

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

III. Medizinische Klinik und Poliklinik

Prof. Dr. med. Tobias Huber

**Die Rolle des Komplementrezeptors C5aR2 bei der Entstehung von
hypertensiven Endorganschäden**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Matin Kohsar
aus Hamburg

Hamburg 2022

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.04.2024

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Friedrich Koch-Nolte

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

Prof. Ulrich Wenzel

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung | 4 |
| 1.1. Bluthochdruck - Hintergrund | 4 |
| 1.2 Bluthochdruck – Immunologische Faktoren | 5 |
| 1.3 Das Komplementsystem..... | 8 |
| 1.4 Komplement und Bluthochdruck | 11 |
| 2. Material und Methoden | 13 |
| 2.1 Versuchstiere und Gruppeneinteilung | 13 |
| 2.2 Angiotensin-II- und DOCA/Salz-induzierter arterieller Hypertonus..... | 14 |
| 2.3 Blutdruck Messung | 16 |
| 2.4 Bestimmung der Albuminurie..... | 16 |
| 2.5 Plasma Untersuchungen | 17 |
| 2.6 Histopathologische Analysen..... | 17 |
| 2.7 Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell scanning, FACS)..... | 18 |
| 2.8 Quantitative real time (RT-) PCR | 19 |
| 2.9 Statistische Analyse | 20 |
| 3. Ergebnisse | 21 |
| 3.1.1 Renaler Endorganschaden und Inflammation in C5aR2 ^{-/-} Mäusen im Ang II Modell | 22 |
| 3.1.2 Kardialer Endorganschaden und Inflammation in C5aR2 ^{-/-} -Mäusen im Ang II Modell | 32 |
| 3.2.1 Renaler Endorganschaden in C5aR2 ^{-/-} -Mäusen im DOCA/Salz Modell | 34 |
| 3.2.2 Kardialer Endorganschaden in C5aR2 ^{-/-} -Mäusen im DOCA/Salz Modell | 45 |
| 4. Diskussion | 48 |
| 4.1 Schlussfolgerungen | 48 |
| 4.2 Ausblick | 51 |
| 5. Zusammenfassung | 51 |
| 5.1. Zusammenfassung in deutscher Sprache..... | 51 |
| 5.2. Zusammenfassung in englischer Sprache | 52 |
| 6. Erklärung des Eigenanteils | 53 |
| 7. Abbildungsverzeichnis | 54 |
| 8. Literaturverzeichnis | 54 |
| 9. Danksagung | 59 |
| 9. Lebenslauf | 60 |
| 10. Eidesstattliche Erklärung | 63 |

1. Einleitung

1.1. Bluthochdruck - Hintergrund

Arterielle Hypertonie stellt ein wichtiges globales Gesundheitsproblem dar.

Schätzungen zufolge sind im Jahr 2015 8,5 Millionen Todesfällen mit arterieller Hypertonie assoziiert gewesen (Zhou et al., 2021). In Deutschland wurde im Jahr 2019 für die hypertensive Herzerkrankung eine Assoziation mit 32,1 Todesfälle pro 100.000 Einwohner geschätzt, damit ist diese die sechsthäufigste Todesursache gewesen (World Health Organization, 2020).

Ein großes Problem beim Bluthochdruck ist dabei das fehlende Bewusstsein für diese wichtige nicht-infektiöse Erkrankung (*non-communicable disease*). Sowohl in einkommensstarken als auch einkommensschwachen Ländern wissen nur ca. die Hälfte der Betroffenen von ihrer Erkrankung und werden adäquat behandelt (Chow et al., 2013).

Bereits in den 1940er Jahren entwickelte Dr. Irvine Page die sogenannte Mosaiktheorie, um die multifaktorielle Komplexität der Pathogenese von Hypertonus zu erklären. Dr. Page revidierte sein ursprüngliches Erklärungsmodell im Lichte neuer Erkenntnisse der Hypertonusforschung mehrmals; pathogenetische Faktoren des Modells sind vor allem der Einfluss der Niere, des Gefäßsystems und des Zentralen Nervensystems (ZNS) (Harrison et al., 2021). Harrison und Kollegen revidierten das Modell kürzlich erneut unter Einbeziehung moderner physiologischer und biochemischer Konzepte. Die Niere ist dabei Produzent von Renin und aktiviert somit das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), beeinflusst die Volumenhomöostase durch Druckdiurese und Natriurese maßgeblich, moduliert den Sympathikotonus und ist Schauplatz von Immunaktivierung und somit zentral in der Pathogenese des Hypertonus involviert. Das Gefäßsystem ist zum einen auf einer hormonell-endokrinen Ebene (Angiotensin II, NO etc.) und durch Endotheldysfunktion betroffen, zum anderen durch strukturelle Veränderungen mikro- und makrovaskulärer Art und auch als Ort von Inflammation. Neural spielen sowohl efferente Signale aus dem ZNS als auch veränderte afferente Signale durch hämodynamische und metabolische Trigger eine Rolle.

Die Rolle des Aldosterons geht noch über seine klassische Rolle im RAAS hinaus, insbesondere wenn man *cross-talks* von Aldosteron und Immunzellen bedenkt. Auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind auf vielfältige Weise an der Pathogenese von Hypertonus beteiligt. Während Salz in der klassischen Guyton'schen Lehre vor allem bei gestörter Natriurese durch Erhöhung des effektiven zirkulierenden Volumens den Blutdruck erhöht, ist mittlerweile bekannt, dass Salzspeicher im Interstitium (vor allem) der Haut Hypertonus begünstigen und Immunantworten modulieren. Ähnlich komplex sind die

Einflüsse genetischer Faktoren und des Mikrobioms im Darm, welche weitere Bausteine des Mosaiks darstellen. Ein besonders zentraler Faktor bleibt das Immunsystem, welches unter anderem durch Neoantigene, aktivierte Endothelien, Salzzakkumulation und Mikrobiomveränderungen aktiviert wird und alle anderen Faktoren der Pathogenese beeinflusst (Harrison et al., 2021).

Die besonders zentrale und essentielle Bedeutung von Salz und Immunsystem bei der Pathogenese des Hypertonus unterstreicht eine weitere, jüngere Bearbeitung der Mosaiktheorie, indem hier diese beiden Faktoren im Zentrum des Mosaiks platziert werden und so ihre wechselseitige Beeinflussung aller anderen Faktoren verdeutlicht wird (Hengel et al., 2022).

1.2 Bluthochdruck – Immunologische Faktoren

Seit den 1960er Jahren ist bekannt, dass das Immunsystem eine Rolle bei der Pathogenese des Hypertonus spielt (Norlander et al., 2018). Vor allem in den letzten beiden Dekaden werden dabei mehr und mehr spezifische Interaktionen und Effekte einzelner Komponenten des Immunsystems bei der komplexen Pathogenese des Hypertonus beschrieben (Wenzel et al., 2016, Harrison et al., 2011, Zhang and Crowley, 2015, Idris-Khodja et al., 2014, McMaster et al., 2015).

Frühe Indizien für die zentrale Rolle des Immunsystems bei der Entstehung von Bluthochdruck lieferten Arbeiten zur immunsuppressiven Therapie mit Mycophenolat-Mofetil bei *Dahl salt sensitive* Ratten (Rodriguez-Iturbe et al., 2001) und zu T- und B-Zell-defizienten C57/B16 Mäusen durch Knockout des Rekombinase-aktivierenden Gens (RAG1) (Guzik et al., 2007). Auch wenn die Ergebnisse von Guzik et al. sich zum Teil in anderen Laboren nicht reproduzieren ließen (Seniuk et al., 2020), wurde die zentrale Bedeutung von verschiedenen Subtypen von CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen und ihren Zytokinen in einer Vielzahl von Arbeiten demonstriert und ist daher heutzutage ein zentraler Aspekt der immunologischen Pathogenese des Hypertonus (Zhang and Crowley, 2015).

In der Folge wurden für fast alle zellulären und humoralen Faktoren des angeborenen und adaptiven Immunsystems untersucht, wie diese die Entstehung und Progression des Hypertonus beeinflussen (Wenzel et al., 2016, Wenzel et al., 2019, Wenzel et al., 2021a, Norlander et al., 2018). Inflammation ist dabei grundlegender Mechanismus bei der Entstehung hypertensiver Endorganschäden in der Niere, dem Gefäßsystem, dem ZNS und dem Herzen (Norlander et al., 2018).

In der Niere beeinflussen Immunzellen und ihre Zytokine den renalen Natriumtransport und damit letztlich die Volumenhomöostase (Norlander and Madhur, 2017) und können langfristig Fibrose, glomeruläre Schäden und chronische Niereninsuffizienz auslösen (Norlander et al., 2018). Das Gefäßsystem wird ebenfalls von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems infiltriert, vor allem das perivaskuläre Fettgewebe und die Adventitia. Durch Zytokine (insbesondere IL17A), ROS und Matrix-Metalloproteinasen wird vaskuläre Dysfunktion und Fibrose (durch vermehrte Produktion von Kollagenen) begünstigt. Im Gehirn sind Mikroglia wichtige Initiatoren prohypertensiver inflammatorischer Stimuli. Zudem wirken sich sympathische Signale des ZNS dämpfend auf die antiinflammatorischer Immunzellen aus. Auch die kardiale Inflammation und Fibrose im Hypertonus werden durch Infiltration durch Immunzellen (u.a. Th17 Zellen) vermittelt (Norlander et al., 2018).

Für diese Effekte sind zahlreiche Faktoren des angeborenen und adaptiven Immunsystems verantwortlich. ROS (wie das Superoxidanion) sind als Teil des angeborenen Immunsystems an einer Vielzahl von zellulären Prozessen zur Aufrechterhaltung der Homöostase und Abwehr von Mikroorganismen beteiligt. Im Hypertonus spielen vor allem die Modulation des Sympathikotonus, des Gefäßtonus, der renalen Natriumreabsorption und der Immunaktivierung eine pathogenetische Rolle (Wenzel et al., 2016, Wenzel et al., 2021a). Im Gegensatz zu den hochspezialisierten T- und B-Zellrezeptoren erkennen im angeborenen Immunsystem sogenannte *pattern recognition receptors* (PRRs) bestimmte molekulare Signaturen, die mit zellulärem Stress (DAMPs, *danger-associated molecular patterns*) oder fremden Mikroorganismen (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) assoziiert sind. Die Toll-like Rezeptoren (TLR), eine Familie der PRRs, vermitteln wahrscheinlich die Verbindung von DAMPs, Inflammation, vaskulären Veränderungen und Hypertension (McCarthy et al., 2014, Singh and Abboud, 2014, Wenzel et al., 2016).

Wichtige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems sind Makrophagen/Monozyten, Granulozyten und Dendritische Zellen (die als professionelle Antigen präsentierende Zellen, APCs, fungieren). Während die Datenlage bezüglich der Rolle von Neutrophilen Granulozyten eher unklar ist, sind Monozyten/Makrophagen wichtige Treiber der Inflammation. Dendritische Zellen werden durch DAMPs und dem intrazellulären Inflammasom aktiviert und präsentieren Neoantigene, die unter anderem durch Lipidoxidation durch ROS entstehen. Dabei spielen, wie in nachfolgenden Unterkapiteln ausgeführt wird, auch das Komplementsystem eine wichtige Rolle (Wenzel et al., 2016, Wenzel et al., 2021a).

Eine Untergruppe myeloider Zellen, die *myeloid-derived suppressor cells*, regulieren Immunantworten und wirken sich protektiv auf hypertensive Endorganschäden aus (Wenzel et al., 2021a). Unter den prohypertensiven Immunzellen, die sich eher im Bereich zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem verorten lassen, weil sie Merkmale beider Systeme zeigen, sind die natürlichen Killerzellen (NK Zellen, die Rolle anderer Vertreter der Gruppe der *innate lymphoid cells* im Hypertonus ist nicht beschrieben) und $\gamma\delta$ T Zellen, die einen semiinvarianten T Zellrezeptor exprimieren (Wenzel et al., 2016, Wenzel et al., 2021a). Bei der T Zell-Subgruppe der NKT Zellen (die neben dem T Zellrezeptor auch Rezeptoren der NK Zellen exprimieren) wurde eine protektive Rolle im Hypertonus beschrieben (Wang et al., 2019), allerdings liegen hier nur wenige Daten vor (Wenzel et al., 2021a).

Wie eingangs erwähnt, spielen T Zellen als wichtige Effektorzellen des adaptiven Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des Hypertonus. Im Hypertonus werden T Zellen vermehrt zum IFN γ -produzierenden Th1-Phänotyp polarisiert, welcher zu einem gewissen Grad zur Pathogenese beizutragen scheint (Wenzel et al., 2016). Auch Th17 Zellen, welche vor allem das proinflammatorische Zytokin IL17 produzieren, verändern unter anderem die renale Natriumreabsorption und führen damit zu Bluthochdruck (Wenzel et al., 2019). Interessanterweise fördert die erhöhte Zufuhr von Kochsalz über verschiedene Mechanismen die Differenzierung von CD4⁺ T Zellen zu Th17 Zellen. Zum einen geschieht dies über den Transkriptionsfaktor NFAT5 (Binger et al., 2015), zum anderen modulieren hohe Kochsalzkonzentrationen die Aktivierung von DCs und die Zusammensetzung des Darmmikrobioms (Wenzel et al., 2019). Regulatorische T Zellen (Tregs), die antiinflammatorisch und antihypertensiv (Wenzel et al., 2016, Wenzel et al., 2021a) wirken, werden durch hohe Kochsalzkonzentrationen gehemmt (Hernandez et al., 2015).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Immunsystems, der auf vielfältige Weise zum Hypertonus beiträgt, ist das Komplementsystem. Dieses wird in den nachfolgenden Unterkapiteln näher besprochen.

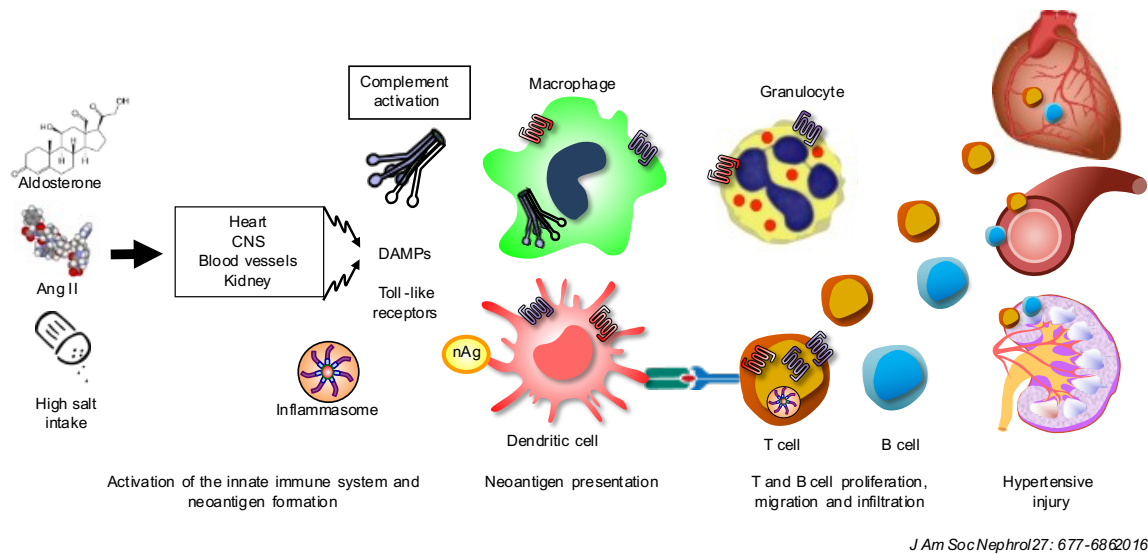


Abbildung 1 Arbeitshypothese zur Entstehung hypertensiver Endorganschäden, aus: (Wenzel et al., 2016)

1.3 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem besteht aus mehr als 30 Proteinen im Serum und wird wegen seiner Eigenschaft der humoralen Abwehr von Pathogenen klassischerweise dem angeborenen Immunsystem zugerechnet, obgleich es angeborene und adaptive Immunantworten moduliert, miteinander vernetzt und die Zellhomöostase beeinflusst (Walport, 2001).

Dabei besteht es nicht allein aus den unmittelbar zur Komplementkaskade gehörenden Molekülen C1 bis C9, sondern schließt Rezeptoren für chemotaktisch wirksame Produkte der Kaskade ebenso ein wie Komplementregulatoren, die ein Überschießen der Immunantwort verhindern. Für die Effektorfunktionen des Komplementsystems sind dabei im Wesentlichen drei Klassen von Molekülen verantwortlich: zum einen die sogenannten Anaphylatoxine C3a und C5a, die durch Bindung an ihre jeweiligen Rezeptoren C3aR und C5aR1 und C5aR2 chemotaktisch und proinflammatorisch wirksam sind, dann die Opsonine (C3b, iC3b, C3d), welche an Oberflächen von Zielstrukturen binden und damit die Phagozytose/Lyse dieser Strukturen fördern und schließlich der *membrane attack complex* (MAC, bestehend aus den Molekülen C5b-C9) (Noris and Remuzzi, 2013).

Das Komplementsystem wird dabei über drei sogenannte kanonische Wege aktiviert, den klassischen, den alternativen und den Lektin-Weg. Wie in Abbildung 2 aus (Wenzel et al., 2017) vereinfacht dargestellt, münden alle drei kanonischen Aktivierungswege des Komplementsystems in einer gemeinsamen Endstrecke, beginnend mit der Spaltung von C3 in C3a und C3b. C3b spaltet dann als C5-Konvertase C5 in C5a und C5b spaltet. C5b

aktiviert dann weitere Komplementfaktoren und bildet mit C6, 7, 8 und 9 den sogenannten *membrane attack complex*, während C5a und C3a als sogenannte Anaphylatoxine durch Interaktion mit ihren Rezeptoren proinflammatorische und chemotaktische Effekte erzielen. Der klassische Weg beginnt mit der Bindung von C1 (sechs C1q Moleküle komplexiert mit jeweils zwei C1s und C1r) an den Fc-Teil an Antigene gebundener IgG und IgM Antikörper zur Aktivierung von C1r und C1s, der Komplex C4bC2a fungiert als C3 Konvertase und stößt die gemeinsame Endstrecke an (Noris and Remuzzi, 2013).

Beim Lektin-Weg wird die gleiche C3-Konvertase gebildet, diesmal allerdings durch Mannose-bindenden Lektine (*mannose-binding lectins*, MBL) und Fikoline aktiviert (Noris and Remuzzi, 2013).

Der alternative Weg hingegen beruht auf einer auch im Gesunden sich ständig spontan abspielenden Hydrolyse einer Thioester Bindung im C3, die eine Konformationsänderung von C3 und Interaktion mit den Faktoren B und D bewirkt. Folglich entsteht eine alternative C3-Konvertase, welche die gemeinsame Endstrecke dann anstößt, wenn C3b in flüssiger Phase oder an bestimmte Oberflächen gebunden (bakterielle Zellwände, Plastik u.ä.) eine zweite, amplifizierende C3-Konvertase bildet (Noris and Remuzzi, 2013).

Neben ihren zentralen Funktionen in der Aktivierung der Kaskade opsonisieren C3b und C4b und ihre entsprechenden Spaltprodukte Immunkomplexe und Bakterien und bereiten damit deren Beseitigung durch das retikuloendotheliale System vor.

Zudem bewirkt die Bindung von C3b an die C3-Konvertasen des klassischen, Lektin- oder alternativen Weges zur Ausbildung von Komplexen, die als C5-Konvertase wirken und C5 in C5a und C5b spalten. C5b ist für die Bildung des *membrane attack complex* essenziell.

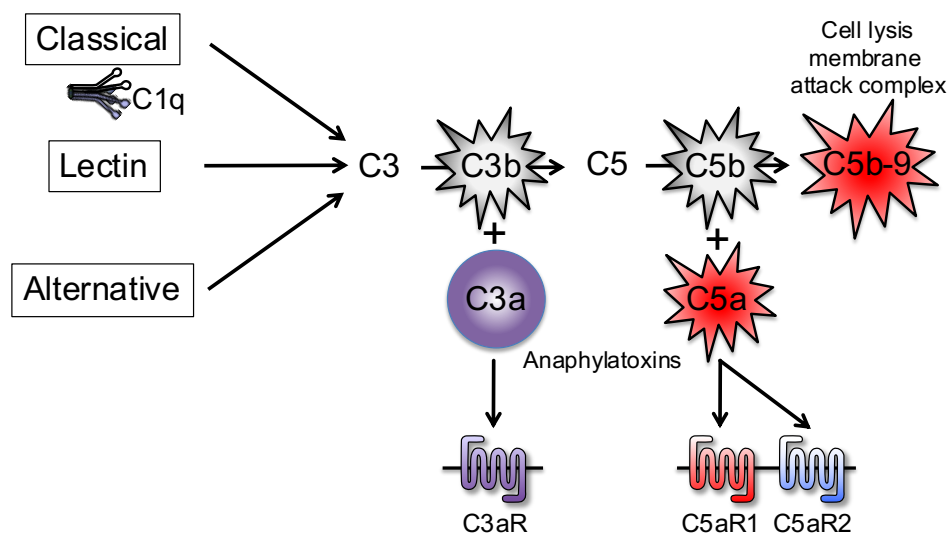


Abbildung 2 aus: (Wenzel et al., 2017) Die drei kanonischen Wege der Komplementaktivierung münden alle vereinfacht dargestellt in einer gemeinsamen

Endstrecke, in der in verschiedenen Amplifikationsschleifen u.a. C3 und C5 gespalten werden und die Bildung des *membrane attack complex* initiiert wird.

C3a und C5a sind, wie oben beschrieben, stark chemotaktisch und proinflammatorisch wirkende Moleküle, die ihre Wirkung durch Bindung an ihre jeweiligen Rezeptoren C3aR und C5aR1/2 entfalten.

C3aR und C5aR1 wirken als klassische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf die Permeabilität und Kontraktion kleiner Gefäße. Zudem beeinflussen sie Effektorfunktionen, Endotheladhäsion und Migration von Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten).

Über C5aR wirkt C5a auch stark chemotaktisch auf Makrophagen, Neutrophile, aktivierte T- und B-Zellen, Basophile und Mastzellen. Die Aktivierung von C5aR1 durch C5a führt unter anderem über TLR-4 und resultierender Zytokinproduktion durch Makrophagen zur Differenzierung von autoreaktiven T-Zellen in Th17 Zellen (Hashimoto et al., 2010). Der selektive C5aR1-Inhibitor CCX168 (Bekker et al., 2016) wurde im Januar 2022 unter dem Namen Avacopan (Handelsname Tavneos) zur Behandlung der schweren, aktiven Granulomatosis mit Polyangiitis und der Mikroskopischen Polyangiitis in der EU zugelassen (European Medicines Agency, 2022).

