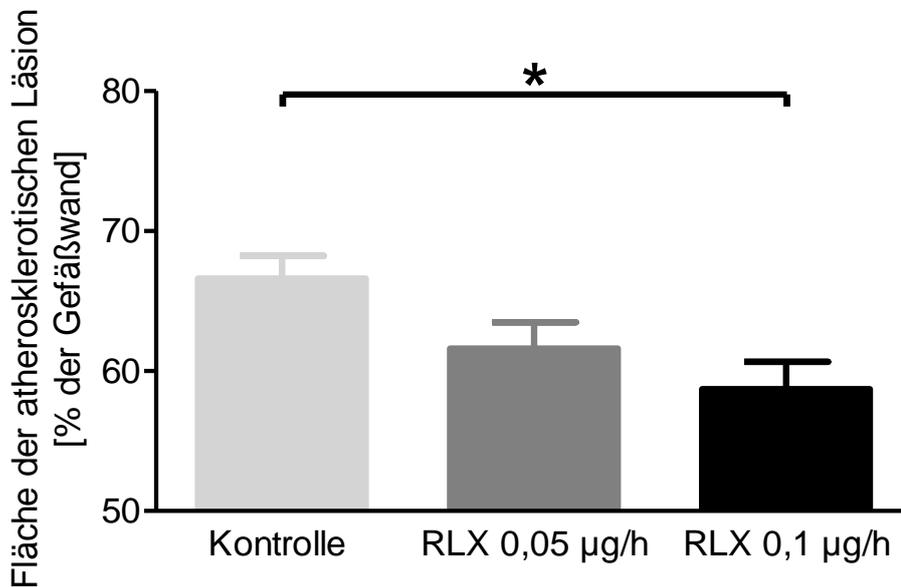


**Abb. 15:** Quantitative Analyse der Bildung atherosklerotischer Plaques in *ApoE*<sup>-/-</sup> Mäusen nach sechswöchiger fett- und cholesterinreicher Diät

Die Darstellung erfolgt als absolute Plaquefläche ( $\text{mm}^2$ ) der Kontrollgruppe und der Gruppen mit vierwöchiger Behandlung mit  $0,05 \mu\text{g/h}$  oder  $0,1 \mu\text{g/h}$  Relaxin-2. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der Plaquefläche in beiden Relaxin-2 behandelten Gruppen [ $0,05 \mu\text{g/h}$  RLX:  $0,32 \pm 0,02 \text{ mm}^2$  ( $n = 8$ ;  $p = 0,047$  vs. Kontrolle) und  $0,1 \mu\text{g/h}$  RLX:  $0,29 \pm 0,02 \text{ mm}^2$  ( $n = 6$ ;  $p = 0,002$  vs. Kontrolle)] gegenüber der Kontrollgruppe ( $0,38 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ ,  $n = 5$ ). Angegeben wird der Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle. \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle. Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

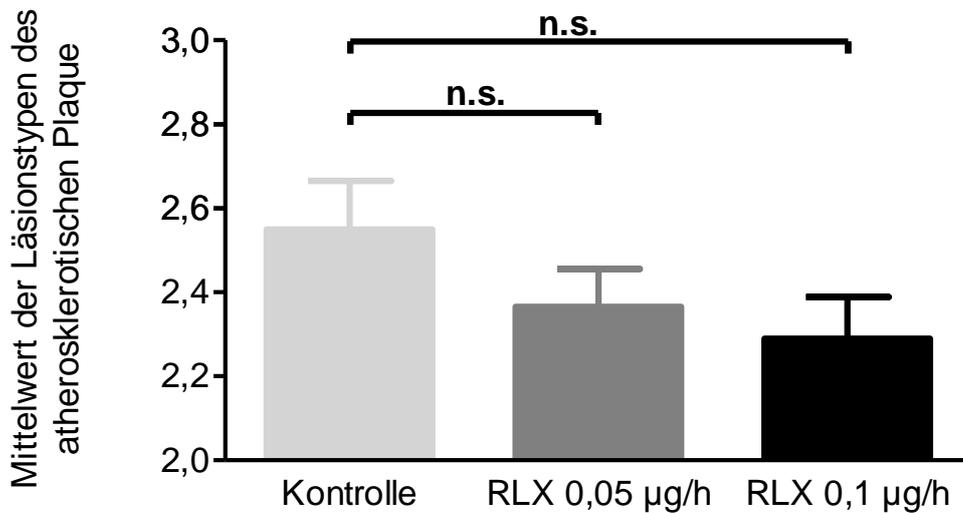
Bei der Analyse des relativen Anteils der atherosklerotischen Läsionen am gesamten Gefäßquerschnitt (Abb. 16) ergab sich in der Gruppe mit der hochdosierten Relaxin-2-Behandlung ( $0,1 \mu\text{g/h}$  RLX) mit  $58,70 \pm 1,97 \%$  ( $n = 6$ ;  $p = 0,010$  vs. Kontrolle) eine signifikante Reduktion gegenüber der Kontrollgruppe ( $66,61 \pm 1,62 \%$ ,  $n = 5$ ). Gleichwohl zeigte sich auch in der Gruppe mit der niedrigdosierten Relaxin-2-Behandlung eine Ten-

denz zu einem verminderten relativen Plaqueteil [0,05 µg/h RLX: 61,60 ± 1,88 % (n = 8; p = 0,144 vs. Kontrolle)].



**Abb. 16:** Quantitative Analyse der Bildung atherosklerotischer Plaques  
 Dargestellt ist der Anteil der Fläche atherosklerotischer Läsionen an der Fläche der Gefäßwand (%) von *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach sechswöchiger fett- und cholesterinreicher Diät. Nach vierwöchiger Relaxin-2-Behandlung mit 0,1 µg/h ergab sich mit einem Anteil der atherosklerotischen Läsion von 58,70 ± 1,97 % der Gefäßwand (n = 6; p = 0,010 vs. Kontrolle) eine signifikante Reduktion der relativen Plaqueläche gegenüber der Kontrollgruppe (66,61 ± 1,62 %; n = 5). Es lag keine signifikante Reduktion in der Gruppe mit der niedrigdosierten Relaxin-2-Behandlung vor [0,05 µg/h RLX: 61,60 ± 1,88 % (n = 8; p = 0,144 vs. Kontrolle)]. Angegeben wird der Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Kontrolle. Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

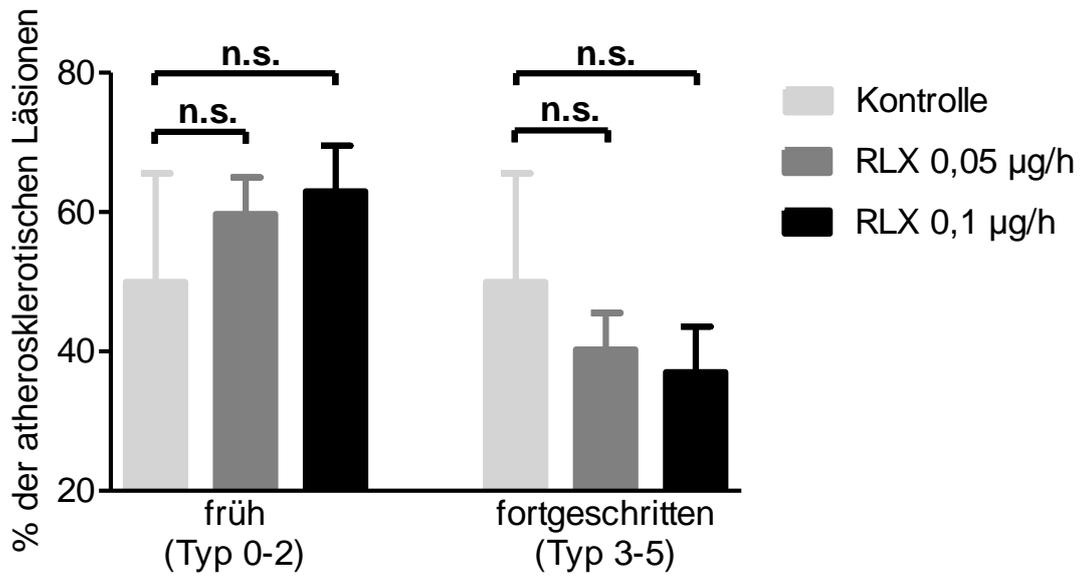
Die atherosklerotischen Läsionen wurden anhand der Ölrot-Färbung, nach der in Kapitel 3.8.2.1 beschriebenen, für Mäuse adaptierten Klassifikation der Atherosklerose, entsprechend des Läsionstyps eingeteilt. In Abb. 17 ist der Mittelwert der Läsionstypen innerhalb der mit Relaxin-2 in einer Konzentration von 0,05 µg/h bzw. 0,1 µg/h behandelten Gruppe bzw. in der Kontrollgruppe dargestellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab sich keine signifikante Reduktion des Stadiums der atherosklerotischen Läsion. Tendenziell scheinen die atherosklerotischen Läsionen in Mäusen unter Behandlung mit Relaxin-2 weniger weit fortgeschritten.



**Abb. 17:** Einteilung der atherosklerotischen Läsionen

Die Darstellung erfolgt als Mittelwert des Läsionstyps der atherosklerotischen Läsion in *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach sechs Wochen fett- und cholesterinreicher Diät in der Kontrollgruppe und den Gruppen mit vierwöchiger Behandlung mit 0,05 µg/h oder 0,1 µg/h Relaxin-2. Die Einteilung wurde anhand der Klassifikation der Stadien der Atherosklerose adaptiert für Mäuse nach van Vlijment et al. (1994) vorgenommen. Angegeben wird der Mittelwert ± SEM. n.s. nicht signifikant. Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

Abb. 18 zeigt die Einteilung in frühe atherosklerotische Läsionen (Typ 0-2) und fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen (Typ 3-5) (Volger et al., 2001) innerhalb der drei verschiedenen Gruppen. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen, jedoch zeigt auch hier die Kontrollgruppe den stärksten Trend zur fortgeschrittenen Läsion.



