UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin, III. Medizinische Klinik und Poliklinik Nephrologie

Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl

Die Rolle der IL-17 / IL-23 Achse und des adaptiven Immunsystems bei hypertensiven Endorganschäden der Maus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Gianina Niemann aus Buchholz in der Nordheide

Hamburg 2015

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 03.06.2016

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Ulrich Wenzel

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Heimo Ehmke

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
	1.1 Hypertonie und das Immunsystem	1
	1.2 Interleukin 17 und Interleukin 23	1
	1.3 Arbeitshypothese und Fragestellung	2
2.	Material und Methoden	4
	2.1 Versuchstiere und Gruppeneinteilung	4
	2.2 Modell zur Induktion von hypertensiven Endorganschäden	4
	2.3 Blutdruck Messung	5
	2.4 Bestimmung der Albuminurie	5
	2.5 Plasma Untersuchung	6
	2.6 Histopathologische Analyse	6
	2.7 FACS	7
	2.8 Real time RT-PCR	8
	2.9 Statistische Analyse	9
3.	Ergebnisse	.10
	3.1 Nachweis von Th17 Zellen in hypertensiven Mäusen	.10
	3.2 Früher renaler und kardialer Endorganschaden in IL-17 ^{-/-} Mäusen	.10
	3.3 Renaler Endorganschaden am Tag 14 in IL-17 ^{-/-} Mäusen	.15
	3.4 Kardialer Endorganschaden am Tag 14 in IL-17 ^{-/-} Mäusen	.20
	3.5 Renaler und kardialer Endorganschaden in IL-23p19 ^{-/-} Mäusen	.22
	3.6 Renaler und kardialer Endorganschaden in RAG-1 ^{-/-} Mäusen	.28
4.	Diskussion	.32
	4.1 Die Rolle der IL-17/IL-23 Achse bei hypertensiven Endorganschäden	.32
	4.2 Die Rolle des adaptiven Immunsystems bei hypertensiven Endorganschäden	.35
	4.3 Wesentliche Aspekte der Arbeit	.36
	4.4 Ausblick	.36
5.	Zusammenfassung	.37
6.	Erklärung des Eigenanteils	.38
7.	Abkürzungsverzeichnis	.39

8. Literaturverzeichnis	40
9. Abbildungsverzeichnis	43
10. Tabellenverzeichnis	44
11. Danksagung	45
12. Lebenslauf	46
13. Eidesstattliche Erklärung	47

1. Einleitung

1.1 Hypertonie und das Immunsystem

Arterielle Hypertonie war in Deutschland die sechst häufigste Todesursache laut dem Statistischem Bundesamt im Jahre 2012 und die häufigste Nebendiagnose der vollstationär behandelten Patienten im Jahre 2011 mit 5,8 Millionen Fällen. Hoher Blutdruck verursacht Arteriosklerose, Linksherzhypertrophie und Nierenschäden mit Infiltration von inflammatorischen Zellen. Die genauen Pathomechanismen, die zur Entstehung und Progression dieser Organschäden führen, sind bisher nicht ausreichend verstanden. Aktuelle Daten unterstützen die Vermutung, dass hypertensive Endorganschäden nicht nur durch hämodynamische Kräfte verursacht und beeinflusst werden, sondern auch durch das angeborene und adaptive Immunsystem (Harwani et al., 2012). Guzik et al. konnten in ihrer bahnbrechenden Publikation zeigen, dass RAG-1^{-/-} Mäuse, denen T- und B-Zellen fehlen, einen niedrigeren Blutdruck unter Angiotensin II Infusion entwickeln als Wildtyp Mäuse (Guzik et al., 2007). Durch die Repopulation dieser Mäuse mit T-Zellen konnte die Reaktion wieder normalisiert werden. Dieses Ergebnis wurde in SCID Mäusen von Crowley et. al bestätigt (Crowley et al., 2010). Somit scheinen T-Zellen eine zentrale Rolle hinsichtlich der Entwicklung von Hypertonie zu spielen. Die genaue Rolle der T-Zellen bei hypertensiven Endorganschäden ist jedoch unklar.

1.2 Interleukin 17 und Interleukin 23

Im Jahre 2005 wurde eine neue T Helfer Untergruppe (Th17) gefunden, die IL-17 produziert (Harrington et al., 2005). IL-17 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sezerniert wird. Obwohl IL-17 ausschließlich von hämatopoetischen Zellen stammt, ist der IL-17 Rezeptor umfangreich sowohl auf hämatopoetischen als auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen, wie zum Beispiel endotheliale und epitheliale Zellen, exprimiert (Hirota et al., 2012). Th17 Zellen benötigen IL-23 zur Expansion und zum Überleben. IL-23 wird von aktivierten dendritischen Zellen und Makrophagen sezerniert. Diese antigenpräsentierenden Zellen sezernieren IL-23, welches an einen Rezeptor Komplex bindet. Der IL-23 Rezeptor ist stark auf IL-17 Zellen exprimiert und geringfügig auf naiven T-Zellen, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen und Makrophagen. Die mögliche Rolle von Th17 Zellen bei Autoimmunerkrankungen wurde zunächst in IL-23p19 defizienten Mäusen gezeigt. IL-23p19 Knockout Mäuse wiesen einen erheblichen Rückgang an Th17 polarisierten Zellen auf und waren resistent gegen die

Entwicklung von experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (Cua et al., 2003), Kollagen-induzierter Arthritis, experimenteller Induktion von Multipler Sklerose, und Rheumatoider Arthritis. Eine neue Verbindung zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und IL-17 wurde von aktuellen Daten vorgeschlagen, die gezeigt haben, dass erhöhte Salzaufnahme mit der Nahrung Autoimmunerkrankungen durch die Induktion von pathogenen Th17 Zellen verstärken (Kleinewietfeld et al., 2013).

1.3 Arbeitshypothese und Fragestellung

In dieser Arbeit sollte nun die Rolle von IL-17, IL-23 und des adaptiven Immunsystems bei hypertensiven Endorganschäden der Maus evaluiert werden. Dazu induzierten wir Hypertonie in C57black6 Mäusen. Da diese Mäuse keinen relevanten hypertensiven Nierenschaden durch alleinige Angiotensin II Infusion entwickeln (Wesseling et al., 2005), benutzten wir unser DOCA + Angiotensin II Modell. Kürzlich haben wir gezeigt, dass die Kombination von DOCA Salz und Angiotensin II Infusion erhebliche hypertensive renale und kardiale Schäden hervorruft (Kirchhoff et al., 2008). Dieses Modell wurde bereits erfolgreich zur Untersuchung der Rolle von Chemokinrezeptoren und ADMA bei hypertensiven Endorganschäden eingesetzt (Sydow et al., 2012, Krebs et al., 2012). Somit wandten wir dieses Modell zunächst in IL-17^{-/-} Mäusen an, um zu sehen, welchen Effekt die Defizienz von IL-17 auf die hypertensiven renalen und kardialen Schäden hat.

Um unsere Ergebnisse in einer anderen Knockout Maus zu bestätigen, wiederholten wir diese Versuche in IL-23p19^{-/-}, da die Expansion und das Überleben der Th17 Zellen von IL-23 abhängig ist. Unsere anfängliche Hypothese war, dass die Defizienz der IL-17/IL-23 Achse die Mäuse gegen renale und kardiale Endorganschäden resistenter machen würde, in Anlehnung an die bezüglich der Autoimmunerkrankungen gefundenen Ergebnisse. Zu unserer Überraschung jedoch fanden wir, dass die Defizienz der IL-17/IL-23 Achse die Albuminurie und die renalen Schäden in hypertensiven Mäusen verschlimmern, während die kardialen Schäden nicht beeinflusst werden.

In einem zweiten Teil unserer Versuche führten wir das DOCA + Angiotensin II Modell in RAG-1^{-/-} Mäusen durch, um die Rolle des adaptiven Immunsystems bei hypertensiven Endorganschäden zu untersuchen. Diese Mäuse besitzen keine T und B-Zellen und somit fehlt ihnen das adaptive Immunsystem. Da gezeigt werden konnte, dass Mäuse mit T-Zellen höheren Blutdruck unter Angiotensin II Infusion entwickeln als Mäuse ohne T-Zellen, war unsere Vermutung, dass die RAG-1^{-/-} Mäuse auch weniger hypertensiven Endorganschaden

entwickeln würden. Allerdings fanden wir, dass das adaptive Immunsystem keine Rolle bei der Entwicklung von hypertensiven renalen und kardialen Endorganschäden spielt.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Gruppeneinteilung

Bei den Versuchstieren handelten es sich um zehn bis zwölf Wochen alte C57black6 Männchen zu Beginn der Versuchsreihen. Diese wurden in Standardkäfigen des Typs II long zu dritt bzw. viert gehalten, in denen sie dauerhaft Zugang zu Futter (LASQCdiet Rod16, Rad) und Trinkwasser bzw. 0,9 prozentiger Natriumchloridlösung hatten. Käfigwechsel erfolgte einmal bis dreimal die Woche. Die Käfige waren mit Einstreu auf Holzbasis und Nestmaterial aus Zellstoff ausgestattet.

Der zirkadiane Rhythmus der Mäuse wurde durch einen Tages- und Nachtzyklus in den Tierräumen gewährleistet. Von 5 – 17 Uhr wurde durch Licht der Tag definiert und von 17 bis 5 Uhr durch Dunkelheit bzw. Rotlicht die Nacht. Die Temperatur lag in den Tierräumen zwischen 20 und 24°C und die relative Luftfeuchtigkeit bei circa 60 % (Sollwert der Tierhaltung: 40 -70 %).

Regelmäßig wurde der Gesundheitszustand der Tiere in Form von Aktivität, Aussehen, Nestbau und Gewicht überwacht.

Verglichen wurden drei Gruppen: Normotensive Wildtyp Mäuse, Wildtyp Mäuse mit DOCA und Angiotensin II und IL-17^{-/-} Mäuse ebenfalls mit DOCA und Angiotensin II. In einer zweiten und dritten Reihe von Experimenten wurde dasselbe Protokoll mit IL-23^{-/-} Mäusen und RAG-1^{-/-} Mäusen durchgeführt.

2.2 Modell zur Induktion von hypertensiven Endorganschäden

Um bei C57black6 Mäusen hypertensiven Endorganschaden zu erzeugen, wurde das DOCA + Angiotensin II Modell benutzt (Kirchhoff et al., 2008).

Zunächst wurden die Mäuse am Tag 0 unter Isoflurane Anästhesie und Tramadol Analgesie uninephrektomiert. Am Tag 14 wurde ein 50 mg DOCA Pellet (Deoxycorticosteron Acetate; Innovative Research of America, USA) subkutan am Rücken implantiert und die Mäuse erhielten 0,9 % NaCl im Trinkwasser. Am Tag 21 wurde eine osmotische Minipumpe (Alzet 1002, Cupertino, USA) mit Angiotensin II ebenfalls subkutan am Rücken der Mäuse implantiert. Diese Minipumpe sezernierte kontinuierlich 1,2 ng Angiotensin II (Sigma, USA) pro Minute pro Gramm Körpergewicht bis zur Organentnahme 13 Tage nach Pumpenimplantation.



Abbildung 1: DOCA + Angiotensin II Modell. Modell zur Induktion von hypertensiven Endorganschäden in Mäusen mit C57black6 Hintergrund. Zunächst erfolgte eine einseitige Nephrektomie, gefolgt von einer Implantation eines DOCA Pellets zwei Wochen später. Eine Woche danach wurde eine Angiotensin II Pumpe implantiert. Die Organentnahme erfolgte 13 Tage nach Implantation der Angiotensin II Pumpe.