Neben den Komplementkomponenten in der Zirkulation, die von der Leber produziert werden, spielt lokal produziertes und aktiviertes Komplement eine wichtige Rolle u.a. im Feintuning von T Zellantworten. Bei der Interaktion von T Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (APCs) führt das kostimulatorische Signal zur Produktion von Anaphylatoxinen und Expression ihrer jeweiligen Rezeptoren und bestimmt die Formation einer Th1 oder Th17 Antwort (Le Friec et al., 2013). Die Defizienz von C3aR und C5aR1 in T Zellen führt dann über autoinduktive Produktion von TGF β und vermehrter, intrazellulärer Expression von C5aR2 zur Ausbildung eines regulatorischen Phänotyps iTregs (*induced T regulatory cell*) (Strainic et al., 2013).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass intrazellulär produzierte Komplementfaktoren auch mit dem NLRP3-Inflammasom interagieren, was zur Bezeichnung „Komposom“ geführt hat. Dabei führt eine Aktivierung des T Zellrezeptors zur intrazellulären Spaltung von C3 und C5, wobei C5a über C5aR1 die Aktivierung des Inflammasoms und damit die Differenzierung der naiven T Zelle in einen Th1 Effektorphänotyp fördert. Stimulierung von intrazellulärem und an der Oberfläche exprimierten C5aR2 durch C5a und C5a-desArg dagegen hemmt das Inflammasom und die durch C5aR1 aktivierten Signalwege und dient

somit der negativen Regulation der Effektorfunktionen der T Zelle (Arbore et al., 2017, Arbore et al., 2016). Veränderungen des Komplexos in T Zellen wurden auch in Autoimmunerkrankungen wie z.B. der Systemischen Sklerose beschrieben (Arbore et al., 2020).

Der C5-Achse kommt somit eine tragende Rolle bei der Vermittlung einer Immunantwort zu. Untersuchungen in einem Mausmodell renaler Inflammation durch Inokulation der Blase mit uropathogenen *E.coli* liefern Hinweise auf eine proinflammatorische Wirkung von C5aR2 (Zhang et al., 2020). Allerdings gibt es auch zahlreiche Hinweise auf eine antiinflammatorische Wirkung von C5aR2 und dieser Rezeptor ist in seiner genauen Funktion bei der Regulation inflammatorischer Prozesse weit weniger gut verstanden als C5aR1 (Li et al., 2019).

C5aR2 (auch C5L2 genannt) koppelt nicht an G-Proteine, bindet auch die durch Carboxypeptidasen desargininierte Form von C5a mit hoher Affinität, hat langsame Ligandenbindungsraten und wird konstitutiv internalisiert. Diese Beobachtungen legten den Schluss nahe, C5aR2 könnte als sogenannter *decoy receptor* allein dazu dienen, extrazelluläres C5a und C5a-desArg abzufangen und somit C5aR1 in seiner proinflammatorischen Rolle zu regulieren. Erkenntnisse neuerer Forschung legen allerdings nahe, dass die Regulation der Signaltransduktion über C5aR1 durch C5aR2 über C5aR1/C5aR2-Heterodimere, beta-Arrestine und Rezeptorinternalisierung erfolgt (Li et al., 2019). Die Bildung von C5aR2/C5aR1- und C5aR2/C3aR-Heterodimeren könnte über verändertes *Trafficking* an die Zelloberfläche und veränderte Rezeptorinternalisierung die z.T. proinflammatorische Wirkung von C5aR2 in einigen Modellen erklären.

Sowohl durch Heterodimerisierung mit C5aR1 als auch unabhängig davon nimmt C5aR2 zudem Einfluss auf die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren wie $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und IL-10 durch Zellen des angeborenen Immunsystems nach Stimulation von Toll-like Rezeptoren. Alles in allem sind die Anaphylatoxinrezeptoren C5aR1 und C5aR2 in eine Vielzahl von Signalwegen involviert und interagieren mit verschiedenen Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

1.4 Komplement und Bluthochdruck

Wie viele Faktoren des Immunsystems wird auch das Komplementsystem durch Blutdruckerhöhung aktiviert. Dabei vermittelt es z.B. die Pathogenese vaskulärer Dysfunktion durch direkte Effekte auf Zielzellen, die über Komplementrezeptoren auf den Zielzellen vermittelt werden. Zudem ist das Komplementsystem an der Aktivierung von

Zellen des Immunsystems und deren Rekrutierung in das Gewebe entsprechender Endorgane beteiligt, sowie an der Produktion proinflammatorischer Botenstoffe (Ruan and Gao, 2019). Auch die oben beschriebenen Anaphylatoxinrezeptoren spielen dabei eine wichtige Rolle. Im Modell der unilateralen Ureterobstruktion (ein Modell des akuten Nierenversagens, das in eine chronische Niereninsuffizienz übergeht) tragen die Komplementfaktoren C3a und C5a und ihre Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren C3aR und C5aR1 auf renalen Makrophagen und Perizyten entscheidend zur Pathogene renaler Fibrose bei (Portilla and Xavier, 2021). Die Annahme, dass der Übergang akuter Schädigung in chronische Veränderungen nicht nur bei der Niereninsuffizienz durch experimentelles postrenales Nierenversagen, sondern auch bei hypertensiven Nierenschäden entscheidend durch das Komplementsystem beeinflusst wird, liegt nahe.

So wurde in den Bluthochdruckmodellen Angiotensin-II und DOCA/Salz gezeigt, dass die durch den Hypertonus induzierte Erhöhung der C3a- und C5a-Spiegel zu erhöhter Expression von C3aR und C5aR1 in Herz, Niere und perivaskulärem Gewebe führt (Zhang et al., 2014a, Shagdarsuren et al., 2005). Die erhöhte Produktion von C3a und C5a im DOCA/Salz Modell ist dabei abhängig von Makrophagen, welche C3 exprimieren (Ruan et al., 2015).

Wie oben beschrieben regulieren die C3a/C3aR- und C5a/C5aR-Achsen die Funktion von Tregs negativ, während eine Blockade dieser Signalwege zur Differenzierung von CD4⁺ T Zellen in regulatorische T Zellen führt. Entsprechend produzieren CD4⁺ T Zellen von C3aR/C5aR^{-/-} Mäusen nach Aktivierung weniger proinflammatorisches IFN γ und IL6, dafür mehr antiinflammatorische Zytokine wie IL10 und TGF β . Die C3aR- und C5aR1-defizienten Mäuse entwickeln nach Angiotensin-II-Infusion einen weniger ausgeprägten Bluthochdruck im Vergleich zum Wildtyp und den jeweiligen Einzelknockouts. Der protektive Effekt des Doppelknockouts wird bei Depletion der Tregs durch Anti-CD25-Antikörper aufgehoben. Außerdem führt der adoptive Transfer von Tregs von C3aR/C5aR^{-/-} Mäusen zu Wildtypmäusen zu einem höheren Schutz vor durch Angiotensin II induzierten Hypertonus und Nierenschaden als der Transfer von Tregs von Wildtypmäusen. Zusammen legen diese Ergebnisse eine tragende Rolle der Komplementrezeptoren C3aR und C5aR1 bei der Vermittlung von hypertensiven Endorganschäden durch Inaktivierung von Tregs nahe (Ruan and Gao, 2019).

Bei hypertensiven Patienten und bei Mäusen, die Angiotensin-II-Infusionen erhielten, wurden im Vergleich zu gesunden Kontrollen höhere Serumspiegel an C5a gemessen (Zhang et al., 2014a). C5aR1 defiziente Mäuse zeigten ein verringertes kardiales *remodeling* und

Inflammation nach Angiotensin-II-Infusion, gleiche Effekte ließen sich durch Applikation des selektiven C5aR1-Inhibitors PMX53 in Wildtypmäusen replizieren (Zhang et al., 2014a, Zhang et al., 2014b).

Durch Experimente mit Knochenmarkschimären konnte gezeigt werden, dass das kardiale *remodeling* durch Angiotensin-II-Infusion von C5aR1-exprimierenden Zellen aus dem Knochenmark und nicht von vaskulären Zellen vermittelt wird (Zhang et al., 2014a). Auch in Ratten im DOCA/Salz-Modell konnte der C5aR1 Antagonist PMX53 Endotheldysfunktion sowie Herzhypertrophie und -fibrose abmildern, ohne die Blutdruckerhöhung zu verhindern (Iyer et al., 2011).

Mithilfe einer C5aR1-Reportermaus konnte gezeigt werden, dass C5aR1 in der Niere von Makrophagen, Dendritischen Zellen und Granulozyten exprimiert wird, nicht aber auf residenten Zellen (Weiss et al., 2016). Nach Angiotensin-II-Infusion zeigte sich wie bei (Zhang et al., 2014a) ein nephroprotektiver Effekt des Knockouts von C5aR1 ohne Auswirkung auf den systolischen Blutdruck. Allerdings war der kardiale Schaden sogar aggraviert (Weiss et al., 2016). Während also die nephroprotektive Wirkung einer Blockade der C5a:C5aR1-Achse im Hypertonus naheliegt, bleibt die Auswirkung auf hypertensives kardiales *remodeling* kontrovers (Wenzel et al., 2021b).

Zur Rolle des zweiten C5a-Rezeptors, C5aR2, auf hypertensive Endorganschäden liegen bisher keine Erkenntnisse vor.

Die hier vorliegende Dissertation befasste sich mit der Frage, ob der konstitutive *Knockout* des Komplementrezeptors C5aR2 Auswirkungen auf den Phänotyp von Balb/c Mäusen in zwei Modellen aggravierter, hypertensiver Endorganschäden hat.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Gruppeneinteilung

Bei den Versuchstieren handelten es sich um zu Beginn der jeweiligen Versuche zehn bis zwölf Wochen alte Wildtyp Balb/c Männchen und C5aR2-knockout Männchen, die auf dem Balb/c-Hintergrund waren. Wildtyp Balb/c Männchen wurden von Charles River Laboratories (Wilmington, Massachusetts, Vereinigte Staaten) bezogen und in der Forschungstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) über mehrere Generationen in Inzucht gehalten. C5aR2-Knockoutmäuse wurden ursprünglich von Prof. Jörg Köhl (Institut für Systemische Entzündungsforschung, Universität zu Lübeck) zur Verfügung gestellt und dann in der Forschungstierhaltung des UKE als homologe Knockoutlinie auf Balb/c-Hintergrund weitergezüchtet.

Mindestens eine Woche vor Beginn der Experimente wurden die Mäuse jeweils in die Tierhaltung des Campus Forschung am UKE überführt, wo sie dann bis zur Organentnahme und Euthanasierung am Ende der Versuche gehalten wurden.

Alle Tierversuche wurden von der Behörde für Justiz und Verbraucherschutz genehmigt (TVA G 104-16 und N 50-19).

Wie zuvor bei (Niemann, 2015) beschrieben, wurden diese in Standardkäfigen des Typs II long zu zweit bis fünft gehalten, in denen sie dauerhaft Zugang zu Futter (LASQCDiets™ Rodent 16, LASvendi, Soest, Deutschland) und Trinkwasser bzw. 0,9-prozentiger Natriumchloridlösung (s.u.) ad libitum hatten. Der Käfigwechsel erfolgte je nach Bedarf ein- bis dreimal die Woche. Die Käfige waren mit Einstreu auf Holzbasis und Nestmaterial aus Zellstoff ausgestattet.

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

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

Verglichen wurden drei Gruppen in zwei Reihen von Experimenten: Normotensive Wildtyp Mäuse, Wildtyp Mäuse mit Angiotensin II (erste Versuchsreihe) oder DOCA (zweite Versuchsreihe) und C5aR2^{-/-} Mäuse ebenfalls mit Angiotensin II (erste Versuchsreihe) oder DOCA (zweite Versuchsreihe).

2.2 Angiotensin-II- und DOCA/Salz-induzierter arterieller Hypertonus

Wie zuvor beschrieben (Ahadzadeh et al., 2018, Weiss et al., 2016), wurden im Sinne einer beschleunigten/aggravierten Induktion hypertensiver Endorganschäden Balb/c und C5aR2-Knockout Mäuse unter Anästhesie mittels Isofluran und Analgesie unilateral nephrektomiert. Sieben Tage später startete die erhöhte Salzaufnahme durch Anreichern des Trinkwassers mit 0,9% NaCl. Weitere sieben Tage später erfolgte die kontinuierliche Infusion von 1,0 bis 1,5ng/gKG/min Ang II (Sigma, USA) mittels einer ebenfalls in Isoflurannarkose und Analgesie subkutan implantierten osmotischen Minipumpe (Alzet 1002, Cupertino, USA). An Tag 14 nach Pumpenimplantation (28 Tage nach Versuchsstart durch unilaterale Nephrektomie) wurden die Versuchstiere euthanasiert und Nieren, Herzen, Aorten, sowie Blut für histologische, durchflusszytometrische und laborchemische Untersuchungen entnommen.

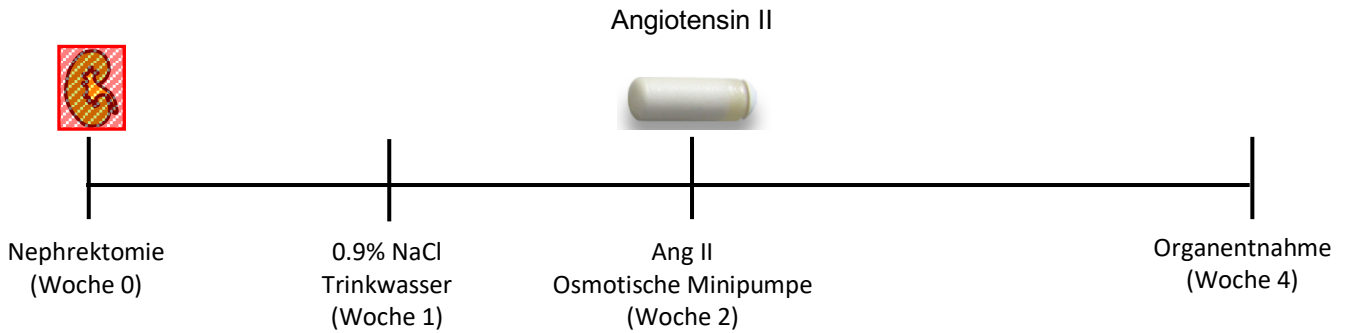


Abbildung 3: Übersicht über den Versuchsablauf im Ang II-Modell.

Als zweites Modell hypertensiver Endorganschaden diente das DOCA/Salz Modell. Hierbei wurden die Mäuse zunächst unter Isoflurananästhesie und Analgesie unilateral nephrektomiert und zudem ein 50 mg DOCA Pellet (Deoxycorticosteron Acetate; Innovative Research of America, USA) subkutan am Rücken implantiert. Am Tag darauf (Tag 1) erhielten die Mäuse 0,9 % NaCl im Trinkwasser. Die Organentnahme erfolgte 6 Wochen nach Start des Versuches.

Nach operativen Eingriffen erfolgte die Analgesie für bis zu drei 3 Tage postoperativ mittels Tramadol im Trinkwasser. Der Gesundheitszustand wurde regelmäßig anhand der Bewegung sowie des Nestbauverhaltens überprüft. Bei Bedarf wurden die Versuchstiere mit zusätzlicher Analgesie, Wärmezufuhr und Weichfutter versorgt oder bei Erfüllung entsprechender Kriterien oder moribundem Erscheinen/Schmerzen mittels zervikaler Dislokation nach CO₂-Narkose euthanasiert.

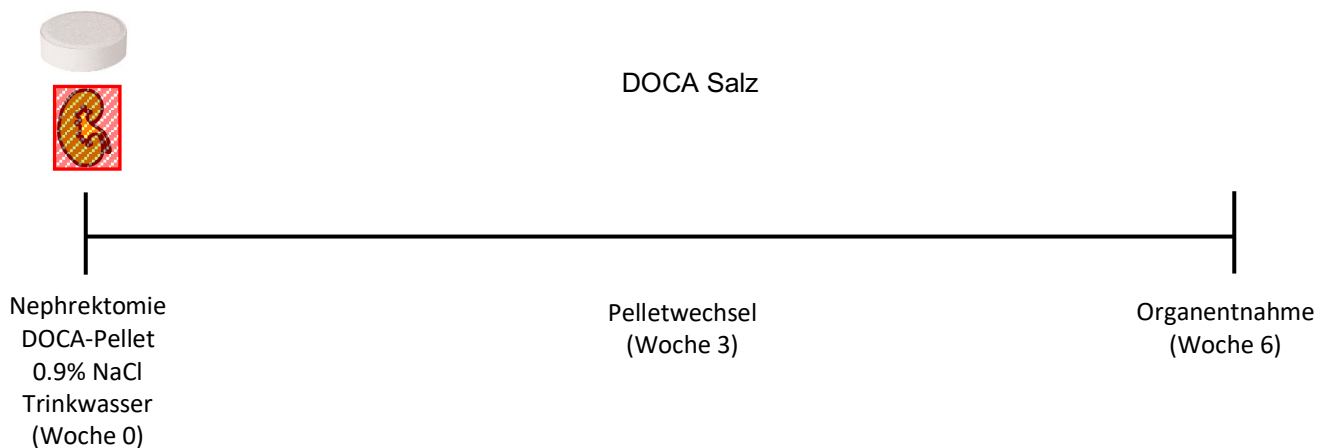


Abbildung 4: Vereinfachte Übersicht über den Versuchsablauf im DOCA/Salz-Modell.

Um eine konstitutionelle renale Schädigung durch den Knockout des C5aR2 auszuschließen, wurden 2 C5aR2-defiziente Mäuse ohne vorherige Induktion von Hypertonus phänotypisch charakterisiert.

2.3 Blutdruck Messung

Der systolische Blutdruck wurde nichtinvasiv mittels eines sogenannten Tail-cuff-Systems (CODA® HAT-4, Kent Scientific, Torrington, Connecticut, Vereinigte Staaten und MC4000, Hatteras Instruments, Cary, North Carolina) gemessen. Hierzu wurden die Mäuse jeweils in der Woche vor Beginn der Versuche 4 - 5 Tage lang durch tägliche Blutdruckmessungen an die Messprozedur gewöhnt („trainiert“). Anschließend erfolgten Messungen des arteriellen Blutdruckes zu mehreren Zeitpunkten einer jeden Versuchsreihe. Gemäß den Herstellerangaben wurden die Mäuse in den entsprechenden Haltevorrichtungen fixiert, die Blutdruckmanschette am Schwanz befestigt und die Blutdruckwerte dann automatisiert oszillographisch in 15 direkt aufeinanderfolgenden Messungen erhoben. Die ersten 5 Messungen jeder solcher Messreihen wurden als Akklimatisierungsphase aus der Mittelwertberechnung ausgeschlossen, ebenso jede Messung, bei der Bewegungsartefakte und ähnliche Messfehler zu nicht verwertbaren Ergebnissen geführt hatte.

2.4 Bestimmung der Albuminurie

An den Tagen 3, 7 und 12 nach Pumpenimplantation wurden die Mäuse für bis zu 6 Stunden in metabolische Käfige mit Zugang zu Trinkwasser zur Urinsammlung gesetzt. Die Albuminkonzentration im Urin wurde mittels ELISA gemessen.

Um die Höhe der Albuminkonzentration im Urin abzuschätzen und damit die nötigen Verdünnungen für den ELISA (s.u.) zu bestimmen, wurden 9µl Urin auf das Proteinfeld eines Urinteststreifens (Multistix 10SG, Siemens, München, Deutschland) pipettiert und nach folgendem Schema die notwendige Verdünnung der Urinprobe für den ELISA festgelegt: Kontrollmäuse=1:100; „0“=1:500; „+“=1:5000; „++“=1:20.000; „+++“=1:50.000; „++++“=100.000.

Kurz zusammengefasst wurden High Binding 96 Well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit einem Coating Antikörper (Goat Anti-Mouse Albumin, Biozol, Eching, Deutschland) inkubiert, nach einem Waschschrift mit Postcoat Puffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) geblockt und dann mit den Proben und Maus-Albumin-Standardlösungen (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) inkubiert. Nach weiterem Waschschrift erfolgte die Inkubation mit dem Detection-Antikörper (Goat Anti-Mouse Albumin HRP-konjugiert, Biozol, Eching, Deutschland) und hiernach die enzymatische Reaktion (TMB Elisa Peroxidase Substrate, Biozol, Eching, Deutschland) und Blockade mit Phosphorsäure. Anschließend wurde die Platte auf einem Photometer (EL808,

BioTek Instruments, Winooksi, Vermont, Vereinigte Staaten) gemessen und die Albuminkonzentration berechnet.

Die Kreatininkonzentration im Urin wurde mithilfe eines kommerziellen Assays „Creatinin Jaffé Kinetisch Fluid“ gemäß Herstellerangaben bestimmt (Hengler Analytik, Steinbach Deutschland). Die Bildung des Farbkomplexes mit Pikrinsäure wurde ebenfalls auf einem Photometer gemessen (EL808, BioTek Instruments, Winooksi, Vermont, Vereinigte Staaten).

2.5 Plasma Untersuchungen

Am Ende der Versuchsperiode wurde bei der Organentnahme 14 Tage nach Pumpenimplantation bzw. 6 Wochen nach DOCA-Pellet-Implantation heparinisertes Blut entnommen und Harnstoff-N (BUN, blood urea-N) und Cholesterin im Zentrallabor des Instituts für Klinische Chemie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf automatisiert gemessen.

2.6 Histopathologische Analysen

Nach der Organentnahme wurden von jeder Maus jeweils eine Scheibe der Niere und des Herzens in 4% neutral gepufferten Formalin für 24 Stunden fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend Schnitte angefertigt. Diese wurden dann deparaffiniert und für die Lichtmikroskopie gefärbt.

Der glomeruläre Schaden wurde histologisch nach einer semiquantitativen Skala anhand von mit PAS Reagenz (Merck, Deutschland) gefärbten Nierenschnitten bewertet, in der 0 kein Schaden bedeutet, 1 milder Schaden in weniger als einem Drittel des Glomerulus, 2 Schaden in mehr als einem Drittel des Glomerulus und 3 Schaden im gesamten Glomerulus. Unter 200facher Vergrößerung wurden 20 Glomeruli pro Tier analysiert.

Der tubulointerstitielle renale Schaden wurde ebenfalls nach einer semiquantitativen Skala anhand der mit PAS Reagenz (Merck, Deutschland) gefärbten Nierenschnitten bewertet, wobei 0 keinen Schaden bedeutet, 1 leichte Schädigung, 2 Schädigung in weniger als 50% der Tubuli eines Gesichtsfeldes und 3 intensive Schädigung von mehr als 50% der Tubuli eines Gesichtsfeldes. Die Schädigung wurde definiert als Erweiterung der Tubuli, Abflachung und Atrophie des Tubulusepithels mit Verdickung der Basalmembran und Erweiterung und Vernarbung des Interstitiums. 10 Gesichtsfelder wurden unter 200facher Vergrößerung evaluiert.