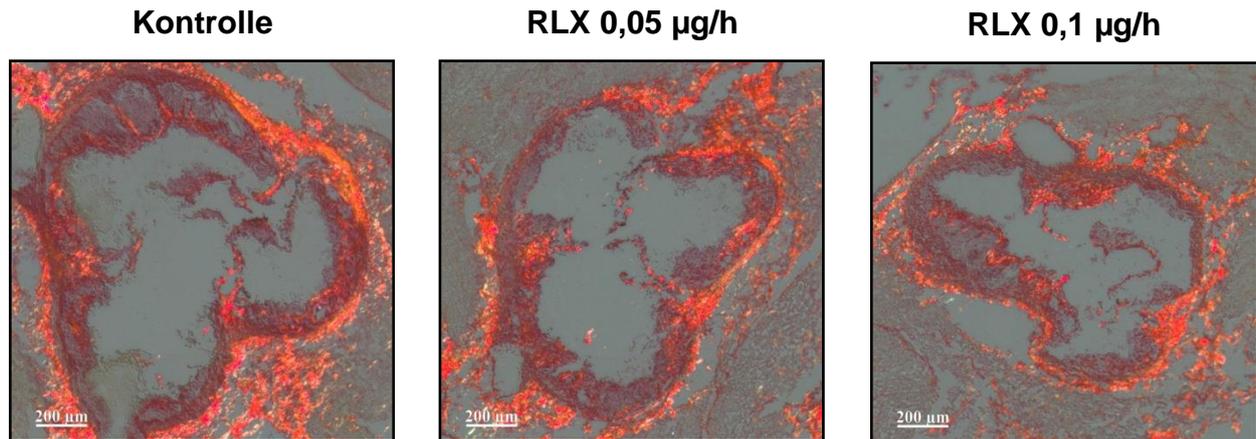
**Abb. 18:** Effekt der Relaxin-2-Behandlung auf die Verteilung in frühe (Typ 0-2) oder fortgeschrittene (Typ 3-5) atherosklerotische Läsionen

Die Analyse fand statt an *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach sechs Wochen fett- und cholesterinreicher Diät getrennt für Kontrollgruppe und die Gruppen unter vierwöchiger Behandlung mit 0,05 µg/h bzw. 0,1 µg/h Relaxin-2. Die Einteilung in frühe (Typ 0-2) und fortgeschrittene (Typ 3-5) atherosklerotische Läsionen erfolgte nach van Vlijment et al. (1994). Alle Werte sind angegeben als Mittelwert ± SEM und in Prozent der Gruppengröße. n.s. nicht signifikant. Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

#### 4.7.2. Komposition der atherosklerotischen Plaques

##### 4.7.2.1. Siriusrot-Färbung

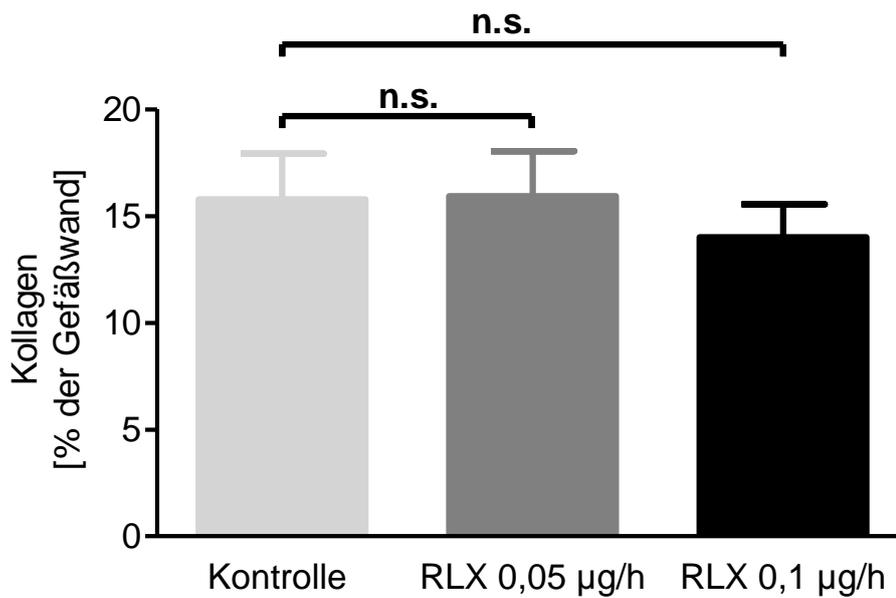
Kollagene Strukturen konnten durch die in Kapitel 3.8.3.1 beschriebene Siriusrot-Färbung dargestellt werden. Abb. 19 zeigt typische Querschnitte der Aortenwurzel in Siriusrot-Färbung. Die kollagen-positive Fläche ist rot eingefärbt.



**Abb. 19:** Repräsentative histologische Querschnitte der Aortenwurzel in Siriusrot-Färbung

Dargestellt sind kollagene Strukturen in *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach sechs Wochen fett- und cholesterinreicher Diät in der Kontrollgruppe und in den Gruppen mit vierwöchiger Behandlung mit 0,05 µg/h oder 0,1 µg/h Relaxin-2

Der prozentuale Anteil der kollagen-positiven Fläche am Gesamtquerschnitt der Gefäßwand wurde ermittelt (Abb. 20). Durch die kontinuierliche Zufuhr von Relaxin-2 wurde keine signifikante Veränderung des Kollagenanteils herbeigeführt.

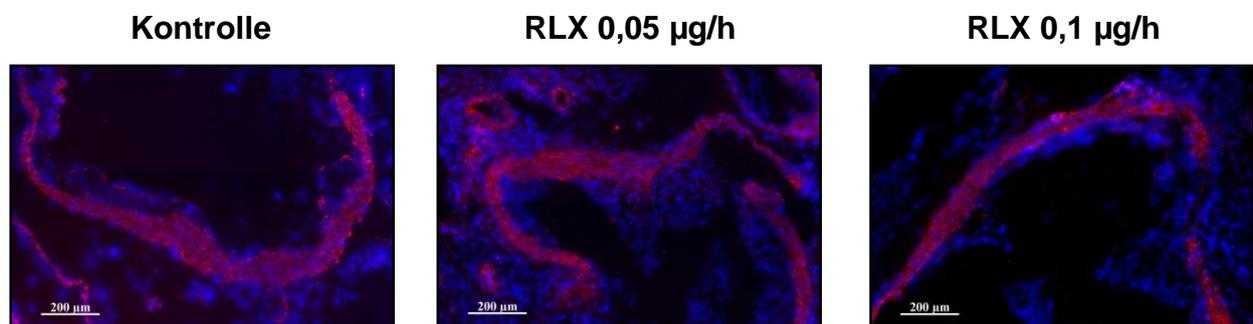


**Abb. 20:** Quantitative Analyse des Kollagengehalts

Analysiert wurden histologische Querschnitte der Aortenwurzeln von *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach sechs Wochen fett- und cholesterinreicher Diät in der Kontrollgruppe und den Gruppen mit vierwöchiger Behandlung mit 0,05 µg/h oder 0,1 µg/h Relaxin-2. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Kollagen an der Gefäßwand. Angegeben wird der Mittelwert ± SEM. n.s. nicht signifikant. Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

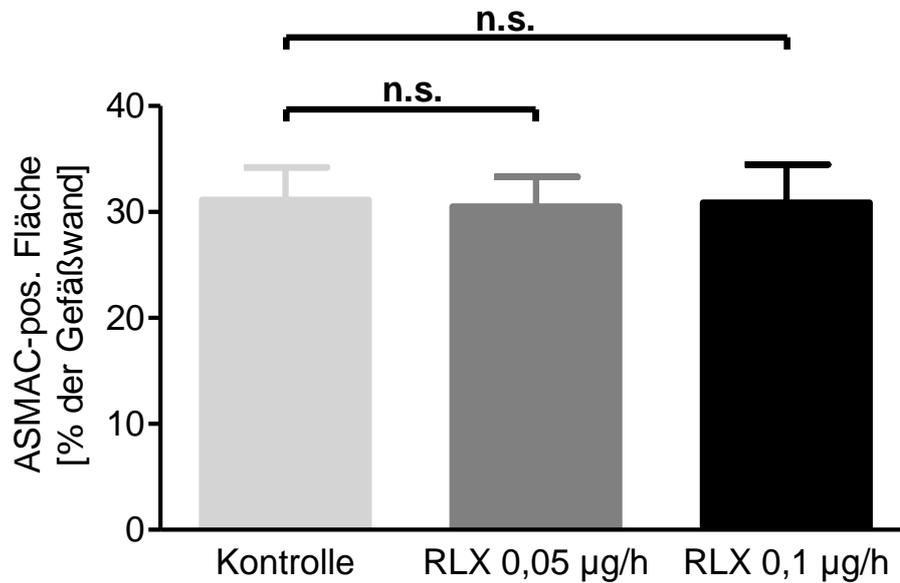
4.7.2.2. ASMAC-Färbung

Die Darstellung glatter Muskelzellen erfolgte durch die unter 3.8.3.2 geschilderte ASMAC-Färbung. Abb. 21 zeigt repräsentative histologische Querschnitte der Aortenwurzel für jede der drei Versuchsgruppen. Die ASMAC-positive Fläche ist deutlich in violett erkennbar.



**Abb. 21:** Repräsentative histologische Querschnitte der Aortenwurzel nach ASMAC-Färbung zur Darstellung des Gehalts an glatten Muskelzellen der Gefäßwand in *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen

Der prozentuale Anteil der ASMAC-positiven Fläche am Gefäßquerschnitt wurde ermittelt. Für jede Gruppe wurden die Mittelwerte berechnet und in Abb. 22 dargestellt. Hierbei fand sich zwischen den drei Gruppen kein Unterschied.

