

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF



Zentrum für Innere Medizin, III. Medizinische Klinik und Poliklinik

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Prof. Dr. med. Tobias Huber

# **Einfluss der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR2 auf Bluthochdruck und hypertensive Endorganschäden**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Marlies Bode aus Dessau**

Hamburg, 2022

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Wenzel

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Streit

Datum der Disputation: 13.01.2023

Prüfungskommission:

Vorsitz:

## 1. Inhalt

1.	Inhalt.....	3
2.	Einleitung.....	7
2.1.	Bluthochdruck.....	7
2.2.	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	7
2.3.	Das Komplementsystem.....	8
2.4.	C3a und der C3a Rezeptor (C3aR).....	10
2.5.	C5a und seine Rezeptoren C5aR1 und C5aR2.....	12
2.6.	Das adaptive Immunsystem und Bluthochdruck.....	14
2.7.	Komplementsystem und Bluthochdruck.....	14
3.	Methodik.....	19
3.1.	Tiermodelle.....	19
3.1.1.	Versuchstiere.....	19
3.1.1.1.	BALB/cAnNCrI.....	20
3.1.1.2.	C3aR <sup>-/-</sup> .....	20
3.1.1.3.	C5aR2 <sup>-/-</sup> .....	21
3.1.1.4.	C3aR <sup>-/-</sup> xC5aR2 <sup>-/-</sup> .....	21
3.1.1.5.	tdTomato-C3aR flox.....	21
3.1.2.	<i>in vivo</i> Hochdruckmodelle.....	21
3.1.2.1.	Unilaterale Nephrektomie.....	22
3.1.2.2.	Angiotensin II-Hochdruckmodell.....	22
3.1.2.3.	DOCA-Salz Hochdruckmodell.....	23
3.2.	Methoden.....	24
3.2.1.	Non-invasive Blutdruckmessung.....	24
3.2.2.	Transkutane Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR).....	25
3.2.3.	Uringewinnung und Bestimmung der Albuminurie.....	26
3.2.4.	Organentnahme.....	27
3.2.5.	Blutanalysen.....	27

## Inhalt

3.2.6. Durchflusszytometrie .....	28
3.2.6.1.Niere .....	28
3.2.6.2.Herz .....	28
3.2.6.3.Monozyten/ Makrophagen Panel und Gating.....	28
3.2.6.4.T-Zell und Zytokine Panels/ Gatings .....	29
3.2.7. RNA Isolation, cDNA Synthese und quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qPCR) .....	33
3.2.8. Histologie.....	33
3.2.8.1.Periodsäure Färbung (PAS).....	34
3.2.8.2.Sirius Rot - Fast Green Färbung (SRFG) .....	35
3.2.8.3.Immunfluoreszenz Färbung .....	36
3.2.9. Daten- und Statistische Analyse.....	37
3.2.10. Abbildungen .....	38
4. Resultate .....	39
4.1. C3a Rezeptor (C3aR).....	39
4.1.1. Detektion von C3aR mittels Konfokalmikroskopie und Durchflusszytometrie .....	39
4.1.2. C3a Rezeptor (C3aR) im Ang II-Hochdruckmodell.....	45
4.1.2.1.Beurteilung renaler hypertensiver Organschäden im C3aR-Knockout unter Ang II-Hochdruck .....	47
4.1.2.2.Beurteilung kardialer hypertensiver Organschäden im C3aR-Knockout unter Ang II-Hochdruck .....	56
4.1.3. C3a Rezeptor (C3aR) im DOCA-Salz Modell.....	59
4.1.3.1.Beurteilung renaler hypertensiver Organschäden im C3aR-Knockout unter DOCA-Hochdruck .....	60
4.1.3.2.Beurteilung kardialer hypertensiver Organschäden im C3aR-Knockout unter DOCA-Hochdruck .....	66
4.2. C3aRxC5aR2 Doppelknockout.....	69
4.2.1. C3aR <sup>-/-</sup> xC5aR2 <sup>-/-</sup> im Ang II Modell .....	69
4.2.1.1.Beurteilung renaler hypertensiver Organschäden im C3aRxC5aR2- Doppelknockout unter Ang II-Hochdruck.....	71

## Inhalt

4.2.1.2. Beurteilung kardialer hypertensiver Organschäden im C3aRxC5aR2-Knockout unter Ang II-Hochdruck .....	78
4.2.2. C3aR <sup>-/-</sup> xC5aR2 <sup>-/-</sup> im DOCA-Salz Modell .....	80
4.2.2.1. Beurteilung renaler hypertensiver Organschäden im C3aRxC5aR2-Doppelknockout unter DOCA-Hochdruck .....	81
4.2.2.2. Beurteilung renaler hypertensiver Organschäden im C3aRxC5aR2-Doppelknockout unter DOCA-Hochdruck .....	87
5. Diskussion .....	90
5.1. Lokalisierung des Anaphylatoxinrezeptors C3aR .....	90
5.2. C3aR-Knockout und C3aRxC5aR2-Doppelknockout unter Hochdruckbedingungen .....	91
5.3. Ausblick .....	94
6. Zusammenfassung .....	96
7. Summary .....	97
8. Abkürzungen .....	98
9. Abbildungsverzeichnis .....	101
10. Publikationsliste .....	105
11. Kongressbeiträge .....	106
12. Literaturverzeichnis .....	107
13. Angaben zum individuellen Teil .....	118
14. Danksagung .....	120
15. Eidesstattliche Versicherung .....	121
16. Anhang .....	122
16.1. Supplemental Data .....	122
16.2. Material .....	130
16.2.1. Material für OPs und <i>in vivo</i> Messungen .....	130
16.2.2. Material für Organentnahmen und Durchflusszytometrie .....	131
16.2.3. Material für Histologie .....	133
16.2.4. Material für qPCR und ELISA .....	135

## Inhalt

16.2.5. FACS Antikörper .....	137
16.2.6. qPCR Primersequenzen .....	138
16.3. Protokoll zur Pumpenbefüllung .....	140
16.4. Protokoll Blutdruckmessung MC4000 Hatteras.....	140
16.5. Protokoll Albumin-Elisa .....	140
16.6. Protokolle der FACS Färbungen.....	140
16.6.1. Einzelzellsuspension Niere MMph .....	140
16.6.2. Einzelzellsuspension Niere T-Zellen.....	140
16.6.3. Einzelzellsuspension Herz.....	140
16.7. Protokolle der Histo Färbungen .....	140
16.7.1. PAS Färbung .....	140
16.7.2. SRFG Färbung .....	140
16.8. Protokoll der RNA Isolierung.....	140

## Einleitung

## 2. Einleitung

### 2.1. Bluthochdruck

Bluthochdruck und die daraus resultierenden Erkrankungen stellen, epidemiologisch gesehen, das höchste Gesundheitsrisiko und die Todesursache Nummer eins dar (Mills et al., 2020). Hierzu zählen die kardiovaskulären Erkrankungen wie koronare Herzerkrankung, Herzinsuffizienz, Schlaganfall, Herzinfarkt, Vorhofflimmern und periphere arterielle Verschlusskrankheiten, sowie chronisches Nierenleiden und kognitive Beeinträchtigungen (Oparil et al., 2018). Die Risikofaktoren für Bluthochdruck sind mannigfaltig. So steigt das Risiko an Bluthochdruck zu erkranken bei beiden Geschlechtern mit zunehmendem Alter an (Singh et al., 2012). Die Rasse und Ethnie können zusätzlich Hinweis auf das Risiko geben. So galten im Zeitraum von 2015 bis 2016 in den USA 13,5% mehr nicht-hispanisch-schwarze Menschen im Vergleich zu nicht-hispanisch-weißen Menschen als hyperten (Dorans et al., 2018). Des Weiteren gilt die erhöhte Salzaufnahme als Risikofaktor, welche in Kombination mit kleineren Anstiegen von pro-hypertensiven Molekülen wie Angiotensin II und Aldosteron zu Hypertonie führen kann (Wenzel et al., 2019). Als weitere Risikofaktoren für Bluthochdruck gelten eine geringe Kaliumaufnahme, Alkoholkonsum, Fettleibigkeit, mangelnde Bewegung und eine ungesunde Ernährung (Mills et al., 2020). Und obwohl viele Risikofaktoren bekannt sind, gibt es eine Vielzahl an Bluthochdruck-Patienten, bei denen die Ethnologie der Erkrankung unklar bleibt und sich somit die Behandlung als schwierig erweist (Montani et al., 2016).

### 2.2. Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Physiologisch wird der Blutdruck über ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher Elemente gesteuert (Oparil et al., 2018). Hierzu zählen unter anderem das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), das sympathische Nervensystem und das Immunsystem. Das RAAS hat hierbei eine zentrale Rolle inne. Es reguliert den arteriellen Blutdruck, die Plasma-Natrium-Konzentration und das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen (Patel et al., 2017). Dabei werden Nieren, Lunge, Vaskulatur und das Gehirn mit involviert (Santos et al., 2019). Das RAAS besteht aus drei wichtigen Hauptkomponenten – Renin, Angiotensin II (Ang II) und Aldosteron (Fountain et al., 2022).

Renin wird in der Niere im Juxtaglomerulären Apparat gebildet (Brown, 2007). Hierbei wird Pro-Renin proteolytisch durch die Proteasen Proprotein Convertase 1 (PC1) oder Cathepsin B aktiviert (Patel et al., 2017). Die Sekretion von Renin wird von 4 Mechanismen reguliert: dem arteriellen Blutdruck, der Aktivität des Sympathischen Nervensystems, der Natrium-Balance und mittels negativen Feedbacks durch Ang II (Brown, 2007). Renin gilt als hormonartiges Enzym, dessen Substrat Angiotensinogen in der Leber sekretiert wird und im Plasma zirkuliert. Mittels proteolytischer Spaltung von Angiotensinogen entsteht

## Einleitung

Angiotensin I, ein physiologisch inaktives Protein (Laghlam *et al.*, 2021), welches durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) zu Ang II decarboxyliert wird (Bernstein *et al.*, 2018).

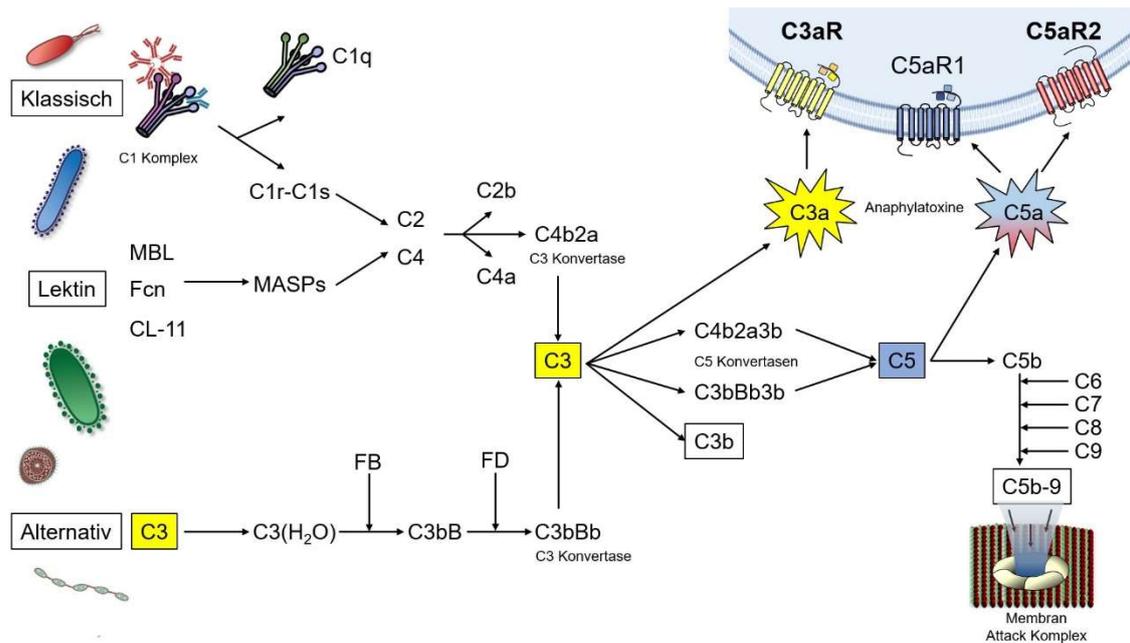
Ang II ist ein sehr vielfältiges Effektormolekül, welches eine intrakrine/ autokrine/ parakrine Rolle in nahezu jedem System spielt (Durante *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2017; Peach *et al.*, 1990). Es wirkt vasokonstriktorisch sowohl auf Arterien als auch auf Venen, hebt den Blutdruck an und stimuliert die Ausschüttung von Aldosteron in der Nebennierenrinde (Feener *et al.*, 1995; Yatabe *et al.*, 2011). In der Niere inhibiert Ang II die Kaliumsekretion und im Gehirn reguliert es sowohl den Durst und die Wasseraufnahme, als auch die Wasser-Reabsorption in der Niere und die Sensitivität der Barorezeptoren (Fountain *et al.*, 2022). Aldosteron reguliert die Natrium-Kalium Homöostase mittels Stimulation der renalen proximalen Tubuli (Chiolero *et al.*, 2000).

Ein Ungleichgewicht des RAAS kann zu Entzündungen, Arteriosklerose, Thrombose und Fibrose im kardiovaskulären System führen, was zu klinisch-relevanten Symptomen und Erkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall, diabetische Mikro- und Makrovaskuläre Erkrankungen, periphere vaskuläre Erkrankungen und kongestiven Herzerkrankungen führt (Mehta *et al.*, 2007).

### 2.3. Das Komplementsystem

Das Komplement ist ein evolutionär konservierter Anteil des angeborenen Immunsystems (Vignesh *et al.*, 2017). Es hat zusammen mit Kontakt- und Koagulationssystemen und den unzähligen Bereichen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems eine Barrierefunktion und schützt vor dem Eindringen von Mikroben. Hierbei hilft es, pathogene Erreger zu markieren und zu eliminieren und das nahezu sofort und mit einer ausreichenden Spezifität, damit die Wirtszellen nicht geschädigt werden (Koenderman *et al.*, 2014; Ricklin *et al.*, 2018; Wenzel *et al.*, 2017; Zipfel *et al.*, 2009). Das Komplementsystem umfasst mehr als 30 Plasma- und Membran-Proteine, welche zum größten Teil in der Leber gebildet werden (Vignesh *et al.*, 2017; Walport, 2001). Diese Proteine oder auch Komplementfaktoren genannt, liegen als Vorläufer-Proteine vor, welche durch bestimmte Stimuli aktiviert werden und ihrerseits kaskadenartig weitere Komplementfaktoren proteolytisch oder mittels Rezeptorbindung aktivieren (Vignesh *et al.*, 2017).

## Einleitung



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Komplementsystems.**

Das Komplementsystem wird über 3 unterschiedliche Wege aktiviert. Der klassische Weg wird mittels Kontakt von Pathogenen mit dem C1 Komplex aktiviert. Der Lektin Weg wird durch den Kontakt von Pathogenen mit Mannose-Bindungs-Lektin (MBL), Ficolinen 1 bis 3 (Fcn) oder Collectin 11 (CL-11) gebunden an MBL-assoziierte Proteine (MASPs) aktiviert. Im alternativen Aktivierungsweg wird der Komplementfaktor C3 spontan zu  $C3(H_2O)$  hydrolysiert. Alle drei Aktivierungswege führen zur Bildung von C3 Konvertasen, welche C3 zu C3a und C3b spalten. C3b bildet C5, welche den Komplementfaktor C5 zu C5a und C5b spalten. C5b bildet mit den Komplementfaktoren C6, C7, C8 und C9 den Membran Attack Komplex C5b-9. Die Anaphylatoxine C3a und C5a binden an ihre spezifischen Rezeptoren C3aR, C5aR1 und C5aR2. Diese Darstellung ist mit Hilfe von BioRender erstellt worden.

Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, gibt es drei unterschiedliche Komplement-Aktivierungswege: der klassische, der Lektin- und der alternative Aktivierungsweg. Der klassische Weg wird durch an IgG oder IgM gebundene Pathogene und fremde Antigene aktiviert. Der Komplement-Komplex C1, bestehend aus den Komplementfaktoren C1q, C1r und C1s, bindet mittels C1q an den Fc Teil von IgG oder IgM und aktiviert somit C1r und C1s, welche dann die Komplementfaktoren C2 und C4 spalten. Die aus Spaltprodukten entstandene C3 Konvertase C4bC2a wird freigesetzt (Morgan, 2000; Sarma *et al.*, 2011).

Der Lektin Weg wird durch die Bindung von Mannose-Bindungs-Lektin (MBL), Ficolinen 1 bis 3 (Fcn) oder Collectin 11 (CL-11) an Pathogene wie Hefen, Bakterien, Parasiten und Viren aktiviert. Hierbei sind sowohl MBL, Fcn als auch CL-11 an MBL-assoziierte Proteine (MASPs) gebunden, welche nach Bindung an das Pathogen zur Autoaktivierung von MASP2 führt, welches dann C2 und C4 spaltet und somit die Bildung der C3 Konvertase bedingt (Ricklin *et al.*, 2018; Sarma *et al.*, 2011).

Der alternative Weg wird durch spontane Hydrolyse von C3 zu  $C3(H_2O)$  aktiviert (auch Tick-over genannt). In Anwesenheit von Komplement Factor B (FB) wird C3b an  $C3(H_2O)$  gebunden, wodurch C3bB entsteht. Mit Hilfe des Komplement Factor D (FD) wird daraufhin eine C3 Konvertase C3bBb gebildet (Qu *et al.*, 2009; Sarma *et al.*, 2011). Ein von aktivierten

## Einleitung

Neutrophilen freigesetztes Plasma Protein (Properdin) kann zusätzlich die C3 Konvertase C3bBb stabilisieren (Kemper *et al.*, 2010).

Die beiden gebildeten C3 Konvertasen (C4b2a und C3(H<sub>2</sub>O)Bb) spalten den Komplementfaktor C3 zu C3a und C3b, welche beide eine Rolle bei der Komplementantwort auf Pathogene spielen. C3b dient einerseits der Opsonisierung und bildet andererseits die C5 Konvertasen C4b2a3b und C3bBb3b, welche ihrerseits den Komplementfaktor C5 spalten. Das Spaltprodukt C5b bindet die Komplementfaktoren C6, C7, C8 und C9 und bildet den Membran-Attack-Komplex (MAC oder auch C5b-9 genannt). Der Membran-Attack-Komplex formiert transmembranöse Kanäle, welche die Zellmembran von Zielzellen zerstört, was zu einer Zelllyse und dem Tod führt (Barnum *et al.*, 2020; Merle *et al.*, 2015; Sarma *et al.*, 2011; Wenzel *et al.*, 2020). Die beiden Spaltprodukte C3a und C5a, auch Anaphylatoxine genannt, spielen eine zentrale Rolle bei Entzündungen, der Rekrutierung von phagozytierenden Zellen und der Mobilisierung von reaktiven Sauerstoffspezies in Makrophagen, Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten (Elsner *et al.*, 1994a; Elsner *et al.*, 1994b; Murakami *et al.*, 1993; Schanzenbacher *et al.*, 2022). Ein Ungleichgewicht des Komplementsystems wird in Verbindung mit Autoimmunerkrankungen, akuten und chronisch entzündlichen Erkrankungen gebracht (Schanzenbacher *et al.*, 2022; Vignesh *et al.*, 2017). Komplement-inhibierende Pharmaka sind effektive Therapien für diverse entzündliche Erkrankungen (Wenzel *et al.*, 2020)

### 2.4. C3a und der C3a Rezeptor (C3aR)

Das humane Anaphylatoxin C3a ist 9kDa klein und umfasst 77 Aminosäuren mit 4 helikalen Strukturen und 3 Disulfid-Brücken (Klos *et al.*, 2013). Es bindet mit seinen C-terminalen Aminosäuren Leucin-Glycin-Leucin-Alanin-Arg an seinen spezifischen Rezeptor C3aR (Gao *et al.*, 2020). Dieser wurde 1988 erstmals bei Meerschweinchen-Thrombozyten beschrieben (Fukuoka *et al.*, 1988) und gehört in die Familie der Rhodopsin G Proteingekoppelten Rezeptoren (Braun *et al.*, 2004; Quell *et al.*, 2017). Der humane C3aR ist 55kDa groß und umfasst in seinen 7 transmembranösen Domänen 482 Aminosäuren (Wetsel, 1995). Die Bindung von C3a an C3aR führt zur schnellen Internalisierung (Quell *et al.*, 2017) und Aktivierung des Pertussis Toxin (PT)-sensitiven G Proteins G $\alpha_i$  (in Immunzellen) (Gao *et al.*, 2020; Möller *et al.*, 1997), der Bindung an  $\beta$ -Arrestine (Gao *et al.*, 2020; Vibhuti *et al.*, 2011) und der Aktivierung von PT-insensitiven G Proteinen G $\alpha_{12/13}$ . Dies führt zur Aktivierung des ERK1/2 Pathways und zytoskeletalen Veränderungen (Gao *et al.*, 2020; Schraufstatter *et al.*, 2002). Die Aktivierung von C3aR führt auch zur Erhöhung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup>. Wird C3a decarboxyliert (C3a-desArg), verliert es seine Fähigkeit zur Bindung an C3aR und bindet stattdessen an den zweiten Rezeptor für das Anaphylatoxin C5a den C5aR2 (Gao *et al.*, 2020; Kalant *et al.*, 2003; Klos *et al.*, 2013).

## Einleitung

C3aR ist auf einer Vielfalt an Zellen zu finden. Dazu zählen auf der immunologischen Seite die Mastzellen, Basophile Granulozyten, Neutrophile Granulozyten, Eosinophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Dendritische Zellen (DCs), T-Zellen, NK Zellen und B-Zellen (Braun *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2014; Quell *et al.*, 2017; Werfel *et al.*, 2000). Außerdem ist der C3aR in Gehirn, Lunge, Lamina Propria, viszeralem Fettgewebe, Milz, Herz, Darm, Leber, Blut, Knochenmark und den Luftwegen zu finden (Braun *et al.*, 2004; Quell *et al.*, 2017). Des Weiteren wurde der C3aR renal auf den proximalen Tubuluszellen und auf Podozyten gefunden (Braun *et al.*, 2004).

Abhängig vom Gewebe und Zelltyp hat die C3a/C3aR Achse eine pro- oder anti-inflammatorische Funktion (Coulthard *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2020). Im Modell der intestinalen Ischämie konnte eine potentielle anti-inflammatorische Wirkung von C3a auf Neutrophile gezeigt werden (Coulthard *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2013). In *in vitro* Experimenten mit NK Zellen, wurde zudem gezeigt, dass C3a einen negativen regulatorischen Effekt auf die IFN- $\gamma$  der NK Zellen hatte (Min *et al.*, 2014).

Auf der anderen Seite zeigten Versuche, dass C3a die IgE-unabhängige Degranulierung und Histamin-Ausschüttung von humanen Mastzellen induziert (Finkelman *et al.*, 2016; Kubota, 1992). Außerdem konnte in humanen Eosinophilen Granulozyten neben der Induktion der Degranulierung, eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration nachgewiesen werden (Takafuji *et al.*, 1994). In humanen Monozyten und Makrophagen induzierte die Stimulation mit C3a die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-8 (Asgari *et al.*, 2013; Monsinjon *et al.*, 2001; Takabayashi *et al.*, 1998; Takabayashi *et al.*, 1996). Des Weiteren konnte die Induktion des oxidativen Bursts mittels C3a Stimulation in Neutrophilen Granulozyten gezeigt werden (Elsner *et al.*, 1994b). In einem *in vivo* Modell für allergisches Asthma konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen mittels IL-23 Ausschüttung die Proliferation von Th17 Zellen und die Produktion von IL-17A induzieren (Engelke *et al.*, 2014; Lajoie *et al.*, 2010). Eine *in vivo* Studie konnte zudem zeigen, dass deutlich weniger pro-inflammatorische Faktoren bei fehlender C3a/C3aR Achse von Antigen präsentierende Zellen (APCs; IL-1, IL-12 und IL-23) und von T-Zellen (IL-2 und IFN- $\gamma$ ) sekretiert werden (Gao *et al.*, 2020; Strainic *et al.*, 2013).

C3a/C3aR spielt bei diversen Erkrankungen eine Rolle. Studien zeigten, dass Sepsis Patienten mit höheren C3a Werten einen schlimmeren Verlauf hatten (Coulthard *et al.*, 2015; Nakae *et al.*, 1994). Auch haben Studien gezeigt, dass bei Lupus Nephritis hohe Konzentrationen von C3aR und C3 in den Glomeruli der Schwere der Krankheit entsprachen (Coulthard *et al.*, 2015; Mizuno *et al.*, 2007). Im Modell der renalen Schädigung konnte zudem gezeigt werden, dass C3a und C5a die Schäden förderten (Peng *et al.*, 2012). Eine Studie zu koronaren Herzerkrankungen zeigte, dass die Expression von C3aR auf Thrombozyten positiv mit der Aktivierung von Glycoprotein IIb/IIIa auf Thrombozyten

## Einleitung

korreliert und die Abwesenheit von C3aR die Inzidenz für Schlaganfälle und Myokardinfarkte deutlich reduzierte (Sauter *et al.*, 2018). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass C3aR als Checkpoint für die erhöhte Anti-Tumor Immunität bei Kolo-Rektalem Carcinom dienen könnte (Krieg *et al.*, 2022).

Zusammengefasst ist zu sagen, dass das Anaphylatoxin C3a und dessen Rezeptor C3aR eine große Rolle sowohl bei der pro- als auch anti-inflammatorischen Immunantwort spielen und bei einer Vielzahl an Erkrankungen Einfluss haben.

### 2.5. C5a und seine Rezeptoren C5aR1 und C5aR2

Das humane C5a ist ein 11kDa großes Glycoprotein und umfasst 74 Aminosäuren (Manthey *et al.*, 2009). Wie C3a besteht es aus 4 Helices, die durch 3 Disulfid-Brücken stabilisiert werden (Monk *et al.*, 2007). Die für die Rezeptor-Aktivierung wichtige Bindungsstelle befindet sich C-terminal und umfasst die Aminosäuren 69-74. C5a wird durch die proteolytische Spaltung von Komplementfaktor C5 gebildet, welcher primär in der Leber gebildet wird (Manthey *et al.*, 2009). Durch Plasma- und Zelloberflächen-Carboxypeptidasen wird C5a recht schnell zu C5a-desArg decarboxyliert (Bokisch *et al.*, 1970). C5a und C5a-desArg binden beide an die 2 spezifischen Rezeptoren C5aR1 (auch CD88 und C5aR genannt) und C5aR2 (auch GPR77 und C5L2 genannt) (Li *et al.*, 2020). Hierbei hat C5a bei beiden Rezeptoren annähernd die gleiche Bindungsaffinität. Wohingegen C5a-desArg eine wesentlich höhere Bindungsaffinität zu C5aR2 (12nM) im Vergleich zu C5aR1 (660nM) aufweist (Li *et al.*, 2013). C5aR1 wurde 1991 erstmals von 2 Arbeitsgruppen beschrieben (Boulay *et al.*, 1991; Gerard *et al.*, 1991). Fast 10 Jahre später wurde C5aR2 erstmals beschrieben (Ohno *et al.*, 2000). Die Gene beider Rezeptoren liegen auf dem 19ten Chromosom hintereinander und weisen eine allgemeine Sequenzübereinstimmung von 38% (41% nur bei den transmembranösen Domänen) auf (Das *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2017).

Sowohl C5aR1 als auch C5aR2 zählen zur Familie der Rhodopsin G Protein-gekoppelten Rezeptoren (Li *et al.*, 2013). Aufgrund struktureller Unterschiede ist C5aR2 jedoch nicht in der Lage das G Protein zu binden (Li *et al.*, 2013). Es wird vermutet, dass C5aR2 als Decoy-Rezeptor Signale non-kanonisch weiterleitet (Okinaga *et al.*, 2003; Scola *et al.*, 2009a). Außerdem geht man davon aus, dass C5aR2 über  $\beta$ -Arrestine intrazellulär Signale weiterleiten und übermäßiges C5a und C5a-desArg internalisieren kann, wodurch eine exzessive Aktivierung von C5aR1 verhindert wird (Bamberg *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013; Pandey *et al.*, 2021; Scola *et al.*, 2009b). Des Weiteren wurde die Bildung einer C5aR—C5aR2-Hetero-Dimerisierung beschrieben, welche zur Internalisierung von C5aR1 führt und somit das C5aR1-medierte ERK Signal herunterreguliert (Crocker *et al.*, 2013; Crocker *et al.*, 2014; Hsu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019; Poursharifi *et al.*, 2013). Die Aktivierung von

## Einleitung

C5aR1 erfolgt meist über das Pertussis Toxin-sensitive G-Protein  $G\alpha_{i2}$  und in hämatopoetischen Zellen und Monozyten über das Pertussis Toxin-insensitive G-Protein  $G\alpha_{16}$  (Li *et al.*, 2019). Dies führt zu einem Kalziuminflux und zur Aktivierung weiterer „Downstream“ Signalwege wie cAMP/PKA, ERK1/2, p38 MAPK und  $\beta$ -Arrestine (Li *et al.*, 2019; Zaal *et al.*, 2019).

Beide C5a Rezeptoren werden sowohl auf myeloiden, als auch auf nicht-myeloiden Zellen exprimiert. Jedoch wird C5aR2 im Vergleich zu C5aR1 deutlich geringer exprimiert (Gerard *et al.*, 2005). Während C5aR1 vornehmlich auf der Zelloberfläche zu finden ist, liegt C5aR2 primär intrazellulär vor (Das *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2017). C5aR2 wurde sowohl in Gehirn und Knochenmark, als auch auf Neutrophilen, dendritischen Zellen, Makrophagen, Lymphozyten (B und NK Zellen) und Monozyten beschrieben (Chen *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2019; Ohno *et al.*, 2000). C5aR1 wurde auf Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Epithelzellen gefunden (Li *et al.*, 2019). Des Weiteren wurden beide Rezeptoren im Gewebe von Herz, Leber, Lunge und Milz sowie auf Adipozyten, Hautfibroblasten, vaskulären glatten Muskelzellen, Astrozyten und Neuronen gefunden (Li *et al.*, 2013; Poursharifi *et al.*, 2013).

C5a hat eine pleiotrope Wirkung, die Chemotaxis, Degranulierung, Phagozytose, oxidativer Burst, und die Sekretion von Zytokinen umfasst (Lee *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2019). Der C5aR1 vermittelt eine pro-inflammatorische Immunantwort, die bei vielen Krankheiten wie Sepsis, rheumatoide Arthritis, Asthma, paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie, Ischemie-Reperfusionsschäden und entzündliche Darmerkrankungen eine Rolle spielt (Monk *et al.*, 2007; Woodruff *et al.*, 2011). Dies macht C5aR1 zu einem potentiellen Therapie-Target (Hawksworth *et al.*, 2017; Ricklin *et al.*, 2018).

Die Rolle von C5aR2 bei inflammatorischen Erkrankungen ist hingegen etwas unklarer. Eine Theorie ist, dass die Funktion von C5aR2 abhängig vom Gewebe und Zelltyp ist. Demnach wird bei der akuten inflammatorischen Immunantwort mit hohen extrazellulären C5a Konzentrationen der auf der Zelloberfläche befindliche C5aR2 aktiviert um die C5aR1 Funktionen zu dämpfen und mittels Heterodimerisierung C5aR1 zu internalisieren und zu desensibilisieren. Unter chronisch inflammatorischen Bedingungen oder im Ruhezustand dominiert die intrazelluläre Funktion, indem C5aR2 den C5aR1 recycelt und zurück an die Zelloberfläche transportiert. Die Defizienz von C5aR2 kann demnach bei akuten entzündlichen Vorgängen zu einer Überaktivierung der C5a/C5aR1-bedingten Immunantwort führen. Während bei chronisch entzündlichen Erkrankungen diese Defizienz zu einer verringerten C5aR1-Antwort und zu einer Protektion führt. Diese Theorie würde auch die gegenläufigen Ergebnisse von unterschiedlichen Studien erklären (Li *et al.*, 2019).

## Einleitung

Zusammengefasst ist zu sagen, dass die C5a/C5aR1-Komplementachse eine pro-inflammatorische Immunantwort hervorruft. Die Immunantwort über die C5a/C5aR2-Achse scheint vom Gewebe, Zelltyp und vom Entzündungstyp abhängig zu sein.

### 2.6. Das adaptive Immunsystem und Bluthochdruck

Das adaptive Immunsystem ist ein System, welches ein breiteres und spezifischeres Spektrum an Eigen- und Fremd-Antigen-Erkennung bietet. Es umfasst ein streng reguliertes Zusammenspiel zwischen den Antigen-präsentierenden Zellen und T und B Lymphozyten, welches die Pathogen-spezifische Immunabwehr, die Bildung des immunologischen Gedächtnisses und die Regulation der Immun-Homöostase vermittelt (Bonilla *et al.*, 2010).

Im Jahr 2007 hat eine Studie gezeigt, dass das adaptive Immunsystem eine Rolle bei arterieller Hypertonie spielt. Im Modell der Ang II-Infusion wiesen Mäuse, die weder B noch T-Zellen besitzen (Rag1-defiziente Mäuse, Rekombinase-Aktivierungsgen 1) einen wesentlich geringeren Bluthochdruck auf, als die hypertensiven Wildtypen. Mittels T-Zell-Transfer in die Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse konnte dieser Effekt aufgehoben werden (Guzik *et al.*, 2007). Spätere Studien von unterschiedlichen Arbeitsgruppen konnten diese Ergebnisse jedoch nicht wiederholen (Ji *et al.*, 2017; Seniuk *et al.*, 2020). Da jedoch die T-Zell-Antwort sehr unterschiedlich ist, ist diese wahrscheinlich auch von der Krankheitsursache und Progression abhängig. Regulatorische T-Zellen (Tregs), eine Teilpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, sind für die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz verantwortlich. Unterschiedliche Studien konnten in Hochdruckexperimenten zeigen, dass transferierte Tregs den Blutdruck senkten und die kardialen und renalen Schädigungen verbesserten (Wenzel *et al.*, 2016; Wenzel *et al.*, 2017; Wenzel *et al.*, 2020)

### 2.7. Komplementsystem und Bluthochdruck

Lange wurde das Komplementsystem nur als Teil des angeborenen Immunsystems angesehen, welches der Abwehr von eindringenden Pathogenen dient. Da jedoch gezeigt wurde, dass das adaptive Immunsystem eine wichtige Rolle bei arterieller Hypertonie spielt und das Komplementsystem eng mit dem adaptiven Immunsystem interagiert, ist es durchaus plausibel, dass das Komplementsystem ein potentieller Regulator von arterieller Hypertonie ist (Guzik *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2016; Wenzel *et al.*, 2017; Wenzel *et al.*, 2020).

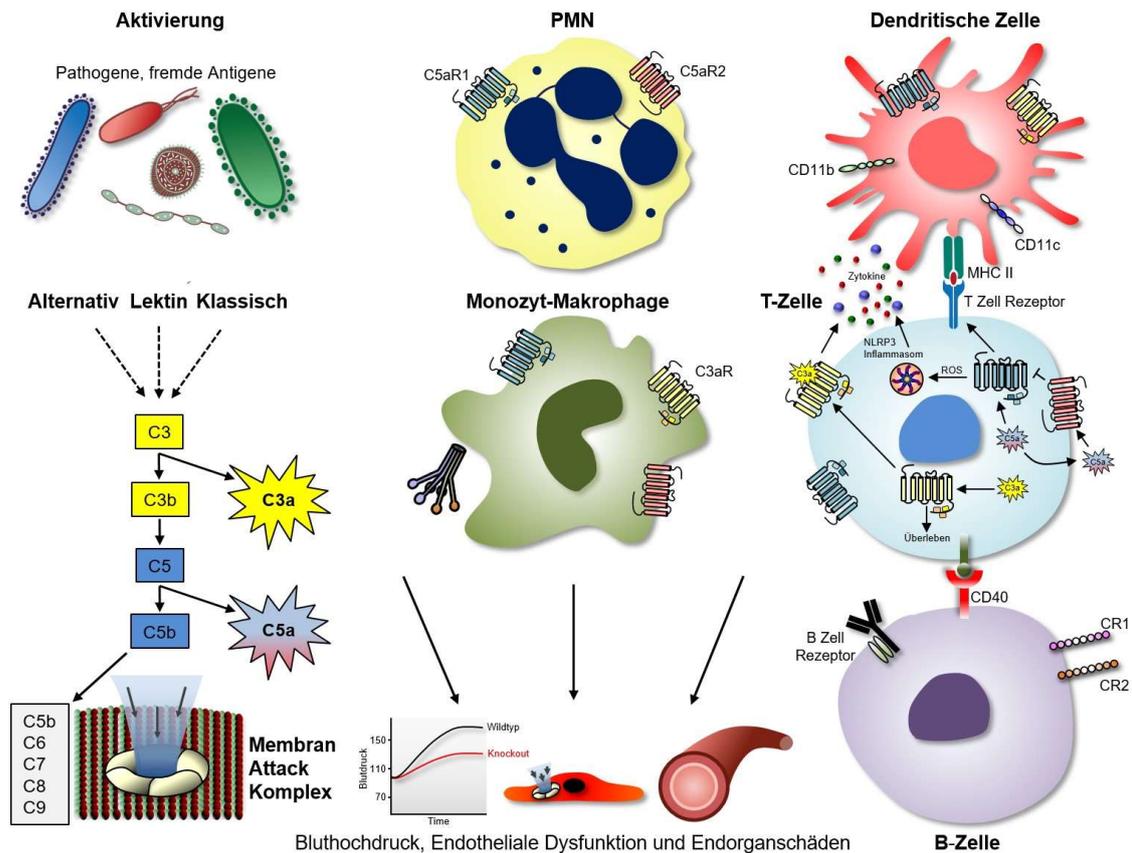
Wie zuvor erwähnt und in Abbildung 2 zu erkennen ist, wird das Komplementsystem zur Abwehr von Pathogenen und fremde Antigenen aktiviert. Infolge der Aktivierung werden sowohl die Anaphylatoxine C3a und C5a freigesetzt, als auch der Membran-Attack-Komplex gebildet. Dieser Komplex bildet Poren in der Membran der Pathogene und leitet

## Einleitung

somit die Lyse jener Pathogene ein. Zusätzlich dazu aktiviert und beeinflusst das Komplementsystem das adaptive Immunsystem, indem es an Komplementrezeptoren bindet. So exprimieren Neutrophile Granulozyten, Monozyten/ Makrophagen, dendritische Zellen, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Anaphylatoxinrezeptoren, wodurch pro- und anti-inflammatorische Immunantworten ausgelöst werden (Kolev *et al.*, 2014). Dendritische Zellen, welche MHCII<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup> sind, tragen zudem Komponenten von Komplementrezeptor 3 (ist CD11c) und 90 % der renalen DCs zusätzlich noch Komponenten von Komplementrezeptor 4 (CD11b) auf der Zelloberfläche. Diese beiden Komplementrezeptoren sind bei der Bindung und Phagozytose der opsonierten Pathogene wichtig. Außerdem reguliert der Komplementrezeptor 3 die Zytokin-Antwort, Leukozyten Trafficking und die Synapsenbildung (Ricklin *et al.*, 2016; Wenzel *et al.*, 2017). B-Zellen haben die Komplementrezeptoren 1 (CR1) und 2 (CR2) auf der Zelloberfläche exprimiert, welche zur optimalen Antikörperausschüttung beitragen (Gottschalk *et al.*, 2015; Wenzel *et al.*, 2020).

Neuere Daten deuten darauf hin, dass das Inflammasom eine Rolle bei arterieller Hypertonie spielt (Krishnan *et al.*, 2016). Zusammen mit dem Komplementsystem bildet das Inflammasom den wichtigsten Teil des angeborenen Immunsystems (Wenzel *et al.*, 2017). Eine Studie im Jahr 2013 zeigte, dass C3a und C5a nicht-kanonisch in humanen T-Zellen gebildet wird (Liszewski *et al.*, 2013a). Hierbei wirkt die intrazelluläre C3a/C3aR-Achse primär anti-inflammatorisch und reguliert das homöostatische T-Zell-Überleben. Wird jedoch der C3a-C3aR Komplex auf die Zelloberfläche transportiert, so wird die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine induziert. Die intrazelluläre C5a/C5aR1-Achse löst hingegen pro-inflammatorische die Aktivierung des T-Zell Rezeptors aus. Zusätzlich dazu wird über die intrazelluläre C5a-C5aR1-Achse die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und dem NLRP3 Inflammasom (NOD-, LRR und Pyrin Domänen-beinhaltendes Protein 3) ausgelöst. Die Bildung des Inflammasoms führt zur Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18, unterstützt die TH1 Antwort und mildert die TH17 Antwort ab (Arbore *et al.*, 2016; Swanson *et al.*, 2019; Wenzel *et al.*, 2017). Das intrazelluläre C5a bindet zusätzlich an den an der Zelloberfläche befindlichen C5aR2 und reguliert dadurch die intrazelluläre C5a/C5aR1-Achse. Diese intrazelluläre Komplement-Interaktion wird Complosom genannt und spielt zusammen mit dem Inflammasom eine zentrale Rolle bei der TH1 Induktion und Regulation (Arbore *et al.*, 2016; Wenzel *et al.*, 2017).

## Einleitung



**Abbildung 2: Komplementsystem und das adaptive Immunsystem.**

Eindringende Pathogene führen zur Aktivierung des Komplementsystems. Die kaskadenartige Aktivierung führt zur Freisetzung und Bildung von unterschiedlichen Komplementfaktoren und dem Membran Attack Komplex (C5b-9). Dieser bildet transmembranöse Poren und verursacht somit die Lyse der Pathogene. Zusätzlich dazu beeinflusst das Komplementsystem das adaptive Immunsystem. Neutrophile Granulozyten, Monozyten/ Makrophagen, dendritische Zellen und auch Lymphozyten exprimieren die Anaphylatoxin-Rezeptoren, Anteile von den Komplementrezeptoren 3 (CD11c) und 4 (CD11b), sowie die Komplementrezeptoren CR1 und CR2. Komplementfaktoren und Zellen des angeborenen und adaptierten Immunsystems sind potentielle Mediatoren von Bluthochdruck und hypertensiven Endorganschäden. Endotheliale Dysfunktion und Schäden sind höchstwahrscheinlich die ersten Schritte hierzu. Die Darstellung basiert auf (Wenzel *et al.*, 2020).

Eine neuere Studie hat gezeigt, dass B-Zellen und IgG Antikörper ausschlaggebend bei der Entwicklung von Ang II-induziertem Bluthochdruck und der Gefäßneubildung bei Mäusen sind (Chan *et al.*, 2015). Auch wurde gezeigt, dass die klassische Komplementaktivierung mittels C1 Komplex die Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signalweges auslöst, welcher eine Schlüsselfunktion bei der Gefäßneubildung und Bluthochdruck inne hat (Sumida *et al.*, 2015). Bei Ang II-Infusion wird ein Blutdruckanstieg, Gefäßneubildung Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen und die Hochregulierung der  $\beta$ -Catenin Zielgene hervorgerufen. Wird der  $\beta$ -Catenin-Signalweg pharmakologisch inhibiert, so kann die Gefäßneubildung supprimiert werden. Der Blutdruck kann hingegen nicht gesenkt werden. Bei Ang II-Infusion werden auch Makrophagen in der Aorta rekrutiert, welche den Komplementfaktor C1q sekretieren. Depletiert man die Makrophagen, inhibiert C1 oder supprimiert C1q genetisch, kann die Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen

## Einleitung

ebenfalls supprimiert werden. Einen Einfluss auf den Blutdruck hat dies jedoch nicht (Wenzel *et al.*, 2017; Wenzel *et al.*, 2020).

Die Lektin Komplementaktivierung spielt ebenfalls eine Rolle. Hämodynamische Faktoren wie Scherkraft-Stress und hypertensive Faktoren wie Angiotensin II, Salz und Aldosteron induzieren kleinste Verletzungen und schädigen Zellen, woraufhin Schaden-assoziierte Molekül Strukturen (DAMPs) freigesetzt werden. Sowohl die DAMPs als auch Toll-like Rezeptoren (TLRs) und Inflammasome aktivieren dann den Lektin Aktivierungsweg (Krishnan *et al.*, 2014).

Die alternative Komplementaktivierung dient vornehmlich der schnellen Amplifikation der Komplementkaskade und der Opsonierung. Aufgrund der spontanen Hydrolyse von C3 existiert ein konstante Hintergrund-Aktivierung des Komplementsystems, welche durch eine Reihe von Inhibitoren reguliert wird, um autoimmune Reaktionen zu verhindern (Ricklin *et al.*, 2018). Die Defizienz jener Inhibitoren führt zu thrombotischen Microangiopathien, welche Ähnlichkeiten mit maligner Nephrosklerose aufweisen (Noris *et al.*, 2009; Wenzel *et al.*, 2017). Es wird davon ausgegangen, dass auch der alternative Aktivierungsweg eine Rolle bei Bluthochdruck und hypertensiven Endorganschäden hat.

Studien haben auch gezeigt, dass Anaphylatoxine bei Hypertonie eine Rolle spielen könnten. So wurde in einer Studie höhere C5a Plasma-Werte bei Bluthochdruck Patienten gefunden (Zhang *et al.*, 2014a). Eine weitere Studie zeigte, dass C5aR1-defiziente Mäuse nach Ang II-Infusion signifikant weniger kardiale Schädigungen und Entzündungen aufwiesen. Diese Ergebnisse wurden bei Wildtyp-Mäusen mit pharmakologischer Antagonisierung (Antagonist PMX53) des C5aR1 bestätigt. Bei C3aR-defizienten Mäusen zeigte sich hingegen ein leichter Anstieg der kardialen Schädigungen (Zhang *et al.*, 2014a; Zhang *et al.*, 2014b). Eine Studie mit DOCA-Salz behandelten Ratten zeigte zudem, dass die mit PMX53 behandelten Tiere eine abgeschwächte endotheliale Dysfunktion und geringere hypertensive kardiale Schädigungen aufwiesen. Zudem kam es zu geringen ventrikulären Kollagenablagerungen und geringerer Hypertrophie. Einen Einfluss auf den systolischen Blutdruck hatte PMX53 jedoch nicht (Iyer *et al.*, 2011). Auch zeigte unsere eigene Arbeitsgruppe, dass im murinen Ang II-Hochdruckmodell die C5aR1-defizienten Tiere Blutdruck-unabhängig wesentlich weniger renale Schädigungen und eine geringere Albuminurie aufwiesen. Jedoch zeigten diese Tiere eine akzellerierte kardiale Schädigung mit kardialer Fibrose und erhöhtem Herzgewicht (Weiss *et al.*, 2016). Der Grunde dieser Unterschiede zwischen kardialer und renaler Schädigungen sind momentan unklar. Nicht publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe lassen die Vermutung zu, dass es bei hypertensiven Schädigungen zu einer Counter-Regulation der beiden C5a Rezeptoren kommt. Ähnliches wurde bei einer Studie mit experimenteller ANCA Vaskulitis gezeigt (Xiao

## Einleitung

et al., 2014). Da C5aR1 und C5aR2 in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen unterschiedlich stark exprimiert werden, kann der Einfluss von C5aR1 unterschiedlich stark ausgeprägt sein (Wenzel *et al.*, 2017).

Während mehrere Arbeiten zur Rolle von C5aR1 bei Hochdruck vorliegen, gibt es keine Daten zu C3aR. In der vorliegenden Arbeit soll daher die Rolle des Anaphylatoxinrezeptors C3aR bei arterieller Hypertonie untersucht werden. Darüberhinaus wird untersucht, welchen Effekt ein Doppelknockout aus C3aR und C5aR2 auf Hochdruck und hypertensiven Endorganschaden hat.

### 3. Methodik

Da es sich sowohl beim Komplementsystem wie auch bei der Entstehung von Bluthochdruck und den resultierenden hypertensiven Endorganschäden um komplexe Abläufe und Zusammenspiele von Organsystemen handelt, ist die Analyse von diesen Zusammenspielen nur im intakten Organismus möglich. Daher basiert diese Arbeit auf Tierversuchen mit Mäusen (*Mus musculus*) und umfasst sowohl *in vivo* wie auch *ex vivo* Analysen.

Sämtliche Tierversuche sind durch die „Behörde für Justiz und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg“ in den Tierversuchsanträgen G 104/16, N 050/2019 und N 094/2020 genehmigt worden.

#### 3.1. Tiermodelle

##### 3.1.1. Versuchstiere

Für dieses Projekt wurde ausschließlich mit für den Versuch gezüchteten Mäusen gearbeitet. Die Zucht erfolgt unter standardisierten Bedingungen in der Zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Dies umfasst klimatisierte Räume (>15-facher Luftwechsel, Raumtemperaturen zwischen 20-24 C und 45-65% rel. Luftfeuchtigkeit) mit einem 12h Hell-Dunkel-Rhythmus, die Gruppenhaltung in Typ II long Käfigen gemäß Teil B der RL 2010/63/EU, die tägliche Pflege und Überwachung durch ausgebildete Tierpfleger/innen der FTH sowie den Zugang zu Futter (Altromin 1328P) und Wasser ad libitum.

Für die Versuche wurden die Tiere in den dafür vorgesehenen Versuchsbereich transferiert und weiterhin unter den standardisierten Bedingungen gehalten. Zum Wohle der Tiere wurde die Gruppenhaltung von Wurfgeschwistern angestrebt, von der nur auf Grund schwerwiegender Gründe (Rangordnungs-Kämpfe und Trennung von Versuchsgruppen) abgewichen wurde.

Ab dem Beginn eines Versuches wurden die Tiere außerdem mindestens einmal täglich durch die Mitglieder der Arbeitsgruppe Wenzel einer Gesundheitskontrolle per Inaugenscheinnahme unterzogen. Dies umfasste allgemeine Gesundheitsmerkmale wie Gewicht, ungepflegtes Fell, verringerte Bewegung und/ oder veränderte Körperhaltung sowie Wundkontrollen. Bei Feststellung einer eingeschränkten Gesundheit wurde, falls notwendig, die Anzahl der täglichen Gesundheitskontrollen erhöht und das Tier mit Wärme, Schmerzmitteln (Tramadol im Trinkwasser (1 mg/ml)) und Weichfutter versorgt. War das Tier moribund oder erreichte die zuvor festgelegten Abbruchkriterien, wurde es unter Isofluran-Narkose mittels zervikaler Dislokation getötet.

## Methodik

Alle Versuche umfassten normotensive Wildtyp-Kontrollen, hypertensive Wildtyp-Tiere und hypertensive Knockout-Tiere. Zum Beginn der Versuche waren die Tiere mindestens 8 Wochen alt, da erst zu diesem Zeitpunkt das Immunsystem komplett ausgebildet ist. Es wurde ausschließlich mit männlichen Tieren gearbeitet.

Mit folgenden Inzucht-Mauslinien wurde gearbeitet:

Tabelle 1: Tabellarische Aufzählung aller verwendeter Mauslinien.

Liniename	Internationale Nomenklatur	Verwendete Genotypen
Balb/c	BALB/cAnNCrI	Wildtyp-Linie
C3aR KO	BALB/cAnNCrI-C3ar1tm	C3aR <sup>d/d</sup>
C5aR2 KO	BALB/cAnNCrI-C5ar2tm1	C5aR2 <sup>-/-</sup>
C3aR x C5aR2 DKO	BALB/cAnNCrI-C3ar1tm1 C5ar2tm1Uhh	C3aR <sup>-/-</sup> x C5aR2 <sup>-/-</sup>
tdTomato-C3aR flox	BALB/cAnNCrI-C3ar1tm1flox Tg(CAG-tdtomato)	C3aR <sup>td</sup>

### 3.1.1.1. BALB/cAnNCrI

Die in diesem Projekt verwendeten Wildtyp-Mäuse waren bis auf die tdTomatoC5aR2flox Mäuse (C57Bl/6) auf Balb/c Hintergrund. Die Balb/c Mäuse stammten aus der Zucht des UKEs, sie gelten als eine sehr häufig verwendete Inzuchtlinie. Da Balb/c Mäuse Albinomäuse sind (Festing, 1998), ist deren Sicht etwas eingeschränkt. Die Zuchteffizienz gilt als gut und die Haltung als unauffällig. Balb/c Männchen neigen zu Rangordnungskämpfen, wodurch die Mäuse mit steigenden Alter oftmals in Einzelhaltung gehalten werden müssen.

### 3.1.1.2. C3aR<sup>-/-</sup>

Die in diesen Versuchen verwendeten C3aR-defizienten Mäuse erhielten wir von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. med. Jörg Köhl, Lübeck. Erstmals publiziert wurde diese Mauslinie von der Arbeitsgruppe um Craig Gerard (Humbles *et al.*, 2000). Mittels homologer Rekombination mit einem Ziel-Vector wurde ein 736 bp Fragment des C3aR Gens (inklusive des Startcodons) durch eine PGKneo Kasette ersetzt, wodurch der C3a Rezeptor ausgeschaltet wurde. In der Zucht zeigt der C3aR Knockout eine normale mendelsche Verteilung. Offenkundige Entwicklungs- oder morphologischen Veränderungen treten nicht auf.

## Methodik

### 3.1.1.3. C5aR2<sup>-/-</sup>

Auch die C5aR2-defizienten verwendeten Mäuse erhielten wir von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. med. Jörg Köhl aus Lübeck. 2005 wurde diese Mauslinie zum ersten Mal durch die Arbeitsgruppe Gerard beschrieben (Gerard *et al.*, 2005). Unter Zuhilfenahme eines Targeting Vektors wurde eine ca. 1kb große Gen-Sequenz der Coding Gene Region des C5aR2 ausgeschnitten und durch ein Grün-fluoreszierendes Protein (GFP) und eine Neomycin-resistente PGK Kasette ersetzt. Eine Veränderung in der Zucht oder Haltung wurde nicht festgestellt.

### 3.1.1.4. C3aR<sup>-/-</sup>xC5aR2<sup>-/-</sup>

Der in den Versuchen verwendete C3aRxC5aR2 Doppelknockout ist am UKE durch die Verpaarung der C3aR-defizienten mit der C5aR2-defizienten Maus entstanden. Wie die jeweiligen Einzelknockouts weist der C3aRxC5aR2 Doppelknockout weder Zucht- noch Haltungsauffälligkeiten auf.

### 3.1.1.5. tdTomato-C3aR flox

Für die Lokalisation des C3aR wurden tdTomato-C3aR flox Mäuse von Prof. Dr. med. Jörg Köhl aus Lübeck verwendet. Diese wurden 2017 erstmals von Quell *et al.* beschrieben (Quell *et al.*, 2017). Unter zu Hilfenahme eines Targeting Vektors wurde in Frame ein tdTomato direkt vor die codierende Gensequenz des C3aR eingefügt und beide durch loxP Sequenzen gerahmt. Dadurch ist ein Zell- oder Gewebe-spezifischer Knockout des C3a Rezeptors möglich.

Das tdTomato Gen gehört zur Klasse der rot fluoreszierender Reporter gene, welches für die höhere Farbhelligkeit als tandem repeat (doppelt dTomato) exprimiert wird (Abe *et al.*, 2013; Shaner *et al.*, 2004).

## 3.1.2. *in vivo* Hochdruckmodelle

Für die Untersuchung von hypertensiven Endorganschäden wurden in der Arbeitsgruppe Wenzel mehrere Mausmodelle entwickelt (Weiss *et al.*, 2016). In diesem Projekt fanden Hochdruckmodelle wie das Ang II Modell oder das DOCA-Salz Modell Anwendung. Die relevanten Endpunkte waren hierbei die Hypertonie, Glomerulosklerose, der tubulointerstitieller Schaden, die Albuminurie, glomeruläre Filtrationsrate, Genexpression von Renin sowie von pro-fibrotischen und pro-inflammatorischen Genen und die FACS-Analyse von Leukozyten.

## **Methodik**

Bei allen verwendeten *in vivo* Hochdruckmodelle erfolgte zu Beginn eine unilaterale Nephrektomie, die der Aggravation der renalen hypertensiven Schäden dient. Außerdem wurde diesen Tieren Kochsalz im Trinkwasser (0,9 %) verabreicht.

Die Modelle unterscheiden sich hinsichtlich der Dauer und der hauptsächlichen Ursache der Hypertonie. Bei den Kurzzeit-Modellen handelt es sich um Tiere, bei denen zusätzlich die Implantation einer osmotischen Minipumpe (befüllt mit Ang II) oder eines DOCA Pellets erfolgte.

Sämtliche Operationen wurden bis auf wenige Ausnahmen von mir durchgeführt.

### **3.1.2.1. Unilaterale Nephrektomie**

Zur Gewährleistung einer Linderung der intra- und postoperativen Wundschmerzen erhalten die Tiere einen Tag vor Nephrektomie Tramadol zur oralen Gabe in das Trinkwasser (1 mg/mL).

Am Tag der Nephrektomie wurden die Tiere ca. 30 Minuten vor Operation unter kurzzeitiger Isofluran-Narkose mit Buprenorphin (0,05-0,1 mg/kg Körpergewicht) subkutan versorgt und die linke Flanke des Tieres wurde im Bereich der Niere rasiert.

Dann wurde die Isofluran-Anästhesie eingeleitet und die erforderliche Narkosetiefe (chirurgische Toleranz) mittels des Zwischenzeh-Reflexes durch Kneifen überprüft. Anschließend wurde im Bereich der linken Niere ein kleiner Flankenschnitt vorgenommen (ca. 8 bis 10 mm), die Niere freipräpariert, die Nierenarterie und -vene sowie der Ureter durch eine Ligatur unterbunden (Perma-Hand Seide, 2-0, Ethicon). Darauffolgend erfolgte die Absetzung der Niere distal der Ligatur, abschließend der Wundverschluss mittels resorbierbarem Nahtmaterial (Muskelschicht: Perma-Hand Silk, 3-0, PS-2, Ethicon) und Klammernaht (Hautverschluss: Wundklammern Michel, 11\*2 mm, Aesculap).

Postoperativ wurden die Tiere bis zu 3 Tage mit Tramadol (1 mg/ml) über das Trinkwasser versorgt. Zudem wurden die Tiere in einem Wärmeschrank vor Unterkühlung geschützt und erhielten zur Erleichterung der Wasser- und Futteraufnahme Weichfutter.

### **3.1.2.2. Angiotensin II-Hochdruckmodell**

Das Angiotensin II-Hochdruckmodell umfasst, wie in Abbildung 3 gezeigt, die unilaterale Nephrektomie (Tag -14), gefolgt von der Gabe von 0,9% NaCl (Tag -7)) im Trinkwasser und der anschließenden Implantation einer osmotischen Minipumpe (Alzet® 1002; Tag 0) befüllt mit Angiotensin II.