2.3 Blutdruck Messung

Der systolische Blutdruck wurde nichtinvasiv am Tag 5 und 10 nach Angiotensin II Pumpenimplantation mittels Tail-cuff Plethysmografie (Process Control Blood Pressure 2900-series; TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) gemessen. Hierzu wurden die Mäuse zunächst an das Prozedere gewöhnt und anschließend die Blutdruckwerte ermittelt. Die Mäuse wurden in eine spezielle Vorrichtung gesetzt, in der sie sich nicht bewegen konnten, um Artefakte zu vermeiden und der Schwanz für die Blutdruckmessung zugänglich war. Ein Sensor, der über den fixierten Schwanz gelegt wurde, übertrug die Blutdruckwellen auf ein Oszilloskop. Nun wurde die Blutdruckmanschette um den Schwanz gelegt und aufgepumpt bis die Wellen auf dem Oszilloskop abflachten. Beim anschließenden Ablassen des Drucks wurden die Wellen genau beobachtet und der systolische Blutdruck dort abgelesen, wo die Wellen plötzlich einen Amplitudensprung absolvierten. Es wurde der Mittelwert aus fünf Messwiederholungen ermittelt.

2.4 Bestimmung der Albuminurie

Am Tag 3, 7 und 12 wurden die Mäuse für 6 Stunden in metabolische Käfige mit Zugang zu Trinkwasser zur Urinsammlung gesetzt. Die Albuminkonzentration im Urin wurde mittels ELISA (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) gemessen und anschließend durch den Urin Kreatinin Wert dividiert. Dieser wurde per Autoanalyse ermittelt (Hitachi 717; Roche, Mannheim, Deutschland). Um die Stärke der Albuminkonzentration im Urin abzuschätzen und damit die nötigen Verdünnungen für den ELISA zu bestimmen, wurden 9µl Urin auf das Proteinfeld eines Urinstixstreifens pipettiert und nach folgendem Schema mit "Sample/Conjugat Diluent" verdünnt: Kontrollmäuse=1:100; 0=1:500; +=1:5000; ++=1:20.000; +++=1:50.000; ++++=100.000. Anschließend wurde der ELISA nach Anleitung durchgeführt.

2.5 Plasma Untersuchung

Am Ende der Versuchsperiode wurde heparinisiertes Blut entnommen und Blut-Harnstoff-N (BUN) und Cholesterin per Autoanalyse (Hitachi 717; Roche, Mannheim, Deutschland) gemessen. Plasma Albumin wurde mittels ELISA (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) bestimmt.

2.6 Histopathologische Analyse

Nach der Organentnahme, wurden die Nieren- und Herzgewebe in 4% neutral gepufferten Formalin für 24 Stunden fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend 1µm dünn geschnitten. Die Schnitte wurden dann deparaffinisiert und für die Lichtmikroskopie mit PAS Reagenz gefärbt (Merck, Deutschland). Der glomeruläre Schaden wurde histologisch nach einer semiquantitativen Skala bewertet, in der 0 kein Schaden bedeutet, 1 milder Schaden in weniger als einem Drittel des Glomerulums, 2 Schaden in mehr als einem Drittel des Glomerulums und 3 Schaden im gesamten Glomerulum. Unter 200facher Vergrößerung wurden 20 Glomeruli pro Tier analysiert. Die renale Infiltration von CD3 positiven T-Zellen, F4/80 positiven Monozyten/ Makrophagen und GR-1 positiven Neutrophilen wurde immunhistochemisch ermittelt. Die Zellen wurden mit Antikörpern visuell markiert, die jeweils spezifisch CD3 (polyclonal antibody, product number A 0452, DakoCytomation, USA), F4/80 (Clone BM8, product number T-2006, BMA Biomedicals, Augst, Schweiz) oder GR-1 (Ly6 G/C, NIMP-R14, Hycult Biotech, Niederlande) erkennen. Zur Detektion wurde das ZytoChem-Plus AP Polymer Kit genutzt (Zytomed, Berlin, Germany). Die Infiltration von CD3 und F4/80 positiven Zellen wurde durch das Scoren von 20 Gesichtsfeldern guantifiziert (0=<10 Zellen, 1=11-30 Zellen, 2=>31 Zellen/Feld). Die Anzahl an GR-1 positiven Neutrophilen wurde pro Gesichtsfeld ausgezählt. Die Evaluation der kardialen Fibrose erfolgte durch Einteilen der mit Masson-Trichrom gefärbten Herzschnitte in die Schweregrade 0 bis 3 in 10 Gesichtsfeldern (Krebs et al., 2012).

Für die Evaluation der Autophagie in den Podozyten wurden folgende primäre Antikörper verwendet: Meerschweinchen Nephrin (1:100, Acris); Hasen Limp-2 (1:1000, Paul Saftig, Kiel, Deutschland); Hasen LC3B (1:100, Cell Signaling). Alle verwendeten sekundären Antikörper waren fluoreszierend färbende, aufgereinigte Esel Antikörper (Jackson ImmunoResearch). Zunächst wurden die Paraffinschnitte deparaffinisiert und die Antigene durch Mikrowellenkochen zurückgewonnen (30 Minunten, 800 Watt, 10mM Zitratpuffer PH 6.1). Unspezifische Bindungen wurden geblockt (5 % Pferde Serum, 0.05 % triton X-100 in PBS, 30 Minuten bei Raumtemperatur). Der Inkubation mit den primären Antikörpern (in Blockpuffer, o/n, 4°C) folgte die Inkubation mit AF488 oder Cy3 gepaart mit dem sekundären Antikörper (1:400, 30 Minuten, bei Raumtemperatur) und draq5 (molekulare Sonde) für die Kerngegenfärbung. Die Färbungen wurden mit einem LSM 510 meta Mikroskop und der LSM Software ausgewertet (all Zeiss, Jena, Deutschland).

2.7 FACS

Zur Leukozytenisolierung wurde das Nierengewebe zerkleinert und mit Kollagenase D und DNAse verdaut (Roche, Mannheim, Germany). Diese Suspension des Nierengewebes wurde nun über ein 70 µm Zellsieb (Falcon, Corning, USA) gegeben, mit 10 ml HBSS nachgespült und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Erythrozyten mit Ammonium Chlorid lysiert und nach 5 – 7 Minuten wurde die Reaktion mit HBSS abgestoppt. Nun wurde das Ganze wieder zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Das entstandene Pellet wurde mit 10 ml HBSS resuspendiert und über einen 40 µm Zellsieb gegeben und ebenfalls mit 10 ml HBSS nachgespült. Wieder folgten eine Zentrifugation und das Abgießen des Überstandes. Das Pellet wurde in 2 ml HBSS resuspendiert und über ein mit HBSS benetztes 30 µm Zellsieb in ein FACS-Röhrchen überführt. Nun wurde mit 1 ml HBSS nachgespült. Das Volumen in dem FACS-Röhrchen wurden auf 2 Röhrchen aufgeteilt für die T-Zellen- und die Monozyten/Makrophagen-Färbung. Beide wurden wiederum zentrifugiert und abgegossen. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde 10 µl Mausserum hinzugegeben und bei 4°C 15 Minuten inkubiert. Für die FACS Analyse wurden Fluorochrom-konjugierte Antikörper eingesetzt (CD45 (30-F11), CD3 (17A2), CD4 (GK1.5), CD8 (53-6.7). Zur intrazellulären Färbung von IL-17A (TC11-18H10.1) und IFN-γ (XMG1.2) wurden die Zellen durch eine vierstündige Inkubierung mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA; 50 ng/ml; Sigma) and Ionomycin (1 µg/ml; Calbiochem-Merck, Darmstadt, Germany) aktiviert. Nach 30 Minuten der Inkubationszeit wurde Brefeldin A (10 µg/ml; Sigma) hinzugegeben. Die Messung erfolgte mit dem Becton & Dickinson LSRII System und der Diva software. Die Datenauswertung wurde mit FlowJo (Tree Star, USA) durchgeführt.

2.8 Real time RT-PCR

Die RNA der Nierenrinde oder des Herzventrikels wurde mittels RNeasy kit (Quiagen, USA) isoliert. Für die Real time quantitative RT-PCR wurde das Applied Biosystems ABI Prism System und das SYBR Green JumpStart taq Ready Mix (Sigma, Germany) genutzt. Mausspezifische PCR Primer wurden angewandt. Die Höhe der mRNA Expression in jeder Probe wurde auf die 18S Expression normiert (Krebs et al., 2012, Fraune et al., 2012). Folgende Primer wurden verwendet:

CCL2 Fw: GGC TCA GCC AGA TGC AGT TAA CCL2 Rev: CCT ACT CAT TGG GAT CAT CTT GCT

Pai-1 Fw: GGA CAC CCT CAG CAT GTT CA Pai-1 Rev: TCT GAT GAG TTC AGC ATC CAA GAT

Foxp3 Fw: CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT Foxp3 Rev: TTC TCA CAA CCA GGC CAC TTG

18s Fw: CAC GGC CGG TAC AGT GAA AC 18s Rev: AGA GGA GCG AGC GAC CAA A

a-MHC Fw: GCT GAC AGA TCG GGA GAA TCA G a-MHC Rev: CCC CTA TGG CTG CAA TGC

ß-MHC Fw: TCC TCA CAT CTT CTC CAT CTC TGA ß-MHC Rev: GCA AAA TAT TGG ATG ACC CTC TTA G

ANP Fw: GTG CGG TGT CCA ACA CAG AT ANP Rev: GCT TCC TCA GTC TGC TCA CTC A

Kollagen I a2 Fw: CCC CGG GAC TCC TGG ACT T Kollagen I a2 Rev: GCT CCG ACA CGC CCT CTC TC

VCAM Fw: TGA TTG GGA GAG ACA AAG CA VCAM Rev: ACG TCA GAA CAA CCG AAT CC

IL-17 Rezeptor A Fw: TGG TGG GAT CTG TCA TCG T

IL-17 Rezeptor A Rev: TGG AGT CAT CAC CAT GTT TCT C

IL-17 Rezeptor C Fw: AAC CAC ACA GAC CTG GTT CC IL-17 Rezeptor C Rev: GGC AGA ATT CGA CCC TCT C

IL-17F Taqman Sonde: Mm00521423_m1 (Applied Biosystems)

2.9 Statistische Analyse

Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. Für die statistischen Analysen wurde Graph Pad Prism 5.1 genutzt. 1-way ANOVA und Post-hoc Analyse nach Newman-Keuls (mehrfach Vergleichstest) wurden durchgeführt, da drei Gruppen miteinander verglichen wurden: Kontrollen, hypertensive Wildtyp und hypertensive Knockout. Da der Unterschied zwischen den Kontrollen und den hypertensiven Wildtypmäusen schon ausreichend von Kirchhoff et al. bewiesen wurde, stellten wir diese Signifikanzen nicht dar (Kirchhoff et al., 2008). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur die Signifikanzen zu hypertensive Wildtyp vs. hypertensive Knockout gezeigt.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis von Th17 Zellen in hypertensiven Mäusen

Zunächst überprüften wir, ob in hypertensiven Mäusen Th17 Zellen in den Nieren nachweisbar sind. Renale T-Zellen wurden isoliert und intrazellulär gefärbt. Die anschließende FACS Analyse ergab, dass in den normotensiven Wildtyp Mäusen 0,94% der eingewanderten CD4-Zellen IL-17 produzierten. In den hypertensiven Wildtyp Mäusen stieg der Anteil der IL-17 produzierenden CD4-Zellen dagegen auf 2,88% an. Es wurde kein IL-17 Signal in den IL-17^{-/-} Mäusen nachgewiesen (Abbildung 2).



Abbildung 2: FACS Analyse: Nachweis von Th17 Zellen. Intrazelluläre Färbung von renalen T-Zellen mit IL-17A und IFN- γ . Die gesuchten Th17 Zellen sind IL-17A⁺ und IFN- γ ⁻ und demnach im linken oberen Quadranten der Graphen lokalisiert. Der Anteil an Th17 Zellen stieg von 0,94% in den Kontrollmäusen auf 2,88% in den hypertensiven Wildtyp Mäusen an. In den IL-17^{-/-} Mäusen wurden keine Th17 Zellen nachgewiesen.