Zur Evaluation der kardialen Fibrose wurden Herzschnitte mit Sirius Rot/Fast Green gefärbt und 10 Gesichtsfelder in 200facher Vergrößerung anhand einer semiquantitativen Skala in

vier Schweregrade eingeteilt (0=keine erkennbare Fibrose, 1=minimal Fibrose, 2=weniger als 50% des Gesichtsfeldes fibrosiert, 3=mehr als 50% des Gesichtsfeldes fibrosiert), wie zuvor bei alternativer Fibrosefärbung durchgeführt (Krebs et al., 2012).

Für die konfokale Mikroskopie der tdTomato- C5aR2fl/fl Reportermaus wurden Nierenschnitte nach der Organentnahme in flüssigem Stickstoff (N-Butan, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) eingefroren und anschließend geschnitten und das Tomato-Signal, sowie WGA (wheat germ agglutinin) und die Zellkerne gefärbt.

Die Auswertung der Immunfluoreszenz erfolgte auf einem LSM 510 meta microscope mithilfe der LSM Software (beide Zeiss, Jena, Deutschland).

2.7 Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell scanning, FACS)

Wie zuvor beschrieben (Ahadzadeh et al., 2018, Niemann, 2015, Weiss et al., 2016), wurden aus Nieren- und Herzgewebe Einzelzellsuspensionen der isolierten Leukozyten hergestellt. Das Nierengewebe wurde direkt nach der Organentnahme mittels eines Skalpells zerkleinert und anschließend mit Kollagenase D und DNase verdaut (Roche, Mannheim, Germany) und durch gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) zu einer Suspension verarbeitet. Mit dieser Suspension erfolgten dann mehrere Läufe durch Zellsiebe (Falcon, Corning, USA) und Waschschriffe, bevor die Erythrozyten mit Ammonium Chlorid lysiert wurden.

Das Volumen der Einzelzellsuspension wurde dann der Anzahl der *panels* der geplanten Färbungen entsprechend aufgeteilt. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde 10µl Mausserum hinzugegeben und bei 4°C 15 Minuten inkubiert.

Für die FACS Analyse wurden Fluorochrom-konjugierte Antikörper eingesetzt (CD45 (30-F11), CD3 (17A2), CD4 (GK1.5), CD8 (53-6.7)).

Zur intrazellulären Färbung von IL-17A (TC11-18H10.1) und IFN-γ (XMG1.2) wurden die Zellen mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA; 50 ng/ml; Sigma) and Ionomycin (1 µg/ml; Calbiochem-Merck, Darmstadt, Germany) aktiviert. Die Exkretion der Zytokine wurde mit Brefeldin A (10 µg/ml; Sigma) blockiert.

Zur Färbung der Transkriptionsfaktoren FoxP3, GATA3 und RORγt wurden die Leukozyten nach Färbung der Oberflächenproteine mithilfe des FOXP3 staining kits (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Vereinigte Staaten) permeabilisiert, intrazellulär gefärbt und anschließend fixiert.

Bei Versuchen, bei welchen ausschließlich Oberflächenfärbungen erfolgten, wurden die Leukozyten am Ende der Färbung mit 0,5%igen Paraformaldehyd fixiert.

Die Messung erfolgte innerhalb von 24h nach Färbung mit einem Becton & Dickinson LSRII System (Becton&Dickinson, New Jersey, Vereinigte Staaten) und der FACSDiva Software (Becton&Dickinson, New Jersey, Vereinigte Staaten). Die Datenauswertung wurde mit FlowJo (Tree Star, USA) durchgeführt.

Einzelzellen wurden mittels Gating der Vorwärtsstreuungsmaße FSC-W und FSC-A identifiziert. Tote Zellen, die LIVE/DEAD™-positiv (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Vereinigte Staaten) waren, wurden von nachfolgenden Analysen ausgeschlossen. Die Expression CD45 diente der Definition von Leukozyten.

2.8 Quantitative real time (RT-) PCR

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

CCL2 Fw: GGC TCA GCC AGA TGC AGT TAA

CCL2 Rev: CCT ACT CAT TGG GAT CAT CTT GCT

PAI-1 Fw: GGA CAC CCT CAG CAT GTT CA

PAI-1 Rev: TCT GAT GAG TTC AGC ATC CAA GAT

FOXP3 Fw: CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT

FOXP3 Rev: TTC TCA CAA CCA GGC CAC TTG

18S Fw: CAC GGC CGG TAC AGT GAA AC

18S Rev: AGA GGA GCG AGC GAC CAA A

ANP Fw: GTG CGG TGT CCA ACA CAG AT

ANP Rev: GCT TCC TCA GTC TGC TCA CTC A

Kollagen I a2 Fw: CCC CGG GAC TCC TGG ACT T

Kollagen I a2 Rev: GCT CCG ACA CGC CCT CTC TC

C5aR1 Fw: GTT ACC ACA GAA CCC AGG AG

C5aR2 Rev: CGC AGG TAT GTT AGG ATC CAT GC3aR

C1q Fw: CAA AGG AGA GAG AGG GGA GC

C1q Rev: CCC CAC ATT GCC AGG TTT GC1r

C1s Fw: ACC TCA GAC TTC TCC AAC GA

C1s Rev: AAG TGG CTA CAG GGG ACA TC

TNF alpha Fw: CCA CCA CGC TCT TCT GTC TA

TNF alpha Rev: CAC TTG GTG GTT TGC TAC GA

C3 Fw: GGA AAC GGT GGT GGA GAA AG

C3 Rev: ATA AGA CAG TGG AGC CAG GG

2.9 Statistische Analyse

Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. Für die statistischen Analysen wurde Graph Pad Prism (Version 8.3 und Version 9) genutzt.

Die Daten wurden zunächst mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft. Bei Vorliegen der Normalverteilung wurden der two-way ANOVA und Post-hoc Analyse nach Holm-Sidak (Adjustierung für multiple Vergleiche) durchgeführt, bei nicht normalverteilten Daten fanden der Kruskal-Willis Test und Post-hoc Analyse nach Dune Anwendung. Die Adjustierung der p-Werte für multiple Vergleiche war notwendig, da drei Gruppen miteinander verglichen wurden: normotensive Wildtypkontrollen, hypertensiver Wildtyp und hypertensiver Knockout. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha=0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

Zunächst gingen wir der Frage nach, ob C5aR2⁺ Zellen in der Niere nachweisbar sind. Dazu wurden renale Leukozyten einer tdTomato-C5aR2^{fl/fl}-Reportermaus in der Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. C5aR2⁺ Zellen ließen sich als sehr kleine Population von CD4⁺ T Zellen finden, daneben exprimierten wenige Dendritische Zellen, Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten C5aR2. In der konfokalen Mikroskopie ließ sich keine relevante Expression von C5aR2 auf residenten oder infiltrierenden Zellen in der Niere und im Herzen der tdTomato-C5aR2^{fl/fl}-Reportermaus nachweisen (Abbildung 5).

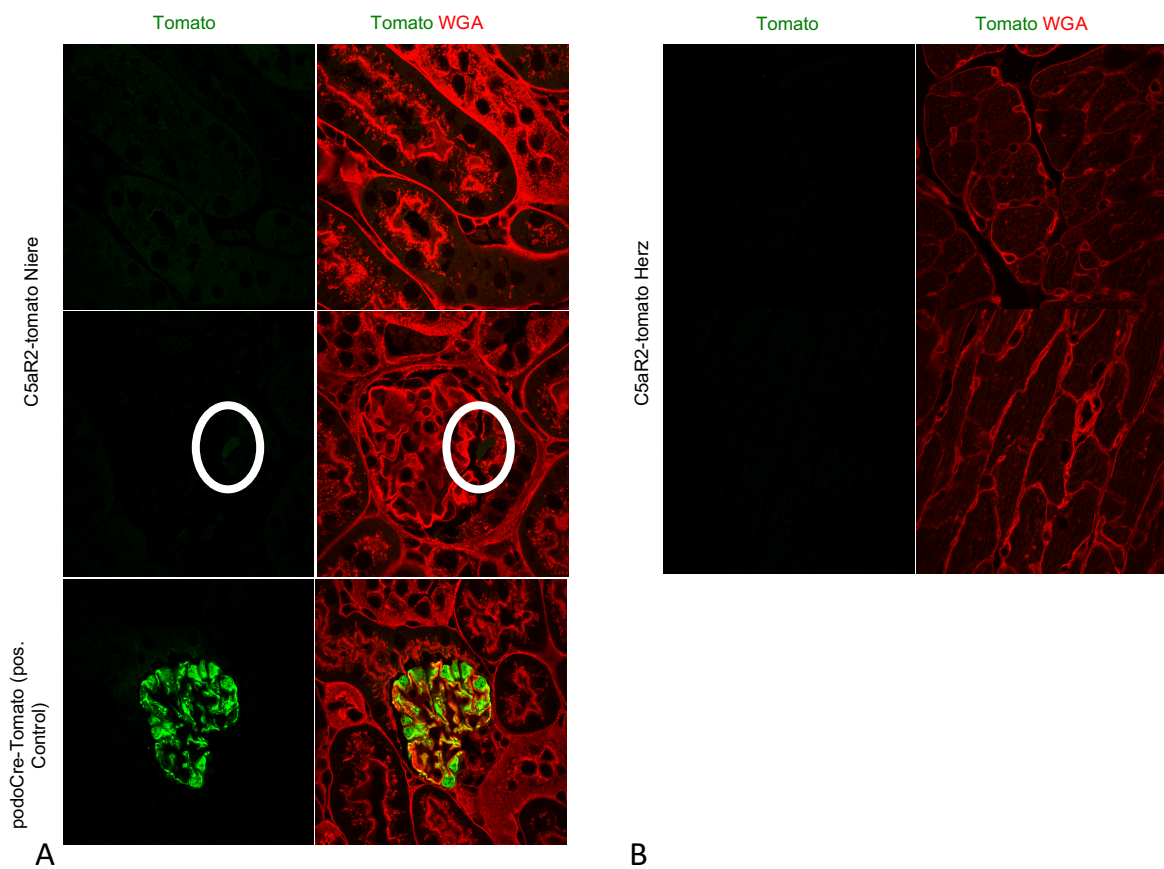


Abbildung 5AB: Konfokale Mikroskopie der Nieren – und Herzschnitte der td-Tomato-C5aR2^{fl/fl} Maus. In der Niere (A) finden sich weder im Tubulointerstitium (oben) noch im Glomerulum (Mitte) eindeutig positive Signale auf residenten oder infiltrierenden Zellen, abgesehen von einem vereinzelt schwach positiven Signal (Kreis). Die Positivkontrolle, welche den Farbstoff Tomato auf allen Podozyten exprimiert, zeigt eine gleichmäßig kräftige Färbung des Glomerulums (unten). Im Herzen (B) der td-Tomato-C5aR2^{fl/fl} Maus kommt ebenfalls keine Färbung von C5aR2 auf residenten oder infiltrierenden Zellen zur Darstellung.

Beide hypertensive Gruppen zeigten eine erhöhte Mortalität gegenüber der Kontrollgruppe. Zwischen den hypertensiven Versuchsgruppen war die Mortalität aber nicht signifikant verändert.

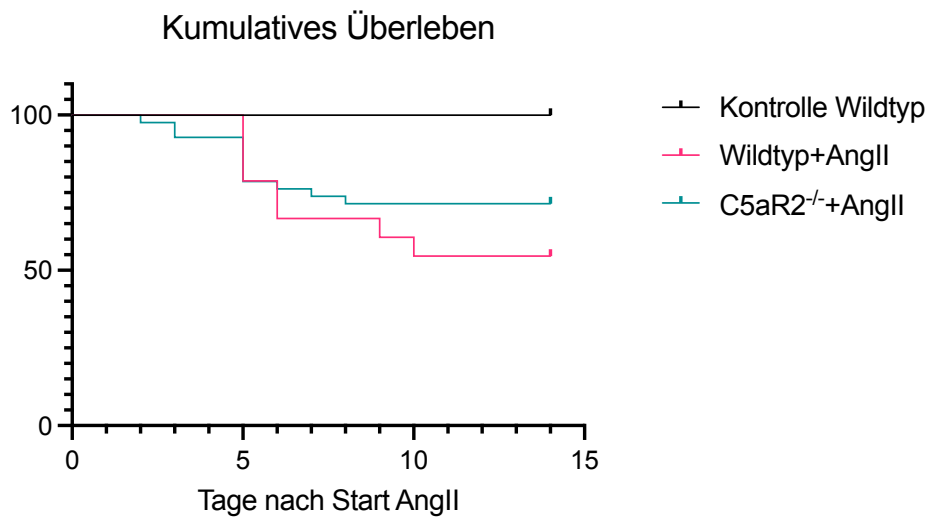


Abbildung 6: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier im Ang II Modell

3.1.1 Renaler Endorganschaden und Inflammation in C5aR2^{-/-} Mäusen im Ang II Modell

Ang II führte zu einem signifikanten Anstieg des systolischen Blutdrucks in beiden Versuchsgruppe gegenüber den normotensiven Kontrollen. Zwischen Wildtyp und C5aR2-Knockout ließ sich allerdings kein Unterschied finden.

Blutdruckmessungen *tail cuff* System im Zeitverlauf

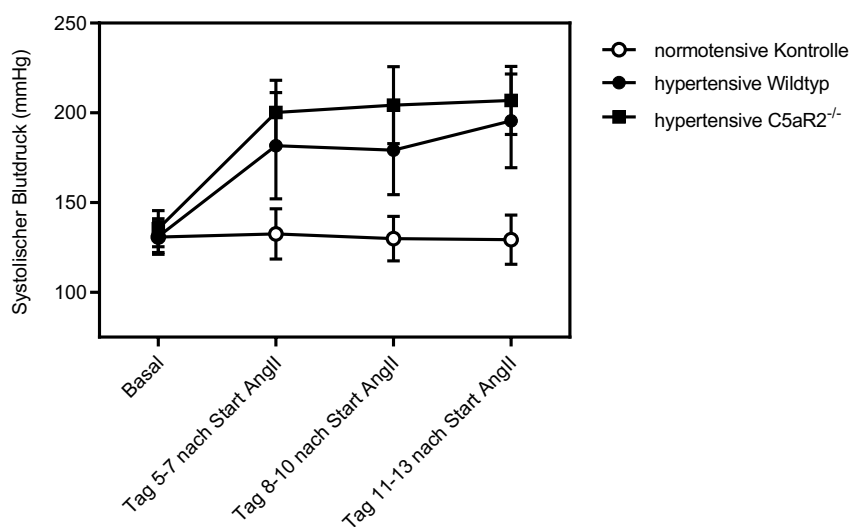


Abbildung 7: Systolischer Blutdruck im zeitlichen Verlauf

Zudem führte Ang II zu einem signifikanten Anstieg des relativen Nierengewichtes (bezogen auf das Körpergewicht) bei beiden Genotypen, Wildtyp und C5aR2-Knockout. Die Gewichtszunahme war in der C5aR2-Knockoutgruppe signifikant höher als in Wildtypmäusen. Wird das Nierengewicht auf die Tibiallänge bezogen, zeigten allein C5aR2-Knockoutmäuse einen signifikanten Anstieg des Nierengewichtes gegenüber den normotensiven Wildtypkontrollen und den hypertensiven Wildtypmäusen.

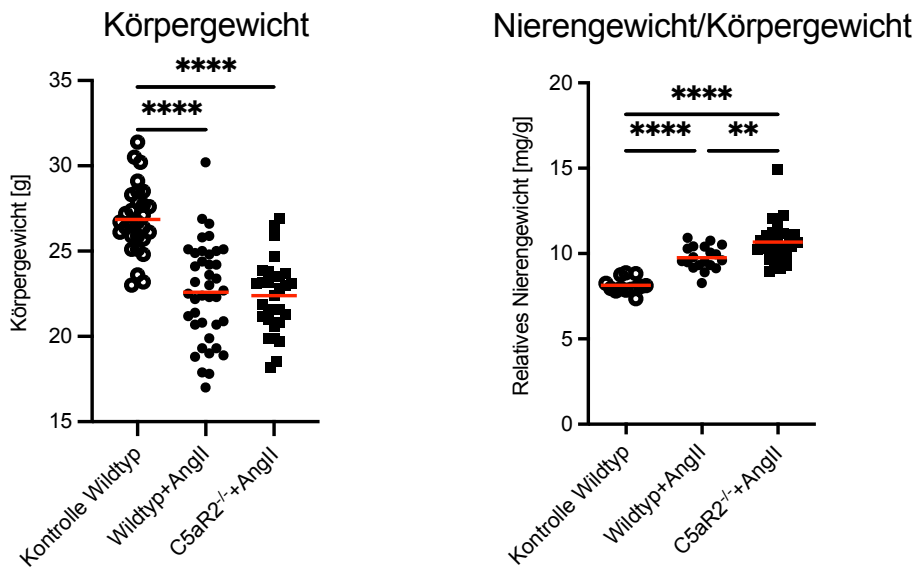


Abbildung 8: Körpergewichte der Mäuse bei Organentnahme (links), Nierengewichte bei Organentnahme bezogen auf das Körpergewicht (rechts)

Um das Ausmaß der Nierenschädigung im Verlauf des Versuches beurteilen zu können, führten wir Messungen der Albuminurie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Implantation der osmotischen Minipumpe durch. In der basalen Messung, vor Beginn der Versuche, fand sich weder in den Wildtyp- noch in den Knockoutmäusen eine relevante Albuminurie. An Tag 4, 7 und 10 des Versuches nach Implantation der Ang II Minipumpen ließ sich sowohl in Wildtyp- als auch C5aR2-Knockout Mäusen zu allen Zeitpunkten eine deutlich erhöhte Albuminurie gegenüber den normotensiven Kontrollen feststellen. An Tag 4 war dabei die Albuminurie in der Knockoutgruppe gegenüber der hypertensiven Wildtypgruppe signifikant höher. An Tag 7 und 10 fand sich dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen hypertensiven Wildtyp- und Knockoutmäusen.

Als Ausdruck dieser langanhaltenden Proteinurie war in beiden hypertensiven Versuchsgruppen der Cholesterinspiegel im Blut erhöht, ohne Unterschied zwischen Wildtyp- und C5aR2-Knockoutmäusen. Die Serumspiegel an Harnstoff-N, als

Surrogatmarker einer schlechten Nierenfunktion, waren ebenfalls in beiden hypertensiven Gruppen gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Auch hier bestand kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockoutmäusen.

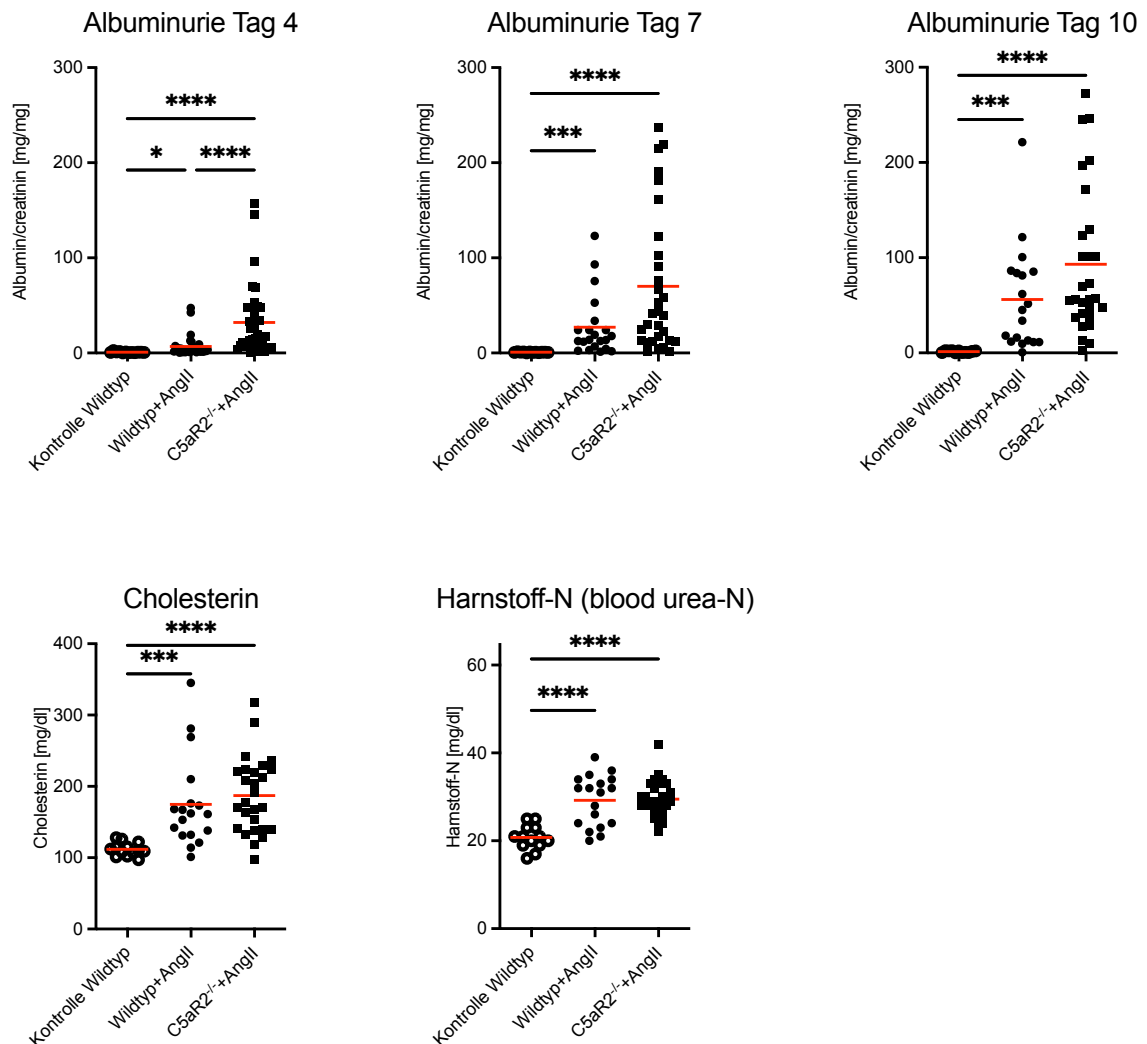


Abbildung 9: Albuminurie an Tag 4, 7 und 10 nach Beginn mit Ang II (obere Reihe), Serum-Cholesterin und Harnstoff-N bei Organentnahme (untere Reihe).

Um die Nierenfunktion *in vivo* zu bestimmen, führten wir zu mehreren Zeitpunkten im Verlauf der Versuche Messungen der glomerulären Filtrationsrate (GFR) durch. Beide Versuchsgruppen entwickelten gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der GFR, während in der basalen Messung vor Beginn der Ang II-Infusion kein Unterschied zu sehen war. Zwischen der Knockoutgruppe und den Wildtypmäusen findet sich kein signifikanter Unterschied in der GFR.