Die osmotische Minipumpe wurde zeitnah zur OP steril unter einer Zellkultur-Werkbank mit Ang II befüllt. Dies wurde für einen geringen Anteil durch mich, für den größeren Anteil

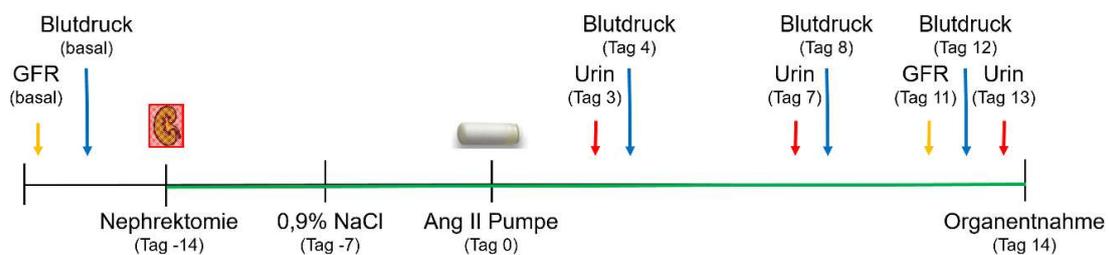
## Methodik

durch den Biologisch-technischen Assistenten Stefan Gatzemeier durchgeführt, Protokoll siehe Anhang. Die Dosierung des Angiotensin II lag bei 1,5 ng/min/g BW.

Wie auch bei der Nephrektomie wurde den Tieren für die subkutane Implantation der osmotischen Minipumpe ein Tag vor der Operation Tramadol im Trinkwasser (1 mg/ml) verabreicht.

Am Tag der Pumpenimplantation wurden die Tiere ca. 30 Minuten vor Operation unter kurzzeitiger Isofluran-Narkose mit Buprenorphin (0,05-0,1 mg/kg Körpergewicht) subkutan versorgt und der Nacken des Tieres wurde rasiert.

Dann wurde die Isofluran-Anästhesie eingeleitet und die erforderliche Narkosetiefe (chirurgische Toleranz) mittels des Zwischenzeh-Reflexes durch Kneifen überprüft. Anschließend wurde im Nacken eine Inzision (5-7 mm) von Haut und Subkutangewebe vorgenommen und in der Subkutis stumpf eine Tasche präpariert. Die osmotische Minipumpe wurde mit dem Verschlussdeckel zuerst unter die Haut geschoben, abschließender Wundverschluss mittels Klammernaht.



### Abbildung 3: Versuchsablauf des Angiotensin II Hochdruckmodells.

Es werden zu Beginn basal die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und Blutdruck gemessen. An Tag -14 erfolgt die Nephrektomie, gefolgt von der Kochsalz-Gabe im Trinkwasser an Tag -7 und der Implantation der osmotischen Minipumpe gefüllt mit Angiotensin II (Ang II). An Tag 3, 7 und 13 erfolgt die Urinsammlung mittels Stoffwechsellkäfig. An Tag 4, 8 und 12 wird Blutdruck gemessen. An Tag 11 wird die GFR bestimmt. Die Organentnahme findet an Tag 14 statt.

Postoperativ werden die Tiere bis zu 3 Tage mit Tramadol (1 mg/mL) über das Trinkwasser versorgt. Zudem werden die Tiere in einem Wärmeschrank vor Unterkühlung geschützt und erhalten Weichfutter.

Der Versuch endet 14 Tage nach der Implantation der osmotischen Minipumpe.

### 3.1.2.3. DOCA-Salz Hochdruckmodell

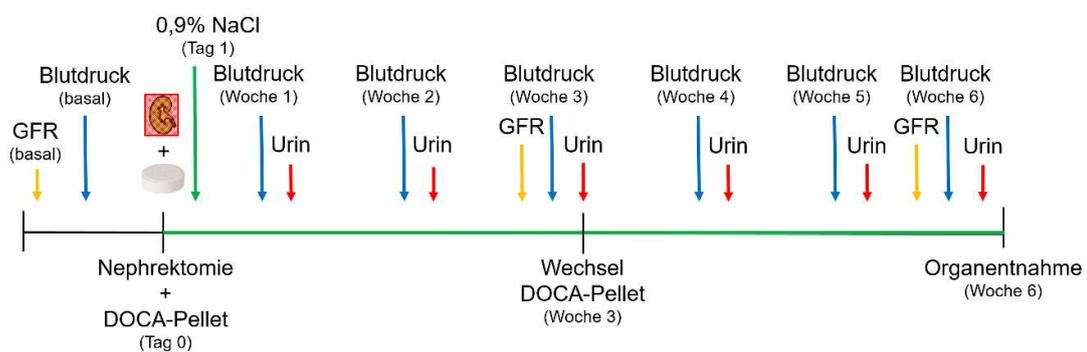
Wie das Angiotensin II-Hochdruckmodell umfasst auch das DOCA-Salz Modell, wie in Abbildung 4 gezeigt, die unilaterale Nephrektomie (Tag 0), jedoch direkt gefolgt von der subkutanen Implantation des DOCA Pellets (Deoxycorticosterone Acetate, 50 mg/ Pellet, 21-day-release, Innovative Research of America). Die Gabe von Kochsalz im Trinkwasser (0,9 %) erfolgt am Tag darauf (Tag 1).

## Methodik

Die subkutane Implantation des DOCA-Pellets wurde direkt nach der Nephrektomie in Isofluran-Narkose durchgeführt. Hierzu wurde im Nacken eine Inzision (5-7 mm) von Haut und Subkutangewebe vorgenommen und eine stumpfe Tasche auf der kontralateralen Seite zur Nephrektomie in der Subkutis gebildet. Das DOCA-Pellet wurde vorsichtig in die Tasche geschoben, die Inzision mittels Wundklammern verschlossen.

Postoperativ wurden die Tiere bis zu 3 Tage mit Tramadol (1 mg/ml) über das Trinkwasser versorgt. Zudem wurden die Tiere in einem Wärmeschrank vor Unterkühlung geschützt und erhielten zur Erleichterung der Wasser- und Futteraufnahme Weichfutter.

Die Organentnahme erfolgte 6 Wochen nach der Nephrektomie.



**Abbildung 4: Versuchsablauf des DOCA Hochdruckmodells.**

Vor der Nephrektomie erfolgten basale GFR- und Blutdruckmessung. An Tag 0 fanden die Nephrektomie und die Implantation des DOCA Pellets statt, gefolgt von der Kochsalz-Gabe im Trinkwasser an Tag -1. Im wöchentlichen Rhythmus erfolgte die Blutdruckmessung und die Urinsammlung mittels Stoffwechselkäfig. In Woche 3 und 6 nach Nephrektomie wurde außerdem eine GFR-Messung durchgeführt. Ein neues DOCA Pellet wurde in Woche 3 implantiert und die Organentnahme fand 6 Wochen nach Nephrektomie statt.

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Non-invasive Blutdruckmessung

Die Erfassung des systolischen Blutdrucks erfolgte mittels Schwanz-Plethysmographie am wachen Tier mit einem automatischen System der Firma Hatteras Instruments (Hatteras MC4000) gemessen. Bei der Blutdruckmessung saßen die Tiere in dafür vorgesehenen Messboxen, die auf 43° C gemäß Hersteller-Empfehlung temperiert waren.

Die arterielle Pulswelle wird mit einem auf dem Schwanz aufgesetzten Piezoelement gemessen. Konträr zur Blutdruckmessung beim Menschen wird mit einer für den Mäuseschwanz konzipierten Blutdruckmanschette die Schwanzarterie langsam ansteigend komprimiert. Dadurch wird die Pulswelle immer kleiner, beim kompletten Ausbleiben dieser Welle ist der systolische Blutdruck erreicht. Anschließend wird der angelegte Druck schnell wieder abgelassen.

Die Messung umfasste 5 Gewöhnungszyklen von ca. 20-30 Sekunden, sowie 10 ebenso lange Messzyklen. Zwischen den einzelnen Zyklen erfolgten Pausen von je ca. 5 Sekunden.

## Methodik

Zur besseren Akzeptanz der Messung wurden die Tiere über 4-5 Tage vor der ersten eigentlichen Messung an das Gerät gewöhnt.

Die Auswertung der Messung erfolgte über die Gerätesoftware (Hatteras MC4000).

### 3.2.2. Transkutane Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)

Die Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) ist eine minimal invasive Messmethode am wachen Tier. Jedoch ist während Messung die Einzelhaltung der Tiere erforderlich, damit die Messung nicht durch Artgenossen beeinträchtigt wird. Mögliche Mehrfachmessungen an derselben Maus werden als unproblematisch bewertet, da bei normaler Nierenfunktion bereits nach ca. 2 Stunden der zur Messung benötigte Farbstoff vollständig ausgeschieden ist und durch die Prozedur keine bleibenden Beeinträchtigungen am Tier zu beobachten sind.

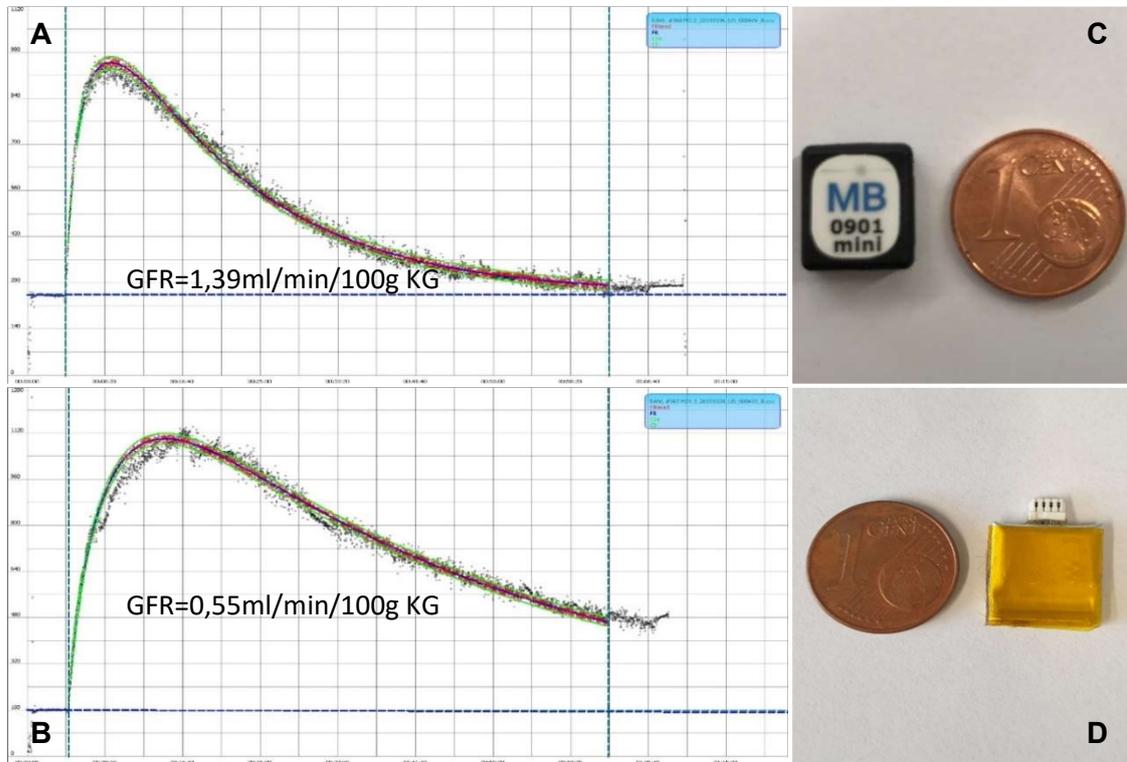
Die Bestimmung der GFR basiert auf der transkutanen Messung eines Fluoreszenzfarbstoff-Signals im Blut der Maus. Hierfür wird FITC-Sinistrin verwendet, welches unmetabolisiert ausschließlich über die Niere ausgeschieden wird. Das Messgerät (Photoelektrode von MediBeacon) misst die Abnahme des Fluoreszenz-Signals in den Kapillargefäßen der Haut, siehe Abbildung 5. Anhand der Signalkurve über die Zeit kann die Auswertesoftware (MB Studio2) die Halbwertszeit ( $t^{1/2}$ ) bestimmen. Zur Bestimmung der GFR wird die Halbwertszeit mit einem Maus-spezifischen Faktor (14,6168; Herstellerangaben) wie folgt verrechnet (Scarfe *et al.*, 2018).

$$GFR = 14,6168/t^{1/2}$$

Für die GFR-Messung wurde mindestens 1 Tag zuvor dem Tier unter kurzzeitiger Isofluoran-Narkose am rückwärtigen Thorax ein ca. 2 cm<sup>2</sup> großes Hautareal rasiert und enthaart (Enthaarungscreme Veet Sensitive oder Vergleichbares). Für die Messung wurde dem Tier unter Isofluoran-Narkose das GFR-Messgerät mittels doppelseitigem Klebepatch (MediBeacon) auf die rasierte Hautstelle geklebt. Um ein stabiles basales Messsignal zu erreichen, verblieb das Tier 3 weitere Minuten unter Narkose. Währenddessen wurde das FITC-Sinistrin (MediBeacon, 25 mg/ml gelöst in 0,9 % NaCl) gewichtsadaptiert (100 µL/30g BW) langsam mit einer 30G Nadel retrobulbär injiziert. Das Tier erwachte danach in einem Einzelkäfig, der zwecks Stressminimierung abgedeckt war, es konnte sich während der gesamten Messzeit von ca. 60 Minuten ungehindert bewegen und fressen. Nach Ablauf der Messzeit wurde unter erneuter kurzzeitiger Isofluoran-Narkose das Messgerät vorsichtig von der Haut gelöst, die an dieser Stelle mit Bepanthen eingecremt wurde. Das Tier wurde

## Methodik

in den eigenen Käfig zurückgesetzt und das Messgerät mittels einer Software (MDB Lab, MediBeacon) ausgelesen.



**Abbildung 5: GFR-Messgeräte und Beispiel zweier GFR-Kurven.**

(A) GFR-Kurve einer normotensiven Kontrolle mit exponentiellem Anstieg und exponentiellem Abfall des GFR Signals auf Basalniveau innerhalb einer Stunde. (B) GFR-Kurve eines hypertensiven Wildtypes mit deutlich verlangsamtem Abfall des GFR Signals, welches nach einer Stunde noch nicht das Basalniveau erreicht hat. (C) GFR-Messgerät der 2ten Generation und des dazugehörigen Akkus (D) in Größenrelation zu einem 1 Cent Stück.

### 3.2.3. Uringewinnung und Bestimmung der Albuminurie

Der zu analysierende Mäuse-Urin wurde mittels eines Stoffwechselkäfigs gewonnen, welcher zusammen mit der Tierhaltung des UKE konzipiert wurde. Diese Käfige sind ausschließlich für die Uringewinnung entwickelt worden und ermöglichen den Tieren während der Sammelperiode freien Zugang zu Trinkwasser. Eine solche Sammelperiode dauert, abhängig vom Sammel-Volumen maximal 6 Stunden und sollte im optimalen Fall mindestens 150  $\mu$ L Urin ergeben.

Für die Bestimmung der Proteinurie wurden Albumin- und Kreatinin-Werte der Urine ermittelt.

Die Albuminurie wurde mittels Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt. Hierfür erfolgte zunächst die Beschichtung einer 96 Well-Platte (ELISA-Platte, High binding F, Sarstedt) mit einem Anti-Maus-Albumin-Antikörper (Goat Anti-Mouse Albumin, Biozol). Anschließend wurden mittels Postcoat-Puffer (TBS+BSA, Sigma) unspezifische Bindungen

## **Methodik**

blockiert. Darauffolgend wurden sowohl der Standard (Maus-Albumin, Sigma) wie auch die verdünnten Urinproben als Doppelbestimmung auf der Platte für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Detection-Antikörper (Goat Anti-Mouse Albumin HRP konjugiert, Biozol) erfolgte die HRP-katalysierte Reduktion des TMB-Substrates (TMB Elisa Peroxidase Substrate, Biozol), welche nach 5-10 Minuten durch Phosphorsäure abgestoppt wurde. Die Konzentrationsbestimmung des Albumins erfolgt im Photometer (EL808, BioTek Instruments) anhand der gemessenen Standardkurve. Das Protokoll ist im Anhang (ab Seite 122) zu finden.

Die Bestimmung der Urin-Kreatinin-Werte erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Tiegs mittels eines automatisierten Analyzers (Cobas Integra® 400 Plus).

### **3.2.4. Organentnahme**

Zum Ende der Versuche erfolgte zwecks Probengewinnung eine Organentnahme. Hierfür wurden die Tiere in eine Isofluran-Narkose versetzt und die notwendige Narkosetiefe überprüft. Mit einer 20G Kanüle wurde zwecks Blutentnahme das Herz punktiert, die gewonnene Blutprobe wurde mit 1,6 mg/ml EDTA gemischt und auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Tier durch zervikale Dislokation getötet und Herz sowie Nieren per medianer Laparotomie entnommen.

Für anschließende Analysen wurden die Organe aufgeteilt. Für die RNA Isolierung wurde ein ca. 40 mg schwerer Nierenpol bzw. Herzspitze in einem dafür geeigneten Reagenzgefäß in flüssigem Stickstoff gefroren. Eine ähnlich schwere Nieren- bzw. Herzquerschnittsscheibe wurde für die Histologie in 4 %igem Formaldehyd fixiert. Falls notwendig wurde eine weitere Nieren- bzw. Herzquerschnittsscheibe für die Immunfluoreszenzmikroskopie auf Watman-Paper mit Tissue-Tek ummantelt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Das restliche Nieren- bzw. Herzgewebe wurde mit einem Skalpell in möglichst kleine Stücke gehackt, in mit Digestionsmedium-gefüllten MACS Tubes überführt und auf Eis gelagert.

### **3.2.5. Blutanalysen**

Das mit 1,6 mg/mL EDTA gemischte Blut wurde für 15 Minuten bei 4000 xg zentrifugiert. Der Plasma-Überstand wurde entnommen und für die Analysen verwendet.

Die Plasma-Harnstoff- und Cholesterin-Werte wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Tiegs mittels eines Analyzers (Cobas Integra 400® Plus) ermittelt.

## **Methodik**

### **3.2.6. Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es einzelne Zellen anhand ihrer optischen Eigenschaften zu bestimmen. Hierfür werden die Zellen mit Fluorchrom-gekoppelten Antikörpern versehen und in einem Durchflusszytometer, umgangssprachlich auch FACS genannt (Fluorescence-activated cell sorting), analysiert.

Sämtliche Messungen der hier aufgeführten Versuche sind am Durchflusszytometer LSR II (Becton Dickinson) und LSR Fortessa (Becton Dickinson) vorgenommen worden.

Hierfür wurden Nieren- und Herzgewebe aufgearbeitet und mittels Fluorchrom-gekoppelter Antikörper angefärbt. Entsprechend der zu analysierenden Zellpopulationen wurden unterschiedliche Zellaufreinigungsschritte, Färbeprotokolle und Gating Strategien angewandt, welche im Folgenden näher erläutert werden. Die Protokolle sind im Anhang (ab Seite 122) zu finden.

#### **3.2.6.1. Niere**

Für die Durchflusszytometrie wird das Nierengewebe in Digestionsmedium (RPMI 1640 mit 10 % FCS, 1 % HEPES, 1 % Penicillin/ Streptomycin) und einem Enzym-Mix (0,4 mg/ml Kollagenase D und 0,1 mg/ml DNase) bei 37° C für 45 Minuten inkubiert. Anschließend wird das Gewebe mittels gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) zu einer Einzelzell-Suspension verarbeitet. Danach wird die Suspension auf die unterschiedlichen Färbe-Panel aufgeteilt.

#### **3.2.6.2. Herz**

Das Herzgewebe wurde für die Durchflusszytometrie in HBSS++ und einem Enzym-Mix (0,4 mg/ml Kollagenase D, 0,1 mg/ml DNase und 1000 mg/ml Kollagenase II) mittels gentleMACS Dissociator zerkleinert und anschließend bei 37° C im MACS Mix Rotator (Miltenyi Biotec) für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension für die Färbe-Panel aufgeteilt.

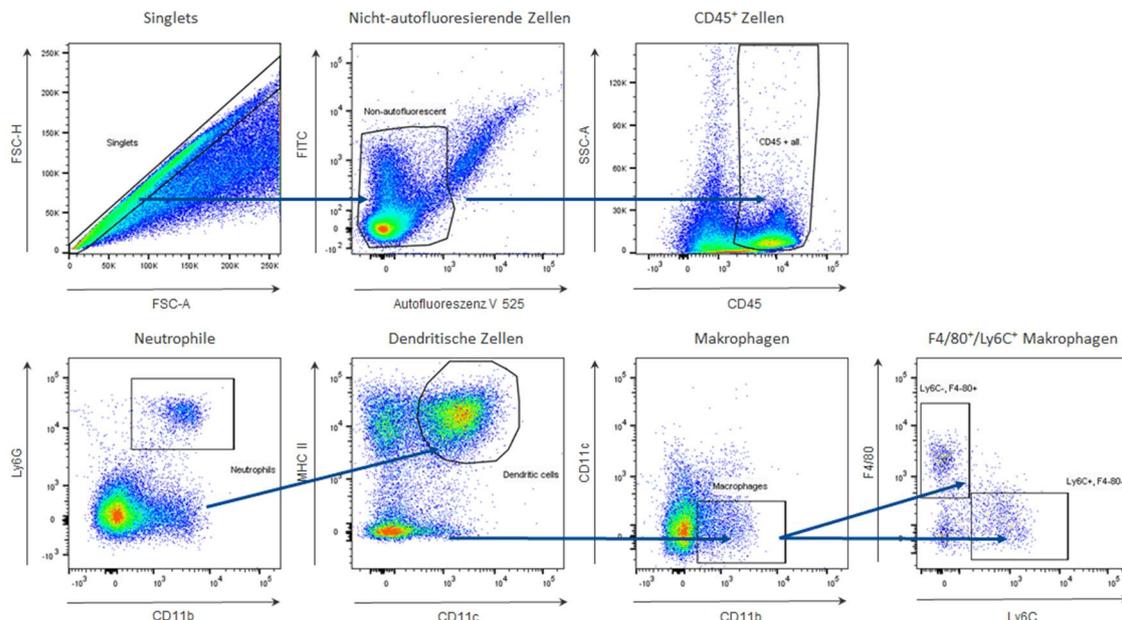
#### **3.2.6.3. Monozyten/ Makrophagen Panel und Gating**

Das Monozyten/ Makrophagen Panel basiert auf der Isolation von myeloiden Zellen, in diesem Fall den Neutrophilen, dendritischen Zellen und Makrophagen.

Hierfür wurden die Zellen nach dem gentleMACS Dissociator über ein 70 µm Zellsieb (Labsolute) gegeben. Es folgte die Lyse der Erythrozyten durch Ammoniumchlorid und ein weiteres Zellsieb (40 µm, Labsolute). Zur Bestimmung der absoluten Zellzahlen wurde die Zellsuspension auf ein definiertes Volumen gebracht, hier 200 µL. Davon wiederum wurde ein definiertes Volumen, in diesem Fall 10 µL, für den Cell Count verwendet. Die restlichen

## Methodik

190  $\mu$ L Zellsuspension wurden für 20 Minuten mit Mausserum (Maus IgG) bei 4° C zur Blockierung der unspezifischen Bindungen inkubiert. Anschließend erfolgte für 30 Minuten die Oberflächen-Färbung mit einem Antikörpermix bei 4° C. Es wurden folgende Fluorochrom-konjugierte Antikörper für das Monozyten/ Makrophagen Panel verwendet: CD45 (30-F11), CD11b (M1/70), CD11c (N418/HL3), Ly6G(1A8), MHCII (M5/114.15.2), F4/80 (BM8) und Ly6C (AL-21/HK1.4).



**Abbildung 6: Gating Strategie des Monozyten-Makrophagen Panels.**

Zunächst wurde die Zellsuspension auf Einzelzellen (Singlets), nicht-autofluoreszierende und CD45<sup>+all</sup> Zellen gegatet (obere Gate-Reihe). Für die Bestimmung der Neutrophilen wurden diese Zellen auf Ly6G<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> gegatet. Die dendritischen Zellen (MHC II<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup>) wurden im nächsten Schritt aus den Nicht-Neutrophilen herausgegatet. Die nicht-dendritische CD11b<sup>+</sup> und CD11c<sup>-</sup> Zellen (Makrophagen) wurden anschließend in F4/80<sup>+</sup> oder Ly6C<sup>+</sup> Makrophagen unterteilt.

Nach der Zellaufreinigung und Oberflächenfärbung wurden die Zellen mittels Durchflusszytometer analysiert. Als myeloide Zellen gelten einzelne (Singlets), nicht-autofluoreszierende CD45<sup>+all</sup> Zellen (obere Reihe in der Abbildung 6). Danach wurden die Zellen aus auf Neutrophile (Ly6G<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup>) gegatet. Die Neutrophile-Zellpopulation wurde anschließend auf dendritische Zellen (MHCII<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup>) und alle Nicht-dendritischen Zellen auf Makrophagen (CD11b<sup>+</sup> und CD11c<sup>-</sup>) gegatet. Die Makrophagen ließen sich in 2 Subpopulationen aufteilen, die proinflammatorischen (auch M1 Typ genannt, Ly6C<sup>+</sup>) und die tissue-residenten (entspricht den M2 Typen, F4/80<sup>+</sup>) Makrophagen.

### 3.2.6.4. T-Zell und Zytokine Panels/ Gatings

Für das T-Zell Panel bzw. das Zytokine Panel wurden Lymphozyten aus dem Gewebe isoliert. Das T-Zell Panel umfasst hierbei  $\gamma\delta$ T-Zellen, NK Zellen, NKT-Zellen, B-Zellen,

## Methodik

regulatorische T-Zellen und T-Helferzellen. Im Zytokine Panel können zusätzlich dazu noch Zytokine wie IFN $\gamma$  und IL-17A bestimmt werden.

Hierfür wurden die Zellen nach dem gentleMACS Dissociator zentrifugiert und in einem Dichtegradienten (37 % Percoll) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation sedimentierten die schwereren Leukozyten und Erythrozyten.

Für das T-Zell Panel wurden im nächsten Schritt die Erythrozyten durch Ammoniumchlorid lysiert, bevor das Zellsuspensat über ein Zellsieb (40  $\mu$ m, Labsolute) gegeben wurde. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahlen wurde die Zellsuspension auf ein definiertes Volumen gebracht, hier 200  $\mu$ L. Davon wiederum wurde ein definiertes Volumen, in diesem Fall 10  $\mu$ L, für den Zell Count verwendet. Die restlichen 190  $\mu$ L Zellsuspension wurden für 20 Minuten mit Mausserum (Maus IgG) bei 4° C zur Blockierung der unspezifischen Bindungen inkubiert. Anschließend erfolgte für 30 Minuten die Oberflächen-Färbung mit einem Antikörpermix bei 4° C. Es wurden folgende Fluorochrom-konjugierte Antikörper für das T-Zell Panel verwendet: CD45 (30-F11), CD3 (17A2), CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7),  $\gamma\delta$ TCR (GL3), NKp46 (29A1.4). Danach wurden mittels eines Lebend-Tot-Farbstoffes (Vivid) die toten Zellen angefärbt. Für die Abgrenzung der T-Helferzellen wurden die Zellen und der Nukleus permeabilisiert und im nächsten Schritt mit folgenden Fluorochrom-konjugierten Antikörpern angefärbt: Tbet (4B10), GATA3 (L50-823), FoxP3 (FJK-16s), ROR $\gamma$ t (Q31-378).

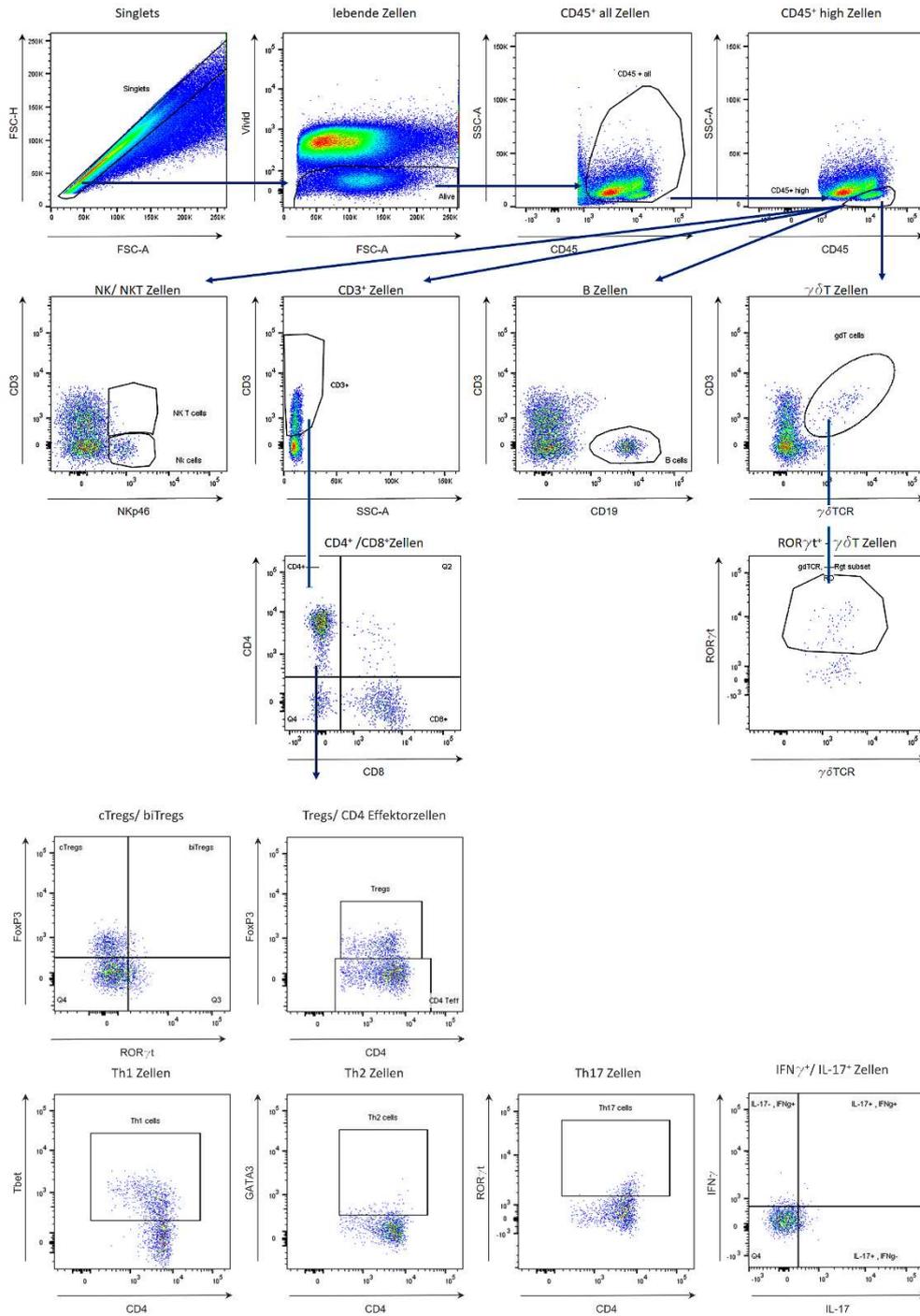
Für das Zytokine Panel wurde das Zellsuspensat für 150 Minuten mit Brefeldin A und Ionomycin stimuliert. Anschließend wurden die Zellen über ein Zellsieb (40  $\mu$ m, Labsolute) gegeben. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahlen wurde die Zellsuspension auf ein definiertes Volumen gebracht, hier 200  $\mu$ L. Davon wurde wiederum ein definiertes Volumen, in diesem Fall 10  $\mu$ L, für den Cell Count verwendet. Die restlichen 190  $\mu$ L Zellsuspension wurden für 20 Minuten mit Mausserum (Maus IgG) bei 4° C zur Blockierung der unspezifischen Bindungen inkubiert. Anschließend erfolgte für 30 Minuten die Oberflächen-Färbung mit einem Antikörpermix bei 4° C. Es werden folgende Fluorochrom-konjugierte Antikörper für das Zytokin Panel verwendet: CD45 (30-F11), CD3 (17A2), CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7),  $\gamma\delta$ TCR (GL3). Danach wurden mittels eines Lebend-Tot-Farbstoffes (Vivid) die toten Zellen angefärbt. Anschließend wurden die Zellen und der Nukleus permeabilisiert und im nächsten Schritt mit folgenden Fluorochrom-konjugierte Antikörpern angefärbt: IL-17A (TC11-18410), IFN $\gamma$  (XMG1.2), FoxP3 (FJK-16s), ROR $\gamma$ t (Q31-378).

Nach der Zellaufreinigung und der Färbung wurden die Zellen mittels Durchflusszytometer analysiert. Nachdem die Zellen auf Einzelzellen (Singlets), lebende Zellen (Vivid<sup>-</sup>) und CD45<sup>high</sup> gegatet wurden (siehe Abbildung 7), teilten sich die Leukozyten in NK (NKp46<sup>+</sup>

## Methodik

und CD3<sup>-</sup>) und NKT-Zellen (NKp46<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>), B-Zellen (CD19<sup>+</sup> und CD3<sup>-</sup>),  $\gamma\delta$ T-Zellen ( $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>) und T-Zellen (CD3<sup>+</sup>). Die T-Zellen wurden in zytotoxische (CD8<sup>+</sup>) und T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) unterteilt. Diese ließen sich in regulatorische T-Zellen (Tregs, FoxP3<sup>+</sup>) und CD4 Effektorzellen (CD4<sup>+</sup> und FoxP3<sup>-</sup>) aufteilen. Im letzten Schritt wurden die Tregs in klassische (cTregs, FoxP3<sup>+</sup> und ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>) und biTregs (FoxP3<sup>+</sup> und ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>) und die CD4 Effektorzellen in TH1 (Tbet<sup>+</sup>), TH2 (GATA3<sup>+</sup>), TH17 (ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>) und IFNg<sup>+</sup> oder IL-17A<sup>+</sup> T-Zellen unterteilt.

# Methodik



**Abbildung 7: Gating Strategie des T-Zell und Zytokine Panels.**

Zunächst wird die Zellsuspension auf Einzelzellen (Singlets), lebende und CD45+high Zellen gegatet (obere Gate-Reihe). Diese Zellen wurden in NK (NKp46<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>) und NKT-Zellen (NKp46<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>), B-Zellen (CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>),  $\gamma\delta$ T-Zellen ( $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>) und T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) unterteilt. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden in regulatorische T-Zellen (cTregs FoxP3<sup>+</sup> und biTregs FoxP3<sup>+</sup>, ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>), TH1 (Tbet<sup>+</sup>), TH2 (GATA3<sup>+</sup>), TH17 (ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>), IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und IL-17A<sup>+</sup> Zellen unterteilt.

## Methodik

### 3.2.7. RNA Isolation, cDNA Synthese und quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Für die qPCR Analyse wurde RNA mittels Trizol-Auszug aus Nieren- und Herzgewebe gewonnen. Hierfür wurde das gefrorene Gewebe zusammen mit Trizol (TRIzol® Reagent) mittels einer Wolframcarbit-Kugel (Quiagen) homogenisiert und nach Zugabe von Chloroform zentrifugiert. Die in der oberen Schicht befindliche RNA wurde anschließend mit Isopropanol ausgefällt und mit Ethanol gewaschen. Nach der Trocknung der RNA wurde diese, angepasst an die Gewebemenge und die Gewebeart, in RNase-freiem Wasser eluiert. Im nächsten Schritt wurde die RNA mittels Spectrophotometer (DeNovix DS 11) für die cDNA Synthese quantifiziert. Unter Zuhilfenahme von Reverser Transkriptase und einem Random Hexamer Primer wurden 2000 ng RNA in cDNA transkribiert und zuletzt auf 200 ng/µL verdünnt.

Für die quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qPCR) wurden pro Probe in einer Doppelbestimmung 200ng cDNA, 9µL SybrGreen (PowerUp), jeweils 0,01 nmol Forward-Primer und Reverse-Primer in einem qPCR Cycler (QuantStudio™ 3 System, Applied Biosystems) analysiert. Abhängig vom Zielgen waren 42-45 PCR Zyklen (15s 95°C, 60s 60°C) erforderlich. Die Auswertung erfolgte mittels Analysesoftware (QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.5.1, Applied Biosystems) als Komparative C<sub>T</sub> Methode (ΔΔC<sub>T</sub> Methode). Als Housekeeping Gen wurde 18 s verwendet. Alle verwendeten Primer sind ab Seite 138 mit ihren Sequenzen aufgeführt.

### 3.2.8. Histologie

Für histologische Analysen wurde das in 4 %igen Formaldehyd (Merck) fixierte Gewebe mit PBS (Gibco) gewaschen. Im nächsten Schritt wurde dem Gewebe das Wasser entzogen und zuerst durch Ethanol, dann durch Xylol und letztendlich durch Paraffin verdrängt (Zitatdelle STP 120). Das paraffinierte Gewebe wurde anschließend in Paraffinblöckchen gegossen. Mit einem Mikrotom (Leica 2255) wurde das Gewebe in 1-3 µm dünne Scheiben geschnitten und auf unbeschichtete Objektträger (für PAS und SRFG) und Superfrost-Objektträger (Immunhistologie) gezogen. Die Schnitte wurden bei 40° C über Nacht zur besseren Haftung angebacken.

Da sämtliche Färbungen in wässrigen Lösungen stattfanden, wurden im nächsten Schritt die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe, angefangen mit Xylol, entparaffiniert.

Die entsprechenden Färbeprotokolle befinden sich im Anhang.

## Methodik

### 3.2.8.1. Periodsäure Färbung (PAS)

Die Periodsäure Färbung (PAS) gilt als Standardfärbung von Nierengewebe. Hierfür wurden 1 µm dünne Schnitte nach der Entparaffinierung für 15 Minuten in eine 1 %ige Periodsäure-Lösung (Carl Roth) getaucht. Danach erfolgte für 40-60 Minuten die Schiffschersche Reagenz (Merck), die vor allem Glykoproteine, Muzine und Glykogen anfärbt. Im Anschluss erfolgte eine Kernfärbung mit Hämalaun nach Böhmer. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte mit Xylol-basiertem Eindeckmittel (Eukit) eingedeckt.

Die Kerne waren nun blau, PAS-positive Substanzen leuchtend rot (magenta, pink, hellviolett) und die restlichen Strukturen blass rosa angefärbt, beispielhaft in Abbildung 8.

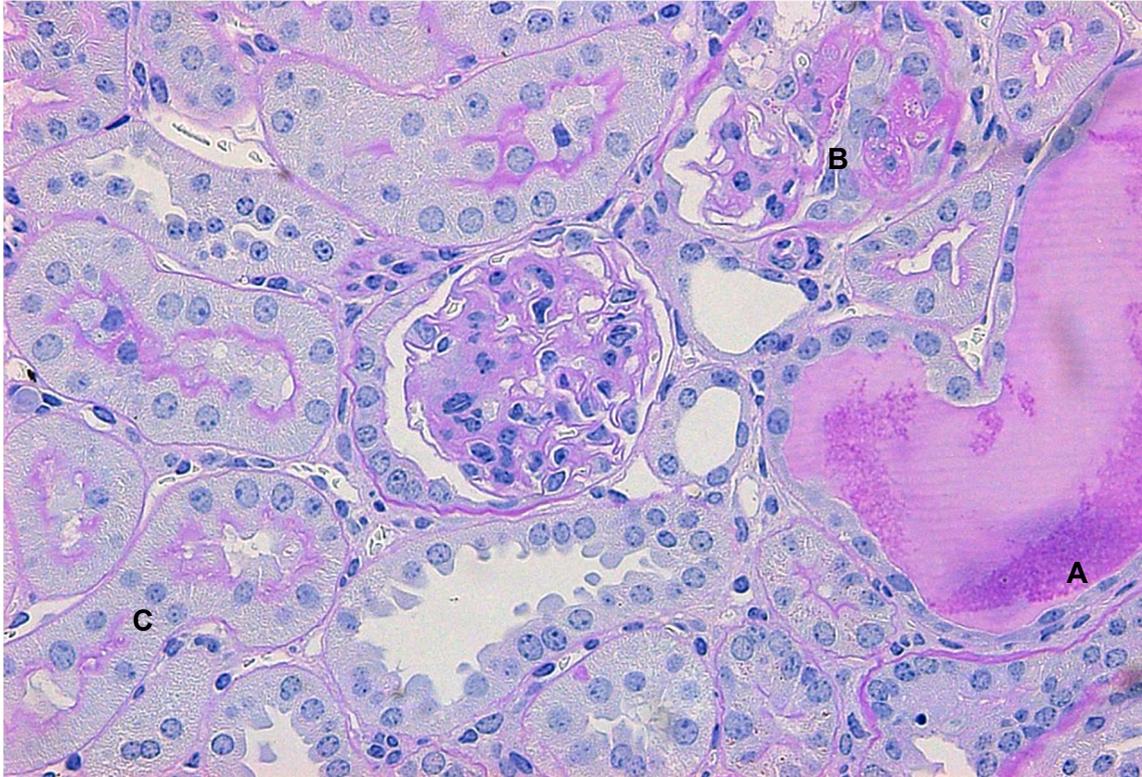
Die semiquantitative Auswertung der Nierenhistologien erfolgte zum allergrößten Teil durch die medizinischen Doktoranden Martin Kohsar, Anna Cai, The Vinh Luu, Niklas Diemer und Pia Kirkerup. Hierbei wurden die Schnitte hinsichtlich des glomerulären Schadens und des tubulointerstitiellen Schadens hin gescoret.

Für das Scoring wurde der Nierenquerschnitt meanderförmig mikroskopiert und 10 bis 20 Gesichtsfelder pro Schnitt bewertet. Glomeruläre Veränderungen wurden in 400facher Vergrößerung bewertet (Tabelle 2), tubulointerstitielle Schäden in einer 200fachen Vergrößerung (Tabelle 3).

**Tabelle 2: Glomeruläres Scoring: Das Scoring bezieht sich auf ein Gesichtsfeld in 400facher Vergrößerung.**

<b>Scoring</b>	<b>Beschreibung</b>
0	Gesund - Keine glomerulären Veränderungen
1	Minimale Schäden – (Streifen)
2	Stärkere Schäden – kleinere flächige Veränderungen
3	Massive Schäden – flächige Veränderungen von mehr als der Hälfte des Glomerulums

## Methodik



**Abbildung 8: Beispiel einer PAS Färbung anhand einer hypertensive geschädigten Niere im DOCA-Salz Modell.**

Pink dargestellt sind PAS-positive Strukturen wie einem Proteinzyylinder im dilatierten distalen Tubulus (A), einem stark vernarbten Glomerulum (B) und dem Bürstensaum der proximalen Tubuli (C).

**Tabelle 3: Tubulointerstielles Scoring in 200facher Vergrößerung.**

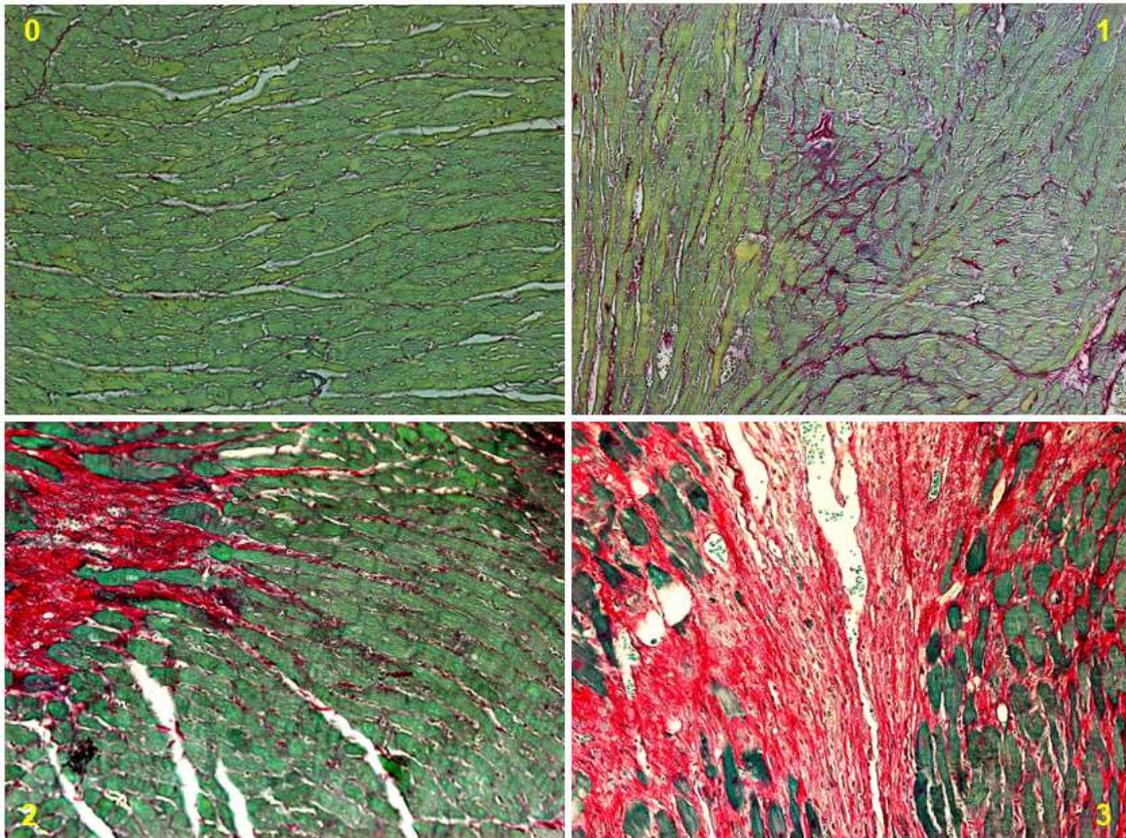
Scoring	Beschreibung
0	Keine Veränderungen der proximalen und distalen Tubuli, keine Proteinzyylinder, Interstitium zart
1	Interstitium leicht verbreitert
2	Flächenförmige Verbreiterung des Institiiums <50 % des Gesichtsfelds
3	Flächenförmige Verbreiterung des Institiiums >50 % des Gesichtsfelds

### 3.2.8.2. Sirius Rot - Fast Green Färbung (SRFG)

Die Sirius Rot - Fast Green Färbung gilt als Fibrose Färbung und findet vor allem bei Herz- und Lebergewebe Anwendung. Hierfür werden 3 µm dünne Schnitte nach der Entparaffinierung in einer Pikrinsäure-Lösung angefärbt. Es folgt eine Gegenfärbung mit Fast Green. Nach einer zügig durchgeführten aufsteigenden Alkoholreihe werden die Schnitte mit Xylol-basiertem Eindeckmittel (Eukit) eingedeckt.

Kollagene Strukturen werden rot und das restliche Gewebe grün angefärbt, beispielhaft in Abbildung 9 abgebildet.

## Methodik



**Abbildung 9: Beispiel des Fibrose Scorings anhand von Sirius Rot – Fast Green Färbungen.**

Rot dargestellt sind Kollagene Strukturen, grün sind Myokard-Gewebe und Erythrozyten. (0) Gesundes Myokardgewebe, ohne Kollagene Strukturen, (1) dezente, septenartige Fibrose, (2) deutliche teilweise flächige Kollagene Strukturen und (3) mit großflächigen vernarbten Bereichen.

Die semiquantitative Auswertung der Herz-Histologien erfolgte fast ausschließlich durch mich. Ein kleinerer Anteil wurde durch die medizinischen Doktoranden M. Kohsar, A. Cai, V. Luu und N. Diemer ausgewertet. Hierbei wurden die Schnitte hinsichtlich der Menge an vernarbten Myokard-Gewebes hin gescort, siehe Tabelle 4.

**Tabelle 4: Fibrose Scorings.**

Scoring	Beschreibung
0	Gesund - Keine Kollagenen Strukturen erkennbar
1	Dezent - Geringfügige Kollagene Strukturen vorhanden
2	Deutlich – teilweise kleinflächige Kollagene Strukturen
3	Massiv – großflächige, mehr als die Hälfte ausfüllende Kollagene Strukturen

### 3.2.8.3. Immunfluoreszenz Färbung

Für den morphologischen Nachweis vom tdTomato Reportergen, wurde das cryo-konservierte Nierengewebe im Cryotom auf ca. 3µm geschnitten und anschließend immunhistologisch angefärbt. Hierfür wurde tdTomato und das Strukturprotein WGA (Wheat Germ Agglutinin) mittels Antikörper angefärbt. Zusätzlich erfolgte eine Kernfärbung

## Methodik

(4',6-diamindino-2-phenylindole, DAPI). Dies und die konfokalmikroskopische Analyse erfolgte ausschließlich durch Prof. Dr. med. C. Meyer-Schwesinger.

### 3.2.9. Daten- und Statistische Analyse

Die in dieser Arbeit ausgewerteten Daten wurden im Zeitraum von Mitte 2016 bis Mitte 2021 erhoben und basieren auf insgesamt 14 Ang II-, 7 DOCA- und 1 Reporter -Versuchen. Da bei einzelnen Versuchen die Auswertungsschwerpunkte verschieden waren, wurden nicht bei allen Versuchen alle Versuchsparameter gemessen bzw. Proben genommen. Die Anzahl an Messwerten pro Auswertung variiert daher abhängig vom Versuch. Außerdem wurden bei der Auswertung punktuell Daten nicht berücksichtigt, wenn die Messwerte nachvollziehbar falsch waren. Dies umfasst FACS-Proben ohne nennenswerte Population an lebenden Zellen, das Versterben von Tieren im Versuch durch Rangordnungskämpfe oder durch Pelletdurchbruch, qualitativ mangelhafte cDNA Proben. Auch fehlen punktuell Messwerte bei der Albuminurie, der Blutdruck- und der GFR-Messung, da mit lebenden Tieren gearbeitet wurde und diese nicht immer für die Messung compliant waren.

Die statistische Analyse der erhobenen Daten wurde mittels Graph Pad Prism 9 vorgenommen. Hierbei wurde die Gaußsche Normalverteilung der Daten mittels Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft.

Für die Datenanalysen von mehr als 2 Gruppen wurde wie folgt vorgegangen: Bei Normalverteilung aller miteinander verglichener Datensets wurden Daten mit dem ungepaarten One-Way ANOVA mit Post-hoc Analyse nach Turkey (Korrektur für Mehrfachvergleiche) analysiert. Bei Nicht-Normalverteilung von mindestens 1 Datenset wurden die Daten mit dem ungepaarten, nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test und Korrektur für Mehrfachvergleiche nach Dunn's verwendet.

Für die Datenvergleiche von 2 Gruppen miteinander wurde wie folgt vorgegangen: Bei Normalverteilung beider Gruppen wurde der parametrische, ungepaarte t-Tests verwendet. Bei einer nicht normalen Verteilung wurde der nicht-parametrische, ungepaarte Mann-Whitney-Test verwendet.

Die Sterblichkeit wurde mittels einer Kaplan-Meyer Kurve ermittelt und durch den Log-Rank (Mantel-Cox) Test auf Signifikanz überprüft.

Für Verlaufs-Datenvergleiche von mehr als 2 Gruppen erfolgte ein Two-Way ANOVA Test mit Post-hoc Analyse nach Turkey.

Die Daten werden als Mittelwerte mit den Standardfehlern (SEM) angegeben. Die dargestellten Signifikanzen werden wie folgt definiert: \* signifikant  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

## **Methodik**

### **3.2.10. Abbildungen**

Die Fotos der histologischen Präparate wurden an Mikroskopen der Firma Zeiss mit den Programmen ZEN 3.5 und AxioVision40 4.8.2.0 aufgenommen. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mittels ZEN 3.5, Coral Draw, Paint 3D und Powerpoint.

Die schematischen Abbildungen wurden mittels Powerpoint und Biorender erstellt.

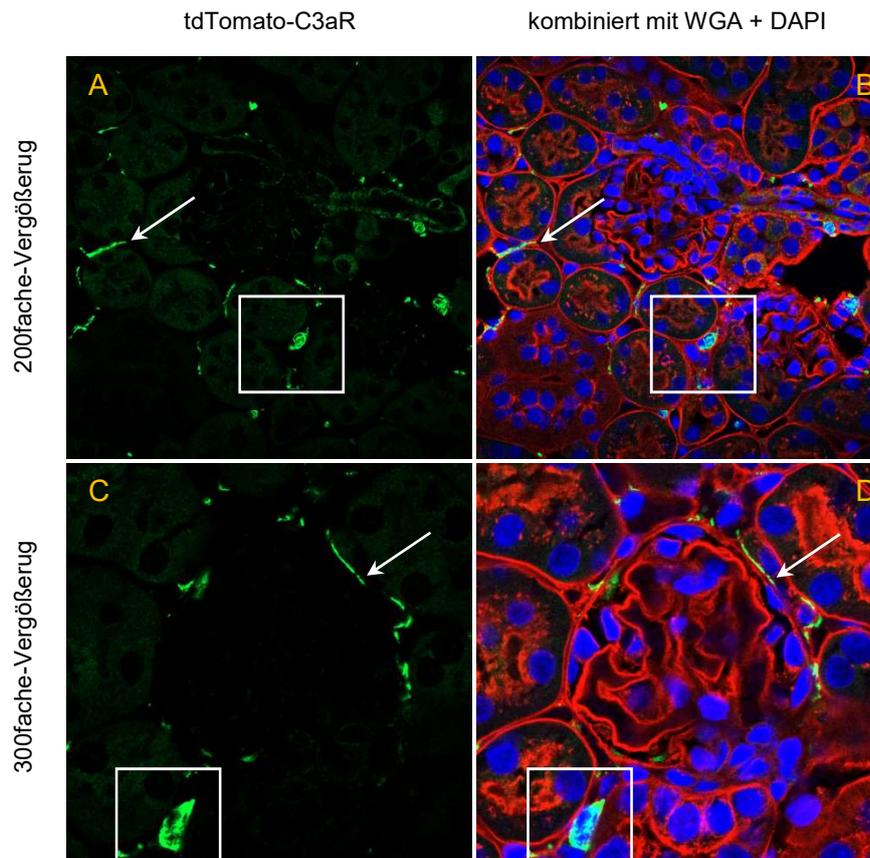
### 4. Resultate

#### 4.1. C3a Rezeptor (C3aR)

Um zu bestimmen, ob C3a Rezeptor (C3aR) eine Rolle bei Bluthochdruck spielt, wurden Analysen an verschiedenen Mauslinien vorgenommen. Zunächst wurde der C3aR mittels der tdTomato-C3aR Reporter-Maus via Konfokalmikroskopie und Durchflusszytometrie lokalisiert und charakterisiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Untersuchung unter Bluthochdruck-Bedingungen. Hierfür kamen 2 Hochdruckmodelle zum Einsatz: das Angiotensin II (Ang II) und das Deoxycorticosteron Acetat (DOCA)-Salz Modell. In jedem Versuch wurden hierfür Balb/c Kontrollen (im Folgenden nur noch Kontrollen genannt) mit hypertensiven Balb/c Wildtypen (im Folgenden Wildtypen genannt) und C3aR-defizienten Mäusen miteinander verglichen.

##### 4.1.1. Detektion von C3aR mittels Konfokalmikroskopie und Durchflusszytometrie

Die gleichzeitige Expression von C3aR und dem Reporter genen tdTomato ermöglicht im Gewebe der tdTomato-C3aR Reporter-Maus die indirekte Detektion des C3a Rezeptors.



**Abbildung 10: C3aR – Konfokalmikroskopie von tdTomato-C3aR Nierenschnitten.**

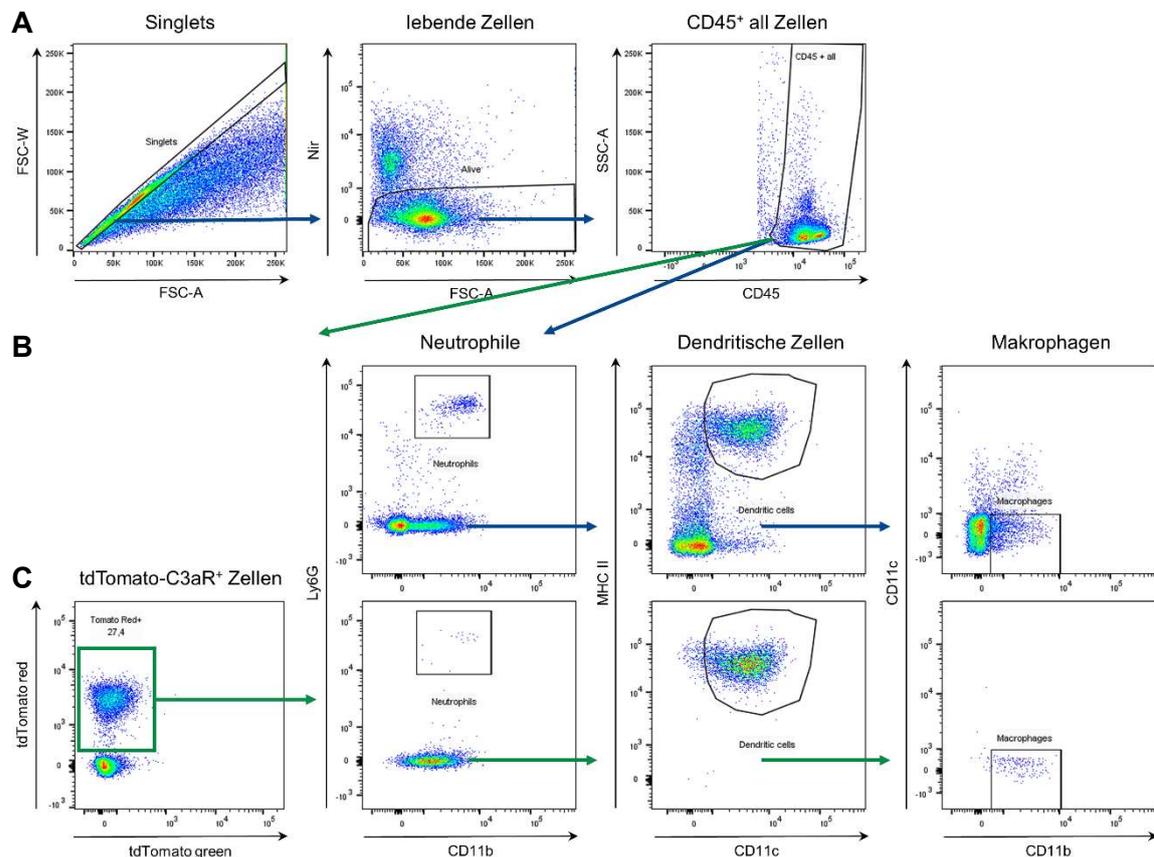
Abgebildet sind 2 Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Nierenschnitten. Auf den Bildern (A) + (C) ist das Tomato red-C3aR Signal in grün dargestellt. In den Abbildungen (B) + (D) sind zusätzlich Zellkerne in blau (DAPI) und Zellmembranen (Wheat Germ Agglutinin, WGA) in Rot dargestellt. Im tubulointerstitiellen Raum finden sich Tomato-positive polymorph-kernige Zellen (weißer Kasten). Zusätzlich dazu finden sich entlang der äußeren Bowman-Kapsel der Glomeruli und um die proximalen Tubuli Tomato Signale (Pfeile). Färbung und Bilder von Prof. Dr. med. C. Meyer-Schwesinger.