3.2 Früher renaler und kardialer Endorganschaden in IL-17^{-/-} Mäusen

Die Kombination aus DOCA und Angiotensin II induzierte schon am 4. Tag nach Angiotensinpumpenimplantation eine ausgeprägte Albuminurie. Diese war in den hypertensiven IL-17^{-/-} Mäusen signifikant höher als in den hypertensiven Wildtyp Mäusen (Abbildung 3).



Abbildung 3: Albuminurie Tag 4. Die Albuminurie wurde aus dem Quotienten von Albumin und Kreatinin im Urin errechnet. Zu diesem frühen Zeitpunkt induzierten DOCA und Angiotensin II schon eine ausgeprägte Albuminurie, die signifikant höher in den hypertensiven IL-17^{-/-} Mäusen ausfiel im Vergleich zu den hypertensiven Wildtyp Mäusen. *=p<0.05

Als nächstes untersuchten wir den histologischen renalen Endorganschaden am Tag 4 nach Beginn der Angiotensin II Infusion. Zu diesem frühen Zeitpunkt zeigten sich keine glomerulären Veränderungen in 9 mit DOCA und Angiotensin II behandelten Wildtyp Mäusen, wohingegegen sich bei 3 von 5 hypertensiven IL-17 defizienten Mäusen segmentale glomeruläre Sklerose darstellte (Abbildung 4, Pfeile).



Abbildung 4: Glomerulärer Schaden in den Nieren. Repräsentative Nierenhistologien in PAS Färbung von Kontrollen, hypertensiven Wildtyp Mäusen und IL-17^{-/-} Mäusen. Zu diesem frühen Zeitpunkt waren in den hypertensiven Wildtyp Mäusen keine glomerulären Veränderungen sichtbar. Die IL-17^{-/-} Mäuse jedoch entwickelten zum Teil segmentale glomeruläre Sklerose (Pfeile).

Die basalen Daten des frühen Zeitpunktes sind in Tabelle 1 dargestellt. Beide hypertensiven Mausgruppen waren am Tag der Organentnahme signifikant leichter als die normotensive Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu hypertrophierten die Nieren ebenfalls in den beiden hypertensiven Gruppen, so dass das Nierengewicht pro Körpergewicht signikant höher war im Vergleich zu den normotensiven Mäusen. Auch die glomeruläre Größe war in beiden hypertensiven Gruppen angestiegen. In allen drei Parametern konnte jedoch kein Unterschied zwischen den hypertensiven Wildtyp Mäusen und den IL-17^{-/-} Mäusen festgestellt werden. Es wurde kein signifikanter Unterschied für Blut-Harnstoff-N (BUN) als Nierenretentionsparameter am Tag 4 gefunden.

	n	Mortalität	Körpergewicht (g)	Nierengewicht/ Körpergewicht (mg/g)	BUN (mg/dl)	Glomeruläre Größe (µm²)
Normotensiver Wildtyp	3	0	29.3±1.0	5.7±0.2	27.0±1.2	4582±224
DOCA+Ang II Wildtyp	9	0	24.8±0.5	8.9±0.4	38.9±3.8	5450±188
DOCA+Ang II IL-17 ^{-/-}	5	0	23.2±1.2	8.9±0.3	35.6±4.7	5640±90

Tabelle 1: Basale Daten Tag 4, Wildtyp vs. IL17 KO.

In der immunohistochemischen CD3 und F4/80 Färbung der Nierenschnitte zeigten sich für beide hypertensiven Gruppen eine vermehrte Infiltration von T-Zellen und Makrophagen, wobei sich auch hier kein Unterschied zwischen Wildtyp- und IL-17^{-/-} Mäusen darstellte (Abbildung 5A und 5B). Desweiteren war die Anzahl der renalen GR-1⁺ Neutrophilen in den beiden hypertensiven Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht (Abbildung 5C).



Abbildung 5: Frühe Inflammation. Quantitative Auswertung der immunohistochemisch gefärbten PAS Histologien der Nieren der Kontrollen, der hypertensiven Wildtypen und der hypertensiven IL-17^{-/-} Mäuse. A: Die CD3 Färbung ergab eine erhöhte Infiltration von T-Zellen in das Nierengewebe der hypertensiven Mausgruppen. B: Die F4/80 Färbung zeigte ebenfalls eine Anreicherung von Monozyten/Makrophagen in den Nieren der hypertensiven Mäuse. C: In der GR1 Färbung der Neutrophilen war kein signifikanter Anstieg zu sehen.

Kürzlich wurde eine erhöhte Albuminurie als Antwort auf DOCA und Angiotensin II bei Interferon-γ-Rezeptor Knockout Mäusen gefunden, die durch eine gestörte Autophagie in den Podozyten erklärt wurde (Marko et al., 2012). Daher untersuchten wir ebenfalls in unserer Studie die Autophagie in den Podozyten mittels immunhistochemischer LC3 und Limp2 Färbung und fanden eine Hochregulierung der Autophagie in den beiden mit DOCA und Angiotensin II behandelten Mausgruppen, jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen (Abbildung 6).



Abbildung 6: Autophagie der Podozyten. Repräsentative konfokal mikroskopische Histologien mit doppelter immunohistochemischer Färbung gegen den Podozytenmarker Nephrin (a-f, rot) und gegen den autophagosomalen Marker LC3B (a-c, grün) oder gegen den lysosomalen Marker Limp-2 (e-f, grün) in Kontrollen und mit DOCA und Angiotensin II behandelten Wildtypen oder IL-17^{-/-}Mäusen. In den mit DOCA und Angiotensin II behandelten wildtypen oder IL-17^{-/-}Mäusen. In den mit DOCA und Angiotensin II behandelten Eröhte Anzahl an LC3 positiven Autophagosomen und Limp-2 positiven Lysosomen in den Podozyten. Jedoch war kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen erkennbar. \hat{T} = Podozyt.

Das Herz ist ein wichtiges Zielorgan für einen durch Bluthochdruck induzierten Endorganschaden. DOCA und Angiotensin II verursachten eine ausgeprägte kardiale Fibrose schon vier Tage nach Beginn der Angiotensin II Infusion (Abbildung 7A). Das blau-grünlich angefärbte Areal, das substantielle Fibrose mit begleitendem Verlust an Kardiomyozyten anzeigt, war signifikant größer in den mit DOCA und Angiotensin II behandelten Mäusen als in den normotensiven Mäusen. Das Scoring der Fibrose zeigte einen Anstieg in den hypertensiven Mäusen (Abbildung 7B).

Die Expression von fetalen Genen wie ANP und dem Quotienten aus den Isoformen der schweren Myosinketten, genauso wie Kollagen-1 waren hochreguliert in den hypertensiven Mäusen. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen IL-17^{-/-} und Wildtyp Mäusen für die kardiale Fibrose oder Genexpressionen gefunden werden (Abbildung 7B-E)



Abbildung 7: Frühe kardiale Fibrose und Genexpression. Repräsentative Histologien der mit Masson-Trichrom gefärbten Herzschnitte von Kontrollen und mit DOCA und Angiotensin II behandelten Wildtyp und IL-17 Knockout Mäusen im Vergleich. Grau-grünliche Areale stellen kardiale Fibrose dar. Es zeigte sich eine verstärkte kardiale Fibrose in den hypertensiven Mausgruppen. B: Das qualitative Scoring der Herzfibrose ergab ebenfalls eine verstärkte kardiale Fibrose in beiden hypertensiven Mausgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypen. C-E: Die Realtime Analyse von mRNA aus Herzgewebe ergab eine Hochregulation von den fetalen Genen ANP und dem Quotienten aus beta-MHC/alpha-MHC genauso wie Kollagen-1. Jedoch wurde kein signifikanter Unterschied zwischen IL-17^{-/-} und Wildtyp Mäusen gefunden.

3.3 Renaler Endorganschaden am Tag 14 in IL-17^{-/-} Mäusen

Die kombinierte Gabe von DOCA und Angiotensin II erhöhte den systolischen Blutdruck in den Wildtyp- und den IL-17^{-/-} Mäusen, ohne jedoch einen Unterschied zwischen den beiden Gruppen, wie in Abbildung 8A gezeigt ist.

Mit der längeren Dauer der Angiotensin II Infusion von 14 Tagen, verschwand der initial beobachtete Unterschied der Albuminurie zwischen den Wildtyp- und IL-17^{-/-} Mäusen (Abbildung 8B). Es wurde jedoch eine signifikant höhere Anzahl an Proteinzylindern in den histologischen Schnitten und erhöhte Plasma Cholesterinspiegel in den IL-17^{-/-} Mäusen am Ende des Experimentes festgestellt (Abbildung 8C und 8D). Die erhöhten Plasma Cholesterinspiegel weisen auf eine Albuminurie im nephrotischen Bereich hin. Die in den IL-17^{-/-} Mäusen signifikant höheren Cholesterinwerte spiegeln am ehesten die erhöhte Albuminurie zum frühen Zeitpunkt wieder.

In beiden hypertensiven Mausgruppen fanden wir eine erhöhte Mortalität (Tabelle 2). Die histologische Analyse des glomerulären Schadens mit Hilfe eines semiquantitativen Scores zeigte einen verstärkten glomerulären Schaden in den IL-17^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen (Abbildung 8E). DOCA+Angiotensin II induzierten hypertensive fokale und segmentale glomeruläre Schäden mit Zerstörung glomerulärer Kapillaren, Plasmainsudation und Vermehrung der extrazellulären Matrix (Abbildung 8F). Die Nierenfunktion verschlechterte sich in den beiden hypertensiven Gruppen, was an den erhöhten Blut-Harnstoff-N (BUN) Werten im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen (27±2 mg/dl) erkennbar war. Der Blut-Harnstoff-N war in den IL-17^{-/-} Mäusen (54±8mg/dl) signifikant höher als in den Wildtyp Mäusen (39±2 mg/dl, p<0.05).









Abbildung 8: Renaler Endorganschaden am Tag 14. A: Der systolische Blutdruck stieg in den hypertensiven Mausgruppen in gleichem Maße nach DOCA und Angiotensin II Gabe an. B: Am Tag 14 nach Beginn der Angiotensin II Infusion konnte kein Unterschied in der Albuminurie zwischen IL-17^{-/-} Mäusen und Wildtyp Mäusen mehr festgestellt werden. C - E: Das Plasmacholesterin, die Anzahl der Proteinzylinder und der histologische glomeruläre Schaden jedoch waren signifikant erhöht in den IL-17^{-/-} Mäusen. F: Repräsentative Histologien der mit PAS gefärbten Nierenschnitte von Kontrollen und mit DOCA und Angiotensin II behandelten Wildtyp und IL-17^{-/-} Mäusen im Vergleich. In dem Schnitt der IL-17^{-/-} Maus sind deutlich stärkere glomeruläre Sklerose und mehrere Proteinzylinder zu erkennen. *=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001

	2	Mortolität	Körpergewicht	Nierengewicht/
	n	wonalitat	(g)	Körpergewicht (mg/g)
Normotensive Wildtyp	10	0	28.33	6.69
DOCA+Ang II Wildtyp	30	7/30	24.28	9.64
DOCA+Ang II IL-17 ^{-/-}	26	8/26	24.91	9.39

Tabelle 2: Basale Daten Tag 14, Wildtyp vs. IL-17 KO Mäuse. Die Mortalität war in beiden hypertensiven Mausgruppen im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe erhöht. Das Körpergewicht nahm ebenfalls in beiden hypertensiven Gruppen in gleichem Maße ab. Gleichzeitig stieg der Quotient aus Nierengewicht und Körpergewicht in diesen beiden Mausgruppen an als Ausdruck der Nierenhypertrophie.