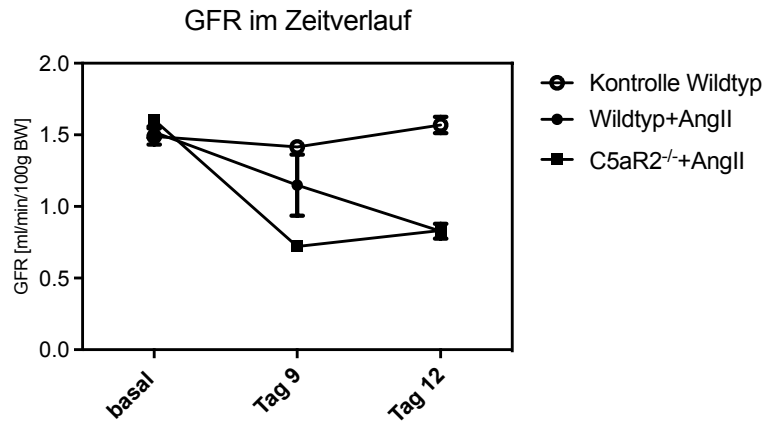


Abbildung 10: GFR im Zeitverlauf (vor Ang II, Tag 9 und 12 nach Beginn mit Ang II)

Zuletzt beurteilten wir den hypertensiven renalen Schaden durch die Analyse von histopathologischen Schnitten. Hier zeigte sich, dass die semiquantitativen Scores für glomerulären Schaden und tubulointerstitiellen Schaden und auch die durchschnittliche Fläche der Glomeruli in beiden hypertensiven Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht war. Zwischen den Versuchsgruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen.

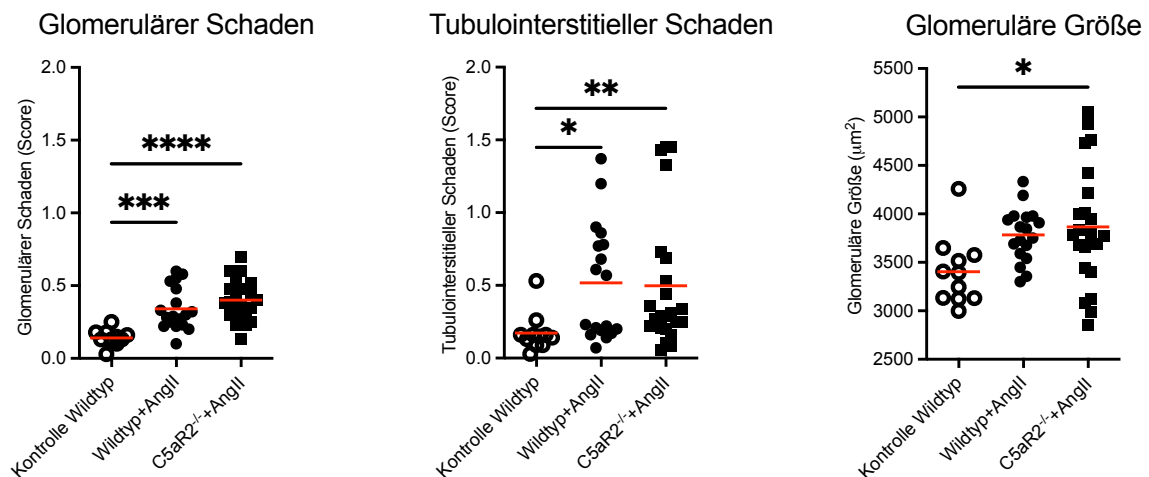


Abbildung 11: Scoring des glomerulären Schadens (A) und des tubulointerstitiellen Schadens (B). Messung der glomeruläre Fläche in μm^2 (C).

Erwartungsgemäß war in beiden Versuchsgruppen die renale Expression von Renin durch die Infusion von Angiotensin II signifikant reduziert.¹

¹ Bei einer Maus aus der C5aR2-Knockout Gruppe scheint die Reninexpression nicht supprimiert zu sein, dies lässt sich allerdings auf eine veränderte Expression des Referenzgens *18S* zurückführen.

Die renale mRNA-Expression von PAI-1, einem Marker renaler Schädigung, in beiden hypertensiven Gruppen erhöht, in der Wildtypgruppe war diese Erhöhung aber signifikant höher als in der C5aR2-Knockout Gruppe. Die renale Expression des Inflammationsmarkers CCL2 war in beiden hypertensiven Gruppen gegenüber den Kontrollen erhöht, ohne signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockoutmäusen. Ebenso verhielt es sich mit NGAL, als Surrogatmarker für den tubulären Schaden.

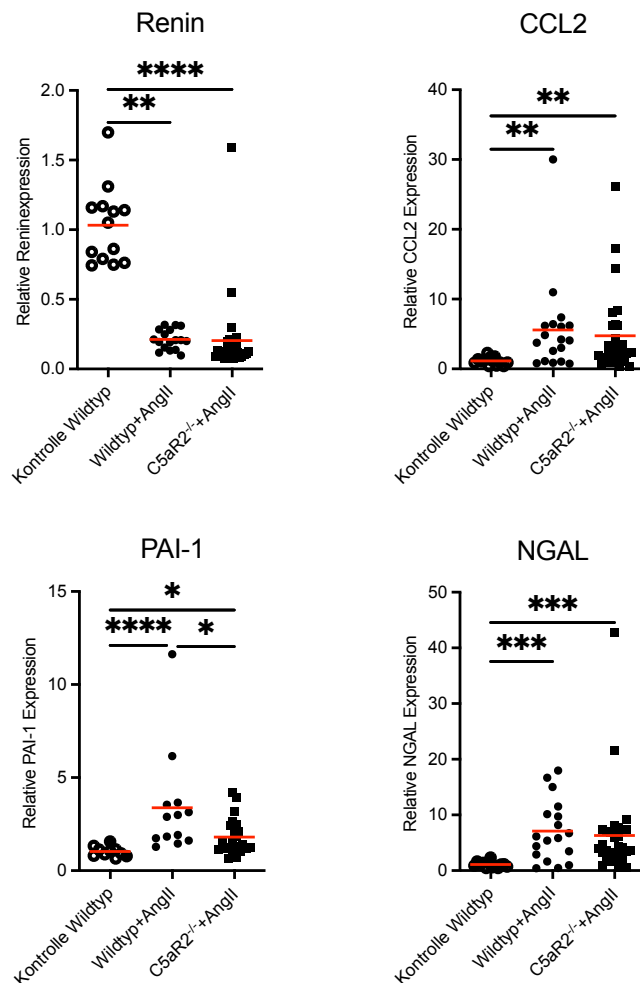


Abbildung 12: Relative mRNA-Expression von Renin, CCL2, PAI-1 und NGAL in der Niere, jeweils bezogen auf 16S

Um die Auswirkung des Knockouts auf das Inflammationsgeschehen in der Niere zu beurteilen, bestimmten wir zunächst die Expression von Komplementrezeptoren und -komponenten auf mRNA-Ebene. Die Expression des Rezeptors C3aR war in den beiden Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verändert. C5aR1 wurde in der C5aR2-Knockout Gruppe signifikant geringer als in der normotensiven Kontroll- und der

hypertensiven Wildtypgruppe exprimiert. Die Expression von C3 war in beiden hypertensiven Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, zwischen Wildtyp- und Knockoutmäusen fand sich kein Unterschied.

Die Expression der Komplementkomponenten C1r und C1s war – wie beim Komplementrezeptor C5aR1 – in der C5aR2-Knockoutgruppe im Vergleich zur normotensiven Kontroll- und hypertensiven Wildtypgruppe verringert.

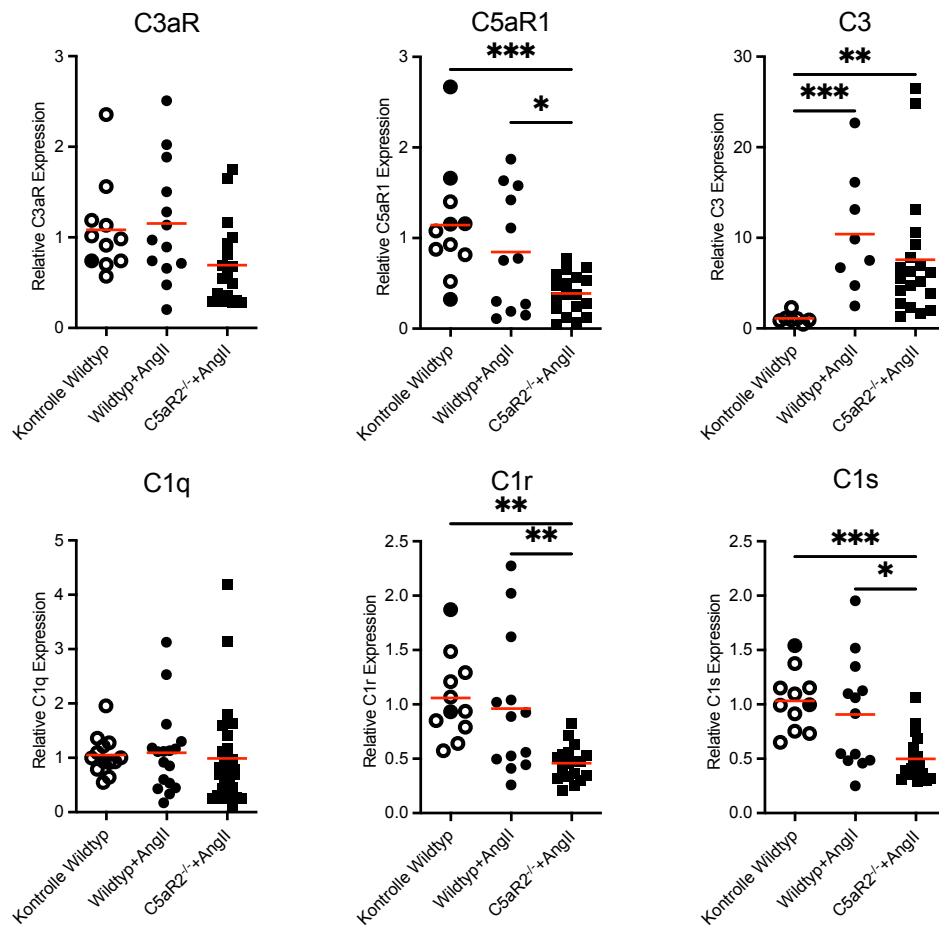


Abbildung 13: Relative mRNA-Expression von C3aR, C5aR1, C3, C1q, C1r und C1s in der Niere, jeweils bezogen auf 16S

Das Zytokin TNF α , welches vor allem von Makrophagen produziert wird, war in seiner mRNA-Expression in allen drei Gruppen nicht signifikant verändert.

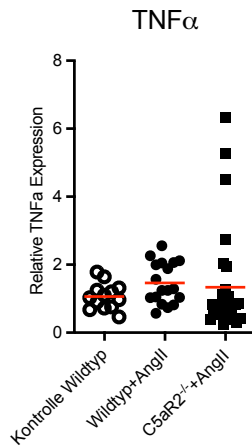


Abbildung 14: Relative mRNA-Expression von Tumornekrosefaktor α (TNF α) in der Niere, bezogen auf 16S

Wir bestimmten die renale T-Zellinfiltration mittels Durchflusszytometrie (FACS). Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe hinsichtlich der renalen Frequenzen an CD3+, CD4+ und CD8+ T-Zellen. Die Frequenz an $\gamma\delta$ T Zellen, einer sogenannten *innate-like* Subgruppe an T-Zellen mit semiinvariantem T-Zellrezeptor, war in der C5aR2KO Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht, zwischen Wildtyp- und Knockoutmäusen war der Unterschied allerdings nicht signifikant. Auch unterschieden sich die $\gamma\delta$ T Zellen der Kontroll- und der beiden Versuchsgruppen nicht in ihrem Anteil, die den Transkriptionsfaktor ROR γ t exprimieren.

Durch die eingangs beschriebenen Effekte der C5a-Achsen auf die Induktion, Stabilität und Funktion der Tregs, lag ein Augenmerk auch auf der Bestimmung derer Frequenzen. Hier zeigte sich, dass die Frequenz von Tregs in der Wildtypgruppe gegenüber der Kontroll- und Knockoutgruppe signifikant erhöht war. Dieser signifikante Unterschied bestand sowohl für Tregs, definiert als CD4+FoxP3+, als auch für cTregs (*conventional*, CD4+Foxp3+ROR γ t-) und biTregs (CD4+FoxP3+ ROR γ t+), vgl. Abbildung 19A.

Außerdem war die Frequenz an Th1 Zellen (definiert über den Transkriptionsfaktor Tbet und CD4) im C5aR2KO gegenüber der Kontroll- und Wildtypgruppe signifikant verringert. Bei der Frequenz der Th2 Zellen (definiert über den Transkriptionsfaktor GATA3 und CD4) bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe. Die Frequenz an renalen Th17 Zellen (definiert über den Transkriptionsfaktor ROR γ t und CD4) war in der hypertensiven Wildtypgruppe gegenüber

der Kontrollgruppe signifikant erhöht, in der Knockoutgruppe fand sich hier kein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontroll- und der Wildtypgruppe.

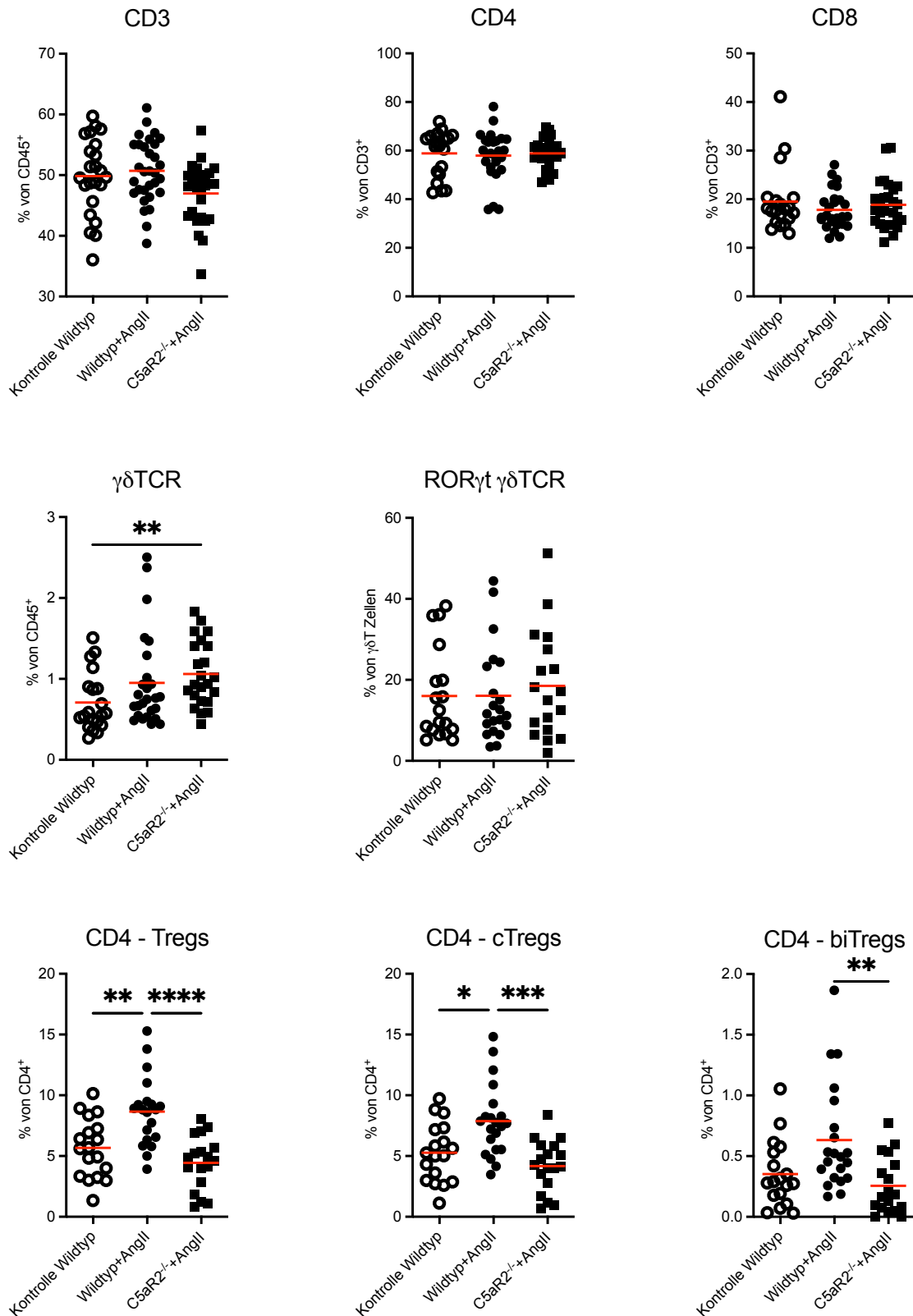


Abbildung 15A: FACS Ergebnisse in der Niere, allgemeine T Zell Subpopulationen (erste Reihe), $\gamma\delta$ T Zellen und ROR γ t-positive $\gamma\delta$ T Zellen (zweite Reihe), Tregs (dritte Reihe)

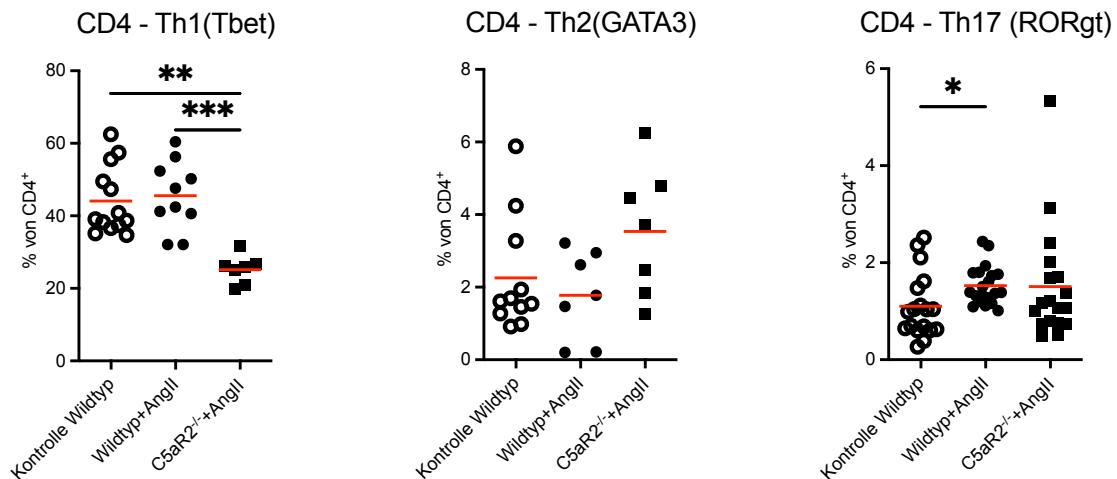


Abbildung 15B: FACS Ergebnisse in der Niere, spezielle Subpopulationen von CD4⁺ T Zellen, Th1, Th2 und Th17

Da das Komplementsystem und im Speziellen die C5a-Achse über diverse Mechanismen wie Chemoattraktion und *cross-talk* mit TLRs auch das angeborene Immunsystem beeinflusst, war dies ein weiterer Aspekt unserer FACS-Analysen. Hier zeigte sich, dass die Frequenz an renalen NK und NKT in der C5aR2-Knockoutgruppe gegenüber der Kontrollgruppe und den Wildtypmäusen signifikant erhöht war.

Die Frequenz an Makrophagen in der Niere war in beiden hypertensiven Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, ohne signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockoutgruppe. Der Anteil an Makrophagen, die den Aktivierungsmarker F4/80 tragen, war bei beiden Versuchsgruppen nicht signifikant verändert. Dagegen war der Anteil an Makrophagen, die positiv für Ly6C waren, in beiden hypertensiven Gruppen gleichermaßen gegenüber der Kontrollgruppe verringert.

In der Frequenz renaler, polymorphkerniger Neutrophiler Granulozyten fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den hypertensiven Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe. Die Frequenz an Dendritischen Zellen war nur in der C5aR2-Knockoutgruppe signifikant gegenüber der hypertensiven Wildtypgruppe verringert.

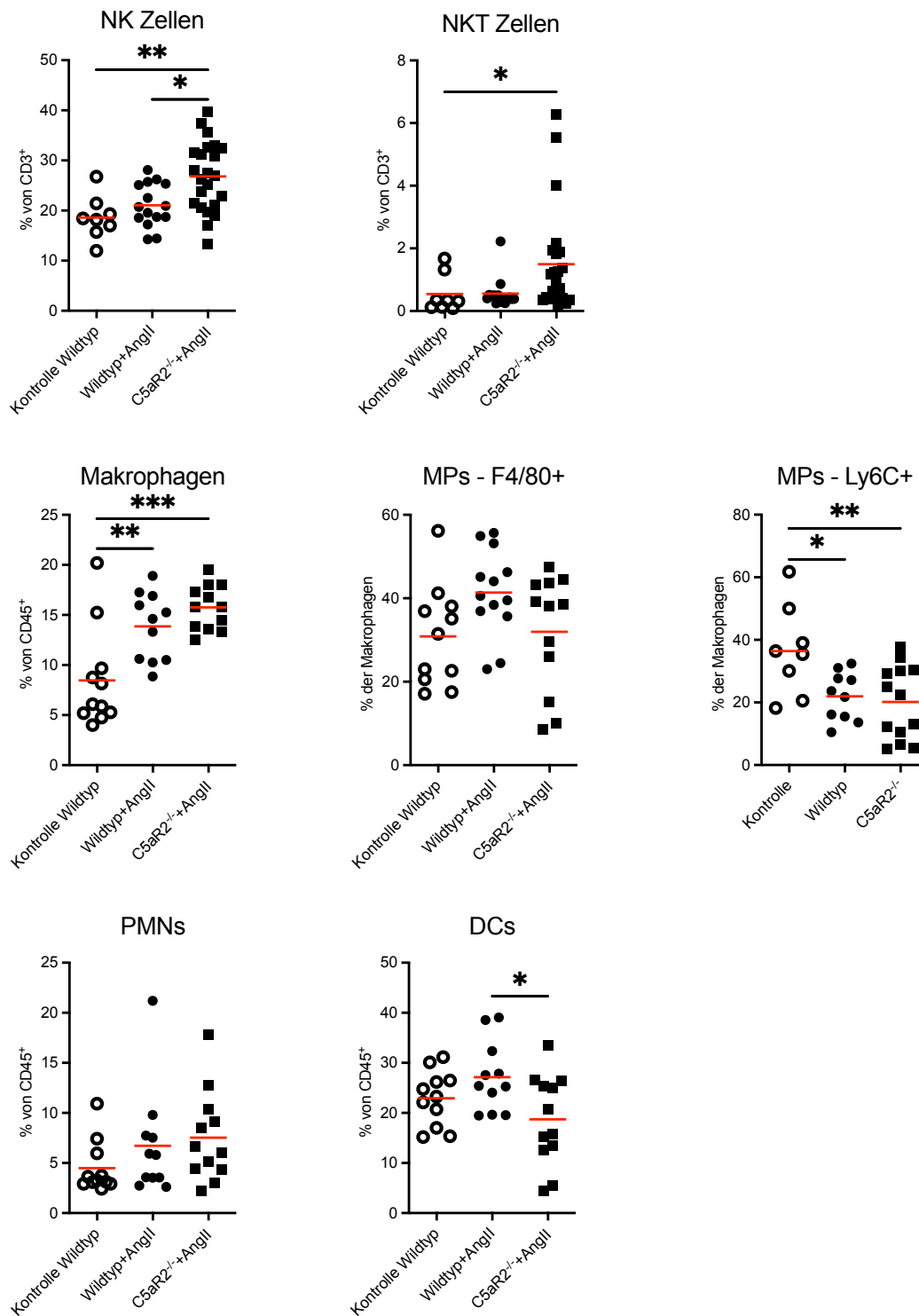


Abbildung 16: FACS Ergebnisse in der Niere, Zellen der angeborenen Immunität. Natürliche Killerzellen und NKT Zellen (erste Reihe), Makrophagen (MPs), mit den Subpopulationen F4/80- und L6C-positiver Makrophagen (zweite Reihe) und Neutrophile Granulozyten (*polymorphnuclear neutrophils PMNs*) sowie Dendritische Zellen (*dendritic cells DCs*), dritte Reihe

3.1.2 Kardialer Endorganschaden und Inflammation in C5aR2^{-/-}-Mäusen im Ang II Modell

Als Ausdruck kardialer Hypertrophie wurde das Gewicht der Herzen bei Organentnahme gemessen. Dieses war, bezogen auf das Körpergewicht, in beiden hypertensiven Gruppen signifikant gegenüber den normotensiven Kontrollen erhöht, allerdings war dieser Unterschied nicht zu sehen, wenn das Herzgewicht auf die Tibialänge normiert wurde. Zwischen hypertensiven Wildtyp- und Knockoutmäusen fand sich in beiden Fällen kein signifikanter Unterschied.

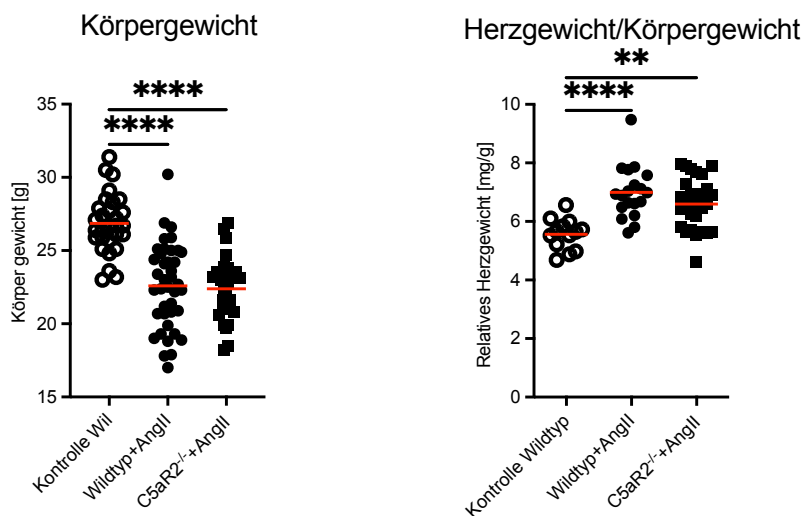


Abbildung 17: Körpergewicht und Herzgewicht bezogen auf das Körpergewicht bei Organentnahme

Die Herzfibrose evaluierten wir an mit *Sirius Red/Fast Green* gefärbten histopathologischen Schnitten. Der semiquantitative Score zur Herzfibrose war in beiden hypertensiven Gruppen gegenüber den Kontrollen erhöht, ein Unterschied zwischen den hypertensiven Gruppen zeigte sich nicht.

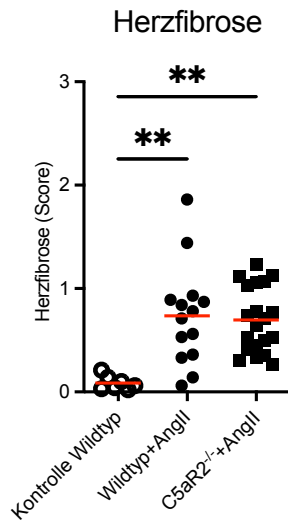


Abbildung 18: Histopathologisches, semiquantitatives Scoring der Herzfibrose bei Organentnahme

Eine vermehrte Vorhofdehnung widerspiegelnd, war die kardiale Expression von mRNA des ANP in beiden hypertensiven Gruppen gleichermaßen signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht. Beim verwandten kardialen Hormon BNP fand sich nur zwischen C5aR2-Knockout und der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression.

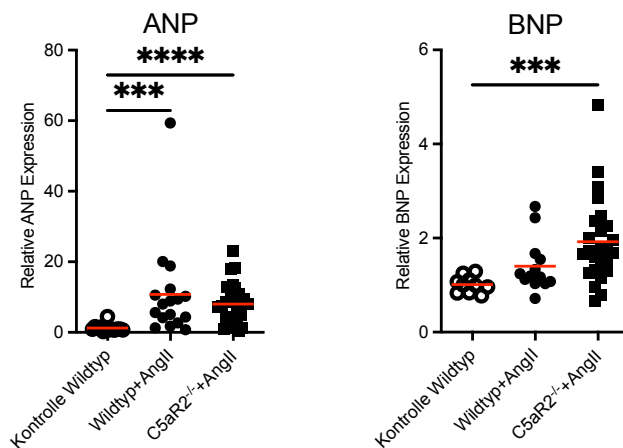


Abbildung 19: Kardiale mRNA-Expression von ANP und BNP bei Organentnahme

In den Herzen zeigte sich auf mRNA-Ebene eine signifikant geringere Expression des Komplementrezeptors C3aR in der C5aR2-Knockoutgruppe gegenüber den normotensiven Kontrollen und der hypertensiven Wildtypgruppe. C5aR1 war in seiner mRNA-Expression nur zwischen der C5aR2-Knockout- und der Kontrollgruppe signifikant verringert. Auch war die Expression von C1r in der C5aR2-Knockoutgruppe gegenüber der hypertensiven

Wildtypgruppe signifikant verringert. C1q und C1s waren in ihrer mRNA-Expression nicht verändert.

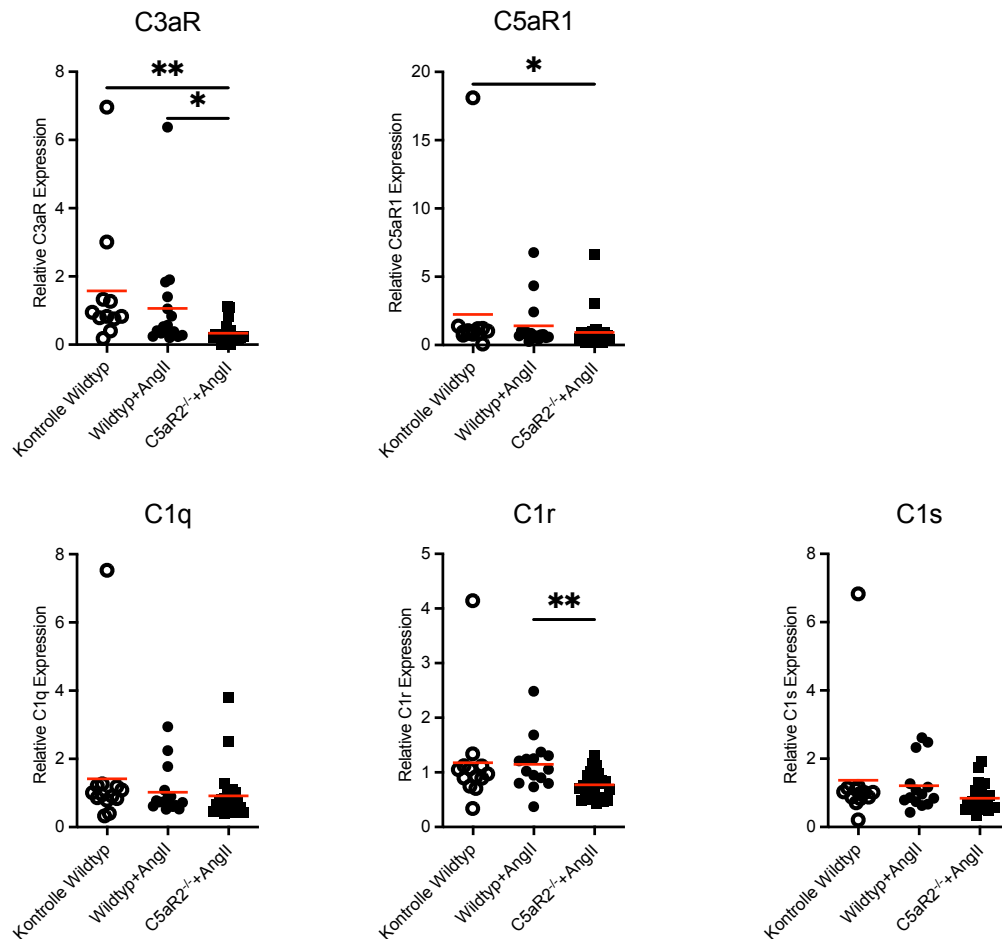


Abbildung 20: Kardiale mRNA-Expression von Komplementrezeptoren und -faktoren

Zur weiteren Validierung unserer Ergebnisse führten wir auch Experimente in einem zweiten, etablierten Modell (Jama et al., 2022) für hypertensive Endorganschäden durch, dem DOCA/Salz Modell.

3.2.1 Renaler Endorganschaden in C5aR2^{-/-}-Mäusen im DOCA/Salz Modell

Zunächst überprüften wir, ob sich Unterschiede im Blutdruck feststellen ließen. Der systolische Blutdruck war während des sechswöchigen Versuchszeitraumes in Woche 1 bei beiden hypertensiven Gruppen gegenüber der normotensiven Kontrollgruppe signifikant erhöht, während die Unterschiede zwischen den hypertensiven Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe in den Messungen in Wochen 2 – 6 nicht signifikant waren. Zwischen der hypertensiven Wildtyp- und Knockoutgruppe war der Blutdruck in den Wochen 1 – 6 nicht signifikant verändert. In der basalen Messung war der Blutdruck in den C5aR2-

Knockoutmäusen signifikant geringer im Vergleich zu den Wildtypmäusen, allerdings handelte es sich hier um einen absoluten Unterschied von weniger als 10mmHg.

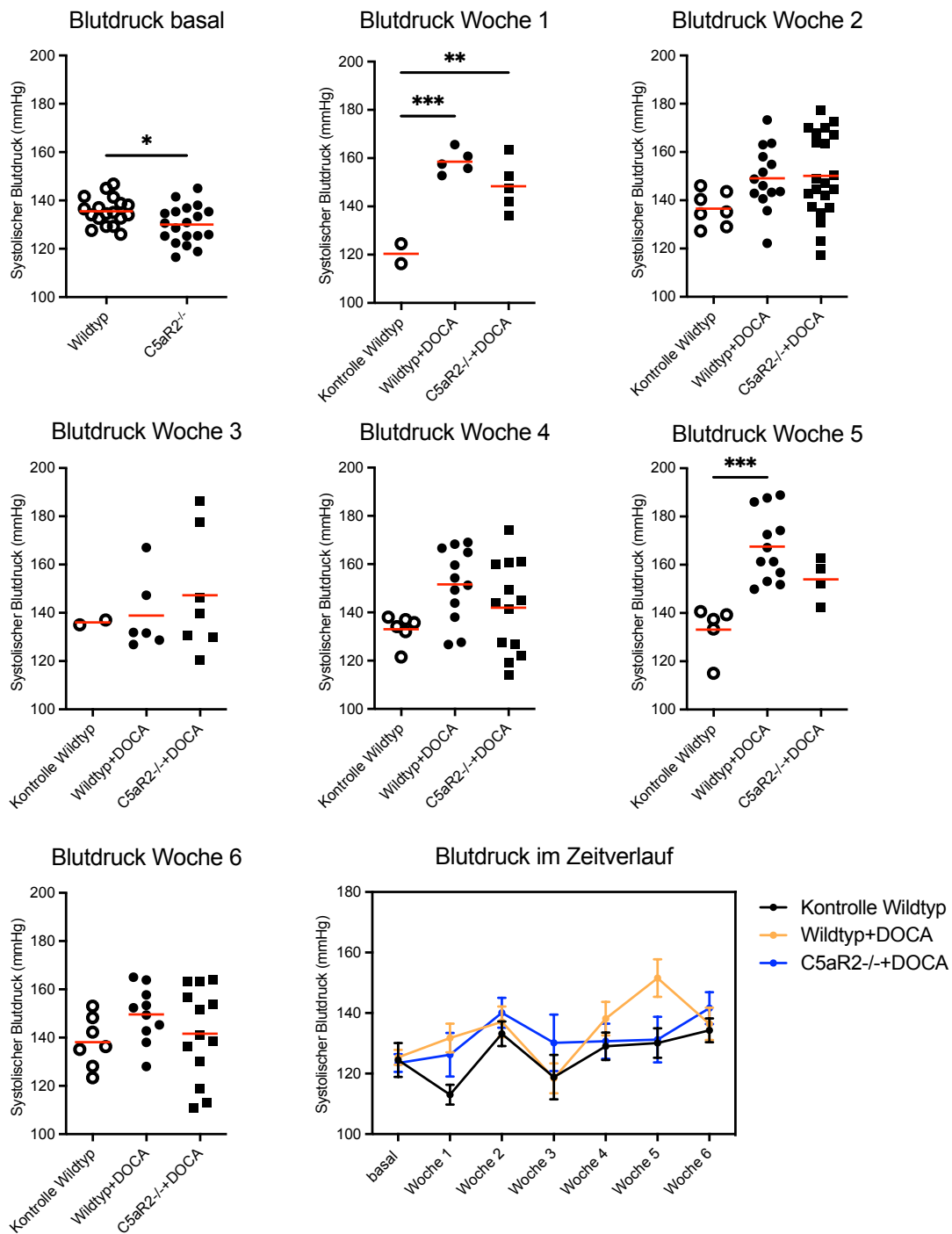


Abbildung 21 Systolischer Blutdruck zu den einzelnen Messzeitpunkten (basal, und Wochen 1 – 6), sowie im zeitlichen Überblick

Das Nierengewicht bei Organentnahme war bei beiden hypertensiven Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht, sowohl in Bezug auf das Körpergewicht als auch auf die Tibialänge. Zwischen hypertensiver Wildtyp- und Knockoutgruppe bestand kein signifikanter Unterschied.

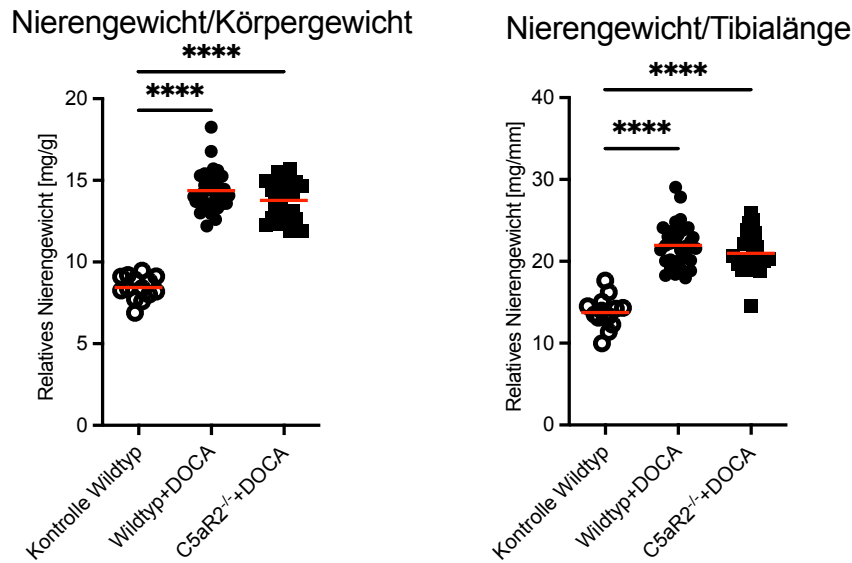


Abbildung 22: Nierengewicht bei Organentnahme, bezogen auf das Körpergewicht und auf die Tibiallänge

In der basalen Messung fand sich kein Unterschied in der Albuminurie zwischen Wildtyp- und C5aR2-Knockoutmäusen. Beide hypertensive Versuchsgruppen entwickelten im Laufe des Versuches eine signifikante Albuminurie gegenüber der Kontrollgruppe. Zu allen Zeitpunkten war die Albuminurie in der C5aR2-Knockoutgruppe niedriger als in der hypertensiven Wildtypgruppe. Allerdings war dieser Unterschied zu keinem Zeitpunkt signifikant. Ab Woche 5 nahm die Albuminurie in der C5aR2-Knockoutgruppe wieder ab, während sie in der hypertensiven Wildtypgruppe hoch blieb.

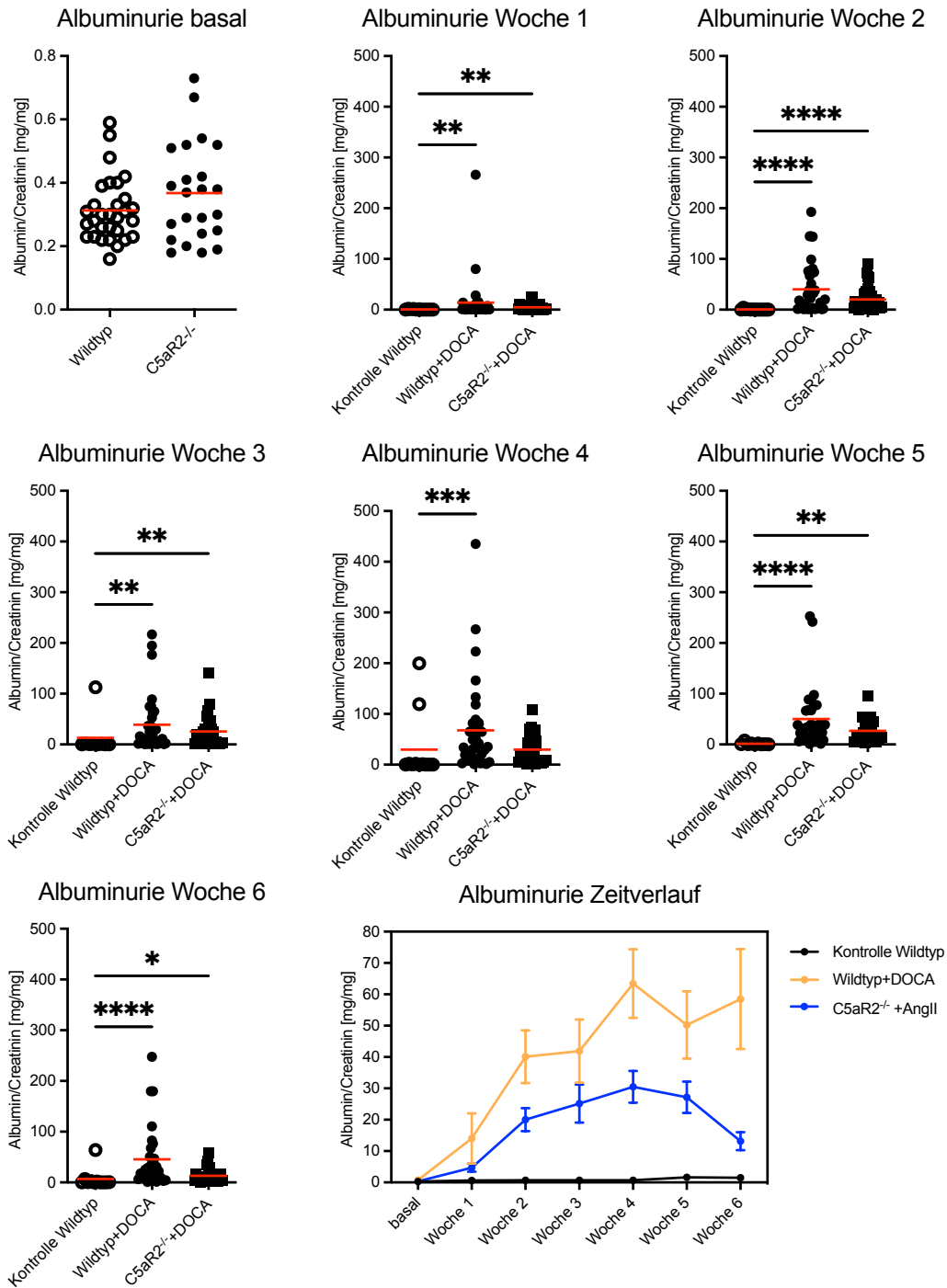


Abbildung 23: Albuminurie zu den einzelnen Messzeitpunkten (basal, und Wochen 1 – 6), sowie im zeitlichen Überblick

Die Serumspiegel an Harnstoff-N waren in der hypertensiven Wildtypgruppe signifikant gegenüber den normotensiven Kontrollen und der Knockoutgruppe verringert.

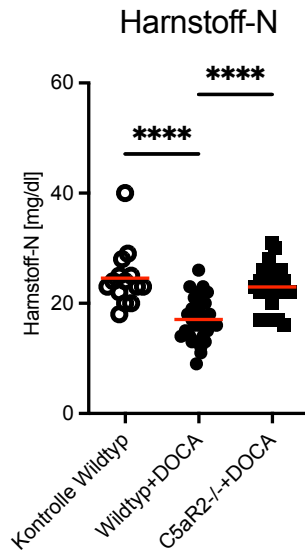


Abbildung 24: Harnstoff-N (*blood urea-N*) im Serum bei Organentnahme

In der Messung der GFR zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Versuchsgruppen untereinander oder zu den Kontrollen in Bezug auf die Nierenfunktion.

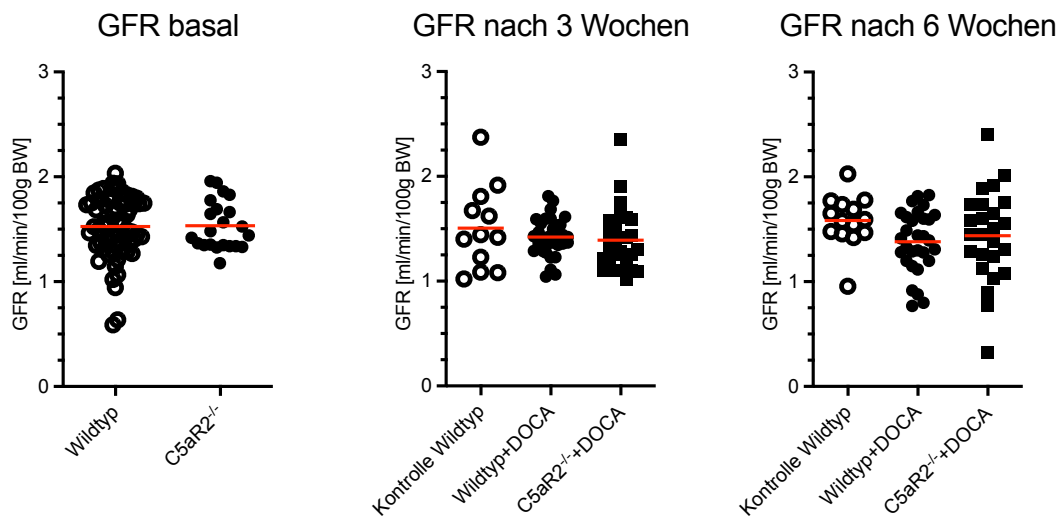


Abbildung 25: GFR (*in vivo*) zu den einzelnen Messzeitpunkten (basal, und Wochen 3 und 6)

Histologisch ließen sich jedoch hochsignifikant leichte bis moderate glomeruläre Schäden in beiden hypertensiven Versuchsgruppen nachweisen, ein signifikanter Unterschied zwischen hypertensiven Wildtyp- und Knockoutmäusen bestand jedoch nicht. Zudem waren die Glomeruli in beiden hypertensiven Versuchsgruppe deutlich gegenüber den Kontrollen hypertrophiert, auch das Tubulointerstitium war in beiden hypertensiven Versuchsgruppen

leicht bis moderat geschädigt. Signifikante Unterschiede zwischen hypertensiven Wildtyp- und Knockoutmäusen ließen sich auch hier nicht feststellen.

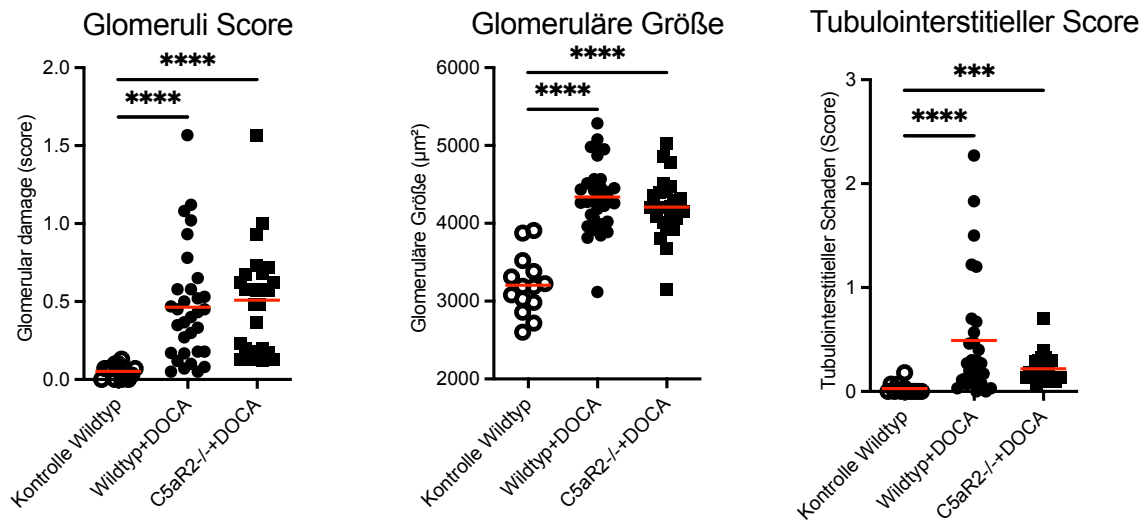


Abbildung 26: Histopathologische Ergebnisse renaler Schäden, semiquantitatives glomeruläres Scoring, quantitative glomeruläre Größe und semiquantitatives tubulointerstitielles Scoring

In beiden Versuchsgruppen zeigte sich erwartungsgemäß eine deutliche Reduktion der Expression von Renin in der Niere. Durch die Zufuhr von DOCA, einem Aldosteronanalogen, und Salz wird das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem gehemmt, was zu einer verringerten renalen Reninexpression führt. Die Expression von Renin war aber in der hypertensiven Wildtypgruppe signifikant stärker supprimiert als in der C5aR2-Knockoutgruppe.

Zudem beobachteten wir die Hochregulierung der mRNA-Expression von Genen, die Marker der renalen Schädigung sind (PAI-1, NGAL, CCL2) in beiden hypertensiven Versuchsgruppen gegenüber den Kontrollen, ohne signifikanten Unterschied unter den hypertensiven Wildtyp- und Knockoutmäusen. Auch zeigten beide Versuchsgruppen eine signifikante Überexpression von Collagen 1 und 3 gegenüber den Kontrollen, wobei dies bei der C5aR2-Knockoutgruppe signifikant weniger stark ausgeprägt war als bei der hypertensiven Wildtypgruppe.

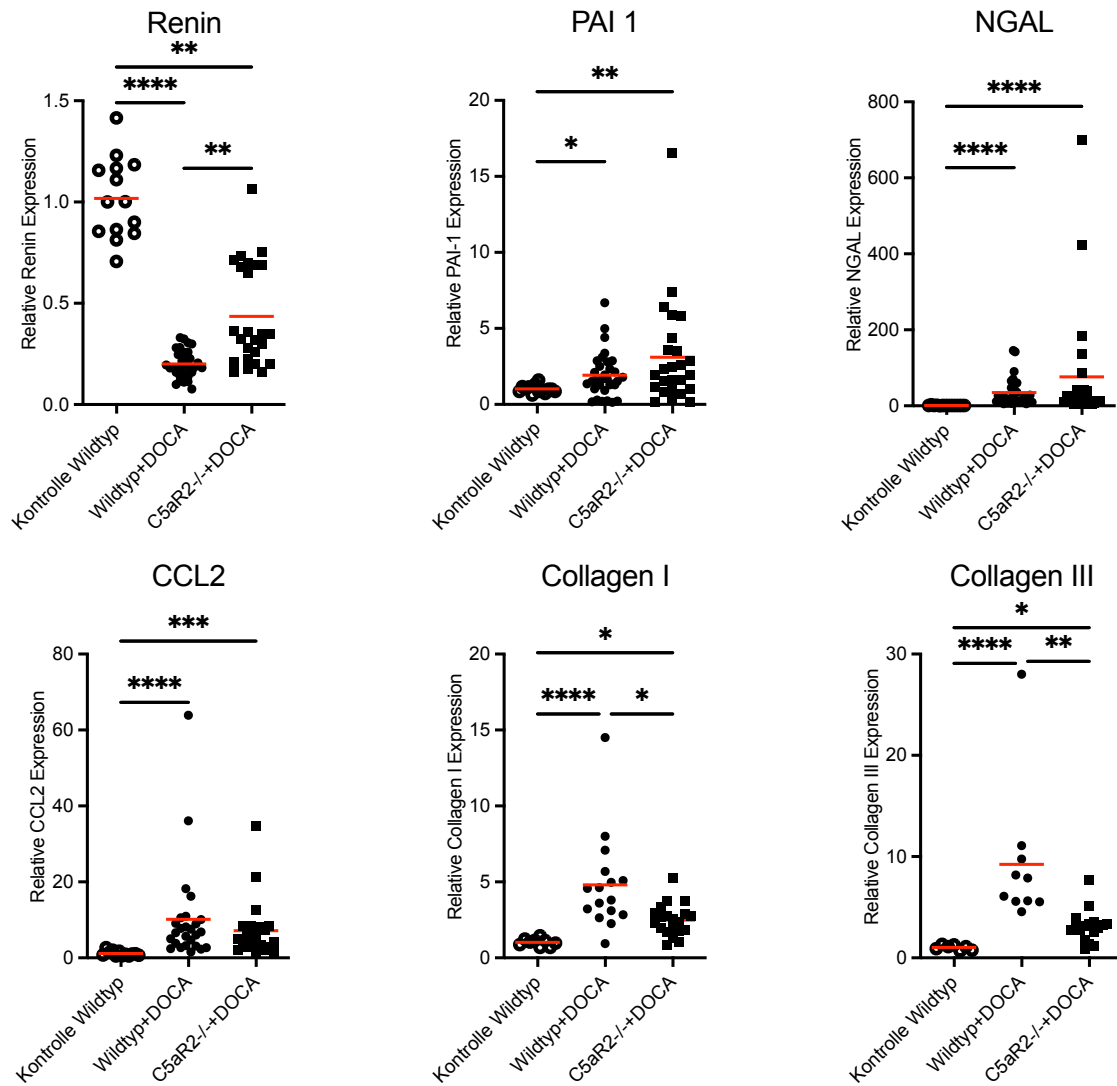


Abbildung 27: Renale mRNA-Expression von Renin, PAI-1, NGAL, CCL2, Collagen 1 und 3

In der Niere ließ sich in beiden Versuchsgruppen eine Überexpression des Fibrosegens TGFb finden, ohne signifikanten Unterschied unter den beiden Versuchsgruppen. Das Zytokin TNFa war indes nur in der hypertensiven Wildtypgruppe überexprimiert.

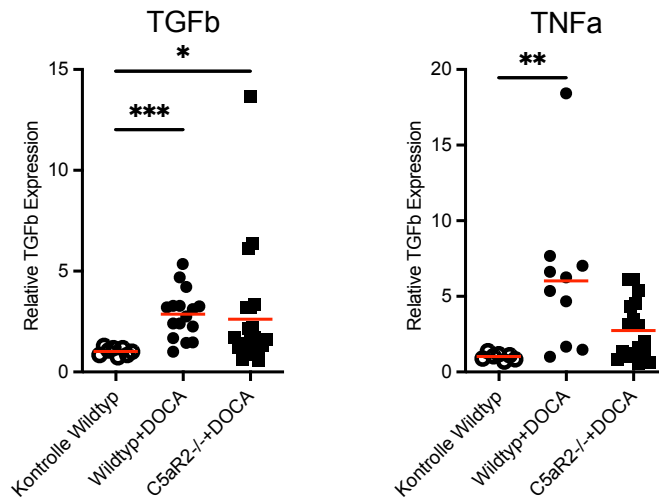


Abbildung 28: Renale mRNA-Expression von TGFβ und TNFα

Des Weiteren fiel auf, dass in der Niere fast alle gemessenen Komplementrezeptoren und -faktoren in beiden hypertensiven Versuchsgruppen auf mRNA-Ebene überexprimiert waren. C5aR1 war dabei in der Wildtypgruppe signifikant stärker überexprimiert, als es in der Knockoutgruppe der Fall war. Bei den übrigen Komplementfaktoren bestand kein signifikanter Unterschied zwischen hypertensiven Wildtyp- und Knockoutmäusen.

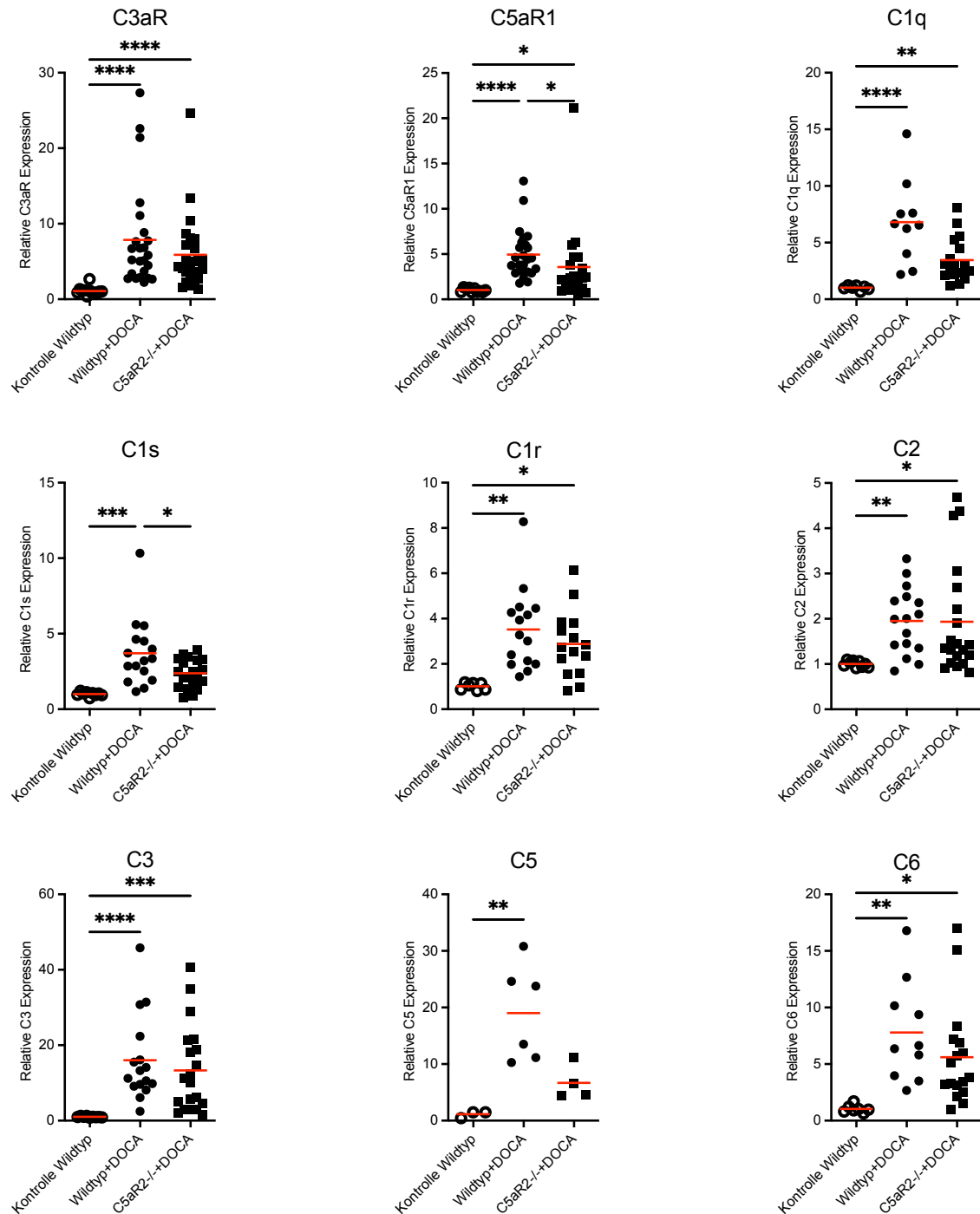


Abbildung 29: Renale mRNA-Expression von Komplementrezeptoren und – faktoren (einzelne Faktoren[C3,5,6] wurden nicht in allen Versuchsdurchläufen gemessen)

Außerdem führten wir auch im DOCA/Salz-Modell durchflusszytometrische Analysen der die Niere infiltrierenden Leukozyten durch. In beiden hypertensiven Gruppen war die Frequenz an renalen CD4+ T Zellen signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe, während die Frequenz an biTregs (CD4+ FOXP3+ROR γ t+) in beiden Versuchsgruppen signifikant

erhöht war. In beiden Fällen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen hypertensiven Wildtyp- und Knockoutmäusen.

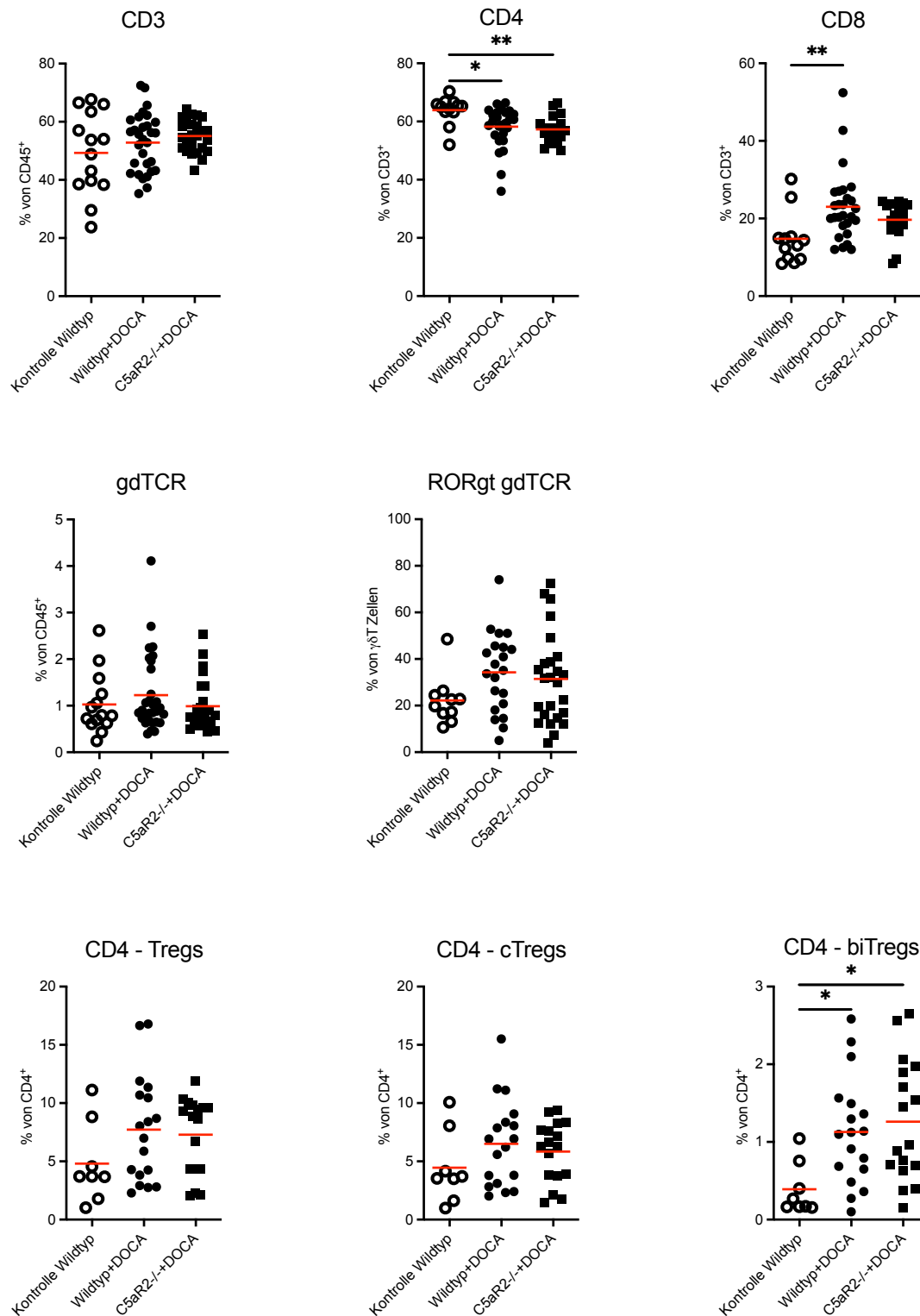


Abbildung 30: FACS Ergebnisse in der Niere, allgemeine T Zell Subpopulationen (erste Reihe), $\gamma\delta$ T Zellen und ROR γ t-positive $\gamma\delta$ T Zellen (zweite Reihe), Tregs (dritte Reihe)

Beide hypertensive Versuchsgruppen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe gleichermaßen signifikant erhöhte Frequenzen von ROR γ t positiven CD4 T Zellen in der Niere.

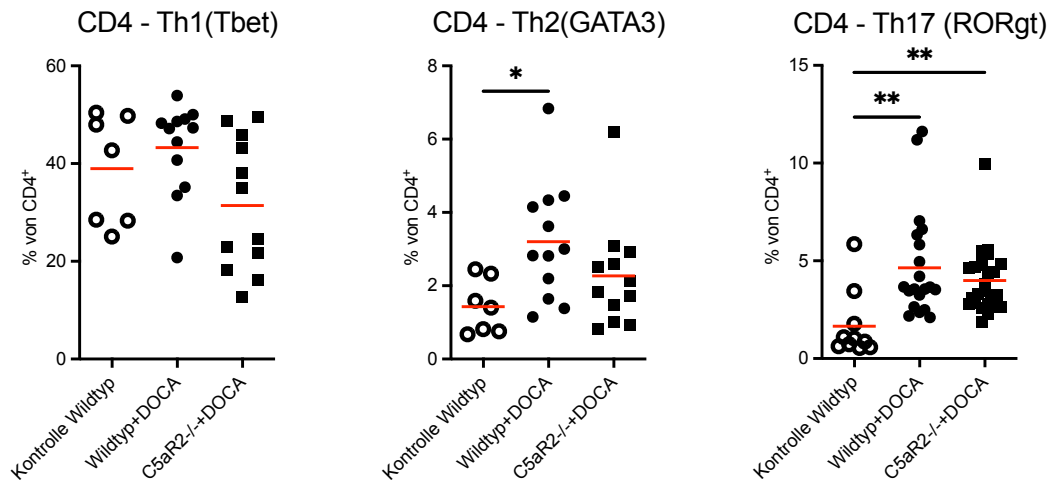


Abbildung 31: FACS Ergebnisse in der Niere, spezielle Subpopulationen von CD4⁺ T Zellen, Th1, Th2 und Th17

Bezüglich Zellen des angeborenen Immunsystems fanden sich vor allem eine gegenüber der Kontroll- und hypertensiven Wildtypgruppe signifikant verringerte Frequenz an Dendritischen Zellen (DCs) in der Knockoutgruppe. Zudem war die Frequenz an F4/80⁺ Makrophagen in der C5aR2-Knockoutgruppe signifikant höher als in der normotensiven Kontrollgruppe.

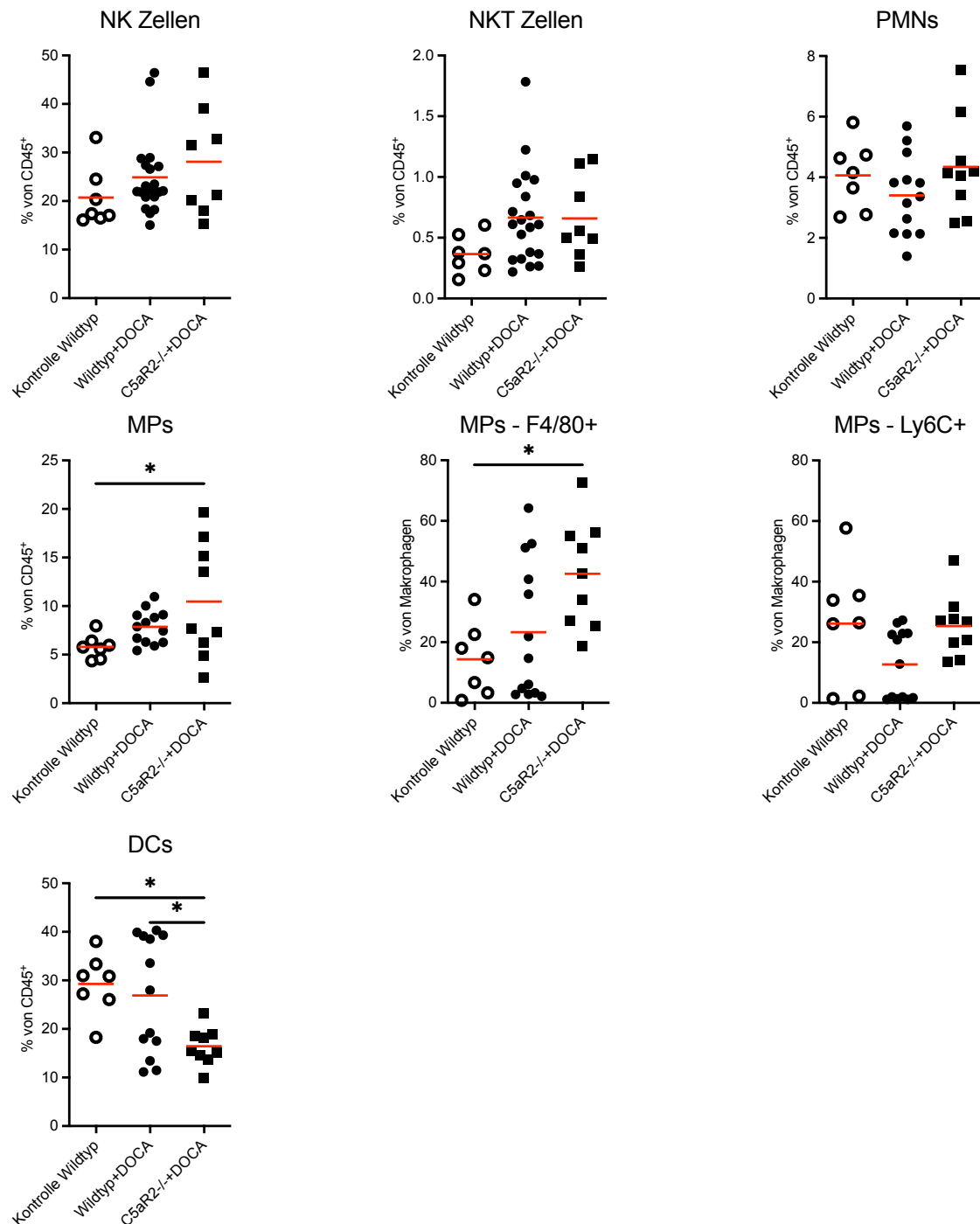


Abbildung 32: FACS Ergebnisse in der Niere, Zellen der angeborenen Immunität. Natürliche Killerzellen und NKT Zellen, Neutrophile Granulozyten (erste Reihe), Makrophagen (MPs), mit den Subpopulationen F4/80- und L6C-positiver Makrophagen (zweite Reihe) und Dendritische Zellen (*dendritic cells DCs*), dritte Reihe

3.2.2 Kardialer Endorganschaden in $C5aR2^{-/-}$ -Mäusen im DOCA/Salz Modell

Wir analysierten auch die kardialen Folgen dieses Hochdruckmodells. Bezüglich des Herzgewichtes als Hinweis auf kardiale Hypertrophie fanden wir keinen Unterschied

zwischen den beiden hypertensiven Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe bei Normalisierung auf das Körpergewicht. Histologisch ließ sich zudem in beiden hypertensiven Versuchsgruppen keine signifikante Fibrose gegenüber den Kontrollen feststellen.

Auch die Genexpression auf mRNA-Ebene untersuchten wir in den Herzen der Versuchstiere. Hier zeigte sich in beiden Versuchsgruppen eine signifikante Überexpression des fetalen Gens ANP gegenüber der Kontrollgruppe, ohne signifikanten Unterschied zwischen hypertensiven Wildtyp- und Knockoutmäusen. Nur in der Wildtypgruppe fand sich zusätzlich eine Überexpression von Collagen 1 und 3 gegenüber der Kontrollgruppe bzw. gegenüber der Kontroll- und Knockoutgruppe.

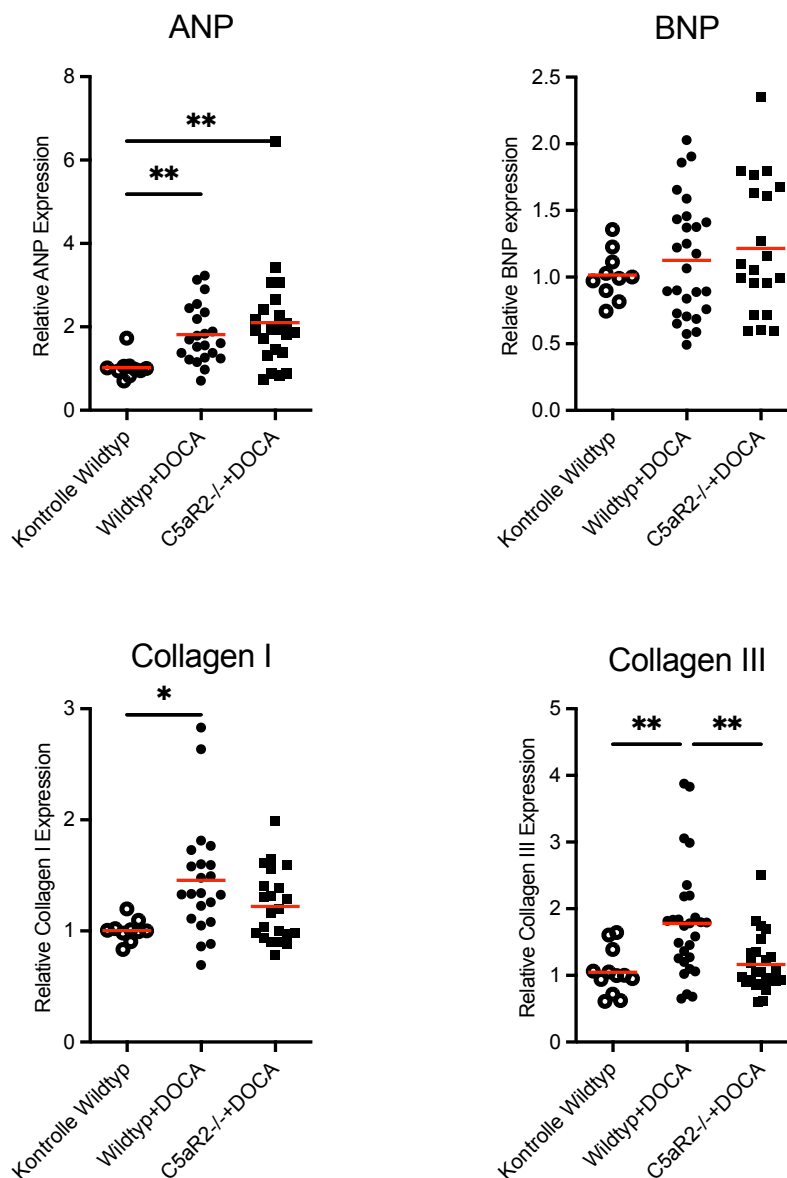


Abbildung 33: Kardiale mRNA-Expression von ANP, BNP, Collagen 1 und 3

In den Herzen war die mRNA-Expression des Rezeptors C3aR nur in der hypertensiven Wildtypgruppe signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht. Die Komplementfaktoren C3 und C4 waren hingegen nur in der C5aR2-Knockoutgruppe gegenüber den Kontrollen signifikant überexprimiert. Der Komplementfaktor C6 wurde in beiden hypertensiven Versuchsgruppen gleichermaßen signifikant überexprimiert.

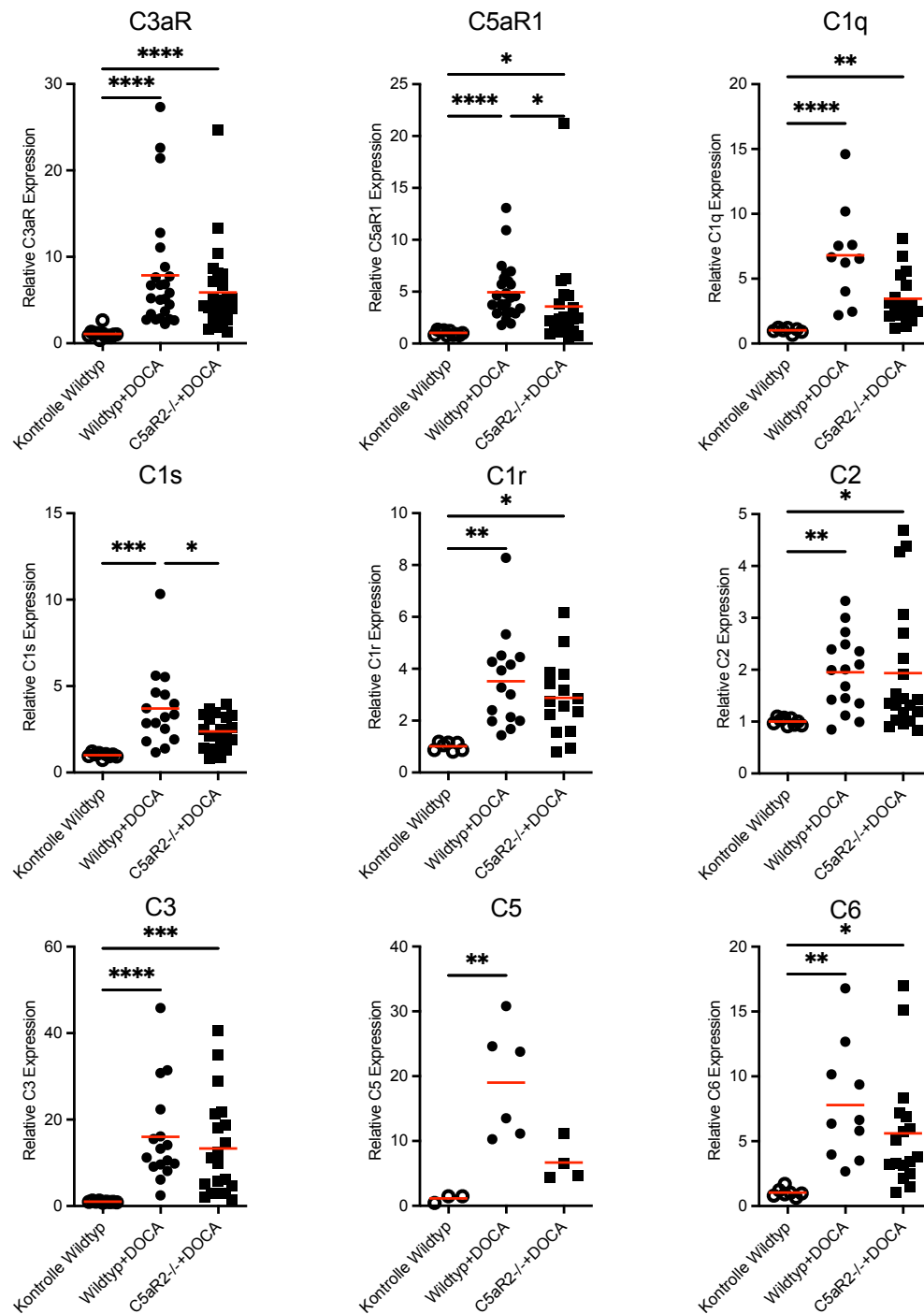


Abbildung 34: Kardiale mRNA-Expression von Komplementrezeptoren und – faktoren (einzelne Faktoren[C3,5,6] wurden nicht in allen Versuchsdurchläufen gemessen)

4. Diskussion

4.1 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir den konstitutionellen Knockout des Komplementrezeptors C5aR2 auf seine phänotypischen Auswirkungen in zwei Modellen hypertensiver Endorganschäden. In beiden Modellen ließ sich dabei kein relevanter Unterschied zwischen hypertensiver Wildtyp- und hypertensiver Knockoutgruppe zeigen in Bezug auf den Blutdruckanstieg, die renale Funktion, Albuminurie, histologische Schäden in Herzen und Nieren und Ausmaß der Inflammation, sowohl auf mRNA-Ebene als auch in der Durchflusszytometrie.

Im Angiotensin II Modell zeigen die deutliche Blutdruckerhöhung und die komplette Reninsupprimierung den Effekt der Angiotensins II Infusion an. Im Vergleich zum DOCA/Salz-Modell war die Steigerung des Nierengewichtes eher moderat, aber eine deutliche Albuminurie, verringerte GFR und histologische Schäden in Herzen und Niere zeugen von den aggravierten Endorganschäden. Das erhöhte Serumcholesterin am Ende des Versuches passt dabei zu der anhaltenden Proteinurie, und das erhöhte Harnstoff-N zu der verringerten GFR. Dabei fand sich zwischen den Versuchsgruppen nur bei der Albuminurie an Tag 4 ein signifikanter Unterschied im Sinne einer größeren Nierenschädigung in der Knockoutgruppe.

In beiden Gruppen zeigten sich auf mRNA-Ebene Inflammation und tubuläre Schäden (angezeigt durch eine Überexpression von CCL2 respektive NGAL).

Im DOCA/Salz-Modell ließ sich keine anhaltende Blutdruckerhöhung in den Versuchsgruppen feststellen. Allerdings zeigen auch die Kontrollen teilweise sehr hohe Blutdrücke, was den Einfluss externer Faktoren auf die Blutdruckmessung wahrscheinlich macht. Die Blutdruckmessungen erfolgten initial mittels eines CODA® High Throughput System von Kent Scientific (Torrington, Vereinigte Staaten). Hiermit ließen sich allerdings keine verlässlichen Daten erheben, auch nach langen Gewöhnungsmessungen waren zu viele Messungen nicht auswertbar. Daher wurde im Verlauf der Versuche die Messmethode auf das in den Methoden angegebene Geräte geändert und nur diese Daten verwendet. Folglich konnten wir nicht in allen Versuchsdurchläufen Blutdruckdaten erheben.

Zudem war die GFR nicht verringert. Allerdings fand sich in beiden Versuchsgruppen ein deutlich erhöhtes Nierengewicht und histopathologisch vergrößerte Glomeruli bei insgesamt moderatem glomerulären und tubulointerstitiellen Schaden. In beiden Gruppen fand sich auf mRNA-Ebene gleichermaßen renale Inflammation, tubuläre Schäden und Fibrose, allerdings

waren Kollagene im C5aR2-Knockout weniger exprimiert und das Renin weniger supprimiert. Kardial zeigte sich kaum Fibrose und auch auf der mRNA-Ebene ließ sich keine relevante Inflammation zeigen, einzig in der Wildtypgruppe waren Kollagene überexprimiert. Die Überexpression von ANP spricht aber für eine erhöhte Vorhofdehnung, was den hypervolämischen Aspekt des Hypertonus im DOCA/Salz-Modell verdeutlicht. Der Harnstoff-N-Spiegel war am Ende des Versuches nicht erhöht, sondern eher verringert, was für eine vermehrte Filtration durch die DOCA-induzierte Hypervolämie und Hyperfiltration spricht.

In beiden Gruppen wurden auf mRNA-Ebene Komplementfaktoren induziert, vornehmlich aber in der Niere, im Herzen war dies kaum der Fall.

Im Gegensatz zum Ang II-Modell, das einen Angiotensin-abhängigen Hypertonus des Menschen nachahmt, ist das DOCA/Salz-Modell ein Modell des Hypertonus mit niedrigen Reninspiegeln (Jama et al., 2022). Interessanterweise werden in der Literatur starke renale und kardiale Schäden im DOCA/Salz-Modell beschrieben, was unseren Beobachtungen widerspricht. Allerdings wurden häufig C57/Bl6 Mäuse im DOCA/Salz-Modell eingesetzt, während wir den Balb/c-Stamm verwendeten. Außerdem ist unsere semiquantitative Skala zur Auswertung der histopathologischen Schäden nicht sehr sensitiv im Bereich milder Schäden, sodass es sein kann, dass die Schäden im DOCA/Salz-Modell in unserer Beobachtung unterschätzt werden. Zudem verwenden wir im Ang II-Modell eine relativ hohe Ang II-Konzentration zusammen mit der Uninephrektomie, sodass die resultierenden Schäden entsprechend aggraviert sind und die Schäden im DOCA/Salz-Modell daher vergleichsweise mild ausfallen. Die gegenüber den Kontrollen kaum erhöhten Blutdrücke im DOCA/Salz-Modell beruhen wahrscheinlich vor allem auf dem Messprinzip. Wie an den z.T. sehr hohen Blutdrücken der Kontrollen zu sehen ist, ist die Messmethode im Gegensatz kontinuierlicher Messung per Telemetrie anfälliger für jede Art von Stress der Versuchstiere, der sich trotz Messung in einem nicht frequentierten, ruhigen Raum und vorheriger Gewöhnung an die Messprozedur nicht vollständig vermeiden lässt. Zudem fehlen aufgrund der Umstellung der Messgeräte Blutdruckdaten zu einigen frühen Versuchsdurchläufen, was die n-Zahl beeinträchtigt. Zum anderen zeigen die Messwerte eine hohe Streubreite, sodass sich die extremen Blutdruckanstiege durch Ang II-Infusion zwar gut darstellen lassen, aber eventuell subtilere Blutdruckanstiege durch DOCA-induzierte Hypervolämie womöglich zu gering sind, um bei der gewählten Anzahl an Versuchstieren statistische Signifikanz zu erreichen.

In den immunologischen Untersuchungen beschreiben wir im Ang II-Modell im C5aR2-Knockout eine höhere Frequenz an renalen $\gamma\delta$ T Zellen und eine verringerte Frequenz an regulatorischen CD4⁺ T Zellen gegenüber der Wildtypgruppe. Außerdem fanden sich im C5aR2-Knockout weniger Th1 Zellen (Tbet⁺ oder IFN γ ⁺) unter den CD4⁺ T Zellen. Im DOCA/Salz-Modell fanden wir in der renalen Infiltration durch Immunzellen dagegen vermehrt Th17 Zellen unter den CD4⁺ T Zellen und keinen signifikanten Abfall der konventionellen Tregs (CD4⁺Foxp3⁺) im C5aR2-Knockout, sondern stattdessen in beiden Versuchsgruppen einen Anstieg von biTregs (CD4⁺Foxp3⁺ROR γ t⁺). Diese Foxp3 und ROR γ t doppelte positive T Zellen wurden in verschiedenen Modellen von Inflammation beschrieben und teilweise als intermediäre Entwicklungsstufe naiver CD4⁺ T Zellen gesehen, aus denen sich je nach Zytokininmilieu sowohl peripher induzierte Tregs (im Gegensatz zu den zentral im Thymus entstandenen Tregs) als auch Th17 Zellen entwickeln können (Zhou et al., 2008, Esposito et al., 2010). Andere beschrieben diese Population aber auch als funktionelle Tregs mit erhöhter Kapazität zur Suppression proinflammatorischer Zellen (Yang et al., 2016).

Die erhöhte Frequenz von Th17 Zellen und Foxp3⁺ ROR γ t⁺ CD4⁺ T Zellen könnte auf distinkten immunologischen Veränderungen im DOCA/Salz-Modell beruhen, da hohe Salzkonzentrationen (wie es bei externer Zufuhr und zusätzlicher Retention durch DOCA der Fall wäre) die Differenzierung von naiven CD4⁺ T Zellen in Th17 Zellen begünstigt (Wilck et al., 2017).

In beiden Modellen führten diese Veränderungen der T Zellphänotypen aber letztlich zu keinen Unterschieden der renalen und kardialen Endorganschäden bei den beiden Versuchsgruppen.

Wie eingangs erwähnt, sind Komplementrezeptoren und lokal produzierte Komplementfaktoren an der Polarisierung von CD4⁺ T Zellen in die jeweiligen Subtypen nach Aktivierung durch APCs beteiligt (Arbore et al., 2017, Arbore et al., 2016). Vor diesem Hintergrund ist der fehlende Anstieg der Frequenz der Tregs in der Knockoutgruppe gegenüber den Wildtypmäusen sehr gut durch die fehlende Interaktion von C5aR2 mit lokal produziertem C5a in CD4⁺ T Zellen zu erklären, obwohl wir und Karsten et al. (Karsten et al., 2017) keine Oberflächenexpression von C5aR2 auf T Zellen nachweisen konnten. Die nachgewiesene Expression von C5aR2 auf DCs könnte hier ebenso zur Erklärung beitragen wie die mögliche intrazelluläre Expression in CD4⁺ T Zellen, wie von Arbore et al. beschrieben. Auch die Veränderungen in den Frequenzen von Th1 und TH17 Zellen und den IL17 und IFN γ sezernierenden CD4 Zellen ließen sich durch diesen Mechanismus erklären.

Hier liegt eine wichtige Limitation der vorliegenden Arbeit. Da wir uns vor allem auf die physiologischen Auswirkungen des Knockouts im Bluthochdruck fokussierten, also histopathologische Schäden, Albuminurie und GFR, lassen unsere Untersuchungen weniger Schlüsse auf den genauen Mechanismus der immunologischen Veränderungen zu. Außerdem stellen unsere FACS-Analysen mit Ausnahme der *ex vivo* durchgeführten Zytokinmessungen keine funktionellen Untersuchungen dar, sodass bei veränderten Frequenzen einer bestimmten Zellpopulation nicht direkt auf die funktionalen Auswirkungen geschlossen werden kann.

4.2 Ausblick

Die Therapie des Hypertonus beschränkt sich immer noch auf einige wenige Mechanismen. Obwohl das Mosaik an Faktoren, die zur Pathogenese beitragen, vielfältig ist, sind neue Klassen von Medikamenten, die alternative pharmakologische Ziele anvisieren, wenig in der Zahl.

Das Komplementsystem kann hierbei von großer Bedeutung sein, gerade vor dem Hintergrund, dass sich die volle Komplexität mit der dieses System in vielfältigste Zellprozesse und Immunmechanismen involviert ist, erst seit kurzem erschließt. Der Komplementrezeptor C5aR2 zeigt in zwei verschiedenen, auf unterschiedlichen Mechanismen beruhenden Modellen der hypertensiven Endorganschäden, dem Ang II-Modell und dem DOCA/Salz-Modell, zwar spezifische immunologische Veränderungen, aber beeinflusst letztlich nicht die Auswirkung des Hypertonus auf renale und kardiale Schäden auf histopathologischer, funktioneller und mRNA-Ebene. C5aR2 ist damit kein vielversprechendes Ziel in der Therapie der arteriellen Hypertonie.

5. Zusammenfassung

5.1. Zusammenfassung in deutscher Sprache

Eine Vielzahl von Faktoren des angeborenen und adaptiven Immunsystems, wie auch das Komplementsystem sind essentiell in der Pathogenese des Hypertonus und hypertensiver Endorganschäden.