## Resultate

Für die Detektion des Tomato Proteins wurde im cryo-konservierten Nierengewebe immunhistologisch das Reportergergen angefärbt und im Konfokalmikroskop analysiert (durchgeführt von Prof. Dr. med. C. Meyer-Schwesinger).

Mikroskopisch ist das Tomato red Signal (in der Abbildung 10 grün dargestellt) im tubulointerstitiellen Raum auf infiltrierenden polymorph-kernigen Zellen zu finden. Zusätzlich dazu findet sich ein Tomato red Signal auch auf der äußeren Seite der Bowman-Kapsel der Glomeruli und auf einzelnen proximalen Tubuli, welche jedoch als Artefakte eingestuft werden.

Bei der Durchflusszytometrie kann das tdTomato Protein direkt detektiert werden. Hierfür wurden Leukozyten aus Nieren- und Herzgewebe einer tdTomato-C3aR Reporter Maus isoliert und für das Monozyten-Makrophagen und das T-Zell Panel angefärbt.



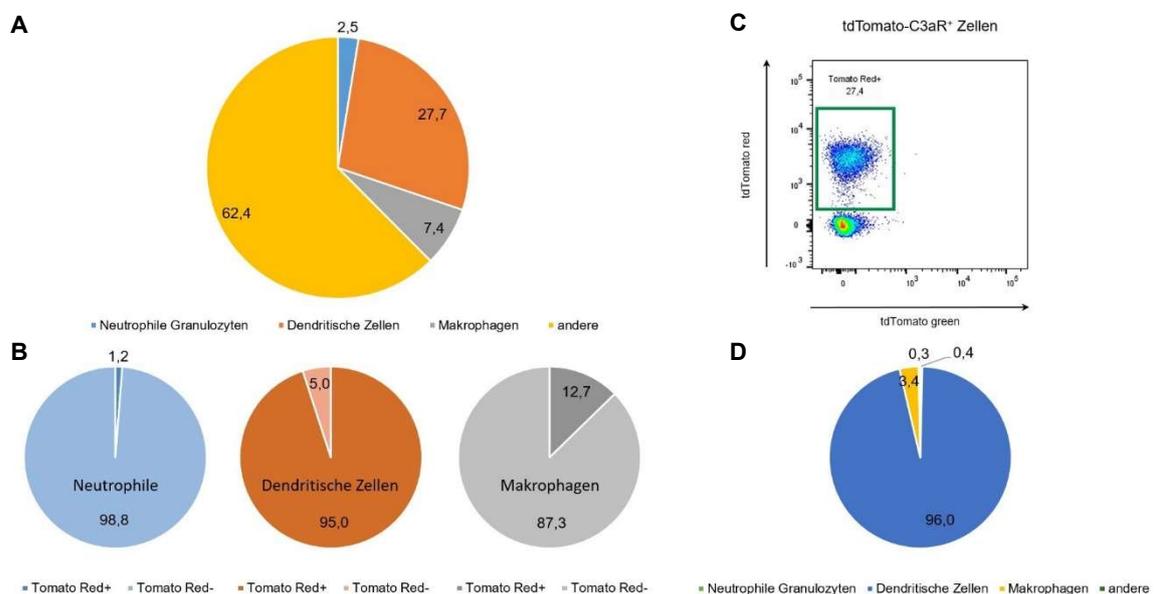
**Abbildung 11: C3aR – Durchflusszytometrie der Monozyten-Makrophagen Gatings von renalen tdTomato-C3aR Zellen.**

(A) Die renalen Leukozyten werden auf lebende (Nir gegen FSC-A) CD45 positive (CD45<sup>+</sup> gegen SSC-A) Singlets (FSC-A gegen FSC-W) vorgegattet. (B) Anschließend werden die Leukozyten auf Neutrophile Granulozyten (Ly6G<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>), Dendritische Zellen (MHC II<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>) und Makrophagen (CD11c<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>) gegattet (blauer Pfeilpfad). Jede dieser Zellpopulationen wird dann noch auf das Reportersignal (Tomato red<sup>+</sup>, Tomato green<sup>-</sup>) gegattet (nicht abgebildet, aber in nachfolgenden Mengendiagrammen mit aufgeführt). (C) Alternativ werden die Leukozyten erst auf das Tomato-Reportersignal (Tomato red<sup>+</sup>, Tomato green<sup>-</sup>) gegattet und anschließend in Neutrophile Granulozyten, Dendritische Zellen und Makrophagen unterteilt (grüner Pfeilpfad).

## Resultate

Bei der Monozyten-Makrophagen Gating Strategie wurden zunächst die isolierten Zellen auf Singlets (FSC-A gegen FSC-W), dann auf lebende (Nir gegen FSC-A) und dann auf CD45 positive Zellen (CD45<sup>+</sup> gegen SSC-A) gegatet. Danach wurden einerseits die CD45<sup>+</sup> Zellen auf Neutrophile (Ly6G<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>), Dendritische Zellen (MHC II<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>) und Makrophagen (CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup>) (Reihe B von Abbildung 11) und anschließend auf Tomato red<sup>+</sup> Signal (Tomato red<sup>+</sup>, Tomato green<sup>-</sup>) gegatet (nicht dargestellt). Andererseits wurden die CD45<sup>+</sup> Zellen auf Tomato red positive Zellen und anschließend auf Neutrophile, Dendritische Zellen und Makrophagen gegatet (Reihe C von Abbildung 11).

Bei der ersteren Monozyten-Makrophagen Gating Strategie lassen sich renal 2,5 % Neutrophile finden. Davon sind 1,2 % Tomato red<sup>+</sup> Zellen. Kardial sind hingegen 4,7% der CD45<sup>+</sup> Zellen Neutrophile und nur 0,4 % davon sind positiv für das Reporter-Signal. Der Anteil der Dendritischen Zellen ist renal 27,7 %, welcher zu 95 % Tomato positiv ist. Im Herzen ist der Anteil der Dendritischen Zellen um das 10-fache geringer und liegt bei 2,7 %. Davon tragen jedoch 29 % der Zellen das Tomato-Signal. Es lassen sich zudem renal 7,4 % Makrophagen finden, von denen 12,7 % Tomato red<sup>+</sup> sind. Kardial liegt der Makrophagen Anteil mit 26,6 % höher. Im Vergleich fällt der Anteil an Tomato red positiven kardialen Makrophagen mit 1,4 % sehr viel geringer aus, siehe Abbildung 12 und Abbildung 13 (A) und (B).

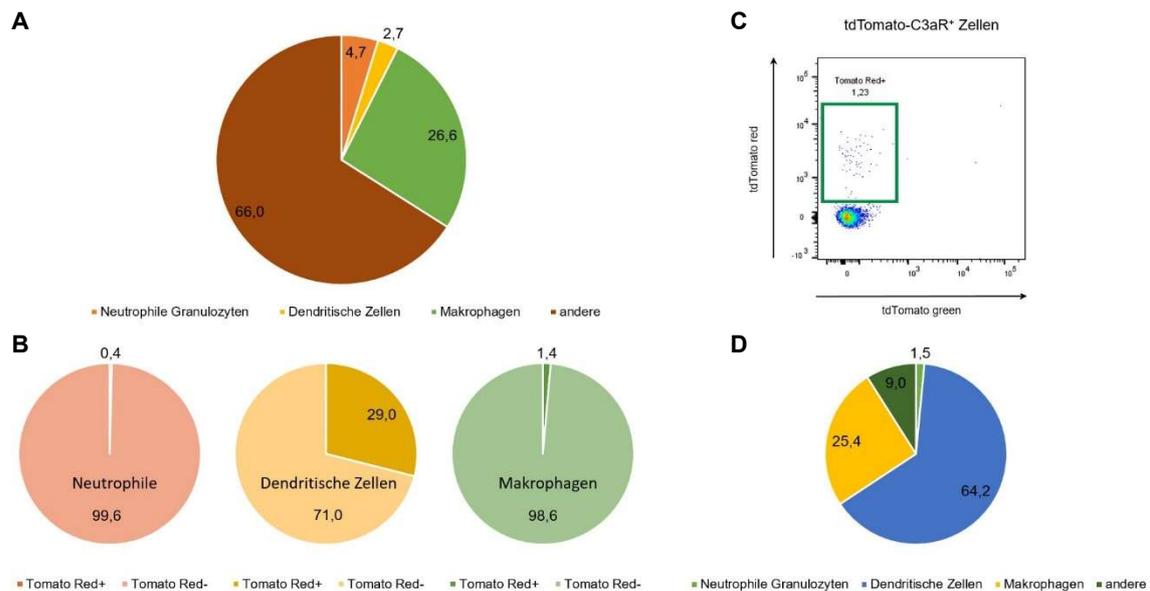


**Abbildung 12: C3aR – Ergebnisse der renalen tdTomato-C3aR-Durchflusszytometrie vom Monozyten-Makrophagen-Panel dargestellt in Mengendiagrammen**

Die renalen Leukozyten lassen sich im Monozyten-Makrophagen Gating in 2,5 % Neutrophile, 27,7 % Dendritische Zellen, 7,4 % Makrophagen und 62,4 % andere CD45 positive Zellen unterteilen. (B) Das Reportersignal weisen 1,2 % der Neutrophilen, 95 % der dendritischen Zellen und 12,7 % der Makrophagen auf. (C) 27,4 % der Leukozyten weisen das Reportergeren tdTomato red auf. (D) Diese lassen sich in 0,4 % Neutrophile, 96 % Dendritische Zellen, 3,4 % Makrophagen und 0,3 % andere Leukozyten unterteilen.

## Resultate

Bei der zweiten Monozyten-Makrophagen Gating Strategie (Reihe C von Abbildung 11), bei dem die CD45<sup>+</sup> Zellen zunächst auf das positive Tomato red Signal (Tomato red<sup>+</sup> und Tomato green<sup>-</sup>) gegatet wurden, finden sich renal 27,4 % und kardial 1,2 % Tomato red positive Leukozyten. Die Verteilung dieser Zellen ist ebenfalls unterschiedlich. In der Niere sind 0,4 % der Tomato red positiven Zellen Neutrophile, 95 % Dendritische Zellen, 3,4 % Makrophagen und 0,3 % andere Leukozyten. Kardial sind 1,5 % der Tomato red positiven Zellen Neutrophile Granulozyten, 64,2 % Dendritische Zellen, 25,4 % Makrophagen und 9 % andere Leukozyten, siehe Abbildung 15 und Abbildung 13 (C) und (D).



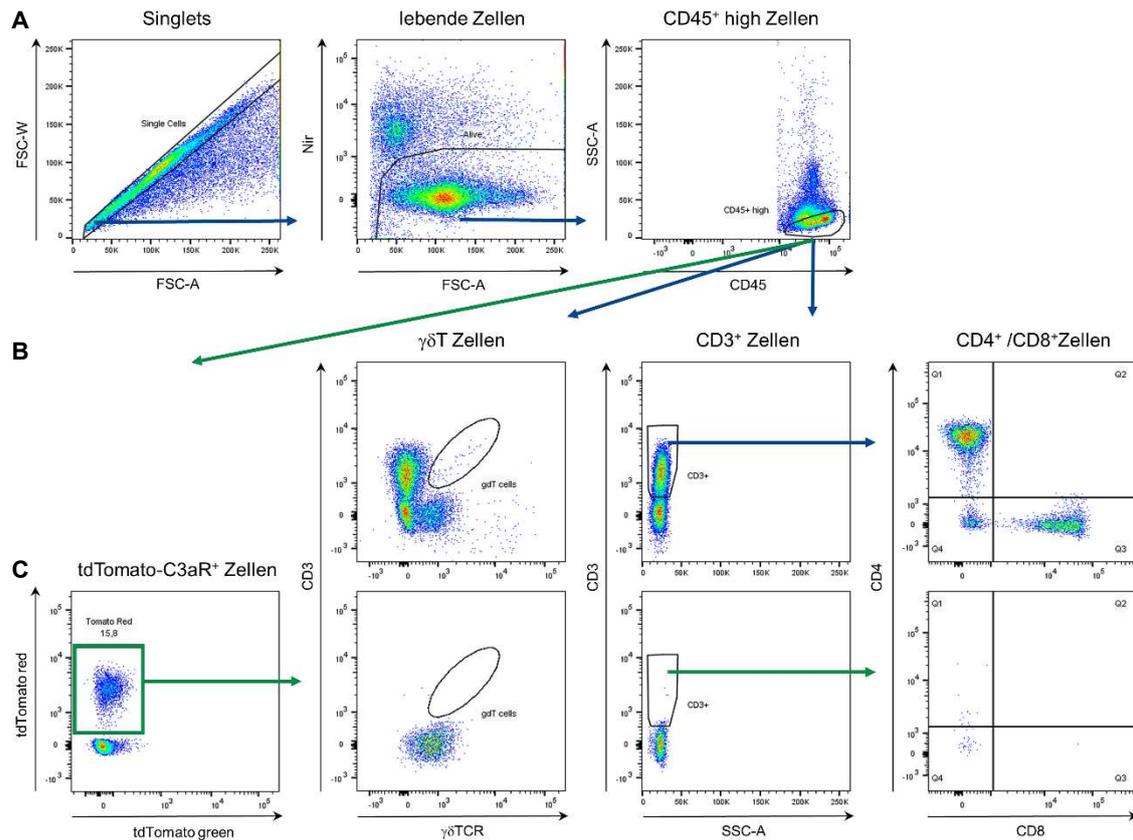
**Abbildung 13: C3aR – Ergebnisse der kardialen tdTomato-C3aR-Durchflusszytometrie vom Monozyten-Makrophagen-Panel dargestellt in Mengendiagrammen.**

(A) Die kardialen Leukozyten unterteilen sich in 7% Neutrophile, 2,7 % Dendritische Zellen, 26,5 % Makrophagen und 66 % andere CD45 positive Zellen. (B) Das Reportersignal weisen 0,4 % der Neutrophilen, 29,0 % der dendritischen Zellen und 1,4 % der Makrophagen. (C) Werden die Leukozyten vor der Unterteilung auf das Reporter gen gegatet, sind (D) 1,5 % Neutrophile, 64,2 % Dendritische Zellen, 25,4 % Makrophagen und 9 % andere CD45 positive Zellen Tomato red positiv.

Es wurden zudem Leukozyten aus Niere und Herz auf T-Zellen gegatet. Hierbei wurden die Zellen zunächst auf Singlets (FSC-A gegen FSC-W), dann auf lebende Zellen (Nir gegen FSC-A) und anschließend auf CD45<sup>+</sup> high Zellen (CD45<sup>+</sup> gegen SSC-A) gegatet, siehe Abbildung 14, Reihe A.

Danach erfolgte wie auch bei der Monozyten-Makrophagen Gating Strategie eine Aufteilung des Gatings. Einerseits wurden die CD45<sup>+</sup> high Zellen zunächst auf T-Zellen gegatet. Hierfür wurden die CD45<sup>+</sup> high Zellen auf  $\gamma\delta$ T-Zellen ( $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>) und parallel dazu auf T-Zellen (CD3<sup>+</sup> gegen SSC-A) und diese dann CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> (CD4 gegen CD8) T-Zellen gegatet, siehe Reihe B Abbildung 14. Zu jedem dieser Gates erfolgte anschließend das Gating auf das Tomato red Signal (Tomato red<sup>+</sup>, Tomato green<sup>-</sup>) (nicht dargestellt).

## Resultate



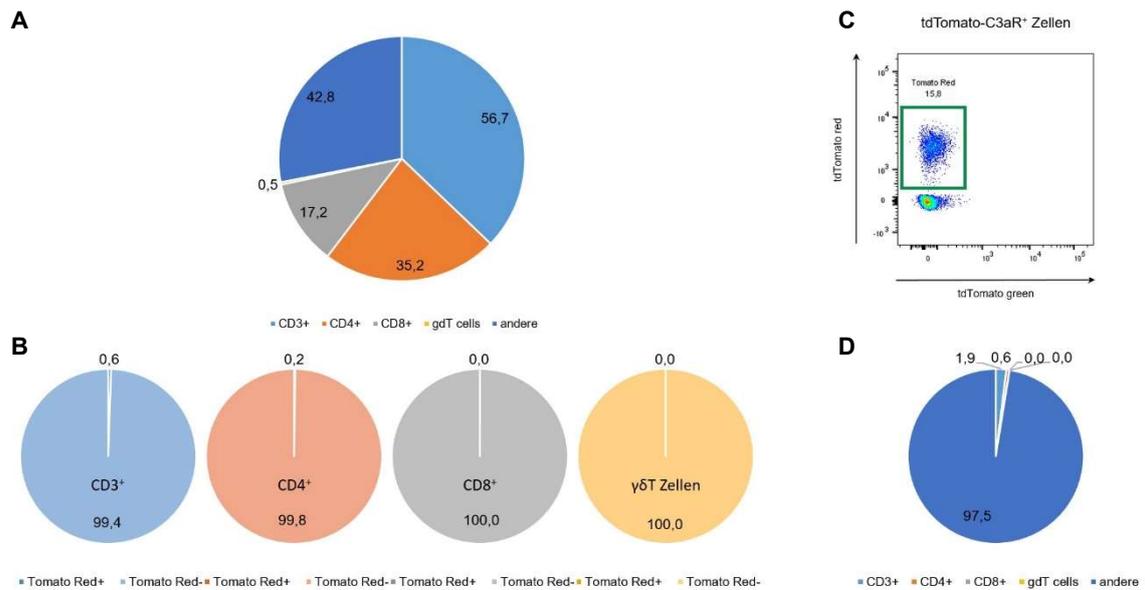
**Abbildung 14: C3aR – Durchflusszytometrie des T-Zell Gatings von renalen tdTomato-C3aR Leukozyten.**

(A) Die renalen Leukozyten auf lebende (Nir gegen FSC-A) CD45 positive (CD45<sup>+</sup> gegen SSC-A) Singlets (FSC-A gegen FSC-W) vorgegattet (B) und anschließend auf  $\gamma\delta$ T-Zellen ( $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>), CD3<sup>+</sup> T-Zellen (CD3<sup>+</sup> gegen SSC-A), CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CD4 gegen CD8) gegattet (blauer Pfeilpfad). Jede dieser Zellpopulationen wird dann noch auf das Reportersignal (Tomato red<sup>+</sup>, Tomato green) gegattet (nicht abgebildet, aber in nachfolgenden Mengendiagrammen mit aufgeführt). (C) Andererseits werden die Leukozyten erst auf das Tomato-Reportersignal (Tomato red<sup>+</sup>, Tomato green) gegattet und anschließend in  $\gamma\delta$ T-Zellen, CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterteilt (grüner Pfeilpfad).

Andererseits wurden die CD45<sup>high</sup> Zellen zunächst auf das tdTomato Signal gegattet und anschließend auf  $\gamma\delta$ T-Zellen, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, siehe Reihe C von Abbildung 14 (grüner Pfeilpfad).

Bei der ersten T-Zell Gating Strategie sind 56,7% der renalen CD45<sup>high</sup> Zellen CD3<sup>+</sup> T-Zellen, welche einen Anteil an 0,6 % Tomato red<sup>+</sup> Zellen aufweisen. Kardial beträgt der Anteil an CD3<sup>+</sup> T-Zellen 22,6 %, wobei diese Zellen vollständig negativ für das Tomato red Signal sind. Keine Zelle des renalen 0,5 % und des kardialen 0,1 %  $\gamma\delta$ T-Zell-Anteils weist das Reportersignal auf. In der Niere finden sich zudem 35,2 % CD4<sup>+</sup> und 17,2 % CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche einen Anteil an Tomato red positiven Zellen von 0,25 % (CD4<sup>+</sup> T-Zellen) und 0,02 % (CD8<sup>+</sup> T-Zellen) aufweisen. Bei den kardialen 14,0 % CD4<sup>+</sup> T-Zellen und 6,7 % CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist in keiner dieser beiden Zellpopulationen ein Tomato red Signal vorhanden, Abbildung 15 und Abbildung 16 (A) und (B).

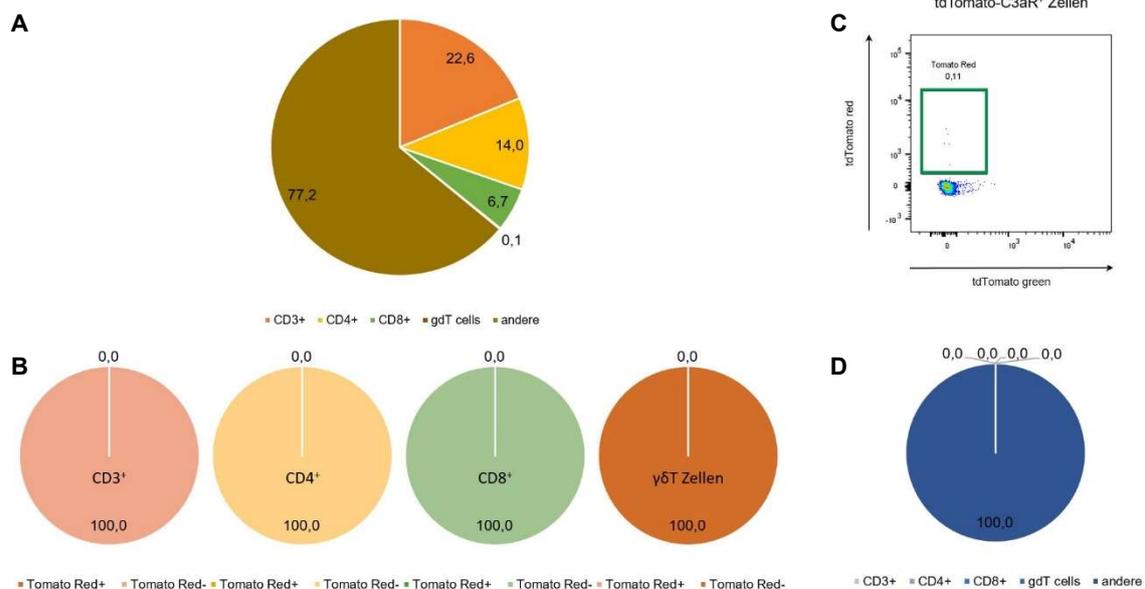
## Resultate



**Abbildung 15: C3aR – Ergebnisse der renalen tdTomato-C3aR-Durchflusszytometrie vom T-Zell-Panel dargestellt in Mengendiagrammen.**

(A) Die renalen Leukozyten unterteilen sich in 0,5 %  $\gamma\delta$ T-Zellen, 56 %  $CD3^+$ , 35,2 %  $CD4^+$ , 17,2 %  $CD8^+$  T-Zellen und 42,8 % anderer Leukozyten, welche als Differenz zu  $CD3^+$  und  $\gamma\delta$ T-Zellen, da  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Unterpopulationen von  $CD3^+$  sind, ermittelt werden. (B) Die  $\gamma\delta$ T-Zellen weisen 0 %, die  $CD3^+$  T-Zellen 0,6 %, die  $CD4^+$  T-Zellen 0,2 % und die  $CD8^+$  T-Zellen 0 % an Tomato red<sup>+</sup> Zellen auf. (C) 15,8 % aller  $CD45^{\text{high}}$  Zellen sind Tomato red positiv (Tomato red<sup>+</sup>) und (D) unterteilen sich in 1,9 % T-Zellen, 0,5 %  $CD4^+$ , 0,04 %  $CD8^+$  T-Zellen und 97,4 % andere  $CD45^+$  Zellen.

Bei der zweiten T-Zell Gating Strategie sind 15,8 % der renalen Leukozyten positiv für das Reporterger-Signal. Diese Leukozyten lassen sich in 1,9 %  $CD3^+$  T-Zellen, 0,6 %  $CD4^+$  T-Zellen und 97,5 % andere Zellen unterteilen. Kardial hingegen sind nur 0,11 % aller Leukozyten Tomato red positiv, bei denen es sich weder  $\gamma\delta$ T-Zellen,  $CD3^+$ ,  $CD4^+$  noch  $CD8^+$  T-Zellen handelt, Abbildung 15 und Abbildung 16 (C) und (D).



**Abbildung 16: C3aR – Ergebnisse der kardialen tdTomato-C3aR-Durchflusszytometrie vom T-Zell-Panel dargestellt in Mengendiagrammen.**

(A) Die kardialen Leukozyten unterteilen sich in 0,1 %  $\gamma\delta$ T-Zellen, 22,6 %  $CD3^+$  T-Zellen, 14,0 %  $CD4^+$ , 6,7 %  $CD8^+$  T-Zellen und 77,2 % andere Leukozyten, welche als Differenz zu  $CD3^+$  und  $\gamma\delta$ T-Zellen, da  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Unterpopulationen von  $CD3^+$  sind, ermittelt werden. (B) Keine der unter (A) aufgeführten Zellpopulationen weist einen Anteil an Tomato red<sup>+</sup> Zellen auf. (C) 0,11 % aller  $CD45^{\text{high}}$  Zellen sind Tomato red<sup>+</sup>. (D) Keine dieser Zellen lässt sich den  $\gamma\delta$ T-Zellen,  $CD3^+$  T-Zellen oder den  $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$  T-Zellen zuordnen.

## Resultate

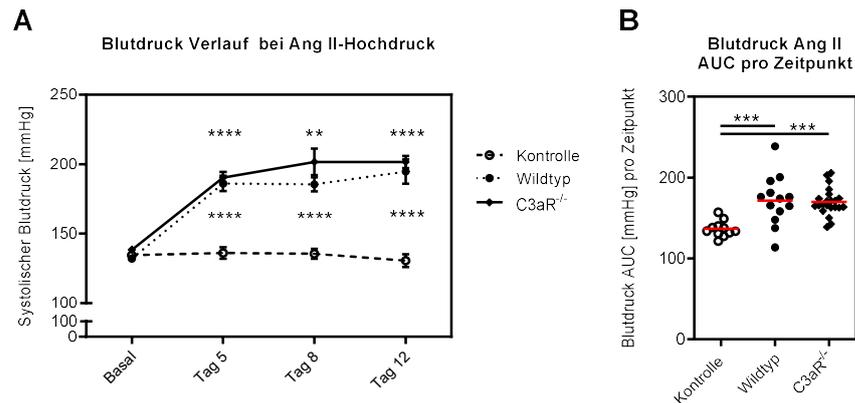
Zusammengefasst kann man sagen, dass der C3aR mikroskopisch auf infiltrierenden Zellen zu finden ist. In der Durchflusszytometrie kann man C3aR vor allem auf renalen und kardialen dendritischen Zellen, aber auch auf Neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und zu einem sehr geringen Anteil auf Lymphozyten nachweisen.

### 4.1.2. C3a Rezeptor (C3aR) im Ang II-Hochdruckmodell

Um die Frage, ob der C3a Rezeptor (C3aR) bei Hypertonie und den daraus resultierenden hypertensiven Endorganschäden eine Rolle spielt, zu beantworten, wurde das in der Arbeitsgruppe Wenzel gut etablierte Ang II-Hochdruckmodell angewandt (Ahadzadeh *et al.*, 2018; Weiss *et al.*, 2016). Als Beurteilungs-Parameter wurden hierfür die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), Albuminurie, Blutplasma-Werte, Organgewichte, Histologie, systolischer Blutdruck, Expression von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Genen (qPCR) und die Sterblichkeit herangezogen. Es wurden hierfür 7 Versuche mit insgesamt 106 Tieren für die unterschiedlichen Auswertungen berücksichtigt. Bei allen Versuchen wurden 3 Versuchsgruppen miteinander verglichen: Balb/c Kontrollen, hypertensive Balb/c Wildtypen und hypertensive C3aR-defiziente Mäuse. Da die einzelnen Versuche andere Schwerpunkte und somit andere Parameter zum Ziel hatten, können bei den Analysen die Tierzahlen sehr stark variieren. Für alle Verlaufs-Parameter wurde vor Beginn der Hochdruck-Induktion eine basale Bestimmung vorgenommen. Da sich zu diesem Zeitpunkt die normotensiven Kontrolltiere nicht von den späteren hypertensiven Wildtypen unterscheiden, wurden beide Gruppen als Gruppe „Wildtyp“ in der Basalbestimmung zusammengefasst.

Um den Erfolg der Induktion von Hypertonie im Ang II-Hochdruckmodell beurteilen zu können, wurde der systolische Blutdruck vor Beginn des Versuches und an den Tagen 5, 8 und 12 nach Ang II-Infusion non-invasiv via Tail-cuff-Methode gemessen. Der systolische Blutdruck wird im Verlauf und als „Area under the curve“ (AUC), dem Mittel der verschiedenen Zeitpunkte ab Tag 5 des Versuchs, dargestellt.

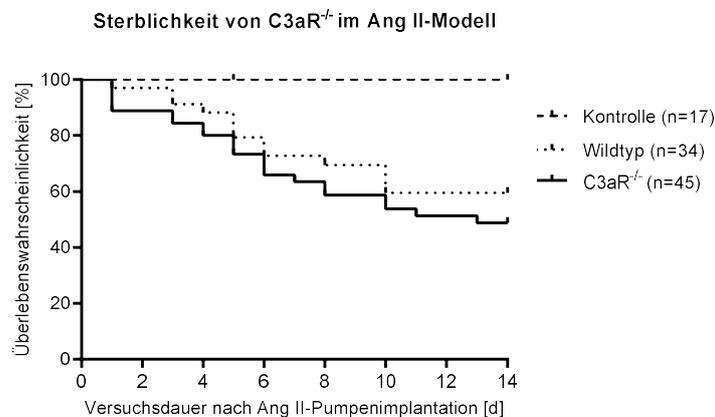
## Resultate



**Abbildung 17: C3aR – Systolischer Blutdruck im Verlauf und als AUC unter Ang II-Hochdruck.**

Dargestellt ist (A) der durchschnittliche systolische Blutdruck und die Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) und (B) die AUC. Der Blutdruck ist vor Beginn der Versuche bei allen 3 Versuchsgruppen vergleichbar. Ab Tag 5 der Ang II-Infusion ist der systolische Blutdruck sowohl in der Wildtyp- als auch in C3aR<sup>-/-</sup>-Gruppe signifikant erhöht und erreicht zum Ende des Modells das Maximum. Signifikante Unterschiede zwischen hypertensiven Wildtypen und C3aR-Knockouts besteht zu keiner Zeit. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*\* p<0,005, \*\*\* p<0,001 und \*\*\*\* p<0,0001

Wie in Abbildung 17 erkennbar ist, entwickeln sowohl die Wildtypen als auch die C3aR-Knockouts im Ang II-Hochdruckmodell einen signifikant erhöhten systolischen Blutdruck im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe. Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen Wildtyp-Gruppe und C3aR-Knockout nicht.



**Abbildung 18: C3aR – Kaplan-Meyer Kurve der Mäuse unter Ang II-Hochdruck.**

Dargestellt ist die Sterblichkeit der Kontrollgruppe mit insgesamt 17 Tieren, der hypertensiven Wildtypen mit 34 und der hypertensiven C3aR-defizienten Gruppe mit 45 Tieren. In der Kontrollgruppe gab es keine Tierverluste. Bis zum Ende der Versuche verstarben 40 % der hypertensiven Wildtypen und 51 % der hypertensiven C3aR-Knockouts. Die Sterblichkeit beider hypertensiver Versuchsgruppen ist signifikant höher zur normotensiven Kontrollgruppe. Untereinander besteht jedoch kein signifikanter Unterschied.

Die Mortalität ist in Abbildung 18 gezeigt. Diese umfasst in insgesamt 7 Versuchen 18 Kontrollen, 35 hypertensive Balb/c- und 45 hypertensive C3aR-defiziente Mäuse. In der normotensiven Kontrollgruppe wurde ein Tier exkludiert, da es an einer Pyelonephritis erkrankt war. In der Wildtypgruppe wurde ein Tier exkludiert, da die osmotische Ang II-

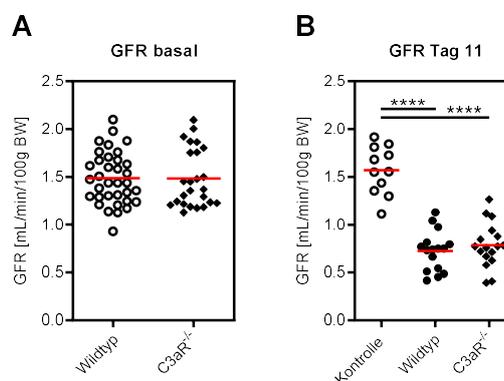
## Resultate

Pumpe nicht funktionierte und das Tier nicht krank wurde. Diese beiden Tiere wurden in allen anderen Analysen ebenfalls exkludiert.

In der hypertensiven Wildtyp-Gruppe verstarben 40 % der Tiere (16 Tiere) im Verlaufe des Versuches. Dies geschah zwischen dem 3. und dem 10. Tag nach Implantation der osmotischen Minipumpe. In der hypertensiven C3aR-Knockout-Gruppe verstarben 51 % der Tiere (25 Tiere). Hierbei wurden vermehrt Blutungen in Thorax und Abdomen sowie Nasenbluten festgestellt. Im Vergleich der beiden hypertensiven Versuchsgruppen miteinander ergibt der Log-Rank-Test keine signifikanten Unterschiede. Dieser besteht jedoch im Vergleich beider hypertensiven Gruppen mit der normotensiven Kontrollgruppe. Es liegt ein signifikant erhöhte Sterblichkeit beider hypertensiven Versuchsgruppen vor. Die Sterblichkeitskurven der Gruppen umfassen sowohl die Tötung von Tieren, gemäß der im Methodenteil erläuterten Abbruchkriterien, wie auch das Auffinden von toten Tieren.

### 4.1.2.1. Beurteilung renaler hypertensiver Organschäden im C3aR-Knockout unter Ang II-Hochdruck

Ein Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion ist die GFR. Sie kann non-invasiv bei Mäusen gemessen werden.



**Abbildung 19: C3aR – Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) unter Ang II-Hochdruck.**

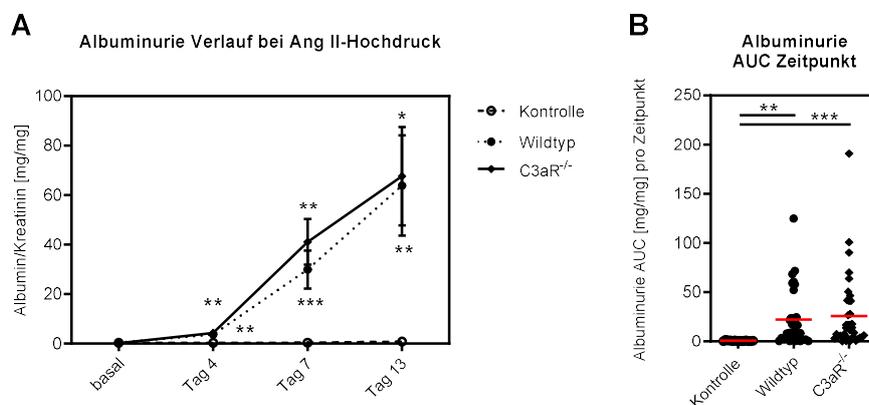
Dargestellt ist die glomeruläre Filtrationsrate welche (A) vor Beginn der Hochdruck-Induktion und (B) am Tag 11 nach Start der Ang II-Infusion bestimmt wurde. (A) Basal liegt sowohl bei den Wildtypen wie auch bei den C3aR<sup>-/-</sup>-Knockouts die mittlere GFR bei 1,48mL/min/100g BW. (B) Am Versuchsende ist die GFR bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen signifikant zur Kontrollgruppe abgefallen. Zwischen beiden hypertensiven Versuchsgruppen besteht kein signifikanter Unterschied. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*\*\*\* p≤0,0001

Laut Literatur liegt die physiologisch normale glomeruläre Filtrationsrate abhängig vom Mausstamm bei 1,0 bis 1,4 mL/min/100g BW (Schock-Kusch *et al.*, 2013). Vor Beginn der Hochdruck-Induktion unterscheidet sich die durchschnittliche basale GFR bei den Balb/c Wildtypen wie auch bei den C3aR-defizienten Tieren nicht, siehe Abbildung 19 (A). Bei beiden Gruppen liegt die mittlere GFR bei 1,48 mL/min/100g BW. Elf Tage nach Ang II-Infusionsbeginn zeigt sich bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen ein starker Abfall der

## Resultate

GFR, währenddessen die GFR der Kontrollgruppe annähernd gleich bleibt, siehe Abbildung 19 (B). Einen signifikanten Unterschied gibt es nur zwischen der Kontrollgruppe und den hypertensiven Versuchsgruppen, nicht zwischen den jeweiligen Hochdruck-Gruppen.

Die Albuminurie wird als ein weiterer Marker für die Beurteilung der Nierenschädigung im Rahmen der induzierten Hypertonie herangezogen. Hierbei werden Albumin und Kreatinin im Urin gemessen und der daraus bestimmte Quotient ergibt die Albuminurie. Die Messungen werden vor Beginn der Hochdruckinduktion und an den Tagen 4, 7 und 13 nach Implantation der mit Ang II befüllten osmotischen Minipumpe vorgenommen und im Verlauf und als AUC, dem Mittel der verschiedenen Zeitpunkte ab Tag 4 des Versuchs, dargestellt. Die AUC stellt hierbei die mittlere Veränderung der Albuminurie zwischen 2 Messzeitpunkten pro Mess-Zeitpunkt dar.



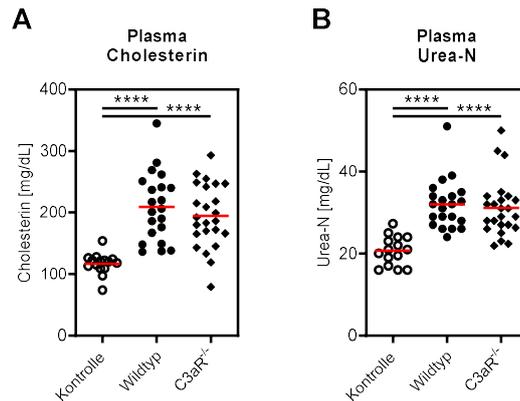
**Abbildung 20: C3aR – Verlauf und AUC der Albuminurie unter Ang II-Hochdruck.**

Dargestellt ist die Albuminurie als der durchschnittliche Quotient von Albumin und Kreatinin (A) Verlauf mit den SEM und als (B) AUC. Basal weisen weder Wildtyp- noch C3aR<sup>-/-</sup>-Mäuse Albumin im Urin auf. Bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen ist am Tag 4 nach Beginn der Ang II-Infusion ein leichter, aber signifikanter Anstieg der Albuminurie messbar. An Tag 7 nach Ang II-Induktion weisen die hypertensiven Versuchsgruppen einen deutlichen Anstieg der Albuminurie auf, der zum Ende des Versuchs weiter ansteigt. Der Unterschied zu beiden hypertensiven Gruppen ist ab Tag 4 signifikant. Die Unterschiede zwischen beiden hypertensiven Gruppen sind zu keinem Zeitpunkt signifikant. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \* p<0,05, \*\* p<0,005 und \*\*\* p<0,001

Die Kontrollgruppe weist über den Verlauf des gesamten Hochdruckmodells nur eine sehr geringe Albumin-Ausscheidung auf, siehe Abbildung 20. Sie liegt gleichbleibend unter 1mg/mg. Im Vergleich dazu steigen die Albuminurie-Werte beider hypertensiver Versuchsgruppen schon an Tag 4 der Ang II-Infusion signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe an. An Tag 7 ist ein deutlich erhöhter Albumin-Anstieg bei beiden Gruppen erkennbar, welcher sich zum Ende des Versuches noch einmal verdoppelt. Die Albuminurie Unterschiede beider hypertensiven Gruppen untereinander sind statistisch nicht signifikant.

Harnstoff (Urea-N) ist ein Parameter der Nierenfunktion. Wie Cholesterin, welches aufgrund der Albuminurie ansteigt, werden beide Parameter im Blutplasma bestimmt.

## Resultate



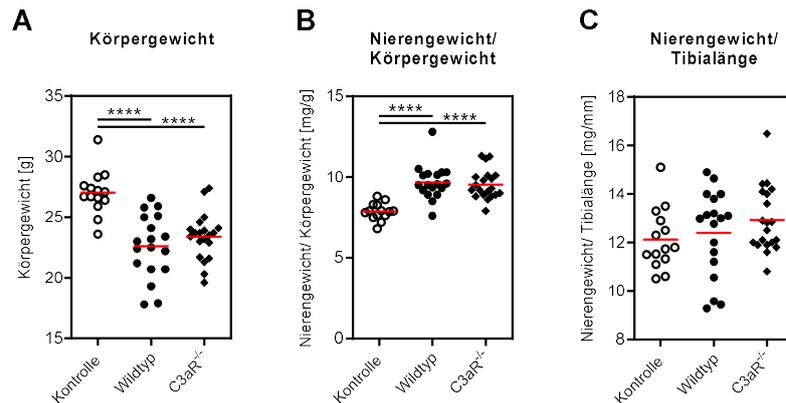
**Abbildung 21: C3aR – Blutplasmawerte von Cholesterin und Urea-N unter Ang II-Hochdruck.**

Dargestellt sind Plasma-Cholesterin- und Harnstoffwerte (Urea-N). (A) Die beide hypertensiven Versuchsgruppen weisen signifikant höhere Cholesterin-Werte im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen auf. (B) Auch die Harnstoffwerte beider Hochdruckgruppen sind im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht. Die Unterschiede zwischen beiden hypertensiven Versuchsgruppen sind nicht signifikant. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Der Plasma-Cholesterin-Spiegel steigt im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl bei der hypertensiven Wildtyp-Gruppe als auch bei der Knockout-Gruppe stark an, siehe Abbildung 21 (A). Auch die Harnstoffwerten (Urea-N) in Abbildung 21 (B) bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Zwischen den hypertensiven Gruppen lässt sich kein statistischer Unterschied feststellen.

Bei der Organentnahme wurden das Körpergewicht, das Nierengewicht und die Tibialänge bestimmt. Das Gewicht der Niere wird als Hypertrophie Parameter genutzt und wird in Bezug auf das Körpergewicht oder die Tibialänge angegeben. Hierbei ist zu beachten, dass das Nierengewicht bezogen auf das Körpergewicht stark abhängig vom Gewicht des Tieres ist. Vereinzelt Ödeme können diese Werte verzerren. Dies lässt sich umgehen, indem das Nierengewicht auf die Tibialänge bezogen wird. Die Tibialänge ist unabhängig vom Gesundheitszustand der Tiere. Hierbei können jedoch Mess- oder Präparierfehler der Tibia die Werte einzelne Werte leicht verzerren. Daher werden zur Beurteilung der renalen Hypertrophie beide Gewichte herangezogen.

## Resultate



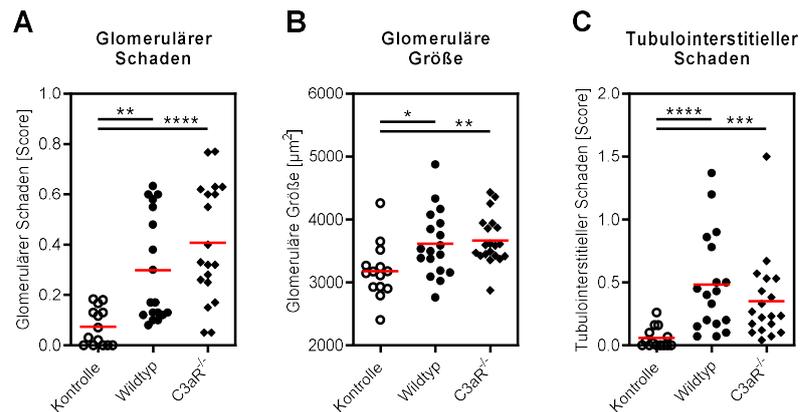
**Abbildung 22: C3aR – Körper- und Nierengewichte unter Ang II-Hochdruck.**

Dargestellt sind (A) Körpergewicht, (B) das Nierengewicht bezogen auf das Körpergewicht und (C) das Nierengewicht bezogen auf die Tibialänge. (A) Das Körpergewicht ist bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen signifikant niedriger. (B) Das Nierengewicht bezogen auf das Körpergewicht ist hingegen bei beiden Hochdruckgruppen signifikant erhöht. (C) Es besteht kein signifikanter Unterschied der Nierengewichte in Bezug auf die Tibialänge. Bei allen 3 Gewichten besteht kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und C3aR<sup>-/-</sup>-Gruppe. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Das Körpergewicht der Kontrollen ist im Vergleich mit beiden hypertensiven Versuchsgruppen signifikant höher, siehe Abbildung 22 (A). Die (B) Nierengewichte in Bezug auf das Körpergewicht sind bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen signifikant erhöht. Das (C) Nierengewicht in Bezug auf die Tibialänge ist bei allen drei Versuchsgruppen ähnlich. Signifikante Unterschiede zwischen den hypertensiven Gruppen bestehen nicht.

Um die Nephropathie beurteilen zu können, wird das Nierengewebe nach Beendigung des Versuches histologisch analysiert. Hierbei wird sowohl die Morphologie der renalen Schädigung, wie auch die Morphometrie histologischer Parameter berücksichtigt. Es erfolgt eine semiquantitative Beurteilung der glomerulären und tubulointerstitiellen Schäden, sowie die morphometrische Bestimmung der glomerulären Größe. Hypertensive glomeruläre Schäden können sich unter anderem in der Verbreiterung des Mesangiums, dem Verlust des kapillaren Lumens, und der Ablagerung von Kollagenen Strukturen äußern (Hill, 2008). Tubulointerstitielle Schäden reichen von dilatierten Tubuli, über tubuläre Proteinzyylinder und die Erweiterung des tubulointerstitiellen Raums bis hin zur Atrophie der Tubuli (Seccia *et al.*, 2017). Als Folge der Nephrektomie und der glomerulären Schädigungen, hypertrophieren die verbliebenen Glomeruli um zu hyperfiltrieren (Hill, 2008). Diese glomeruläre Größe lässt sich durch die morphometrische Bestimmung des glomerulären Tufts nachweisen.

## Resultate

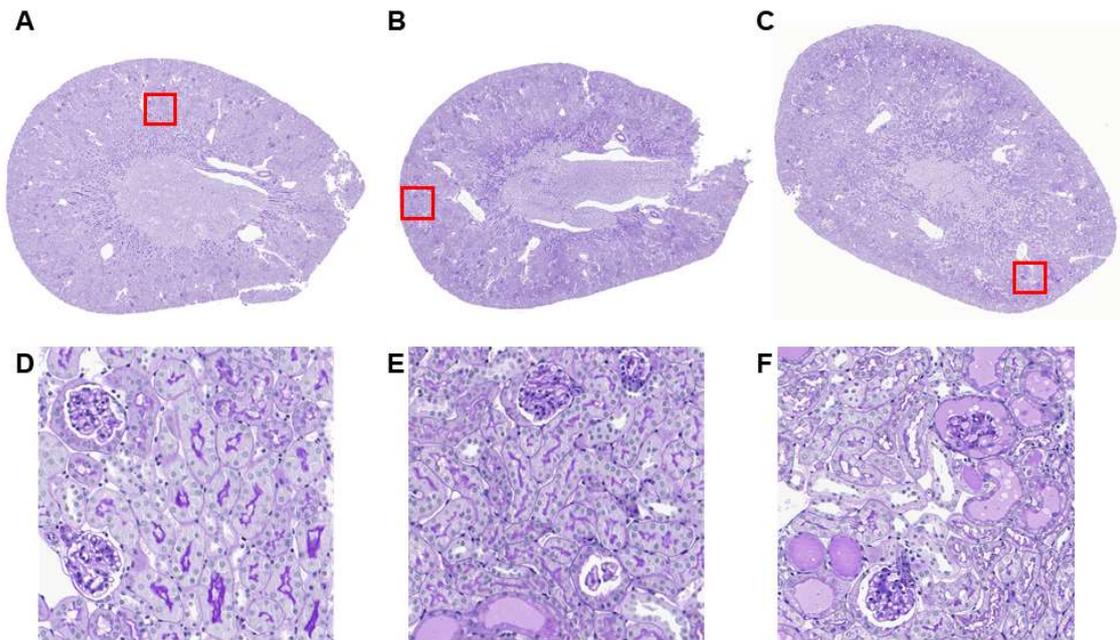


**Abbildung 23: C3aR – Histologische Beurteilung von Nierengewebe unter Ang II-Hochdruck.**

Dargestellt sind (A) die glomeruläre Schädigung, (B) die glomeruläre Größe und (C) der tubulointerstitielle Schaden. Alle drei histologischen Parameter zeigen im einen signifikanten Anstieg unter Hochdruckbedingungen. Hierbei gibt es jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden hypertensiven Versuchsgruppen. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Die Auswertung der Nierenhistologien ergibt einen signifikant erhöhten Anstieg des glomerulären Schadens (Abbildung 23 (A)) sowohl bei den hypertensiven Wildtypen, als auch bei den hypertensiven C3aR-defizienten Mäusen im Unterschied zur Kontrollgruppe. Wie in Abbildung 24 (E) und (F) zu erkennen ist, weisen die hypertensiv geschädigten Glomeruli eine Abnahme des Kapillarvolumens mit einhergehender Zunahme des Mesangiums (größere PAS-positive Flächen) auf. Der Anstieg des glomerulären Schadens spiegelt sich zudem in der glomerulären Größe wieder, siehe Abbildung 23 (B). Unter Hochdruckbedingungen hypertrophieren die Glomeruli der Wildtyp- und der Knockout-Gruppe signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch der tubulointerstitielle Schaden steigt unter Hochdruck signifikant an, siehe Abbildung 23 (C). Die Kontrollen weisen kaum tubulointerstitielle Veränderungen auf, wo hingegen die beiden Hochdruckgruppen deutliche Veränderungen zeigen. Dieser Anstieg an tubulointerstitiellen Veränderungen ist in Abbildung 24 (E) und (F) deutlich in Form der dilatierten Tubuli und Proteinzyylinder in den Tubuli und Glomeruli erkennbar. Zwischen beiden hypertensiven Versuchsgruppen ist bei allen 3 Parametern kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

## Resultate



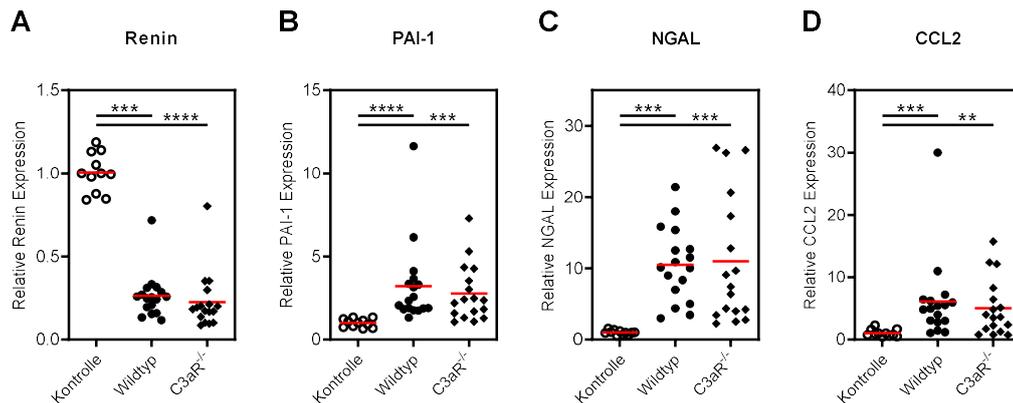
**Abbildung 24: C3aR – PAS-gefärbte Nierenhistologien im Ang II-Hochdruckmodell.**

Dargestellt sind PAS-gefärbte Nierenschnitte (A)+(D) einer Kontrolle, (B)+(E) einem hypertensiven Wildtypen und (C)+(F) einem hypertensiven C3aR-Knockout im Ang II-Hochdruckmodell. (A)+(D) Die Niere ist unauffällig mit einer normalen glomerulären Architektur und klar erkennbaren Kapillaren, das Lumen der Tubuli ist klein und der interstitielle Raum ist kaum vorhanden. (B), (C), (E) und (F) Die Niere weist vergleichbare Schäden auf. Die Glomeruli zeigen stark PAS-positive Areale auf, das Kapillar-Lumen ist sehr viel geringer, das Mesangium ist expandiert. Die Tubuli sind dilatiert, Proteinzyylinder sind vorhanden und der interstitielle Raum ist leicht verbreitert.

Ein weiterer Parameter zur Beurteilung der hypertensiven renalen Schädigungen ist die Analyse der Expression diverser Gene mittels quantitative Real-Time PCR (qPCR). Hierzu zählen Renin, PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1), NGAL (Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin), CCL2 (CC-Chemokin-Ligand-2), Kollagen I und Kollagen III.

Renin ist Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und dient der Regulation des Blutdrucks. Im Falle des Ang II-Hochdruckmodells, dient es als indirekte Kontrolle der erfolgreichen Ang II-Infusion mittels der osmotischen Minipumpen. Unter Ang II-Infusion wird Renin aufgrund der negativen Rückkopplung im RAAS supprimiert. Dies lässt sich in Abbildung 25 (A) erkennen. Beide hypertensiven Versuchsgruppen weisen eine signifikant niedrigere Expression von Renin im Vergleich zur Kontrolle auf.

## Resultate



**Abbildung 25: C3aR – Quantitative Real-Time PCR von Nierengewebe unter Ang II-Hochdruck.**

Dargestellt ist die relative Gen-Expression diverser Gene in der Niere. (A) Renin ist signifikant in beiden hypertensiven Versuchsgruppen supprimiert. (B) PAI-I, wie auch (C) NGAL und (D) CCL2 werden unter Hochdruck signifikant vermehrt exprimiert. Keine statistischen Unterschiede sind bei allen Vergleichen zwischen hypertensiven Wildtypen und hypertensiven C3aR-Knockout feststellbar. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*\*  $p \leq 0,005$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

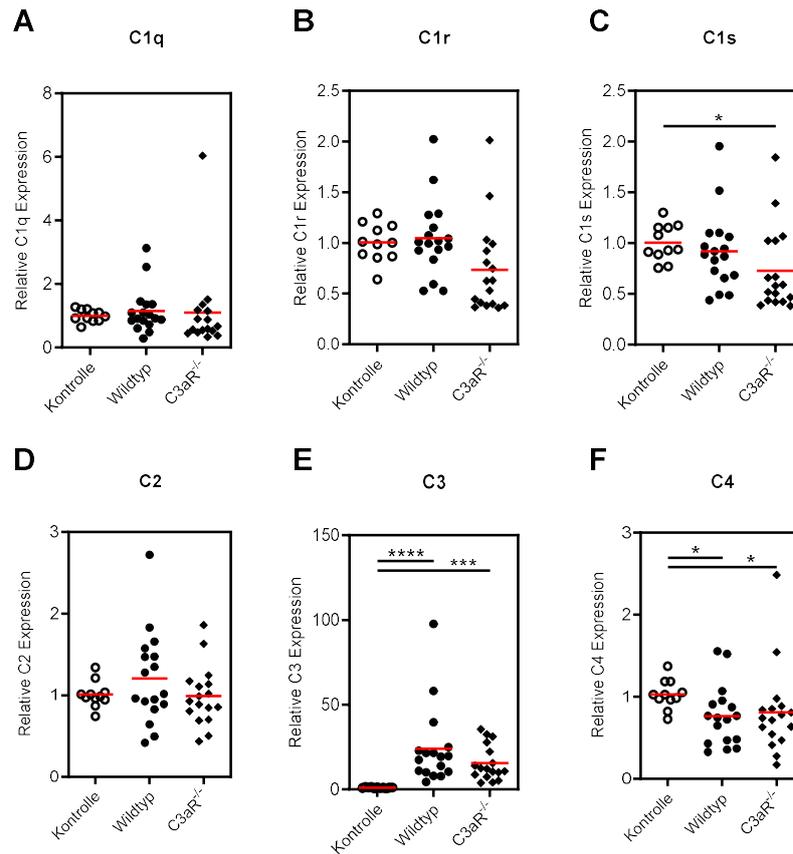
PAI-1 ist Teil der Serin-Proteinase-Inhibitoren und kann zu den pro-fibrotischen Enzymen gezählt werden (Ghosh *et al.*, 2012). In fibrotischen Gewebe ist PAI-1 erhöht, wodurch die proteolytischen Vorgänge im Gewebe inhibiert und Kollagene nicht degradiert werden. Unter Ang II-Hochdruck lässt sich ein signifikanter Anstieg von PAI-1 in beiden Hochdruckgruppen im Vergleich zu den Kontrollen verzeichnen, siehe Abbildung 25 (B). Der Unterschied zwischen beiden Hochdruck-Gruppen ist nicht signifikant.

NGAL gilt als Marker für eine akute Nierenschädigung (Shang *et al.*, 2017) und ist in beiden hypertensiven Versuchsgruppen signifikant erhöht. Wo hingegen zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede feststellbar sind, siehe Abbildung 25 (C).

CCL2 gehört in die Familie der CC-Chemokine und wird mit der Pathogenese diverser Krankheiten in Verbindung gebracht. Es zieht Monozyten an und aktiviert diese (Palomino *et al.*, 2015), wodurch es zu den pro-inflammatorischen Markern gezählt werden kann. Unter Ang II-Hochdruckbedingungen wird CCL2 in der hypertensiven Wildtyp-Gruppe und in der C3aR-Knockout-Gruppe signifikant höher exprimiert. Zwischen beiden Hochdruck-Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied.