Der renale Schaden in den hypertensiven Mäusen wurde von einer erhöhten Infiltration von F4/80⁺ Monozyten/Makrophagen und GR-1⁺ Neutrophilen begleitet. Während kein Unterschied für die Monozyteninfiltration gefunden werden konnte, wurde eine signifikant höhere Anzahl an Neutrophilen in den Nieren der IL-17^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen beobachtet (Abbildung 9A und B).



Abbildung 9: Inflammation am Tag 14. A: In beiden hypertensiven Mausgruppen wanderten signifikant mehr F4/80⁺ Monozyten/Makrophagen in das Nierengewebe ein als in den normotensiven Wildtyptieren. Es wurde kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen gefunden. B: Die Infiltration von Neutrophilen war in den hypertensiven IL-17^{-/-} Mäusen signifikant höher als in den hypertensiven Wildtyp Mäusen. **=p<0.01

Es gibt zwei Rezeptoren, a und c, an die IL-17 binden kann. Für diese IL-17 Rezeptoren a und c wurden in der Niere keine veränderte Expression gefunden und auch die renale Regulierung des vaskulären Adhesionsmoleküls VCAM-1 zeigte keinen Unterschied zwischen Knockout und Wildtyp Mäusen. Von IL-17 gibt es unterschiedlliche Typen. Die wichtigsten sind IL-17A und IL-17F. In beiden hypertensiven Mausgruppen war die Expression von IL-17F gleichermaßen erniedrigt (Abbildungen 10A-D).



Abbildung 10: Inflammationsmarker. A und B: Die IL-17 Rezeptoren wurden in einem Teil der Versuchsgruppen untersucht. Es wurde keine veränderte Expression der IL-17 Rezeptoren a und c in den Nieren gefunden. C und D: Ebenfalls kein signifikanter Unterschied zeigte sich in der renalen Expression von VCAM-1 und IL-17F zwischen hypertensiven Wildtyp und hypertensiven IL-17 Knockout Mäusen.

Der verstärkte renale Schaden der Knockout Mäuse war von einer signifikant erhöhten Infiltration von CD3⁺ T-Zellen begleitet (Abbildung 11A).

Als nächstes isolierten wir die Lymphozyten aus den Nieren, um die Subpopulationen der Lymphozyten zu untersuchen, die bei Bluthochdruck in die Nieren einwandern. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den hypertensiven Wildtyp Mäusen und den IL-17^{-/-} Mäusen hinsichtlich der regulatorische T-Zellen (Foxp3⁺), CD3, CD4, CD8, NKT und NK Zellen gefunden (Abbildungen 11B - C, Tabelle 3). Im Gegensatz dazu zeigte sich eine erhöhte Anzahl an $\gamma\delta$ T-Zellen in den Nieren der IL-17^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den hypertensiven Wildtyp Mäusen (Abbildungen 11D).

Außerdem isolierten wir die Makrophagen (CD11b⁺, CD11c⁻) und Dendritischen Zellen (CD11b⁺, CD11c⁺) aus den Nieren. In beiden Zelllinien fanden wir keinen Unterschied zwischen den hypertensiven Wildtyp und IL-17^{-/-} Mäusen bezüglich der Aktivierungsmarker F4/80, Ly6C und MHCII bei der Betrachtung der CD45⁺ Zellen (Abbildung 12).



Abbildung 11: Inflamatorische Zellinfiltration. A: Die histologische Auswertung der in die Niere eingewanderten CD3⁺ T-Zellen ergab eine signifikant erhöhte Anzahl in den hypertensiven IL-17 defizienten Mäusen im Vergleich zur hypertensiven Wildtypgruppe. B und C: Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der infiltrierenden Foxp3⁺ Zellen und der renalen Expression von Foxp3 gefunden. D: Die Quantifizierung der $\gamma\delta$ T-Zellen in der Durchflusszytometrie zeigte eine signifikant höhere Anzahl an $\gamma\delta$ T-Zellen in den hypertensiven IL-17 Knockout Mäusen. *=p<0.05

	CD3 (% der CD45⁺ Zellen)	CD4 (% der CD3 ⁺ Zellen)	CD8 (% der CD3 ⁺ Zellen)	Doppel negativ (% der CD3⁺ Zellen)	NK (% der CD45⁺ Zellen)	NKT (% der CD3⁺ Zellen)
Kontrolle	4.1±0.6	68.5±2.0	22.9±2.7	8.4±0.9	5.9±0.5	2.67±0.0
Wildtyp DOCA+Ang II	9.0±0.8	72.0±4.3	23.2±5.0	4.8±0.7	7.6±0.3	2.36±0.1
IL-17 ^{-/-} DOCA+Ang II	10.3±0.7	72.5±2.5	18.0±2.5	3.3±0.4	4.7±0.5	1.31±0.3

Tabelle 3: Eingewanderte Subpopulationen der aus der Niere isolierten Lymphozyten. Quantifizierung und Analyse der Subpopulationen der renalen Lymphozyten mittels Anfärbung der Zelloberflächenmarker CD3, CD4, CD8 und NKL1.1.





Abbildung 12: Charakterisierung der renalen dendritischen Zellen und Makrophagen. A: Renale dendritische Zellen (CD11b⁺, CD11c⁺) und Makrophagen (CD11b⁺, CD11c⁻) wurden mittels Durchflusszytometrie in Wildtyp und IL-17 defizienten Mäusen analysiert. B und C: Quantifizierung der in A definierten dendritischen Zellen und Makrophagen. Der Anteil an dendritischen Zellen und Makrophagen war in allen drei Versuchgruppen gleich. D: Die Expression der Aktivierungsmarker F4/80, Ly6C und MHCII auf renalen dendritischen Zellen und Makrophagen zeigte keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

3.4 Kardialer Endorganschaden am Tag 14 in IL-17^{-/-} Mäusen

Als zweites Organ untersuchten wir das Herz nach 14 tägiger Angiotensin II Infusion auf hypertensive Schäden in Wildtyp und IL-17 Knockout Mäuse. Als Zeichen des kardialen Endorganschadens stieg das relative Herzgewicht in den hypertensiven Mäusen an, jedoch war kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen festzustellen (Abbildung 13A). Das histologische Scoren der kardialen Fibrose ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den Wildtyp Hochdruckmäusen (Abbildung 13B). Der kardiale Endorganschaden wurde auch durch die Messung der Expression von fetalen Genen wie ANP, Kollagen Typ1 und dem Quotienten aus den MHC Isoformen evaluiert. All diese Parameter waren hochreguliert in den Hochdruckmäusen, jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den IL-17^{-/-} Mäusen und den Wildtyp Mäusen (Abbildung 13C-E).



Abbildung 13: Kardialer Endorganschaden am Tag 14. A: Es zeigte sich ein erhörtes Herzgewicht in den mit DOCA und Angiotensin II behandelten Mäusen. Es wurde kein Unterschied zwischen Wildtyp und IL-17 defizienten Mäusen gefunden. B: Kein Unterschied fand sich in dem Score der kardialen Fibrose zwischen den beiden Genotypen. C-E: Die Genexpression von ANP, Kollagen-1 und des MHC Quotienten wurde in 12 Wildtyp und 11 IL-17^{-/-} Mäusen gemessen. Alle Parameter waren hochreguliert in den hypertensiven Mäusen, ergaben jedoch keinen Unterschied zwischen IL-17^{-/-} und Wildtyp Mäusen.

3.5 Renaler und kardialer Endorganschaden in IL-23p19^{-/-} Mäusen

Da IL-23 für die Proliferation und das Überleben der Th17 Zellen wichtig ist, induzierten wir in IL-23p19^{-/-} Mäusen hypertensiven Endorganschaden mit dem DOCA + Angiotensin II Modell. Auch hier entwickelten die hypertensiven Knockout Mäuse eine signifikant höhere Albuminurie in der frühen Phase als die hypertensiven Wildtyp Mäuse (Abbildung 14A). Außerdem ergab die histologische Untersuchung der Nieren einen signifikant stärkeren glomerulären Schaden und eine signifikant höhere Anzahl an Proteinzylindern in den IL-23p19 defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen (Abbildung 14B und C). Das Plasma Cholesterin war signifikant höher in den Knockout Mäusen als in den Wildtyp Mäusen (Abbildung 14D).



Abbildung 14: Renaler Endorganschaden in IL-23 KO Mäusen. A: Die Albuminurie wurde in allen drei Versuchsgruppen einen Tag vor der Angiotensinpumpenimplantation (Tag -1) und dann an Tag 3, 7 und 12 nach der Pumpenimplantation bestimmt. Die IL-23p19 defizienten Mäuse entwickelten signifikant ausgeprägtere Albuminurie im Vergleich zu der Wildtypgruppe. B und C: Die Histologische Beurteilung der Nieren zeigte einen signifikant stärkeren glomerulären Schaden und eine höhere Anzahl an Proteinzylindern in den Knockout Mäusen. D: Als Reaktion auf die ausgeprägte Albuminurie im nephrotischen Bereich, stieg das Plasma Cholesterin signifikant höher in den IL-23p19^{-/-} Mäusen als in den Wildtyp Mäusen. ***=p<0.001

Um die Rolle der Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen bei hypertensiven Nierenschäden in IL-23p19 Knockout Mäusen zu untersuchen, wurde die Anzahl der infiltrierenden Foxp3⁺ Zellen per Immunhistochemie und die Foxp3 Expression mittels realtime PCR in den Nieren ausgewertet. In der Abbildung 15A sind die mit Foxp3 markierten regulatorischen T-Zellen gezeigt. Die Auszählung dieser Zellen ergab eine leicht reduzierte Anzahl an regulatorischen T-Zellen in den IL-23p19^{-/-} Mäusen verglichen mit den Wildtyp Mäusen. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abbildung 15B). Allerdings wurde eine signifikant niedrigere renale Expression von Foxp3 in den hypertensiven IL-23p19^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den hypertensiven Wildtyp Mäusen gefunden (Abbildung 15C). Diese Daten deuten auf eine verminderte Ausprägung der Foxp3 Expression in den renal eingewanderten regulativen T-Zellen der IL-23p19 Knockout Mäusen hin. Des Weiteren haben wir die renale Expression von IL-17F als Reaktion auf die Gabe von DOCA und Angiotensin II untersucht. Hier wurde kein Unterschied zwischen den hypertensiven Knockout und Wildtyp Mäusen gefunden. (Abbildung 15D).



Kontrolle Wildtyp D+A IL-23p19^{-/-} D+A

Abbildung 15: Inflammation in den Nieren der IL-23p19 KO Mäuse. A: Repräsentative Histologien der Kontrollen, der hypertensiven Wildtypen und der hypertensiven IL-23p19 Knockout Mäusen. Die regulatorischen T-Zellen sind hier immunhistochemisch mit dem Marker Foxp3 angefärbt und in den kleinen Bildausschnitten unten rechts dargestellt. B: Die histologische Auszählung der Foxp3 positiven Zellen pro Gesichtsfeld ergab eine nicht signifikante, niedrigere Anzahl an eingewanderten regulatorischen T-Zellen in den Nieren der hypertensiven Knockout Mäusen. C: Die renale Expression von Foxp3 war signifikant niedriger in den IL-23p19 Knockout Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen. D:Kein Unterschied wurde hinsichtlich der renalen IL-17F Expression gefunden. *=p<0,05

Ähnlich wie bei den IL-17 Knockout Mäusen, fanden wir auch bei den IL-23p19 Knockout Mäusen keinen veränderten systolischen Blutdruck im Vergleich zu den hypertensiven Wildtypmäusen (Kontrollen 89±4, Wildtyp DOCA + Ang II 125±2, IL-23p19^{-/-} DOCA+Ang II 120±4 mmHg). Ebenso wurde kein Unterschied in der Entwicklung kardialer Fibrose und der Expression fetaler Gene und Kollagen Typ 1 zwischen beiden Genotypen entdeckt (Abbildung 16A-D).