Das chemotaktisch aktive Molekül C5a entsteht als Spaltprodukt von C5 bei der Aktivierung der Komplementkaskade und bewirkt über seine Rezeptoren C5aR1 und C5aR2 vielfältige pro- und antiinflammatorische Effekte. Kürzlich beschrieb unsere Arbeitsgruppe reduzierte renale Schäden bei C5aR1-defizienten Mäusen in einem Angiotensin-II basierten Hochdruckmodell. In der vorliegenden Abhandlung untersuchten wir nun die Auswirkung

des konstitutiven Knockouts des zweiten C5a-Rezeptors C5aR2 in zwei Mausmodellen aggravierter hypertensiver Endorganschäden, dem DOCA/Salz- und Angiotensin-II-Modell. Als erstes wurde mittels einer tdTomato-C5aR2-Knockin Maus untersucht, dass C5aR2 nicht von ortsständigen renalen Zellen exprimiert wird. Relevante Anteile C5aR2-positiver Zellen ließen sich vor allem unter den Dendritischen Zellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten finden.

Histopathologischer renaler und kardialer Schaden, systolischer Blutdruck, Albuminurie, das Ausmaß der renalen und kardialen Inflammation und GFR zeigten keine relevanten Unterschiede in der C5aR2-Knockout Gruppe. Im Ang II-Modell fanden sich in der Niere der C5aR2-Knockoutgruppe weniger Th1 Zellen und Tregs und vermehrt NK, NKT und $\gamma\delta$ T Zellen. Im DOCA/Salz-Modell fanden sich in beiden Versuchsgruppen vermehrt Th17 Zellen in der Niere und ROR γ t⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T Zellen.

Der genetische Knockout des Komplementrezeptor C5aR2 führt in zwei Modellen des aggravierten hypertensiven Endorganschadens in Balb/c-Mäusen zu keinen relevanten Veränderungen des Phänotyps gegenüber Wildtypmäusen. C5aR2 ist damit kein vielversprechendes Ziel pharmakologischer, antihypertensiver Interventionen.

5.2. Zusammenfassung in englischer Sprache

Numerous factors of the innate and adaptive immune system, including the complement system are essential in the pathogenesis of arterial hypertension and hypertensive endorgan damage.

The chemotactic molecule C5a is generated as a cleavage product of C5 upon activation of the complement cascade. Through its receptors C5aR1 and C5aR2 it achieves multiple pro- and anti-inflammatory effects. Recently, our group described ameliorated renal damage in C5aR1-knockout mice in Ang II-induced hypertension. In the dissertation at hand, the outcome of C5aR2-knockout mice in two models of aggravated hypertensive endorgan damage, the Ang II and DOCA/salt models, was examined.

Utilizing a tdTomato-knockin mouse, C5aR2 expression by dendritic cells, macrophages and granulocytes could be visualized, while resident cells in the kidney stained negative.

Histopathological renal and cardiac damage, systolic blood pressure, albuminuria, the extent of cardiac and renal inflammation and GFR were not relevantly altered in the C5aR2-knockout group. In the Ang II model, renal infiltration by Th1 cells and Tregs was lower in the knockout group, and renal infiltration by NK, NKT and $\gamma\delta$ T cells was increased. Whereas

in the DOCA/salt model, renal infiltration by Th17 cells and ROR γ t+ Foxp3+ CD4+ T cells was increased in both groups.

The constitutive knockout of C5aR2 in Balb/c mice does not alter the phenotype in two models of aggravated hypertensive endorgan damage. Thus, C5aR2 does not appear to be a relevant pharmacological target for novel antihypertensive treatment options.

6. Erklärung des Eigenanteils

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

- Versuchsdesign, Versuchsplanung und Diskussion der Daten: gemeinsam mit Prof. Dr. Ulrich Wenzel, Dr. Alva Rosendahl und Marlies Bode
- Betreuung der Mäuse während des Versuches: gemeinsam mit der Versuchstierhaltung des UKE, Stefan Gatzemeier, Marlies Bode, Paula Steffens und Reza Kabiri
- Gewinnung der Urinproben mittels Stoffwechsellkäfigen: gemeinsam mit Stefan Gatzemeier
- Albumin ELISA
- Creatinine Jaffé Kinetic
- Realtime RT-PCR
- Tail-cuff-Blutdruckmessungen
- Herstellung der Leukozyteneinzellsuspension für die FACS Analyse: gemeinsam mit Dr. Alva Rosendahl, Marlies Bode, Paula Steffens, Reza Kabiri und Stefan Gatzemeier
- Durchführung der FACS-Messungen am Durchflusszytometer: gemeinsam mit Dr. Alva Rosendahl, Marlies Bode und Stefan Gatzemeier
- Mikroskopische Auswertung der histologischen Schnitte
- Planung und Durchführung der statistischen Analyse: gemeinsam mit Prof. Dr. Ulrich Wenzel und Marlies Bode
- Erstellen der Abbildungen
- Niederschrift der Dissertation, Literaturrecherche und Bewertung der Daten

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

- Operative Eingriffe: Dr. Alva Rosendahl und Marlies Bode
- FACS Analyse in FlowJo: Dr. Alva Rosendahl und Marlies Bode

- Herstellung der Leukozyteneinzelzellsuspensionen und Messung am Durchflusszytometer der C5aR2-tdTomato Reportermaus: Dr. Alva Rosendahl und Marlies Bode
- Konfokale Mikroskopie der C5aR2-tdTomato-Reportermaus: Prof. Dr. Catherine Meyer-Schwesinger
- Histopathologische Gewebefeinschnitte und Färbungen: Mariola Rezka und Marlies Bode
- Bestimmung von Cholesterin und Blut-Harnstoff-N im Plasma per Autoanalyse: Institut für klinische Chemie des UKE

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung Nr.1: aus (Wenzel et al., 2016)

Abbildung Nr.2: aus (Wenzel et al., 2017)

Abbildung Nr.3 und 4: adaptiert nach Abbildungen von Marlies Bode

Abbildungen Nr. 5: adaptiert nach einer Abbildung von Dr. Catherine Meyer-Schwesinger

Abbildungen Nr. 6– 38: eigene Abbildungen

8. Literaturverzeichnis

- Ahadzadeh, E., Rosendahl, A., Czesla, D., Steffens, P., Prussner, L., Meyer-Schwesinger, C., Wanner, N., Paust, H. J., Huber, T. B., Stahl, R. a. K., Wiech, T., Kurts, C., Seniuk, A., Ehmke, H. & Wenzel, U. O. 2018. The chemokine receptor CX3CR1 reduces renal injury in mice with angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*, 315, F1526-F1535.
- Arbore, G., Kemper, C. & Kolev, M. 2017. Intracellular complement - the complosome - in immune cell regulation. *Mol Immunol*, 89, 2-9.
- Arbore, G., Ong, V. H., Costantini, B., Denton, C. P., Abraham, D., Placais, L., Blighe, K., Mitchell, L., Ellis, R., Heck, S., Nocerino, P., Woodruff, T. M., Kordasti, S., Kemper, C. & Hourcade, D. E. 2020. Deep phenotyping detects a pathological CD4(+) T-cell complosome signature in systemic sclerosis. *Cell Mol Immunol*, 17, 1010-1013.
- Arbore, G., West, E. E., Spolski, R., Robertson, A. a. B., Klos, A., Rheinheimer, C., Dutow, P., Woodruff, T. M., Yu, Z. X., O'Neill, L. A., Coll, R. C., Sher, A., Leonard, W. J., Kohl, J., Monk, P., Cooper, M. A., Arno, M., Afzali, B., Lachmann, H. J., Cope, A. P., Mayer-Barber, K. D. & Kemper, C. 2016. T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4(+) T cells. *Science*, 352, aad1210.
- Bekker, P., Dairaghi, D., Seitz, L., Leleti, M., Wang, Y., Ertl, L., Baumgart, T., Shugarts, S., Lohr, L., Dang, T., Miao, S., Zeng, Y., Fan, P., Zhang, P., Johnson, D., Powers, J., Jaen, J., Charo, I. & Schall, T. J. 2016. Characterization of Pharmacologic and Pharmacokinetic Properties of CCX168, a Potent and Selective Orally Administered Complement 5a Receptor Inhibitor, Based on Preclinical Evaluation and Randomized Phase 1 Clinical Study. *PLoS One*, 11, e0164646.

- Binger, K. J., Gebhardt, M., Heinig, M., Rintisch, C., Schroeder, A., Neuhofer, W., Hilgers, K., Manzel, A., Schwartz, C., Kleinewietfeld, M., Voelkl, J., Schatz, V., Linker, R. A., Lang, F., Voehringer, D., Wright, M. D., Hubner, N., Dechend, R., Jantsch, J., Titze, J. & Muller, D. N. 2015. High salt reduces the activation of IL-4 and IL-13-stimulated macrophages. *J Clin Invest*, 125, 4223-38.
- Chow, C. K., Teo, K. K., Rangarajan, S., Islam, S., Gupta, R., Avezum, A., Bahonar, A., Chifamba, J., Dagenais, G., Diaz, R., Kazmi, K., Lanus, F., Wei, L., Lopez-Jaramillo, P., Fanghong, L., Ismail, N. H., Puoane, T., Rosengren, A., Szuba, A., Temizhan, A., Wielgosz, A., Yusuf, R., Yusufali, A., Mckee, M., Liu, L., Mony, P., Yusuf, S. & Investigators, P. S. 2013. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. *JAMA*, 310, 959-68.
- Esposito, M., Ruffini, F., Bergami, A., Garzetti, L., Borsellino, G., Battistini, L., Martino, G. & Furlan, R. 2010. IL-17- and IFN-gamma-secreting Foxp3+ T cells infiltrate the target tissue in experimental autoimmunity. *J Immunol*, 185, 7467-73.
- European Medicines Agency. 2022. *Tavneos (avacopan) An overview of Tavneos and why it is authorised in the EU* [Online]. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/tavneos-epar-medicine-overview_en.pdf [Accessed 29.06.2022 2022].
- Guzik, T. J., Hoch, N. E., Brown, K. A., Mccann, L. A., Rahman, A., Dikalov, S., Goronzy, J., Weyand, C. & Harrison, D. G. 2007. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med*, 204, 2449-60.
- Harrison, D. G., Coffman, T. M. & Wilcox, C. S. 2021. Pathophysiology of Hypertension: The Mosaic Theory and Beyond. *Circ Res*, 128, 847-863.
- Harrison, D. G., Guzik, T. J., Lob, H. E., Madhur, M. S., Marvar, P. J., Thabet, S. R., Vinh, A. & Weyand, C. M. 2011. Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension*, 57, 132-40.
- Hashimoto, M., Hirota, K., Yoshitomi, H., Maeda, S., Teradaira, S., Akizuki, S., Prieto-Martin, P., Nomura, T., Sakaguchi, N., Kohl, J., Heyman, B., Takahashi, M., Fujita, T., Mimori, T. & Sakaguchi, S. 2010. Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. *J Exp Med*, 207, 1135-43.
- Hengel, F. E., Benitah, J. P. & Wenzel, U. O. 2022. Mosaic theory revised: inflammation and salt play central roles in arterial hypertension. *Cell Mol Immunol*, 19, 561-576.
- Hernandez, A. L., Kitz, A., Wu, C., Lowther, D. E., Rodriguez, D. M., Vudattu, N., Deng, S., Herold, K. C., Kuchroo, V. K., Kleinewietfeld, M. & Hafler, D. A. 2015. Sodium chloride inhibits the suppressive function of FOXP3+ regulatory T cells. *J Clin Invest*, 125, 4212-22.
- Idris-Khodja, N., Mian, M. O., Paradis, P. & Schiffrin, E. L. 2014. Dual opposing roles of adaptive immunity in hypertension. *Eur Heart J*, 35, 1238-44.
- Iyer, A., Woodruff, T. M., Wu, M. C., Stylianou, C., Reid, R. C., Fairlie, D. P., Taylor, S. M. & Brown, L. 2011. Inhibition of inflammation and fibrosis by a complement C5a receptor antagonist in DOCA-salt hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 58, 479-86.
- Jama, H. A., Muralitharan, R. R., Xu, C., O'donnell, J. A., Bertagnolli, M., Broughton, B. R. S., Head, G. A. & Marques, F. Z. 2022. Rodent models of hypertension. *Br J Pharmacol*, 179, 918-937.
- Karsten, C. M., Wiese, A. V., Mey, F., Figge, J., Woodruff, T. M., Reuter, T., Scurtu, O., Kordowski, A., Almeida, L. N., Briukhovetska, D., Quell, K. M., Sun, J., Ender, F., Schmudde, I., Vollbrandt, T., Laumonier, Y. & Kohl, J. 2017. Monitoring C5aR2

- Expression Using a Floxed tdTomato-C5aR2 Knock-In Mouse. *J Immunol*, 199, 3234-3248.
- Le Fricc, G., Kohl, J. & Kemper, C. 2013. A complement a day keeps the Fox(p3) away. *Nat Immunol*, 14, 110-2.
- Li, X. X., Lee, J. D., Kemper, C. & Woodruff, T. M. 2019. The Complement Receptor C5aR2: A Powerful Modulator of Innate and Adaptive Immunity. *J Immunol*, 202, 3339-3348.
- Mccarthy, C. G., Goulopoulou, S., Wenceslau, C. F., Spitler, K., Matsumoto, T. & Webb, R. C. 2014. Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: novel links between inflammation and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 306, H184-96.
- Mcmaster, W. G., Kirabo, A., Madhur, M. S. & Harrison, D. G. 2015. Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. *Circ Res*, 116, 1022-33.
- Niemann, G. 2015. *Die Rolle der IL-17 / IL-23 Achse und des adaptiven Immunsystems bei hypertensiven Endorganschäden der Maus*. Doktor der Medizin Doktorarbeit, Universität Hamburg, Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky.
- Noris, M. & Remuzzi, G. 2013. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol*, 33, 479-92.
- Norlander, A. E. & Madhur, M. S. 2017. Inflammatory cytokines regulate renal sodium transporters: how, where, and why? *Am J Physiol Renal Physiol*, 313, F141-F144.
- Norlander, A. E., Madhur, M. S. & Harrison, D. G. 2018. The immunology of hypertension. *J Exp Med*, 215, 21-33.
- Portilla, D. & Xavier, S. 2021. Role of intracellular complement activation in kidney fibrosis. *Br J Pharmacol*, 178, 2880-2891.
- Rodriguez-Iturbe, B., Pons, H., Quiroz, Y., Gordon, K., Rincon, J., Chavez, M., Parra, G., Herrera-Acosta, J., Gomez-Garre, D., Largo, R., Egido, J. & Johnson, R. J. 2001. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from angiotensin II exposure. *Kidney Int*, 59, 2222-32.
- Ruan, C. C. & Gao, P. J. 2019. Role of Complement-Related Inflammation and Vascular Dysfunction in Hypertension. *Hypertension*, 73, 965-971.
- Ruan, C. C., Ge, Q., Li, Y., Li, X. D., Chen, D. R., Ji, K. D., Wu, Y. J., Sheng, L. J., Yan, C., Zhu, D. L. & Gao, P. J. 2015. Complement-mediated macrophage polarization in perivascular adipose tissue contributes to vascular injury in deoxycorticosterone acetate-salt mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35, 598-606.
- Seniuk, A., Thiele, J. L., Stubbe, A., Oser, P., Rosendahl, A., Bode, M., Meyer-Schwesinger, C., Wenzel, U. O. & 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.
- Shagdarsuren, E., Wellner, M., Braesen, J. H., Park, J. K., Fiebeler, A., Henke, N., Dechend, R., Gratzke, P., Luft, F. C. & Muller, D. N. 2005. Complement activation in angiotensin II-induced organ damage. *Circ Res*, 97, 716-24.
- Singh, M. V. & Abboud, F. M. 2014. Toll-like receptors and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 307, R501-4.
- Strainic, M. G., Shevach, E. M., An, F., Lin, F. & Medof, M. E. 2013. Absence of signaling into CD4(+) cells via C3aR and C5aR enables autoinductive TGF-beta1 signaling and induction of Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol*, 14, 162-71.
- Walport, M. J. 2001. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*, 344, 1058-66.

- Wang, H. X., Li, W. J., Hou, C. L., Lai, S., Zhang, Y. L., Tian, C., Yang, H., Du, J. & Li, H. H. 2019. CD1d-dependent natural killer T cells attenuate angiotensin II-induced cardiac remodelling via IL-10 signalling in mice. *Cardiovasc Res*, 115, 83-93.
- Weiss, S., Rosendahl, A., Czesla, D., Meyer-Schwesinger, C., Stahl, R. A., Ehmke, H., Kurts, C., Zipfel, P. F., Kohl, J. & Wenzel, U. O. 2016. The complement receptor C5aR1 contributes to renal damage but protects the heart in angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*, 310, F1356-65.
- Wenzel, U., Turner, J. E., Krebs, C., Kurts, C., Harrison, D. G. & Ehmke, H. 2016. Immune Mechanisms in Arterial Hypertension. *J Am Soc Nephrol*, 27, 677-86.
- Wenzel, U. O., 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, U. O., Bode, M., Kurts, C. & Ehmke, H. 2019. Salt, inflammation, IL-17 and hypertension. *Br J Pharmacol*, 176, 1853-1863.
- Wenzel, U. O., Ehmke, H. & Bode, M. 2021a. Immune mechanisms in arterial hypertension. Recent advances. *Cell Tissue Res*.
- Wenzel, U. O., Kemper, C. & Bode, M. 2021b. The role of complement in arterial hypertension and hypertensive end organ damage. *Br J Pharmacol*, 178, 2849-2862.
- Wilck, N., Matus, M. G., Kearney, S. M., Olesen, S. W., Forslund, K., Bartolomaeus, H., Haase, S., Mahler, A., Balogh, A., Marko, L., Vvedenskaya, O., Kleiner, F. H., Tsvetkov, D., Klug, L., Costea, P. I., Sunagawa, S., Maier, L., Rakova, N., Schatz, V., Neubert, P., Fratzer, C., Krannich, A., Gollasch, M., Grohme, D. A., Corte-Real, B. F., Gerlach, R. G., Basic, M., Typas, A., Wu, C., Titze, J. M., Jantsch, J., Boschmann, M., Dechend, R., Kleinewietfeld, M., Kempa, S., Bork, P., Linker, R. A., Alm, E. J. & Muller, D. N. 2017. Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. *Nature*, 551, 585-589.
- World Health Organization. 2020. *Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability* [Online]. Geneva: World Health Organization, . Available: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghel-leading-causes-of-death> [Accessed 24-11-2021 2021].
- Yang, B. H., Hagemann, S., Mamareli, P., Lauer, U., Hoffmann, U., Beckstette, M., Fohse, L., Prinz, I., Pezoldt, J., Suerbaum, S., Sparwasser, T., Hamann, A., Floess, S., Huehn, J. & Lochner, M. 2016. Foxp3(+) T cells expressing RORgammat represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*, 9, 444-57.
- 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, 1240-8.
- Zhang, C., Li, Y., Wang, C., Wu, Y. & Du, J. 2014b. Antagonist of C5aR prevents cardiac remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *Am J Hypertens*, 27, 857-64.
- Zhang, J. & Crowley, S. D. 2015. Role of T lymphocytes in hypertension. *Curr Opin Pharmacol*, 21, 14-9.
- Zhang, T., Wu, K. Y., Ma, N., Wei, L. L., Garstka, M., Zhou, W. & Li, K. 2020. The C5a/C5aR2 axis promotes renal inflammation and tissue damage. *JCI Insight*, 5.
- Zhou, B., Perel, P., Mensah, G. A. & Ezzati, M. 2021. Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension. *Nat Rev Cardiol*.
- Zhou, L., Lopes, J. E., Chong, M. M., Ivanov, Ii, Min, R., Victora, G. D., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y. P., Rudensky, A. Y., Ziegler, S. F. & Littman, D. R. 2008. TGF-beta-

induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ function. *Nature*, 453, 236-40.

9. Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Wenzel, der mir die Möglichkeit gab, in die experimentelle Forschung einzusteigen und im Rahmen einer Dissertation neue Methoden kennenzulernen, Erkenntnisse zu gewinnen und Ergebnisse zu diskutieren. Die fortwährende Unterstützung ermöglichte mir erst, diese Monografie zu erstellen. Auch danke ich dem Auswahlkomitee des Cardiovascular Research Centre Hamburg (CVRC), dafür dass ich im Rahmen des Graduiertenkollegs „Individualised Cardiovascular Medicine“ an meiner Dissertation arbeiten durfte. Dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislaufforschung danke ich für die Unterstützung als Stipendiat. Frau Prof. Gisa Tiegs und Herrn Prof. Heimo Ehmke danke ich für die Anregungen im Rahmen meiner regelmäßigen Evaluationen.

Mein Dank gilt auch der stellvertretenden Betreuerin meiner Dissertation Dr. rer. nat. Alva Rosendahl, sowie Stefan Gatzemeier, und Marlies Bode, meinen geschätzten MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe, für die großartige Unterstützung, Begleitung und kollegiale Zusammenarbeit. Darüber hinaus trugen auch alle anderen MitarbeiterInnen der Labore der III: Medizinischen Klinik zu einer äußerst positiven, kollegialen Atmosphäre im Labor bei, in der man gegenseitige Unterstützung, Anregung und Beratung im Vordergrund stand.

Meinen lieben Eltern und Geschwistern danke ich ganz besonders für die Unterstützung, nicht allein während der Niederschrift dieser Dissertation, sondern auch während der gesamten Zeit der Experimente, der Bewerbung und des gesamten Studiums.

10. Lebenslauf

- entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen -

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

- entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen -

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

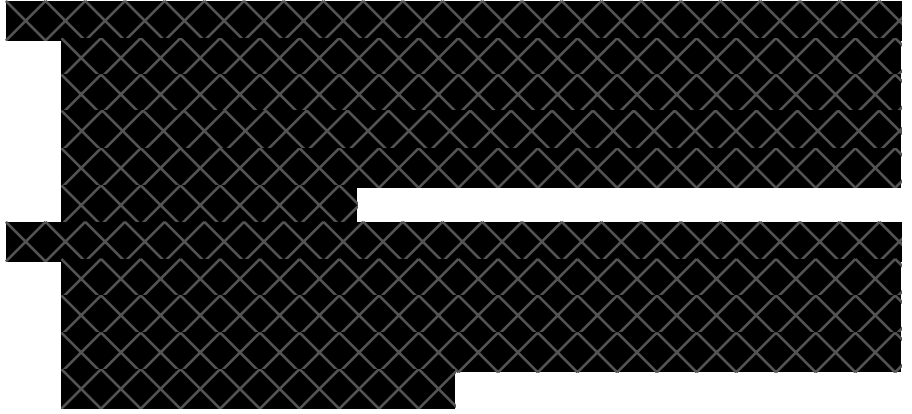
[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

- entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen -



11. Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Unterschrift: 