Als nächstes wurden die Expressionen von Komplementfaktoren in der Niere analysiert. Für die klassische Aktivierung wurden die Faktoren C1q, C1r und C1s gemessen. Auch wurden die Komplementfaktoren C2 und C4 gemessen, da sie sowohl im klassischen, wie auch beim Lektin-Weg eine Rolle spielen (Krishnan *et al.*, 2009). Ebenfalls wurde der Komplementfaktor C3 gemessen, da er eine zentrale Rolle sowohl in der alternativen Aktivierung wie auch in der klassischen und der Lektin-Aktivierung spielt (Ricklin *et al.*, 2016).

## Resultate



**Abbildung 26: C3aR – Komplementfaktoren in der Niere unter Ang II-Hochdruck.**

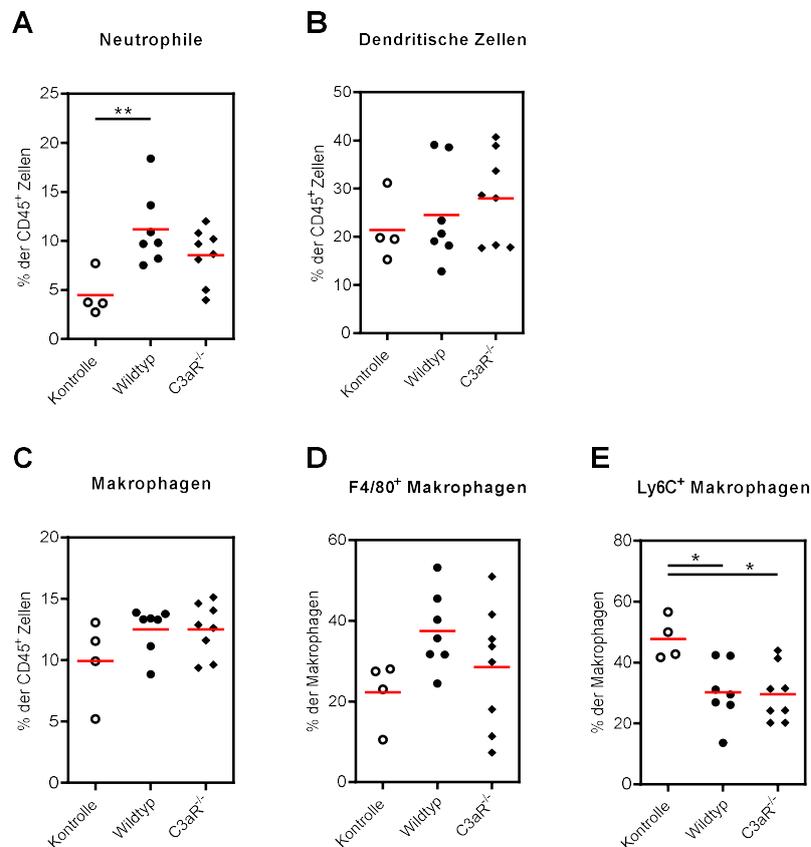
Dargestellt ist die relative Gen-Expression von Komplementfaktoren in der Niere. (A) Die Expression von C1q unterscheidet sich in den hypertensiven Versuchsgruppen nicht von den Kontrollen. (B) C1r ist im C3aR-Knock tendenziell erniedrigt. (C) Komplementfaktor C1s ist in der C3aR<sup>-/-</sup>-Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringert. (D) der Komplementfaktor C2 wird nicht reguliert. In beiden hypertensiven Versuchsgruppen ist (E) C3 signifikant erhöht und (F) C4 signifikant erniedrigt. Ein statistischer Unterschied zwischen hypertensiver Wildtyp- und C3aR-Knockout-Gruppe besteht bei allen Faktoren nicht. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \* p<0,05, \*\*\* p≤0,001 und \*\*\*\* p≤0,0001

Die Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungs-Weges zeigen kaum Veränderung in der Gen-Expression. C1q (Abbildung 26 (A)) wird in allen drei Versuchsgruppen ähnlich exprimiert. Gleiches gilt für C2, siehe Abbildung 26 (D). Die hypertensive C3aR-defizienten Mäuse exprimieren C1r tendenziell und C1s signifikant weniger im Vergleich zur Kontrollgruppe, siehe Abbildung 26 (B) + (C). C3 wird hingegen unter Hochdruck bei beiden Versuchsgruppen vermehrt exprimiert, siehe Abbildung 27 (E). C4 ist bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen signifikant gemindert, Abbildung 27 (F). Die Unterschiede zwischen den beiden Hochdruck-Gruppen sind bei keinem Faktor signifikant.

Zuletzt wurde das Nierengewebe immunologische mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierfür wurden Leukozyten aus dem Nierengewebe isoliert und für die Analyse myeloider bzw. lymphozytärer Zellen gefärbt. Da sowohl die Konfokalmikroskopie, wie auch die Durchflusszytometrie der tdTomato-C3aR Maus den C3a Rezeptor vor allem auf myeloiden Zellen nachgewiesen hat, liegt der Schwerpunkt dieser Auswertung auf dem Monozyten-

## Resultate

Makrophagen Panel. Die Auswertung der Lymphozyten ist im Anhang (ab Seite 122) zu finden.



**Abbildung 27: C3aR – Durchflusszytometrische Analyse des Monozyten-Makrophagen-Panels im Ang II Modell.**

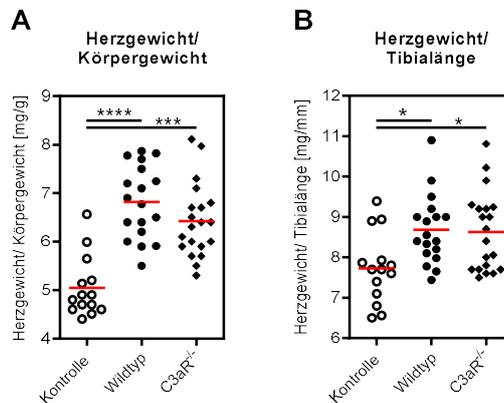
Dargestellt ist die Häufigkeit von (A) Neutrophile Granulozyten, (B) Dendritischen Zellen und (C) Makrophagen relative bezogen auf CD45<sup>+</sup> Zellen und den (D) F4/80<sup>+</sup> und (E) Ly6C<sup>+</sup> Makrophagen relative bezogen auf die Makrophagen. (A) Hypertensive Wildtypen weisen signifikant und die hypertensiven C3aR-Knockouts tendenziell mehr Neutrophile auf. Keinerlei signifikante Unterschiede bestehen bei der Anzahl der (B) Dendritischen, (C) Makrophagen und (D) F4/80<sup>+</sup> Makrophagen. (E) Bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen ist die Anzahl an Ly6C<sup>+</sup> Makrophagen signifikant gemindert. Nicht signifikant sind die Unterschiede zwischen den beiden Hochdruck-Gruppen. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \* p<0,05 und \*\* p<0,005

Wie in Abbildung 27 (A) zu erkennen ist, nimmt die Anzahl an Neutrophile Granulozyten bei den hypertensiven Wildtypen signifikant und bei den hypertensiven C3aR-Knockouts tendenziell im Vergleich zur Kontrollgruppe zu. Im Vergleich dazu sind weder bei den Dendritischen Zellen (DC abgekürzt) (Abbildung 27 (B)), noch bei den allgemeinen Makrophagen (Abbildung 27 (C)) oder den F4/80<sup>+</sup> Makrophagen (Abbildung 27 (D)) signifikante Veränderungen erkennbar. Einzig die die Ly6C<sup>+</sup> Makrophagen sind in beiden hypertensiven Versuchsgruppen signifikant vermindert, siehe Abbildung 27 (E). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Hochdruck-Gruppen sind bei allen 5 Zellpopulationen nicht vorhanden.

## Resultate

### 4.1.2.2. Beurteilung kardialer hypertensiver Organschäden im C3aR-Knockout unter Ang II-Hochdruck

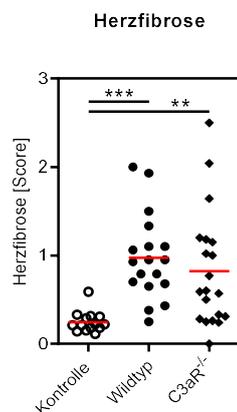
Um die Rolle des C3aR bei hypertensiven kardialen Schäden beurteilen zu können, werden wie bei der Niere Organgewichte, Histologien und die Expression von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Gene analysiert.



**Abbildung 28: C3aR – Herzgewichte unter Ang II-Hochdruck.**

Dargestellt sind (A) das Herzgewicht bezogen auf das Körpergewicht und (B) das Herzgewicht bezogen auf die Tibialänge. (A) + (B) Das Herzgewicht beider hypertensiver Gruppen ist bezogen auf das Körpergewicht und auf die Tibia signifikant erhöht. Ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und C3aR<sup>-/-</sup>-Gruppe besteht nicht. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Wie bei der Niere, gibt das Gewicht des Herzens Aufschluss über eine Schädigung des Gewebes. Hierfür wurde das Gewicht des Herzens in Bezug zum Körpergewicht und zur Tibialänge gesetzt. Wie in Abbildung 28 (A) zu erkennen ist, ist das Herzgewicht beider hypertensiver Versuchsgruppen sowohl in Bezug auf das Körpergewicht als auch auf die Tibialänge signifikant erhöht. Signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen bestehen nicht.

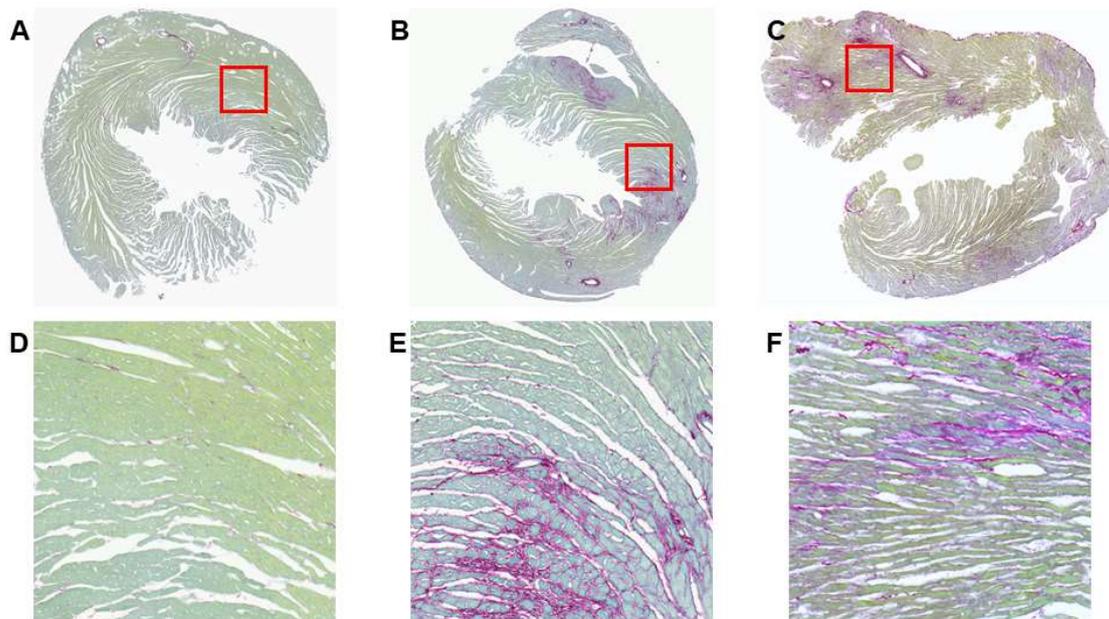


**Abbildung 29: C3aR – Semiquantitative Beurteilung kardialer Fibrose unter Ang II-Hochdruck.**

Dargestellt ist die semiquantitativ bestimmte Fibrose des kardialen Gewebes, welche sowohl beim hypertensiven Wildtypen, als auch beim hypertensiven C3aR-Knockout signifikant ansteigt. Unterschiede zwischen den beiden hypertensiven Versuchsgruppen sind nicht signifikant. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*\*  $p \leq 0,005$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$

## Resultate

Als weiterer Parameter für die kardiale Schädigung gilt die mikroskopische semiquantitative Analyse der Fibrose im Myokard-Gewebe. Wie in Abbildung 29 zu erkennen ist, ist die Menge an Kollagenen Fasern im Myokard sowohl bei den hypertensiven Wildtypen, als auch bei den hypertensiven C3aR-Knockouts im Vergleich zu den Kontrollen deutlich angestiegen und kann als Fibrose erachtet werden. Quantitativ sind keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Hochdruck-Gruppen erkennbar.



**Abbildung 30: C3aR – SRFG-gefärbte Herzhistologien im Ang II-Hochdruckmodell.**

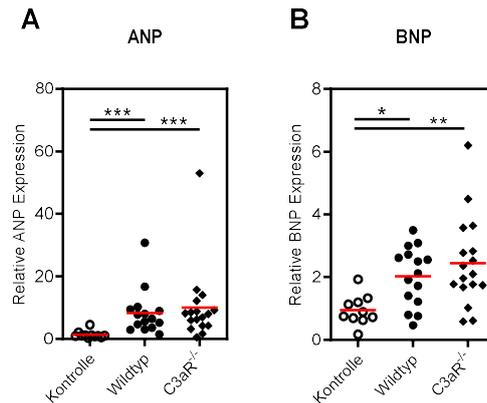
Dargestellt sind SRFG-gefärbte Herzschnitte von (A)+(D) einer Kontrolle, (B)+(E) einem hypertensiven Wildtypen und (C)+(F) einem hypertensiven C3aR-Knockout im Ang II-Hochdruckmodell. (A) Das Herzgewebe weist ein regelmäßiges Myokard mit sehr geringem Anteil an Kollagenfasern auf. (B)+(C) Die Vernarbungen der des Myokards sind deutlich vom intakten Myokard-Gewebe abgegrenzt. (E)+(F) Morphologisch beginnt die septenartige Fibrosierung an abgegrenzten Bereichen flächenartige Vernarbungen zu bilden.

Morphologisch sind die fibrotischen Bereiche des im Ang II Modells geschädigten Myokards bei beiden Versuchsgruppen deutlich abgrenzbar. Stellenweise geht die septenartige Fibrose zu einer flächigen Fibrose über. Das Myokard der Kontrollgruppe weist nur vereinzelte Kollagene Fasern auf, die vor allem intrakardiale Gefäße zu finden sind, siehe Abbildung 30.

Wie auch bei der Niere, wird die hypertensive kardiale Schädigung darüber hinaus mittels quantitative Real-Time PCR Analyse beurteilt. Hierbei wird die Expression von ANP (Atriales natriuretisches Peptid) und BNP (B-Typ natriuretisches Peptid) betrachtet.

ANP ist ein kardiales Hormon, welches sowohl Einfluss auf die Vasodilation als auch auf die Natriuresis hat (Cannone *et al.*, 2019). Unter Ang II-Hochdruckbedingungen wird es sowohl bei der Wildtyp-Gruppe, als auch bei der C3aR-Knockout-Gruppe signifikant hochreguliert, siehe Abbildung 31 (A).

## Resultate



**Abbildung 31: C3aR – Quantitative Real-Time PCR von Herzgewebe unter Ang II-Hochdruck.**

Dargestellt ist die relative Gen-Expression diverser Gene im Herzen. (A) + (B) ANP und BNP werden unter Hochdruck sowohl in der hypertensiven Wildtyp-Gruppe, als auch in der hypertensiven Knockout-Gruppe signifikant hochreguliert. Keinerlei signifikante Unterschiede bestehen bei allen Vergleichen zwischen den hypertensiven Versuchsgruppen. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$

BNP gilt als klinischer Marker für Herzinsuffizienz und kardiale Hypertrophie. Es ist wie ANP ein kardiales Peptid und spielt eine wichtige Rolle bei kardio-renalen Interaktion (Okamoto *et al.*, 2019). Im Ang II-Hochdruckmodell ist BNP bei beiden hypertensiven Gruppen signifikant erhöht, siehe Abbildung 31 (B).

Zusammengefasst ist zu sagen, dass unter Ang II-Infusion sowohl Wildtypen als auch C3aR-Knockouts einen vergleichbaren Hypertonus entwickeln. Unter Ang II-Hochdruck ist die Mortalität beider Hochdruckgruppen ähnlich hoch. Die GFR sinkt bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen gleich stark ab. Des Weiteren entwickeln beide Gruppen unter Ang II-Hochdruck eine vergleichbar hohe Albuminurie. Plasma-Cholesterin und Plasma-Harnstoff steigen ebenfalls vergleichbar an. Außerdem verlieren beide Hochdruckgruppen ähnlich an Körpergewicht und weisen vergleichbar angestiegene Nierengewichte. Der renale histologische Schaden ist ebenfalls bei beiden Gruppen vergleichbar erhöht. In der renalen quantitativen Real-Time PCR zeigen beide Hochdruckgruppen niedrigere Renin-Werte. Die Werte für PAI-I, NGAL, CCL2 und C3 steigen an. Die Werte für C1q, C1r, C1s, C2 und C4 sind annähernd unverändert im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen. In der Durchflusszytometrie weisen die hypertensiven Wildtypen mehr Neutrophile Granulozyten im Vergleich zu den Knockouts und den Kontrollen auf. Bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen ist die Anzahl der Ly6C<sup>+</sup> Makrophagen erniedrigt. Unter Ang II-Hochdruck steigt bei beiden Versuchsgruppen das Herzgewicht an. Außerdem zeigen beide Gruppen deutliche Fibrosen des Myokards. Die kardiale Gen-Expression von ANP und BNP ist bei beiden Hochdruckgruppen erhöht.

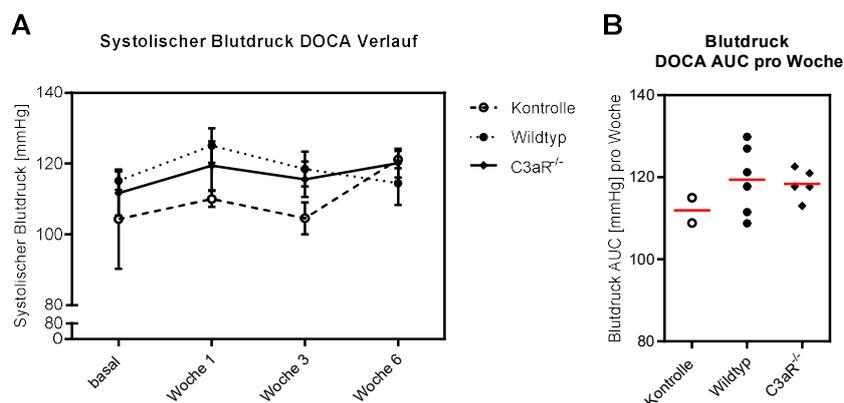
## Resultate

### 4.1.3. C3aR Rezeptor (C3aR) im DOCA-Salz Modell

Um die Frage der Rolle von C3aR bei Hypertonie und den daraus resultierenden hypertensiven Endorganschäden besser beurteilen zu können, wurde ein weiteres Hypertonie-Modell – das DOCA-Salz Modell – bei der C3aR-defizienten Maus angewandt. Im Gegensatz zum Ang II Modell wird beim DOCA-Salz Modell der Hochdruck durch die Implantation von DOCA-Pellets induziert. Diese Pellets geben über 21 Tage kontinuierlich DOCA ab. Aufgrund der Versuchsdauer von insgesamt 6 Wochen erfolgt 3 Wochen nach Implantation des ersten Pellets, die Implantation eines weiteren Pellets (im Folgenden Pellet-Wechsel genannt). Dies wird bei der Messung der Hochdruck-Beurteilungs-Parameter (GFR, Albuminurie, Blutplasma-Werte, Organgewichte, Histologie, systolischer Blutdruck, Expression von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Genen (qPCR), Sterblichkeit) berücksichtigt.

In 2 Versuchen wurden insgesamt 24 Tiere in drei Versuchsgruppen (4 Kontrollen, 11 Wildtypen, 9 C3aR-Knockouts) verwendet. Auch bei diesen Versuchen waren Analyse-Schwerpunkte und Zielparameter unterschiedlich, wodurch die Tierzahlen bei den einzelnen Analysen variieren. Wie beim vorherigen Versuchsmodell, wurde für die Verlaufs-Parameter vor Beginn der Hochdruck-Induktion eine basale Bestimmung vorgenommen. Da sich, wie auch in vorangegangenen Versuchen die Kontrolltiere nicht von den späteren hypertensiven Wildtypen unterscheiden, wurden wieder beide Gruppen als Gruppe „Wildtyp“ in der Basalbestimmung zusammengefasst.

Der Blutdruck wurde vor Beginn des Versuches und ab Induktion in Woche 1, 3, und 6 non-invasiv via Tail-cuff-Methode gemessen.



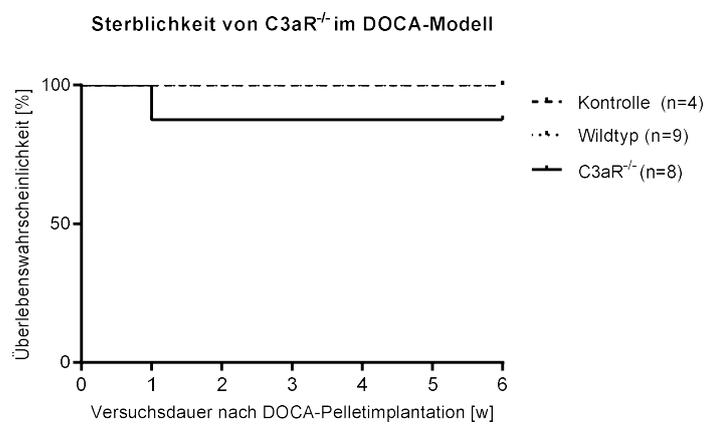
**Abbildung 32: C3aR – Systolischer Blutdruck im DOCA-Hochdruck.**

Dargestellt ist der durchschnittliche systolische Blutdruck und der SEM. Der Blutdruck ist vor Beginn der Versuche bei allen Tieren vergleichbar. Ab Woche 1 der DOCA-Hypertonie ist der systolische Blutdruck beider hypertensiven Versuchsgruppen erhöht und ist in Woche 1 bei den Wildtypen und in Woche 2 bei den Knockouts signifikant höher im Vergleich zu den Kontrollen. Zum Ende des DOCA-Salz Modells sinken bei beiden Hochdruck-Gruppen die systolischen Blutdrücke ab. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden hypertensiven Gruppen besteht nicht

## Resultate

Die systolische Blutdruckmessung, siehe Abbildung 32, sowohl der Kontrollen als auch der Wildtypen und C3aR-Knockouts war basal im vergleichbaren Bereich. (A) Im Verlaufe des DOCA Modells verändert sich der Blutdruck nicht. (B) Die AUC pro Woche ist bei den Wildtypen und den C3aR-Knockouts leicht erhöht.

Für die Berechnung der Sterblichkeit nach Kaplan-Meyer wurden 4 Kontrollen, 9 Wildtypen und 8 Knockouts berücksichtigt, siehe Abbildung 33. Die Sterblichkeitskurven der Gruppen umfassen sowohl die Tötung von Tieren, gemäß der im Methodenteil erläuterten Abbruchkriterien, wie auch das Auffinden von toten Tieren. 2 Wildtypen und 1 Knockout wurden aufgrund eines Pelletdurchbruchs nicht bei der Mortalität berücksichtigt.



**Abbildung 33: C3aR – Kaplan-Meyer-Kurve der C3aR-defizienten Mäuse im DOCA Hochdruckmodell.**

Dargestellt ist die Sterblichkeit der Versuchstiere im DOCA-Salz Modell. Es wurden 4 Kontrollen, 9 hypertensive Wildtypen und 8 hypertensive C3aR-Knockouts berücksichtigt. Im Verlauf des Modells verstarb nur 1 Tier in der hypertensiven Knockout-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen keiner Versuchsgruppe.

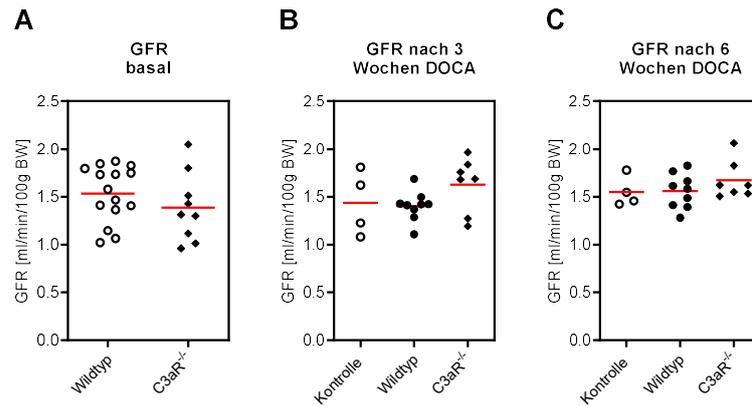
Im Verlaufe des DOCA-Salz Modells verstarb nur in der C3aR-Knockout-Gruppe 1 von 9 Tieren (11,1 %). In der Kontrollgruppe und hypertensiven Wildtyp-Gruppe gab es keine Verluste. Eine Signifikanz besteht zwischen keiner der 3 Versuchsgruppen.

### 4.1.3.1. Beurteilung renaler hypertensiver Organschäden im C3aR-Knockout unter DOCA-Hochdruck

Um die renalen hypertensiven Organschäden im DOCA-Salz Modell zu beurteilen wird die GFR herangezogen. Diese wurde im vor Beginn der Hochdruck-Induktion kurz vor dem Wechsel des DOCA-Pellets und kurz vor Ende des Modells gemessen.

Im DOCA-Salz Modell sind die basalen GFR, siehe Abbildung 34, der Wildtypen und Knockouts im Mittel vergleichbar. Auch nach 3 Wochen DOCA-Hypertonie verbleibt die durchschnittliche GFR der hypertensiven Wildtypen und Knockouts auf Höhe der Kontrollen. Dies ändert sich auch zum Ende des Hochdruckmodells nicht. Signifikant ist keiner der Unterschiede.

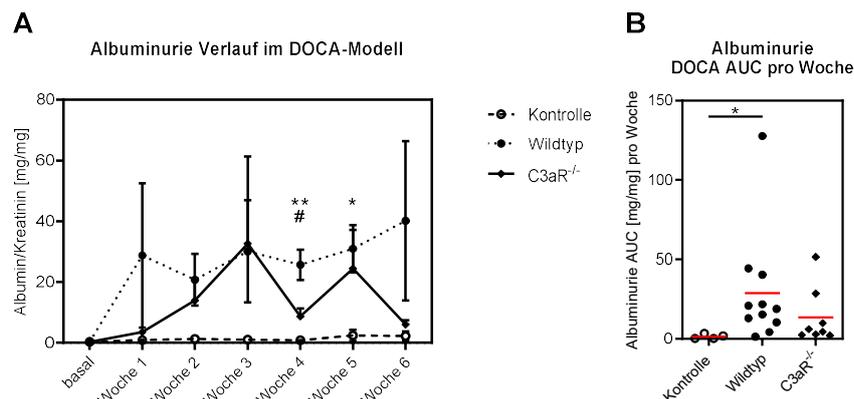
## Resultate



**Abbildung 34: C3aR – Glomeruläre Filtrationsrate im DOCA-Salz Modell.**

(A) Basal wie auch (B) nach drei Wochen bzw. (C) nach 6 Wochen DOCA-Hochdruck verändert sich die GFR der hypertensiven Wildtypen und Knockouts nicht im Vergleich zu den Kontrollen.

Die Albuminurie wurde wie im Ang II Modell als Quotient des Albumins und des Kreatinins bestimmt. Die Bestimmung erfolgte basal und dann wöchentlich.



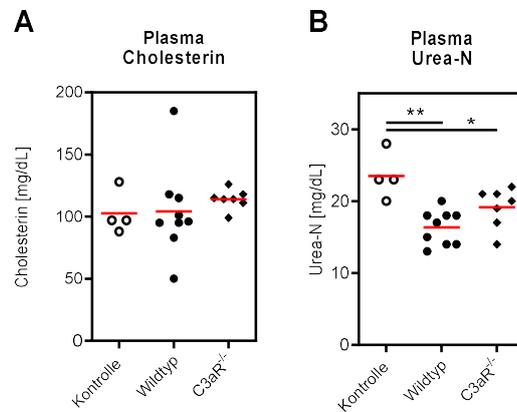
**Abbildung 35: C3aR – Albuminurie im Verlauf und als AUC im DOCA-Salz Modell.**

Dargestellt ist die Albuminurie (A) im Verlauf als durchschnittlicher Quotient von Albumin und Kreatinin mit SEM und (B) als AUC pro Woche. Basal weist keine Versuchsgruppe eine Albuminurie auf. Beide hypertensive Versuchsgruppen entwickeln ab der ersten Woche nach DOCA-Pellet-Implantation eine Albuminurie. In der vierten Woche des Modells, weisen die hypertensiven Wildtypen im Vergleich zur Kontroll- wie auch zur C3aR-Knockout-Gruppe eine signifikant höhere Albuminurie auf. Dieser Unterschied ist gleich sich ab Woche 5 bis zum Ende des Versuchs in Woche 6 wieder an. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p \leq 0,005$ , Wildtyp vs. C3aR<sup>-/-</sup>: #  $p < 0,05$

Wie in Abbildung 35 zu erkennen ist, sind vor Beginn der Hochdruckinduktion alle 3 Versuchsgruppen nicht albuminurisch. Ab Woche 1 des DOCA-Salz Modells steigt in den hypertensiven Versuchsgruppen die Albuminurie an. In Woche 4 des Versuches ist der Anstieg in den hypertensiven Wildtypen signifikant höher als im Vergleich zu den Kontrollen und den hypertensiven C3aR-Knockouts. Dieser Unterschied ist ab Woche 5 nur noch im Vergleich zu den Kontrollen und ab Woche 6 gar nicht mehr signifikant.

## Resultate

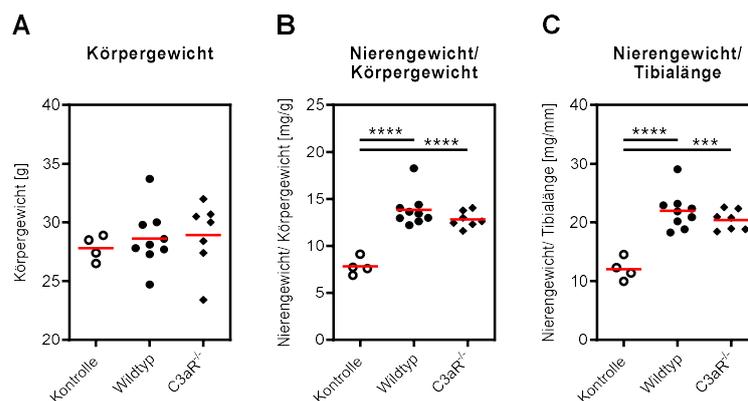
Die Harnstoff-Werte sind in beiden hypertensiven Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrolle signifikant niedriger. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden hypertensiven Versuchsgruppen besteht nicht, Abbildung 36.



**Abbildung 36: C3aR – Blutplasmawerte Urea-N unter DOCA-Hochdruck.**

Unter DOCA-Bluthochdruck sind die Harnstoffwerte der hypertensiven Wildtypen und Knockouts im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erniedrigt. Die Unterschiede zwischen beiden hypertensiven Gruppen nicht signifikant. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,005$

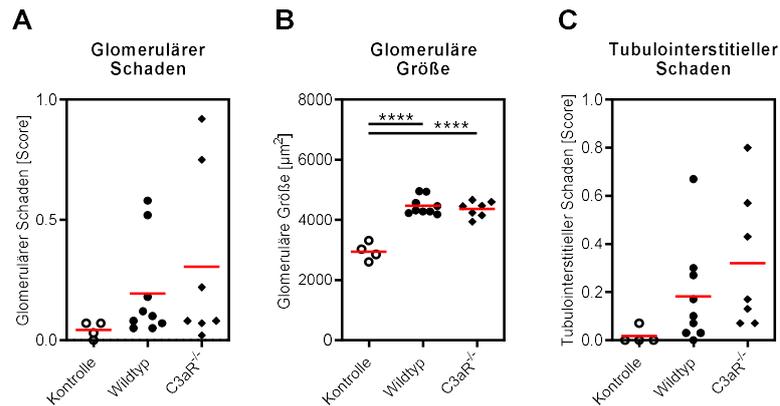
In Abbildung 37 ist zu erkennen, dass die Körpergewichte (A) der Tiere aller 3 Versuchsgruppen zum Ende des Versuches annähernd gleich sind. Das Nierengewicht ist sowohl im Verhältnis (B) zum wie auch (C) zur Tibialänge in beiden hypertensiven Versuchsgruppen signifikant erhöht. Einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden hypertensiven Gruppen gibt es nicht.



**Abbildung 37: C3aR – Körper- und Nierengewichte unter DOCA-Hochdruck.**

Das Körpergewicht der Tiere nach 6 Wochen DOCA-Hochdruck zeigt keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Sowohl das (B) Nierengewicht bezogen auf das als auch (C) das Nierengewicht bezogen auf die Tibialänge sind unter DOCA-Bluthochdruck signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zwischen den hypertensiven Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*\*\*  $p < 0,001$  und \*\*\*\*  $p < 0,0001$

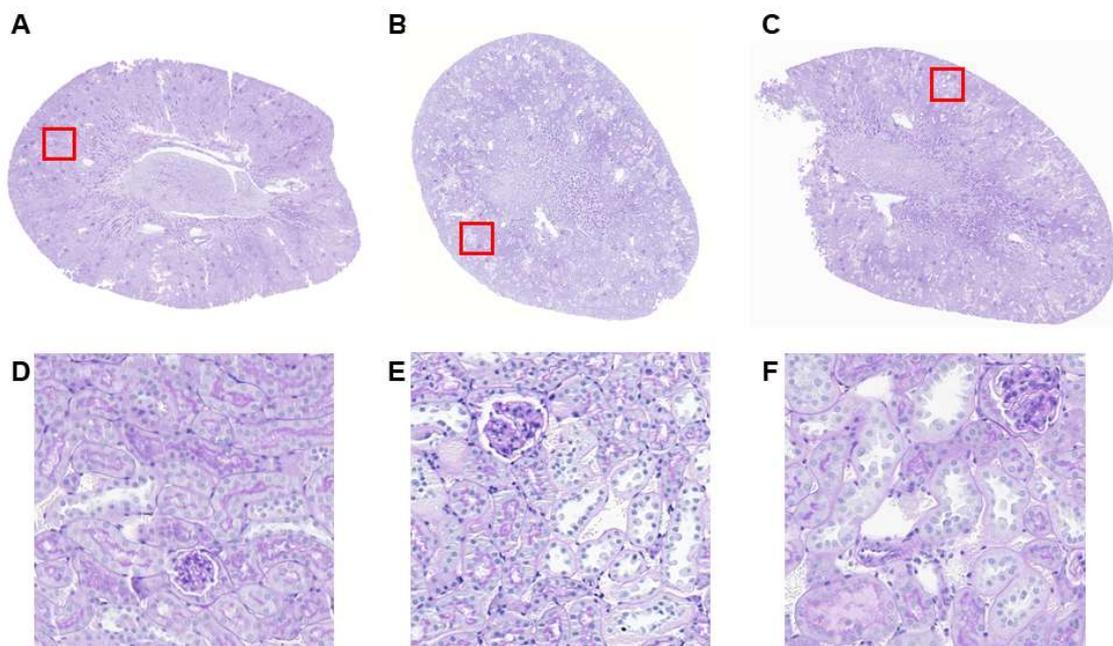
## Resultate



**Abbildung 38: C3aR – Histologische Beurteilung von Nierengewebe unter DOCA-Hochdruck.**

Dargestellt sind (A) die glomeruläre Schädigung, (B) die glomeruläre Größe und (C) der tubulointerstielle Schaden im DOCA-Salz Modell. Einzig die (B) glomeruläre Größe ist bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen signifikant erhöht. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden hypertensiven Versuchsgruppen bestehen nicht. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Wie in Abbildung 38 (B) zu erkennen ist, ist die histologische Schädigung nur in Form der durchschnittlichen glomerulären Größe in den hypertensiven Versuchsgruppen signifikant erhöht.

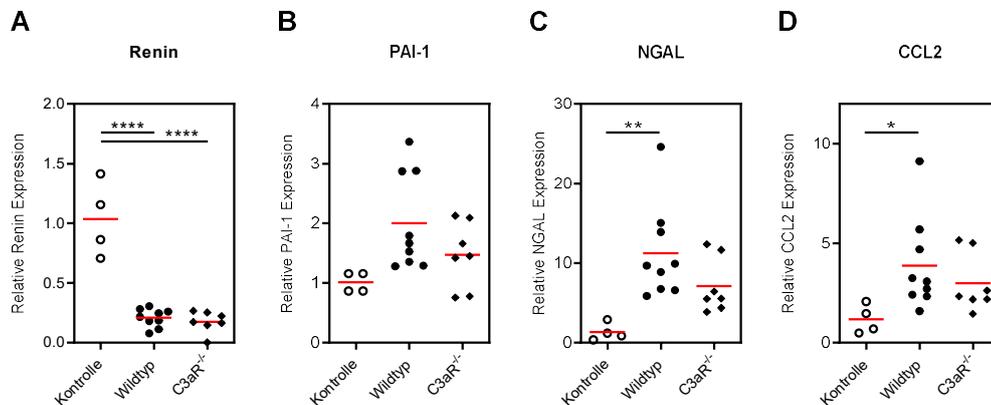


**Abbildung 39: C3aR – PAS-gefärbte Nierenhistologien im DOCA-Salz Modell.**

Dargestellt sind PAS-gefärbte Nierenschnitte (A)+(D) einer Kontrolle, (B)+(E) eines hypertensiven Wildtyps und (C)+(F) eines hypertensiven C3aR-Knockouts im DOCA-Salz Modell. (A)+(D) Die Niere weist eine normale glomerulären Architektur mit klar erkennbaren Kapillaren und geringem Tubulilumen auf. (B) bis (F) Die Nieren weisen vergleichbare Schäden auf. Die Glomeruli zeigen stark PAS-positive Areale auf, das Kapillar-Lumen ist viel geringer, das Mesangium ist expandiert. Die Tubuli sind dilatiert, Proteinzyliinder sind vereinzelt vorhanden und der interstitielle Raum ist leicht verbreitert.

## Resultate

Der glomeruläre und der tubulointerstitielle Schaden ist in den hypertensiven Versuchsgruppen bei einzelnen Glomeruli und dilatierten Tubuli erkennbar, siehe Abbildung 39 (E) und (F). Diese Parameter sind jedoch nicht signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle.

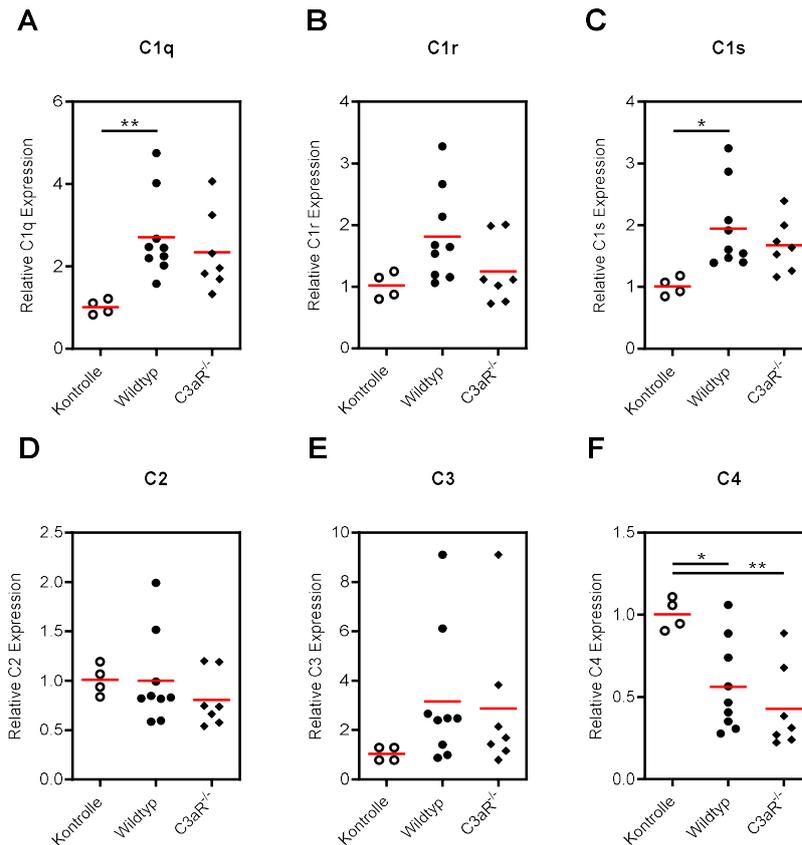


**Abbildung 40: C3aR – Quantitative Real-Time PCR von Nierengewebe unter DOCA-Hochdruck.**

Im DOCA-Salz Modell ist (A) Renin signifikant in beiden hypertensiven Versuchsgruppen supprimiert. (B) PAI-1 wird unter DOCA-Hochdruck nur tendenziell stärker exprimiert. (C) NGAL und (D) CCL2 wird nur in den hypertensiven Wildtypen signifikant höher exprimiert. Signifikante Unterschiede zwischen beiden hypertensiven Versuchsgruppen bestehen nicht. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Die Analyse der renalen Gen-Expression zeigt, dass unter DOCA-Hochdruck die Renin-Expression signifikant supprimiert wird, siehe Abbildung 40 (A). (B) PAI-1 wird bei beiden Hochdruck-Gruppen tendenziell mehr exprimiert. (C) NGAL und (D) CCL2 wird bei den hypertensiven Wildtypen signifikant und bei den hypertensiven C3aR-Knockouts tendenziell höher exprimiert. Die Unterschiede zwischen beiden hypertensiven Versuchsgruppen sind nicht signifikant.

## Resultate

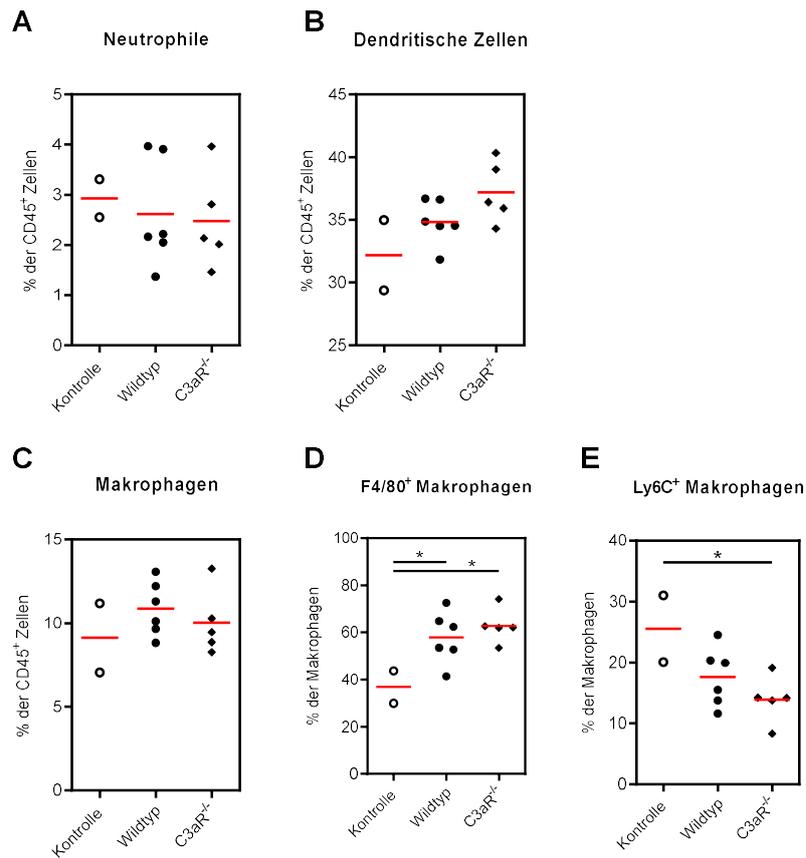


**Abbildung 41: C3aR – Komplementfaktoren in der Niere unter DOCA-Hochdruck.**

Unter DOCA-Bluthochdruck, sind die Komplementfaktoren (A) C1q und (C) bei hypertensiven Wildtypen signifikant höher exprimiert, als bei den normotensiven Kontrollen. Bei den hypertensiven Knockouts sind diese Faktoren tendenziell erhöht. Tendenziell sind die Faktoren (B) C1r und (E) C3 (Kontrollen 1,03-fach, Wildtypen 3,16-fach, C3aR-Knockouts 2,87-fach) bei beiden hypertensiven Gruppen erhöht. (D) C2 wird nicht. (F) Faktor C4 ist bei beiden hypertensiven Gruppen signifikant supprimiert. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden hypertensiven Versuchsgruppen. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,005$

Die Komplementfaktoren, siehe Abbildung 41, (A) C1q und (C) C1s werden bei den hypertensiven Wildtypen signifikant und die Faktoren (B) C1r und (E) C3 tendenziell höher exprimiert. Etwas schwächer sind die Expressionen bei den hypertensiven C3aR-Knockouts. (D) C2 wird unter DOCA nicht reguliert. (F) C4 wird hingegen signifikant bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen supprimiert. Die Unterschiede zwischen den beiden hypertensiven Versuchsgruppen sind nicht signifikant.

## Resultate



**Abbildung 42: C3aR – Durchflusszytometrische Analyse des Monozyten-Makrophagen-Panels unter DOCA-Hochdruck.**

Unter DOCA-Hochdruck ist die Anzahl der (A) Neutrophilen den Kontrollen ähnlich. (B) Die dendritischen Zellen sind im hypertensiven C3aR-Knockout und im hypertensiven Wildtypen tendenziell erhöht. Keine signifikanten Unterschiede bestehen sowohl bei der Anzahl der (C) Makrophagen. Die Anzahl der (D) F4/80<sup>+</sup> Makrophagen sind bei beiden Hochdruckgruppen signifikant erhöht. (E) Die Anzahl der Ly6C<sup>+</sup> Makrophagen ist bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen signifikant niedriger. Signifikante Unterschiede zwischen beiden hypertensiven Versuchsgruppen bestehen nicht. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \* p<0,05

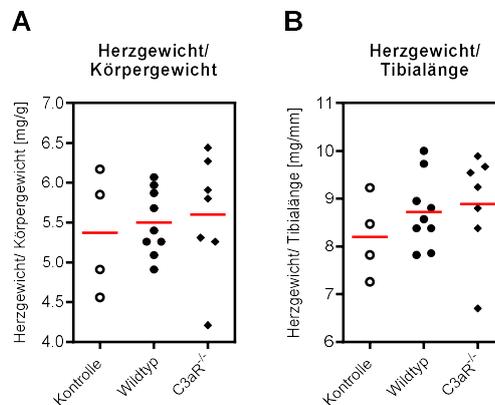
In der Durchflusszytometrie im DOCA-Salz Modell, siehe Abbildung 42, ist Die Anzahl an (A) Neutrophilen, (B) dendritischen Zellen und (C) Makrophagen fast unverändert im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen. Es ist ein signifikanter Anstieg der (D) F4/80<sup>+</sup> Makrophagen unter DOCA-Hochdruck bei beiden Hochdruckgruppen erkennbar. Die Anzahl der Ly6C<sup>+</sup> Makrophagen sinkt bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen deutlich bis signifikant ab.

### 4.1.3.2. Beurteilung kardialer hypertensiver Organschäden im C3aR-Knockout unter DOCA-Hochdruck

Um die kardialen hypertensiven Organschäden im DOCA-Salz Modell zu beurteilen werden sowohl Gewicht, histologische Schädigung und die Gen-Expression von pro-inflammatorischen Faktoren im Herzen untersucht.

## Resultate

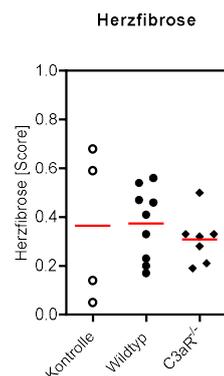
Es zeigt sich, dass das Herzgewicht, siehe Abbildung 43, unter DOCA-Hochdruck (A) in Bezug auf das Körpergewicht in allen 3 Versuchsgruppen annähernd gleich ist. (B) Das Herzgewicht in Bezug auf die Tibiallänge steigt hingegen tendenziell an. Unterschiede zwischen den beiden hypertensiven Versuchsgruppen sind nicht erkennbar.



**Abbildung 43: C3aR – Herzgewichte unter DOCA-Hochdruck.**

Unter DOCA-Hochdruck ist das (A) Herzgewicht in Bezug auf das Körpergewicht aller 3 Versuchsgruppen vergleichbar hoch. (B) Das Herzgewicht in Bezug auf die Tibiallänge ist bei den hypertensiven Versuchsgruppen tendenziell, aber nicht signifikant erhöht. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden hypertensiven Versuchsgruppen.

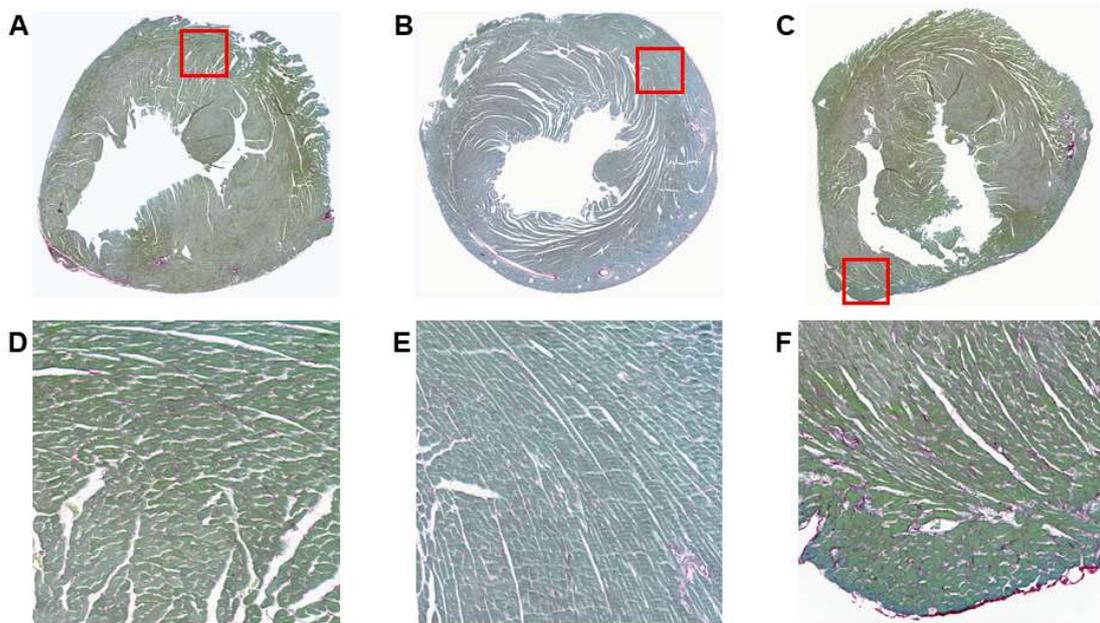
Die histologische Analyse, siehe Abbildung 44, zeigt keine Zunahme der fibrotischen Veränderungen des Myokards unter DOCA-Hochdruck. Die Menge an Fibrose im Myokard der hypertensiven Wildtypen und C3aR-Knockouts entspricht im Durchschnitt den normotensiven Kontrollen. Auch die Morphologie entspricht den normotensiven Kontrollen, siehe Abbildung 45.



**Abbildung 44: C3aR – Semiquantitative Beurteilung kardialer Fibrose unter DOCA-Hochdruck.**

Unter DOCA-Bluthochdruck ist weder bei den hypertensiven Wildtypen noch bei den hypertensiven Knockouts eine erhöhte Fibrosierung des Myokards erkennbar.

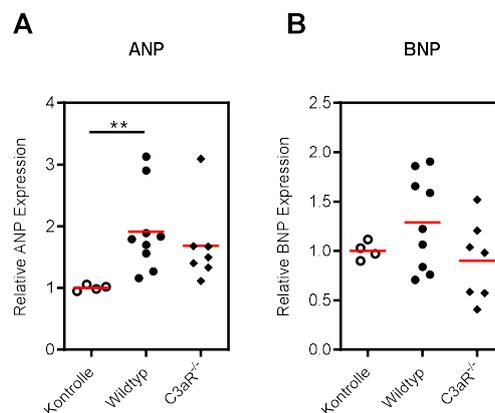
## Resultate



**Abbildung 45: C3aR – SRFG-gefärbte Herzhistologien im DOCA-Salz Modell**

Dargestellt sind SRFG-gefärbte Herzschnitte von (A)+(D) einer Kontrolle, (B)+(E) einem hypertensiven Wildtypen und (C)+(F) einem hypertensiven C3aR-Knockout im DOCA-Salz Modell. Das Herzgewebe weist bei allen drei Versuchsgruppen ein regelmäßiges Myokard mit sehr geringem Anteil an Kollagenfasern auf, die vor allem die Einbettung der intrakardialen Gefäße darstellen.

Die Real-Time PCR-Analyse des Myokards, siehe Abbildung 46, zeigt einen signifikanten Anstieg der (A) ANP-Expression in der hypertensiven Wildtyp-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Welcher in der hypertensiven C3aR-Knockout-Gruppe nur tendenziell zu erkennen ist. Die Expression von (B) BNP ist bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen unterschiedlich stark aber nicht signifikant. Ein Unterschied zwischen beiden Hochdruck-Gruppen besteht nicht.



**Abbildung 46: C3aR – Quantitative Real-Time PCR von Herzgewebe unter DOCA-Hochdruck.**

Im DOCA-Salz Modell weisen (A) hypertensive Wildtypherzen eine signifikant und die hypertensiven Knockouts eine tendenziell erhöhte ANP Gen-Expression auf. Die Expression von (B) BNP und die Vergleiche zwischen beiden hypertensiven Gruppen sind nicht signifikant. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*\* p<0,005

## Resultate

Zusammengefasst ist zu sagen, dass im DOCA-Salz Modell der systolische Blutdruck bei Wildtypen und C3aR-Knockouts nur leicht ansteigt. Unter DOCA-Hochdruck tritt bei den hypertensiven Versuchsgruppen und den normotensiven Kontrollen fast keine Mortalität auf. Die GFR ist unverändert. Bei den hypertensiven Versuchsgruppen tritt eine leichte Albuminurie auf. Der Plasma-Harnstoff sinkt bei den Hochdruckgruppen ab. Das Körpergewicht verändert sich unter DOCA-Hochdruck nicht. Die Nierengewichte steigen bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen gleich an. Die renalen histologischen Schäden sind bei beiden Hochdruckgruppen vergleichbar hoch. Renin wird im DOCA-Salz Modell bei beiden Gruppen weniger exprimiert. PAI-I, NGAL, CCL2, Kollagen I, Kollagen III, C1q, C1r, C1s wird vor allem in hypertensiven Wildtypen höher exprimiert. C2 und C3 wird unter DOCA-Salz nicht und C4 herunterreguliert. Unter DOCA-Hochdruck steigt in der Knockout-Gruppe die Anzahl der F4/80<sup>+</sup> Makrophagen an. Die Anzahl an Ly6C<sup>+</sup> Makrophagen sinkt bei beiden Hochdruckgruppen ab. Sowohl Körper- als auch Nierengewichte sind in allen drei Versuchsgruppen vergleichbar. Histologisch gibt es keine Unterschiede beim Myokard. ANP und BNP ist bei den hypertensiven Wildtypen erhöht.

### 4.2. C3aRxC5aR2 Doppelknockout

#### 4.2.1. C3aR<sup>-/-</sup>xC5aR2<sup>-/-</sup> im Ang II Modell

Neben der Frage, ob die einzelnen Komplementrezeptoren C3aR und C5aR2 eine Rolle bei Hypertonie und den daraus resultierenden hypertensiven Endorganschäden spielen, steht eine weitere Frage: gibt es einen Einfluss auf die Entwicklung von Hypertonie beim Zusammenspiel beider Rezeptoren? Um dies zu beantworten, wurde auch bei C3aRxC5aR2-doppeldefizienten Mäusen das Ang II-Hochdruckmodell angewandt.

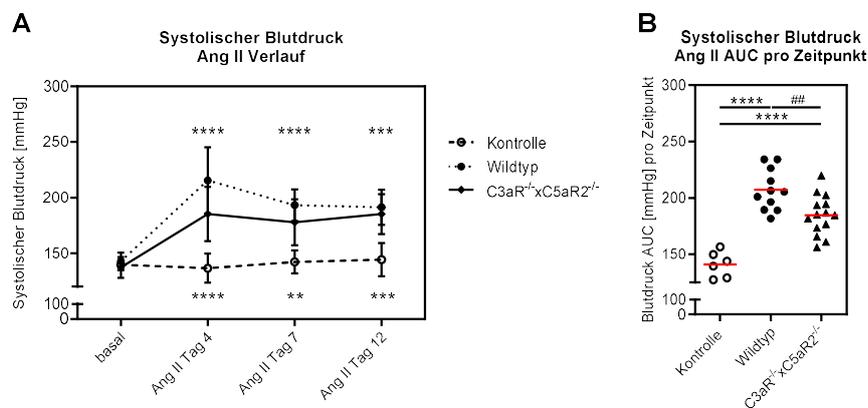
Wie zuvor dienen als Beurteilungs-Parameter die GFR, Albuminurie, Blutplasma-Werte, Organgewichte, Histologie, systolischer Blutdruck, Expression von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Proteinen (qPCR) und die Sterblichkeit. In insgesamt 4 Versuchen wurden 60 Tiere verwandt. Wie zuvor wurden 3 Versuchsgruppen miteinander verglichen: 11 Balb/c Kontrollen (Kontrollen), 25 hypertensive Balb/c Wildtypen (Wildtypen) und 24 hypertensive C3aRxC5aR2-doppeldefiziente Mäuse (Doppelknockouts). Auch in diesem Set an Versuchen gab es für die einzelnen Versuche andere Schwerpunkte und somit andere Ziel-Parameter, wodurch bei den Analysen die Tierzahlen sehr stark variieren können. Für die Verlaufs-Parameter wurde wie zuvor, vor Beginn der Hochdruck-Induktion eine basale Bestimmung vorgenommen. Die basalen GFR-Werte werden hierbei wie zuvor unterteilt in „Wildtyp“ und dem Doppelknockout.

Im ersten Schritt wurde der Erfolg der Induktion von Hypertonie im Ang II-Hochdruckmodell beurteilt. Hierfür wurde der systolische Blutdruck vor Beginn des Versuches und an den

## Resultate

Tagen 5, 8 und 12 nach der Implantation der osmotischen Ang II-Pumpe non-invasiv via Tail-cuff-Methode gemessen. Der Blutdruck wird im Verlauf und als AUC dargestellt.