Abbildung 16: Kardialer Endorganschaden in IL-23p19 KO Mäusen. A: Die histologische Beurteilung der kardialen Fibrose in den mit Masson Goldner gefärbten Herzschnitten zeigte deutliche Herzfibrose in beiden hypertensiven Mausgruppen ohne signifikanten Unterschied zueinander. B-D: Die kardiale Expression von ANP und Kollagen-1, sowie der Quotient der MHC Unterformen waren ebenfalls in beiden hypertensiven Mausgruppen hochreguliert, jedoch gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypen.

Abschließend untersuchten wir die basale renale Histologie und die Infiltration von inflammatorischen Zellen in den Knockout Mäusen, um auszuschließen, dass der Knockout per se einen renalen Schaden entwickelt oder ein entzündlicher Prozess vorbesteht. Repräsentative mikroskopische Bilder, die Auswertung der glomerulären Veränderungen und die Daten der Immunhistochemie sind in Abbildung 17 und in Tabelle 4 gezeigt. Auch die ausführliche FACS Analyse der aus den Nieren isolierten Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen ergab keinen Unterschied zwischen Wildtyp und den Knockout Mäusen unter basalen Bedingungen (Abbildung 18 und 19, Tabelle 5 und 6).





Abbildung 17: Basale Charakterisierung von normotensiven IL-17 KO und IL-23p19 KO Mäusen. A: Gezeigt sind mit PAS gefärbte Nierenschnitte von unbehandelten Wildtyp, IL-17^{-/-} und IL-23p19^{-/-} Mäusen. Es wurden keine renalen Abnormalitäten gefunden. B: Dies wurde durch das Scoren des glomerulären Schadens bestätigt.

	F4/80 ⁺ Zellen (Score)	CD3⁺ Zellen (Score)
Wildtyp	0.12±0.01	0.21±0.01
IL-17-/-	0.07±0.04	0.27±0.04
IL-23p19-/-	0.09±0.03	0.11±0.03

Tabelle 4: Basale Inflammation in IL-17 KO und IL-23p19 KO Mäusen. Es wurde kein Unterschied zwischen den beiden unbehandelten Knockout Mausgruppen und der Wildtyp Mausgruppe hinsichtlich der Einwanderung von CD3⁺ T-Zellen und F4/80⁺ Monozyten/Makrophagen in die Niere gefunden.



Abbildung 18: Basale Charakterisierung der renalen Lymphozyten in IL-17 KO Mäusen. Die renale Lymphozyten wurden mit Antikörpern gegen die Zelloberflächenmarker CD3, $\gamma\delta$ TCR, NK1.1, CD4 and CD8 gefärbt und in der FACS Analyse anschließend charakterisiert.

	CD3 (% der CD45⁺ Zellen)	CD4 (% der CD3⁺ Zellen)	CD8 (% der CD3 ⁺ Zellen)	γδ T (% der CD45⁺ Zellen)	Doppel negativ (% der CD3 ⁺ Zellen)	NK (% der CD45⁺ Zellen)	NKT (% der CD3⁺ Zellen)
Wildtyp	12.8±1.2	69.2±1.6	24.0±0.9	1.36±0.1	6.6±1.0	11.9±1.2	2.24±0.3
IL-17-/-	12.9±0.8	68.1±1.1	25.7±1.5	1.21±0.1	6.0±0.7	12.2±0.7	1.49±0.2

Tabelle 5: Quantifizierung der basalen renalen Lymphozyten in IL-17 KO Mäusen. Die Analyse der basal in die Niere eingewanderten Lymphozyten in Wildtyp Mäusen und IL-17 Knockout Mäusen ergab keinen Unterschied zwischen beiden Genotypen.



Abbildung 19: Basale Charakterisierung von renalen dendritischen Zellen und Makrophagen. A: Renale dendritische Zellen (CD11b⁺,CD11c⁺) und Makrophagen (CD11b⁺,CD11c⁻) wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie in gesunden Wildtypen und IL-17 Knockout Mäusen analysiert. B und C: Quantifizierung der in A definierten dendritischen Zellen und Makrophagen. D: Expression von F4/80, Ly6C und MHCII auf renalen dendritischen Zellen und Makrophagen.

3.6 Renaler und kardialer Endorganschaden in RAG-1^{-/-} Mäusen

Um nun die Rolle des adaptiven Immunsystems bei hypertensiven Endorganschäden zu untersuchen, führten wir das DOCA und Angiotensin II Modell ebenfalls in RAG-1^{-/-} Mäusen durch. Diese Mäuse besitzen keine T- und B-Zellen und somit kein adaptives Immunsystem. Am Tag 3, 7 und 14 nach Beginn der Angiotensin II Infusion sahen wir keinen Unterschied in der Albuminurie zwischen den hypertensiven Wildtyp Mäusen und den hypertensiven RAG-1 Knockout Mäusen (Abbildung 20A). Auch histologisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des glomerulären Schadens und der Anzahl der Proteinzylinder in den Nieren zwischen beiden Genotypen (Abbildungen 20B und C). Das Plasma Cholesterin als Marker für eine Albuminurie im nephrotischen Bereich war in beiden hypertensiven Mausgruppen leicht erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch gab es auch hier keinen Unterschied zwischen den beiden hypertensiven Genotypen (Abbildung 20D).



Abbildung 20: Renaler Endorganschaden in RAG-1 KO Mäusen. A: Gezeigt ist die Albuminurie der drei Mausgruppen einen Tag vor der Angiotensinpumpenimplantation und an Tag 3, 7 und 12 nach Beginn der Angiotensin II Infusion. Die Albuminurie stieg über die gesamte Zeit in den Wildtyp und den RAG-1^{-/-} Mäusen im gleichen Maße an. B: Die histologische Beurteilung des glomerulären Schadens zeigte einen identischen Schaden in den Nieren der Wildtyp Mäuse und der RAG-1^{-/-} Mäuse. C: Die Anzahl der Proteinzylinder in den histologischen Nierenschnitten war in den RAG-1 Knockout Mäusen etwas niedriger als in den Wildtyp Mäusen. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. D: Ebenfalls kein Unterschied wurde hinsichtlich des Plasma Cholesterins zwischen beiden hypertensiven Genotypen gefunden.

In beiden hypertensiven Mausgruppen fand sich ein erhöhtes relatives Nierengewicht, als Ausdruck einer Nierenhypertrophie, im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe. Zwischen beiden Genotypen gab es keinen Unterschied hinsichtlich dieses Parameters, sowie auch hinsichtlich der Mortalität und des Körpergewichtes. Die RAG-1^{-/-} Mäuse entwickelten unter der Angiotensin II Infusion signifikant niedrigeren Blutdruck als die hypertensiven Wildtyp Mäuse (Tabelle 6).

	n	Mortalität	Körpergewicht (g)	Nierengewicht/ Körpergewicht (mg/g)	Systolischer Blutdruck (mmHg)
Normotensive Wildtyp	4	0	24.10	6.47	94.6
DOCA+Ang II Wildtyp	22	6/22	22.92	12.51	128.1
DOCA+Ang II RAG-1 ^{-/-}	20	6/20	21.56	12.49	111.6 *

Tabelle 6: Basale Daten Wildtyp vs. RAG-1 KO Maus. Verglichen wurden 4 normotensive Wildtyp Mäuse, 22 hypertensive Wildtyp Mäuse und 20 hypertensive RAG-1 Knockout Mäuse. Aus beiden hypertensiven Mausgruppen starben vorzeitig während des Versuches jeweils 6 Mäuse. In diesen beiden Versuchsgruppen sank das Körpergewicht leicht und das relative Nierengewicht stieg stark an. Es konnte kein Unterschied zwischen den hypertensiven Wildtyp Mäusen und den hypertensiven RAG-1 Knockout Mäusen festgestellt werden. Die RAG-1^{-/-} Mäuse entwickelten einen signifikant niedrigeren Blutdruck als die Wildtypmäuse unter Angiotensin II Infusion. * = p<0,05 (RAG-1^{-/-} vs. hypertensive Wildtyp)

Weiterhin untersuchten wir die Inflammations- und Fibrosemarker, CCL2 und PAI-1, in den Nieren mittels Real time Rt-PCR. Die hypertensiven Wildtyp Mäuse und die hypertensiven RAG-1 Knockout Mäuse zeigten eine erhöhte renale Expression von CCL2 und PAI-1 im Vergleich zu den normotensiven Wildtyp Kontrollen. Keinen Unterschied wurde zwischen den beiden hypertensiven Genotypen gefunden (Abbildungen 20A und B). In der Immunhistologie wurde eine verstärkte Infiltration des Nierengewebes beider hypertensiver Mausgruppen mit F4/80 positiven Monozyten/Makrophagen gefunden. Auch hier gab es keinen Unterschied zwischen den hypertensiven Wildtyp Mäusen und den hypertensiven RAG-1^{-/-} Mäusen (Abbildung 21C).



Abbildung 21: Inflammation in RAG-1 KO Mäusen. A: Die renale Expression des Inflammationsmarkers CCL2 war in den hypertensiven Wildtyp Mäusen, wie auch in den hypertensiven RAG-1^{-/-} gleichermaßen erhöht. B: Ebenso verhielt sich die renale Expression des Fibrosemarkers PAI-1. C: In der Immunhistochemischen F4/80-Färbung für Monozyten/Makrophagen zeigte sich eine ebenfalls gleichermaßen verstärkte Infiltration dieser Zellen in die Nieren beider hypertensiven Mausgruppen.

Abschließend evaluierten wir den kardialen Endorganschaden in den RAG-1^{-/-} Mäusen. Ähnlich wie bei den IL-17^{-/-} Mäusen und auch den IL-23^{-/-} Mäusen wurde kein Unterschied zwischen den hypertensiven Wildtyp Mäusen und den hypertensiven RAG-1^{-/-} Mäusen für die Entwicklung kardialer Fibrose, sowie für die Expression fetaler Gene und Kollagen-1 gefunden (Abbildung 21A-D).



Abbildung 22: Kardialer Endorganschaden in RAG-1 KO Mäusen. A: Die histologische Beurteilung der kardialen Fibrose in den mit Masson Goldner gefärbten Herzschnitten zeigte deutliche Herzfibrose in beiden hypertensiven Mausgruppen ohne signifikanten Unterschied zueinander. B-D: Die kardiale Expression von ANP und Kollagen-1, sowie der Quotient der MHC Unterformen waren ebenfalls in beiden hypertensiven Mausgruppen hochreguliert, jedoch gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypen.

4. Diskussion

4.1 Die Rolle der IL-17/IL-23 Achse bei hypertensiven Endorganschäden

Das angeborene und adaptive Immunsystem wird zunehmend als wichtiger Einflussfaktor bei der Ausprägung von Hypertonie und hypertensiven Endorganschäden angesehen. Es wurde gezeigt, dass T-Zellen eine essentielle Rolle bei der Entwicklung von Hypertonie spielen (Guzik et al., 2007, Crowley et al., 2010). Die speziellen Untergruppen der T-Zellen, die für Hypertonie und hypertensive Endorganschäden wichtig sind, sind noch unbekannt. Aktuelle Daten weisen darauf hin, dass IL-17 eine wichtige Rolle bei Bluthochdruck spielt und ein neues therapeutisches Ziel sein könnte (Madhur et al., 2010).

C57black Mäuse dienen bei den meisten Knockout Mäusen als Maushintergrund. Jedoch ist es nicht möglich, eine detaillierte Studie zu hypertensiven Endorganschäden mit Angiotensin II Infusion alleine in C57black Mäusen durchzuführen, da diese Mäuse hier keinen glomerulären Schaden oder Albuminurie entwickeln (Wesseling et al., 2005). Daher entwickelten wir kürzlich ein Modell zur Induktion von hypertensiven renalen und kardialen Endorganschäden durch die Kombination von DOCA Salz und Angiotensin II Infusion in C57black Mäusen (Kirchhoff et al., 2008). Dieses Model ist besonders hilfreich, um die Rolle des Immunsystems bei hypertensiven Endorganschäden zu untersuchen, da die Immunsuppression bei Patienten mit refraktärer Erkrankung oder massiven Endorganschäden nützlich sein könnte (Krebs et al., 2012, Sydow et al., 2012).