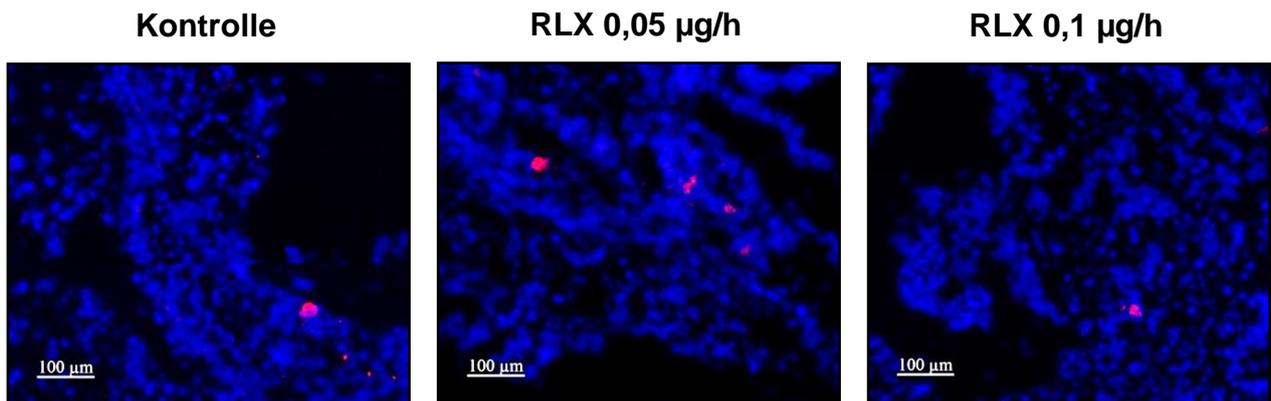


**Abb. 22:** Quantitative Analyse des Gehalts glatter Muskelzellen

Die Quantifizierung wurde an histologischen Querschnitten durch die Aortenwurzel von *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäuse nach sechs Wochen fett- und cholesterinreicher Diät durchgeführt. Die Darstellung erfolgt als Anteil der ASMAC-positiven Fläche am Gesamtquerschnitt des Gefäßes in der Kontrollgruppe und nach vierwöchiger Behandlung mit Relaxin-2 in einer Konzentration von 0,05 µg/h bzw. 0,1 µg/h. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert ± SEM. n.s. nicht signifikant. Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

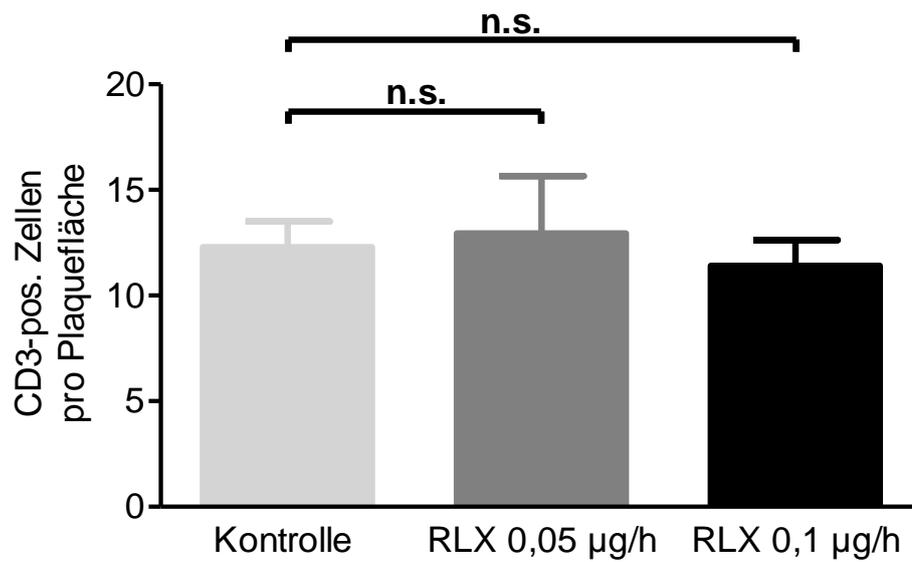
#### 4.7.2.3. CD3-Färbung

Die quantitative Beurteilung der T-Zell-Infiltration erfolgte durch eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen den Marker CD3 (siehe Kapitel 3.8.3.3). In Abb. 23 fallen die T-Zellen in den histologischen Querschnitten der Aortenwurzel durch ihre violette Farbe ins Auge.



**Abb. 23:** Repräsentative histologische Querschnitte der Aortenwurzel von *ApoE*<sup>-/-</sup> Mäusen in CD3-Färbung zur Darstellung der T-Zell-Infiltration

Es wurde die Anzahl der T-Zellen pro Plauefläche bestimmt. Es zeigte sich keine Beeinflussung des Vorkommens von T-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit Relaxin-2 (Abb. 24).

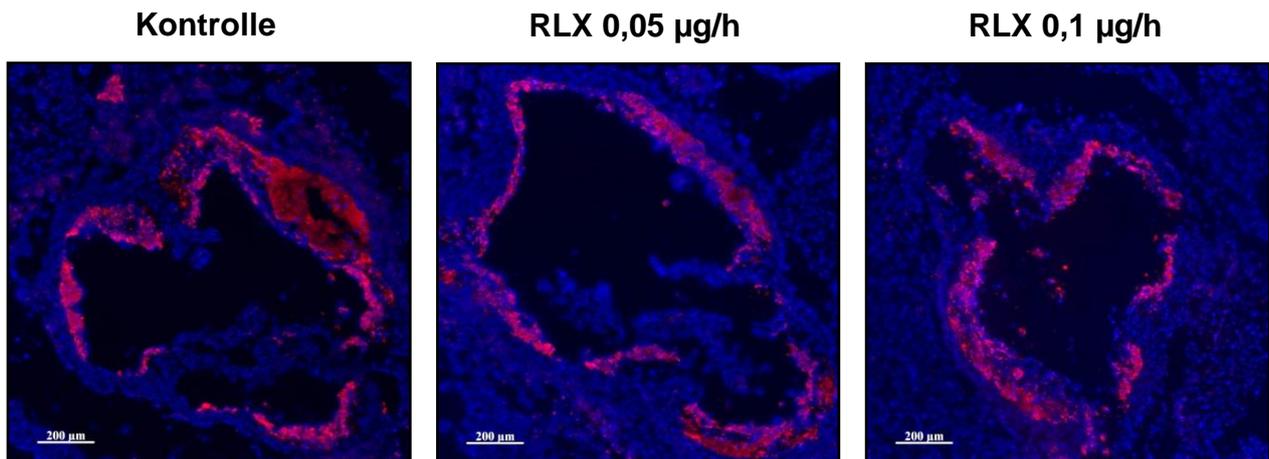


**Abb. 24:** Quantitative Analyse der T-Zell-Infiltration

Histologische Querschnitte der Aortenwurzeln von *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden nach sechs Wochen fett- und cholesterinreicher Diät in der Kontrollgruppe und den Gruppen mit vierwöchiger Behandlung mit 0,05 µg/h oder 0,1 µg/h Relaxin-2 analysiert. Die Darstellung zeigt CD3-positive Zellen pro Plauefläche. Angegeben wird der Mittelwert ± SEM. n.s. nicht signifikant. Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

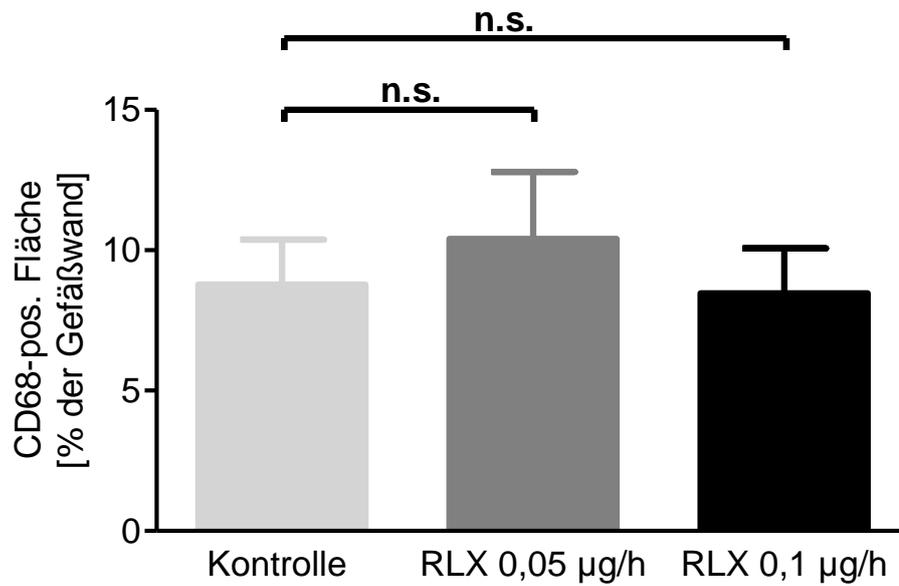
#### 4.7.2.4. CD68-Färbung

Die Akkumulation von Makrophagen wurde durch die in Kapitel 3.8.3.4 beschriebene immunhistochemische Färbung mit CD68-Antikörpern dargestellt. Abb. 25 zeigt für jede Gruppe einen repräsentativen histologischen Querschnitt durch die Aortenwurzel. Durch Makrophagen infiltrierte Bereiche sind deutlich violett erkennbar.



**Abb. 25:** Repräsentative histologische Querschnitte der Aortenwurzel nach CD68-Färbung zur Darstellung von Makrophagenakkumulation in *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach sechs Wochen fett- und cholesterinreicher Diät

Es erfolgte eine Quantifizierung der CD68-positiven Fläche und Bezug auf die gesamte Gefäßfläche. Bezüglich der Ansammlung von Makrophagen in der Gefäßwand bestand zwischen den drei verschiedenen Versuchsgruppen kein Unterschied (Abb. 26).

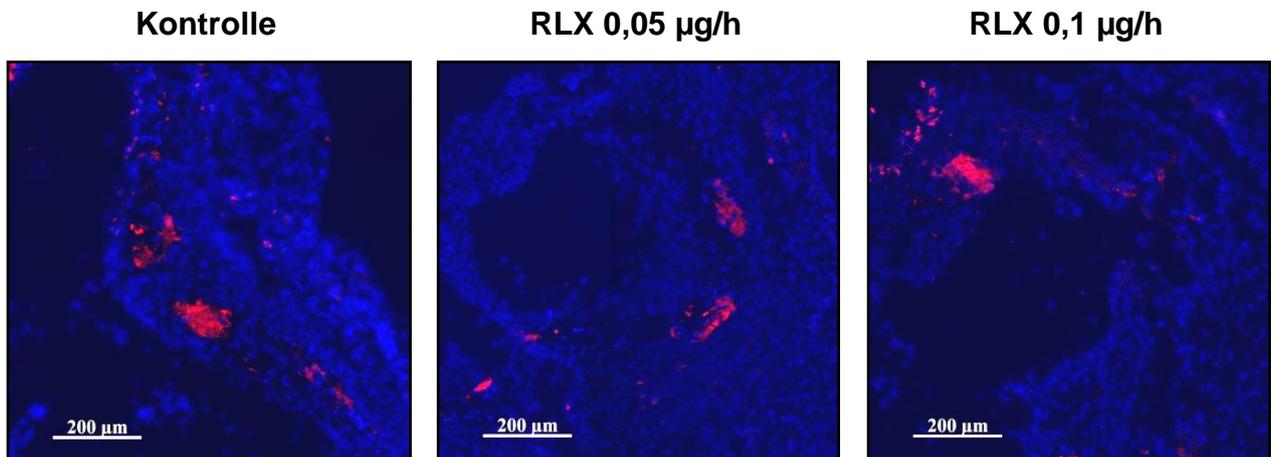


**Abb. 26:** Prozentualer Anteil der CD68-positiven Fläche an der Gefäßwand in *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen

Die Quantifizierung erfolgte nach sechswöchiger fett- und cholesterinreicher Diät in der Kontrollgruppe und zusätzlicher vierwöchiger Behandlung mit Relaxin-2 in einer Konzentration von 0,05 µg/h bzw. 0,1 µg/h. Angegeben wird der Mittelwert ± SEM. n.s. nicht signifikant. Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

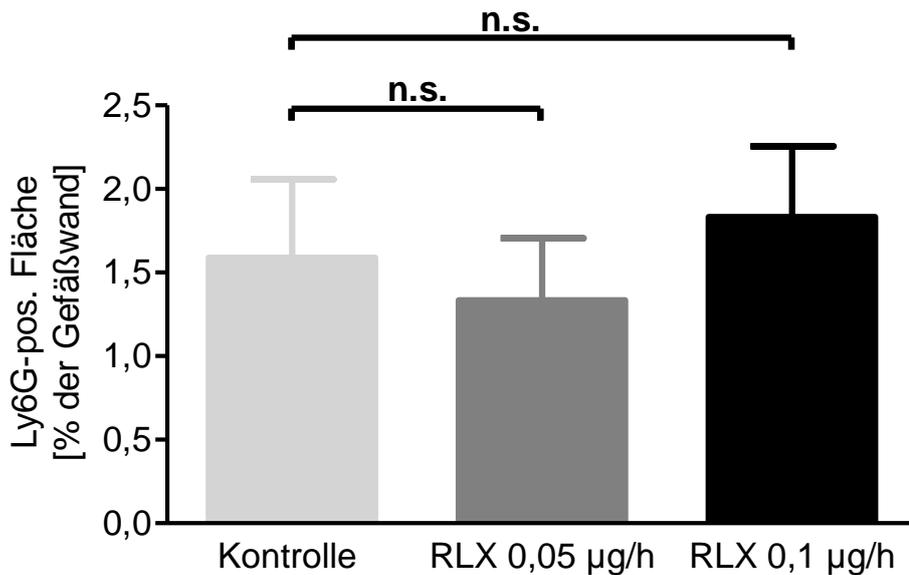
#### 4.7.2.5. Ly6G-Färbung

Neutrophile Granulozyten wurden durch die Ly6G-Färbung (siehe Kapitel 3.8.3.5) erfasst. Die violetten, Ly6G-positiven Bereiche wurden quantifiziert. Repräsentative Aufnahmen auf Höhe der Aortenwurzel sind in Abb. 27 dargestellt.



**Abb. 27:** Repräsentative histologische Querschnitte der Aortenwurzel nach Ly6G-Färbung zur Darstellung der Neutrophilenakkumulation in *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach sechs Wochen fett- und cholesterinreicher Diät

In Abb. 28 ist der Quotient aus Ly6G-positiver Fläche und der Gefäßfläche dargestellt. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der Infiltration durch neutrophile Granulozyten zwischen den drei Gruppen.

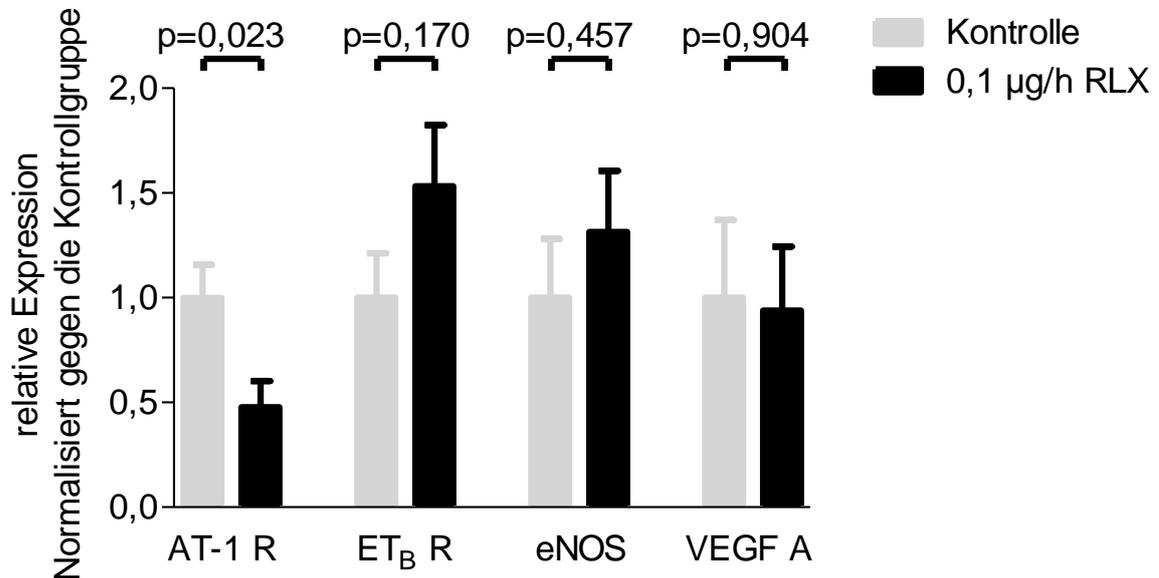


**Abb. 28:** Quantitative Analyse der Akkumulation von Neutrophilen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ly6G-positive Fläche an der gesamten Gefäßwand von *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach sechs Wochen fett- und cholesterinreicher Diät, sowie nach vierwöchiger Behandlung mit Relaxin-2 in einer Konzentration von 0,05 µg/h bzw. 0,1 µg/h und in der Kontrollgruppe. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert ± SEM. n.s. nicht signifikant. Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

#### 4.8. Genexpressionsanalyse

Die Expression von Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1a, Endothelin-Rezeptor Typ B, endothelialer NO-Synthase und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A, mögliche Angriffspunkte der Wirkung von Relaxin-2, wurden mittels Real-time PCR quantitativ analysiert (siehe Kapitel 3.8.3.5). Die Extraktion der RNA erfolgte aus dem Aortenbogen der Versuchstiere (n = 6-7). Abb. 29 stellt die relative mRNA Expression der genannten Zielstrukturen bezogen auf die Expression der jeweiligen untersuchten Zielstruktur in der Kontrollgruppe dar. Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1a (AT-1 R) wurde in der Gruppe mit einer Relaxin-2-Behandlung von 0,1 µg/h signifikant herabreguliert. In dieser Gruppe zeigte sich eine Expression von nur  $48 \pm 12$  % ( $p = 0,023$ ) der Kontrollgruppe. Für die übrigen Zielstrukturen zeigte sich keine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe. Bei einer Relaxin-2-Behandlung von 0,1 µg/h betrug die Expression des

ET<sub>B</sub>-Rezeptors  $153 \pm 29$  % ( $p = 0,170$ ), der endothelialen NO-Synthase  $131 \pm 29$  % ( $p = 0,457$ ) und von VEGF A  $94 \pm 31$  % ( $p = 0,904$ ) der Expression der Kontrollgruppe.



**Abb. 29:** Relative mRNA-Expression in aortalen Gewebe

Analysiert wurde Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1a (AT-1 R; Kontrolle:  $1,00 \pm 0,16$ , RLX  $0,1 \mu\text{g/h}$ :  $0,48 \pm 0,12$ ), Endothelin-Rezeptor Typ B (ET<sub>B</sub> R; Kontrolle:  $1,00 \pm 0,21$ , RLX  $0,1 \mu\text{g/h}$ :  $1,53 \pm 0,29$ ), endotheliale NO-Synthase (eNOS; Kontrolle:  $1,00 \pm 0,28$ , RLX  $0,1 \mu\text{g/h}$ :  $1,31 \pm 0,29$ ) und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A (VEGF A; Kontrolle:  $1,00 \pm 0,37$ , RLX  $0,1 \mu\text{g/h}$ :  $0,94 \pm 0,31$ ) in *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach sechs Wochen fett- und cholesterinreicher Diät und vierwöchiger Behandlung mit Relaxin-2 in einer Konzentration von  $0,1 \mu\text{g/h}$  bzw.  $0,05 \mu\text{g/h}$  und in der Kontrollgruppe. Angegeben wird der Mittelwert  $\pm$  SEM. Eigene Daten in modifizierter Darstellung nach (Tiyerili et al., 2016).

## 5. Diskussion

Die Studie „Gefäßprotektive Effekte von humanem rekombinantem Relaxin-2 im Atherosklerose-Mausmodell“ untersuchte erstmals den Effekt von Relaxin-2 auf Atherosklerose. Relaxin-2 zeigte dabei atheroprotektive Eigenschaften. Die Entwicklung atherosklerotischer Plaques konnte durch eine Relaxin-2-Behandlung signifikant reduziert werden. Relaxin-2 zeigte eine antiinflammatorische Wirkung und verbesserte die endotheliale Dysfunktion von *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach sechswöchiger fett- und cholesterinreicher Diät. *Ex vivo* und *in vitro* konnten wir zeigen, dass Relaxin-2 oxidativen Stress zu reduzieren vermag. Außerdem wurde die Expression des Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1a durch die Relaxin-2-Behandlung herabreguliert (Tiyerili et al., 2016). Konsequenterweise sollte Relaxin-2 als eine mögliche zukünftige Therapie der Atherosklerose und durch Atherosklerose verursachte Erkrankungen in Betracht gezogen werden.

Die Experimente wurden an dem etablierten *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mausmodell der Atherosklerose durchgeführt. Durch den genetischen Knockout, unterstützt durch eine fett- und cholesterinreiche Diät, kommt es zur spontanen Entwicklung von Hypercholesterinämie, atherosklerotischen Läsionen und zur Entstehung endothelialer Dysfunktion (Davignon, 2005; d'Uscio et al., 2001; Meir und Leitersdorf, 2004; Meyrelles et al., 2011).

Die erhobenen metabolischen Faktoren und kardiovaskulären Risikoparameter Körpergewicht, Cholesterinwert, Nüchtern-Blutzucker, Blutdruck und Herzfrequenz waren zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen vergleichbar, denen unterschiedliche Konzentrationen von Relaxin-2 verabreicht wurden. Somit war die Vergleichbarkeit der verschiedenen Gruppen gewährleistet. Weiterhin sind diese Parameter als Ursachen der gemessenen Effekte ausgeschlossen.

Die Relaxin-2-Plasmakonzentrationen wurden durch kontinuierliche Behandlung über osmotische Minipumpen herbeigeführt. Die Konzentrationen lagen weitaus höher als die physiologischen murinen Relaxin-2-Konzentration in der Schwangerschaft (Ng et al., 2006; Soh et al., 2012). Konzentrationen dieser Größenordnung wurden jedoch bereits erprobt (Samuel et al., 2003). Die Verwendung von Serelaxin (Novartis, Serelaxin (RLX030)), der rekombinanten Form des humanen Relaxin-2 in Mäusen ist ebenfalls weit erprobt (Ng et al., 2016; Jelinic et al., 2014; Leo et al., 2014).

Auch in der Behandlung von Patienten wurde bereits Relaxin-2 erprobt. In der RELAX-AHF Studie zeigte sich im prospektiven Sicherheitsendpunkt „180-Tage Mortalität nach akutem Herzversagen“, eine Reduktion der Mortalität um 37 % (Teerlink et al., 2013). Dieses signifikante Ergebnis bezüglich des prospektiven Sicherheitsendpunkts sollte in der Folgestudie RELAX-AHF-2 überprüft werden. Hier wurden die primären Endpunkte „kardiovaskulärer Tod in den ersten 180 Tagen“ und „Verschlechterung der Herzinsuffizienz während der ersten fünf Tage“ bei Patienten mit akutem Herzversagen unter Therapie mit Relaxin-2 jedoch nicht signifikant verbessert (Novartis International AG, 2017).

### 5.1. Endotheliale Dysfunktion

Eine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand in der Evaluierung des Einflusses einer Relaxin-2-Behandlung auf endotheliale Dysfunktion. Die sechswöchige fett- und cholesterinreiche Diät induzierte eine endotheliale Dysfunktion in den *ApoE<sup>-/-</sup>*-Mäuse. Die Behandlung mit Relaxin-2 konnte diese signifikant reduzieren. In Organbad-Experimenten zeigte sich eine signifikante Verbesserung der endothelabhängigen Carbachol-induzierten Vasodilatation in den Gruppen mit Relaxin-2-Behandlung (Abb. 6). Die endothelunabhängige Vasodilatation durch Nitroglycerin blieb unbeeinträchtigt (Abb. 7).

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit bisherigen Studien. Dort konnte Relaxin-2 durch TNF- $\alpha$  (Dschietzig et al., 2012) sowie durch hohe Glukosespiegel hervorgerufene (Ng et al., 2016) endotheliale Dysfunktion verbessern. Weiterhin ist dieses Ergebnis mit den Beobachtungen durch Pini et al. (2016) vereinbar. Hier wurde kürzlich die protektive Wirkung von Relaxin-2 *ex vivo* bei der Entstehung von endothelialer Dysfunktion, aortalem Remodeling und Herabregulierung der eNOS durch Zigarettenrauch demonstriert (Pini et al., 2016).

Relaxin-2 wirkt der Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion und oxidativem Stress entgegen (Du et al., 2010; Sasser et al., 2014). Das Renin-Angiotensin-System spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Atherosklerose. Es ist bekannt, dass Angiotensin II proinflammatorisch auf Ebene der Gefäßwand wirkt und eine gesteigerte Produktion inflammatorischer Zytokine und reaktiver Sauerstoffspezies sowie die vermehrte

Expression von Adhäsionsmolekülen hervorruft (Tedgui und Mallat, 2006). Übereinstimmend damit beobachteten wir eine Herabregulierung der Expression von Angiotensin-II-Rezeptoren Typ 1a (Abb. 29). Im Einklang hiermit konnten in dieser Studie die Aufhebung des Angiotensin II-induzierten oxidativen Stress durch Präinkubation von HCASMCs mit Relaxin-2 in *in-vitro*-Experimente gezeigt werden (Abb. 11 und Abb. 12).

Weiterhin wirkt Relaxin-2 auch der ET-1-vermittelten Vasokonstriktion entgegen (Dschietzig et al., 2003). Das vaskuläre Endothelin-System ist ebenfalls in die Entwicklung von Atherosklerose involviert (Li et al., 2013; Mazzuca und Khalil, 2012). Neben seiner vasokonstriktorisches Wirkung über den ET<sub>A</sub>-Rezeptor (Galie, 2004) spielt ET-1 eine Rolle bei der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und Inflammation (Li et al., 2013). Es ist somit wahrscheinlich, dass die Effekte der Relaxin-2-Behandlung zumindest teilweise auf dem Antagonismus der vasokonstriktorisches Wirkung des ET-1-Systems beruhen.

Neben dem besser erforschten zur Vasokonstriktion führenden ET<sub>A</sub>-Rezeptor des Endothelin-Systems gibt es weiterhin den ET<sub>B</sub>-Rezeptor, dessen Aktivierung auf Endothelzellen zur Vasodilatation und auf glatten Muskelzellen zur Vasokonstriktion führt. (Galie, 2004; Mazzuca und Khalil, 2012). Die Expression des ET<sub>B</sub>-Rezeptors auf Endothelzellen ist nach Inkubation mit Relaxin-2 erhöht (Dschietzig et al., 2003). Seine vasodilatatorische Wirkung wird über die Freisetzung NO, PGI<sub>2</sub> und endothelialen hyperpolarisierenden Faktor vermittelt. Weiterhin sorgt der ET<sub>B</sub>-Rezeptor der Endothelzellen für die Clearance von ET-1 (Mazzuca und Khalil, 2012; Bagnall et al., 2006). In Übereinstimmung hiermit konnte in Endothelzell-spezifischen ET<sub>B</sub>-Rezeptor Knockout-Mäusen eine endotheliale Dysfunktion, verminderte NO-Verfügbarkeit und erhöhte ET-1-Konzentrationen im Plasma festgestellt werden (Bagnall et al., 2006).

In dieser Studie konnte eine Tendenz zur Hochregulierung des ET<sub>B</sub>-Rezeptors erfasst werden (Abb. 29). Der ET<sub>B</sub>-Rezeptor ist überwiegend auf Endothelzellen und nur in geringer Dichte auf vaskulären glatten Muskelzellen vorhanden (Mazzuca und Khalil, 2012). Zur Analyse in der PCR wurde in dieser Studie jedoch die komplette Aorta verwendet und daher waren nicht nur Endothelzellen, sondern auch weitere Zellen u.a. vaskuläre glatte Muskelzellen in den Proben vorhanden. Dies könnte versuchsbedingt zur Abschwächung der messbaren Ausprägung der ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Expression geführt ha-

ben. Eine eindeutige Beantwortung der Frage nach dem Einfluss des ET-1-Systems ist in dieser Arbeit nicht möglich. In zukünftigen Studien wäre daher eine differenzierte Betrachtung von Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen bei der PCR-Analyse lohnenswert. Zusätzlich bedarf es weiterer Untersuchungen der Konzentrationen des zirkulierenden ET-1, um den Einfluss der ET-1 Clearance bewerten zu können.

Die vermittelnden Mechanismen der Vasodilatation durch Relaxin-2 sind zeitabhängig. In einer Studie von Leo et al. (2016) wurde die Aktivierung von Prostaglandin- und NO-Signalwegen in Abhängigkeit von der Dauer einer kontinuierlichen intravenösen Infusion von Relaxin-2 untersucht. Die endothelabhängige Relaxation in mesenterialen Arterien war in beiden Fällen signifikant verbessert. Dies äußerte sich durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Bradykinin. Bei 48-stündiger Relaxin-2-Infusion konnte eine vermehrte basale NOS-Aktivität in Verbindung mit einer vermehrten Expression der eNOS in mesenterialen Arterien von Ratten festgestellt werden. Bei 72-stündiger Relaxin-2-Infusion konnten diese Effekte nicht mehr festgestellt werden und es lagen Werte ähnlich zu denen der Kontrollmäuse vor. Jedoch gibt die Studie Grund zur Annahme, dass eine vermehrte Prostaglandin I<sub>2</sub>-Produktion, die Bradykinin-vermittelte Relaxation unterstützt und zur weiterhin verbesserten Endothelfunktion nach 72 Stunden Relaxin-2-Infusion beiträgt. Überraschenderweise konnte in dieser Studie jedoch nur eine Verbesserung der Endothelfunktion der Aorta nach 48 Stunden und nicht nach 72 Stunden Relaxin-2-Infusion festgestellt werden (Leo et al., 2016).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Leo et al. (2016) nach 72 Stunden, konnten auch wir nach der wesentlich längeren vierwöchigen Behandlungszeit keine vermehrte Expression der eNOS (Abb. 29) feststellen. In unserer Studie konnten wir hingegen nach vierwöchiger Freisetzung von Relaxin-2 eine eindeutige Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation (Abb. 6) feststellen. Unter Hinzuziehung von weiteren Studien (Leo et al., 2014) deutet dies auf eine Veränderung der Wirkungsmechanismen von Relaxin-2 in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer hin.

## **5.2. Inflammation und oxidativer Stress**

Weiterhin beschäftigte sich diese Arbeit mit der Frage, ob Relaxin-2 die Bildung atherosklerotischer Läsionen durch Beeinflussung inflammatorischer Faktoren verringern kann.

Die antiinflammatorischen Eigenschaften von Relaxin-2 zeigten sich in der Messung von Zytokin-Konzentrationen im Blutplasma der Versuchsmäuse. Das proinflammatorische IL-6 zeigte sich bei Mäusen, denen Relaxin-2 verabreicht wurde signifikant reduziert (Abb. 8). Eine signifikante Hochregulierung des antiinflammatorischen IL-10 zeigte sich im Plasma von Mäusen mit einer Relaxin-2-Behandlung von 0,1 µg/h (Abb. 9). Dies ist ein bemerkenswertes Ergebnis, da IL-6-Injektionen die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen in atherosklerose-anfälligen Mäusen (C57Bl/6, *ApoE*<sup>-/-</sup>) signifikant verstärkten (Huber et al., 1999). Auch Sun et al. (2007) belegen den Beitrag des durch Mastzellen freigesetzten IL-6 und IFN-γ auf die Bildung atherosklerotischer Läsionen (Sun et al., 2007).

IL-10 ist für seine antiinflammatorische Wirkung bekannt. Das Fortschreiten der Plaqueentwicklung sowie Ruptur und Thrombosierung wird in allen Stadien der Atherosklerose durch IL-10 positiv beeinflusst (Han und Boisvert, 2011). Weiterhin hat IL-10 einen positiven Einfluss auf die Bildung von Neointima (Zernecke et al., 2006). Seine Effekte vermittelt IL-10 u.a. durch Hemmen der Produktion von inflammatorischen Mediatoren, Matrixmetalloproteinasen sowie durch seine antiapoptotische Wirkung (Han und Boisvert, 2011, 2015). IL-10 inhibiert außerdem die Aktivierung von Makrophagen und ist in der Lage, den Lipid-Metabolismus von Makrophagen zu beeinflussen (Han und Boisvert, 2015).

Die gemessenen Veränderungen der Plasmakonzentrationen von IL-6 und IL-10 bei den Mäusen, die eine Relaxin-2-Behandlung erfuhren, versprechen demnach eine Reduktion der Entwicklung atherosklerotischer Plaques. Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen und somit stellt der Einfluss auf die Plasmakonzentrationen von IL-6 und IL-10 eine potentielle Komponente der antiatherosklerotischen Wirkung von Relaxin-2 dar.

Im Wechselspiel beeinflussen und verstärken oxidativer Stress und Inflammation die Bildung und das Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen (Hajjar und Gotto, JR, 2013; Husain et al., 2015). Mit Relaxin-2 behandelte Mäuse wiesen eine signifikant verringerte vaskuläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies auf und belegen somit die antioxidative Wirkung von Relaxin-2 (Abb. 10). Auch die Ergebnisse unsere *in-vitro*-Experimente unterstützen diese These (Abb. 11 und Abb. 12). Im Einklang damit zeigten Sasser et al. (2014) eine Reduktion der durch Angiotensin II-induzierten, gesteigerten Aktivität der

NADPH-Oxidase und Collino et al. (2013) eine Steigerung der Expression und Aktivität der endogenen antioxidativen Enzyme MnSOD und CuZnSOD bei Experimenten zu Ischämie/Reperfusionsschäden an der Niere (Collino et al., 2013; Sasser et al., 2014).

### **5.3. Progression und Komposition atherosklerotischer Plaques**

Im Fokus der Analysen dieser Studie stand schließlich noch die Bestimmung von Größe und Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaques in Mäusen mit Relaxin-2-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Unsere Ergebnisse zeigen erstmals eine signifikante Reduktion der Bildung atherosklerotischer Plaques durch Behandlung mit Relaxin-2. Bei kontinuierlicher Applikation von 0,1 µg/h Relaxin-2 zeigt sich eine signifikante Reduktion der Fläche der Plaques an der gesamten Gefäßwand (Abb. 16). Sowohl bei Applikation einer Dosis von 0,05 µg/h als auch 0,1 µg/h Relaxin-2 wurde die absolute Größe der atherosklerotischen Plaques in der Ölrot-Färbung signifikant reduziert (Abb. 15). Ein Trend zu weniger fortgeschrittenen Stadien unter Relaxin-2-Behandlung war erkennbar, jedoch nicht signifikant (Abb. 18).

Die Zusammensetzung der Plaques wurde durch immunhistochemische Färbungen bezüglich T-Zell-Infiltration (Abb. 24), Akkumulation von Makrophagen (Abb. 26) und neutrophilen Granulozyten (Abb. 28) analysiert. In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollmäusen und mit Relaxin-2 behandelten Mäusen festgestellt werden. Im Kontrast dazu stehen die Untersuchungen von Brecht et al. (2011) und Masini et al. (2004), die zeigten, dass Relaxin-2 die zuvor induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen durch vaskuläre Zellen (Brecht et al., 2011) und die chemotaktische Migration und Aktivierung neutrophiler Granulozyten (Masini et al., 2004) reduziert. Diese Studien legen somit einen Einfluss von Relaxin-2 auf die Zusammensetzung atherosklerotischer Plaques nahe. Wünschenswert wäre hier eine erneute Analyse mit höheren Relaxin-2-Konzentrationen. Plasmakonzentrationen von über 60 ng/ml Relaxin-2 wurden bereits über osmotische Minipumpen im Mausmodell erreicht (Unemori et al., 1996).

Die Analyse des Anteils glatter Muskelzellen an der Fläche des Gefäßquerschnitts auf Höhe der Aortenwurzel wurde durch eine ASMAC-Färbung ermittelt (Abb. 22). VSMCs spielen eine wichtige Rolle bei dem Wachstum atherosklerotischer Plaques und haben

Einfluss auf ihre Vulnerabilität (Bennett, 1999; Rudijanto, 2007). In dieser Arbeit zeigte sich keine Veränderung zwischen Relaxin-2 behandelten und Kontrollmäusen.

Relaxin-2 ist für seine antifibrotischen Effekte bekannt. Relaxin Knockout-Mäuse zeigen eine fortgeschrittene Organfibrose (Samuel et al., 2003; Samuel et al., 2004 a; Samuel et al., 2004 b). Eine Reduktion der Fibrose durch Behandlung mit Relaxin-2 in Tiermodellen wurde ebenfalls bereits demonstriert (Samuel et al., 2003; Samuel et al., 2004 a; Samuel et al., 2004 b; Samuel et al., 2014). Auf Ebene der Gefäße sind die Ergebnisse bezüglich der Beeinflussung des Kollagengehalts uneinheitlich, weisen jedoch in Richtung einer Reduktion unter Relaxin-2-Behandlung (Debrah et al., 2011; Jelinic et al., 2014; Xu et al., 2010). Die Evaluierung des Kollagengehalts bezogen auf die gesamte Gefäßwand ergab in dieser Arbeit keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen mit Relaxin-2-Behandlung (Abb. 20).

Die Stabilität der Plaques hängt vor allem von der Zusammensetzung, der Infiltration durch Immunzellen und dem Grad der Inflammation ab (Silvestre-Roig et al., 2014; Rudijanto, 2007). An dieser Stelle empfiehlt sich eine Analyse in weiter fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose, da in dieser Studie mehr frühe atherosklerotische Läsionen betrachtet wurden. Sinnvoll wäre dabei eine länger andauernde Relaxin-2-Behandlung, gegebenenfalls wieder ergänzt durch höhere Relaxin-2-Konzentrationen.

## 6. Zusammenfassung

Folgeerkrankungen der Atherosklerose sind die häufigste Ursache für Morbidität und Mortalität weltweit und stellen einen erheblichen Kostenfaktor für Gesundheitssystem und Wirtschaft dar. In Studien konnten bereits positive Effekte von Relaxin-2 auf endotheliale Dysfunktion, oxidativen Stress und Inflammation belegt werden. Somit setzt Relaxin-2 an wichtigen Schlüsselbereichen der Entwicklung von Atherosklerose an. Konsequenterweise muss Relaxin-2 als mögliches Medikament in der Behandlung von Atherosklerose und durch Atherosklerose verursachte Erkrankungen in Betracht gezogen werden.

Ziel dieser Studie war es daher, den Einfluss von Relaxin-2 auf die Bildung atherosklerotischer Läsionen und den Effekt auf vaskulären oxidativen Stress, Inflammation und Endothelfunktion zu ermitteln, um therapeutische Effekte von Relaxin-2 bei Atherosklerose evaluieren zu können.

Die Studie wurde sowohl an einem *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mausmodell, als auch in der Zellkultur an humanen koronaren arteriellen glatten Muskelzellen (HCASMCs) durchgeführt. Im Mausmodell wurde mithilfe subkutaner osmotischer Minipumpen eine kontinuierliche Zufuhr von Relaxin-2 über vier Wochen gewährleistet. Durch histologische und immunhistochemische Färbungen wurden die Größe und Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaques näher untersucht. Die Endothelfunktion wurde in Organbad-Experimenten analysiert. Der Einfluss auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wurde sowohl *ex vivo* an aortalen Segmenten, als auch *in vitro* an HCASMCs ermittelt. Außerdem wurde das Ausmaß der Inflammation durch Messung der Plasmakonzentrationen der Zytokine IL-6 und IL-10 ergänzt. Schlussendlich wurden potentielle Zielstrukturen von Relaxin-2 mittels PCR-Analyse untersucht.

Relaxin-2 zeigte atheroprotektive Eigenschaften im *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mausmodell der Atherosklerose. Die Entwicklung atherosklerotischer Plaques konnte durch Relaxin-2-Behandlung signifikant reduziert werden. Die Zusammensetzung der Plaques blieb jedoch unbeeinflusst. *Ex vivo* und *in vitro* konnten antioxidative Effekte von Relaxin-2 belegt werden. Die antiinflammatorische Wirkung von Relaxin-2 zeigte sich in der signifikanten Senkung der Plasmakonzentrationen des proinflammatorischen IL-6 und Erhöhung der Plasma-

konzentrationen des antiinflammatorischen IL-10. Die Abschwächung der endothelialen Dysfunktion in Relaxin-2 behandelten Mäusen zeigte sich in einer signifikant verbesserten endothelabhängigen Vasodilatation. Die Expression des Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1a wurde durch Relaxin-2-Behandlung vermindert.

In einem Mausmodell der Atherosklerose konnten wir den signifikanten Einfluss von Relaxin-2 auf die Endothelfunktion, oxidativen Stress, Inflammation und seine wichtige Rolle bei der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen zeigen. Obwohl Relaxin-2 als Medikament zur Behandlung bei akuter Herzinsuffizienz nach aktuellsten Erkenntnissen keinen Behandlungsvorteil bietet, stellt es möglicherweise eine neue Behandlungsoption der Atherosklerose und auf Atherosklerose beruhender Krankheiten dar.

## 7. Tabellen

Tab. 1: Pipettierschema und Endkonzentrationen im Organbad.....	26
Tab. 2: Klassifikation der Stadien der Atherosklerose adaptiert für Mäuse .....	35
Tab. 3: Taqman Sonden und Zielstruktur für die quantitative PCR .....	43
Tab. 4: Metabolische Parameter.....	46
Tab. 5: Feststoffe zur Herstellung von Lösungen.....	84

## 8. Abbildungen

Abb. 1: Maßgebliche Faktoren bei der Initiierung und dem Fortschreiten der Atherosklerose und potentielle Wirkungsmechanismen des Hormons Relaxin-2 .....	11
Abb. 2: Signalwege der Endothelin-Rezeptoren Typ A und Typ B im vaskulären System .....	13
Abb. 3: Behandlungsprotokoll .....	22
Abb. 4: Stimulation von HCASMCs zur Erfassung von reaktiven Sauerstoffspezies .....	30
Abb. 5: Relaxin-2-Plasmakonzentrationen .....	47
Abb. 6: Carbachol-induzierte endothelabhängige Vasodilatation .....	48
Abb. 7: Nitroglycerin-induzierte endothelunabhängige Vasodilatation .....	49
Abb. 8: Plasmakonzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 .....	50
Abb. 9: Plasmakonzentration des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 .....	51
Abb. 10: Messung der vaskulären Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies .....	52
Abb. 11: Messung reaktiver Sauerstoffspezies <i>in vitro</i> an HCASMCs durch L-012 Chemilumineszenz.....	54
Abb. 12: Repräsentative Bilder der DCF-Messung an HCASMCs .....	55
Abb. 13: Messung reaktiver Sauerstoffspezies <i>in vitro</i> an HCASMCs in einem DCF-Assay .....	56
Abb. 14: Repräsentative Querschnitte der Aortenwurzel in Ölrot-Färbung .....	57
Abb. 15: Quantitative Analyse der Bildung atherosklerotischer Plaques.....	58
Abb. 16: Quantitative Analyse der Bildung atherosklerotischer Plaques.....	59
Abb. 17: Einteilung der atherosklerotischen Läsionen .....	60

Abb. 18: Effekt der Relaxin-2-Behandlung auf die Verteilung in frühe (Typ 0-2) oder fortgeschrittene (Typ 3-5) atherosklerotische Läsionen .....	61
Abb. 19: Repräsentative histologische Querschnitte der Aortenwurzel in Siriusrot-Färbung.....	62
Abb. 20: Quantitative Analyse des Kollagengehalts.....	63
Abb. 21: Repräsentative histologische Querschnitte der Aortenwurzel nach ASMAC-Färbung.....	63
Abb. 22: Quantitative Analyse des Gehalts glatter Muskelzellen .....	64
Abb. 23: Repräsentative histologische Querschnitte der Aortenwurzel von <i>ApoE</i> <sup>-/-</sup> Mäusen in CD3-Färbung.....	65
Abb. 24: Quantitative Analyse der T-Zell-Infiltration .....	66
Abb. 25: Repräsentative histologische Querschnitte der Aortenwurzel nach CD68-Färbung.....	67
Abb. 26: Prozentualer Anteil der CD68-positiven Fläche an der Gefäßwand.....	68
Abb. 27: Repräsentative histologische Querschnitte der Aortenwurzel nach Ly6G-Färbung.....	69
Abb. 28: Quantitative Analyse der Akkumulation von Neutrophilen .....	70
Abb. 29: Relative mRNA-Expression in aortalen Gewebe .....	71

## 9. Anhang

**Tab. 5:** Feststoffe zur Herstellung von Lösungen

Feststoff	Hersteller
CaCl <sub>2</sub>	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
D(+)-Glukose	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EDTA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NaHCO <sub>3</sub>	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NaHEPES	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

## 10. Literaturverzeichnis

Bagnall AJ, Kelland NF, Gulliver-Sloan F, Davenport AP, Gray GA, Yanagisawa M, Webb DJ, Kotelevtsev YV. Deletion of endothelial cell endothelin B receptors does not affect blood pressure or sensitivity to salt. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. 2006. 48: 286–293

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. 138: 1909–1915

Bani D, Failli P, Bello MG, Thiemermann C, Sacchi TB, Bigazzi M, Masini E. Relaxin Activates the L-Arginine Nitric Oxide Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells in Culture. *Hypertension*. 1998. 31: 1240–1247

Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovascular research*. 1999. 41: 361–368

Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998. 394: 894–897

Brecht A, Bartsch C, Baumann G, Stangl K, Dschietzig T. Relaxin inhibits early steps in vascular inflammation. *Regulatory peptides*. 2011. 166: 76–82

Bremnes T, Paasche JD, Mehlum A, Sandberg C, Bremnes B, Attramadal H. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2000. 275: 17596–17604

Centre for Economics and Business Research (CEBR), 2014: The economic cost of cardiovascular disease from 2014-2020 in six European economies.

<https://www.cebr.com/wp-content/uploads/2015/08/Short-Report-18.08.14.pdf> (Zugriffsdatum: 23.10.2016)

Collino M, Rogazzo M, Pini A, Benetti E, Rosa AC, Chiazza F, Fantozzi R, Bani D, Masini E. Acute treatment with relaxin protects the kidney against ischaemia/reperfusion injury. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2013. 17: 1494–1505

Conrad KP, Novak J. Emerging role of relaxin in renal and cardiovascular function. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2004. 287: R250-61

- Davignon J. Apolipoprotein E and atherosclerosis: beyond lipid effect. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005. 25: 267–269
- Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004. 109: III27-32
- Debrah DO, Debrah JE, Haney JL, McGuane JT, Sacks MS, Conrad KP, Shroff SG. Relaxin regulates vascular wall remodeling and passive mechanical properties in mice. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 2011. 111: 260–271
- Diez J, Ruilope LM. Serelaxin for the treatment of acute heart failure: a review with a focus on end-organ protection. *European heart journal. Cardiovascular pharmacotherapy*. 2016. 2: 119–130
- Dschietzig T, Bartsch C, Baumann G, Stangl K. RXFP1-inactive relaxin activates human glucocorticoid receptor: further investigations into the relaxin-GR pathway. *Regulatory peptides*. 2009. 154: 77–84
- 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. *Circulation research*. 2003. 92: 32–40
- Dschietzig T, Bartsch C, Stangl V, Baumann G, Stangl K. Identification of the pregnancy hormone relaxin as glucocorticoid receptor agonist. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004. 18: 1536–1538
- Dschietzig T, Brecht A, Bartsch C, Baumann G, Stangl K, Alexiou K. Relaxin improves TNF-alpha-induced endothelial dysfunction: the role of glucocorticoid receptor and phosphatidylinositol 3-kinase signalling. *Cardiovascular research*. 2012. 95: 97–107
- 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 journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001. 15: 2187–2195
- Du X-J, Bathgate RAD, Samuel CS, Dart AM, Summers RJ. Cardiovascular effects of relaxin: from basic science to clinical therapy. *Nature reviews. Cardiology*. 2010. 7: 48–58

- d'Uscio LV, Baker TA, Mantilla CB, Smith L, Weiler D, Sieck GC, Katusic ZS. Mechanism of Endothelial Dysfunction in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001. 21: 1017–1022
- Galie N. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovascular research*. 2004. 61: 227–237
- Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007. 27: 2292–2301
- Hajjar DP, Gotto AM, JR. Biological relevance of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of arterial diseases. *The American journal of pathology*. 2013. 182: 1474–1481
- Han X, Boisvert WA. The Role of IL-10 in Atherosclerosis. In: Parthasarathy S, Hrsg. *Atherogenesis*. Rijeka: InTech, 2011: 361–384
- Han X, Boisvert WA. Interleukin-10 protects against atherosclerosis by modulating multiple atherogenic macrophage function. *Thrombosis and haemostasis*. 2015. 113: 505–512
- Hsu SY, Nakabayashi K, Nishi S, Kumagai J, Kudo M, Sherwood OD, Hsueh AJW. Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science (New York, N.Y.)*. 2002. 295: 671–674
- Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1999. 19: 2364–2367
- Husain K, Hernandez W, Ansari RA, Ferder L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World journal of biological chemistry*. 2015. 6: 209–217
- Ichiki T, Izumi R, Cataliotti A, Larsen AM, Sandberg SM, Burnett JC, JR. Endothelial permeability in vitro and in vivo: protective actions of ANP and omapatrilat in experimental atherosclerosis. *Peptides*. 2013. 48: 21–26
- Jelinic M, Leo C-H, Post Uiterweer ED, Sandow SL, Gooi JH, Wlodek ME, Conrad KP, Parkington H, Tare M, Parry LJ. Localization of relaxin receptors in arteries and veins, and region-specific increases in compliance and bradykinin-mediated relaxation after in vivo serelaxin treatment. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014. 28: 275–287

- Kofler S, Nickel T, Weis M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2005. 108: 205–213
- Kong RCK, Shilling PJ, Lobb DK, Gooley PR, Bathgate RAD. Membrane receptors: structure and function of the relaxin family peptide receptors. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010. 320: 1–15
- Robbins basic pathology. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Reg. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders. 2013
- Leo CH, Jelinic M, Ng HH, Tare M, Parry LJ. Time-dependent activation of prostacyclin and nitric oxide pathways during continuous i.v. infusion of serelaxin (recombinant human H2 relaxin). *British journal of pharmacology*. 2016. 173: 1005–1017
- Leo CH, Jelinic M, Parkington HC, Tare M, Parry LJ. Acute intravenous injection of serelaxin (recombinant human relaxin-2) causes rapid and sustained bradykinin-mediated vasorelaxation. *Journal of the American Heart Association*. 2014. 3: e000493
- Li MW, Mian MOR, Barhoumi T, Rehman A, Mann K, Paradis P, Schiffrin EL. Endothelin-1 overexpression exacerbates atherosclerosis and induces aortic aneurysms in apolipoprotein E knockout mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013. 33: 2306–2315
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000. 407: 233–241
- Masini E, Nistri S, Vannacci A, Bani Sacchi T, Novelli A, Bani D. Relaxin inhibits the activation of human neutrophils: involvement of the nitric oxide pathway. *Endocrinology*. 2004. 145: 1106–1112
- Mazzuca MQ, Khalil RA. Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease. *Biochemical pharmacology*. 2012. 84: 147–162
- McGuane JT, Danielson LA, Debrah JE, Rubin JP, Novak J, Conrad KP. Angiogenic growth factors are new and essential players in the sustained relaxin vasodilatory pathway in rodents and humans. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. 2011. 57: 1151–1160
- Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004. 24: 1006–1014
- Metra M, Cotter G, Davison BA, Felker GM, Filippatos G, Greenberg BH, Ponikowski P, Unemori E, Voors AA, Adams KF, JR, Dorobantu MI, Grinfeld L, Jondeau G, Marmor A,

Masip J, Pang PS, Werdan K, Prescott MF, Edwards C, Teichman SL, Trapani A, Bush CA, Saini R, Schumacher C, Severin T, Teerlink JR. Effect of serelaxin on cardiac, renal, and hepatic biomarkers in the Relaxin in Acute Heart Failure (RELAX-AHF) development program: correlation with outcomes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013. 61: 196–206

Meyrelles SS, Peotta VA, Pereira TMC, Vasquez EC. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids in health and disease*. 2011. 10: 211

Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, Ishida T, Inoue N, Hirata K-i, Matsukawa A, Morishita R, Kaneda Y, Yokoyama M. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002. 22: 115–120

Ng HH, Leo CH, Parry LJ. Serelaxin (recombinant human relaxin-2) prevents high glucose-induced endothelial dysfunction by ameliorating prostacyclin production in the mouse aorta. *Pharmacological research*. 2016. 107: 220–228

Ng SP, Steinetz BG, Lasano SG, Zelikoff JT. Hormonal changes accompanying cigarette smoke-induced preterm births in a mouse model. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.). 2006. 231: 1403–1409

Novartis International AG, 2017: Novartis provides update on Phase III study of RLX030 (serelaxin) in patients with acute heart failure. <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-provides-update-phase-iii-study-rlx030-serelaxin-patients-acute-heart> (Zugriffsdatum: 12.06.2017)

Oksche A, Boese G, Horstmeyer A, Furkert J, Beyermann M, Bienert M, Rosenthal W. Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor. *Molecular pharmacology*. 2000. 57: 1104–1113

Osto E, Coppolino G, Volpe M, Cosentino F. Restoring the Dysfunctional Endothelium. *CPD*. 2007. 13: 1053–1068

Pini A, Boccacini G, Baccari MC, Becatti M, Garella R, Fiorillo C, Calosi L, Bani D, Nistri S. Protection from cigarette smoke-induced vascular injury by recombinant human relaxin-2 (serelaxin). *Journal of cellular and molecular medicine*. 2016. 20: 891–902

- Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta medica Indonesiana*. 2007. 39: 86–93
- Samuel CS, Bodaragama H, Chew JY, Widdop RE, Royce SG, Hewitson TD. Serelaxin is a more efficacious antifibrotic than enalapril in an experimental model of heart disease. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. 2014. 64: 315–322
- Samuel CS, Unemori EN, Mookerjee I, Bathgate RAD, Layfield SL, Mak J, Tregear GW, Du X-J. Relaxin modulates cardiac fibroblast proliferation, differentiation, and collagen production and reverses cardiac fibrosis in vivo. *Endocrinology*. 2004 a. 145: 4125–4133
- Samuel CS, Zhao C, Bathgate RAD, Bond CP, Burton MD, Parry LJ, Summers RJ, Tang MLK, Amento EP, Tregear GW. Relaxin deficiency in mice is associated with an age-related progression of pulmonary fibrosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003. 17: 121–123
- Samuel CS, Zhao C, Bond CP, Hewitson TD, Amento EP, Summers RJ. Relaxin-1-deficient mice develop an age-related progression of renal fibrosis. *Kidney international*. 2004 b. 65: 2054–2064
- Sarwar M, Samuel CS, Bathgate RA, Stewart DR, Summers RJ. Serelaxin-mediated signal transduction in human vascular cells: bell-shaped concentration-response curves reflect differential coupling to G proteins. *British journal of pharmacology*. 2015. 172: 1005–1019
- Sasser JM, Cunningham MW, JR, Baylis C. Serelaxin reduces oxidative stress and asymmetric dimethylarginine in angiotensin II-induced hypertension. *American journal of physiology. Renal physiology*. 2014. 307: F1355-62
- Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Munzel T. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circulation research*. 2005. 97: e53-9
- Sibal L, Agarwal SC, Home PD, Boger RH. The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Current cardiology reviews*. 2010. 6: 82–90

- Silvestre-Roig C, Winther MP de, Weber C, Daemen MJ, Lutgens E, Soehnlein O. Atherosclerotic plaque destabilization: mechanisms, models, and therapeutic strategies. *Circulation research*. 2014. 114: 214–226
- Soh YM, Tiwari A, Mahendroo M, Conrad KP, Parry LJ. Relaxin regulates hyaluronan synthesis and aquaporins in the cervix of late pregnant mice. *Endocrinology*. 2012. 153: 6054–6064
- Sun J, Sukhova GK, Wolters PJ, Yang M, Kitamoto S, Libby P, MacFarlane LA, Mallen-St Clair J, Shi G-P. Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nature medicine*. 2007. 13: 719–724
- Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiological reviews*. 2006. 86: 515–581
- Teerlink JR, Cotter G, Davison BA, Felker GM, Filippatos G, Greenberg BH, Ponikowski P, Unemori E, Voors AA, Adams KF, Dorobantu MI, Grinfeld LR, Jondeau G, Marmor A, Masip J, Pang PS, Werdan K, Teichman SL, Trapani A, Bush CA, Saini R, Schumacher C, Severin TM, Metra M. Serelaxin, recombinant human relaxin-2, for treatment of acute heart failure (RELAX-AHF). *The Lancet*. 2013. 381: 29–39
- Teichman SL, Unemori E, Dschietzig T, Conrad K, Voors AA, Teerlink JR, Felker GM, Metra M, Cotter G. Relaxin, a pleiotropic vasodilator for the treatment of heart failure. *Heart failure reviews*. 2009. 14: 321–329
- Teichman SL, Unemori E, Teerlink JR, Cotter G, Metra M. Relaxin: review of biology and potential role in treating heart failure. *Current heart failure reports*. 2010. 7: 75–82
- Tiyerili V, Beiert T, Schatten H, Camara B, Jehle J, Schrickel JW, Nickenig G, Andrié RP. Anti-atherosclerotic effects of serelaxin in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2016. 251: 430–437
- Toth M, Taskinen P, Ruskoaho H. Relaxin stimulates atrial natriuretic peptide secretion in perfused rat heart. *The Journal of endocrinology*. 1996. 150: 487–495
- 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. *The Journal of clinical investigation*. 1996. 98: 2739–2745

- van Popele NM, Grobbee DE, Bots ML, Asmar R, Topouchian J, Reneman RS, Hoeks APG, van der Kuip, D. A. M., Hofman A, Witteman JCM. Association Between Arterial Stiffness and Atherosclerosis. *Stroke*. 2001. 32: 454–460
- van Vlijmen BJ, van den Maagdenberg, A M, Gijbels MJ, van der Boom H, HogenEsch H, Frants RR, Hofker MH, Havekes LM. Diet-induced hyperlipoproteinemia and atherosclerosis in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice. *The Journal of clinical investigation*. 1994. 93: 1403–1410
- Volger OL, Mensink RP, Plat J, Hornstra G, Havekes LM, Princen HM. Dietary vegetable oil and wood derived plant stanol esters reduce atherosclerotic lesion size and severity in apoE\*3-Leiden transgenic mice. *Atherosclerosis*. 2001. 157: 375–381
- Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine*. 2011. 17: 1410–1422
- Xu Q, Chakravorty A, Bathgate RAD, Dart AM, Du X-J. Relaxin therapy reverses large artery remodeling and improves arterial compliance in senescent spontaneously hypertensive rats. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. 2010. 55: 1260–1266
- Yambe M, Tomiyama H, Hirayama Y, Gulniza Z, Takata Y, Koji Y, Motobe K, Yamashina A. Arterial stiffening as a possible risk factor for both atherosclerosis and diastolic heart failure. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2004. 27: 625–631
- Zernecke A, Liehn EA, Gao J-L, Kuziel WA, Murphy PM, Weber C. Deficiency in CCR5 but not CCR1 protects against neointima formation in atherosclerosis-prone mice: involvement of IL-10. *Blood*. 2006. 107: 4240–4243

## 11. Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. med. René Pascal Andrié für die Überlassung des Themas und für die angenehme Zusammenarbeit.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Vedat Tiyerili für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente und der Betreuung dieser Arbeit.

Vielen Dank auch an Dr. med. Thomas Beiert für die große Hilfsbereitschaft in der Endphase dieser Arbeit und die Zusammenarbeit, die mir die Arbeit immens erleichterte.

Besonders danken möchte ich auch dem MTA Team der Molekularen Kardiologie, insbesondere Anna Flender und Theresa Schmitz, für die gute Einarbeitung und die stete Ansprechbarkeit bei Fragen.

Für die Hilfe bei der Bestimmung der Konzentrationen von IL-6 und IL-10 möchte ich Herrn Bakary Camara meinen besten Dank aussprechen.

Weiterhin danken möchte ich Anja Kerksiek aus dem Institut für Klinische Chemie und Pharmakologie für die Bestimmung der Cholesterinkonzentrationen.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie und meinem Freund für ihren Rückhalt und ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihr stets offenes Ohr danken.