In Abbildung 47 (A) ist zu erkennen, dass alle drei Versuchsgruppen vor Beginn der Ang II-Hochdruck-Induktion einen vergleichbaren systolischen Blutdruck aufweisen. Dieser steigt kurz nach Beginn an Tag 5 des Modells bei beiden Versuchsgruppen mit Ang II-Infusion signifikant an. Im weiteren Verlauf des Modells sinkt der Blutdruck der Wildtyp-Gruppe wieder etwas ab und nähert sich zum Ende des Versuchs dem Blutdruck der C3aRxC5aR2-Doppelknockout-Gruppe an, welche zu allen Zeitpunkten unter dem Blutdruck der Wildtypen liegt. (B) Dies ist auch bei der AUC pro Zeitpunkt zu erkennen.

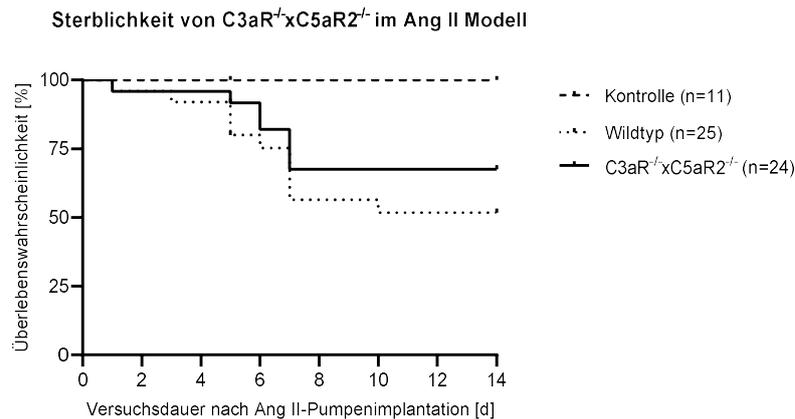


**Abbildung 47: C3aRxC5aR2 – Systolischer Blutdruck im Verlauf und als AUC unter Ang II-Hochdruck.**

Dargestellt ist (A) der durchschnittliche systolische Blutdruck mit SEM im Verlauf und (B) als AUC pro Zeitpunkt. Vor Beginn der Hochdruck-Induktion ist der Blutdruck bei allen 3 Versuchsgruppen vergleichbar. Ab Tag 5 der Ang II-Infusion steigt der systolische Blutdruck sowohl in der Wildtyp- als auch in Doppelknockout-Gruppe signifikant an. Zum Ende des Versuchs zeigen beide Hochdruck-Gruppen ähnliche systolische Blutdrücke. Die AUC pro Zeitpunkt ab Tag 4 des Versuchs ist bei den Wildtypen signifikant höher im Vergleich zu den Kontrollen und den Wildtypen. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*\*  $p \leq 0,005$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , Wildtyp vs. C3aR<sup>-/-</sup>C5aR2<sup>-/-</sup>: ##  $p \leq 0,005$

Als nächstes wird die Sterblichkeit analysiert. Hierfür wurde eine Kaplan-Meyer-Graphik gewählt, welche 11 Kontrollen, 25 hypertensive Wildtypen und 24 hypertensive C3aRxC5aR2-Doppelknockouts umfasst, Abbildung 48. Die Sterblichkeitskurven der Gruppen umfassen sowohl die Tötung von Tieren, gemäß der im Methodenteil erläuterten Abbruchkriterien, wie auch das Auffinden von toten Tieren.

## Resultate



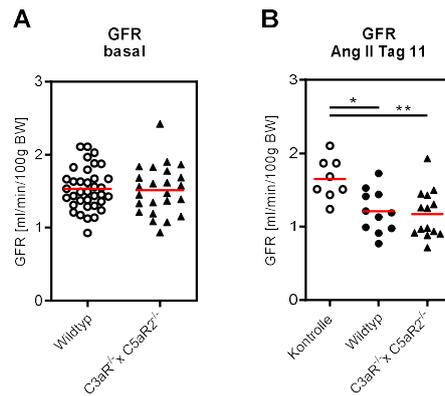
**Abbildung 48: C3aRxC5aR2 – Kaplan-Meier-Kurve der C3aRxC5aR2-defizienten Mäuse im Ang II-Hochdruckmodell.** Dargestellt ist die Sterblichkeit von 11 Kontrollen, 25 hypertensiven Wildtypen und 24 C3aRxC5aR2-Doppelknockouts im Ang II-Hochdruckmodell. In der Kontrollgruppe gab es keine Tierverluste. Bis zum Ende der Versuche verstarben 14 hypertensive Wildtypen (48 %) und 10 hypertensive Doppelknockouts (32 %). Die Doppelknockouts verstarben etwas früher im Versuch (zwischen Tag 1 und 7) als die Wildtypen (Tag 1 und Tag 10). Die Sterblichkeit beider hypertensiver Versuchsgruppen ist signifikant höher zur normotensiven Kontrollgruppe. Untereinander besteht jedoch kein signifikanter Unterschied.

In der hypertensiven Wildtyp-Gruppe verstarben 36 % der Tiere (11 Tiere) im Verlaufe des Versuches. Dies geschah zwischen dem 3. und dem 10. Tag nach Implantation der osmotischen Minipumpe. In der hypertensiven C3aRxC5aR2-Doppelknockout-Gruppe verstarben zwischen Tag 1 und Tag 7 nach der Implantation der Ang II-Pumpe 44 % der Tiere (10 Tiere). Hierbei wurden vermehrt Blutungen in Thorax und Abdomen sowie Nasenbluten festgestellt. Im Vergleich der beiden hypertensiven Versuchsgruppen miteinander ergibt der Log-Rank-Test keine signifikanten Unterschiede. Dieser besteht jedoch im Vergleich beider hypertensiven Gruppen mit der normotensiven Kontrollgruppe. Es liegt ein signifikant erhöhte Sterblichkeit beider hypertensiven Versuchsgruppen vor.

### 4.2.1.1. Beurteilung renaler hypertensiver Organschäden im C3aRxC5aR2-Doppelknockout unter Ang II-Hochdruck

Als erster Parameter für die renalen hypertensiven Organschäden wurde die GFR vor Beginn der Hochdruck-Induktion und am Ende des Modells an Tag 11 bei den Tieren gemessen. Wie in Abbildung 49 zu erkennen ist, ist (A) vor Beginn des Ang II-Hochdruckmodells die GFR bei beiden Genotypen gleich. (B) Am 11. Tag nach Beginn der Hochdruck-Induktion ist die GFR sowohl der hypertensiven Wildtypen, als auch der hypertensiven C3aRxC5aR2-Doppelknockouts signifikant im Vergleich zu den Kontrollen abgefallen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden hypertensiven Versuchsgruppen besteht nicht.

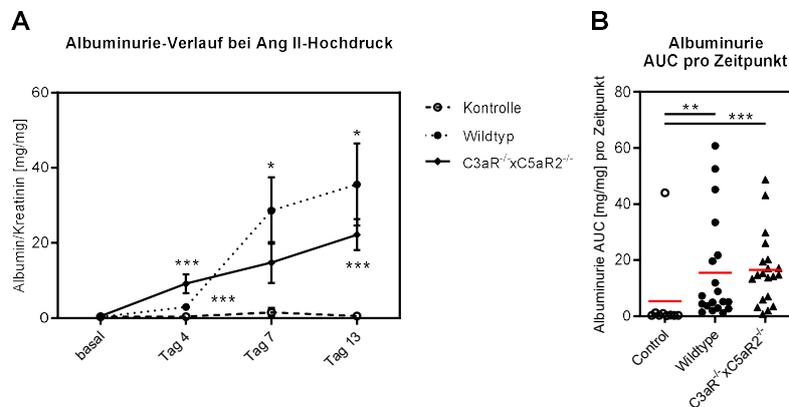
## Resultate



**Abbildung 49: C3aRxC5aR2 – Glomeruläre Filtrationsrate im Ang II-Hochdruckmodell.**

(A) Die GFR der Versuchsgruppen unterscheidet sich vor Beginn des Versuches nicht voneinander. (B) An Tag 11 der Ang II-Infusion ist die GFR bei beiden Hochdruckgruppen signifikant abgefallen. Einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Hochdruckgruppen besteht nicht. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p \leq 0,005$

Als Weiteres wurde die Albuminurie als Marker der Nierenschädigung bestimmt. Hierbei werden Albumin und Kreatinin im Urin gemessen und der daraus bestimmte Quotient ergibt die Albuminurie. Die Messungen werden wie zuvor vor Beginn der Hochdruckinduktion und an den Tagen 4, 7 und 13 nach Implantation der mit Ang II befüllten osmotischen Minipumpe vorgenommen.



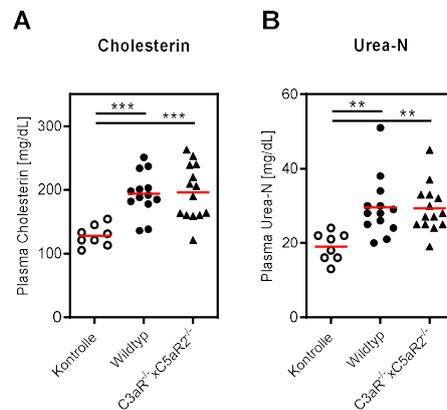
**Abbildung 50: C3aRxC5aR2 – Albuminurie im Verlauf und als AUC unter Ang II-Hochdruck.**

Dargestellt ist die Albuminurie als durchschnittlicher Quotient von Albumin und Kreatinin (A) als Verlauf mit SEM und (B) als AUC. Zu Beginn der Ang II-Infusion an Tag 4 des Modells steigt die Albuminurie der Doppelknockouts stärker als die der Wildtypen an. Ab Tag 7 bis zum Ende des Versuchs an Tag 13 ist jedoch die Albuminurie der Wildtypen wesentlich höher als die der Doppelknockouts. Die Unterschiede zwischen beiden hypertensiven Gruppen sind zu keinem Zeitpunkt signifikant. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$

Wie in Abbildung 50 zu sehen ist, weisen alle 3 Versuchsgruppen vor Beginn des Versuchs einen ähnlich geringen Albuminurie-Wert auf. (A) Die Ang II-Infusion induziert bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen im Verlaufe des Versuchs eine Albuminurie. (B) Die AUC pro Zeitpunkt ab Tag 4 des Versuchs ist bei beiden Hochdruckgruppen gleich. Die Unterschiede zwischen beiden Hochdruckgruppen sind zu keiner Zeit signifikant.

## Resultate

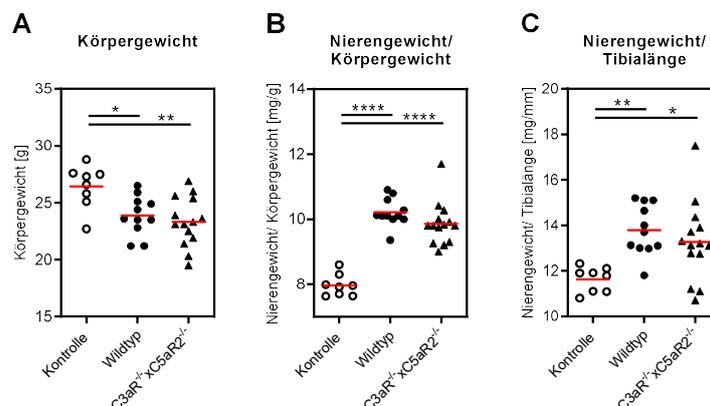
Der Abbildung 51 ist zu entnehmen, dass unter Ang II-Infusion (A) die Cholesterin-Werte beider hypertensiver Versuchsgruppen signifikant ansteigen. (B) Die Harnstoffwerte (Urea- N) steigen ebenfalls bei beiden Hochdruckgruppen signifikant an. Unterschiede zwischen hypertensiven Wildtypen und hypertensiven C3aRxC5aR2-Doppelknockouts bestehen nicht.



**Abbildung 51: C3aRxC5aR2 – Blutplasmawerte von Cholesterin und Urea-N unter Ang II-Hochdruck.**

Unter Ang II-Bluthochdruck steigen sowohl (A) die Cholesterin-Werte, als auch die Harnstoffwerte bei beiden Hochdruckgruppen signifikant an. Die Unterschiede zwischen beiden hypertensiven Gruppen sind nicht signifikant. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*\*  $p \leq 0,005$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$

In beiden hypertensiven Gruppen kommt es zu einer signifikanten Abnahme des Körpergewichts der Tiere im Vergleich zu den Kontrollen, siehe Abbildung 52 (A). Gleichzeitig steigt (B) das Nierengewicht im Bezug zum Körpergewicht und (C) in Bezug zur Tibiallänge sowohl bei den hypertensiven Wildtypen, als auch bei den hypertensiven C3aCx5aR2-Doppelknockouts signifikant an. Es bestehen keine signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen beiden Hochdruckgruppen.

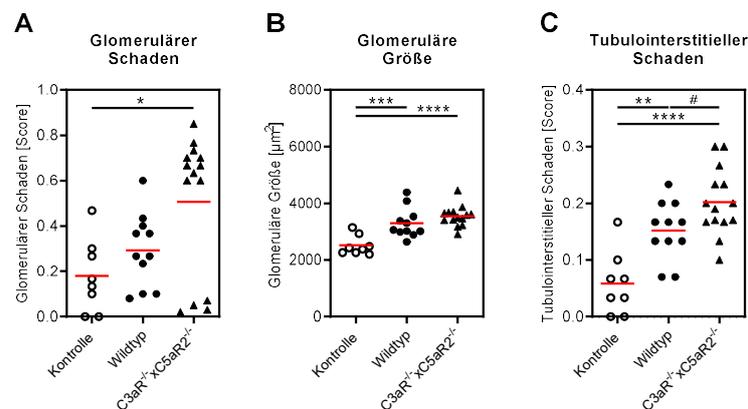


**Abbildung 52: C3aRxC5aR2 – Körper- und Nierengewichte unter Ang II-Hochdruck.**

(A) Das Körpergewicht der Tiere nach 2 Wochen Ang II-Hochdruck zeigt signifikante Unterschiede zwischen den hypertensiven Versuchsgruppen und den normotensiven Kontrollen. Sowohl das (B) Nierengewicht bezogen auf das Körpergewicht als auch (C) das Nierengewicht bezogen auf die Tibialänge sind in den hypertensiven Gruppen signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zwischen den hypertensiven Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

## Resultate

Die Auswertung der Nierenhistologien zeigt die Manifestation der renalen hypertensiven Organschäden. Der Abbildung 53 kann man entnehmen, dass im Ang II-Hochdruckmodell ein (A) glomerulärer Schaden zu beobachten ist, der in der C3aRxC5aR2-Doppelknockout-Gruppe signifikant erhöht ist. (B) Die glomeruläre Größe ist in beiden Hochdruckgruppen signifikant höher als in den normotensiven Kontrollen. Auch (C) der tubulointerstitielle Schaden ist bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen signifikant erhöht. Hierbei zeigt die Doppelknockout-Gruppe einen signifikant höheren Schaden im Vergleich zur Wildtypgruppe. Alle anderen Unterschiede zwischen den Hochdruckgruppen sind nicht signifikant.

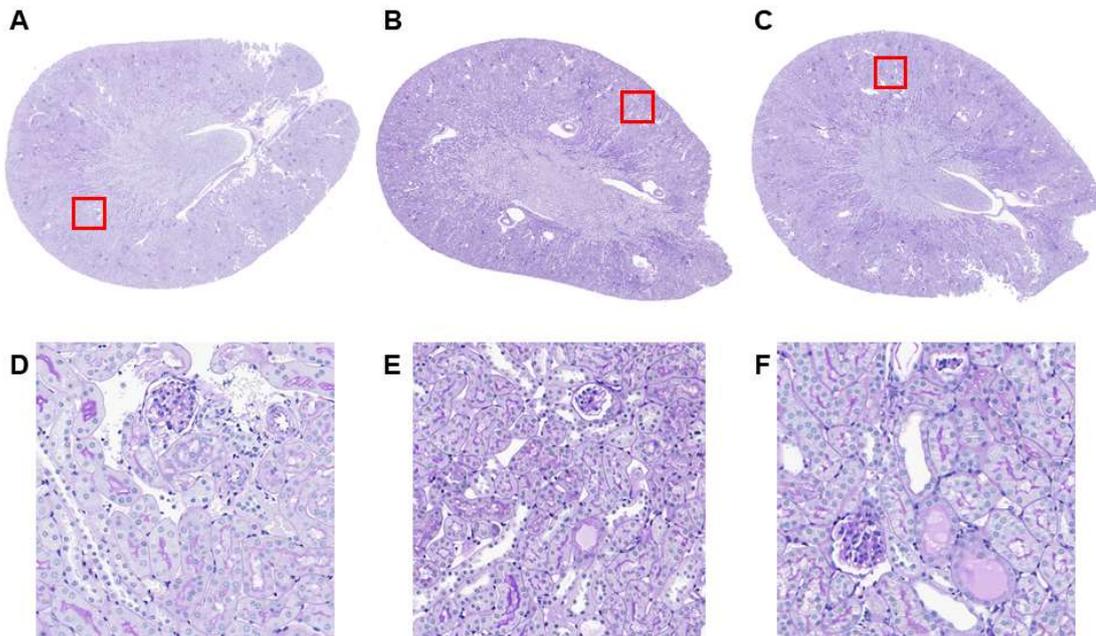


**Abbildung 53: C3aRxC5aR2 – Histologische Beurteilung von Nierengewebe unter Ang II-Hochdruck.**

Dargestellt sind (A) die glomeruläre Schädigung, (B) die glomeruläre Größe und (C) der tubulointerstitielle Schaden. Alle drei histologischen Parameter sind bei den Doppelknockouts signifikant erhöht. Die hypertensiven Wildtypen zeigen signifikant größere Glomeruli und einen höheren tubulointerstitiellen Schaden als die normotensiven Kontrollen. Der Unterschied zwischen den beiden Hochdruckgruppen ist nur beim tubulointerstitiellen Schaden signifikant. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , Wildtyp vs. C3aR<sup>2-/-</sup>: #  $p < 0,05$

Die glomerulären Schädigungen aufgrund des Ang II-induzierten Hochdrucks sind in Abbildung 54 zu erkennen. Sowohl die Niere der (B) und (E) hypertensiven Wildtypen, als auch (C) und (F) der C3aRxC5aR2-Doppelknockouts weisen teils mittelschwer bis schwer vernarbte Glomeruli auf. Das Kapillarvolumen ist im Vergleich zu den Kontrollen wesentlich geringer und das Mesangium zum Teil stark expandiert. Im tubulointerstitiellen Bereich sind Proteinzyylinder in den dilatierten Tubuli und inflammatorische Infiltrationen im tubulointerstitiellen Raum erkennbar.

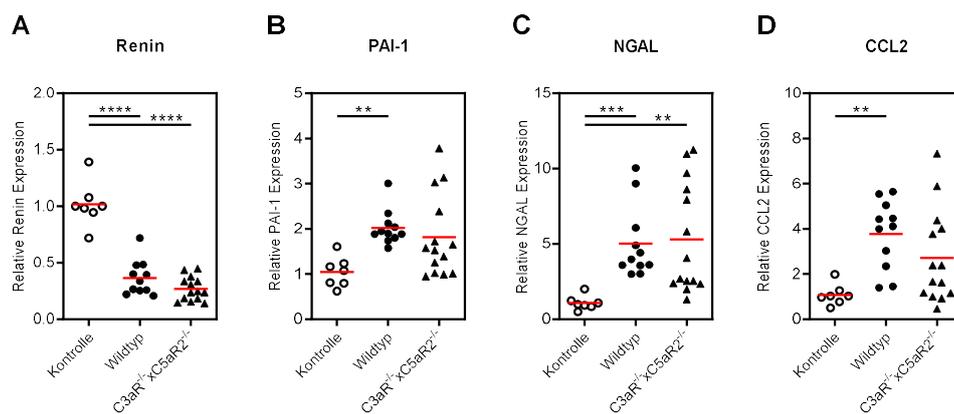
## Resultate



**Abbildung 54: C3aRxC5aR2 – PAS-gefärbte Nierenhistologien im Ang II-Hochdruckmodell.**

Dargestellt sind PAS-gefärbte Nierenschnitte (A)+(D) einer Kontrolle, (B)+(E) eines hypertensiven Wildtypens und (C)+(F) eines hypertensiven C3aRxC5aR2-Doppelknockouts im Ang II-Hochdruckmodell. (A)+(D) Das Nierengewebe ist unauffällig, zeigt eine normale glomeruläre Architektur mit klar erkennbaren Kapillaren, das Lumen der Tubuli ist klein und der interstitielle Raum ist kaum vorhanden. (B) bis (F) Die Nieren der hypertensiven Wildtypen und Doppelknockouts zeigen zum Teil mittelschwer bis schwer geschädigte Glomeruli mit einer Abnahme an Kapillarlumen und einer Zunahme an Mesangium. Die Tubuli sind teils stark dilatiert, und es finden sich inflammatorische Infiltrationen.

Die Analyse der renalen Gen-Expression mittels qPCR zeigt, dass unter Ang II-Infusion die Renin-Expression signifikant supprimiert wird, Abbildung 55 (A). Sowohl die hypertensiven Wildtypen als auch die hypertensiven C3aRxC5aR2-Doppelknockouts exprimieren signifikant weniger Renin im Vergleich zu den Kontrollen.



**Abbildung 55: C3aRxC5aR2 – Quantitative Real-Time PCR von Nierengewebe unter Ang II-Hochdruck.**

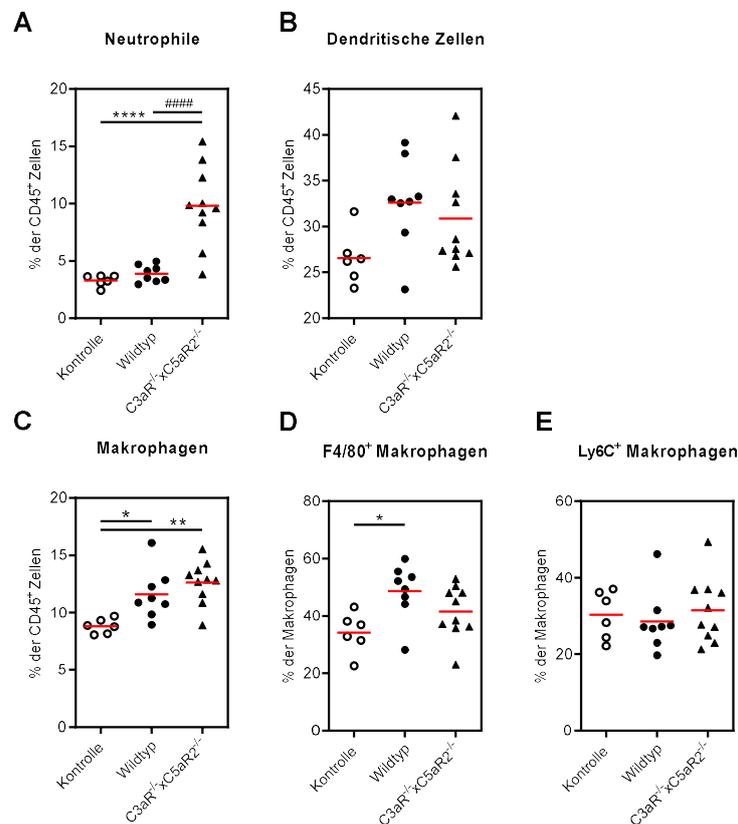
Dargestellt ist die relative Gen-Expression diverser Gene in der Niere. (A) Renin wird signifikant bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen supprimiert. (B) PAI-I, (C) NGAL und (D) CCL2 werden unter Hochdruck tendenziell bis signifikant vermehrt exprimiert. Alle Unterschiede zwischen hypertensiven Wildtypen und hypertensiven Doppelknockouts sind nicht signifikant. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*\*  $p \leq 0,005$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$



## Resultate

Hingegen wird (F) C4 in Wildtypen nicht verändert und in Doppelknockouts deutlich verringert exprimiert, siehe Abbildung 56. Dadurch entsteht ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Hochdruckgruppen. Die restlichen Expressionsunterschiede zwischen den hypertensiven Versuchsgruppen sind nicht signifikant.

Die Abbildung 57 zeigt die durchflusszytometrische Analyse der renalen Leukozyten. Die Anzahl der (A) Neutrophile Granulozyten der C3aRxC5aR2-Doppelknockouts steigt im Ang II-Hochdruckmodell signifikant im Vergleich zu den Kontrollen und den Wildtypen. (B) Dendritische Zellen treten bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen tendenziell häufiger auf. (C) Makrophagen sind bei beiden Hochdruckgruppen und (D) F4/80<sup>+</sup> Makrophagen nur bei den Wildtypen signifikant erhöht. (E) Die Anzahl der Ly6C<sup>+</sup> Makrophagen ändert sich nicht. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Hochdruck-Gruppen bestehen nur bei den Neutrophilen.



**Abbildung 57: C3aRxC5aR2 – Durchflusszytometrische Analyse des Monozyten-Makrophagen-Panels unter Ang II-Hochdruck.**

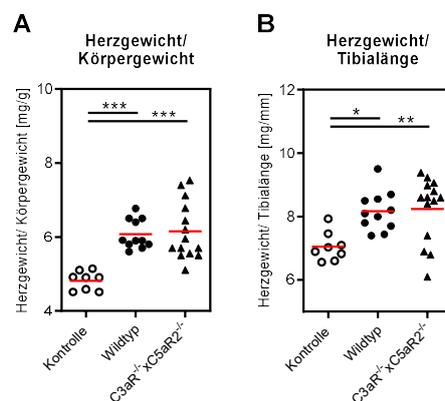
Dargestellt ist die Häufigkeit von (A) Neutrophile Granulozyten, (B) Dendritischen Zellen und (C) Makrophagen relative bezogen auf CD45<sup>+</sup> Zellen und den (D) F4/80<sup>+</sup> und (E) Ly6C<sup>+</sup> Makrophagen relative bezogen auf die Makrophagen im Ang II-Hochdruckmodell. (A) Die hypertensiven Doppelknockouts weisen eine signifikant höhere Anzahl an Neutrophilen auf. (B) Dendritische Zellen treten bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen tendenziell mehr auf. (C) Die Anzahl an Makrophagen ist bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen signifikant höher. (D) Die F4/80<sup>+</sup> Makrophagen sind bei den Wildtypen signifikant und bei den Doppelknockouts tendenziell vermehrt. (E) Die Anzahl an Ly6C<sup>+</sup> Makrophagen ist bei allen drei Versuchsgruppen annähernd gleich. Nicht signifikant sind bis auf die Anzahl der Neutrophilen die Unterschiede zwischen den beiden hypertensiven Gruppen. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \* p<0,05, \*\* p<0,005, und \*\*\*\* p<0,0001, Wildtyp vs. C3aR1<sup>-/-</sup>: ### p<0,001

## Resultate

### 4.2.1.2. Beurteilung kardialer hypertensiver Organschäden im C3aRxC5aR2-Knockout unter Ang II-Hochdruck

Die kardialen hypertensiven Schäden werden wie zuvor mittels Analyse von Organengewichten, Histologien und Gen-Expressionen von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Genen beurteilt.

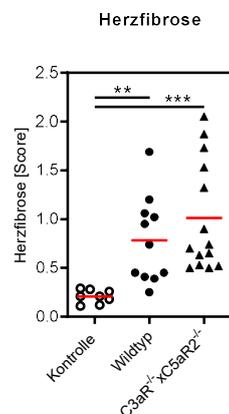
Wie in Abbildung 58 zu erkennen ist, nimmt das (A) Herzgewicht im Verhältnis zum Körpergewicht und (B) im Verhältnis zur Tibialänge signifikant sowohl bei den hypertensiven Wildtypen, als auch bei den hypertensiven C3aRxC5aR2-Doppelknockouts zu. Unterschiede zwischen beiden Hochdruckgruppen bestehen nicht.



**Abbildung 58: C3aRxC5aR2 – Körper- und Herzgewichte unter Ang II-Hochdruck.**

Unter Ang II-Hochdruck steigen (A) das Herzgewicht bezogen auf das Körpergewicht und (B) das Herzgewicht bezogen auf die Tibialänge im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen signifikant an. Ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und Doppelknockout-Gruppe besteht nicht. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$

Die semiquantitative Analyse der kardialen hypertensiven Schädigung wird in Abbildung 59 dargestellt. Dem kann man entnehmen, dass die Ang II-Hypertonie sowohl in den hypertensiven Wildtypen, als auch in den hypertensiven C3aRxC5aR2-Doppelknockouts signifikant höhere Schäden hervorruft.

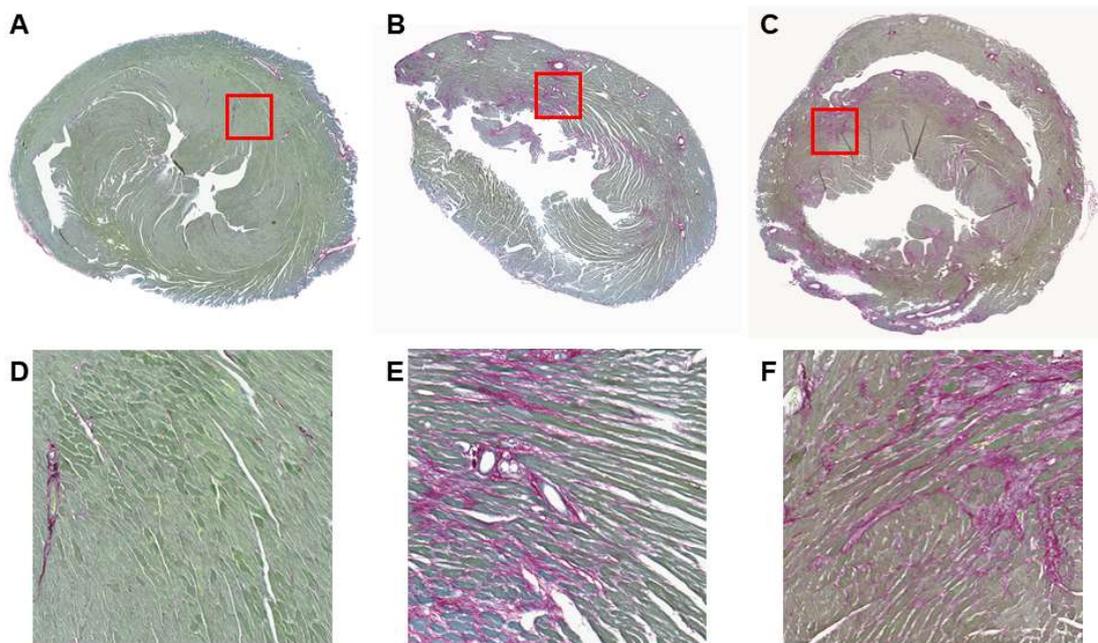


**Abbildung 59: C3aRxC5aR2 – Semiquantitative Beurteilung kardialer Fibrose unter Ang II-Hochdruck.**

Die semiquantitative Beurteilung des kardialen Gewebes zeigt unter Ang II-Hochdruck eine signifikant höhere Fibrosierung des Myokards sowohl bei den hypertensiven Wildtypen, als auch bei den hypertensiven Doppelknockouts. Der Unterschied zwischen beiden Hochdruckgruppen ist nicht signifikant. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*\*  $p \leq 0,005$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$

## Resultate

Die histopathologischen kardialen Schäden der hypertensiven Versuchsgruppen sind in Abbildung 60 gut erkennbar. Sowohl die (B) und (E) hypertensiven Wildtypen, als auch die (C) und (F) hypertensiven C3aRxC5aR2-Doppelknockouts zeigen in unterschiedlicher Ausprägung eine Zunahme an kollagenen Fasern. Bei beiden Genotypen sind im Myokard septenartige Fibrosen zu beobachten, die teilweise in flächige Vernarbungen übergehen.

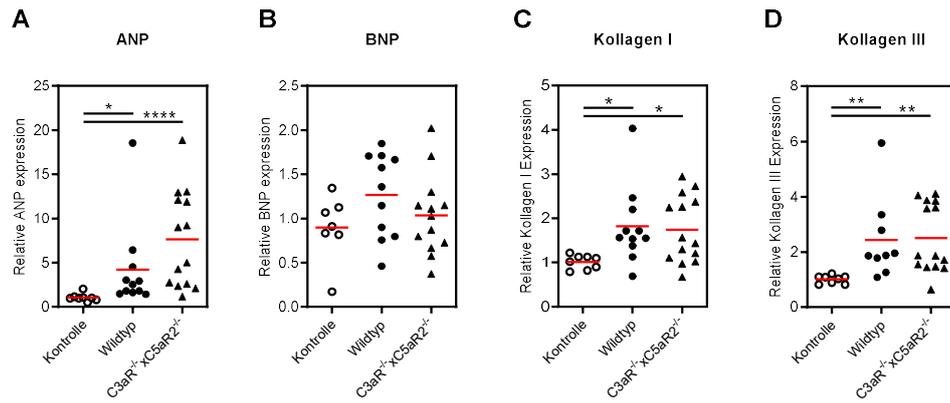


**Abbildung 60: C3aRxC5aR2 – SRFG-gefärbte Herzhistologien im Ang II-Hochdruckmodell.**

Dargestellt sind SRFG-gefärbte Herzschnitte von (A)+(D) einer Kontrolle, (B)+(E) einem hypertensiven Wildtypen und (C)+(F) einem hypertensiven C3aRxC5aR2-Knockout im Ang II-Hochdruckmodell. (A) Das Herzgewebe weist ein regelmäßiges Myokard mit sehr geringem Anteil an Kollagenfasern auf, der Einbettung der Vasa privata. (B)+(C) Die Vernarbungen des Myokards sind deutlich zu erkennen. (E)+(F) Die septenartige Fibrosierung geht in flächenartige Vernarbungen über.

Abschließend wird die kardiale Schädigung mittels quantitative Real-Time PCR Analyse beurteilt. Wie in Abbildung 61 (A) zu erkennen ist, steigt die ANP Expression unter Ang II-Hochdruck signifikant bei beiden Versuchsgruppen an. (B) BNP wird bei beiden Gruppen auch vermehrt, aber nicht signifikant höher exprimiert. (C) Kollagen I und (E) Kollagen III werden beide in beiden Hochdruckgruppen signifikant stärker exprimiert. Signifikante Expressions-Unterschiede zwischen beiden Hochdruckgruppen bestehen nicht.

## Resultate



**Abbildung 61: C3aRx5aR2 – Quantitative Real-Time PCR von Herzgewebe unter Ang II-Hochdruck.**

Unter Ang II-Hochdruck steigt die Gen-Expression von (A) ANP signifikant und (B) tendenziell an. (C) Kollagen I und (D) Kollagen III werden in beiden hypertensiven Versuchsgruppen signifikant exprimiert. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden hypertensiven Versuchsgruppen. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

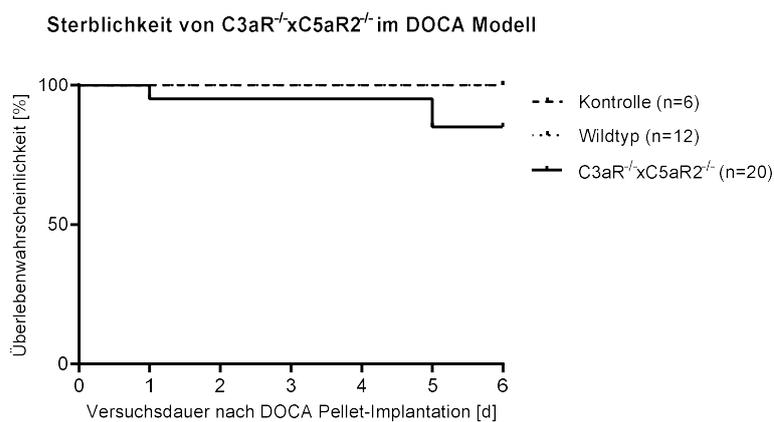
Zusammengefasst ist zu sagen, dass sich im Ang II-Hochdruckmodell bei den Wildtypen und den C3aRx5aR2-Doppelknockouts ein vergleichbarer Hypertonus entwickelt. Die Mortalität unter Ang II-Infusion ist bei beiden Gruppen erhöht. Die GFR sinkt bei beiden Hochdruckgruppen vergleichbar ab. Unter Ang II-Hochdruck entwickeln beide Gruppen eine Albuminurie. Sowohl die Plasma-Cholesterin- als auch die Plasma-Harnstoffwerte steigen bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen an. Das Körpergewicht sinkt bei beiden Gruppen ab, die Nierengewichte nehmen zu. Beide hypertensive Gruppen weisen renale histologische Schäden auf. Unter Ang II-Infusion wird Renin supprimiert. Renal wird PAI-I, NGAL und CCL2 bei beiden Hochdruckgruppen höher exprimiert. C1q, C1r, C1s, C2 und C3 wird in hypertensiven Wildtypen hochreguliert. C4 wird bei den hypertensiven Doppelknockouts supprimiert. Im Ang II Modell steigt die bei den Doppelknockouts Anzahl der Neutrophilen an. Makrophagen treten bei beiden Hochdruckgruppen vermehrt auf. Die Herzgewichte sind unter Ang II-Hochdruck bei beiden Gruppen erhöht. Kardial tritt bei beiden Gruppen Fibrose auf. Außerdem sind kardial ANP, BNP, Kollagen I und Kollagen III bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen erhöht.

### 4.2.2. C3aR<sup>-/-</sup>x5aR2<sup>-/-</sup> im DOCA-Salz Modell

Um die Frage der Rolle von C3aR und C5aR2 bei Hypertonie und den daraus resultierenden hypertensiven Endorganschäden abschließend beurteilen zu können, kam das DOCA-Salz Modell zur Anwendung. Wie bei den Versuchen des Einzel-Knockouts war die Versuchsdauer 6 Wochen und beinhaltete die Implantation zweier DOCA-Pellets im Abstand von 3 Wochen zu einander. In 3 Versuchen wurden insgesamt 45 Tiere in drei Versuchsgruppen (6 Kontrollen, 17 Wildtypen, 22 C3aRx5aR2-Doppelknockouts) verwendet. Auch bei diesen Versuchen waren Analyse-Schwerpunkte und Zielparameter

## Resultate

unterschiedlich, wodurch die Tierzahlen bei den einzelnen Analysen variieren. Wie beim vorherigen Versuchsmodell, wurde für die Verlaufs-Parameter vor Beginn der Hochdruck-Induktion eine basale Bestimmung vorgenommen. Da sich, wie auch in vorangegangenen Versuchen, die normotensiven Kontrolltiere nicht von den späteren hypertensiven Wildtypen unterscheiden, wurden wieder beide Gruppen als Gruppe „Wildtyp“ in der Basalbestimmung der GFR zusammengefasst. Bei diesem Versuchsset wurden jedoch weder Blutdruck gemessen noch eine Durchflusszytometrie von myeloiden Zellen vorgenommen.



**Abbildung 62: C3aRxC5aR2 – Kaplan-Meyer-Kurve der C3aRxC5aR2-defizienten Mäuse im DOCA-Salz Modell.**

Dargestellt ist die Sterblichkeit der Kontrollgruppe mit insgesamt 6 Tieren, der hypertensiven Wildtypen mit 12 und der hypertensiven  $C3aR^{-/-} \times C5aR2^{-/-}$  Doppelknockout-Gruppe mit 20 Tieren. Es gab weder in der Kontrollgruppe noch in der hypertensiven Wildtypgruppe Verluste aufgrund der DOCA-Bluthochdruck-Induktion. In der hypertensiven Doppelknockout-Gruppe verstarben an Tag 3 und 36 der Hochdruck-Induktion insgesamt 3 Tiere (15%). Die Sterblichkeit beider hypertensiver Versuchsgruppen im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe und untereinander ist nicht signifikant erhöht.

Die Kaplan-Meyer-Kurve der  $C3aR \times C5aR2$ -DOCA Versuche, siehe Abbildung 62, basiert auf 6 Kontrollen, 12 Wildtypen und 22 Doppelknockouts. Aufgrund von Pelletdurchbrüchen wurden 5 Wildtypen und 2 Doppelknockouts exkludiert. Wie zu erkennen ist, verstarb im Verlaufe des DOCA-Salz Modells kein Kontroll- und kein Wildtypier. In der Gruppe der Doppelknockouts gab es einen Verlust von 15% (3 Tiere). Eine Signifikanz besteht zwischen keiner der 3 Versuchsgruppen.

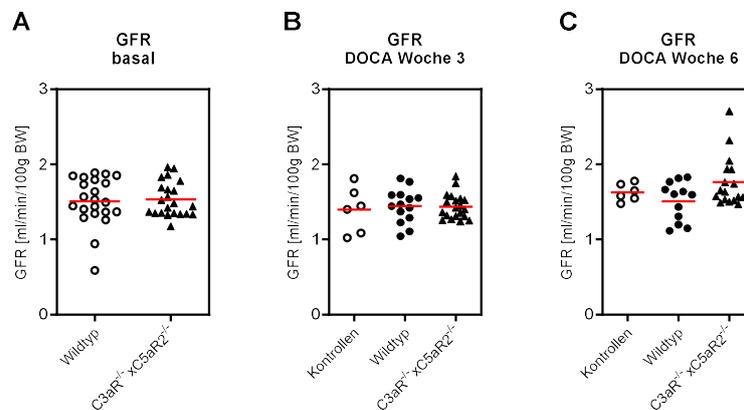
### 4.2.2.1. Beurteilung renaler hypertensiver Organschäden im $C3aR \times C5aR2$ -Doppelknockout unter DOCA-Hochdruck

Als erster Parameter zur Beurteilung der renalen hypertensiven Organschäden und den damit einhergehenden Funktionsverlusten wurde auch in diesem Versuchsset die GFR gemessen. Wie zuvor erfolgte die Messung vor Beginn der Hochdruck-Induktion kurz vor dem Wechsel des ersten DOCA-Pellets und kurz vor Ende des Modells.

Der Abbildung 63 ist zu entnehmen, dass die GFR (A) vor Beginn der DOCA-Hochdruckinduktion bei beiden Genotypen annähernd gleich ist. (B) In der Mitte des

## Resultate

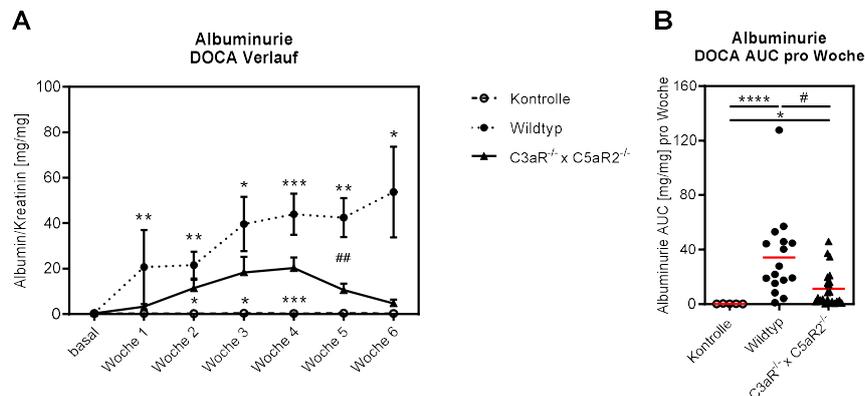
Versuches in der dritten Woche des Modells ist die GFR aller drei Versuchsgruppen noch immer gleich hoch. (C) Zum Ende des Versuchs in Woche 6 des Modells weisen die die hypertensiven C3aRxC5aR2-Doppelknockouts eine geringfügig höhere GFR im Vergleich zu den Kontrollen und den hypertensiven Wildtypen auf. Zu keinem Zeitpunkt besteht ein signifikanter Unterschied.



**Abbildung 63: C3aRxC5aR2 – Glomeruläre Filtrationsrate im DOCA-Salz Modell.**

Die glomeruläre Filtrationsrate ist (A) basal bei Wildtypen und den Doppelknockouts annähernd gleich. Unter DOCA-Bluthochdruck verändert sich die GFR weder nach (B) 3 Wochen noch (C) nach 6 Wochen signifikant im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden hypertensiven Versuchsgruppen.

Die Albuminurie (als Quotient von Albumin und Kreatinin gemessen im Urin) als zweiter Parameter der Nierenschädigung zeigt in Abbildung 64 einen deutlichen Unterschied zwischen den hypertensiven Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe.



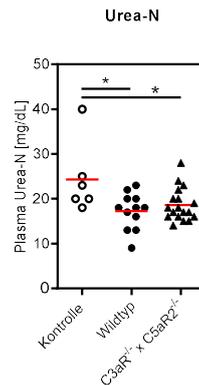
**Abbildung 64: C3aRxC5aR2 – Albuminurie im Verlauf und als AUC unter DOCA-Hochdruck.**

Dargestellt ist die Albuminurie als durchschnittlicher Quotient von Albumin und Kreatinin (A) im Verlauf mit SEM und (B) als AUC pro Woche. (A) Basal weisen alle drei Versuchsgruppen annähernd die gleiche geringe Albuminurie auf. Ab Woche 1 der Bluthochdruck-Induktion steigt die Albuminurie der hypertensiven Wildtypgruppe signifikant an. Die Albuminurie der hypertensiven Doppelknockouts ist ab Woche 2 bis Woche 5 signifikant höher im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe. Am Ende des Versuchs in Woche 6 nähert sie sich den Kontrollen wieder an. (B) Die AUC pro Woche ist bei den hypertensiven Wildtypen signifikant höher im Vergleich zu den Kontrollen und den Doppelknockouts. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , Wildtyp vs. C3aR<sup>-/-</sup>: #  $p < 0,05$ , ##  $p \leq 0,005$

Vor Beginn der DOCA-Hochdruckinduktion ist die Albuminurie aller drei Versuchsgruppen vergleichbar gering, Abbildung 64 (A). Ab Woche 1 steigt die Albuminurie beider

## Resultate

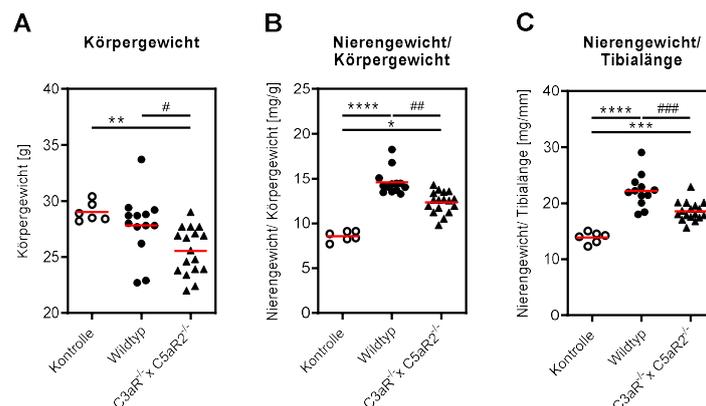
hypertensiver Versuchsgruppen an. Die Albuminurie der Wildtypen steigt hierbei sehr viel stärker und signifikant im Vergleich zu den Kontrollen und bis zum Ende des Modells in Woche 6 an. Ab Woche 2 ist auch die Albuminurie der hypertensiven C3aRxC5aR2-Doppelknockouts signifikant höher, als die der Kontrollen. Jedoch sinkt ab Woche 5 die Albuminurie wieder und hat sich in Woche 6 der Albuminurie der Kontrollen wieder angenähert. Der Albuminurie-Unterschied zwischen beiden hypertensiven Versuchsgruppen ist nur in Woche 5 signifikant.



**Abbildung 65: C3aRxC5aR2 – Blutplasmawerte von Cholesterin und Urea-N unter DOCA-Hochdruck.**

Unter DOCA-Bluthochdruck ist der Plasma-Harnstoff bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen signifikant im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe niedriger. Die Unterschiede zwischen beiden hypertensiven Gruppen nicht signifikant. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$

Die Plasma-Harnstoff-Werte der DOCA-Doppelknockout-Versuche sind in Abbildung 65 dargestellt. Sie sind bei beiden Hochdruckgruppen signifikant niedriger im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden hypertensiven Versuchsgruppen besteht nicht.

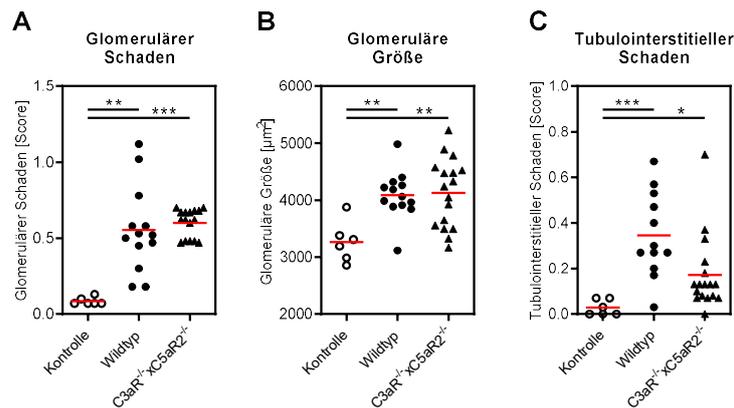


**Abbildung 66: C3aRxC5aR2 – Körper- und Nierengewichte unter DOCA-Hochdruck.**

6 Wochen nach DOCA-Bluthochdruck-Induktion sinkt das (A) Körpergewicht der hypertensiven Doppelknockouts signifikant sowohl im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe als auch im Vergleich zur hypertensiven Wildtypgruppe. Das Nierengewicht (B) im Verhältnis zum Körpergewicht und (C) im Verhältnis zur Tibialänge steigt bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen signifikant zur Kontrollgruppe an. Die hypertensiven Wildtypen weisen jeweils signifikant höhere Nierengewichte im Vergleich zu den hypertensiven Doppelknockouts auf. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , Wildtyp vs. C3aR1-/-: #  $p < 0,05$ , ##  $p \leq 0,005$  und ###  $p \leq 0,001$

## Resultate

Der Abbildung 66 (A) ist zu entnehmen, dass unter DOCA-Hochdruck das Körpergewicht bei den hypertensiven C3aRxC5aR2-Doppelknockouts abfällt. Dies ist sowohl im Vergleich zu den Kontrollen als auch zu den hypertensiven Wildtypen signifikant. Das (B) Nierengewicht im Verhältnis zum Körpergewicht und (C) im Verhältnis zur Tibiallänge beider Hochdruckgruppen steigt signifikant an. Jedoch steigen beide Gewichte in der Doppelknockout-Gruppe nicht so stark wie die der Wildtypen an, wodurch signifikante Gewichtsunterschiede zwischen den beiden Genotypen entstehen.



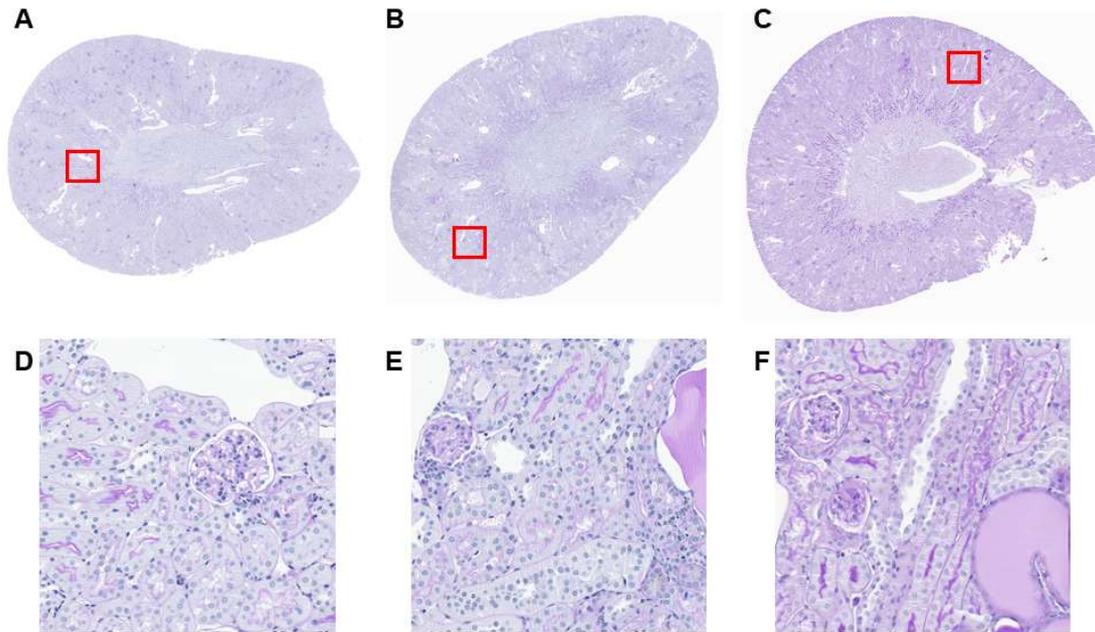
**Abbildung 67: C3aRxC5aR2 – Histologische Beurteilung von Nierengewebe unter DOCA-Hochdruck.**

Die beiden hypertensiven Versuchsgruppen zeigen unter DOCA-Hochdruck einen signifikant aggravierten (A) glomerulären und (C) tubulointerstitiellen Schaden. Der sich auch in einer signifikanten (B) Größenzunahme der Glomeruli widerspiegelt. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden hypertensiven Versuchsgruppen ist nicht gegeben. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$

Abbildung 67 zeigt, dass sowohl die hypertensiven Wildtypen als auch die hypertensiven C3aRxC5aR2-Doppelknockouts deutliche Schädigungen des renalen Gewebes nach DOCA-Hochdruck-Induktion aufweisen. Der (A) glomeruläre Schaden ist bei beiden Hochdruckgruppen ähnlich stark und signifikant höher im Vergleich zu den Kontrollen. Damit einher geht eine für beide hypertensive Versuchsgruppen signifikante (B) Größenzunahme der Glomeruli. (C) Der tubulointerstitielle Schaden ist ebenfalls bei beiden hypertensiven Genotypen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Hierbei ist die Schädigung in der Wildtypgruppe tendenziell etwas stärker. Jedoch sind sämtliche Unterschiede zwischen den Hochdruckgruppen nicht signifikant.

Die in Abbildung 68 exemplarisch abgebildeten Nierenhistologien zeigen deutlich, dass unter DOCA-Hochdruck sowohl die (B) und (E) hypertensiven Wildtypen, als auch die (C) und (F) die hypertensiven C3aRxC5aR2-Doppelknockouts glomeruläre Schädigungen vorliegen. Die zum Teil stark geschädigten Glomeruli weisen deutliche Kapillarovolumenverluste und Mesangium-Expansionen auf. Die Tubuli sind teilweise dilatiert und weisen Proteinzylinder auf. Vereinzelt treten inflammatorische Infiltrationen auf und der tubulointerstitielle Raum weist leichte Verbreiterungen auf.

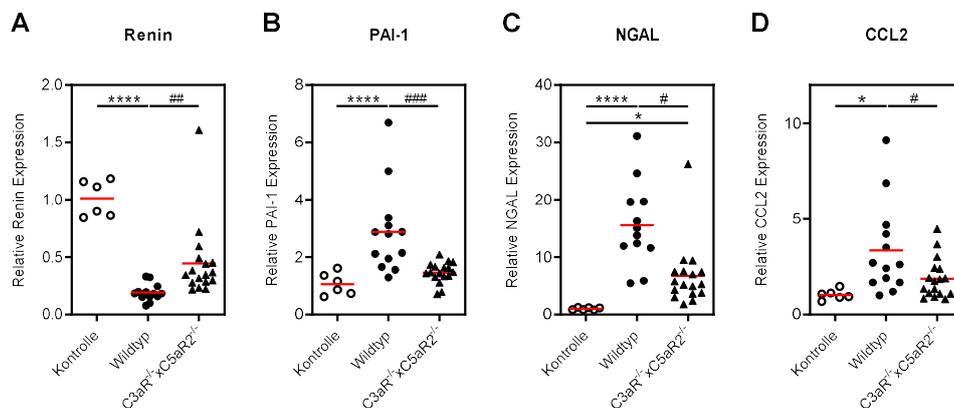
## Resultate



**Abbildung 68: C3aRxC5aR2 – PAS-gefärbte Nierenhistologien im DOCA-Salz Modell.**

Dargestellt sind PAS-gefärbte Nierenschnitte (A)+(D) einer Kontrolle, (B)+(E) einem hypertensiven Wildtypen und (C)+(F) einem hypertensiven C3aRxC5aR2-Knockouts im DOCA-Salz Modell. (A)+(D) Die Niere weist die normale glomerulären Architektur mit klar erkennbaren Kapillaren und kleinem Tubulilumen auf. (B) bis (F) Die Niere weist vergleichbare Schäden auf. Die Glomeruli zeigen stark PAS-positive Areale, das Mesangium ist expandiert. Die Tubuli sind dilatiert, Proteinzyylinder treten vereinzelt auf und der interstitielle Raum ist etwas verbreitert.

Abschließend wird mittels qPCR die hypertensive Schädigung der Nieren im unter DOCA-Hypertonie-Induktion beurteilt.