Die aktuelle Arbeit liefert neue Erkenntnisse über die Rolle von IL-17 und IL-23 bei hypertensiven Endorganschäden. Wir konnten in unserem Model für hypertensive Endorganschäden eine renale Anreicherung von Th17 Zellen in hypertensiven Wildtyp Mäusen zeigen. Wenige Tage nach dem Start der Angiotensin II Infusion in diesem Modell entwickelten die Mäuse eine massive Albuminurie. Überraschenderweise verstärkte die IL-17 Defizienz die Albuminurie und die hypertensiven glomerulären Schäden waren ausgeprägter in den IL-17^{-/-} Mäusen als in den Wildtyp Mäusen. Ähnliche Ergebnisse beobachteten wir in den IL-23p19^{-/-} Mäusen. Dies unterstützt erheblich die protektive Rolle der IL-17/IL-23 Achse in der Entwicklung von hypertensiven Nierenschäden im DOCA + Angiotensin II Modell. Der konkrete zugrunde liegende Mechanismus des widersprüchlichen Effektes von IL-17 und IL-23 Defizienz bleibt bisher unbekannt. Wir entdeckten eine Expression des IL-17a und c Rezeptors in der Niere. Daher ist es wahrscheinlich, dass IL-17 einen Einfluss auf die infiltrierenden und ortsständigen Zellen in der Niere ausübt. IL-17 könnte das epitheliale Zellüberleben positiv beeinflussen oder auf andere Weise helfen die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere aufrecht zu erhalten. Die Autophagie in den Podozyten beeinflusst die Anfälligkeit für glomeruläre Erkrankungen (Hartleben et al., 2010) und IFNγ Rezeptor defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Albuminurie und eine gestörte Autophagie als Antwort auf Angiotensin II Infusion (Marko et al., 2012). Obwohl sich in unserer Studie eine verstärkte Autophagie zeigte, fanden wir keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypen.

γδ T-Zellen exprimieren die T Zell Rezeptor gamma-delta Ketten. Diese Zellen verbinden das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem. Ihre proinflammatiorische Funktion hat in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit erregt (Vantourout and Hayday, 2013). Diese Zellen wurden noch nicht bei Hypertonie untersucht. Interessanterweise wurde eine erhöhte Anzahl an γδ T-Zellen in den Nieren der IL-17 defizienten Mäusen festgestellt. γδ T-Zellen haben eine antigenpräsentierende Funktion und können Zytokine wie IFNγ, IL-6 und Perforin sezernieren. Die verstärkte Infiltration von γδ T-Zellen könnte einer der Mechanismen sein, die den stärkeren glomerulären Schaden in den IL-17^{-/-} Mäusen verursacht. γδ T-Zellen zeigen eine schnelle initiale Immunantwort, ähnlich wie im angeborenen Immunsystem und agiert somit eher in der Initiationsphase der Immunreaktion (Vantourout and Hayday, 2013). Dies unterstützt die mögliche Rolle dieser Zellen, da der Unterschied in der Albuminurie zwischen Wildtyp und IL-17^{-/-} Mäusen am deutlichsten in der Anfangsphase der Angiotensin II Infusion war.

Regulatorische T-Zellen schützen vor Hypertonie und hypertensiven Endorganschäden (Kasal et al., 2012). Eine niedrigere Expression von Foxp3 in den IL-23p19^{-/-} Mäusen könnte auf eine abgeschwächte antiinflammatorische Kapazität der regulatorischen T-Zellen in der Niere hinweisen.

Auch in anderen entzündlichen Erkrankungen ist die genaue pathogene Rolle von IL-17 und IL-23 noch unsicher. Die Vermutung, dass Th17 Zellen pathogene Zellentypen sind, wurde in Frage gestellt. IL-17 und IL-23 können entweder eine pathogene oder eine protektive Rolle bei Erkrankungen spielen. Zum Beispiel verschlimmert IL-17 Defizienz die experimentelle Kolitis (O'Connor et al., 2009). Bei Arteriosklerose wurden sowohl verstärkende als auch mildernde Effekte von IL-17 Defizienz beschrieben (Taleb et al., 2009, Danzaki et al., 2012, Madhur et al., 2011). Bei der Glomerulonephritis in IL-17^{-/-} Mäusen wurde eine biphasische Antwort gefunden, mit schützenden Einflüssen gegen Nierenschäden in der frühen Phase und Verschlimmerung in der späteren Phase (Odobasic et al., 2011). Eine protektive Wirkung von IL-17 wurde auch in der Bildung von Aortenaneurysmen gesehen (Romain et al., 2013) und niedrige zirkulierende IL-17 Spiegel sind mit einem höheren kardiovaskulären Risiko nach Myokardinfarkt verbunden (Simon et al., 2013).

Die IL-17 Defizienz ist nicht gleichbedeutend mit der Hemmung der Th17 Zellgeneration, da IL-17 auch in einigen anderen Zelltypen produziert wird. IL-23 wird hauptsächlich von aktivierten dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen produziert. Jüngste Daten zeigen, dass auch das angeborene (=innate) Immunsystem eine Rolle bei Hypertonie spielt (Harwani et al., 2012) und IL-17 und IL-23 wurden auch mit dem angeborenen Immunsystem in Verbindung gebracht (Hue et al., 2006).

Um das Ausmaß des renalen und kardialen Endorganschadens zu beurteilen, benutzten wir mehrere quantitative und semiquantitative Verfahren sowohl in den IL-17^{-/-} Mäusen als auch in den IL-23^{-/-} Mäusen. Die Nierenschäden wurden histologisch durch das Scoren des glomerulären Schadens in mit PAS-gefärbten Nierenschnitten ermittelt. Die Albuminurie wurde an mehreren Zeitpunkten gemessen und die erhöhte Albuminurie wurde durch erhöhte Plasma Cholesterin Werte und vermehrten Proteinzylindern in den Nierenschnitten bestätigt. Der kardiale Endorganschaden wurde anhand der Fibrose und der Expression von fetalen Genen und Kollagen beurteilt. In den hypertensiven Mäusen fanden wir neben dem renalen Schaden ebenso kardiale Schädigungen. Allerdings veränderte weder die IL-17 Defizienz noch die IL-23 Defizienz den Grad des kardialen Endorganschadens. Dies deutet darauf hin, dass der verstärkte hypertensive Endorganschaden durch die Abwesenheit der IL-17/IL-23 Achse spezifisch für die Niere ist.

Auf den ersten Blick sind unsere Daten widersprüchlich mit den Daten von Nguyen et al. (Nguyen et al., 2013) und Madhur et al. (Madhur et al., 2010). Während diese Autoren gezeigt haben, dass die tägliche Injektion von IL-17 zu endothelialer Dysfunktion und Hypertonie führt und die IL-17 Defizienz schützende Wirkung bei Angiotensin II Infusion hat, spiegeln unsere Daten eine verstärkte Schädigung bei DOCA + Angiotensin II wieder. Madhur et al. zeigten, dass die Angiotensin II Infusion eine Th17 Antwort induzierte, die durch eine erhöhte Produktion von IL-17 durch zirkulierende T-Zellen und einer erhöhten Anzahl an IL-17⁺ zirkulierenden T-Zellen zu erkennen war. Außerdem fanden sie weniger vaskuläre Dysfunktion bei Angiotensin II Gabe in IL-17 defizienten Mäusen. Obwohl die initiale hypertensive Antwort auf Angiotensin II in IL-17^{-/-} und Wildtyp Mäusen ähnlich war, war der Blutdruck in den IL-17^{-/-} Mäusen nach vier Wochen niedriger als in den Wildtyp Mäusen (Madhur et al., 2010). Der Unterschied zu der Arbeit von Nguyen et al. könnte dadurch erklärt werden, dass IL-17 alleine gegeben wurde und nicht in Kombination mit Angiotensin II und DOCA Salz. Ebenso könnte der Unterschied zu der Studie von Madhur durch unsere zusätzliche Gabe des Aldosteronanalogons DOCA und Salz erklärt werden. Aldosteron begünstigt autoimmune Schädigungen durch die Verstärkung der Th17 vermittelten Immunreaktion, wie kürzlich gezeigt wurde (Herrada et al., 2010). Mit Aldosteron behandelte dendritische Zellen wiesen eine erhöhte Kapazität zur Induktion von IL-17 in CD4⁺ T-Zellen auf. Außerdem weisen aktuelle Daten darauf hin, dass Salz

Autoimmunerkrankungen durch die Induktion von pathogenen Th17 Zellen verstärken (Kleinewietfeld et al., 2013). Insgesamt betrachtet deuten diese Daten auf eine mechanistische Verbindung zwischen Angiotensin II, Aldosteron und IL-17 Produktion hin.

4.2 Die Rolle des adaptiven Immunsystems bei hypertensiven Endorganschäden

Arterielle Hypertonie und hypertensive Endorganschäden in der Niere und im Herzen gehen einher mit der Infiltration von Monozyten, T-Zellen und Neutrophilen (Steinmetz et al., 2007, Krebs et al., 2012). Es ist bisher unklar ob der renale Schaden primär durch die eingewanderten Zellen verursacht wird oder ob die Infiltration von Entzündungszellen ein sekundäres Phänomen nach induzierter Schädigung ist. Jüngste Arbeiten von Guzik et al. (Guzik et al., 2007) und Crowley et al. (Crowley et al., 2010) weisen darauf hin, dass T-Zellen den Blutdruckanstieg unter Angiotensin II Infusion verursachen. Unklar bleibt aber, ob die T-Zellen auch bei hypertensiven Endorganschäden eine entscheidende Rolle spielen. Unsere Daten zeigen, dass das adaptive Immunsystem, also T- und B-Zellen, keine Rolle bei der Entwicklung von hypertensiven Endorganschäden in der Niere und im Herzen spielen. Wir führten das DOCA + Angiotensin II Modell in RAG-1^{-/-} Mäusen durch. Aufgrund des fehlenden "Recombination activating gene 1" sind diese Mäuse nicht in der Lage T- oder B-Zellen zu bilden. Demnach fehlt ihnen das erworbene Immunsystem. Um den Grad der hypertensiven renalen und kardialen Schädigung zu beurteilen, wendeten wir dieselben quantitativen und semiquantitativen Verfahren an, wie bei den IL-17^{-/-} und den IL-23p19^{-/-} Mäusen. Die Nierenschäden wurden histologisch durch das Scoren des glomerulären Schadens und das Auszählen von Proteinzylindern in mit PAS-gefärbten Nierenschnitten ermittelt. Die Albuminurie wurde an mehreren Zeitpunkten gemessen. Im Plasma wurde das Cholesterin, als Marker für eine Albuminurie im nephrotischen Bereich, gemessen. Der kardiale Endorganschaden wurde anhand der Fibrose und der Expression von fetalen Genen und Kollagen beurteilt. Wir fanden in beiden hypertensiven Mausgruppen renale, sowie kardiale Schäden. Jedoch zeigte sich in keiner der Messverfahren ein signifikanter Unterschied zwischen den hypertensiven RAG-1^{-/-} Mäusen und den hypertensiven Wildtyp Mäusen.

Die RAG-1^{-/-} Mäuse entwickelten auch in unserem DOCA + Angiotensin II Modell signifikant niedrigeren Blutdruck als die Wildtyp Mäuse. Dies bestätigt die Daten von Guzik et al. und zeigt, dass auch im DOCA + Angiotensin II Modell die Blutdruckentstehung ohne das adaptive Immunsystem vermindert ist. Offenbar reicht dieser kleine Blutdruckunterschied nicht aus, um den Endorganschaden signifikant zu verändern.