**Abbildung 69: C3aRxC5aR2 – Quantitative Real-Time PCR von Nierengewebe unter DOCA-Hochdruck.**

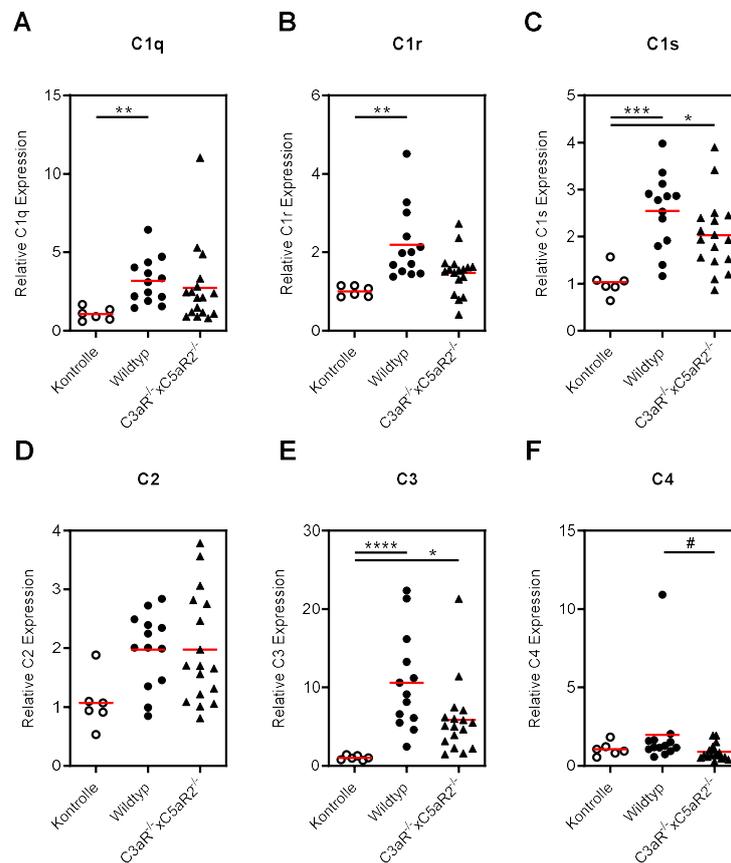
Unter DOCA-Bluthochdruck sinkt die (A) Renin Expression bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen ab. Die (B) PAI-1, (C) NGAL, (D) und CCL2 Expression ist in der hypertensiven Wildtypgruppe signifikant und in der hypertensiven Doppelknockout-Gruppe tendenziell bis signifikant zur Kontrollgruppe erhöht. Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen beiden hypertensiven Versuchsgruppen. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , Wildtyp vs. C3aR<sup>-/-</sup>: #  $p < 0,05$ , ##  $p \leq 0,005$  und ###  $p \leq 0,001$

Wie in Abbildung 69 (A) zu erkennen ist, wird bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen die Renin-Expression supprimiert. (B) PAI-1 wird sowohl in den hypertensiven Wildtypen, als auch in den hypertensiven C3aRxC5aR2-Doppelknockouts hochreguliert. Jedoch ist

## Resultate

dies nur für die Wildtypen signifikant. (C) NGAL wird in beiden Hochdruckgruppen signifikant höher exprimiert. Ähnlich wie PAI-1 wird (D) CCL2 bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen höher, aber nur bei den Wildtypen signifikant höher exprimiert.

Die Expression der Komplementfaktoren unter DOCA-Hochdruck wird in Abbildung 70 dargestellt. (A) C1q und (B) C1r werden in beiden hypertensiven Versuchsgruppen höher im Vergleich zu den Kontrollen exprimiert. Jedoch ist nur der Expressionsanstieg der hypertensiven Wildtypen signifikant. (C) C1s wird sowohl bei den Wildtypen, als auch bei den hypertensiven C3aRxC5aR2-Doppelknockouts signifikant höher exprimiert. Bei beiden Hochdruckgruppen ist die Expression von (D) C2 tendenziell und (E) C3 signifikant vermehrt. (F) C4 wird hingegen bei den Wildtypen tendenziell stärker und bei den Doppelknockouts tendenziell schwächer im Vergleich zu den Kontrollen exprimiert. Der dadurch entstehende Expressions-Unterschied ist als einziger signifikant.



**Abbildung 70: C3aRxC5aR2 – Komplementfaktoren in der Niere unter DOCA-Hochdruck.**

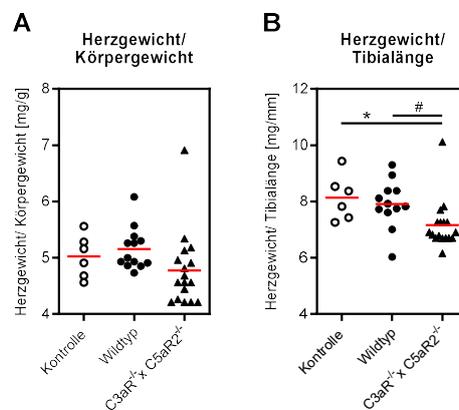
Die Komplementfaktoren (A) C1q, (B) C1r, (C) C1s, (D) C2, (E) C3 und (F) C4 werden unter DOCA-Hochdruck in beiden hypertensiven Versuchsgruppen tendenziell bis signifikant im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen vermehrt exprimiert. Unterschiede zwischen den hypertensiven Versuchsgruppen sind nicht signifikant. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , Wildtyp vs. C3aR<sup>-/-</sup>: #  $p < 0,05$

## Resultate

### 4.2.2.2. Beurteilung renaler hypertensiver Organschäden im C3aRxC5aR2-Doppelknockout unter DOCA-Hochdruck

Um abschließend die kardialen hypertensiven Organschäden im DOCA-Salz Modell beurteilen zu können, werden wie zuvor das Gewebegewicht, histologische Schädigung und die Gen-Expression von pro-inflammatorischen Faktoren im Herzen analysiert.

Der Abbildung 71 ist zu entnehmen, dass (A) das Herzgewicht in Bezug zum Körpergewicht in der Doppelknockout-Gruppe tendenziell niedriger ist. Das (B) Herzgewicht in Bezug zur Tibiallänge ist in der Doppelknockout-Gruppe im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen und den hypertensiven Wildtypen signifikant niedriger. Alle weiteren Unterschiede sind nicht signifikant.

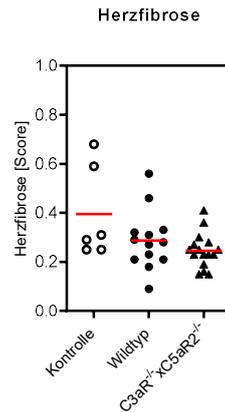


**Abbildung 71: C3aRxC5aR2 – Körper- und Herzgewichte unter DOCA-Hochdruck.**

Unter DOCA-Bluthochdruck sinkt das (A) das Herzgewicht im Verhältnis zum Körpergewicht bei den hypertensiven Doppelknockouts tendenziell ab. (B) Das Herzgewicht im Verhältnis zur Tibiallänge sinkt bei den hypertensiven Doppelknockouts signifikant im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen und den hypertensiven Wildtypen ab. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , Wildtyp vs. C3aR<sup>-/-</sup>: #  $p < 0,05$

Die histopathologische Analyse, siehe Abbildung 72, des kardialen Gewebes zeigt keine fibrotischen Veränderungen des Myokards unter DOCA-Hochdruck. Die Menge an Kollagenen Fasern im Myokard der hypertensiven Wildtypen und C3aRxC5aR2-Doppelknockouts entspricht im Durchschnitt den normotensiven Kontrollen. Signifikante Unterschiede bestehen nicht.

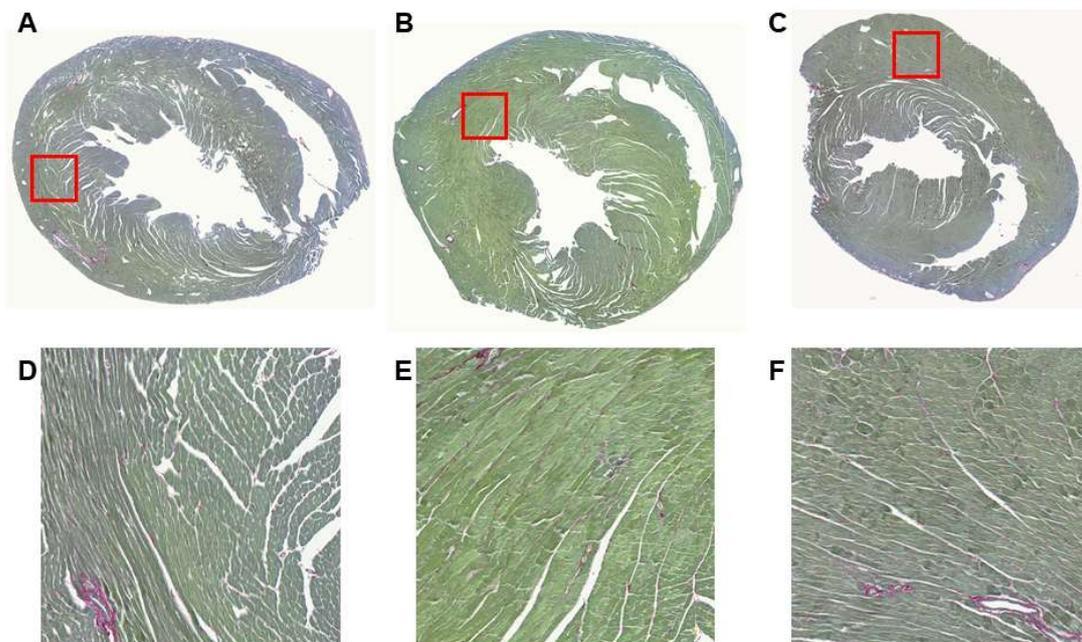
## Resultate



**Abbildung 72: C3aRxC5aR2 – Semiquantitative Beurteilung kardialer Fibrose unter DOCA-Hochdruck.**

Unter DOCA-Hochdruck ist bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen keine Fibrosierung des Myokard-Gewebes zu erkennen. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede.

In Abbildung 73 ist zu erkennen, dass sowohl die Kontrollen (A) und (D) als auch die Wildtypen (B) und (E) und C3aRxC5aR2-Doppelknockouts (C) und (F) ein regelmäßiges Myokard aufweisen. Die geringe Menge an Kollagenen Fasern findet sich vornehmlich als Einbettung von intrakardialen Gefäßen. Fibrotische Veränderungen wie Septen oder flächige Vernarbungen treten nicht auf.

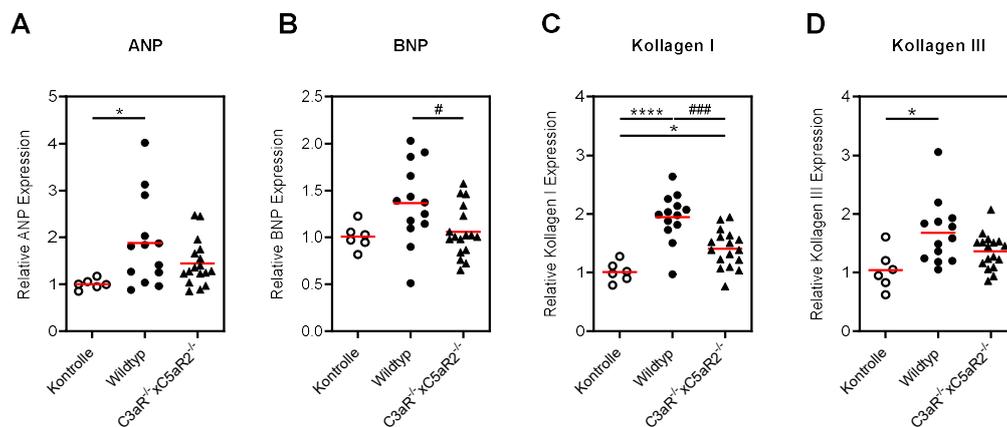


**Abbildung 73: C3aRxC5aR2 – SRFG-gefärbte Herzhistologien im DOCA-Salz Modell.**

Dargestellt sind SRFG-gefärbte Herzschnitte von (A)+(D) einer Kontrolle, (B)+(E) einem hypertensiven Wildtypen und (C)+(F) einem hypertensiven C3aR-Knockout im DOCA-Salz Modell. Das Herzgewebe weist bei allen drei Versuchsgruppen ein regelmäßiges Myokard mit sehr geringem Anteil an Kollagenfasern auf, die vor allem die Einbettung der intrakardialen Gefäße darstellen.

## Resultate

Die quantitative Gen-Expressions-Analyse des kardialen Gewebes mittels qPCR zeigt in Abbildung 74, dass (A) ANP im DOCA-Salz Modell in den Wildtypen signifikant und in den C3aRxC5aR2-Doppelknockouts tendenziell höher exprimiert wird. (B) BNP ist in den Wildtypen deutlich höher als in den Kontrollen und den Doppelknockouts exprimiert. (C) Kollagen I wird in beiden Hochdruckgruppen signifikant höher exprimiert. Hierbei weist die Wildtyp-Gruppe erneut eine signifikant höhere Expression im Vergleich zu den Doppelknockouts auf. Auch (D) Kollagen III wird bei den hypertensiven Versuchsgruppen vermehrt exprimiert. Hierbei ist jedoch nur der Unterschied zwischen Kontroll- und Wildtyp-Gruppe signifikant. Alle weiteren Unterschiede der Expressionen sind nicht signifikant.



**Abbildung 74: C3aRxC5aR2 – Quantitative Real-Time PCR von Herzgewebe unter DOCA-Hochdruck.**

Unter DOCA-Hochdruck steigt bei hypertensiven Wildtypen die kardiale Gen-Expression von (A) ANP, (B) BNP, (C) Kollagen I und (D) Kollagen III im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen schwach aber deutlich bis signifikant an. Bei den hypertensiven Doppelknockouts wird nur die Expression von Kollagen I signifikant hochreguliert. Signifikanzangaben vs. normotensive Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , Wildtyp vs. C3aR1-/-: #  $p < 0,05$  und ###  $p \leq 0,001$

Zusammengefasst kann man sagen, dass im DOCA-Salz Modell keine Unterschiede bei den hypertensiven Wildtypen und C3aRxC5aR2-Doppelknockouts bei der Mortalität bestehen. Die GFR bleibt unverändert. Unter DOCA-Hochdruck entwickeln sowohl die hypertensiven Wildtypen, als auch die hypertensiven Doppelknockouts eine Albuminurie, die bei den Wildtypen höher ist. Die Plasma-Harnstoffwerte sinken bei beiden Hochdruckgruppen ab. Im DOCA-Salz Modell verlieren die Doppelknockouts an Gewicht, die Nierengewichte steigen bei beiden Hochdruckgruppen an. Der renale histologische Schaden ist bei beiden hypertensiven Versuchsgruppen gleich. Unter DOCA-Hochdruck wird bei beiden Versuchsgruppen Renin supprimiert und renal PAI-I, NGAL, CCL2, C1q, C1r, C1s, C2 und C3 hochreguliert. C4 wird nicht reguliert. Es kommt zu keiner hypertensiven Herzschiädigung. Kardial tritt keine Fibrose auf. ANP, BNP, Kollagen I und Kollagen III wird unter DOCA-Hochdruck vor allem bei den Wildtypen hochreguliert.

### 5. Diskussion

Das adaptive und das angeborene Immunsystem gewinnen bei der Entstehung von arterieller Hypertonie und den Hochdruck-induzierten Endorganschäden zunehmend an Bedeutung (Wenzel *et al.*, 2016; Wenzel *et al.*, 2021). In den letzten Jahren hat sich unsere Arbeitsgruppe mit der Frage beschäftigt, ob das Komplementsystem hierbei eine Rolle spielt (Wenzel *et al.*, 2017; Wenzel *et al.*, 2020). Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR2 auf die Pathophysiologie von Bluthochdruck und den dadurch induzierten Endorganschäden näher zu beleuchten. Hierfür wurde der C3aR mittels der tdTomato-C3aR Reporter-Maus via Konfokalmikroskopie und Durchflusszytometrie lokalisiert und charakterisiert. Wir untersuchten dann den Einfluss von C3aR auf Bluthochdruck und hypertensive Endorganschäden mittels zweier Hochdruckmodellen in C3aR-defizienten Mäusen und analysierten hierfür den Blutdruck, die GFR, die Nieren- und Herzgewichte, die Albuminurie, die Durchflusszytometrie, die Expression von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Proteinen, sowie die histologische Quantifizierung der Herz- und Nierenschäden. Anschließend untersuchten wir den Einfluss des C3aRxC5aR2-Doppelknockouts auf Bluthochdruck und hypertensive Endorganschäden.

#### 5.1. Lokalisierung des Anaphylatoxinrezeptors C3aR

Mikroskopisch konnte der C3aR renal im tubulointerstitiellen Raum auf infiltrierenden polymorph-kernigen Zellen nachgewiesen werden. Obwohl dies den Ergebnissen anderer Studien zum größten Teil entspricht, konnte der C3aR jedoch nicht auf Podozyten wie von Braun *et al.* beschrieben, nachgewiesen werden (Braun *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2020; Quell *et al.*, 2017). Dies könnte daran liegen, dass wir zum Nachweis des C3aR die Expression des tdTomato-Reportersignals in murinen Nieren verwendet haben. Braun *et al.* wies den humanen C3aR mittels Antikörper nach, dessen Clone (8H1) nicht länger für die Detektion von C3aR verwendet wird (Braun *et al.*, 2004). Unspezifische, d. h. falsch positive, Effekte sind insbesondere beim Nachweis von Rezeptoren im Gewebe mit Antikörpern nicht auszuschließen.

In der Durchflusszytometrie konnten die dendritischen Zellen sowohl renal als auch kardial als primär C3aR-exprimierende Zellen identifiziert werden. Des Weiteren wurde der C3aR auf Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Chen *et al.*, 2007; Quell *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2013). Jedoch wiesen die renalen T Zellen der tdTomato-C3aR Maus nur eine sehr geringe C3aR Expression auf. Wie von Quell *et al.* berichtet, gibt es diesbezüglich konträre Berichte (Quell *et al.*, 2017). Ältere Studien konnten den C3aR nicht auf humanen naiven T Zellen nachweisen (Martin *et al.*, 1997; Quell *et al.*, 2017; Werfel *et al.*, 2000). Wohingegen

## Diskussion

neuere Studien ihn durchaus auf humanen naiven und regulatorischen T Zellen identifizieren konnten (Cravedi *et al.*, 2013; Kwan *et al.*, 2013; Liszewski *et al.*, 2013b; Quell *et al.*, 2017). Des Weiteren konnte Strainic *et al.* in *in vitro* Versuchen den murinen C3aR in T Zellen nachweisen (Strainic *et al.*, 2008). Da in unseren Versuchen der C3aR in naiven Tieren nachgewiesen worden ist, ist zu vermuten, dass die C3aR Expression bei T Zellen erst durch Stimuli angeregt wird.

Die Lokalisierung und Charakterisierung von C5aR2 mittels tdTomato-Reportermaus war Teil der Dissertation von M. Kohsar. Zusammengefasst ist zu sagen, dass C5aR2 mikroskopisch renal auf infiltrierenden Zellen im glomerulären und tubulointerstitiellen Raum detektiert wurde. In der Durchflusszytometrie zeigte sich, dass mehrheitlich Neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen und Makrophagen den C5aR2 exprimierten. Dies deckt sich mit anderen Berichten (Chen *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013; Ohno *et al.*, 2000). Auf T Zellen wird der C5aR2 ebenfalls nur sehr gering exprimiert. Wie auch bei dem C3aR gibt es hierzu gegenläufige Berichte. Karsten *et al.* konnten auf murinen T Zellen den C5aR2 nicht nachweisen (Karsten *et al.*, 2017). Wohingegen Verghese *et al.* durchaus die Expression von C5aR2 auf naiven und regulatorischen T Zellen zeigen konnten (Verghese *et al.*, 2018). Es ist daher denkbar, dass wie auch bei C3aR die Expression von C5aR2 auf T Zellen einen Stimulus benötigt.

### **5.2. C3aR-Knockout und C3aRxC5aR2-Doppelknockout unter Hochdruckbedingungen**

Der C3aR-Knockout zeigte sowohl im Ang II als auch im DOCA-Salz Modell keinen relevanten Unterschied zum hypertensiven Wildtypen. In beiden Modellen wiesen der hypertensive Wildtyp und der hypertensive Knockout ähnliche Mortalitäten, systolische Blutdrücke, GFR, Albuminurien, Blutplasmawerte, Organgewichte, histologische Schäden in Herzen und Nieren und Ausmaße der Inflammation, sowohl auf mRNA-Ebene als auch in der Durchflusszytometrie auf. Bei den C3aRxC5aR2-Doppelknockouts sind leichte Unterschiede zu den hypertensiven Wildtypen erkennbar. In beiden Modellen sind die Mortalitäten, die GFR, die Harnstoffwerte und die Expression von pro-inflammatorischen Markern vergleichbar. Hingegen ist der Anstieg der Albuminurie bei beiden Modellen etwas geringfügiger im Vergleich zu den Wildtypen.

Im Ang II Modell findet sich kein Unterschied beim Blutdruck zwischen hypertensiven Wildtypen und C3aR-Knockouts. Dahingegen findet sich ein kleiner aber signifikanter Unterschied zwischen den hypertensiven Wildtypen und C3aRxC5aR2-Knockouts. Es könnte sich hierbei um Messungenauigkeiten handeln. Möglich wäre aber auch, dass in der Gruppe der hypertensiven Wildtypen durch die Mortalität der Effekt „Survival of the Fittest“ einsetzt, so dass die am stärksten hypertensiven Tiere im weiteren Verlauf der Versuche

## Diskussion

fehlen. Im DOCA-Salz Modell hingegen steigt der Blutdruck wesentlich geringer und unterscheidet sich nur leicht von den normotensiven Kontrollen.

Zusätzlich zu den geringeren Blutdrücken sind im DOCA-Salz-Modell zum Teil hohe Blutdruckschwankungen erkennbar. Diese Schwankungen basieren auf einer Kombination von externen Faktoren und einer kleinen Kohorten-Größe in den DOCA-Versuchen. Da die Versuche mit Mäusen auf Balb/c-Hintergrund durchgeführt wurden, hat die größere Nervosität der Balb/c im Vergleich zu C57BL/6 zu einer größeren Streuung der Messwerte geführt. Andere DOCA-Salz Studien mit relativ kleiner Endzahl an Tieren nutzten zum überwiegenden Teil Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund (Jama *et al.*, 2022). Die externen Faktoren umfassen eine relativ hohe Messungenauigkeit der Blutdruckmessung mittels Tail-cuff-Methode im Vergleich zur Telemetrie-Messung. Die Blutdruckmessung mittels Tail-cuff wird von vielen Faktoren beeinflusst, wie eine komplexe Körpertemperatur-Regelung, welche ihrerseits Einfluss auf die Vasomotorik hat (Bigiarelli, 2022; Drüeke *et al.*, 2019). Wir haben in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Ehmke versucht, die Telemetrie in Balb/c Mäusen in den verwendeten Hochdruckmodellen durchzuführen. Balb/c Mäuse tolerieren die Kombination aus Nephrektomie, DOCA Pellet/ Ang II Pumpe und Implantation der Telemetriesender nicht. Daher konnten wir keine validen Blutdruckmessungen durchführen.

Die Mortalität ist ebenfalls bei beiden Knockouts im Ang II Modell deutlich erhöht. Hierbei zeigen die C3aR-Knockouts eine tendenziell höhere Mortalität und die C3aRxC5aR2 eine tendenziell niedrigere Mortalität im Vergleich zu den hypertensiven Wildtypen. Die erhöhte Mortalität der C3aR, die mit Nasenbluten und inneren Blutungen einherging, kann man mit längeren Blutungszeiten erklären, da der C3aR auf den Thrombozyten für die Funktion der Thrombozyten notwendig ist (Sauter *et al.*, 2019; Sauter *et al.*, 2018). Diese erhöhte Mortalität scheint bei zusätzlicher Defizienz des C5aR2 teilweise kompensiert zu werden. Ein Vergleich der Blutungszeiten beider Knockouts könnte darüber Aufschluss geben. Es zeigt aber auch, dass der niedrigere Blutdruck der Doppelknockouts in Kombination mit der etwas mildereren Mortalität auf einer allgemein besseren „Fitness“ der Tiere basieren könnte. Im DOCA-Salz Modell gibt es keine erhöhte Mortalität in den Hochdruckgruppen.

Der deutliche Hochdruck-Induktionseffekt des Ang II Modells ist auch bei der Schädigung von den Nieren zu erkennen. Sowohl bei den C3aR-Knockouts als auch bei den C3aRxC5aR2-Doppelknockouts geht die höhere Albuminurie mit dem deutlichen Funktionsverlust (GFR) der Niere, den erhöhten Cholesterin- und Harnstoffwerten, den Gewichtsverlusten der Tiere und der starken Zunahme der Nierengewichte einher. Bis auf die Albuminurie gibt es bei all diesen Parametern keinerlei Unterschiede zwischen den hypertensiven Wildtypen und Knockouts. Es scheint, als ob die Defizienzen von der C3aR

## Diskussion

und C3aRxC5aR2 im Ang II Modell keinen Einfluss auf die Pathophysiologie der renalen Schädigungen haben. Die niedrigere Albuminurie der Doppelknockouts im Ang II Modell, vor allem zum Ende des Modells, scheint jedoch die Theorie „Survival of the Fittest“ teilweise zu stützen. Im DOCA-Salz Modell ist die Schädigung der Nieren sowohl bei beiden Knockouts als auch bei den Wildtypen nicht so deutlich ausgeprägt. Die Albuminurie der Wildtypen ist in diesem Modell am stärksten ausgeprägt. Die AUC der Albuminurie ist bei den C3aR tendenziell und bei den C3aRxC5aR2-Doppelknockouts signifikant niedriger. Dies könnte darauf hinweisen, dass die zumindest die Doppelknockouts teilweise geschützt sein könnten. Diese Vermutung wird auch dadurch gestützt, dass auch die Nierengewichte der Doppelknockouts im Vergleich zu den Wildtypen signifikant niedriger sind, wohingegen die C3aR-Knockouts keinerlei Unterschiede zu den hypertensiven Wildtypen zeigen.

Bei beiden Hypertonie-Modellen ist auf mRNA-Ebene deutlich zu erkennen, dass Renin supprimiert wird. Gleichzeitig werden die Marker für die renalen Schädigungen hochreguliert. Es ist auch erkennbar, dass in den hypertensiven Wildtypen im Vergleich zu den Knockouts diese Marker leicht bis signifikant höher exprimiert werden. Dies spiegelt sich teilweise in der histopathologischen Analyse der Gewebs-Schädigungen wieder. Die C3aR-Knockouts zeigen bei beiden Hochdruckmodellen im Vergleich zu den Wildtypen vergleichbare glomeruläre und tubulointerstitielle Schädigungen. Wohingegen die Doppelknockouts im Ang II Modell bei ähnlichen Gen-Expressionen höhere renale Schädigungen aufzeigen. Im DOCA-Salz Modell entwickeln die Doppelknockouts sogar etwas geringere tubulointerstitielle Schädigungen. Es wäre daher denkbar, dass sich die auf mRNA-Ebene festgestellten Veränderungen noch nicht auf histologischer Ebene manifestiert haben. Des Weiteren ist zu bedenken, dass die Auswertung der Histopathologien semiquantitativ sind und Differenzen in der Analyse immer vom Analytiker abhängig ist. Der geringere tubulointerstitielle Schaden der Doppelknockouts im DOCA-Salz Modell könnte dennoch auf einen partiellen protektiven Effekt hindeuten.

Die kardialen Schädigungen sind bei beiden Knockouts und den hypertensiven Wildtypen im Ang II Modell vergleichbar. Alle drei Versuchsgruppen zeigen deutlich schwerere Herzen mit einer ausgeprägten Fibrose des Myokards, sowie einen deutlichen Anstieg von ANP und BNP. Im DOCA-Salz Modell sind die Schädigungen aller drei Versuchsgruppen deutlich schwächer ausgeprägt. Keine der drei Gruppen weist eine Fibrose des Myokards auf. Die Herzgewichte und Gen-Expressionen bei den C3aR-Knockouts und den Wildtypen vergleichbar sind. Wohingegen die Doppelknockouts weniger starke Gewichtszunahmen der Herzen und wesentlich geringere Gen-Expressionen der Marker für die kardialen Schädigungen aufweisen. Auch dies stützt die These, dass die Doppeldefizienz teilweise protektiv wirkt.

## Diskussion

Im Ang II Modell sind keine deutlichen Unterschiede bei der immunologischen Antwort zwischen hypertensiven Wildtypen und C3aR-Knockouts erkennbar. Beide Gruppen zeigen einen Anstieg der Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Wobei sich das Verhältnis von Ly6C<sup>+</sup> Makrophagen (pro-inflammatorisch) zugunsten der F4/80<sup>+</sup> Makrophagen (tissue-resident) verschiebt. Auch im DOCA-Salz Modell bestehen keine deutlichen Unterschiede zwischen beiden hypertensiven Gruppen. Erneut ist das Verhältnis von Ly6C<sup>+</sup> Makrophagen zugunsten der F4/80<sup>+</sup> Makrophagen verschoben. Dies bestätigt die vorangegangenen Beobachtungen, dass C3aR keinen Einfluss auf Bluthochdruck zu haben scheint.

Hingegen zeigt der Doppelknockout im Ang II Modell eine signifikant höhere Anzahl an Neutrophilen. Dendritische Zellen und auch die erhöhte Anzahl an Makrophagen ist bei den hypertensiven Wildtypen und den Doppelknockouts annähernd gleich. Es wäre daher möglich, dass die partiellen protektiven Eigenschaften des Doppelknockouts mit der veränderten Neutrophilen Antwort zusammenhängen könnte. Da C3aR keine Effekte zu haben scheint, wird vor allem die C5aR2-Defizienz des Doppelknockouts ausschlaggebend für diesen Effekt sein. Dies würde jedoch nicht zu der Theorie passen, dass der C5aR2 als Decoy-Rezeptor von C5aR1 fungiert und dessen pro-inflammatorische Immunantwort, welche unsere Arbeitsgruppe in früheren Versuchen zu der Rolle von C5aR1 bei Bluthochdruck zeigte, abschwächt (Bamberg *et al.*, 2010; Okinaga *et al.*, 2003; Weiss *et al.*, 2016).

Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zur Rolle des C5aR2-Singleknockouts bei Bluthochdruck deuten jedoch daraufhin, dass die C5aR2-Defizienz allein keinen Einfluss auf Bluthochdruck und hypertensive Endorganschäden haben könnte. Es wäre daher möglich, dass C3aR und C5aR2 in einem sehr geringen Maße miteinander interagieren und dass bei der Doppelfizienz beider Rezeptoren ein sehr geringer Effekt bei Bluthochdruck und hypertensiven Endorganschäden erkennbar ist. Da es jedoch ein sehr geringer Effekt ist, könnte es sich auch um zufällig statistische Effekte handeln.

Abschließend ist zu sagen, dass bei beiden Hochdruckmodellen und bei allen drei Hochdruckgruppen vor allem der Komplementfaktor C3 hochreguliert wird. Daher ist eine Aktivierung des Komplementsystems bei Bluthochdruck eindeutig feststellbar. Dies deckt sich mit Daten einer von uns kürzlich eingereichten Arbeit bei dem wir eine Hochregulierung von C3 in der Niere sowohl bei Patienten als auch bei hypertensiven Mäusen finden (Bode *et al.* submitted).

### 5.3. Ausblick

Bluthochdruck und die daraus resultierenden Erkrankungen und Endorganschädigungen stellen ein großes Problem für die Bevölkerung und die Gesundheitssysteme dar (Wenzel

## Diskussion

*et al.*, 2021). Neuere Daten haben gezeigt, dass das Komplementsystem eine Rolle bei Bluthochdruck spielen könnte (Weiss *et al.*, 2016; Wenzel *et al.*, 2020). Die hier präsentierten Daten hatten zur Aufgabe, die Rolle Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR2 bei Bluthochdruck näher zu beleuchten. Zusammengefasst ist zu sagen, dass die Defizienz von C3aR und die Doppeldefizienz von C3aRxC5aR2 nur einen geringen Einfluss auf die Entwicklung von Bluthochdruck bei der Maus hatte. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR2 bei Bluthochdruck und hypertensiven Endorganschäden kaum bis keine Rolle spielen.

### 6. Zusammenfassung

Bluthochdruck und die daraus resultierenden Endorganschäden stellen, epidemiologisch gesehen, das höchste Gesundheitsrisiko für die Bevölkerung dar (GBD 2016, 2017; Mills et al., 2020). Trotz guter Fortschritte in der Therapie von Bluthochdruck gibt es noch immer Therapieresistenzen diverser Art. Es wurde gezeigt, dass das adaptive Immunsystem eine Rolle bei Bluthochdruck spielt (Guzik et al., 2007). Zudem gibt es neuere Erkenntnisse, die zeigen, dass das Komplementsystem, ein Teil des angeborenen Immunsystems, ebenfalls eine Rolle bei der Bluthochdruck spielt (Weiss et al., 2016; Wenzel et al., 2020). Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR2 bei Hypertonie zu untersuchen. Hierfür kamen 2 Bluthochdruck-Modelle in der Maus zum Einsatz (Ang II und DOCA). Zu untersuchende Parameter dieser Arbeit waren der Blutdruck (non-invasiv mittels Tail-cuff), die Nierenfunktion (minimal invasive GFR-Messung), Nieren- und Herzgewichte, Albuminurie, Durchflusszytometrie, Expression von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Genen, sowie histologische Quantifizierung der Herz- und Nierenschäden. Zur Lokalisation von C3aR wurden tdTomato-Reportermause verwendet.

Zusammengefasst ist zu sagen, dass die Defizienz von C3aR und die Doppeldefizienz von C3aRxC5aR2 kaum Einfluss auf die Entwicklung von Bluthochdruck und hypertensiven Endorganschäden bei der Maus hatte. C3aR und C3aRxC5aR2 sind damit kein Ziel bei neuen Therapieansätzen der arteriellen Hypertonie.

## Summary

### 7. Summary

From an epidemiological point of view, hypertension and resulting hypertensive end-organ damage remain an important global health issue (GBD 2016, 2017; Mills et al., 2020). Despite the progress in the treatment of hypertension, there is still resistance to therapies of various kinds. It has been shown that adaptive immunity plays a role in hypertension (Guzik et al., 2007). Moreover, new insights show that the complement system, a part of innate immunity, also plays a role in hypertension (Weiss et al., 2016; Wenzel et al., 2020). The purpose of this work was to investigate whether the anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR2 play a role in hypertension and, therefore, could be used as new therapy targets. For this purpose, we used 2 different models of hypertension (Ang II and DOCA). Target parameters in this work were blood pressure (non-invasive via tail cuff), kidney function (minimal invasive GFR measurement), kidney and heart weights, albuminuria, flow cytometry, expression of pro-inflammatory and pro-fibrotic genes, as well as histological quantification of heart and kidney damage. For localisation of C3aR, tdTomato reporter mice were used.

To conclude, the deficiency of C3aR and the double deficiency of C3aRxC5aR2 have barely any effect on the development of hypertension and hypertensive end organ damage in mice. Therefore, C3aR and C3aRxC5aR2 are not targets for new therapies in arterial hypertension.

## Abkürzungen

### 8. Abkürzungen

ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APC	Antigen präsentierende Zelle
AUC	Area under the curve
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
C3aR	Komplementfaktor C3a Rezeptor
C5aR1	Komplementfaktor C5a Rezeptor 1
C5aR2	Komplementfaktor C5a Rezeptor 2
C5L2	C5a-like receptor 2
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium 2 Ionen
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCL2	CC-Chemokin-Ligand-2
CD11b	Cluster of Differentiation 11b
CD11c	Cluster of Differentiation 11c
CD3	Cluster of Differentiation 3
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD45	Cluster of Differentiation 45
CD8	Cluster of Differentiation 8
CD88	Cluster of Differentiation 88
CL-11	Collectin 11
CR1	Komplementrezeptor 1
CR2	Komplementrezeptor 2
DAMP	Schaden-assoziierte Molekül Struktur
DAPI	4',6-diamindino-2-phenylindole
DC	Dendritische Zellen
DOCA	Deoxycorticosteron Acetat
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
ERK1/2	Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FB	Komplement Factor B
Fcn	Ficolin
FD	Komplement Factor D
FSC-A	Forwards scatter area
GFR	glomerulären Filtrationsrate

## Abkürzungen

GPR77	G-Protein Coupled Receptor 77
HRP	horseradish peroxidase
IFN- $\gamma$	Interferon-Gamma
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-1	Interleukin 1
IL-12	Interleukin 12
IL-17A	Interleukin 17A
IL-18	Interleukin 18
IL-1 $\beta$	Interleukin 1Beta
IL-2	Interleukin 2
IL-23	Interleukin 23
kDa	Kilo-Dalton
Ly6C	lymphocyte antigen 6 complex, locus C1
Ly6G	lymphocyte antigen 6 complex, locus G
MAC	Membran-Attack-Komplex
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinasen
MASP	MBL-assoziiertes Protein
MBL	Mannose-Bindungs-Lektin
MHCII	Major histocompatibility complex 2
NGAL	Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin
NK Zellen	Natürliche Killer Zellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Zellen
NLRP3	NOD-, LRR und Pyrin Domänen-beinhaltendes Protein 3
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
PAS	Periodsäure Färbung
PC1	Proprotein Convertase 1
PKA	Proteinkinase A
PT	Pertussis Toxin
qPCR	quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Rag1	Rekombinase-Aktivierungsgen 1
SRFG	Sirius Rot - Fast Green Färbung
SSC-A	Sitewarts scatter area
tdTomato	tandem repeat Tomato
TH1	T-Helferzelle Typ 1

## Abkürzungen

TH17	T-Helferzelle Typ 17
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor-Alpha
Tregs	Regulatorische T-Zellen
Urea-N	Harnstoff

### 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Komplementsystems. _____	9
Abbildung 2: Komplementsystem und das adaptive Immunsystem. _____	16
Abbildung 3: Versuchsablauf des Angiotensin II Hochdruckmodells. _____	23
Abbildung 4: Versuchsablauf des DOCA Hochdruckmodells. _____	24
Abbildung 5: GFR-Messgeräte und Beispiel zweier GFR-Kurven. _____	26
Abbildung 6: Gating Strategie des Monozyten-Makrophagen Panels. _____	29
Abbildung 7: Gating Strategie des T-Zell und Zytokine Panels. _____	32
Abbildung 8: Beispiel einer PAS Färbung anhand einer hypertensive geschädigten Niere im DOCA-Salz Modell. _____	35
Abbildung 9: Beispiel des Fibrose Scorings anhand von Sirius Rot – Fast Green Färbungen. _____	36
Abbildung 10: C3aR – Konfokalmikroskopie von tdTomato-C3aR Nierenschnitten. ____	39
Abbildung 11: C3aR – Durchflusszytometrie der Monozyten-Makrophagen Gatings von renalen tdTomato-C3aR Zellen. _____	40
Abbildung 12: C3aR – Ergebnisse der renalen tdTomato-C3aR-Durchflusszytometrie vom Monozyten-Makrophagen-Panel dargestellt in Mengendiagrammen ____	41
Abbildung 13: C3aR – Ergebnisse der kardialen tdTomato-C3aR-Durchflusszytometrie vom Monozyten-Makrophagen-Panel dargestellt in Mengendiagrammen. 42	
Abbildung 14: C3aR – Durchflusszytometrie des T-Zell Gatings von renalen tdTomato- C3aR Leukozyten. _____	43
Abbildung 15: C3aR – Ergebnisse der renalen tdTomato-C3aR-Durchflusszytometrie vom T-Zell-Panel dargestellt in Mengendiagrammen. _____	44
Abbildung 16: C3aR – Ergebnisse der kardialen tdTomato-C3aR-Durchflusszytometrie vom T-Zell-Panel dargestellt in Mengendiagrammen. _____	44
Abbildung 17: C3aR – Systolischer Blutdruck im Verlauf und als AUC unter Ang II- Hochdruck. _____	46
Abbildung 18: C3aR – Kaplan-Meyer Kurve der Mäuse unter Ang II-Hochdruck. _____	46
Abbildung 19: C3aR – Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) unter Ang II-Hochdruck. ____	47
Abbildung 20: C3aR – Verlauf und AUC der Albuminurie unter Ang II-Hochdruck. ____	48
Abbildung 21: C3aR – Blutplasmawerte von Cholesterin und Urea-N unter Ang II- Hochdruck. _____	49
Abbildung 22: C3aR – Körper- und Nierengewichte unter Ang II-Hochdruck. _____	50
Abbildung 23: C3aR – Histologische Beurteilung von Nierengewebe unter Ang II- Hochdruck. _____	51
Abbildung 24: C3aR – PAS-gefärbte Nierenhistologien im Ang II-Hochdruckmodell. ____	52

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 25: C3aR – Quantitative Real-Time PCR von Nierengewebe unter Ang II-Hochdruck. _____	53
Abbildung 26: C3aR – Komplementfaktoren in der Niere unter Ang II-Hochdruck. _____	54
Abbildung 27: C3aR – Durchflusszytometrische Analyse des Monozyten-Makrophagen-Panels im Ang II Modell. _____	55
Abbildung 28: C3aR – Herzgewichte unter Ang II-Hochdruck. _____	56
Abbildung 29: C3aR – Semiquantitative Beurteilung kardialer Fibrose unter Ang II-Hochdruck. _____	56
Abbildung 30: C3aR – SRFG-gefärbte Herzhistologien im Ang II-Hochdruckmodell. _____	57
Abbildung 31: C3aR – Quantitative Real-Time PCR von Herzgewebe unter Ang II-Hochdruck. _____	58
Abbildung 32: C3aR – Systolischer Blutdruck im DOCA-Hochdruck. _____	59
Abbildung 33: C3aR – Kaplan-Meyer-Kurve der C3aR-defizienten Mäuse im DOCA-Hochdruckmodell. _____	60
Abbildung 34: C3aR – Glomeruläre Filtrationsrate im DOCA-Salz Modell. _____	61
Abbildung 35: C3aR – Albuminurie im Verlauf und als AUC im DOCA-Salz Modell. _____	61
Abbildung 36: C3aR – Blutplasmawerte Urea-N unter DOCA-Hochdruck. _____	62
Abbildung 37: C3aR – Körper- und Nierengewichte unter DOCA-Hochdruck. _____	62
Abbildung 38: C3aR – Histologische Beurteilung von Nierengewebe unter DOCA-Hochdruck. _____	63
Abbildung 39: C3aR – PAS-gefärbte Nierenhistologien im DOCA-Salz Modell. _____	63
Abbildung 40: C3aR – Quantitative Real-Time PCR von Nierengewebe unter DOCA-Hochdruck. _____	64
Abbildung 41: C3aR – Komplementfaktoren in der Niere unter DOCA-Hochdruck. _____	65
Abbildung 42: C3aR – Durchflusszytometrische Analyse des Monozyten-Makrophagen-Panels unter DOCA-Hochdruck. _____	66
Abbildung 43: C3aR – Herzgewichte unter DOCA-Hochdruck. _____	67
Abbildung 44: C3aR – Semiquantitative Beurteilung kardialer Fibrose unter DOCA-Hochdruck. _____	67
Abbildung 45: C3aR – SRFG-gefärbte Herzhistologien im DOCA-Salz Modell _____	68
Abbildung 46: C3aR – Quantitative Real-Time PCR von Herzgewebe unter DOCA-Hochdruck. _____	68
Abbildung 47: C3aRxC5aR2 – Systolischer Blutdruck im Verlauf und als AUC unter Ang II-Hochdruck. _____	70
Abbildung 48: C3aRxC5aR2 – Kaplan-Meyer-Kurve der C3aRxC5aR2-defizienten Mäuse im Ang II-Hochdruckmodell. _____	71
Abbildung 49: C3aRxC5aR2 – Glomeruläre Filtrationsrate im Ang II-Hochdruckmodell. _____	72

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 50: C3aRxC5aR2 – Albuminurie im Verlauf und als AUC unter Ang II-Hochdruck. _____	72
Abbildung 51: C3aRxC5aR2 – Blutplasmawerte von Cholesterin und Urea-N unter Ang II-Hochdruck. _____	73
Abbildung 52: C3aRxC5aR2 – Körper- und Nierengewichte unter Ang II-Hochdruck. ____	73
Abbildung 53: C3aRxC5aR2 – Histologische Beurteilung von Nierengewebe unter Ang II-Hochdruck. _____	74
Abbildung 54: C3aRxC5aR2 – PAS-gefärbte Nierenhistologien im Ang II-Hochdruckmodell. _____	75
Abbildung 55: C3aRxC5aR2 – Quantitative Real-Time PCR von Nierengewebe unter Ang II-Hochdruck. _____	75
Abbildung 56: C3aRxC5aR2 – Komplementfaktoren in der Niere unter Ang II-Hochdruck.	76
Abbildung 57: C3aRxC5aR2 – Durchflusszytometrische Analyse des Monozyten-Makrophagen-Panels unter Ang II-Hochdruck. _____	77
Abbildung 58: C3aRxC5aR2 – Körper- und Herzgewichte unter Ang II-Hochdruck. ____	78
Abbildung 59: C3aRxC5aR2 – Semiquantitative Beurteilung kardialer Fibrose unter Ang II-Hochdruck. _____	78
Abbildung 60: C3aRxC5aR2 – SRFG-gefärbte Herzhistologien im Ang II-Hochdruckmodell. _____	79
Abbildung 61: C3aRxC5aR2 – Quantitative Real-Time PCR von Herzgewebe unter Ang II-Hochdruck. _____	80
Abbildung 62: C3aRxC5aR2 – Kaplan-Meier-Kurve der C3aRxC5aR2-defizienten Mäuse im DOCA-Salz Modell. _____	81
Abbildung 63: C3aRxC5aR2 – Glomeruläre Filtrationsrate im DOCA-Salz Modell. ____	82
Abbildung 64: C3aRxC5aR2 – Albuminurie im Verlauf und als AUC unter DOCA-Hochdruck. _____	82
Abbildung 65: C3aRxC5aR2 – Blutplasmawerte von Cholesterin und Urea-N unter DOCA-Hochdruck. _____	83
Abbildung 66: C3aRxC5aR2 – Körper- und Nierengewichte unter DOCA-Hochdruck. ____	83
Abbildung 67: C3aRxC5aR2 – Histologische Beurteilung von Nierengewebe unter DOCA-Hochdruck. _____	84
Abbildung 68: C3aRxC5aR2 – PAS-gefärbte Nierenhistologien im DOCA-Salz Modell.	85
Abbildung 69: C3aRxC5aR2 – Quantitative Real-Time PCR von Nierengewebe unter DOCA-Hochdruck. _____	85
Abbildung 70: C3aRxC5aR2 – Komplementfaktoren in der Niere unter DOCA-Hochdruck.	86

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 71: C3aRxC5aR2 – Körper- und Herzgewichte unter DOCA-Hochdruck. ____	87
Abbildung 72: C3aRxC5aR2 – Semiquantitative Beurteilung kardialer Fibrose unter DOCA-Hochdruck. _____	88
Abbildung 73: C3aRxC5aR2 – SRFG-gefärbte Herzhistologien im DOCA-Salz Modell.	88
Abbildung 74: C3aRxC5aR2 – Quantitative Real-Time PCR von Herzgewebe unter DOCA-Hochdruck. _____	89
Abbildung 75: C3aR - Renale Real-Time PCR-Analyse unter Ang II-Hochdruck ____	122
Abbildung 76: C3aR - Durchflusszytometrie-Analyse von renalen Lymphozyten unter Ang II-Hochdruck _____	122
Abbildung 77: C3aR - Durchflusszytometrie-Analyse der relativen medianen Fluoreszenz-Intensität von renalen Lymphozyten unter Ang II-Hochdruck _____	123
Abbildung 78: C3aR - Kardiale Real-Time PCR-Analyse unter Ang II-Hochdruck ____	123
Abbildung 79: C3aR - Durchflusszytometrie-Analyse von kardialen Leukozyten unter Ang II-Hochdruck _____	124
Abbildung 80: C3aR - Renale Real-Time PCR-Analyse unter DOCA-Hochdruck ____	124
Abbildung 81: C3aR - Durchflusszytometrie-Analyse von renalen Lymphozyten unter DOCA-Hochdruck _____	125
Abbildung 82: C3aR - Durchflusszytometrie-Analyse der relativen medianen Fluoreszenz-Intensität von renalen Lymphozyten unter DOCA-Hochdruck ____	126
Abbildung 83: C3aR - Kardiale Real-Time PCR-Analyse unter DOCA-Hochdruck ____	126
Abbildung 84: C3aRxC5aR2 - Renale Real-Time PCR-Analyse unter Ang II-Hochdruck _____	126
Abbildung 85: C3aRxC5aR2 - Kardiale Real-Time PCR-Analyse unter Ang II-Hochdruck _____	127
Abbildung 86: C3aRxC5aR2 - Durchflusszytometrie-Analyse von renalen Lymphozyten unter Ang II-Hochdruck _____	127
Abbildung 87: C3aRxC5aR2 - Durchflusszytometrie-Analyse der relativen medianen Fluoreszenz-Intensität von renalen Lymphozyten unter Ang II-Hochdruck _____	128
Abbildung 88: C3aRxC5aR2 - Durchflusszytometrie-Analyse von renalen Lymphozyten unter DOCA-Hochdruck _____	128
Abbildung 89: C3aRxC5aR2 - Durchflusszytometrie-Analyse der relativen medianen Fluoreszenz-Intensität von renalen Lymphozyten unter DOCA-Hochdruck _____	129
Abbildung 90: C3aRxC5aR2 - Durchflusszytometrie-Analyse von kardialen Lymphozyten unter DOCA-Hochdruck _____	129

## 10. Publikationsliste

Luettgies K, **Bode M**, Diemer JN, Schwanbeck J, Wirth EK, Klopffleisch R, Kappert K, Thiele A, Ritter D, Foryst-Ludwig A, Kolkhof P, Wenzel UO, & Kintscher U (2022). Finerenone Reduces Renal ROR $\gamma$ t  $\gamma$  $\delta$  T Cells and Protects against Cardiorenal Damage. *Am J Nephrol* 53: 552-564.

Rosendahl A, Kabiri R, **Bode M**, Cai A, Klinge S, Ehmke H, Mittrücker H, & Wenzel UO (2019). Adaptive immunity and IL-17A are not involved in the progression of chronic kidney disease after 5/6 nephrectomy in mice. *Br J Pharmacol* 176: 2002-2014.

Seniuk A, Thiele JL, Stubbe A, Oser P, Rosendahl A, **Bode M**, Meyer-Schwesinger C, Wenzel UO, & Ehmke H (2020). B6.Rag1 Knockout Mice Generated at the Jackson Laboratory in 2009 Show a Robust Wild-Type Hypertensive Phenotype in Response to Ang II (Angiotensin II). *Hypertension* 75: 1110-1116.

van der Heijden C, **Bode M**, Riksen NP, & Wenzel UO (2022). The role of the mineralocorticoid receptor in immune cells in cardiovascular disease. *Br J Pharmacol* 179: 3135-3151.

Wenzel UO, **Bode M**, Kohl J, & Ehmke H (2017). A pathogenic role of complement in arterial hypertension and hypertensive end organ damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 312: H349-H354.

Wenzel UO, **Bode M**, Kurts C, & Ehmke H (2019). Salt, inflammation, IL-17 and hypertension. *Br J Pharmacol* 176: 1853-1863.

Wenzel UO, Ehmke H, & **Bode M** (2021). Immune mechanisms in arterial hypertension. Recent advances. *Cell Tissue Res*.

Wenzel UO, Kemper C, & **Bode M** (2020). The role of complement in arterial hypertension and hypertensive end organ damage. *Br J Pharmacol*.

**Bode M**, Kirkerup P, Herrnstadt G, Ehmke H, Köhl J, Wiech T, Wenzel UO (in progress). Deficiency of Complement C3a and C5a Receptors does not prevent angiotensin II-induced hypertension and hypertensive end organ damage.

## **11. Kongressbeiträge**

- **International Complement Workshop (Santa Fe, Sept. 2018)**

Vortrag und Travel-Award – „The complement receptor C5aR2 is protective in hypertensive end organ damage“

- **II Joint Meeting of the German Society for Immunology (DGfI) and the Italian Society of Immunology, Clinical Immunology and Allergology (SIICA) (München, Sept. 2019)**

Posterpräsentation – „Deficiency of anaphylatoxin receptors C5aR2 and C3aR aggravates hypertensive renal injury“

- **Kidney Week of American Society of Nephrology (ASN) (Washington DC, 2019)**

Posterpräsentation – „Deficiency of anaphylatoxin receptors C5aR2 and C3aR aggravates hypertensive renal injury“

### 12. Literaturverzeichnis

Abe T, & Fujimori T (2013). Reporter mouse lines for fluorescence imaging. *Dev Growth Differ* 55: 390-405.

Ahadzadeh E, Rosendahl A, Czesla D, Steffens P, Prussner L, Meyer-Schwesinger C, Wanner N, Paust HJ, Huber TB, Stahl RAK, Wiech T, Kurts C, Seniuk A, Ehmke H, & Wenzel UO (2018). The chemokine receptor CX3CR1 reduces renal injury in mice with angiotensin II-induced hypertension. *American journal of physiology Renal physiology* 315: F1526-F1535.

Arbore G, West EE, Spolski R, Robertson AA, Klos A, Rheinheimer C, Dutow P, Woodruff TM, Yu ZX, O'Neill LA, Coll RC, Sher A, Leonard WJ, Kohl J, Monk P, Cooper MA, Arno M, Afzali B, Lachmann HJ, Cope AP, Mayer-Barber KD, & Kemper C (2016). T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4(+) T cells. *Science* 352: aad1210.

Asgari E, Le Friec G, Yamamoto H, Perucha E, Sacks SS, Köhl J, Cook HT, & Kemper C (2013). C3a modulates IL-1 $\beta$  secretion in human monocytes by regulating ATP efflux and subsequent NLRP3 inflammasome activation. *Blood* 122: 3473-3481.

Bamberg CE, Mackay CR, Lee H, Zahra D, Jackson J, Lim YS, Whitfeld PL, Craig S, Corsini E, & Lu B (2010). The C5a receptor (C5aR) C5L2 is a modulator of C5aR-mediated signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 285: 7633-7644.

Barnum SR, Bubeck D, & Schein TN (2020). Soluble membrane attack complex: biochemistry and immunobiology. *Front Immunol* 11: 585108.

Bernstein KE, Khan Z, Giani JF, Cao DY, Bernstein EA, & Shen XZ (2018). Angiotensin-converting enzyme in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Nephrol* 14: 325-336.

Bigiarelli KJ (2022). Rodent Thermoregulation: Considerations for Tail-Cuff Blood Pressure Measurements. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 61: 406-411.

Bokisch VA, & Müller-Eberhard HJ (1970). Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *The Journal of clinical investigation* 49: 2427-2436.

Bonilla FA, & Oettgen HC (2010). Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125: S33-40.

Boulay F, Mery L, Tardif M, Brouchon L, & Vignais P (1991). Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells. *Biochemistry* 30: 2993-2999.

Braun MC, Reins RY, Li T-b, Hollmann TJ, Dutta R, Rick WA, Teng B-B, & Ke B (2004). Renal expression of the C3a Receptor and functional responses of primary human proximal tubular epithelial cells. *The Journal of Immunology* 173: 4190-4196.

Brown MJ (2007). Renin: friend or foe? *Heart* 93: 1026-1033.

## Literaturverzeichnis

Cannone V, Cabassi A, Volpi R, & Burnett JC (2019). Atrial Natriuretic Peptide: A Molecular Target of Novel Therapeutic Approaches to Cardio-Metabolic Disease. *Int J Mol Sci* 20.

Chan CT, Sobey CG, Lieu M, Ferens D, Kett MM, Diep H, Kim HA, Krishnan SM, Lewis CV, Salimova E, Tipping P, Vinh A, Samuel CS, Peter K, Guzik TJ, Kyaw TS, Toh BH, Bobik A, & Drummond GR (2015). Obligatory role for B cells in the development of angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension* 66: 1023-1033.

Chen NJ, Mirtsos C, Suh D, Lu YC, Lin WJ, McKerlie C, Lee T, Baribault H, Tian H, & Yeh WC (2007). C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. *Nature* 446: 203-207.

Chioloro A, Maillard M, Nussberger J, Brunner HR, & Burnier M (2000). Proximal sodium reabsorption: An independent determinant of blood pressure response to salt. *Hypertension* 36: 631-637.

Coulthard LG, & Woodruff TM (2015). Is the complement activation product C3a a proinflammatory molecule? Re-evaluating the evidence and the myth. *J Immunol* 194: 3542-3548.

Cravedi P, Leventhal J, Lakhani P, Ward SC, Donovan MJ, & Heeger PS (2013). Immune cell-derived C3a and C5a costimulate human T cell alloimmunity. *American Journal of Transplantation* 13: 2530-2539.

Croker DE, Halai R, Fairlie DP, & Cooper MA (2013). C5a, but not C5a-des Arg, induces upregulation of heteromer formation between complement C5a receptors C5aR and C5L2. *Immunology and cell biology* 91: 625-633.

Croker DE, Halai R, Kaeslin G, Wende E, Fehlhaber B, Klos A, Monk PN, & Cooper MA (2014). C5a2 can modulate ERK1/2 signaling in macrophages via heteromer formation with C5a1 and  $\beta$ -arrestin recruitment. *Immunology and cell biology* 92: 631-639.

Das A, Gupta PK, & Rana S (2022). C5aR2 receptor: The genomic twin of the flamboyant C5aR1. *J Cell Biochem*.

Dorans KS, Mills KT, Liu Y, & He J (2018). Trends in prevalence and control of hypertension according to the 2017 american college of cardiology/american heart association (ACC/AHA) guideline. *J Am Heart Assoc* 7.

Drüeke TB, & Devuyst O (2019). Blood pressure measurement in mice: tail-cuff or telemetry? *Kidney International* 96: 36.

Durante A, Peretto G, Laricchia A, Ancona F, Spartera M, Mangieri A, & Cianflone D (2012). Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 18: 981-1004.

## Literaturverzeichnis

Elsner J, Oppermann M, Czech W, Dobos G, Schöpf E, Norgauer J, & Kapp A (1994a). C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. *European journal of immunology* 24: 518-522.

Elsner J, Oppermann M, Czech W, & Kapp A (1994b). C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins.

Engelke C, Wiese AV, Schmutde I, Ender F, Ströver HA, Vollbrandt T, König P, Laumonnier Y, & Köhl J (2014). Distinct roles of the anaphylatoxins C3a and C5a in dendritic Cell-mediated allergic asthma. *The Journal of Immunology* 193: 5387-5401.

Feener EP, Northrup JM, Aiello LP, & King GL (1995). Angiotensin II induces plasminogen activator inhibitor-1 and -2 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. *J Clin Invest* 95: 1353-1362.

Festing MF (1998). Mouse Genome Database (MGD) - Inbred Strains of Mice The Jackson Laboratory.

Finkelman FD, Khodoun MV, & Strait R (2016). Human IgE-independent systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 137: 1674-1680.

Fountain JH, & Lappin SL (2022). Physiology, renin angiotensin system. In StatPearls. StatPearls Publishing: Treasure Island (FL).

Fukuoka Y, & Hugli TE (1988). Demonstration of a specific C3a receptor on guinea pig platelets. *J Immunol* 140: 3496-3501.

Gao H, Neff TA, Guo RF, Speyer CL, Sarma JV, Tomlins S, Man Y, Riedemann NC, Hoesel LM, Younkin E, Zetoune FS, & Ward PA (2005). Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2. *FASEB J* 19: 1003-1005.

Gao S, Cui Z, & Zhao MH (2020). The complement C3a and C3a receptor pathway in kidney diseases. *Front Immunol* 11: 1875.

GBD 2016 RFC (2017). Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 390: 1345-1422.

Gerard NP, & Gerard C (1991). The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* 349: 614-617.

Gerard NP, Lu B, Liu P, Craig S, Fujiwara Y, Okinaga S, & Gerard C (2005). An anti-inflammatory function for the complement anaphylatoxin C5a-binding protein, C5L2. *J Biol Chem* 280: 39677-39680.

## Literaturverzeichnis

Ghosh AK, & Vaughan DE (2012). PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol* 227: 493-507.

Gottschalk C, & Kurts C (2015). The debate about dendritic cells and macrophages in the kidney. *Front Immunol* 6: 435.

Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, & Harrison DG (2007). Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med* 204: 2449-2460.

Hawthornthwaite OA, Li XX, Coulthard LG, Wolvetang EJ, & Woodruff TM (2017). New concepts on the therapeutic control of complement anaphylatoxin receptors. *Molecular immunology* 89: 36-43.

Hill GS (2008). Hypertensive nephrosclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17: 266-270.

Hsu W-C, Yang F-C, Lin C-H, Hsieh S-L, & Chen N-J (2014). C5L2 is required for C5a-triggered receptor internalization and ERK signaling. *Cellular signalling* 26: 1409-1419.

Humbles AA, Lu B, Nilsson CA, Lilly C, Israel E, Fujiwara Y, Gerard NP, & Gerard C (2000). A role for the C3a anaphylatoxin receptor in the effector phase of asthma. *Nature* 406: 998-1001.

Iyer A, Woodruff TM, Wu MC, Stylianou C, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM, & Brown L (2011). Inhibition of inflammation and fibrosis by a complement C5a receptor antagonist in DOCA-salt hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 58: 479-486.

Jama HA, Muralitharan RR, Xu C, O'Donnell JA, Bertagnolli M, Broughton BRS, Head GA, & Marques FZ (2022). Rodent models of hypertension. *Br J Pharmacol* 179: 918-937.

Ji H, Pai AV, West CA, Wu X, Speth RC, & Sandberg K (2017). Loss of resistance to angiotensin II-induced hypertension in the Jackson Laboratory recombination-activating gene null mouse on the C57BL/6J background. *Hypertension* 69: 1121-1127.

Kalant D, Cain SA, Maslowska M, Sniderman AD, Cianflone K, & Monk PN (2003). The chemoattractant receptor-like protein C5L2 binds the C3a des-Arg77/acylation-stimulating protein. *J Biol Chem* 278: 11123-11129.

Karsten CM, Wiese AV, Mey F, Figge J, Woodruff TM, Reuter T, Scurtu O, Kordowski A, Almeida LN, & Briukhovetska D (2017). Monitoring C5aR2 expression using a floxed tdTomato-C5aR2 knock-in mouse. *The Journal of Immunology* 199: 3234-3248.

Kemper C, Atkinson JP, & Hourcade DE (2010). Properdin: Emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annual Review of Immunology* 28: 131-155.

Klos A, Wende E, Wareham KJ, & Monk PN (2013). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXVII. Complement peptide C5a, C4a, and C3a receptors. *Pharmacol Rev* 65: 500-543.

## Literaturverzeichnis

Koenderman L, Buurman W, & Daha MR (2014). The innate immune response. *Immunol Lett* 162: 95-102.

Kolev M, Le Friec G, & Kemper C (2014). Complement--tapping into new sites and effector systems. *Nature reviews Immunology* 14: 811-820.

Krieg C, Weber LM, Fosso B, Marzano M, Hardiman G, Olcina MM, Domingo E, El Aidy S, Mallah K, Robinson MD, & Guglietta S (2022). Complement downregulation promotes an inflammatory signature that renders colorectal cancer susceptible to immunotherapy. *J Immunother Cancer* 10.

Krishnan S, Dowling J, Ling Y, Diep H, Chan C, Ferens D, Kett M, Pinar A, Samuel C, Vinh A, Arumuqam T, Hewitson T, Kemp-Harper B, Robertson A, Cooper M, Latz E, Mansell A, Sobey C, & Drummond G (2016). Inflammasome activity is essential for one kidney/deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension in mice. *British journal of pharmacology* 173: 752-765.

Krishnan SM, Sobey CG, Latz E, Mansell A, & Drummond GR (2014). IL-1 $\beta$  and IL-18: inflammatory markers or mediators of hypertension? *Br J Pharmacol* 171: 5589-5602.

Krishnan V, Xu Y, Macon K, Volanakis JE, & Narayana SV (2009). The structure of C2b, a fragment of complement component C2 produced during C3 convertase formation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65: 266-274.

Kubota Y (1992). The effect of human anaphylatoxins and neutrophils on histamine release from isolated human skin mast cells. *The Journal of dermatology* 19: 19-26.

Kwan W-h, van der Touw W, Paz-Artal E, Li MO, & Heeger PS (2013). Signaling through C5a receptor and C3a receptor diminishes function of murine natural regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine* 210: 257-268.

Laghlam D, Jozwiak M, & Nguyen LS (2021). Renin-angiotensin-aldosterone system and immunomodulation: A state-of-the-art review. *Cells* 10.

Lajoie S, Lewkowich IP, Suzuki Y, Clark JR, Sproles AA, Dienger K, Budelsky AL, & Wills-Karp M (2010). Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. *Nature Immunology* 11: 928-935.

Lee H, Whitfeld PL, & Mackay CR (2008). Receptors for complement C5a. The importance of C5aR and the enigmatic role of C5L2. *Immunol Cell Biol* 86: 153-160.

Li R, Coulthard LG, Wu M, Taylor SM, & Woodruff TM (2013). C5L2: a controversial receptor of complement anaphylatoxin, C5a. *The FASEB Journal* 27: 855-864.

Li XX, Clark RJ, & Woodruff TM (2020). C5aR2 activation broadly modulates the signaling and function of primary human macrophages. *J Immunol* 205: 1102-1112.

## Literaturverzeichnis

Li XX, Lee JD, Kemper C, & Woodruff TM (2019). The complement receptor C5aR2: A powerful modulator of innate and adaptive immunity. *The Journal of Immunology* 202: 3339-3348.

Liszewski MK, Kolev M, Le Friec G, Leung M, Bertram PG, Fara AF, Subias M, Pickering MC, Drouet C, Meri S, Arstila T, Pekkarinen P, Ma M, Cope A, Reinheckel T, Rodriguez de Cordoba S, Afzali B, Atkinson J, & Kemper C (2013a). Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity* 39: 1143-1157.

Liszewski MK, Kolev M, Le Friec G, Leung M, Bertram PG, Fara AF, Subias M, Pickering MC, Drouet C, Meri S, Arstila TP, Pekkarinen PT, Ma M, Cope A, Reinheckel T, Rodriguez de Cordoba S, Afzali B, Atkinson JP, & Kemper C (2013b). Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity* 39: 1143-1157.

Manthey HD, Woodruff TM, Taylor SM, & Monk PN (2009). Complement component 5a (c5a). *The international journal of biochemistry & cell biology* 41: 2114-2117.

Martin U, Bock D, Arseniev L, Tornetta MA, Ames RS, Bautsch W, Köhl J, Ganser A, & Klos A (1997). The human C3a receptor is expressed on neutrophils and monocytes, but not on B or T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 186: 199-207.

Mehta PK, & Griendling KK (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C82-97.

Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, & Roumenina LT (2015). Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol* 6: 262.

Mills KT, Stefanescu A, & He J (2020). The global epidemiology of hypertension. *Nat Rev Nephrol* 16: 223-237.

Min X, Liu C, Wei Y, Wang N, Yuan G, Liu D, Li Z, Zhou W, & Li K (2014). Expression and regulation of complement receptors by human natural killer cells. *Immunobiology* 219: 671-679.

Mizuno M, Blanchin S, Gasque P, Nishikawa K, & Matsuo S (2007). High levels of complement C3a receptor in the glomeruli in lupus nephritis. *American journal of kidney diseases* 49: 598-606.

Möller T, Nolte C, Burger R, Verkhatsky A, & Kettenmann H (1997). Mechanisms of C5a and C3a complement fragment-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signaling in mouse microglia. *J Neurosci* 17: 615-624.

Monk PN, Scola AM, Madala P, & Fairlie DP (2007). Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol* 152: 429-448.

Monsinjon T, Gasque P, Ischenko A, & Fontaine M (2001). C3A binds to the seven transmembrane anaphylatoxin receptor expressed by epithelial cells and triggers the production of IL-8. *FEBS letters* 487: 339-346.

## Literaturverzeichnis

Montaniel KR, & Harrison DG (2016). Is hypertension a bone marrow disease? *Circulation*.

Morgan BP (2000). The complement system: An overview. In *Complement Methods and Protocols*. ed Morgan B.P. Humana Press: Totowa, NJ, pp 1-13.

Murakami Y, Imamichi T, & Nagasawa S (1993). Characterization of C3a anaphylatoxin receptor on guinea-pig macrophages. *Immunology* 79: 633-638.

Nakae H, Endo S, Inada K, Takakuwa T, Kasai T, & Yoshida M (1994). Serum complement levels and severity of sepsis. *Research communications in chemical pathology and pharmacology* 84: 189-195.

Noris M, & Remuzzi G (2009). Atypical hemolytic-uremic syndrome. *The New England journal of medicine* 361: 1676-1687.

Ohno M, Hirata T, Enomoto M, Araki T, Ishimaru H, & Takahashi TA (2000). A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Mol Immunol* 37: 407-412.

Okamoto R, Ali Y, Hashizume R, Suzuki N, & Ito M (2019). BNP as a Major Player in the Heart-Kidney Connection. *Int J Mol Sci* 20.

Okinaga S, Slattery D, Humbles A, Zsengeller Z, Morteau O, Kinrade MB, Brodbeck RM, Krause JE, Choe HR, Gerard NP, & Gerard C (2003). C5L2, a non-signaling C5A binding protein. *Biochemistry* 42: 9406-9415.

Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, Berlowitz DR, Cífková R, Dominiczak AF, Grassi G, Jordan J, Poulter NR, Rodgers A, & Whelton PK (2018). Hypertension. *Nat Rev Dis Primers* 4: 18014.

Palomino DC, & Marti LC (2015). Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)* 13: 469-473.

Pandey S, Kumari P, Baidya M, Kise R, Cao Y, Dwivedi-Agnihotri H, Banerjee R, Li XX, Cui CS, Lee JD, Kawakami K, Maharana J, Ranjan A, Chaturvedi M, Jhingan GD, Laporte SA, Woodruff TM, Inoue A, & Shukla AK (2021). Intrinsic bias at non-canonical,  $\beta$ -arrestin-coupled seven transmembrane receptors. *Mol Cell* 81: 4605-4621.e4611.

Patel S, Rauf A, Khan H, & Abu-Izneid T (2017). Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother* 94: 317-325.

Peach MJ, & Dostal DE (1990). The angiotensin II receptor and the actions of angiotensin II. *J Cardiovasc Pharmacol* 16 Suppl 4: S25-30.

## Literaturverzeichnis

Peng Q, Li K, Smyth LA, Xing G, Wang N, Meader L, Lu B, Sacks SH, & Zhou W (2012). C3a and C5a promote renal ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American Society of Nephrology* 23: 1474-1485.

Poursharifi P, Lapointe M, Pétrin D, Devost D, Gauvreau D, Hébert TE, & Cianflone K (2013). C5L2 and C5aR interaction in adipocytes and macrophages: insights into adipoinmunology. *Cellular Signalling* 25: 910-918.

Qu H, Ricklin D, & Lambris JD (2009). Recent developments in low molecular weight complement inhibitors. *Mol Immunol* 47: 185-195.

Quell KM, Karsten CM, Kordowski A, Almeida LN, Briukhovetska D, Wiese AV, Sun J, Ender F, Antoniou K, Schroder T, Schmutde I, Berger JL, Konig P, Vollbrandt T, Laumonnier Y, & Kohl J (2017). Monitoring C3aR expression using a floxed tdTomato-C3aR reporter knock-in mouse. *J Immunol* 199: 688-706.

Ricklin D, Mastellos DC, Reis ES, & Lambris JD (2018). The renaissance of complement therapeutics. *Nature Reviews Nephrology* 14: 26.

Ricklin D, Reis ES, Mastellos DC, Gros P, & Lambris JD (2016). Complement component C3 - The "Swiss Army Knife" of innate immunity and host defense. *Immunol Rev* 274: 33-58.

Santos RAS, Oudit GY, Verano-Braga T, Canta G, Steckelings UM, & Bader M (2019). The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 316: H958-h970.

Sarma JV, & Ward PA (2011). The complement system. *Cell and tissue research* 343: 227-235.

Sauter RJ, Sauter M, Obrich M, Emschermann FN, Nording H, Patzelt J, Wendel HP, Reil JC, Edlich F, & Langer HF (2019). Anaphylatoxin receptor C3aR contributes to platelet function, thrombus formation and In vivo haemostasis. *Thromb Haemost* 119: 179-182.

Sauter RJ, Sauter M, Reis ES, Emschermann FN, Nording H, Ebenhöch S, Kraft P, Münzer P, Mauler M, Rheinlaender J, Madlung J, Edlich F, Schäffer TE, Meuth SG, Duerschmied D, Geisler T, Borst O, Gawaz M, Kleinschnitz C, Lambris JD, & Langer HF (2018). Functional relevance of the anaphylatoxin receptor C3aR for platelet function and arterial thrombus formation marks an intersection point between innate immunity and thrombosis. *Circulation* 138: 1720-1735.

Scarfe L, Schock-Kusch D, Ressel L, Friedemann J, Shulhevich Y, Murray P, Wilm B, & de Caestecker M (2018). Transdermal measurement of glomerular filtration rate in mice. *J Vis Exp*.

Schanzenbacher J, Köhl J, & Karsten CM (2022). Anaphylatoxins spark the flame in early autoimmunity. *Front Immunol* 13: 958392.

## Literaturverzeichnis

Schock-Kusch D, Geraci S, Ermeling E, Shulhevich Y, Sticht C, Hesser J, Stsepankou D, Neudecker S, Pill J, Schmitt R, & Melk A (2013). Reliability of transcutaneous measurement of renal function in various strains of conscious mice. *PLoS One* 8: e71519.

Schraufstatter IU, Trieu K, Sikora L, Sriramarao P, & DiScipio R (2002). Complement c3a and c5a induce different signal transduction cascades in endothelial cells. *J Immunol* 169: 2102-2110.

Scola A-M, Johswich K-O, Morgan BP, Klos A, & Monk PN (2009a). The human complement fragment receptor, C5L2, is a recycling decoy receptor. *Molecular immunology* 46: 1149-1162.

Scola AM, Johswich KO, Morgan BP, Klos A, & Monk PN (2009b). The human complement fragment receptor, C5L2, is a recycling decoy receptor. *Mol Immunol* 46: 1149-1162.

Seccia TM, Caroccia B, & Calò LA (2017). Hypertensive nephropathy. Moving from classic to emerging pathogenetic mechanisms. *J Hypertens* 35: 205-212.

Seniuk A, Thiele JL, Stubbe A, Oser P, Rosendahl A, Bode M, Meyer-Schwesinger C, Wenzel UO, & Ehmke H (2020). B6.Rag1 knockout mice generated at the Jackson Laboratory in 2009 show a robust wild-type hypertensive phenotype in response to ang II (angiotensin II). *Hypertension* 75: 1110-1116.

Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, & Tsien RY (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22: 1567-1572.

Shang W, & Wang Z (2017). The update of NGAL in acute kidney injury. *Curr Protein Pept Sci* 18: 1211-1217.

Singh GM, Danaei G, Pelizzari PM, Lin JK, Cowan MJ, Stevens GA, Farzadfar F, Khang YH, Lu Y, Riley LM, Lim SS, & Ezzati M (2012). The age associations of blood pressure, cholesterol, and glucose: analysis of health examination surveys from international populations. *Circulation* 125: 2204-2211.

Strainic MG, Liu J, Huang D, An F, Lalli PN, Muqim N, Shapiro VS, Dubyak GR, Heeger PS, & Medof ME (2008). Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunity* 28: 425-435.

Strainic MG, Shevach EM, An F, Lin F, & Medof ME (2013). Absence of signaling into CD4<sup>+</sup> cells via C3aR and C5aR enables autoinductive TGF- $\beta$ 1 signaling and induction of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 14: 162.

Sumida T, Naito AT, Nomura S, Nakagawa A, Higo T, Hashimoto A, Okada K, Sakai T, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee J-K, Minamino T, Offermanns S, Noda T, Botto M, Kobayashi Y, Morita H, Manabe I, Naqai T, Shiojima I, & Komuro I (2015). Complement C1q-induced activation of  $\beta$ -catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling. *Nat Commun* 6: 12.

## Literaturverzeichnis

Swanson KV, Deng M, & Ting JPY (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology* 19: 477-489.

Takabayashi T, Vannier E, Burke JF, Tompkins RG, Gelfand JA, & Clark BD (1998). Both C3a and C3adesArg regulate interleukin-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Infectious Diseases* 177: 1622-1628.

Takabayashi T, Vannier E, Clark BD, Margolis NH, Dinarello CA, Burke JF, & Gelfand JA (1996). A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF-alpha and IL-1 beta synthesis. *The Journal of Immunology* 156: 3455-3460.

Takafuji S, Tadokoro K, & Dahinden CA (1994). Degranulation from human eosinophils stimulated with C3a and C5a. *International archives of allergy and immunology* 104: 27-29.

Vergheze AD, Demir M, Chun N, Fribourg M, Cravedi P, Llaudo I, Woodruff TM, Yadav P, Lira SA, Medof ME, & Heeger PS (2018). T Cell Expression of C5a Receptor 2 Augments Murine Regulatory T Cell (T(REG)) Generation and T(REG)-Dependent Cardiac Allograft Survival. *J Immunol* 200: 2186-2198.

Vibhuti A, Gupta K, Subramanian H, Guo Q, & Ali H (2011). Distinct and shared roles of  $\beta$ -arrestin-1 and  $\beta$ -arrestin-2 on the regulation of C3a receptor signaling in human mast cells. *PLoS One* 6: e19585.

Vignesh P, Rawat A, Sharma M, & Singh S (2017). Complement in autoimmune diseases. *Clin Chim Acta* 465: 123-130.

Walport MJ (2001). Complement. First of two parts. *The New England journal of medicine* 344: 1058-1066.

Weiss S, Rosendahl A, Czesla D, Meyer-Schwesinger C, Stahl RA, Ehmke H, Kurts C, Zipfel PF, Kohl J, & Wenzel UO (2016). The complement receptor C5aR1 contributes to renal damage but protects the heart in angiotensin II-induced hypertension. *American journal of physiology Renal physiology* 310: F1356-1365.

Wenzel U, Turner JE, Krebs C, Kurts C, Harrison DG, & Ehmke H (2016). Immune Mechanisms in Arterial Hypertension. *J Am Soc Nephrol* 27: 677-686.

Wenzel UO, Bode M, Kohl J, & Ehmke H (2017). A pathogenic role of complement in arterial hypertension and hypertensive end organ damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 312: H349-H354.

Wenzel UO, Bode M, Kurts C, & Ehmke H (2019). Salt, inflammation, IL-17 and hypertension. *Br J Pharmacol* 176: 1853-1863.

Wenzel UO, Ehmke H, & Bode M (2021). Immune mechanisms in arterial hypertension. *Recent advances. Cell Tissue Res*: 393-404.

## Literaturverzeichnis

Wenzel UO, Kemper C, & Bode M (2020). The role of complement in arterial hypertension and hypertensive end organ damage. *Br J Pharmacol*: 2849-2862.

Werfel T, Kirchhoff K, Wittmann M, Begemann G, Kapp A, Heidenreich F, Götze O, & Zwirner J (2000). Activated human T lymphocytes express a functional C3a receptor. *The Journal of Immunology* 165: 6599-6605.

Wetsel RA (1995). Structure, function and cellular expression of complement anaphylatoxin receptors. *Curr Opin Immunol* 7: 48-53.

Woodruff TM, Nandakumar KS, & Tedesco F (2011). Inhibiting the C5-C5a receptor axis. *Mol Immunol* 48: 1631-1642.

Wu MC, Brennan FH, Lynch JP, Mantovani S, Phipps S, Wetsel RA, Ruitenberg MJ, Taylor SM, & Woodruff TM (2013). The receptor for complement component C3a mediates protection from intestinal ischemia-reperfusion injuries by inhibiting neutrophil mobilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 9439-9444.

Xiao H, Dairaghi DJ, Powers JP, Ertl LS, Baumgart T, Wang Y, Seitz LC, Penfold ME, Gan L, Hu P, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Schall TJ, Jaen JC, Falk RJ, & Jennette JC (2014). C5a receptor (CD88) blockade protects against MPO-ANCA GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 25: 225-231.

Yatabe J, Yoneda M, Yatabe MS, Watanabe T, Felder RA, Jose PA, & Sanada H (2011). Angiotensin III stimulates aldosterone secretion from adrenal gland partially via angiotensin II type 2 receptor but not angiotensin II type 1 receptor. *Endocrinology* 152: 1582-1588.

Zaal A, van Ham SM, & ten Brinke A (2019). Differential effects of anaphylatoxin C5a on antigen presenting cells, roles for C5aR1 and C5aR2. *Immunology Letters* 209: 45-52.

Zhang C, Li Y, Wang C, Wu Y, Cui W, Miwa T, Sato S, Li H, Song W-C, & Du J (2014a). Complement 5a receptor mediates angiotensin II-induced cardiac inflammation and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34: 1240-1248.

Zhang C, Li Y, Wang C, Wu Y, & Du J (2014b). Antagonist of C5aR prevents cardiac remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *American journal of hypertension* 27: 857-864.

Zhang T, Garstka MA, & Li K (2017). The controversial C5a receptor C5aR2: its role in health and disease. *Journal of immunology research* 2017.

Zipfel PF, & Skerka C (2009). Complement regulators and inhibitory proteins. *Nature reviews Immunology* 9: 729-740.

### 13. Angaben zum individuellen Teil

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

- Versuchsdesign, Versuchsplanung und Diskussion der Daten: gemeinsam mit Prof. Dr. Ulrich Wenzel, Dr. Alva Rosendahl
- Durchführung der operativen Eingriffe: gemeinsam mit Dr. Alva Rosendahl
- Betreuung der Mäuse während des Versuches: gemeinsam mit der Versuchstierhaltung des UKE, Dr. Alva Rosendahl, Stefan Gatzemeier, Paula Steffens, Daniel Czesla, Matin Kohsar, Reza Kabiri, Lennard Prüßner, Anna Cai, The Vinh Luu, Niklas Diemer
- Messung der glomerulären Filtrationsrate: gemeinsam mit Dr. Alva Rosendahl
- Gewinnung der Urinproben mittels Stoffwechsellkäfige: gemeinsam mit Dr. Alva Rosendahl, Stefan Gatzemeier, Paula Steffens, Daniel Czesla, Matin Kohsar, Reza Kabiri, Lennard Prüßner, Anna Cai, The Vinh Luu, Niklas Diemer
- Tail-cuff-Blutdruckmessungen: gemeinsam mit Stefan Matin Kohsar, Reza Kabiri, Lennard Prüßner, Anna Cai, The Vinh Luu, Niklas Diemer
- Albumin ELISA, quantitative Realtime-PCR: gemeinsam mit Stefan Gatzemeier, Paula Steffens, Daniel Czesla, Matin Kohsar, Reza Kabiri, Lennard Prüßner, Anna Cai, The Vinh Luu, Niklas Diemer
- Aufarbeitung der Einzelzellsuspension für die Durchflusszytometrie: gemeinsam mit Dr. Alva Rosendahl, Stefan Gatzemeier, Paula Steffens, Daniel Czesla, Matin Kohsar, Reza Kabiri, Lennard Prüßner, Anna Cai, The Vinh Luu, Niklas Diemer
- Durchführung und Auswertung der Durchflusszytometrie: gemeinsam mit Dr. Alva Rosendahl
- Histopathologische Aufarbeitung der Proben
- Mikroskopische Auswertung der histologischen Schnitte: gemeinsam mit Paula Steffens, Daniel Czesla, Matin Kohsar, Anna Cai, The Vinh Luu, Niklas Diemer, P. Kirkerup
- Planung und Durchführung der statistischen Analyse: gemeinsam mit Prof. Dr. Ulrich Wenzel
- Erstellen der Abbildungen: gemeinsam mit Prof. Dr. Ulrich Wenzel
- Niederschrift der Dissertation, Literaturrecherche und Bewertung der Daten

## **Angaben zum individuellen Teil**

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

- Cholesterin und Blut-Harnstoff-N im Plasma per Autoanalyse: Arbeitsgruppe Tiegs
- Konfokale Mikroskopie der C5ar2-tdTomato-Reportermaus: Prof. Dr. Catherine Meyer-Schwesinger

## Danksagung

### 14. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Wenzel bedanken. Vielen Dank, dass Sie mir über die letzten Jahre Ihr Vertrauen schenken und mir dieses Projekt anvertrauen. Vielen Dank für all die hilfreichen Tipps und Ratschläge, Ihren Pragmatismus, Ihre Spontanität und Ihren Humor. Kurz gefasst: Danke!

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Tobias B. Huber für die Möglichkeit bedanken, meine Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Daneben möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Streit für die Übernahme der Ko-Betreuung bedanken.

Auch danke ich Prof. Dr. Ulf Panzer, Sprecher Sonderforschungsbereiches 1192, sowie Anett Peters die das Umfeld für die wissenschaftliche Arbeit bereitstellten. Insbesondere bedanke ich mich für die vielen Ratschläge und Tipps bezüglich der Durchflusszytometrie bei Dr. rer. nat. Hans-Joachim (Hajo) Paust,

Ich möchte auch Dr. rer. nat. Alva Rosendahl für Arbeit als meine Post-Doc und Lehrerin in Sachen Maus-Chirurgie und Durchflusszytometrie.

Außerdem danke ich der gesamten AG Wenzel mit allen seinen medizinischen Doktoranden und dem sehr stillen aber deutlich schlagenden Herzen, dem technischen Assistenten Herrn Gatzemeier. Vielen Dank, dass du mir über die Jahre „Pinkies Schublade“ ermöglicht hast.

Ferner möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mir Rückhalt und Ablenkung gaben. Insbesondere möchte ich Dr. rer. nat. Anja Tetzner danken, die so unendlich viele Katzen-GIFs über sich ergehen ließ und mit mir jede Pyramide erstürmte.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die über die letzten Jahre immer für mich da wa. Mein ganz besonderer Dank gilt hierbei meinem Vater Dipl. Ing. Jörg Bode, der für sehr viel Zeit in die Korrektur dieser Arbeit investierte und sie jedes einzelne Mal Karl Marx Kapital und Maos Bibel vorzug.

Danke!

## Eidesstattliche Versicherung

### 15. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, 21. Oktober 2022

---

Marlies Bode

16. Anhang  
16.1. Supplemental Data

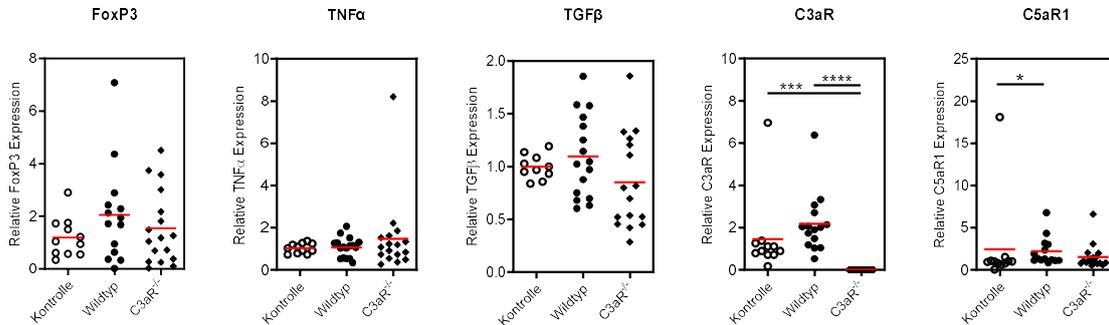


Abbildung 75: C3aR - Renale Real-Time PCR-Analyse unter Ang II-Hochdruck

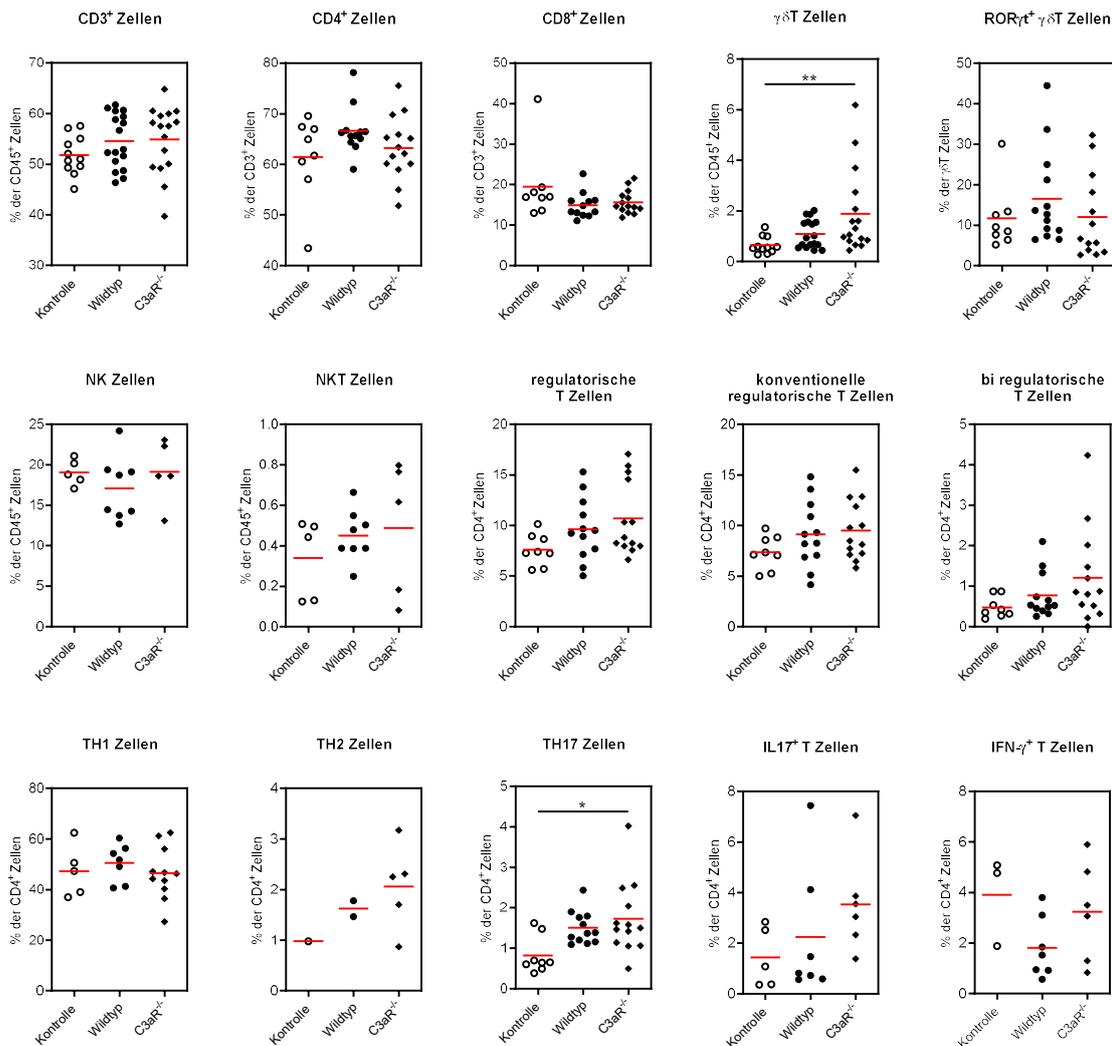
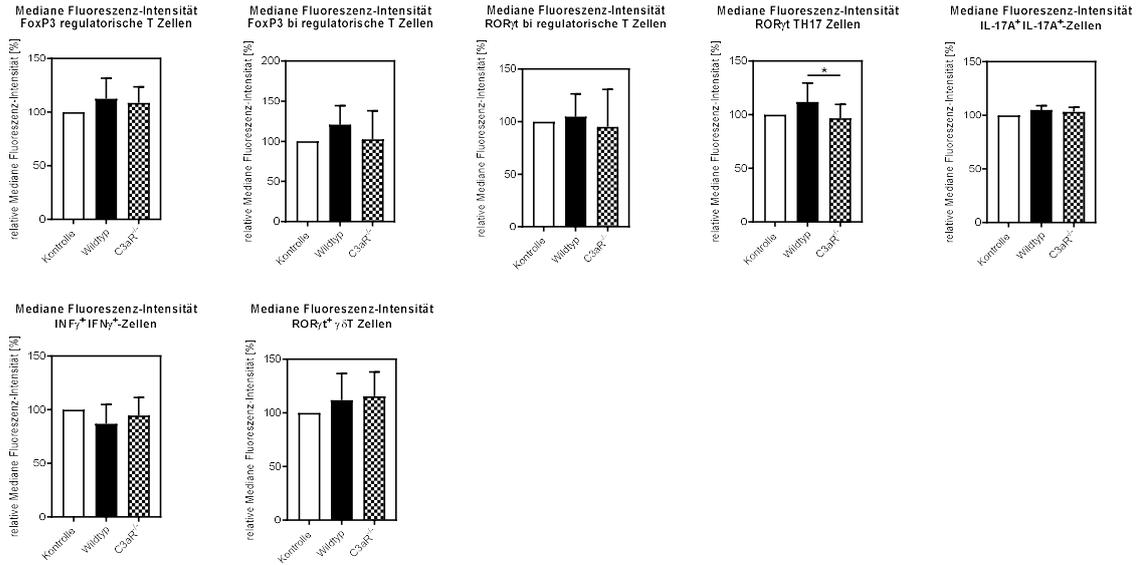
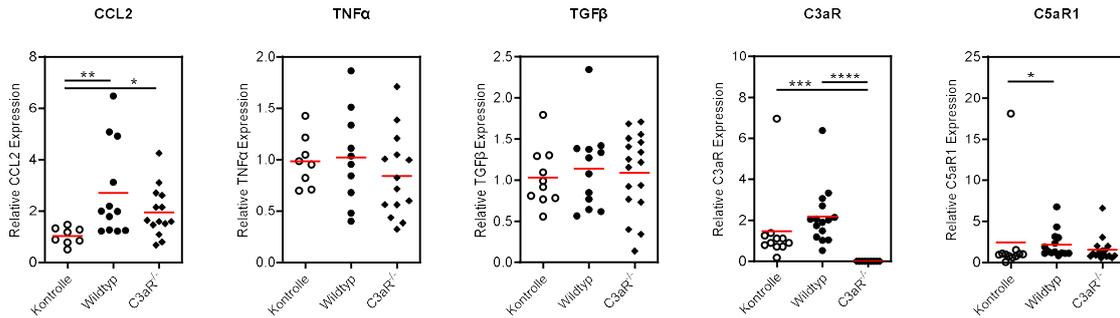


Abbildung 76: C3aR - Durchflusszytometrie-Analyse von renalen Lymphozyten unter Ang II-Hochdruck

# Anhang



**Abbildung 77: C3aR - Durchflusszytometrie-Analyse der relativen medianen Fluoreszenz-Intensität von renalen Lymphozyten unter Ang II-Hochdruck**



**Abbildung 78: C3aR - Kardiale Real-Time PCR-Analyse unter Ang II-Hochdruck**

## Anhang

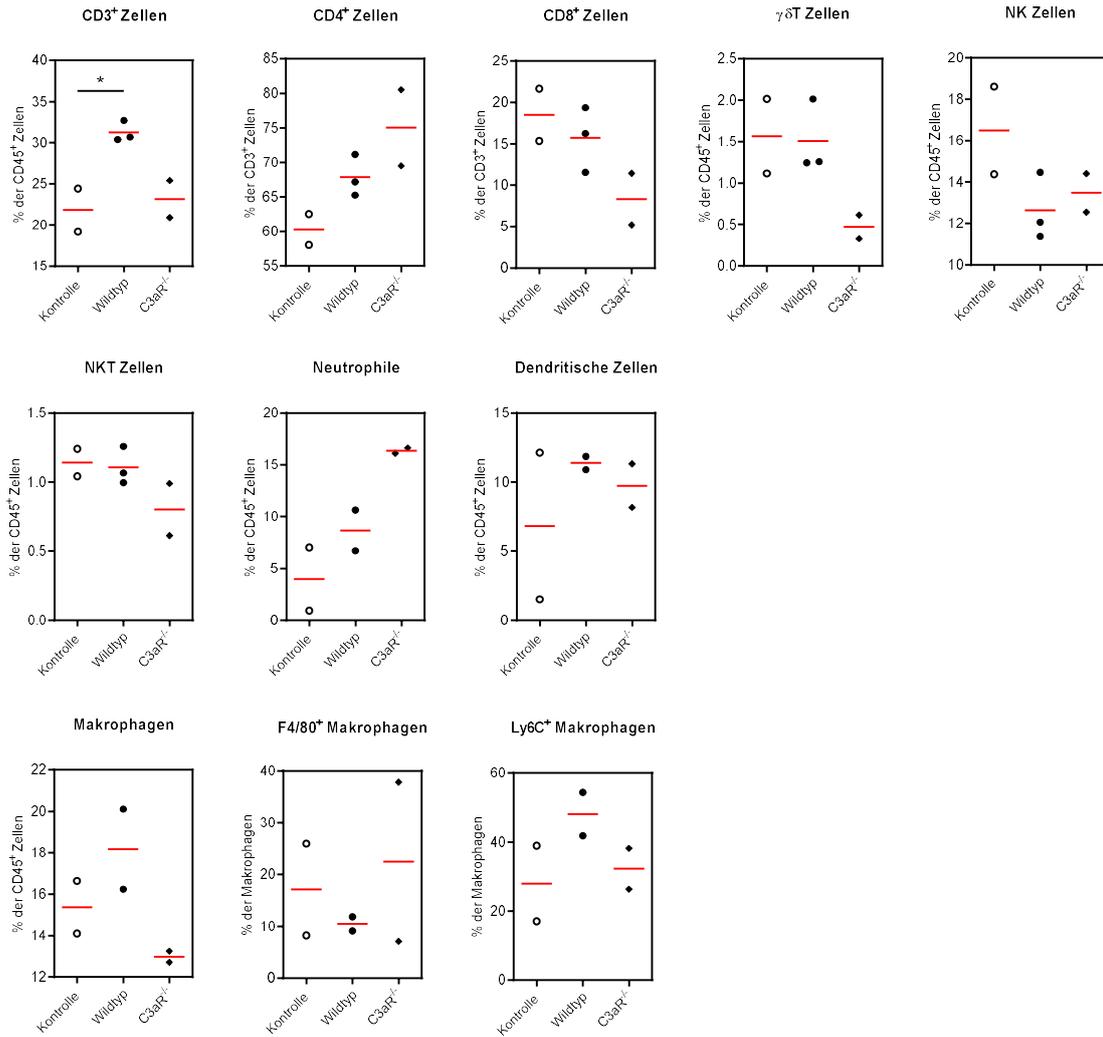


Abbildung 79: C3aR - Durchflusszytometrie-Analyse von kardialen Leukozyten unter Ang II-Hochdruck

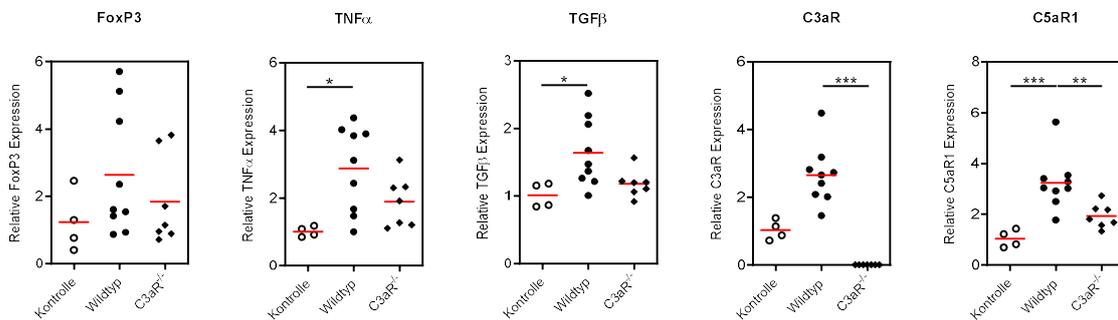


Abbildung 80: C3aR - Renale Real-Time PCR-Analyse unter DOCA-Hochdruck

# Anhang

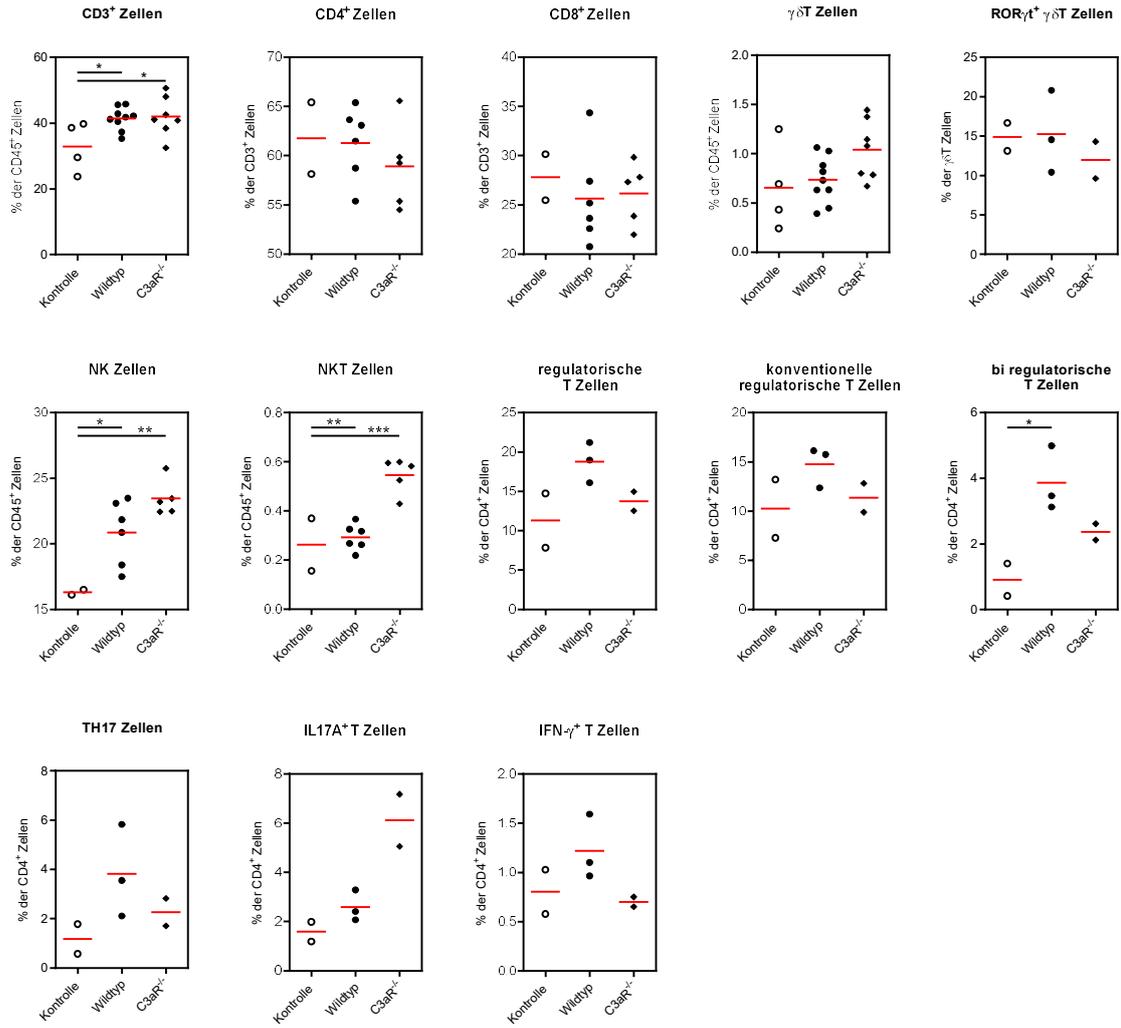
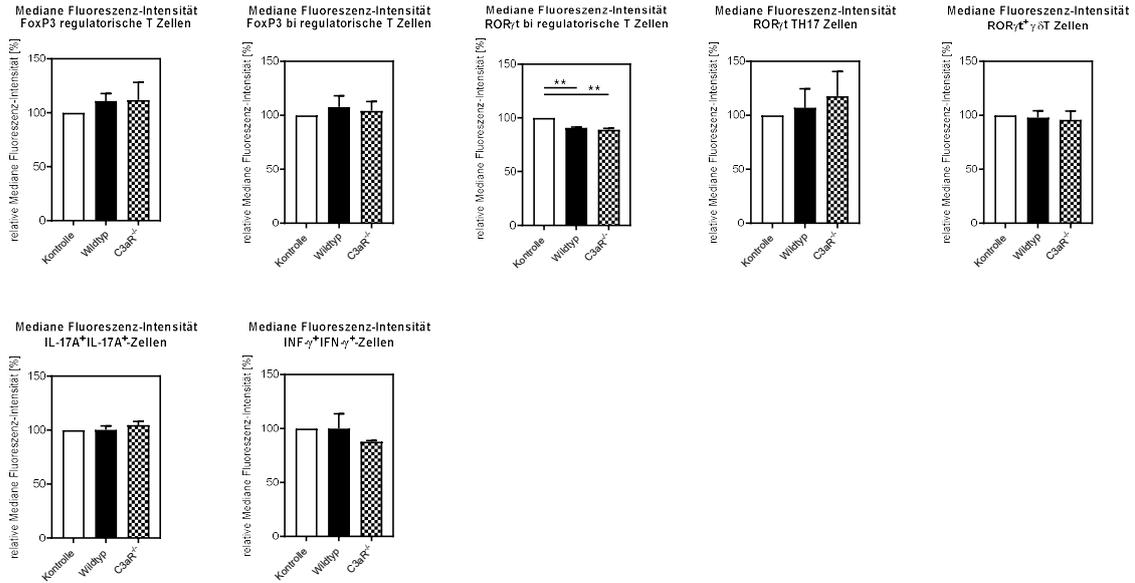
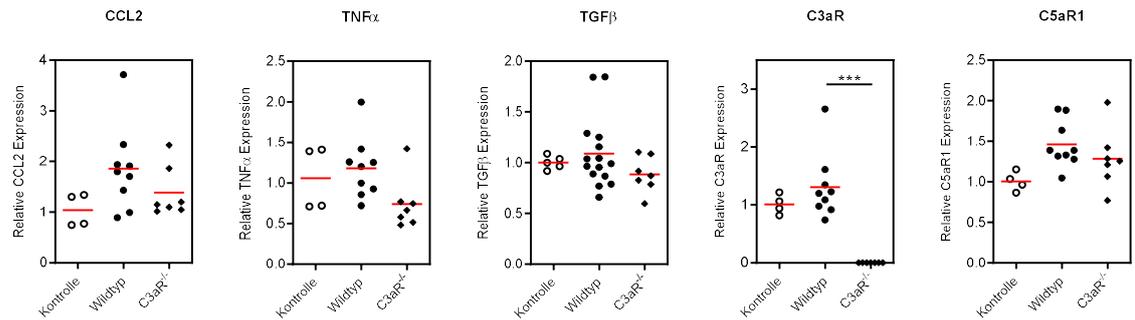


Abbildung 81: C3aR - Durchflusszytometrie-Analyse von renalen Lymphozyten unter DOCA-Hochdruck

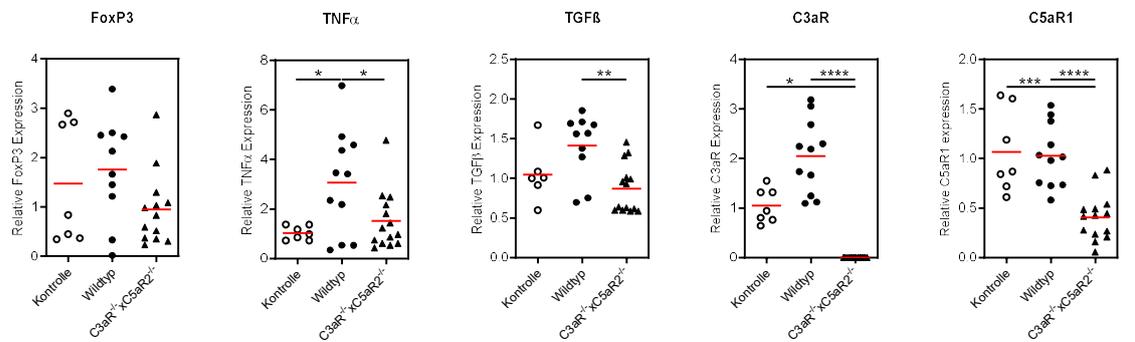
# Anhang



**Abbildung 82: C3aR - Durchflusszytometrie-Analyse der relativen medianen Fluoreszenz-Intensität von renalen Lymphozyten unter DOCA-Hochdruck**



**Abbildung 83: C3aR - Kardiale Real-Time PCR-Analyse unter DOCA-Hochdruck**



**Abbildung 84: C3aRx5aR2 - Renale Real-Time PCR-Analyse unter Ang II-Hochdruck**

# Anhang

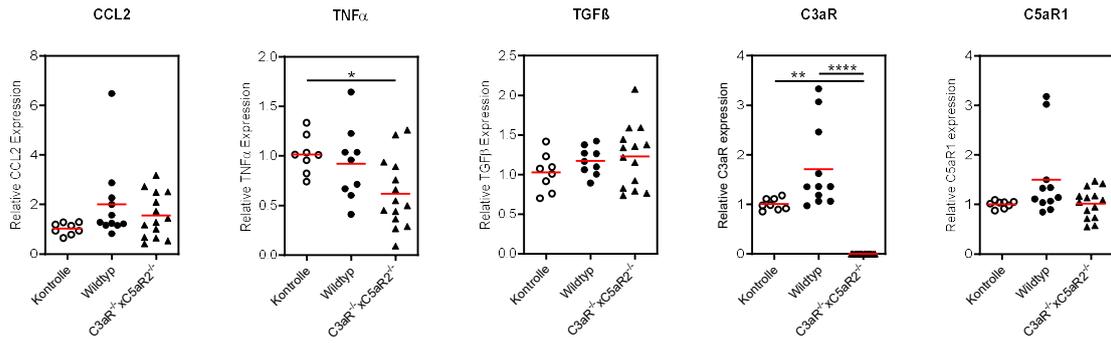


Abbildung 85: C3aRxC5aR2 - Kardiale Real-Time PCR-Analyse unter Ang II-Hochdruck

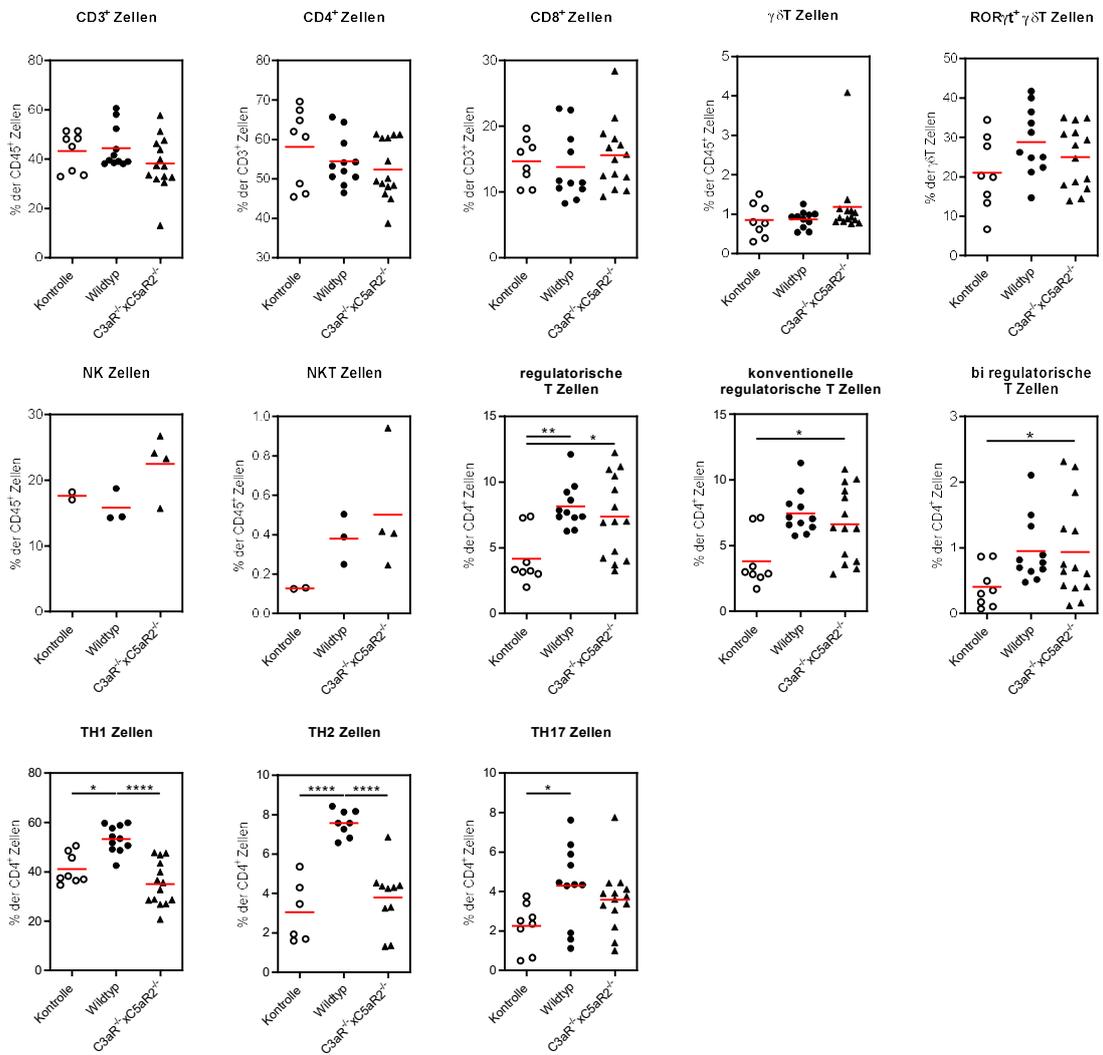


Abbildung 86: C3aRxC5aR2 - Durchflusszytometrie-Analyse von renalen Lymphozyten unter Ang II-Hochdruck

# Anhang

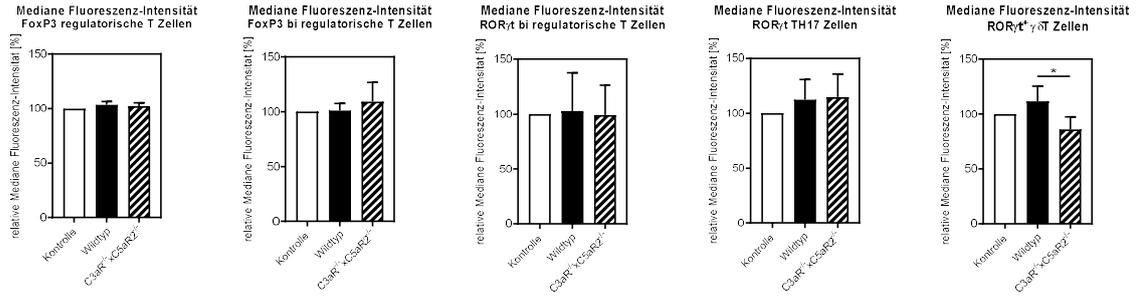


Abbildung 87: C3aRxC5aR2 - Durchflusszytometrie-Analyse der relativen medianen Fluoreszenz-Intensität von renalen Lymphozyten unter Ang II-Hochdruck

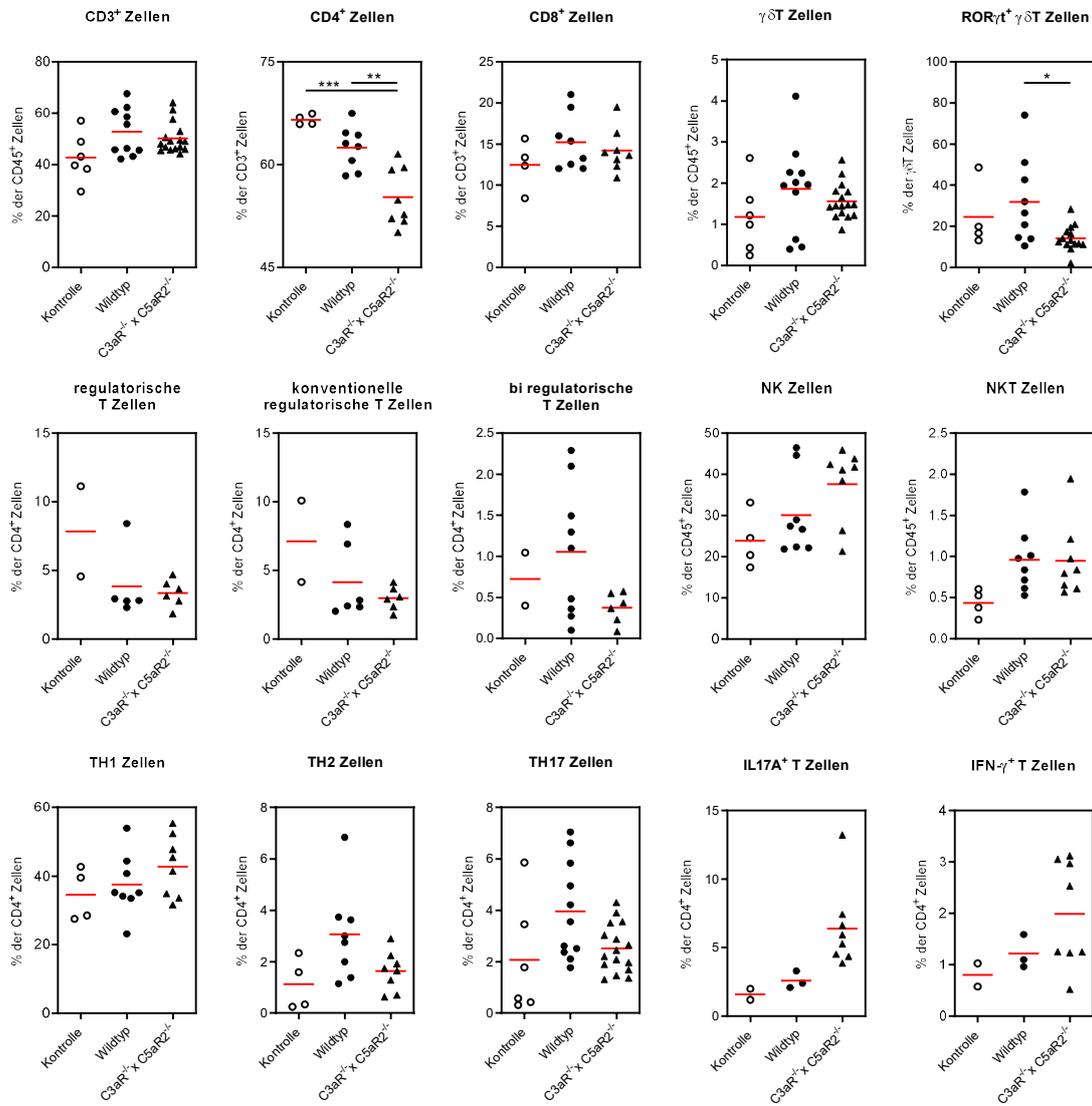
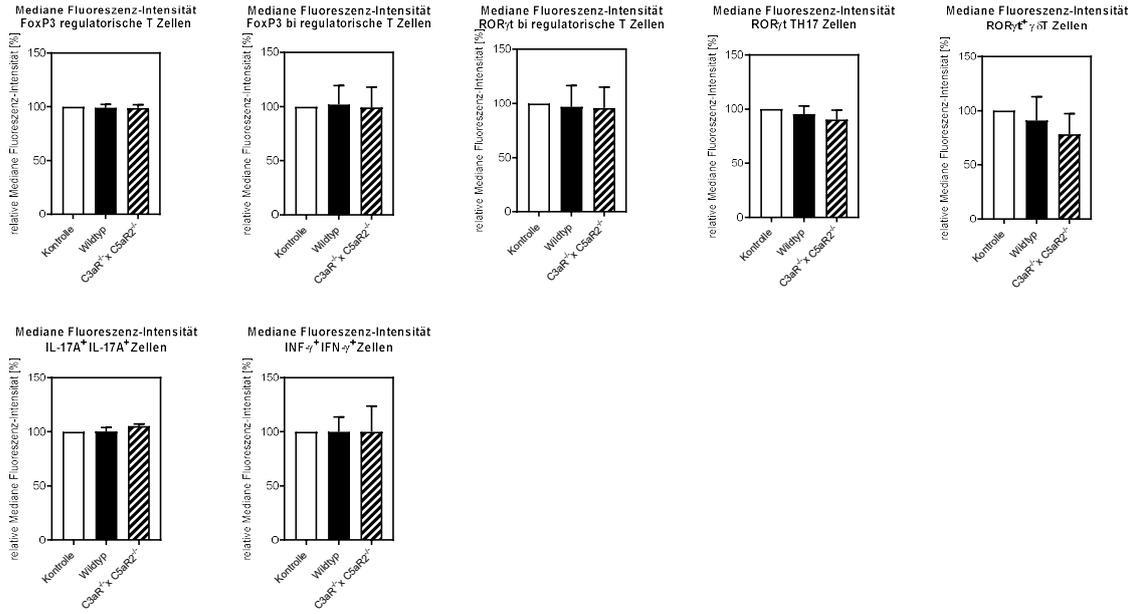
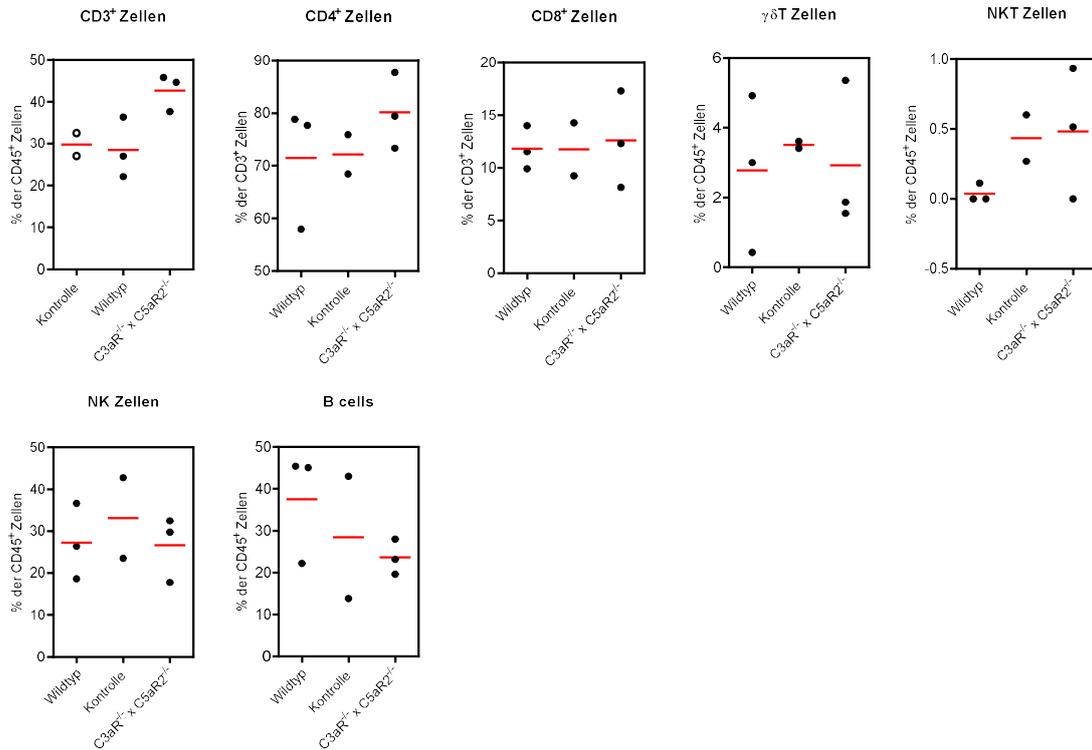


Abbildung 88: C3aRxC5aR2 - Durchflusszytometrie-Analyse von renalen Lymphozyten unter DOCA-Hochdruck

# Anhang



**Abbildung 89: C3aRxC5aR2 - Durchflusszytometrie-Analyse der relativen medianen Fluoreszenz-Intensität von renalen Lymphozyten unter DOCA-Hochdruck**



**Abbildung 90: C3aRxC5aR2 - Durchflusszytometrie-Analyse von kardialen Lymphozyten unter DOCA-Hochdruck**

## Anhang

### 16.2. Material

#### 16.2.1. Material für OPs und *in vivo* Messungen

<b>Material/ Gerät/ Software</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer/ PZN</b>
Altromin Haltungsfutter	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland	1328P
Tramadol (oral)	Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland	PZN 11236125
26G Nadel BD Microlane 3	Becton, Dickinson & Co. Ltd. Drogheda, Ireland	303800
Buprenorphin (s.c.) (Buprenorphin hydrochlorid)	Indivior Europe Ltd., Dublin, Irland	PZN 00345928
Isofluran	Baxter Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland	HDG9623
Perma-Hand Seide, 2- 0	Ethicon Inc. By Johnson&Johnson Company, New Brunswick, New Jersey, USA	EH6724H
Perma-Hand Silk, 3-0	Ethicon Inc. By Johnson&Johnson Company, New Brunswick, New Jersey, USA	1679H
Wundklammern Michel, 11*2mm	Aesculap AG, Tuttlingen, Germany	BN511R
Natriumchlorid, NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	9265.2
AngiotensinII Acetat	Bachem AG, Bubendorf, Schweiz	4006473.1001000010781
osmotischen Minipumpe	Alzet®, Durect Corporation, Cupertino Kalifornien, USA	Modell 1002
DOCA Pellets (Deoxycorticosterone Acetate, 50°mg/ Pellet, 21-day-release)	Innovative Research of America, Sarasota, Florida, USA	M-121
Hatteras Blutdruckmessgerät	Hatteras Instruments, Incorporated, Cary, North Carolina, USA	MC4000 blood pressure analysis system
Enthaarungscreme Veet Sensitive	Reckitt Benckiser Deutschland GmbH, Heidelberg, Deutschland	PZN07768307
30G Nadel (BD Micro- Fine Demi)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	PZN 04144150

## Anhang

Bepanthen® Wund- und Heilsalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland	PZN 02182413
doppelseitigem Klebepatch für GFR	MediBeacon Inc., Mannheim, Deutschland	Direktvertrieb durch die Firma MediBeacon Inc., daher keine Bestellnummer/ PZN
FITC-Sinistrin	MediBeacon Inc., Mannheim, Deutschland	
GFR Photoelektrode	MediBeacon Inc., Mannheim, Deutschland	
MB Lab2	MediBeacon Inc., Mannheim, Deutschland	
MB Studio2	MediBeacon Inc., Mannheim, Deutschland	

### 16.2.2. Material für Organentnahmen und Durchflusszytometrie

Material/ Gerät/ Software	Hersteller	Bestellnummer
Heparin-Natrium LEO, 25000I.E/ 5mL	Leo Pharma AS, Ballerup, Dänemark	050618
EDTA, Ultra Pure™, 0,5M	Invitrogen by life technologies Paisley, UK	15575-038
Dulbeccos' Phosphate Bullered Saline (DPBS--)	Gibco Invitrogen by life technologies, Paisley, UK	14190-094
Fetal Bovine Serum, Qualified, Heat Inactivated (FCS)	Gibco Invitrogen by life technologies, Paisley, UK	10500-064
MACS Tubes (gentleMACS™ C Tubes,	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland	130096334
RPMI Medium 1640	Gibco Invitrogen by life technologies, Paisley, UK	21875-034
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	P4458-100ML
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS++)	Gibco Invitrogen by life technologies, Paisley, UK	24020-091
autoMACS Running Puffer	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland	130-091-221
Tris-HCl (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ClH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.08219.1000
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	A9434-500G

## Anhang

Maus-IgG (Normal mouse serum)	Jackson Immunoresearch, Ely, UK	015-000-120
Collagenase D	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	11088858001
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	10104159001
1000°mg/ml Collagenase II, lyophilized	Gibco Invitrogen by life technologies, Paisley, UK	17101-015
Collagenase I	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	C0130
Collagenase XI	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	C7657
Hyaluronidase I	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	H3506-500mg
PMA (Phorbol 12-Myrisate 13-Acetat)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	79346-1MG
Ionomycin	EMD Milipore Corp, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	407950-1MG
Brefeldin A (BFA)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	B7651-5mg
Percoll™ Plus	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden	17-544-01
Phosphate Buffered Saline (PBS 10x--)	Lonza, Verviers, Belgium	BE17-517Q
70°µM Zellsieb	Labsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland	7.696.768
40°µm Zellsieb	Labsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland;	7.696.767
CountBrigh™ absolute counting beads	Life Technologies Corporation, Eugene, Oregon, USA	C36950
gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland	130-093-235
MACS Mix Rotator (Miltenyi Biotec)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland	130-090-753
Becton & Dickinson LSRII System	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	Direktvertrieb durch die Firma Becton Dickinson GmbH, daher keine
Diva software	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	

## Anhang

FlowJo Software	Tree Star, Inc., Ashland, Oregon, USA	Bestellnummer/ PZN
-----------------	---------------------------------------	-----------------------

### 16.2.3. Material für Histologie

Material/ Gerät/ Software	Hersteller	Bestellnummer
Formaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	K44006603 245
Watman-Paper, Thickness 0,34mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	4926.1
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Europe B. V., Alphen aan den Rijn, Niederlande	4583
Paraplast Plus® (Paraffin)	Leica Biosystems Richmond Inc., Richmond, Illinois, USA	39602004
Zitadelle STP120	Thermo Shandon Limited (Thermo Fisher Scientific), Runcorn, Cheshire, UK	813150
Ethanol, 96%	Chemsolute by Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland	2206.5000
Ethanol, 99%	Chemsolute by Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland	2212.5000
Xylol	J. T. Baker by Avantor (VWR), Darmstadt, Deutschland	8080.2500
unbeschichtete Objektträger	Assistent by Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Deutschland	42406010-C
Superfrost-Objektträger	Assistent by Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Deutschland	42409110
Rotationsmikrotom	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland	Modell RM 2255
Hämatoxylin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	24420
Aluminiumkaliumsulfat (KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> *12H <sub>2</sub> O)	Supelco by Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.01047.1000
Na-Iodat (NaIO <sub>3</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.06525.0100
Periodsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	3257.1

## Anhang

Schiffscher Reagenz	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	HX02687433
Neufuchsin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	72200-25g
Naphtol-AS-BI-Phosphat	Honeywell Fluka™, Charlotte, North Carolina, USA	70482
Natriumnitrit	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	106549
Tris (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	AE15.2
Eukitt® Quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	03989-100mL
Wässrige Pikrinsäure	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	10339.00500
Essigsäure (Eisessig)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	3738.5
Direct Red 80	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	365548-5G
Fast Green FGF	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	F7252-5G
10x DAKO Target Retrieval Solution pH <sup>9</sup>	DAKO by Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA	S2367
10x DAKO Citrate Target Retrieval Solution pH <sup>6</sup>	DAKO by Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA	S2369
Trypsin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	T7168-50TAB
Proteinase bakteriell XXIV (Protease 24)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	P8038-1G
ZytoChem Plus, AP Polymer System (Polap Kit)	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland	POLAP-100
Anti-CD3, polyclonaler Rabbit-Anti-Human Antikörper	DAKO by Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA	A0452
Anti-F4/80 (Clone BM8), monoklonaler Rat-Anti-Mouse Antikörper	BMA, Biomedicals, Augst, Schweiz	T-2006
Anti-GR1 (Clone NIMP-R14) monoklonaler Rat-Anti-Mouse Antikörper	Hycult Biotech Inc., Wayne, Pennsylvania, USA	HM1039-FS

## Anhang

Anti-FoxP3 (Clone FJK-16s), monoclonaler Rat-Anti-Mouse Antikörper	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA	14-5773
Brücken-Antikörper, Rabbit-Anti-Rat IgG biotinylated Antikörper	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA	BA-4001
Gummi arabicum	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	G9752
Natrium-Cacodylat Trihydrat	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	C0250

### 16.2.4. Material für qPCR und ELISA

Material/ Gerät/ Software	Hersteller	Bestellnummer
TRIzol® Reagent	Ambion by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	15596018
Tungsten Carbide Beads, 3mm	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland	69997
Tissue LyzerII Homogenizer	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland	85300
Chloroform	J. T. Baker by Avantor (VWR), Darmstadt, Deutschland	7386
Isopropanol	Chemsolute by Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland	1136.2500
RNaseOUT™	Invitrogen by life technologies Paisley, UK	10777-019
Speed Vac® DNA110	Savant™ by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	13442549
Nanodrop, DeNovix, DS-11 Spectrophotometer	DeNovix Inc., Wilmington, Delaware, USA	31DS-11-B
dNTPs Set, 100mM, PCR Grade	Invitrogen by life technologies Paisley, UK	10297-018
Reverse Transkriptase RevertAid Reverse Transcriptase + Puffer für cDNA Synthese	Molecular Biology by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	EP0442
Random Hexamer Primer	Invitrogen by life technologies Paisley, UK	48190011

## Anhang

PCR Cycler, TProfessional TRIO Thermocycler	Biometra by Ananalytik Jena GmbH, Jena, Deutschland	846-2-070-720
PowerUP™ Sybr™ Green	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	A25742
qPCR Platten	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland	72.1981
QuantStudio™ 3 System	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	A28136
QuantStudio™ Design & Analysis Software	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Version v1.5.1
Multistix® 10SG Teststreifen	Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Manufacturing Ltd., Swords, Co. Dublin, Ireland	01526748
ELISA-Platten, High binding F	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland	82.1581.200
Coatingpuffer	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	C3041
Postcoatpuffer	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	T6789
10% Tween-20	Biozol Diagnostics Vertrieb GmbH, Echning, Deutschland	E108
Albumin-Standard, Maus Albumin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	
Coating-AK: Goat Anti- Mouse Albumin Affinity Purified	Biozol Diagnostics Vertrieb GmbH, Echning, Deutschland	A90-134A
Detection AK: Goat Anti- Mouse Albumin HRP conjugated	Biozol Diagnostics Vertrieb GmbH, Echning, Deutschland	A90-134P
TMB Elisa Peroxidase Substrate	Aviva/ Biozol Diagnostics Vertrieb GmbH, Echning, Deutschland	OORA01684
Phosphorsäure (1M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	30417-1L-M
ELISA Plate Reader, EL808	BioTek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA	25-315S
Cobas Integra ® 400 Plus	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	04922859001

## Anhang

### 16.2.5.FACS Antikörper

Antikörper (Clone) - Fluochrom	Hersteller	Bestellnummer
Vivid, LIVE/DEAD staining	Molecular Probes by life technologies by ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	L34963
CD45 (30-F11) - PerCP	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA	103129
CD11b (M1/70) – AF700	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA	10122
CD11c (N418/HL3) – V450	BD Biosciences by Benson & Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA	562782
Ly6G (1A8) – PE-Cy7	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA	127618
MHCII (M5/114.15.2) - PE	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA	107608
F4/80 (BM8) - APC	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA	17-4801-82
Ly6C (AL-21/HK1.4) - FITC	BD Biosciences by Benson & Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA	553104
CD3 (17A2) – AF700	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA	100216
IL-17A (TC11-18410) – BV605	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA	506927
IFNγ (XMG1.2) – V450	BD Horizon™ by Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	560661
CD4 (RM4-5) – PE-Cy7	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA	100528
CD8 (53-6.7) – V500	BD Biosciences by Benson & Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA	560776
CD8 (53-6.7) – BV711	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA	100759
FoxP3 (FJK-16s) - APC	Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	17-5773-82
FoxP3 (FJK-16s) - FITC	Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	11-5773-82

## Anhang

RORgt (Q31-378) - PE	BD Biosciences by Benson & Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA	5620607
RORgt (Q31-378) – BV785	BD Horizon™ by Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	564723
Tbet (4B10) – BV421	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA	644816
GATA3 (L50-823) – AF488	BD Biosciences by Benson & Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA	560163
CD19 (6D5) – BV605	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA	115540
NKp46 = CD335 (29A1.4) - PE	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA	137604
γdTCR (GL3) - 510	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA	118131
γdTCR (GL3) - APC	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA	118116

### 16.2.6.qPCR Primersequenzen

Name	Sequenz (5'-3')	Gen Bereich
<b>18s Fw</b>	CAC GGC CGG TAC AGT GAA AC	
<b>18s Rev</b>	AGA GGA GCG AGC GAC CAA A	
<b>ANP Fw</b>	GTG CGG TGT CCA ACA CAG AT	
<b>ANP Rev</b>	GCT TCC TCA GTC TGC TCA CTC A	
<b>BNP Fw</b>	CCA GTC TCC AGA GCA ATT CAA	
<b>BNP Rev</b>	AGC TGT CTC TGG GCC ATT TC	
<b>mC1q Fw</b>	CAA AGG AGA GAG AGG GGA GC	
<b>mC1q Rev</b>	CCC CAC ATT GCC AGG TTT G	
<b>mC1r Fw</b>	GTA CAG GGT GAA GCT GGT CT	
<b>mC1r Rev</b>	ACC TCC CCA GTG TTT GCT TA	
<b>mC1s Fw</b>	ACC TCA GAC TTC TCC AAC GA	
<b>mC1s Rev</b>	AAG TGG CTA CAG GGG ACA TC	
<b>mC2 Fw</b>	GAT GGA GAG ACG GCT GTG T	
<b>mC2 Rev</b>	CAA AGT TCA AGC CTG TCC GA	
<b>mC3 Fw</b>	GGA AAC GGT GGT GGA GAA AG	
<b>mC3 Rev</b>	ATA AGA CAG TGG AGC CAG GG	
<b>C3.2 Fw</b>	CAA GGG AGT GTT TGT GCT GA	
<b>C3.2 Rev</b>	AGC CAA TGT CTG CCT TCT CT	
<b>mC4 Fw</b>	CAT CCA GGC CAG GTA CAT CT	
<b>mC4 Rev</b>	CCT CTT CCC TTG CTC ATC CA	
<b>C5 Fw</b>	GCC GGA CCA GTC AGT AAA GA	
<b>C5 Rev</b>	AAG ACA GTC TCC CGT TTG GC	
<b>mC6 Fw</b>	CCC TCC AAG CTC TGC AAA AT	
<b>mC6 Rev</b>	GTC TCC ACA GTC ATT CTC TCC A	

## Anhang

<b>C3aR Fw</b>	CCC CAA GAC ATT GCC TCC AT	
<b>C3aR Rev</b>	GAC TGT GTT CAC GGT CGT CT	
<b>C5aR neu Fw</b>	GTT ACC ACA GAA CCC AGG AG	
<b>C5aR neu Rev</b>	CGC AGG TAT GTT AGG ATC CAT G	
<b>Collagen I <math>\alpha</math>2 Fw (Col1a2)</b>	CCC CGG GAC TCC TGG ACT T	Exon 11
<b>Collagen I <math>\alpha</math>2 Rev (Col1a2)</b>	GCT CCG ACA CGC CCT CTC TC	Exon 14
<b>Collagen III <math>\alpha</math>1 Fw (Col3a1)</b>	CCT GGA GCC CCT GGA CTA ATA G	Exon 18
<b>Collagen III <math>\alpha</math>1 Rev (Col3a1)</b>	GCC CAT TTG CAC CAG GTT CT	Exon 20
<b>Collagen IV <math>\alpha</math>2 Fw (Col4a2)</b>	TAC CTG CCA CTA CTT CGC TAA C	Exon 47
<b>Collagen IV <math>\alpha</math>2 Rev (Col4a2)</b>	CGG ATG GTG TGC TCT GGA AG	Exon 47
<b>Foxp3.1 (Fw)</b>	CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT	Exon 4/5
<b>Foxp3.2 (Rev)</b>	TTC TCA CAA CCA GGC CAC TTG	Exon 5
<b>Foxp3 Fw2</b>	AAG GAG AAG CTG GGA GCT ATG	Exon 7
<b>Foxp3 Rev2</b>	TAC TGG TGG CTA CGA TGC AG	Exon 8
<b>NGAL_P Fw</b>	GGC CTC AAG GAC GAC AAC A	
<b>NGAL_P Rev</b>	TCA CCA CCC ATT CAG TTG TCA	
<b>MCP-1 Fw (CCL-2)</b>	GGC TCA GCC AGA TGC AGT TAA	Exon 1/2
<b>MCP-1 Rev (CCL-2)</b>	CCT ACT CAT TGG GAT CAT CTT GCT	Exon 2
<b>PAI-1 Fw</b>	GGA CAC CCT CAG CAT GTT CA	Exon 4
<b>PAI-1 Rev</b>	TCT GAT GAG TTC AGC ATC CAA GAT	Exon 4
<b>Renin Fw</b>	GCT CTG GAG TCC TTG CAC CTT	Exon 1
<b>Renin Rev</b>	CTT GAG CGG GAT TCG TTC AA	Exon 1/2
<b>Renin Fw2</b>	CCC CTG TCT TTG ACC ACA TT	Exon 5
<b>Renin Rev2</b>	TCG CTA CCT CCT AGC ACC AC	Exon 6
<b>TGF-beta FW</b>	CCG CAA CAA CGC CAT CTA TGA	Exon 1/2
<b>TGF-beta Rev</b>	GGG GGT CAG CAG CCG GTT AC	Exon 3
<b>TNF alpha Fw</b>	CCA CCA CGC TCT TCT GTC TA	Exon 1
<b>TNF alpha Rev</b>	CAC TTG GTG GTT TGC TAC GA	Exon 3/4

## **Anhang**

- 16.3. Protokoll zur Pumpenbefüllung**
- 16.4. Protokoll Blutdruckmessung MC4000 Hatteras**
- 16.5. Protokoll Albumin-Elisa**
- 16.6. Protokolle der FACS Färbungen**
  - 16.6.1. Einzelzellsuspension Niere MMph**
  - 16.6.2. Einzelzellsuspension Niere T-Zellen**
  - 16.6.3. Einzelzellsuspension Herz**
- 16.7. Protokolle der Histo Färbungen**
  - 16.7.1. PAS Färbung**
  - 16.7.2. SRFG Färbung**
- 16.8. Protokoll der RNA Isolierung**

### Befüllen von osmotischen Minipumpen

- Benötigte Menge des zu applizierenden Stoffes berechnen (Extraprotokoll!!!) und abwägen bzw. fertige Lösung im Originalgefäß herstellen
- Pumpen unter der Sterilwerkbank in Petrischale geben, je Pumpendeckel und -korpus einzeln
- Lösung mit Kanüle in Spritze aufziehen, Luftblasen aus Kanüle entfernen!!
- Lösung langsam in den Pumpenkörper füllen bis die wässrige Lösung austritt, ggf. am Ende nochmal überall geringe Mengen ergänzen
- Deckel auf den Pumpenkörper stecken
- Die fertig befüllten Pumpen in 0,9% NaCl-Lösung einlegen  
Unbedingt darauf achten, dass die Pumpen in die Salzlösung hinabsinken!

## Protokoll Blutdrucktraining und -messung

Vor der ersten Messung müssen die Mäuse an das Handling gewöhnt werden ( $\geq 4$  Mal), ansonsten ist die Durchführung bei Training und Messung nahezu identisch.

- 1.) Termin für den Raum 99.079 rechtzeitig per Onlinekalender reservieren!
- 2.) Gerät einschalten, Laptop anschließen (grauer Adapter in GFR-Port), Holder auf der Heizplatte vorwärmen, Klebestreifen vorbereiten
- 3.) Laptop starten (Password kleiner Chef+PLZ), Programm Hatteras MC4000 öffnen
- 4.) **Jedes Mal vor Beginn** einen „Pressuretest“ (kleines Hammersymbol) durchführen: Mit „Up“ starten und bei ungefähr 150mm Hg auf „Pause“ drücken. Jetzt sollte der Druck um 3-4mmHg absinken und dann für mehrere Sekunden konstant bleiben. Abschließend mit „Down“ den Druck abbauen.  
Sollte der Druck stetig sinken oder sich gar nicht erst aufbauen, dann müssen die Gummicuffs gewechselt werden. Hierfür eines der gebrauchten Gummis als Schablone nehmen, mit der Schere einen Luftballon zurechtschneiden und die Gummis auf die Metallcuffs aufziehen. **Immer alle 4 Gummis gleichzeitig austauschen!** Die schwarzen Endkappen vorsichtig ab- und aufziehen, die werden so lange wie möglich wiederverwendet.
- 5.) Wenn die Temperatur der Heizplatte ungefähr die eingestellten 105°F erreicht hat, können die Mäuse hineingesetzt werden. Hierfür die Maus auf die Heizplatte setzen und von hinten vorsichtig aber bestimmt den Holder über die Maus platzieren. Den Holder über die Magnete auf der Heizplatte fixieren; bei Widerstand hat das Tier noch eine oder mehrere Pfoten eingeklemmt, diese dann vorsichtig durch leichte Seitwärtsbewegungen des Holders lösen.
- 6.) Den Holder direkt vor den entsprechenden Cuff schieben und den Schwanz durch den Cuff fädeln. Den Cuff in die halbkreisförmige Einkerbung des Heizplattenaufsatzes legen, den Schwanz über die Messzelle legen und hinter der Messzelle mit dem Klebeband fixieren.
- 7.) Beim Training kann die Messung sofort gestartet werden, bei regulären Messungen ein wenig warten (2-5min.) und erst dann die Messung starten, damit sich alle Tiere an die Umgebung equilibrieren können.
- 8.) Die Messung wird über den „Go“-Button gestartet, hier müssen die Tiere dem entsprechenden Messchannel zugeordnet werden, die Versuchstiere werden generell mit <Versuchsnummer> M1, <Versuchsnummer> M2, etc. nummeriert.
- 9.) Nach der Messung werden misslungene Zyklen über den Reject-Button ausgeschlossen. Die Daten dann über „Specimenlog“ -> Tier aus der Liste auswählen -> „Show data“ -> Reiter „File“ -> „Export csv“ auf den Server ziehen.

## Protokoll Albumin-Elisa

### Tag 1:

- Urinproben mit U-Stix (9µl) analysieren und je nach Ergebnis den Verdünnungsfaktor festlegen  
 $\emptyset = 1:500$ ; + = 1:5000; ++ = 1:20.000; +++ = 1:50.000; +++++ = 1:100.000  
 Bei Unsicherheiten weniger hoch verdünnen, um das Risiko für evt. Pipettierungenauigkeiten zu minimieren
- Alle Proben 1:500 in Sample Conjugate Diluent (2µl Urin + 998 SCD) verdünnen und aus dieser Ausgangsverdünnung ggf. weitere Verdünnungen herstellen
- Platte coaten: Anzahl der benötigten Wells bestimmen und anschließend entsprechende Menge Coatingpuffer (Carbonate/Bicarbonate-Puffer) mit Coatingantikörper Goat Anti-Mouse Albumin 1:100 ansetzen und von dieser Lösung jeweils 100µl in die Wells geben, Inkubation über Nacht bei 4°C

### Tag 2:

- Platte 3x mit Waschpuffer (~150µl/Well) waschen, Waschlösung zwischendrin abkippen und Platte auf Papier kräftig ausklopfen
- Jeweils 200µl Postcoat-Puffer in die Wells geben und Platte für 30' bei RT inkubieren
- Standardreihe ansetzen: Dazu folgender Pipettivorschlag (für EINE Platte!)

	Konzentration		Sample Conjugate Diluent
<b>S0</b>	10000 ng/ml	2µl Stocklösung [1mg/ml]	198µl
<b>S1</b>	1000 ng/ml	100µl S0	900µl
<b>S2</b>	500 ng/ml	300µl S1	300µl
<b>S3</b>	250 ng/ml	300µl S2	300µl
<b>S4</b>	125 ng/ml	300µl S3	300µl
<b>S5</b>	62,5 ng/ml	300µl S4	300µl
<b>S6</b>	31,25 ng/ml	300µl S5	300µl
<b>S7</b>	15,625 ng/ml	300µl S6	300µl
<b>S8</b>	7,8 ng/ml	300µl S7	300µl

- Platte 3x mit Waschpuffer waschen (s.o.)
- Jeweils 100µl Standard und Probe in Doppelbestimmung gemäß Pipettierschema auf die Platte laden und 60' bei RT inkubieren
- Platte 5x mit Waschpuffer waschen (s.o.)
- Den Detection-Antikörper Goat Anti-Mouse Albumin-HRP 1:50.000 (oder ggf. abweichend) in SCD verdünnen und von dieser Lösung jeweils 100µl in die Wells geben, bei RT für 60' inkubieren
- Platte 5x mit Waschpuffer waschen (s.o.)

## Anhang

- Benötigte Menge an TMB-Substrat vorher abfüllen und im Dunklen auf RT equilibrieren, jeweils 100µl TMB-Substrat in die Wells geben und Platte im Dunklen bei RT inkubieren bis die Blaufärbung die gewünschte Intensität erreicht hat (ca. 5-10')
- Substratreaktion durch Zugabe von jeweils 100µl 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> abstoppen und Platte zeitnah im Elisa-Reader bei 450nm analysieren

### Lösungen und Reagenzien für den Elisa:

- Coatingpuffer: Den Inhalt von 2 Kapseln Carbonate/Bicarbonate-Puffer (#C3041 Sigma) in 200mL dH<sub>2</sub>O lösen
- Postcoatpuffer: Den Inhalt eines Beutels TBS+BSA (#T6789 Sigma) in 1L dH<sub>2</sub>O lösen
- Waschpuffer: Den Inhalt eines Beutels TBS+Tween (#T9039 Sigma) in 1L dH<sub>2</sub>O lösen
- Sample Conjugate Diluent (SCD): 500µl 10% Tween-20 (#E108 Biozol) zu 100ml Postcoatpuffer geben
- Coating-AK: Goat Anti-Mouse Albumin Affinity Purified (#A90-134A Biozol)
- Detection AK: Goat Anti-Mouse Albumin HRP conjugated (#A90-134P Biozol)
- TMB-Substrat: TMB Elisa Peroxidase Substrate (#OORA01684 Aviva/Biozol)
- 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: 16,9mL 85% Phosphorsäure ad 250ml mit dH<sub>2</sub>O
- U-Stix: Multistix 10SG Teststreifen (#01526748 Siemens)
- Elisaplatten: Elisa plate, High binding F (#82.1581.200 Sarstedt)

## Anhang

<b>Niereneinzelzellsuspension für MMph (ohne Percoll)</b>		<b>Anmerkungen</b>
1. Niere ausbauen	Kapsel entfernen, stück für RNA und Scheibe für Histo abschneiden, mit Skalpell kleinstmöglich würfeln, in Gentle MACS C-Tubes mit 5ml Digestions-Medium (RPMI, 10%FCS, 1% Pen/Strep, 1% Hepes) überführen, auf Eis	
2. Digestion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pro Probe je 10µl DNase und 20µl Collagenase D zufügen (Endvolumen 5ml/Niere)</li> <li>• Inkubation 45min bei 37°C im Wasserbad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Master-Mix erstellen, 30µl in jede Probe.</li> </ul>
3. Gentle-MACS	Dissoziieren der Einzelzellen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• C-Tubes auf Gentle-MACS stecken</li> <li>• 1x Programm „mSpleen 01.01 C Tube“</li> <li>• ggf. 1x Programm „mLung 02.01 C Tube“</li> <li>• Zentrifuge: 360g, 8min, 4°C</li> <li>• dekantieren</li> </ul>	
4. Zellsieb 70µm	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellsuspension über 70µm Zellsieb geben, Sieb mit 10-20ml kaltem MACS nachspülen</li> <li>• Zentrifuge: 360g, 8min, 4°C</li> <li>• dekantieren</li> </ul>	
5. Ery-Lyse	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resuspension in 2ml Erylyse-Puffer (2mL pro Niere), (1ml bei Milz) 5-8min bei RT, dann Reaktionsstopp mit 10ml kaltem MACS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cave: Bei Milz erforderlich</li> </ul>
6. Waschen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zentrifuge: 360g, 8min, 4°C</li> <li>• Dekantieren, Resuspension in 10mL MACS</li> </ul>	
7. Zellsieb 40µm	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellsuspension über 40µm Zellsieb geben, Sieb mit 10-20ml kaltem MACS nachspülen</li> <li>• Zentrifuge: 360g, 8min, 4°C</li> <li>• dekantieren</li> </ul>	
8. Überführen 96-well	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Überführen in 96-well Platte</li> <li>• Zentrifuge: 360g, 2min, 4°C</li> <li>• Überstand Ausschlagen, nicht klopfen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Platte mit V-Buttom</li> <li>• Beschriftung auf Plastikdeckel</li> <li>• Cave: Bei Makrophagen UND T-Zellen Proben halbieren, auf Platte immer eine Reihe freilassen zwischen verschiedenen Färbungen</li> </ul>
9. Blocken	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 200µl MACS + 5% Mausserum (10µl Mausserum/190µl)</li> <li>• 10µL Zellsuspension für cell count entnehmen</li> <li>• Inkubation 20min, Kühlschrank 4°C</li> <li>• AK-Mix vorbereiten</li> <li>• Zentrifuge: 360g, 2min, 4°C</li> <li>• Platte ausschlagen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mausserum bei Collagenase, DNase im Frierer</li> </ul>
10. Cell count	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 40µL MACS in einem FACS Tube mit Einsatz vorlegen</li> <li>• 10µL Zellsuspension pro Probe hinzu</li> <li>• 50µL Beads-Mastermix (pro Probe: 40µL MACS, 10µL Beads c=500/µL, 0,5µL CD45 PerCP) hinzu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beads als Aliquots im Kühlschrank</li> </ul>

## Anhang

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 min lichtgeschützt, 4°C inkubieren</li> </ul>	
11. Färben Oberfläche	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AK-Mastermix: In MACS, 50µl/Probe</li> <li>• 20 min Inkubation, lichtgeschützt, 4°C</li> <li>• VIVID vorbereiten</li> </ul>	
12. Waschen (2x)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100µl PBS</li> <li>• Zentrifuge: 360g, 2min, 4°C</li> <li>• Platte ausschlagen</li> </ul>	
13. Fixierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ebioscience Foxp3-staining kit</li> <li>• 100µl „Permeabilisation working solution“/Probe</li> <li>• Inkubation 30min, lichtgeschützt, 4°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 Teil Concentrate (kl. Flasche), 3 Teile Diluent (große Flasche), FACS Kühlschrank</li> <li>• Alternative ohne Perm.: mit 100µl 1% PFA fixieren (Kühlschrank 16% PFA mit PBS verdünnen), danach 2x mit PBS waschen, 100µl PBS draufgeben, fertig.</li> </ul>
14. Waschen (2x)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100µl 1x Permeabilisation buffer (Foxp3 kit)</li> <li>• Zentrifuge: 360g, 2min, 4°C</li> <li>• Platte ausschlagen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aus 10x Puffer mit H2O verdünnen</li> </ul>
15. fertig	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellen in PBS (FACS Tubes) aufnehmen und bei 4°C lagern</li> <li>• (wenn nicht fixiert mit 1% PFA, innerhalb der nächsten 24h messen)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oder PBS in Platte, wenn FACS am nächsten Tag.</li> </ul>

	Bestellnummer	Resuspendieren	Konz <sub>End</sub>
<b>Digestionsmedium</b>	500ml RPMI, 50ml FCS, 5ml Penicilin/Streptomycin, 5ml Natrium Pyruvat, 10ml HEPES		
<b>Erylyse-Puffer</b>	Stock I: 170mM Tris-HCl, pH 7,6	4,22g ad 200ml dH <sub>2</sub> O	1ml Stock I + 9ml Stock II immer
	Stock II: 160mM NH <sub>4</sub> Cl	1,71g ad 200ml dH <sub>2</sub> O	frisch ansetzen (RT)
<b>Maus-IgG</b>	Jackson Immunoresearch Normal mouse serum 015-000-120	+5ml dH <sub>2</sub> O	50mg/ml Protein
<b>Collagenase D („CD“)</b>	Roche 500mg 11088858001	+ 5ml PBS	100µg/µl
<b>DNase („D“)</b>	Roche 100mg 10104159001	+ 2ml PBS	50µg/µl
<b>PMA</b>	Phorbol 12-Myrisate 13-Acetat Sigma 79346-1MG	+1ml Ethanol p.a.	1µg/µl
<b>Ionomycin</b>	Calbiochem 1mg 407950	+1ml Methanol p.a.	1µg/µl
<b>Brefeldin A (BFA)</b>	Sigma 654-5mg	+1ml Ethanol p.a.	5µg/µl

## Anhang

<b>Niereneinzelsuspension für Zytokine und Tcells (mit Percoll)</b>		<b>Anmerkungen</b>
1. Niere ausbauen	Kapsel entfernen, stück für RNA und Scheibe für Histo abschneiden, mit Skalpell kleinstmöglich würfeln, in Gentle MACS C-Tubes mit 5ml Digestions-Medium (RPMI, 10%FCS, 1% Pen/Strep, 1% Hepes) überführen, auf Eis	•
2. Digestion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pro Probe je 10µl DNase und 20µl Collagenase D zufügen (Endvolumen 5ml/Niere)</li> <li>• Inkubation 45min bei 37°C im Wasserbad</li> </ul>	• Master-Mix erstellen, 30µl in jede Probe.
3. Gentle-MACS	Dissoziieren der Einzelzellen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• C-Tubes auf Gentle-MACS stecken</li> <li>• 1x Programm „mSpleen 01.01 C Tube“</li> <li>• ggf. 1x Programm „mLung 02.01 C Tube“</li> <li>• Zentrifuge: 360g, 7min, RT dekantieren</li> </ul>	•
4. Percoll-Gradient	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resuspendieren des Nierenhomogenats in 7ml Percoll 37% bei Raumtemperatur</li> <li>• Überführen in 15ml Falcon-Tubes</li> <li>• Zentrifuge: 500g, 15min, RT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Für schönes T-Zell Panel (Nicht so gut für Makrophagen geeignet)</li> <li>• Falls leer, am Vortag ansetzen (Stock im FACS Kühlschrank mit PBS).</li> <li>• Fuge: Acc:9; Dec.: 7</li> </ul>
5. Waschen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dekantieren</li> <li>• Resuspension in 10ml HBSS</li> <li>• Zentrifuge: 360g, 7min, 4°C</li> </ul>	•
6. Ery-Lyse	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resuspension in 2ml Erylyse-Puffer (2mL pro Niere!), (1ml bei Milz) 5-8min bei RT, dann Reaktionsstopp mit 10ml kaltem MACS</li> </ul>	• Zusätzliche Erylyse fällt bei Herz und Niere bei Stimulation weg, weil Erys bei Stimulation zerstört werden. Cave: Bei Milz erforderlich
7. Waschen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zentrifuge: 360g, 7min, 4°C</li> <li>• Dekantieren, Resuspension in Stimulationsmedium und vollständig überführen in FACS-Tubes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Falls Erylyse entfallen: Dekantieren, 10ml MACS zugeben.</li> <li>• Gut abtropfen nach Dekantieren.</li> </ul>
8. Zellsieb	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellsuspension über 50µm Zellsieb geben, Sieb mit 5-10ml kaltem MACS nachspülen</li> <li>• Zentrifuge: 360g, 7min, 4°C</li> <li>• dekantieren</li> </ul>	
9. Stimulation	<p>PMA/Ionomycin</p> <p>1ml X-Vivo mit β-Mercaptoethanol (1µl/ml) pro Ansatz</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PMA: 0,05µl auf 1ml X-Vivo (= 0.05µg/ml)</li> <li>- Ionomycin: 1µl auf 1ml X-Vivo (= 1µg/ml)</li> <li>- Brefeldin A (2µl auf 1ml Probe (= 10µg/ml)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zusätzlich unstimuliertes Röhrchen (mit-Zellen aus Kontrollen).</li> <li>• Kühlschrank: β-Mercapto, Xvivo &amp; Ionomycin, PMA (blaues Eppi) &amp; Brefeldin A (BFA)</li> <li>• X-Vivo + β-Mercapto Vortexen, in unstimulierte Probe; Mix mit beiden davor + PMA, Iono und BFA in alle anderen.</li> </ul>

## Anhang

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 150 min 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (Brutschrank, Plastikdeckel auf Platte um Verdunstung zu verhindern)</li> <li>• Hierfür immer 1 Milz zur Kontrolle mitfärben, sowie 1 unstimulierte Blut- und 1 unstimulierte Milz Kontrolle</li> </ul>	
10. Waschen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resuspension in 2ml MACS-Puffer</li> <li>• Zentrifuge: 360g, 7min, 4°C</li> <li>• Dekantieren und Abtropfen (Zellstoff)</li> <li>• Resuspension im Rücklauf des Mediums</li> </ul>	•
11. Überführen 96-well	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Überführen in 96-well Platte</li> <li>• Zentrifuge: 360g, 2min, 4°C</li> <li>• Überstand ausschlagen, nicht klopfen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Platte mit V-Buttom Beschriftung auf Plastikdeckel</li> <li>• auf Platte immer eine Reihe freilassen zwischen verschiedenen Färbungen</li> </ul>
12. Blocken	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 200µl MACS + 5% Mausserum (10µl Mausserum/190µl) pro Probe</li> <li>• 10µL Zellsuspension für cell count entnehmen</li> <li>• Inkubation 20min, Kühlschrank 4°C</li> <li>• AK-Mix vorbereiten</li> <li>• Zentrifuge: 360g, 2min, 4°C</li> <li>• Platte ausschlagen</li> </ul>	• Mausserum bei Collagenase, DNase im Frierer
13. Cell count	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 40µL MACS in einem FACS Tube mit Einsatz vorlegen</li> <li>• 10µL Zellsuspension pro Probe hinzu</li> <li>• 50µL Beads-Mastermix (pro Probe: 40µL MACS, 10µL Beads c=500/µL, 0,5µL CD45 PerCP) hinzu</li> <li>• 20 min lichtgeschützt, 4°C inkubieren</li> </ul>	• Beads als Aliquots im Kühlschrank
14. Färben Oberfläche	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AK-Mastermix: In MACS, 50µl/Probe</li> <li>• 20 min Inkubation, lichtgeschützt, 4°C</li> <li>• VIVID vorbereiten</li> </ul>	•
15. Waschen (2x)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100µl PBS (Azidfrei wegen VIVID!)</li> <li>• Zentrifuge: 360g, 2min, 4°C</li> <li>• Platte ausschlagen</li> </ul>	•
16. Färben LIVE/DEAD	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100µl/ Probe</li> <li>• 3ml PBS + 1µl VIVID (gelöst in 50µl DMSO)</li> <li>• 20 min Inkubation, lichtgeschützt, 4°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• VIVID 5min vorher auftauen, danach wieder einfrieren</li> <li>• Bei Kaede: Nir statt Vivid, 1µl auf 999µl PBS</li> </ul>
17. Waschen (2x)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100µl PBS (Azidfrei wegen VIVID!)</li> <li>• Zentrifuge: 360g, 2min, 4°C</li> <li>• Platte ausschlagen</li> </ul>	• PBS ist Azidfrei
18. Permeabilisierung / Fixierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ebioscience Foxp3-staining kit</li> <li>• 100µl „Permeabilisation working solution“/Probe</li> <li>• Inkubation 30min, lichtgeschützt, 4°C</li> <li>• AK-Mix vorbereiten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 Teil Concentrate (kl. Flasche), 3 Teile Diluent (große Flasche), FACS Kühlschrank</li> <li>• Alternative ohne Perm.: mit 100µl 1% PFA fixieren (Kühlschrank 16% PFA mit PBS verdünnen), danach 2x mit PBS waschen, 100µl PBS draufgeben, fertig.</li> </ul>
19. Waschen (2x)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100µl 1x Permeabilisation buffer (Foxp3 kit)</li> <li>• Programm 4: 360g, 2min, 4°C</li> </ul>	• Aus 10x Puffer mit H <sub>2</sub> O verdünnen

## Anhang

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Platte ausschlagen</li> </ul>	
20. Färben intrazellulär	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mastermix: 100µl Permeabilisation buffer + AK/Probe</li> <li>• Inkubation 30min</li> </ul>	•
21. Waschen (2x)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100µl 1x Permeabilisation buffer (Foxy3 kit)</li> <li>• Zentrifuge: 360g, 2min, 4°C</li> <li>• Platte ausschlagen</li> </ul>	•
22. fertig	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellen in 100µL PBS (FACS Tubes) aufnehmen und bei 4°C lagern</li> <li>• (wenn nicht fixiert mit 1% PFA, innerhalb der nächsten 24h messen)</li> </ul>	• Oder PBS in Platte, wenn FACSen am nächsten Tag.

	Bestellnummer	Resuspendieren	Konz <sub>End</sub>
<b>Digestionsmedium</b>	500ml RPMI, 50ml FCS, 5ml Penicilin/Streptomycin, 5ml Natrium Pyruvat, 10ml HEPES		
<b>Erylyse-Puffer</b>	Stock I: 170mM Tris-HCl, pH 7,6	4,22g ad 200ml dH <sub>2</sub> O	1ml Stock I + 9ml Stock II immer
	Stock II: 160mM NH <sub>4</sub> Cl	1,71g ad 200ml dH <sub>2</sub> O	frisch ansetzen (RT)
<b>Maus-IgG</b>	Jackson Immunoresearch Normal mouse serum 015-000-120	+5ml dH <sub>2</sub> O	50mg/ml Protein
<b>Collagenase D („CD“)</b>	Roche 500mg 11088858001	+ 5ml PBS	100µg/µl
<b>DNase („D“)</b>	Roche 100mg 10104159001	+ 2ml PBS	50µg/µl
<b>PMA</b>	Phorbol 12-Myrisate 13-Acetat Sigma 79346-1MG	+1ml Ethanol p.a.	1µg/µl
<b>Ionomycin</b>	Calbiochem 1mg 407950	+1ml Methanol p.a.	1µg/µl
<b>Brefeldin A (BFA)</b>	Sigma 654-5mg	+1ml Ethanol p.a.	5µg/µl

## Anhang

Herzeinzelzellsuspension- Gentle-MACS MMph		Anmerkungen
1. Herz ausbauen	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stück für RNA, Scheibe für Histo abschneiden, Zweiteilen, in C-Tubes mit 5ml <b>HBSS++</b> geben</li> </ul>	
2. Gentle-MACS	<ul style="list-style-type: none"> <li>10µl DNase, 20µl Collagenase I, 10µl Collagenase II</li> <li>M_heart_01 und m_heart_02.01 laufen lassen (C-Tubes aufbewahren)</li> <li>Kurz anfügen, damit die Überführung besser klappt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Collagenase II Stock:100mg/ml</li> </ul>
3. Inkubieren	<ul style="list-style-type: none"> <li>In 15ml Falcons überführen</li> <li>30min bei 37°C im MACS Mix Rotator inkubieren</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Im Brutschrank</li> </ul>
4. Zellsieb	<ul style="list-style-type: none"> <li>Zellen kurz anfügen (1min) damit sich die Stückchen besser überführen lassen</li> <li>1mL von 5mL Zellsuspension für MMph über 70µm Sieb geben, mit Stempel matschen</li> <li>Mit 10ml kaltem MACS spülen</li> <li>Zentrifuge: 360g, 8min, 4°C</li> </ul>	
6. Ery-Lyse	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pellet in 1ml Ery-Lyse Puffer resuspendieren</li> <li>Nach 7 min Reaktion mit 10ml kaltem MACS abstoppen</li> <li>Zentrifuge: 360g, 8min, 4°C</li> </ul>	
7. Zellsieb	<ul style="list-style-type: none"> <li>In 10ml MACS aufnehmen</li> <li>Über 40µm Sieb geben, mit Stempel matschen</li> <li>Mit 10ml MACS spülen</li> </ul>	
8. Waschen	<ul style="list-style-type: none"> <li>Zentrifuge: 360g, 8min, 4°C</li> <li>Dekantieren und Abtropfen (Zellstoff)</li> <li>in 100µl MACS</li> </ul>	
9. Überführen 96-well	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resuspension des Pellets mit dem Rücklauf vollständig überführen in 96-well Platte</li> <li>Programm 4: 360g, 2min, 4°C</li> <li>Überstand Ausschlagen, nicht klopfen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Platte mit V-Buttom (Nicht U), sonst haften die Zellen nicht.</li> <li>Cave: Bei Makrophagen UND T-Zellen Proben halbieren, auf Platte immer eine Reihe freilassen zwischen verschiedenen Färbungen</li> </ul>
10. Blocken	<ul style="list-style-type: none"> <li>000µl MACS + 5% Mausserum (10µl Mausserum/190µl)</li> <li>Inkubation 20min, Kühlschrank 4°C</li> <li>AK-Mix vorbereiten</li> <li>Programm 4: 360g, 2min, 4°C</li> <li>Platte ausschlagen</li> </ul>	
11. Färben Oberfläche	<ul style="list-style-type: none"> <li>AK-Mastermix: In MACS, 50µl/Probe</li> <li>20 min Inkubation, lichtgeschützt, 4°C</li> </ul>	

## Anhang

12. fertig	<ul style="list-style-type: none"> <li>100µl PBS auf die Zellen geben und bei 4°C lagern und am Messtag direkt vor der Messung resuspendieren und in FACS Tubes überführen</li> </ul>	
------------	---	--

	Bestellnummer	Resuspendieren	Konz <sub>End</sub>
<b>Erylyse-Puffer</b>	Stock I: 170mM Tris-HCl, pH 7,6	4,22g ad 200ml dH <sub>2</sub> O	1ml Stock I + 9ml Stock II immer frisch ansetzen (RT)
	Stock II: 160mM NH <sub>4</sub> Cl	1,71g ad 200ml dH <sub>2</sub> O	
<b>Maus-IgG (Mausserum)</b>	Jackson ImmunoResearch Normal mouse serum 015-000-120	+5ml dH <sub>2</sub> O	50mg/ml Protein
<b>Collagenase D („CD“)</b>	Roche 500mg 11088858001	+ 5ml PBS	100µg/µl
<b>DNase („D“)</b>	Roche 100mg 10104159001	+ 2ml PBS	50µg/µl

## Anhang

### Sirius Rot - Fast Green

Schritt	Bemerkungen	Dauer/ Ergebnis
<b>Entparaffinieren:</b>		3x Xylol 5 Minuten 3x 100% EtOH 5 Minuten 2x 96% EtOH 5 Minuten 2x 70% EtOH 5 Minuten 3x dest. H <sub>2</sub> O 5 Minuten
<b>Sirius Rot-Färbung:</b>	vor Gebrauch 5mL Eisessig auf 100mL Färbelösung	10 Minuten
<b>Saures dest. H<sub>2</sub>O:</b>	· 300mL Eisessig · 660mL dest. H <sub>2</sub> O	10 Sek.
<b>dest. H<sub>2</sub>O:</b>		10 Sek
<b>Fast Green-Färbung:</b>	vor Gebrauch 5mL Eisessig auf 100mL Färbelösung  mehrmals dippen, damit auf dem Schnitt keine Luftblasen verbleiben, sonst bleiben rote Bereiche	3 Minuten
<b>Saures dest. H<sub>2</sub>O:</b>	· 300mL Eisessig · 660mL dest. H <sub>2</sub> O	10 Sek.
<b>dest. H<sub>2</sub>O:</b>		kurz
<b>Aufsteigende Alkoholreihe:</b>	Ethanol wirklich kurz (dippen bis die Schlieren verschwinden), weil sonst das Fast Green herausgewaschen wird	1x 70% EtOH kurz 3x 96% EtOH kurz 3x 100% EtOH kurz 3x Xylol 5 Minuten
<b>Eindecken:</b>	wasserfreiem Eindeckmedium (Eukit, Entellan)	
<b>Sirius Rot 0,1%:</b>	· 1g Direkt Red 80 (Sirius Rot) · 1L gesättigte wässrige	
<b>Pikrinsäure:</b>	· 15-20g Pikrinsäure in 500mL heißem dest. H <sub>2</sub> O gelöst · 12-15g Pikrinsäure in 500mL kaltem dest. H <sub>2</sub> O gelöst gemischt und 24h reifen lassen · filtriert und pH: 2,0	Pikrinsäure ist im trockenen Zustand explosiv, daher wird die gesättigte Pikrinsäure fertig gekauft
<b>Fast Green:</b>	· 1g Fast Green FCF · 1L gesättigte wässrige Pikrinsäure	
<b>Färbeergebnis:</b>		· Kollagen/ Bindegewebe rot · Erythrozyten gelb · Muskulatur, Zytoplasma, Schleim grün

## Anhang

### PAS

Schritt	Bemerkungen	Dauer/ Ergebnis
<b>Entparaffinieren:</b>		3x Xylol 5 Minuten 3x 100% EtOH 5 Minuten 2x 96% EtOH 5 Minuten 2x 70% EtOH 5 Minuten 3x dest. H <sub>2</sub> O 5 Minuten
<b>Perjodsäure (0,1%)</b>		15 Minuten
<b>Fließendes Leitungswasser</b>		2-3 Minuten
<b>dest. H<sub>2</sub>O:</b>		kurz
<b>Schiff'sches Reagenz</b>	zu Beginn der Färbung aus Marlies Kühlschrank holen Vorsicht! Sauber arbeiten! Färbt alles farbecht pink!	40-60 Minuten (länger mit steigendem Alter der Reagenz)
<b>Fließendes Leitungswasser</b>	Warmes Wasser!	7 Minuten
<b>dest. H<sub>2</sub>O:</b>		kurz
<b>Hämalaun nach Böhmer</b>	Vor Gebrauch immer filtern!	1-3 Minuten (länger mit steigendem Alter der Reagenz)
<b>Fließendes Leitungswasser</b>		2-3 Minuten
<b>Differenzieren mit HCl-Alkohol</b>	Danach Mikroskop-Kontrollen	sehr kurz (3x Dippen)
<b>dest. H<sub>2</sub>O:</b>		kurz
<b>Aufsteigende Alkoholreihe:</b>		1x 70% EtOH 2 Minuten 2x 90% EtOH 2 Minuten 3x 100% EtOH 2, 5 und 10 Minuten 3x Xylol 5 Minuten
<b>Eindecken:</b>	wasserfreiem Eindeckmedium (Eukit, Entellan)	
<b>Hämalaun nach Böhmer</b>	1.) 250 mL Aqua bidest. 12,5 g Aluminiumkaliumsulfat (KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> *12H <sub>2</sub> O) 0,125 g Na-Iodat (NaIO <sub>3</sub> ) 2.) 1,25 g Hämatoxylin 12,5 mL Ethanol absolut (EtOH) Lösung 2 über Nacht abgedeckt rühren lassen	
<b>Färbeergebnis:</b>		PAS-positive Substanzen: leuchtend rot (magenta, pink, hellviolett) Zellkerne: blau

## Anhang

### RNA isolation with Trizol

Storafw: Trizol: fridge, Chloroform: solvent cupboard, 80% EtOH: -20 °C, RNaseOUT: -20°C, samples: -80°C

Step	What	Conditions	Calculation/ coments
<b>Tissue crushing</b>	per sample: <b>500µL Trizol</b> in 1,5mL tube add <b>1 Wolframcarbide ball</b> add the frozen <b>tissue</b> sample	<b>Homogenizer</b> <b>1 min</b>	<b><u>Working under fume hood!</u></b>  Final Trizol volume in a 50mL falcon for better pipetting
<b>Adding Chloroform</b>	add <b>100µL chloroform per tube</b>	<b>Centrifugation</b> <b>11000xg</b> <b>15 min</b>	shake until the solution is milky before centrifugation
<b>Phase separation</b>	Take the upper phase with pipettes  add same volume <b>Isopropanol</b>	<b>Incubation</b> <b>RT</b> <b>30 min</b>	for 200µL upper phase, 200µL Isopropanol  the other phase into chloroform waste
<b>Washing</b>		<b>Centrifugation</b> <b>11000xg</b> <b>10 min</b>	
	discard the supernatant add <b>500µL ice cold Ethanol 80%</b>	<b>Centrifugation</b> <b>11000xg</b> <b>10 min</b>	supernatant into GIT waste
	discard the supernatant add <b>500µL ice cold Ethanol 80%</b>	<b>Centrifugation</b> <b>11000xg</b> <b>10 min</b>	supernatant into GIT waste
<b>Dry the pellet</b>	discard the supernatant	<b>Centrifugation</b> <b>Full speed</b> <b>10 min</b>	supernatant into GIT waste
	Dry the pellet in Speed-Vac	<b>Temp. Low</b> <b>5 min</b>	
<b>Elute RNA</b>	for <b>RNase-free H<sub>2</sub>O</b> : 1µL RNaseOUT and 99µL H <sub>2</sub> O	<b>Incubation</b> <b>on ice</b> <b>1 hr</b>	50µL RNase free H <sub>2</sub> O for kidneys 20µL RNase free H <sub>2</sub> O for heart
<b>Storage</b>		<b>at -80°C</b>	