4.3 Wesentliche Aspekte der Arbeit

Die aktuelle Studie liefert neue und unerwartete Erkenntnisse über die Rolle der IL-17/IL-23 Achse bei hypertensiven Endorganschäden. IL-17 und IL-23p19 Knockout Mäuse entwickeln verstärkten renalen Schaden als Antwort auf DOCA + Angiotensin II. Im Gegensatz dazu wirkt sich weder die IL-17 noch die IL-23p19 Defizienz auf den kardialen Endorganschaden bei DOCA + Angiotensin II Gabe aus.

Diese Beobachtungen weisen auf eine schützende Rolle der IL-17/IL-23 Achse in diesem Modell der arteriellen Hypertonie hin.

Des Weiteren zeigen unsere Daten, dass das adaptive Immunsystem keine Rolle bei der Entwicklung von hypertensiven Endorganschäden spielt. RAG-1^{-/-} Mäuse entwickeln vergleichbaren renalen und kardialen Schaden in dem DOCA + Angiotensin II Modell wie die Wildtyp Mäuse.

4.4 Ausblick

Unsere Daten betonen die Komplexität der Immunmechanismen bei hypertensiven Endorganschäden. Das Ausschalten der IL-17/IL-23 Achse resultiert nicht zwingend in einer schützenden Wirkung. IL-17 und IL-23 Defizienz verstärkt hypertensive renale Schäden, während die kardialen Schäden nicht beeinflusst werden. IL-17 und IL-23 sind notwendig um die Integrität bestimmter Zelltypen aufrecht zu erhalten. Zukünftige Studien werden notwendig sein, um herauszufinden, ob die Hemmung der IL-17/IL-23 Achse nützlich oder schädlich in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen sein wird. Außerdem würden wir empfehlen, dass die Nierenfunktion von Patienten, die im Rahmen von klinischen Studien IL-17 Hemmung erhalten, engmaschig kontrolliert werden sollte. Das adaptive Immunsystem scheint eine Rolle in der Entwicklung der Hypertonie zu spielen, jedoch keinen Einfluss auf die Entstehung von renalen und kardialen hypertensiven Endorganschäden im DOCA + Angiotensin II Modell zu haben. Daher vermuten wir, dass das innate IL-17 den vermehrten renalen Endorganschaden unter

DOCA + Angiotensin II verursacht. Es wurde daher durch Kreuzung von RAG-1^{-/-} Mäusen mit IL-17^{-/-} bzw. IL-23p19^{-/-} Mäusen Doppelknockout Mäuse geschaffen, mit denen die Rolle des innate IL-17 im Weiteren untersucht werden kann.

5. Zusammenfassung

T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Hypertonie unter Angiotensin II Infusion. Jedoch sind die speziellen Untergruppen der T-Zellen, die für die Entstehung von hypertensiven Endorganschaden wichtig sind unbekannt. Th17 Zellen sind eine kürzlich entdeckte Untergruppe, die IL-17 produziert und IL-23 für ihre Expansion benötigt. Um die Rolle der Th17 Immunreaktion bei hypertensiven renalen und kardialen Endorganschäden zu untersuchen, wurde in Wildtyp Mäusen (n=39) und IL-17 defizienten Mäusen (n=31) Bluthochdruck mit Deoxycorticosterone Acetat (DOCA) + Angiotensin II (Ang II) induziert. Die Organschäden wurden am Tag 4 und am Tag 14 beurteilt. Um die IL-17/IL-23 Achse an einer anderen Stelle zu hemmen, induzierten wir ebenfalls Hypertonie mit dem DOCA + Angiotensin II Modell in IL-23p19 defizienten Mäusen. In hypertensiven Wildtyp Mäusen reicherten sich Th17 Zellen in der Niere an. Der systolische Blutdruck unterschied sich nicht in den hypertensiven IL-17 defizienten Mäusen und den hypertensiven Wildtyp Mäusen. Am Tag 3 nach Induktion der Hypertonie wurde eine signifikant erhöhte Albuminurie in den IL-17 defizienten Mäusen im Vergleich zu den hypertensiven Wildtyp Mäusen. Nach 14 Tagen zeigte die Histologie einen stärkeren glomerulären Schaden und mehr renale Infiltration von vδ T-Zellen in den IL-17 Knockout Mäusen als in den Wildtyp Mäusen. Ebenso entwickelten die IL-23p19 defizienten Mäuse unter DOCA + Angiotensin II eine signifikant erhöhte Albuminurie und stärkeren glomerulären Schaden verglichen mit den Wildtyp Mäusen. DOCA + Angiotensin II induziert auch kardiale Schäden, die durch das Herzgewicht, die kardiale Fibrose und die Expression von fetalen Genen und Matrixkomponenten messbar sind. Allerdings zeigten sich hier keine Unterschiede zwischen den IL-17^{-/-}, IL-23p19^{-/-} und den Wildtyp Mäusen. Die IL-17/IL-23 Defizienz verstärkt die durch DOCA + Angiotensin II induzierte Albuminurie und hypertensive renale Schäden. Es hat keinen Einfluss auf hypertensive kardiale Schäden.

Um anschließend die Rolle des adaptiven Immunsystems bei hypertensiven Endorganschäden zu untersuchen, wandten wir das DOCA + Angiotensin II Modell bei RAG-1^{-/-} Mäusen an. Diesen Mäusen fehlen T- und B-Zellen. Es wurde kein Unterschied in der Albuminurie nach 3,7 und 12 Tagen zwischen den RAG-1 defizienten Mäusen und den Wildtyp Mäusen festgestellt. Auch die Histologie zeigte einen vergleichbaren glomerulären Schaden und keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Anzahl an Proteinzylindern. Auch der kardiale Endorganschaden war in beiden Genotypen gleich stark ausgeprägt. Das adaptive Immunsystem spielt somit keine Rolle bei der Entwicklung von hypertensiven renalen und kardialen Endorganschäden in dem untersuchten Modell.

6. Erklärung des Eigenanteils

Folgende Anteile der vorliegenden Arbeit basieren auf meiner unmittelbaren (Mit-)Arbeit:

- Versuchsdesign, Versuchsplanung und Diskussion der Daten: gemeinsam mit Prof.
 Dr. Ulrich Wenzel und Dr. Christian Krebs
- Operative Eingriffe: gemeinsam mit Dr. Alva Rosendahl, Dr. Sascha Lange, Dr. Christian Krebs und Prof. Dr. Ulrich Wenzel
- Betreuung der Mäuse während des Versuches: gemeinsam mit der Versuchstierhaltung des UKE und Stefan Gatzemeier
- Gewinnung der Urinproben mittels Stoffwechselkäfigen: gemeinsam mit Stefan Gatzemeier
- Albumin ELISA: gemeinsam mit Stefan Gatzemeier
- Realtime RT-PCR: gemeinsam mit Stefan Gatzemeier
- Tail-cuff-Blutdruckmessungen: gemeinsam mit Dr. Christian Krebs
- Herstellung der Leukozyteneinzelzellsuspension f
 ür die FACS Analyse: gemeinsam mit Dr. Alva Rosendahl, Dr. Sascha Lange, Dr. Christian Krebs und Stefan Gatzemeier
- Mikroskopische Auswertung der histologischen Schnitte: gemeinsam mit Dr. Christian Krebs
- Planung und Durchführung der statistischen Analyse: gemeinsam mit Prof. Dr. Ulrich Wenzel nach Beratung am Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie am UKE durch Dr. Hans O. Pinnschmidt
- Erstellen der Abbildungen und Tabellen: gemeinsam mit Dr. Christian Krebs
- Die IL-17/IL-23 Daten wurden veröffentlicht (Krebs et al., 2013)
- Korrekturlesen des Manuskriptes des Papers

Die Durchführung nachfolgender Anteile der Arbeit basiert nicht auf meiner unmittelbaren Arbeit. Jedoch wirkte ich bei deren Auswertung und Interpretation mit:

- FACS Analyse: Dr. Alva Rosendahl, Dr. Sascha Lange und Dr. Christian Krebs
- Evaluation der Autophagie in den Podozyten: Dr. Catherine Meyer-Schwesinger
- Erstellung der Histologien: Mariola Rezka
- Bestimmung von Kreatinin im Urin, Cholesterin und Blut-Harnstoff-N im Plasma per Autoanalyse: Institut für klinische Chemie des UKE

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ADMA	Asymmetric dimethyl arginine
Ang II	Angiotensin II
ANOVA	Analysis of variance
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
BUN	Blut-Harnstoff-N
CD	Cluster of differentiation
DNA	Desoxyribonucleic acid
DOCA	Deoxycorticosteron acetate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
GR-1	Granulocyte differentiation antigen 1
IFN-γ	Interferon Gamma
IL	Interleukin
KO Mäuse	Knockout Mäuse
MHC	Myosin heavy chain
NaCl	Natriumchlorid
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
PAS	Periodic acid schiff
PBS	Phosphate buffered saline
RAG-1	Recombination activating gene 1
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain
	reaction
Th17	T Helfer 17 (Zelle)
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1

8. Literaturverzeichnis

- CROWLEY, S. D., SONG, Y. S., LIN, E. E., GRIFFITHS, R., KIM, H. S. & RUIZ, P. (2010) Lymphocyte responses exacerbate angiotensin II-dependent hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298, R1089-97.
- CUA, D. J., SHERLOCK, J., CHEN, Y., MURPHY, C. A., JOYCE, B., SEYMOUR, B., LUCIAN, L., TO, W., KWAN, S., CHURAKOVA, T., ZURAWSKI, S., WIEKOWSKI, M., LIRA, S. A., GORMAN, D., KASTELEIN, R. A. & SEDGWICK, J. D. (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421, 744-8.
- DANZAKI, K., MATSUI, Y., IKESUE, M., OHTA, D., ITO, K., KANAYAMA, M., KUROTAKI, D., MORIMOTO, J., IWAKURA, Y., YAGITA, H., TSUTSUI, H. & UEDE, T. (2012) Interleukin-17A deficiency accelerates unstable atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32, 273-80.
- FRAUNE, C., LANGE, S., KREBS, C., HOLZEL, A., BAUCKE, J., DIVAC, N.,
 SCHWEDHELM, E., STREICHERT, T., VELDEN, J., GARRELDS, I. M., DANSER, A.
 H., FRENAY, A. R., VAN GOOR, H., JANKOWSKI, V., STAHL, R., NGUYEN, G. &
 WENZEL, U. O. (2012) AT1 antagonism and renin inhibition in mice: pivotal role of targeting angiotensin II in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 303, F1037-48.
- GUZIK, T. J., HOCH, N. E., BROWN, K. A., MCCANN, L. A., RAHMAN, A., DIKALOV, S., GORONZY, J., WEYAND, C. & HARRISON, D. G. (2007) Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med*, 204, 2449-60.
- HARRINGTON, L. E., HATTON, R. D., MANGAN, P. R., TURNER, H., MURPHY, T. L., MURPHY, K. M. & WEAVER, C. T. (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol,* 6, 1123-32.
- HARTLEBEN, B., GODEL, M., MEYER-SCHWESINGER, C., LIU, S., ULRICH, T., KOBLER, S., WIECH, T., GRAHAMMER, F., ARNOLD, S. J., LINDENMEYER, M. T., COHEN, C. D., PAVENSTADT, H., KERJASCHKI, D., MIZUSHIMA, N., SHAW, A. S., WALZ, G. & HUBER, T. B. (2010) Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *J Clin Invest*, 120, 1084-96.
- HARWANI, S. C., CHAPLEAU, M. W., LEGGE, K. L., BALLAS, Z. K. & ABBOUD, F. M. (2012) Neurohormonal modulation of the innate immune system is proinflammatory in the prehypertensive spontaneously hypertensive rat, a genetic model of essential hypertension. *Circ Res*, 111, 1190-7.
- HERRADA, A. A., CONTRERAS, F. J., MARINI, N. P., AMADOR, C. A., GONZALEZ, P. A., CORTES, C. M., RIEDEL, C. A., CARVAJAL, C. A., FIGUEROA, F., MICHEA, L. F., FARDELLA, C. E. & KALERGIS, A. M. (2010) Aldosterone promotes autoimmune damage by enhancing Th17-mediated immunity. *J Immunol*, 184, 191-202.
- HIROTA, K., AHLFORS, H., DUARTE, J. H. & STOCKINGER, B. (2012) Regulation and function of innate and adaptive interleukin-17-producing cells. *EMBO Rep*, 13, 113-20.

- HUE, S., AHERN, P., BUONOCORE, S., KULLBERG, M. C., CUA, D. J., MCKENZIE, B. S., POWRIE, F. & MALOY, K. J. (2006) Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. J Exp Med, 203, 2473-83.
- KASAL, D. A., BARHOUMI, T., LI, M. W., YAMAMOTO, N., ZDANOVICH, E., REHMAN, A., NEVES, M. F., LAURANT, P., PARADIS, P. & SCHIFFRIN, E. L. (2012) T regulatory lymphocytes prevent aldosterone-induced vascular injury. *Hypertension*, 59, 324-30.
- KIRCHHOFF, F., KREBS, C., ABDULHAG, U. N., MEYER-SCHWESINGER, C., MAAS, R., HELMCHEN, U., HILGERS, K. F., WOLF, G., STAHL, R. A. & WENZEL, U. (2008) Rapid development of severe end-organ damage in C57BL/6 mice by combining DOCA salt and angiotensin II. *Kidney Int*, 73, 643-50.
- KLEINEWIETFELD, M., MANZEL, A., TITZE, J., KVAKAN, H., YOSEF, N., LINKER, R. A., MULLER, D. N. & HAFLER, D. A. (2013) Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*, 496, 518-22.
- KREBS, C., FRAUNE, C., SCHMIDT-HAUPT, R., TURNER, J. E., PANZER, U., QUANG, M. N., TANNAPFEL, A., VELDEN, J., STAHL, R. A. & WENZEL, U. O. (2012) CCR5 deficiency does not reduce hypertensive end-organ damage in mice. *Am J Hypertens*, 25, 479-86.
- KREBS, C. F., LANGE, S., NIEMANN, G., ROSENDAHL, A., LEHNERS, A., MEYER-SCHWESINGER, C., STAHL, R. A., BENNDORF, R. A., VELDEN, J., PAUST, H. J., PANZER, U., EHMKE, H. & WENZEL, U. O. (2013) Deficiency of the interleukin 17/23 axis accelerates renal injury in mice with deoxycorticosterone acetate+angiotensin ii-induced hypertension. *Hypertension*, 63, 565-71.
- MADHUR, M. S., FUNT, S. A., LI, L., VINH, A., CHEN, W., LOB, H. E., IWAKURA, Y., BLINDER, Y., RAHMAN, A., QUYYUMI, A. A. & HARRISON, D. G. (2011) Role of interleukin 17 in inflammation, atherosclerosis, and vascular function in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 1565-72.
- MADHUR, M. S., LOB, H. E., MCCANN, L. A., IWAKURA, Y., BLINDER, Y., GUZIK, T. J. & HARRISON, D. G. (2010) Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension*, 55, 500-7.
- MARKO, L., KVAKAN, H., PARK, J. K., QADRI, F., SPALLEK, B., BINGER, K. J., BOWMAN, E. P., KLEINEWIETFELD, M., FOKUHL, V., DECHEND, R. & MULLER, D. N. (2012) Interferon-gamma signaling inhibition ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage. *Hypertension*, 60, 1430-6.
- NGUYEN, H., CHIASSON, V. L., CHATTERJEE, P., KOPRIVA, S. E., YOUNG, K. J. & MITCHELL, B. M. (2013) Interleukin-17 causes Rho-kinase-mediated endothelial dysfunction and hypertension. *Cardiovasc Res*, 97, 696-704.
- O'CONNOR, W., JR., KAMANAKA, M., BOOTH, C. J., TOWN, T., NAKAE, S., IWAKURA, Y., KOLLS, J. K. & FLAVELL, R. A. (2009) A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol*, 10, 603-9.
- ODOBASIC, D., GAN, P. Y., SUMMERS, S. A., SEMPLE, T. J., MULJADI, R. C., IWAKURA, Y., KITCHING, A. R. & HOLDSWORTH, S. R. (2011) Interleukin-17A promotes early but attenuates established disease in crescentic glomerulonephritis in mice. *Am J Pathol*, 179, 1188-98.

- ROMAIN, M., TALEB, S., DALLOZ, M., PONNUSWAMY, P., ESPOSITO, B., PEREZ, N., WANG, Y., YOSHIMURA, A., TEDGUI, A. & MALLAT, Z. (2013) Overexpression of SOCS3 in T lymphocytes leads to impaired interleukin-17 production and severe aortic aneurysm formation in mice--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33, 581-4.
- SIMON, T., TALEB, S., DANCHIN, N., LAURANS, L., ROUSSEAU, B., CATTAN, S., MONTELY, J. M., DUBOURG, O., TEDGUI, A., KOTTI, S. & MALLAT, Z. (2013) Circulating levels of interleukin-17 and cardiovascular outcomes in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*, 34, 570-7.
- STEINMETZ, O. M., SADAGHIANI, S., PANZER, U., KREBS, C., MEYER-SCHWESINGER, C., STREICHERT, T., FEHR, S., HAMMING, I., VAN GOOR, H., STAHL, R. A. & WENZEL, U. (2007) Antihypertensive therapy induces compartment-specific chemokine expression and a Th1 immune response in the clipped kidney of Goldblatt hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, F876-87.
- SYDOW, K., SCHMITZ, C., VON LEITNER, E. C., VON LEITNER, R., KLINKE, A., ATZLER, D., KREBS, C., WIEBOLDT, H., EHMKE, H., SCHWEDHELM, E., MEINERTZ, T., BLANKENBERG, S., BOGER, R. H., MAGNUS, T., BALDUS, S. & WENZEL, U. (2012) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase1 is an organ-specific mediator of end organ damage in a murine model of hypertension. *PLoS One*, 7, e48150.
- TALEB, S., ROMAIN, M., RAMKHELAWON, B., UYTTENHOVE, C., PASTERKAMP, G., HERBIN, O., ESPOSITO, B., PEREZ, N., YASUKAWA, H., VAN SNICK, J., YOSHIMURA, A., TEDGUI, A. & MALLAT, Z. (2009) Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *J Exp Med*, 206, 2067-77.
- VANTOUROUT, P. & HAYDAY, A. (2013) Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol,* 13, 88-100.
- WESSELING, S., ISHOLA, D. A., JR., JOLES, J. A., BLUYSSEN, H. A., KOOMANS, H. A. & BRAAM, B. (2005) Resistance to oxidative stress by chronic infusion of angiotensin II in mouse kidney is not mediated by the AT2 receptor. *Am J Physiol Renal Physiol*, 288, F1191-200.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: DOCA + Angiotensin II Modell5
Abbildung 2: FACS Analyse: Nachweis von Th17 Zellen10
Abbildung 3: Albuminurie Tag 411
Abbildung 4: Glomerulärer Schaden in den Nieren11
Abbildung 5: Frühe Inflammation12
Abbildung 6: Autophagie der Podozyten13
Abbildung 7: Frühe kardiale Fibrose und Genexpression14
Abbildung 8: Renaler Endorganschaden am Tag 1416
Abbildung 9: Inflammation am Tag 1417
Abbildung 10: Inflammationsmarker17
Abbildung 11: Inflamatorische Zellinfiltration18
Abbildung 12: Charakterisierung der renalen dendritischen Zellen und Makrophagen20
Abbildung 13: Kardialer Endorganschaden am Tag 1421
Abbildung 14: Renaler Endorganschaden in IL-23 KO Mäusen22
Abbildung 15: Inflammation in den Nieren der IL-23p19 KO Mäuse23
Abbildung 16: Kardialer Endorganschaden in IL-23p19 KO Mäusen24
Abbildung 17: Basale Charakterisierung von normotensiven IL-17 KO und IL-23p19 KO
Mäusen25
Abbildung 18: Basale Charakterisierung der renalen Lymphozyten in IL-17 KO Mäusen26
Abbildung 19: Basale Charakterisierung von renalen dendritischen Zellen und Makrophagen.
Abbildung 20: Renaler Endorganschaden in RAG-1 KO Mäusen
Abbildung 21: Inflammation in RAG-1 KO Mäusen
Abbildung 22: Kardialer Endorganschaden in RAG-1 KO Mäusen

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Basale Daten Tag 4, Wildtyp vs. IL17 KO	12
Tabelle 2: Basale Daten Tag 14, Wildtyp vs. IL-17 KO Mäuse	16
Tabelle 3: Eingewanderte Subpopulationen der isolierten Lymphozyten	19
Tabelle 4: Basale Inflammation in IL-17 KO und IL-23p19 KO Mäusen	25
Tabelle 5: Quantifizierung der basalen renalen Lymphozyten in IL-17 KO Mäusen	26
Tabelle 6: Basale Daten Wildtyp vs. RAG-1 KO Maus	29

11. Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Wenzel, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Seine exzellente Betreuung, Diskussionsbereitschaft und konstruktiven Ideen haben diese Arbeit erst ermöglicht und kontinuierlich vorangetrieben.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ulf Panzer und Herrn Prof. Dr. med. Heimo Ehmke für die Betreuung meiner Doktorarbeit im Graduiertenkolleg und die wertvollen Anregungen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. rer. nat. Alva Rosendahl und Stefan Gatzemeier, Mitglieder meiner Arbeitsgruppe im Labor. Die technische Hilfe, die freundliche Arbeitsatmosphäre und die ständige Unterstützung im Labor trugen wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation bei. Auch Dr. med. Christian Krebs und Mariola Reszka danke ich herzlich für ihre Unterstützung.

Schließlich möchte ich mich vom ganzen Herzen bei meinen Eltern und meinen Schwestern für die stetige liebevolle Unterstützung während meines Studiums bedanken.

12. Lebenslauf

Persönliche Daten

.

Name Geburtsdatum Geburtsort Eltern Familienstand

Adresse

Schulausbildung

1996 - 2000 2000 - 2002 2002 - 2009

Studium

Oktober 2009

Mai 2009

Dezember 2010

Oktober 2012

Sonstige Tätigkeiten

2007/2008 Schu November 2008 Lehr Joha Sommer 2009 Pflee

Frühjahr und Sommer 2009

Sommer 2012

Sommer 2014

Seit 2011

Gianina Niemann 09.02.1990 21244 Buchholz Karsten Niemann, Geschäftsführung Nicole Niemann, leitende Angestellte ledig Grundstraße 30, 20257 Hamburg

Grundschule, Buchholz Orientierungsstufe, Buchholz Gymnasium, Buchholz Auslandsjahr in Texas 2006/2007 Abitur 2009

Beginn des Medizinstudiums an der Universität Hamburg Erhalt eines Stipendiums der Konrad-Adenauer-Stiftung Aufnahme in das Excellenzprogramm des UKEs Erhalt eines Stipendiums des CVRC Graduiertenkollegs für eine 12 monatige experimentelle Doktorarbeit

Schulsprecherin Lehrgang zur Sanitätshelferin bei der Johanniter-Unfall-Hilfe Pflegepraktikum im Herzzentrum UKE Pflegepraktikum im Krankenhaus Buchholz (Innere Medizin/ Neurologie) Famulatur im Herzzentrum UKE und in einer Praxis für Innere Medizin, Notfallmedizin und Palliativmedizin Famulatur in Liverpool, England (Nephrologie, RLUH) und in Bielefeld (Allgemeine Innere und Endokrinologie) Kampfrichterwartin Turnkreis Harburg für das weibliche Kunstturnen (ehrenamtliche Tätigkeit)

13. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

G. Niemann Unterschrift: