

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Institut für zelluläre und integrative Physiologie

Prof. Dr. med. Ehmke

## **MPO – T-Lymphozyten – Interaktion im Rahmen der Angiotensin-II-induzierten Hypertension**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Philipp Oser

aus Trier

Hamburg 2016

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 07.09.2016

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Heimo Ehmke

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Torsten Christ

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Physiologie und Pathophysiologie des arteriellen Blutdrucks.....	1
1.2. Das Immunsystem .....	8
1.3. Die Myeloperoxidase.....	15
1.3.1. Synthese und Funktion.....	15
1.3.2. Die Bedeutung der MPO für Herz-Kreislauf-Erkrankungen.....	18
1.4. Myeloperoxidase und T-Lymphozyten.....	20
2. Zielsetzung der Dissertation.....	21
3. Material und Methoden.....	23
3.1. Material.....	23
3.2. Methoden.....	25
3.2.1. Mauslinien & Haltung.....	25
3.2.2. Versuchs-Ablauf und Endpunkte.....	28
3.2.3. Genotypisierung.....	29
3.2.4. Implantation der Telemetriesender.....	31
3.2.5. Telemetrische Messung.....	33
3.2.6. Telemetrische Auswertung.....	34
3.2.7. T-Lymphozyten Separation.....	36
3.2.8. FACS-Analyse.....	39
3.2.9. T-Lymphozyten-Transfer.....	41
3.2.10. AT-II-Pumpen.....	42
3.2.11. Messung der aortalen Relaxationsfähigkeit.....	43
3.2.12. Aorten-Histologie.....	46
3.2.13. Herzgewichte.....	47
3.2.14. In vitro – Stimulierung von T-Lymphozyten.....	47
3.2.15. Statistik.....	51

4. Ergebnisse.....	52
4.1. Telemetrie-OP Erfolg.....	52
4.2. Telemetrie-Daten.....	52
4.2.1. T-Lymphozyten-Transfer.....	52
4.2.2. Basismessungen.....	58
4.2.3. Angiotensin-II-Behandlung.....	75
4.3. Milzzellen-Analyse mittels Durchflusszytometrie.....	103
4.4. Genotypisierung.....	104
4.5. Aorten-Untersuchung.....	105
4.6. Aorten-Histologie.....	114
4.7. Körpergewichte.....	116
4.8. Herzgewichte.....	117
4.9. In vitro – Stimulation von T-Lymphozyten.....	118
5. Diskussion.....	120
5.1. Mauslinien-Generierung und T-Lymphozyten-Transfer.....	120
5.2. Mauslinien-Haltung.....	123
5.3. Die Telemetrie-Operation.....	124
5.4. Das AT-II-Modell für die arterielle Hypertonie.....	125
5.5. Versuchsgruppen im Vergleich.....	126
5.5.1. MAP.....	126
5.5.2. Aktivität & Herzfrequenz.....	131
5.5.3. Untersuchung der Relaxationsfähigkeit an Aorten.....	133
5.6. Herzgewichte und Körpergewichte.....	135
5.7. In vitro – Stimulierung von T-Lymphozyten.....	136
5.8. Einschränkung der Übertragbarkeit.....	137
6. Zusammenfassung und Ausblick.....	138
Abstract.....	139
7. Abkürzungsverzeichnis.....	140
8. Literaturverzeichnis.....	141
9. Danksagung.....	152
10. Lebenslauf.....	153
11. Eidesstattliche Erklärung&Versicherung.....	154

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:



# 1. Einleitung

## 1.1. Physiologie und Pathophysiologie des arteriellen Blutdrucks

Der arterielle Blutdruck, meist als zentraler Blutdruck bezogen auf die großen herznahen Gefäße, ist ein essentieller Bestandteil der kardiovaskulären Funktion und auf Grund dessen ein unverzichtbarer hämodynamischer Messparameter.

Man unterscheidet einen systolischen Blutdruck, definiert als maximaler Druckwert während der systolischen Auswurfphase des Herzens, von einem diastolischen Blutdruck, der als minimaler Wert am Ende der Anspannungsphase des Herzens messbar ist.

Die Differenz der beiden Werte wird als Blutdruckamplitude bezeichnet. Der für die Organdurchblutung relevante arterielle Mitteldruck („mean arterial pressure“ = MAP) kann nur indirekt über die Division der Integralfläche der arteriellen Druckkurve durch die Pulsdauer exakt bestimmt werden. Alternativ kann der zentrale Blutdruck über folgende Formel abgeschätzt werden:

$$\text{MAP} = \text{diastol. Blutdruck} + 1/3 \times (\text{systol. Blutdruck} - \text{diastol. Blutdruck})$$

Unter Berücksichtigung des zentral-venösen Drucks (ZVD) ergibt sich für den Kreislauf die treibende Druckdifferenz:

$$\Delta P = \text{MAP} - \text{ZVD}$$

Diese kann nun auf das aus der Elektrotechnik bekannte Ohm'sche Gesetz übertragen werden:

$$\text{Ohm'sches Gesetz: Spannung } U = \text{Stromstärke } I \times \text{Widerstand } R$$

Nach Einsetzung von  $U = \Delta P$ ,  $I = \text{HZV}$  und  $R = \text{TPR}$  ergibt sich für den Kreislauf:

$$\Delta p = \text{HZV} \times \text{TPR}$$

$$\text{bzw.: } \text{MAP} - \text{ZVD} = \text{HZV} \times \text{TPR}$$

$$\text{Umstellung nach MAP: } \text{MAP} = \text{HZV} \times \text{TPR} + \text{ZVD}$$

Der MAP ist somit näherungsweise das Produkt aus Herzzeitvolumen, gemessen als Produkt von Schlagvolumen (SV) und Herzfrequenz (HF), sowie dem totalen peripheren Gefäßwiderstand (TPR). Durch den Aufbau des Druckgradienten zwischen arteriellem und venösem System ist der arterielle Blutdruck die treibende Kraft der Hämozirkulation, die u.a. die ausreichende Versorgung der Organe mit sauerstoff- und nährstoffreichem Blut und den Abtransport metabolischer Produkte wie z.B. CO<sub>2</sub> sicherstellt.

Die als physiologisch definierten Blutdruckwerte variieren je nach Leitlinie der verschiedenen Fachgesellschaften. Gemäß den aktuell geltenden Leitlinien „2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension“ der „European Society of Hypertension“ gelten Blutdrücke von über 100/60mmHg (Systolischer Wert/Diastolischer Wert) und unter 140/90mmHg als physiologisch. Unterhalb dieser Werte spricht man von einer arteriellen Hypotonie, die sich durch zerebrale Minderperfusion mit Schwindel bis hin zu Bewusstseinsverlust manifestieren kann, oberhalb von einer arteriellen Hypertonie.

Diese, im allgemeinen Sprachgebrauch auch als „Bluthochdruck“ bezeichnet, ist ein gesicherter Risikofaktor für Herz-Kreislauf Erkrankungen und spielt somit für die Haupttodesursachen westlicher Industrienationen eine bedeutsame Rolle. Grund hierfür ist vor allem die enorme Prävalenz der Hypertonie: In einer Studie von 2003 belegt Deutschland mit einer Hypertonie-Prävalenz von 55,3% in der Altersgruppe 35. bis 65. Lebensjahr den 1. Platz vor Ländern wie den USA, Kanada oder Italien (Wolf-Maier et al. 2003). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Studien des Robert-Koch-Instituts, die im Untersuchungszeitraum von 2008 bis 2011 bei etwa jedem dritten deutschen Erwachsenen (Altersgruppe 18. Lebensjahr und älter) eine Hypertonie diagnostizierten (Neuhauser et al. 2013).

Die immense Relevanz im klinischen Alltag begründet sich in der Komplexität und Vielschichtigkeit der durch Hypertonie verursachten pathologischen Prozesse. Erstmals 1948 durch die Framingham-Studie beschrieben, ist der Bluthochdruck heutzutage neben erhöhten Plasma-Cholesterin-Werten, Rauchen und Diabetes mellitus Teil der „vier großen Risikofaktoren“ für Erkrankungen des menschlichen Herz-Kreislauf-Systems, die sich z.B. als Herzinfarkte, Schlaganfälle und Nierenschäden manifestieren.

Die arterielle Hypertonie gilt als „Zivilisationserkrankung“ unserer westlichen Gesellschaft. Stress, Übergewicht, vermehrter Alkoholkonsum und zu wenig körperliche Bewegung sind Begleiterscheinungen einer leistungsorientierten Gesellschaft, gleichzeitig aber auch Risikofaktoren für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie.



Darüber hinaus stellt die in Industrie-Nationen erhöhte Lebenserwartung einen eigenständigen Risikofaktor für die arterielle Hypertonie dar (Wang et al. 2006).

Im Gegensatz zu den vielzähligen Risikofaktoren ist die Pathogenese der arteriellen Hypertonie bis heute nicht vollständig verstanden. Grundsätzlich wird unterschieden zwischen einer primären (=essentiellen) und eine sekundären Hypertonie:

Die sekundäre Hypertonie präsentiert sich definitionsgemäß als Reaktion auf eine bestehende Grunderkrankung. Meist manifestiert sich diese in den Nieren, z.B. als Folge einer Nierenarterienstenose oder einer Glomerulonephritis. Aber auch eine Aortenisthmusstenose, endokrinologische Störungen wie z.B. ein Conn-Syndrom, ein Phäochromozytom oder ein Morbus Cushing können ursächlich für eine sekundäre Hypertonie sein (Onusko 2003). Die sekundäre Hypertonie bietet durch die Behandlung der ursächlichen Grunderkrankung ein verhältnismäßig einfaches und erfolgversprechendes Therapieziel.

Die genaue Pathophysiologie der essentiellen Hypertonie, die mit bis zu 95% deutlich häufiger auftretende Bluthochdruckerkrankung (Carretero and Oparil 2000), ist hingegen bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Hieraus ergibt sich eine bisher nur symptomorientierte und weniger kausale Therapie.

Wahrscheinlich ist, dass nicht ein einzelner Pathomechanismus verantwortlich ist, sondern es der Interaktion mehrerer Prozesse bedarf und die Manifestation einer Hypertonie somit auf einer Ansammlung verschiedenster genetischer Prädispositionen, organischer Läsionen und exogener Faktoren basiert. Einflussnahmen auf die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie wurden durch verschiedene Organsysteme, genetische und embryonale Anlagen sowie die psychische Verfassung des betroffenen Individuums beschrieben (Jonas et al. 1997).

Die Organsysteme, die bisher mit der Genese der essentiellen arteriellen Hypertonie in Verbindung gebracht werden, sind v.a. die Nieren, das zentrale Nervensystem (=ZNS), das arterielle Gefäßsystem und verschiedene hormonelle Systeme.

### Nieren

Das hypertensive Potenzial der Nieren ist seit langem bekannt und ihre Funktion in der Langzeiteinstellung des Blutdrucks ist unbestritten (Cowley et al. 1996).

Retting et al. transplantierten 1993 Nieren hypertensiver Ratten in normotensive Tiere, die im Verlauf einen Bluthochdruck entwickelten (Rettig et al. 1990). Ebenso konnten in einem späteren Versuchsaufbau Nieren normotensiver Spender-Tiere den Blutdruck in spontan hypertensiven Tieren senken (Patschan et al. 1997).

Nephrologische Einflussnahmen auf den Blutdruck können dabei u.a. durch verschiedene Hormone, die Modulation des Wasser- und Elektrolythaushalts sowie den Sympathikus vermittelt werden. Eine Studie, die durch die Kreuztransplantation von Nieren die Effekte eines Knockout des Nierenspezifischen Dopamin-5-Rezeptors auf den Blutdruck untersuchte, konnte die Bedeutung der Niere für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie verdeutlichen. Die Autoren konnten eine vermehrte Salzretention und eine erhöhte AT-1-Rezeptordichte in den Knockout-Tieren als mögliche Ursachen der erhöhten Blutdruckwerte aufzeigen (Asico et al. 2011).

Im Rahmen des kongenital erworbenen Liddle-Syndroms führt eine erhöhte Dichte Natrium-resorbierender ENaK-Kanäle zur Entwicklung einer arteriellen Hypertonie bereits im Kindesalter (Kota et al. 2014).

Über die Innervierung der Tubuli, renaler Gefäße und juxtaglomerulären Apparates durch sympathische Nervenfasern werden in erheblichem Ausmaß die hormonelle Sekretion sowie der Salz- und Wasserhaushalt durch die Aktivität des sympathischen Nervensystems beeinflusst (DiBona 2000).

### Zentrales Nervensystem

Die Beteiligung des ZNS wurde ursprünglich in der Steuerung kurzfristiger Druckanpassungen vermutet (Brody 1986). Jedoch konnten Studien zeigen, dass verschiedene chronisch hypertensiv wirkende Substanzen auch eine Vielzahl zentral-nervaler Angriffspunkte haben. So belegten Arbeiten die zentrale Wirkung einer kochsalzreichen Diät. Die nachgewiesene Erhöhung der Na<sup>+</sup>-Konzentration im zerebralen Liquor führte über die zirkumventrikulären Organe des Gehirns zu einer messbaren Sympathikus-Aktivierung und damit verbunden zu einer systemischen Vasokonstriktion (Blaustein et al. 2012). Außerdem hatte die Ausschaltung spezifischer Hirnareale ebenfalls hypertensive Druckentwicklungen zur Folge (Hendel and Collister 2005).

### Gefäßsystem

Die Bedeutung des arteriellen Gefäßsystems für die arterielle Hypertonie ist durch Studien vielfach belegt. Über eine Zunahme des totalen peripheren Widerstandes (TPR) im Rahmen einer Vasokonstriktion kommt es zu einem Anstieg des arteriellen Blutdrucks. Medikamente, wie z.B. Calcium-Antagonisten, können im Umkehrschluss über eine Vasodilatation zu einem Absinken des arteriellen Blutdrucks beitragen. Die Hauptkrankung der Gefäße, die Arteriosklerose, steht dabei in einer Wechselwirkung mit der arteriellen Hypertonie.

Die zunehmende Verkalkung und die abnehmende Elastizität der Gefäßwände im Rahmen der Arteriosklerose begünstigen eine Erhöhung des Blutdrucks, der wiederum durch Mikroverletzungen und Turbulenzen im Blutfluss eine zunehmende Schädigung der Gefäßwände verursacht (Li and Chen 2005).

So konnte u.a. durch die Behandlung einer arteriellen Hypertonie mit einem Calcium-Antagonisten ein verlangsamtes Fortschreiten der Arteriosklerose der Karotiden beobachtet werden (Zanchetti et al. 2002).

### Hormonelle Systeme: Angiotensin-II im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Die Regulation des Blutdrucks durch hormonelle Systeme spielt besonders in der Pathogenese der sekundären Hypertonie eine große Rolle. Jedoch konnte auch in der Pathophysiologie der essenziellen Hypertonie der Einfluss verschiedener Hormone beobachtet werden.

Von großer Bedeutung ist das Hormon Angiotensin-II als eines der Effektormoleküle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Ausgangspunkt seiner Synthese ist die Sekretion des Botenstoffs Renin aus dem Juxtaglomerulären Apparat der Niere als Reaktion auf verschiedenartige Stimuli, wie z.B. eine Hypovolämie, eine Sympathikus-Aktivierung, eine arterielle Hypotension oder erniedrigte Natriumspiegel im Primärfiltrat der Nieren (s.Abbildung 1).

Im Blutkreislauf zirkulierendes Renin hydrolysiert Angiotensinogen, ein in der Leber synthetisiertes Protein zu biologisch inaktivem Angiotensin-I (Johnson et al., 2013). Durch das vorwiegend im Lungenepithel lokalisierte Angiotensin-Converting-Enzym (=ACE) erfolgt die abschließende Umwandlung mittels der Abspaltung des terminalen His-Leu-Dipetids in das biologisch aktive Angiotensin-II (=AT-II) (Rummer 2000).

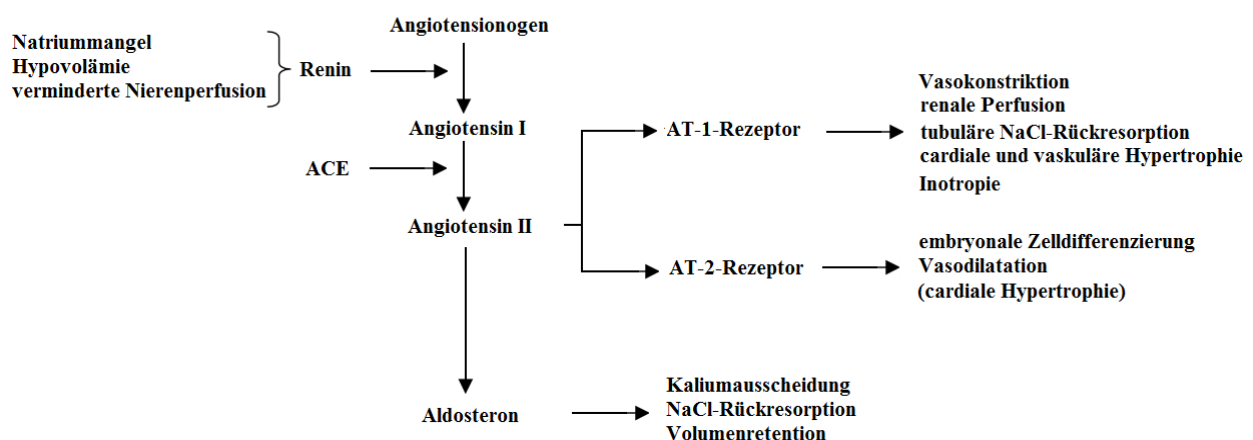


Abbildung 1 : Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Trotz kurzer Halbwertszeit bindet Angiotensin-II an seine G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, u.a. Typ I und II. Typ I - Angiotensin II-Rezeptoren (=AT1-Rez.) vermitteln im erwachsenen Menschen sowie in der Maus den Großteil der Angiotensin-II induzierten Reaktionen.

Im Gefäßmuskel führt die Bindung von AT-II an die AT1-Rezeptoren über die IP3-Signalkaskade zu einer Öffnung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$  - Kanäle. Der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration aktiviert über die Bildung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplex die Myosin-Leichtketten-Kinase. Die durch die Kinase vermittelte Phosphorylierung der leichten Myosin-Kette erlaubt die Bindung des Myosinkopfes an Aktin und führt auf diese Weise zur Kontraktion der Gefäßmuskulatur und damit zu einer Vasokonstriktion mit Reduktion des Gefäßdurchmessers. Diese führt zu einem Anstieg des totalen peripheren Widerstandes und damit letztendlich zu einem Anstieg des arteriellen Blutdrucks.

In den Nebennieren kommt es durch die Bindung von AT-II an die AT1-Rezeptoren zur Freisetzung von Aldosteron. Dieses Hormon, gebunden an einen intrazellulären Mineralkortikoid-Rezeptor, interagiert mit sogenannten „hormone response elements“ bestimmter Gene der zellulären DNA. In den Zellen des distalen Tubulus-Epithels kommt es durch die vermehrte Expression von  $\text{Na}^+$ -Kanälen (EnaC) und der basolateralen  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase zu einer vermehrten Rückresorption von Natrium aus dem Primärfiltrat (Viengchareun et al. 2007). Neuere Studien konnten zudem Aldosteron-Effekte auf nicht-epitheliales Gewebe nachweisen. So wurde u.a. ein unter Aldosteron-Gabe verminderter NO-Spiegel, ein potenter Vasodilatator, in Muskelzellen der Aorta gemessen, dessen Ursache eine verminderte Aktivität der Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase war (Leopold et al. 2007). Weitere Auswirkungen hat Aldosteron u.a. auf den Hypophysenhinterlappen, wo es die Ausschüttung von Vasopressin begünstigt, das eine Wasserretention in den Nieren verursacht (Usberti et al. 1985).

In der Summe der oben genannten Effekte kommt es über eine erhöhte Wasser- und Salz-Retention sowie eine zentralvermittelte Stimulation des Durstgefühls zu einer Zunahme des Plasmavolumens. Dies hat, im Zusammenspiel mit der systemischen Vasokonstriktion der Widerstandsgefäße, einen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks zur Folge (Erdös and Skidgel 1990).

Inzwischen wurden auch stimulierende Effekte des Hormons auf z.B. Zell-Wachstum und Entzündungsreaktionen nachgewiesen, die über seine Funktion als vasokonstriktorisches Hormon hinausgehen, wie z.B. die Hypertrophie-Induktion von arteriellen Gefäßmuskel-Zellen (Griffin et al. 1991).

Der Typ-2 Rezeptor verliert nach dem Embryonalphase zunehmend an Bedeutung (Touyz and Berry 2002). Studien jedoch auf eine eventuelle Beteiligung des Rezeptors in der Pathogenese der Herzhypertrophie hinweisen.

Die Ausschaltung des AT<sub>2</sub>-Rezeptors hatte ein fast vollständiges Ausbleiben der kardialen Hypertrophie unter AT-II-Gabe zur Folge. Als mögliche Ursache wurde von den Autoren eine verminderte Aktivität der p70S6K-Kinase und eine dadurch reduzierte Kollagen-Synthese diskutiert (Ichihara et al. 2001). Das Ausschalten der AT<sub>1</sub>-Rezeptoren konnten dagegen das Ausmaß der kardialen Hypertrophie nicht beeinflussen (Crowley et al. 2006).

Die beschriebenen Effekte, besonders des AT<sub>2</sub>-Rezeptors, führen unter physiologischen Bedingungen zu einem ausgeglichenen Wasser- und Elektrolyt-Stoffwechsel sowie zu einer funktionellen Blutdruckregulation des Körpers.

Eine Überstimulation des Systems kann jedoch über die gleichen Mechanismen zu einer Entgleisung besonders des Blutdrucks führen und ist, zumindest anteilig, in einem Großteil der Fälle für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie verantwortlich. Dementsprechend ist die klinische Relevanz des RAAS in der Behandlung der arteriellen Hypertonie unbestritten. Medikamentöse Eingriffe in das System durch Aldosteron- und Renin-Antagonisten sowie ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker sind längst Teil standardisierter Therapiepläne und ihre blutdrucksenkende Wirkung ist in Studien vielfach belegt (Turnbull et al. 2003).

Zudem konnte das hypertensive Potenzial des Systems in einer Vielzahl von experimentellen Studien nachgewiesen werden, so dass der Einsatz von Angiotensin-II zur experimentellen Induktion eines Hypertonie-Modells in Tieren inzwischen gängige Praxis ist.

Pathologische Auswirkungen der Angiotensin-II-Gabe wurden dabei in praktisch allen beteiligten Organsystemen in Form von typischen, hochdruckbedingten Endorganschäden nachgewiesen.

Ursächlich hierfür sind einerseits das systemisch aktivierte AT-II, andererseits konnte die Existenz lokal arbeitender Renin-Angiotensin-Systeme, z.B. in Herz, Niere und Gehirn, belegt werden. Diese können unabhängig von, oder in Wechselwirkung mit dem systemischen Renin-Angiotensin-System zusätzlich Einfluss auf Endorganschäden sowie die organspezifische Blutdruckregulation nehmen (Paul et al. 2006).

Typische Endorganschäden finden sich dabei u.a. am Herzen in Form von kardialer Hypertrophie sowie einer fortschreitenden Herzinsuffizienz, die wie beschrieben zumindest anteilig über AT<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt wird. In den Nieren sind die AT-II vermittelten Gewebeschädigungen v.a. durch die begleitende Hypertonie verursacht. Zusätzliche blutdruckunabhängige Schädigungen werden aktuell diskutiert und könnten u.a. durch eine Gewebeischämie verursacht werden (Long et al. 2004).

In den Gefäßen konnte sowohl in Mausmodellen als auch in humanen Studien eine Reduktion arteriosklerotischer Prozesse durch eine Blockade verschiedener Anteile des RAAS-Systems beobachtet werden.

Als mögliche Ursache dieses Effekts konnte eine durch AT-II-Gabe vermehrte Immigration von zirkulierenden Monozyten in die Gefäßwand und bestehende Plaques nachgewiesen werden. Deren Einwanderung gilt mit als initialer Schritt in der Pathogenese der Arteriosklerose (Weiss et al. 2001).

Neben dem Renin-Angiotensin-Aldosteron System gibt es eine Vielzahl weiterer Hormone, die einen Einfluss auf die Blutdruckregulation nehmen:

Das Dopamin-System wirkt v.a. an den Nieren und kann über verschiedene Rezeptoren u.a. die Salzreabsorption regulieren. In mehreren Tiermodellen konnte über Knockouts verschiedener Dopaminrezeptoren auf diese Weise eine arterielle Hypertonie provoziert werden (Banday and Lokhandwala 2008). Ebenso konnte eine Insulin-Resistenz als unabhängiger Risikofaktor einer essenziellen Hypertonie nachgewiesen werden. Neuere Studien spekulierten über eine durch kompensatorisch erhöhte Insulin-Spiegel vermittelte vermehrte Salzreabsorption als Ursache des ermittelten Zusammenhangs (Soleimani 2015).

Zusätzlich zu den beschriebenen Systemen verdichten sich seit einigen Jahren die Hinweise, dass auch das Immunsystem in der Hypertonie-Entstehung beteiligt sein könnte.

## 1.2. Das Immunsystem

Der Begriff Immunsystem leitet sich vom lateinischen "*immunis – frei, unberührt, rein von etw.*" (Zeno 2014) ab und erste Berichte über immunologische Prozesse reichen bis ins Jahr 430 v.Chr. zurück, als in Athen ausschließlich von der „Attischen Seuche“ bereits Genesene zur Behandlung von Infizierten herangezogen wurden.

Als Begründer der Immunologie gilt Edward Jenner, ein englischer Landarzt, der 1798 publizierte, dass mit Kuhpocken infizierte Menschen nicht oder nur in schwachem Maße von der damaligen Pockenepidemie betroffen waren (Remmel 2010).

Es dauerte allerdings bis ins späte 19. Jahrhundert bevor Robert Koch den Beweis für die Verursachung von Infektionen durch Mikroorganismen erbrachte.

Definiert wird die Immunologie als die Lehre von den Grundlagen der körperlichen Abwehr von Krankheitserregern. Das Immunsystem erlaubt dem Menschen, geschützt durch seine körpereigene Abwehr, sich von Keimen umgeben durch diese Welt zu bewegen (Murphy 2014).

Bedenkt man die Menge und Vielfalt an Mikroorganismen mit denen sich der menschliche Organismus Tag für Tag auseinander setzen muss, so ist die immense Bedeutung des Immunsystems schon am gesunden Menschen offensichtlich.

Die tatsächliche Notwendigkeit eines permanenten Schutzes vor Bakterien, Viren, Pilzen und anderen Erregern zeigt sich allerdings erst bei Schwäche oder gar Fehlen einer funktionierenden Immunabwehr. Patienten, die unter einer Immundefizienz z.B. durch genetische Defekte oder durch Chemotherapie leiden, werden häufig nicht Opfer ihrer eigentlichen Grunderkrankung sondern versterben an gefürchteten Sekundärinfektionen (Link and Bokemeyer 2006).

Nicht nur von außen wirkende Einflüsse machen ein funktionierendes Immunsystem unverzichtbar. Ebenso wichtig ist ein ausgewogenes Verhältnis von Toleranz und aktivem Vorgehen gegen körpereigene Zellen sowie im Körper geduldete Fremd-Organismen wie z.B. die Bakterien der Darmflora. Fehlfunktionen in diesem Bereich können ursächlich für Autoimmunerkrankungen oder Tumore sein.

Es verwundert daher nicht, dass das Verständnis sowie mögliche Einflussmaßnahmen auf das menschliche Immunsystem eine enorme Bedeutung für die moderne Medizin haben.

Legitimierte in früheren Zeiten schon der Erfolg einer Behandlung ihre Anwendung, so ist in Zeiten von Organtransplantation und Immunsuppression inzwischen das Interesse am Verständnis der immunologischen Mechanismen mehr und mehr in den Vordergrund gerückt.

Klassischerweise unterscheidet man die durch das Immunsystem vermittelte Reaktion auf einen Krankheitserreger in eine adaptive, spezifische und eine angeborene, unspezifische Immunantwort. Des Weiteren lassen sich diese beiden synergetisch arbeitenden Systeme jeweils in eine humorale und eine zelluläre Komponente unterteilen (Steinwald 2009).

Charakteristisch für das angeborene Immunsystem ist seine ständige und sofortige Reaktionsbereitschaft auf Fremdorganismen.

Wichtige Vertreter des Systems sind Makrophagen und Monozyten, Natürliche Killerzellen, Granulozyten und das Komplementsystem, aber auch antimikrobielle Enzymsysteme oder mechanische Barrieren wie die Epidermis und die Schleimhäute (Ganten 1999), die zusammen eine erste Verteidigungslinie gegen Mikroorganismen bilden. Auch die Myeloperoxidase (s.1.3.) wird diesem System zugerechnet.

Eine fehlende Spezifität in seinem Ansprechen auf pathogene Erreger führt, verbunden mit einer fehlenden Lernfähigkeit des Systems, immer wieder zur Nichterkennung einzelner Erreger.

Trotzdem geht man davon aus, dass das angeborene Immunsystem für sich alleine schon einen Großteil der potenziellen Infektionen abwehren kann (Janeway and Walport 2001a).

Das erworbene Immunsystem zeichnet sich durch seine hohe Anpassungsfähigkeit aus. Diese durch T- und B-Lymphozyten sowie Dendritische Zellen vermittelte Immunantwort ist in der Lage spezifisch auf eindringende Erreger zu reagieren und ist somit besonders effektiv.

Es gilt als das entwicklungsgeschichtlich jüngere System und kann in eine humorale und eine zelluläre Antwort unterschieden werden.

Die humorale Antwort wird hauptsächlich durch die von B-Lymphozyten gebildeten spezifischen Antikörper vermittelt.

Die zelluläre Immunantwort wird mit den T-Lymphozyten gleichgesetzt. Auf die Präsentation fragmentierter Antigene durch andere Immunzellen angewiesen, stehen sie in engem funktionellem Kontakt mit anderen Komponenten des Immunsystems (Nitschke 2006).

### T-Lymphozyten und ihre Bedeutung für Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Frühzeitig das Knochenmark verlassend, wandern die noch unreifen T-Lymphozyten in den Thymus ein. Dort besiedeln sie zunächst die kortikalen Bereiche. Zu diesem Zeitpunkt exprimieren die Zellen noch keinen der sogenannten T-Zell-Oberflächenmarker auf ihrer Oberfläche und werden als CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> TCR<sup>-</sup> -Zellen (= Doppel-Negativ Zellen, bezogen auf ihre CD4 und CD8-Rezeptoren) bezeichnet.

Im anschließenden Reifeprozess bildet sich zunächst der T-Zell-Rezeptor, gebunden an CD3, auf der Zelloberfläche aus. Dieser erfährt im Rahmen seiner Ausbildung durch somatische Rekombination eine ausgeprägte Spezialisierung, so dass die Gesamtheit der heranreifenden Zellen eine jeweils spezifische Reaktionsbereitschaft auf eine Vielzahl verschiedenster Antigene aufweist.

Die im Anschluss ebenfalls exprimierten CD4 - und CD8 -Rezeptoren überführen die Zellen in das CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> -Stadium und sind Voraussetzung für die anschließende Positivselektion.

Thymusspezifische, Antigen präsentierende Zellen interagieren über MHC-I und MHC-II – Moleküle mit dem T-Zell-Rezeptor der T-Lymphozyten. Bei ausbleibender Interaktion kommt es zur Apoptose der betroffenen Zelle. Die Bindung des T-Zell-Rezeptors an ein MHC-I Molekül führt zur alleinigen Ausprägung des CD4-Rezeptors, während bei Bindung an ein MHC-II Molekül nur noch der CD8-Rezeptor exprimiert wird. Durch diese Reduktion auf einen der beiden Rezeptoren erreichen die Zellen das Stadium der „Einfach-Positiv“-Zelle (CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>) und können nun der Negativ-Selektion unterzogen werden.

In den Thymus eingewanderte Dendritische Zellen präsentieren den T-Lymphozyten körpereigene Antigene.

Reaktionen mit diesen würden in einem späteren Stadium zu möglichen Autoimmunreaktionen führen, so dass die Bindung des T-Zell-Rezeptors an ein solches Peptid die Zelle in die Apoptose führt. Zellen, die auch diesen Reifungsschritt erfolgreich passieren, verlassen als reife T-Lymphozyten den Thymus und beginnen ihre Zirkulation im menschlichen Organismus (Neumann 2008).



Eine übliche Unterteilung der T-Lymphozyten erfolgt nach den von ihnen exprimierten Rezeptoren CD4 oder CD8, deren Verhältnis im Blut, bei individuell-genetische Unterschieden, im europäischen Raum etwa ein CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Ratio von 2,1 aufweist (Howard et al. 1996). In der Maus liegt das Verhältnis mit 2-4 etwas höher (Myrick et al. 2002).

### CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten

Diese Subpopulation der T-Lymphozyten, auch als T-Helferzellen (= TH) bezeichnet, dient vornehmlich der Aktivierung anderer Zellen des Immunsystems.

Für ihren abschließenden Reifeprozess essentiell ist die Präsentation von prozessierten Antigenen durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ) wie z.B. Makrophagen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen oder B-Lymphozyten auf ihren MHC II-Molekülen. Darüber hinaus nehmen zusätzlich von den Antigen-präsentierende Zellen sezernierte Hormone oder exprimierte co-stimulierende Moleküle Einfluss auf die Entwicklungsrichtung.

Ausgehend von naiven TH0-Zellen entwickeln sich die T-Lymphozyten zu TH1- oder TH2-Helferzellen.

Die Bildung von TH-1 Helferzellen wird dabei v.a. durch IL-12 und IFN- $\gamma$  gefördert. TH1-Zellen aktivieren dann bei Bedarf über Interleukin-2 und Interferon- $\gamma$  bevorzugt Makrophagen.

TH-2 Helferzellen benötigen für ihre Reifung dagegen IL-2 und IL-4 sowie die Bindung zwischen dem Co-Substrat B7 und dem entsprechenden Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche. Aktivierte TH2-Zellen greifen in den Reifezyklus der B-Zelle zur Antikörper-produzierenden Plasmazelle ein und nutzen hierzu Zytokine wie IL-5 und IL-13. Das ebenfalls sezernierte IL-4 hemmt gleichzeitig die Immunantwort von Makrophagen.

Diese gegenläufigen Prozesse verdeutlichen die immense Bedeutung für den Verlauf einer Infektion in Abhängigkeit von der jeweils dominierenden T-Zell-Subpopulation.

So konnte beispielhaft gezeigt werden, dass C57Bl/6J Mäuse mit einer genetisch vorgegebenen TH1-Antwort, nicht aber Mäuse mit einer betonten TH2-Antwort eine Infektion mit *Leishmania major* überleben (Reiner and Locksley 1995).

Eine weitere CD4<sup>+</sup> jedoch nicht zu den T-Helferzellen zählende Population wird als Gruppe der regulatorischen T-Lymphozyten (= Tregs) oder Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen bezeichnet. Nur etwa 10% der CD4<sup>+</sup> Zellen gehören dieser Gruppe an, jedoch ist ihre spezifische Rolle für das immunologische Gleichgewicht von großer Bedeutung. Durch die Vermittlung einer Gegenregulierung begonnener immunologischer Aktivität schützen sie den Organismus vor übermäßigen Immunreaktionen. Kontrovers diskutiert wird zudem ihre Beteiligung in der Entwicklung und Progression von Tumoren.

Durch die beobachtete Akkumulation in Tumorgewebe zunächst für die Supprimierung von Abwehrmechanismen verantwortlich gemacht, zeigten neuere Studien in bestimmten Tumoren auch Tumor-regressive Effekte (Whiteside 2012).

Eine ebenfalls außerhalb der TH1/TH2-Kategorisierung geführte CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten-Subgruppe sind die TH17-Zellen. Ihre Differenzierung wird durch die Sezernierung von IL-6, IL-21, IL-23 und TGF- $\beta$  aus Antigen-präsentierenden Zellen stimuliert. Die von den TH17-Zellen hauptsächlich produzierten Zytokine IL-17, IL-6 und IL-21 sind durch ihre proinflammatorischen Eigenschaften von besonderer Bedeutung in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie z.B. der Multiplen Sklerose (Jadidi-Niaragh et al. 2011) und Psoriasis (Elloso et al. 2012).

### CD8+ T-Lymphozyten

Auch als cytotoxische T-Lymphozyten bezeichnet, interagieren reife CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup> Zellen mit antigenbeladenen MHC-I-Molekülen auf benachbarten Zelloberflächen. Da fast alle kernhaltigen Zellen Antigene über MHC-I präsentieren können, ist es auf diese Weise möglich effektiv gegen zellinterne Erreger vorzugehen. Ihre cytotoxische Wirkung vermitteln die CD8-Zellen einerseits über die Sezernierung von Perforinen und Granzymen, andererseits auch über eine exogene Apoptose-Initiierung in der infizierten Zielzelle (Andersen et al. 2006).

### T-Lymphozyten und Arteriosklerose

Die Entdeckung der Arteriosklerose geht zurück bis ins frühe 16. Jahrhundert. Als einer der ersten beschrieb Leonardo da Vinci (1452-1519), dass die Verdickung von Arterien den Blutfluss der Älteren behindere. Der deutsche Pathologe Rudolf Virchow formulierte Ende des 18. Jahrhunderts als Erster die Hypothese, dass eine chronisch-entzündliche Veränderung der Intima Ausgangspunkt für die Entstehung von Arteriosklerose sei (Mayerl et al. 2006).

Die Erkenntnisse von Virchow sind bis heute gültig und bilden noch immer die Grundlage für die aktuelle Forschung.

Die genaue Pathogenese der Erkrankung, die sogenannte Atherogenese, ist jedoch bis heute nicht vollständig aufgeklärt (Beer 2007).

Einig ist man sich, dass es initial durch eine Zunahme der Gefäßpermeabilität zu einer Einwanderung von LDL-Komplexen in den subendothelialen Raum kommt, die dort von infiltrierenden Makrophagen phagozytiert werden. Die anschließende Umwandlung der Makrophagen in sogenannte „Schaumzellen“ führt in Verbindung mit weiteren pathologischen Prozessen zu Bildung und Wachstum eines artheromatösen Plaques (Furjanic 2008; Lee 2012).

Neben der Beteiligung von Monozyten/Makrophagen konnte auch eine vermehrte Aktivität von T-Lymphozyten in der Plaque-Genese gezeigt werden. So konnten bereits ein vermehrtes Wachstum und eine Destabilisierung von Plaques durch CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten gezeigt werden (Kyaw et al. 2013). Demgegenüber steht eine Reduktion der Plaque-Progression unter Treg-Wirkung (Haraba et al. 2011).

Auch wenn die vollständige Klärung der involvierten immunologischen Mechanismen noch aussteht, führte die Entdeckung der inflammatorischen Ätiologie dieser bedeutenden Herz-Kreislaufkrankung zu der Suche nach inflammatorischen Komponenten in einer Vielzahl anderer Krankheitsätiologien, u.a. auch der arteriellen Hypertonie (Harrison et al. 2010).

### T-Lymphozyten und die arterielle Hypertonie

Schon seit einigen Jahren berichten verschiedene Forschergruppen immer wieder über mögliche Verbindungen zwischen dem Aktivitätsgrad des adaptiven Immunsystems und der Inzidenz von arterieller Hypertonie (Bataillard et al. 1986; Muller et al. 2002).

Seit langem als Mitspieler in der Genese verschiedener Endorganschädigungen bekannt, brachten Studien, die vermehrte immunologische Aktivität in hypertensiv-geschädigten Nieren und Gefäßen nachweisen konnten, erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung immunologischer Prozesse in der Genese der arteriellen Hypertonie (Verloren et al. 2009).

Dabei ist v.a. die systemische Präsenz des Immunsystems von potenziell großer Relevanz. Es wird spekuliert, ob nicht die im gesamten Körper zirkulierenden Immunzellen das fehlende Glied zur Erklärung der komplexen Interaktion der verschiedenen blutdruckregulierenden Organsysteme sein könnten (Harrison and Guzik 2011).

Bis heute ist es allerdings schwierig zwischen einer primären Immunaktivität als Verursacher der Hypertonie und einer sekundären immunologischen Reaktion auf hypertensive Belastungen zu differenzieren (Quiroz 2012).

2007 gelang dem Forscherteam um Guzik und Harrison ein entscheidender Schritt in der genaueren Identifizierung der zu Grunde liegenden Mechanismen dieser Beobachtungen.

In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ohne B- und T-Lymphozyten ein deutlich verringerter Blutdruckanstieg unter Angiotensin II – Gabe messbar ist. Ein selektiver T-Lymphozyten-Transfer, nicht aber B-Lymphozyten-Transfer, führte zu einem Ausbleiben dieses Effekts.

Dieser Umstand, verbunden mit einer vermehrten Detektion von v.a. CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in periadventitialem Fettgewebe der Tiere, ließ die Autoren eine zentrale Rolle der T-Lymphozyten in der Modulation des Hypertonie diskutieren und über ein mögliches neues Ziel pharmakologischer Hypertonie-Intervention spekulieren („In this regard, the T cell likely plays a central role in modulation of hypertension and provides a new therapeutic target for treatment of this common disease.“; Guzik et al. 2007).

Anschlussarbeiten, teilweise der selben Arbeitsgruppe, spekulierten über verschiedene Hypothesen auf welche Weise die T-Lymphozyten den beschriebenen Einfluss auf den Blutdruck vermitteln könnten. Dabei konzentrierte man sich besonders auf verschiedene durch T-Lymphozyten vermittelte Interleukine. Eine Blockade des u.a. durch T-Lymphozyten produzierten Tumornekrose-Faktors alpha (TNF- $\alpha$ ) konnte in mehreren Studien sowohl Blutdruckanstieg (Guzik et al. 2007) als auch hypertensive Endorganschädigung unter AT-II-Gabe verhindern (Elmarakby et al. 2008).

In einem weiteren AT-II-Modell war die hypertensive Reaktion der Tiere durch das Fehlen von Interleukin 17, einem v.a. durch den T-Lymphozyten Sub-Typ Th17 produzierten Signalstoff, deutlich reduziert. Zudem konnte in vaskulären Untersuchungen der AT-II behandelten Tiere eine unter IL-17-Mangel deutlich reduzierte leukozytäre Infiltration in die Gefäße gezeigt werden. Auf Grund dieser Beobachtung vermuteten die Autoren, dass T-Lymphozyten sowohl direkt als auch über eine sekundäre Akquirierung weiterer proinflammatorischer Zellen Einfluss auf die Blutdruckantwort nehmen können (Madhur et al. 2010). Auch die Ausschaltung mittels eines Antikörpers des durch verschiedene Immunzellen (u.a. T-Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen) produzierten IL-6 konnte einen durch AT-II vermittelten Blutdruckanstieg verhindern (Coles et al. 2007).

In Bezug auf hypertensive Endorganschäden wurden auch mögliche kardioprotektive Effekte der T-Lymphozyten deutlich. Der Transfer von ausschließlich regulatorischen T-Lymphozyten (= Tregs) führte zu einer reduzierten kardialen Hypertrophie nach Angiotensin-II Infusion. Zu einer abgeschwächten Blutdruckantwort kam es jedoch nicht (Kvakan et al. 2009). Andere Autoren präsentierten eine ähnlich konzipierte Arbeit, die nach Treg-Transfer den Blutdruckanstieg merklich reduzieren konnte, so dass unter Einbeziehung der Ergebnisse von Guzik&Harrison eine mögliche „ying/yang relationship“ zwischen Treg-Zellen und CD4/CD8 T-Lymphozyten vermutet wurde (Barhoumi et al. 2011a).

Die aktuelle Studienlage zusammenfassend kann die Mitbeteiligung von T-Lymphozyten in der Pathogenese zumindest der spezifischen AT-II-Hypertonie als hoch wahrscheinlich angesehen werden. Die genaue Betrachtung von Subpopulationen verspricht weitere Erkenntnisse in naher Zukunft.

Es zeigen sich vielschichtige Prozesse, so dass sich das aktuell entstehende Interaktions-Modell sehr komplex darstellt. Die vorliegende Arbeit soll helfen, weitere Prozesswege aufzudecken und somit zum Verständnis dieses vielversprechenden und neuen pathogenetischen Ansatzes beitragen.

## **1.3. Die Myeloperoxidase**

### **1.3.1. Synthese und Funktion**

Die Myeloperoxidase (= MPO) gehört zur Superfamilie der Häm-Peroxidasen. Hauptsächlich konzentriert sich das Enzym in neutrophilen Granulozyten, einer Subzellpopulation des Immunsystems. Insgesamt macht das Enzym zwischen 2% und 5% der gesamten Masse dieser Zellen aus (Klebanoff 2005).

Des Weiteren kommt die MPO in geringen Konzentrationen auch in Monozyten, Mikroglia-Zellen des ZNS, den Kupffer-Zellen der Leber und in den Pyramiden-Neuronen des Hippocampus vor.

Die Relevanz der MPO in Monozyten wird jedoch durch den Verlust des Enzyms bei der Differenzierung der Monozyten in Makrophagen eingeschränkt (Deimann 1984).

Das kodierende Gen der MPO liegt zusammen mit denen der Eosinophilperoxidase und der Lactoperoxidase, weiteren Enzymen der Häm-Peroxidase-Familie, auf dem langen Arm des Chromosom 17. Auf Grund des ähnlichen strukturellen Aufbaus der drei Gene wird ein gemeinsames Urgen vermutet.

Die Transkription unterliegt einer Vielzahl an Regulationsmechanismen, so wurden neben mehreren Cis- Elementen und Transkriptionsfaktoren auch verschiedene genetische Polymorphismen in Form sogenannter „SNP's“ (=“single nucleotide Polymorphisms“) identifiziert, deren Vorliegen erhebliche Auswirkungen auf Ausmaß und Funktion der synthetisierten MPO haben können. Aktuelle Studien publizierten bereits erste mögliche Verbindungen zwischen diesen SNP's und phänotypischen Korrelaten in Risiko und Ausprägung spezifischer Krankheiten wie Alzheimer oder Multipler Sklerose (van der Veen et al 2009).

Das ursprüngliche Translations-Produkt erfährt im Endoplasmatischen Retikulum (=ER) der Zellen eine Reihe posttranslationaler Modifikationen und wird so in die ApoproMPO umgewandelt.

Noch im ER wird das eisenenthaltende Häm-Molekül als prosthetische Gruppe integriert (Hansson et al 2006). Die enzymatisch bereits aktive proMPO wird in eine schwere und eine leichte Kette gespalten (Nauseef et al 1992). Die Zusammenlagerung zweier Leicht-Schwer-Kettenpaare stellt den abschließenden Syntheseschritt dar (Andrews and Krinsky 1981).

Die schlussendliche Primärstruktur des Enzyms ist ein 144kD Dimer, dessen schwere Ketten miteinander über eine Di-Sulfidbrücke kommunizieren. In die beiden schweren Ketten ist jeweils die prosthetische Häm-Gruppe integriert.

Die Sekundärstruktur ist durch Helices gekennzeichnet, wobei alpha-Helices mit einem Anteil von etwa 50% an der gesamten Polypeptid-Struktur deutlich überwiegen (Fenna et al. 1995).

Das reife Enzym wird in die Primär-Granula der Neutrophilen Granulozyten transportiert. Dort erfolgt die Bindung an eine negativ geladene Matrix, bestehend aus sulfatierten Proteoglycanen.

Vor über 70 Jahren entdeckt, war lange Zeit die einzige der MPO zuzuordnende Aufgabe die Beteiligung am antimikrobiellen System der Neutrophilen Granulozyten: In ihren azurophilen Granula gespeichert, führt ein intrazellulärer Calcium-Anstieg zur Überführung der MPO in internalisierte Phagosomen, bzw. zur Sekretion des Enzyms in den extrazellulären Raum. Auf diese Weise erhält die MPO Kontakt zu ihrem wichtigsten Substrat, dem Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) (Klebanoff 2005).  $H_2O_2$  ist Produkt des sogenannten „respiratory burst“, einer Reaktion neutrophiler Granulozyten bei der mit Hilfe des Enzyms NADPH-Oxidase Sauerstoffradikale nach extrazellulär oder in intrazelluläre Kompartimente abgegeben werden. Diese reagieren im Anschluss spontan oder unter Katalyse durch die Superoxid-Dismutase zu  $H_2O_2$ .

Im Fall der neutrophilen Granulozyten kommt es anschließend durch die Reaktion von  $H_2O_2$  mit MPO in den Granula zur Bildung des Compound I, dem primären katalytischen Komplex der MPO (van der Veen 2009). Hierzu reagiert das  $H_2O_2$  mit dem zentralen Eisen-Molekül der MPO unter Bildung einer Doppelbrücke. Dieser energiereiche Zustand stellt den Ausgangspunkt für zwei verschiedene Anschlussreaktionswege dar.

Einerseits kann es im Rahmen des „Halogenation cycle“ (Arnhold 2004) nun durch Interaktion mit Halogenen wie Chlor oder Brom zu einer direkten 2-Elektronen-Reduktion kommen: Die Oxidation der Halogene führt zur Bildung von Hypohalogenigen Säuren ( $HOX$ ,  $X=Cl, Br, SCN$ ), wobei unter physiologischen pH-Verhältnissen auf Grund der hohen Chlorid-Präsenz die Synthese von  $HOCl$  überwiegt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass etwa 45% des eingesetzten  $H_2O_2$  zu  $HOCl$  reagieren. (van Dalen et al. 1997).

Ob es wirklich zur Bildung von freiem  $HOCl$  kommt ist noch umstritten, alternativ wird die Bildung eines Compound I – Chlorid – Intermediats diskutiert. Dieses könnte dann weiterführend freie Amino-Gruppen von Polysacchariden der extrazellulären Matrix wie Heparansulfate chlorieren.

Ein anderer postulierter Ansatz geht von dem sofortigen spontanen Übergang in oxidatives Cl<sub>2</sub>-Gas aus (Hazen et al. 1996).

In jedem Fall wird der Bildung von HOCl in der Forschung eine zentrale Rolle zugesprochen. So wurden in einer Vielzahl von Arbeiten bereits Interaktionen mit Proteinen, DNA und Lipiden aufgezeigt (Prokopowicz et al. 2012).

Des Weiteren stellt der Nachweis von 3-Chlorotyrosin, einem stabilen Reaktionsprodukt von HOCl mit der Aminosäure Tyrosin, aktuell einen zuverlässigen und vielfach genutzten Nachweis stattgefundenener MPO-Aktivität dar (Hazen and Heinecke 1997).

Weitere Reaktionsprodukte des HOCl, wie z.B. die Chloramine, zeichnen sich zudem im Gegensatz zu dem „short-lived“ HOCl durch eine ausgesprochen lange Halbwertszeit aus und können auf diese Weise die pro-oxidative Wirkung der MPO-Aktivität zeitlich deutlich verlängern (Hawkins et al. 2003).

Ein alternativer Reaktionsweg des Compound I ist der Peroxidase-Zyklus. Er basiert auf zwei aufeinander folgenden 1-Elektron-Reduktionen des Compound I unter Bildung eines Compound-II-Zwischenprodukts, der dem Compound I strukturell ähnelt, jedoch nicht mit Halogenen reagieren kann. Dadurch verschiebt sich der Großteil der Reaktionspartner hin zu organischen Substraten wie Tyrosin, Ascorbaten und Steroid-Hormonen unter Bildung verschiedener organischer Radikale. Aber auch anorganische Stoffe wie Nitrite oder Sauerstoff- und NO-Radikale können oxidiert werden (Arnhold 2004).

In beiden Zyklen führen die Reaktionswege zur Rückbildung der MPO in seine native Form und damit zu einer wiederhergestellten Reaktionsbereitschaft.

In der Literatur wird zusätzlich der Compound-III-Zustand des MPO beschrieben, dem eine allgemeine Relevanz bisher auf Grund seiner hohen Instabilität allerdings abgesprochen wird (Klebanoff 2005).

Über lange Zeit blieben die beschriebenen Generierungswege von ROS und Anschlussprodukten auf ihre lokale Bedeutung für das antimikrobielle System beschränkt.

Jedoch zeigen Untersuchungen, dass eine Dysfunktion des MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Systems nur marginale Auswirkungen auf die Funktionsfähigkeit der Granulozyten hat. MPO-defiziente Versuchstiere haben eine kaum reduzierte Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen (Aratani et al. 1999), obwohl in vitro die MPO wirksam gegen Bakterien einsetzbar ist (Klebanoff 2005).

Beim Menschen ist die totale bzw. subtotale MPO-Defizienz mit ca. 1/2727 recht häufig und dennoch gibt es bislang keine signifikanten Aussagen zu phänotypischen Auswirkungen humaner MPO-Defizienz (Kutter 1998).

Einige kleinere Fall-Kontroll-Studien berichten über Assoziationen mit verschiedenen entzündlich-degenerativen Erkrankungen (Kutter 1998) sowie von einzelnen schwerwiegenden Verläufen bei bestehender MPO-Defizienz, insgesamt bleibt die klinische Relevanz eines MPO-Mangels jedoch deutlich hinter den zu erwartenden Konsequenzen zurück (van der Veen 2009).

### **1.3.2. Die Bedeutung der MPO für Herz-Kreislauf-Erkrankungen**

Auf Grund der beschriebenen, verhältnismäßig geringen Bedeutung der MPO für die Abwehr von Mikroorganismen versuchen Forscher weitere, sowohl lokale als auch systemische Bedeutungen der MPO außerhalb des mikrobiziden Systems zu finden.

Auf lokaler Ebene kann im Rahmen inflammatorischer Prozesse MPO Aktivität als einer der ersten Prozesse nachgewiesen werden (Nauseef 2007), so u.a. auch in artherosklerotischen Läsionen.

Die Arbeit von Daugherty et al. 1994 postulierte eine Beteiligung der MPO in der Modifikation von LDL in seine oxidierte artherosklerose-fördernde Form. Grundlage für diese Annahme war der Nachweis einer Vielzahl von Reaktionsprodukten der MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Interaktion in den artherosklerotischen Läsionen: Erhöhte Spiegel von Nitrotyrosin sowohl in lädierten Aorten als auch in LDL-Molekülen menschlicher Atherome ließen auf MPO-abhängige Reaktionen schließen (Nicholls and Hazen 2009; Leeuwenburgh et al. 1997). Insbesondere der Nachweis von 3-Chlorotyrosin bedeutete den spezifischen Beleg der MPO-Aktivität (Harrison and Schultz 1976).

Eine mögliche Mitbeteiligung der MPO konnte darüber hinaus in der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns herausgearbeitet werden: In einem Angiotensin-II-Mausmodell führte ein genetischer MPO Knockout zu einer signifikant reduzierten Anfälligkeit für Vorhofflimmern unter elektrischer Stimulation; unter einer kontinuierlichen MPO-Infusion mittels osmotischer Minipumpe in den MPO-KO Tieren war dieser Unterschied zwischen den Genotypen nicht mehr beobachtbar (Rudolph et al. 2010).

Von zukünftig potenziell großer Bedeutung erscheinen neue Studien, die einen Zusammenhang zwischen dem MPO-Plasmaspiegel und der Schwere des klinischen Verlaufs verschiedener Erkrankungen aufzeigen konnten. So konnte ein signifikanter Zusammenhang eines erhöhten MPO-Plasmaspiegels und einem vermehrten Auftreten eines akuten Koronarsyndrom bei Patienten mit initial stabiler koronarer Herzkrankheit gezeigt werden (Tang et al. 2011).



Die Bestimmung von MPO-Plasmaspiegeln bei Patienten mit neu aufgetretenem Brustschmerz erlaubte, in Kombination mit den etablierten diagnostischen Maßnahmen, eine deutliche Anhebung der Sensitivität der Diagnostik in Bezug auf schwere kardiovaskuläre Syndrome in den der initialen Untersuchung folgenden 6 Monaten (Nicholls et al. 2011).

Auf der anderen Seite konnten weitere Studien mit der MPO auch mögliche protektive Eigenschaften aufzeigen: Eine Arbeit von 2001 konnte den destruktiven Einfluss der MPO auf die Gefäßwand nicht bestätigen und verzeichnete sogar ein 50% erhöhtes Ausmaß an Gefäßschädigung in MPO-defizienten Mäusen unter einer Cholesteroll-Lipid-Diät.

Des Weiteren konnte die gleiche Arbeit eine vermehrte Präsenz der MPO in den arteriosklerotischen Läsionen nicht bestätigen. Die Autoren spekulierten daher u.a. über eine mögliche oxidative Inaktivierung proinflammatorischer Stoffe durch das MPO-System (Brennan et al. 2001).

Zu ähnlichen Überlegungen führte eine andere Arbeit, die auch dem durch MPO generierte HOCl eine Reaktionsbereitschaft mit verschiedenen Mitspielern inflammatorischer Prozesse nachweisen konnte und in diesem Zusammenhang einen „negative feedback loop“ durch die HOCl-Generierung postulierte (King et al. 1997).

Die Auswirkungen der MPO auf Gefäßebene führte zu der Frage nach systemischen Effekten: Da entzündliche Veränderungen des Gefäßsystems auf langfristiger Basis die Elastizität und Anpassungsbereitschaft besonders des arteriellen Systems beeinflussen können, speulierte man 2010 erstmals auch über hypertensive Effekte der MPO (Van der Zwan et al. 2010a). Die Studie konnte zwar auf Grund zu kleiner Fallzahl und fehlender Randomisierung keine definitiven Kausalitäten aufdecken, zeigte aber erstmals die mögliche Assoziation zwischen MPO und Bluthochdruck auf. Die selben Autoren zeigten wenig später in einem „Letter to the Editor“ die Möglichkeit auf, dass der beobachtete Blutdruckabfall einer anderen Arbeitsgruppe nach Melatoninsubstitution möglicherweise auch mit der MPO-inhibitorischen Eigenschaft des Melatonins in Zusammenhang stehen könnte (van der Zwan et al. 2010b).

Zusätzlich zu der rein entzündlichen Schädigung der Gefäßwände als Ursache einer arteriellen Hypertonie hinaus wird auch die verminderte Bioverfügbarkeit von endotheliale Stickstoffmonoxid, einem potenten Vasodilatator, durch MPO diskutiert. Diese hätte einen erhöhten Gefäßmuskeltonus zu Folge und würde somit über eine Erhöhung des peripheren Widerstandes zu einer hypertonen Druckentwicklung beitragen (Eiserich et al. 2002). Dieser Hypothese entsprechend konnte sowohl in Mausmodellen als auch in vitro der katalytischer Abbau von Stickstoffmonoxid durch MPO und seine Reaktionsprodukte nachgewiesen werden (Eiserich et al. 2002).

Zudem konnte eine weitere Studie kausale Zusammenhänge zwischen verschiedenen MPO Genotypen und Prävalenzen arterieller Hypertonie nachweisen (Liu et al. 2013).

Neben den beschriebenen, zahlreichen indirekten Hinweisen fehlt bisher jedoch der direkte Nachweis eines Zusammenhangs zwischen MPO und arterieller Hypertonie.

## **1.4. Myeloperoxidase und T-Lymphozyten**

Als weitere mögliche systemische Wirkung der MPO konnte Marcinkiewicz 1991 erstmals die in vitro Stimulierung der IL-2 Sekretion von T-Lymphozyten und Makrophagen durch die Anwesenheit von Chloraminen, einem Endprodukt von MPO-Reaktionen, darstellen (Marcinkiewicz et al. 1991).

In einer Blutuntersuchung von Patienten mit systemischen Vaskulitiden, einer u.a. T-Lymphozyten vermittelten Erkrankungsgruppe, konnte in vitro eine vermehrte Proliferation von T-Lymphozyten durch MPO aufgezeigt werden (Griffith et al. 1996).

Eine direkte Stimulation von T-Lymphozyten durch Tucaresol, einem synthetischen Generikum eines Reaktionsprodukts von HOCl, konnte ebenso gezeigt werden wie eine Aktivierung von T-Lymphozyten durch oxidierte LDL-Partikel. Da die Oxidierung von LDL-Partikel, ein durch HOCl und andere MPO-Reaktionsprodukte beschriebener Reaktionsweg ist, wäre somit eine indirekte Stimulation von T-Lymphozyten durch die MPO möglich (Alderman et al. 2002; Rhodes 2002).

Zusammenfassend ist eine Interaktion zwischen der MPO und T-Lymphozyten als wahrscheinlich zu erachten. Eine sich hieraus ergebende Bedeutung für die Pathogenese der arteriellen Hypertonie ist bisher jedoch nicht verfolgt worden.

In dieser Arbeit soll daher untersucht werden, ob die MPO und T-Lymphozyten miteinander in Interaktion stehen und auf diese Weise jeder für sich oder in Interaktion miteinander Einfluss auf die Blutdruckregulation unter physiologischen Bedingungen nehmen. Im weiteren Verlauf soll gezeigt werden, ob die MPO und T-Lymphozyten einen Einfluss auf die Entstehung der Angiotensin-II vermittelten Hypertonie haben.

Ein vorstellbares Szenario ist z.B. eine Aktivierung Neutrophiler Granulozyten durch die AT-II-Stimulation, die eine vermehrte Sekretion von MPO zur Folge hat (Ji et al. 2008). Der erhöhte MPO-Plasmaspiegel kann über MPO-Reaktionsprodukte wie u.a. HOCl zu einer Stimulation von T-Lymphozyten führen (s.o.), die mittels einer systemischen Entzündungsreaktion z.B. in den arteriellen Gefäßwänden eine verstärkte hypertensive Reaktion verursachen können.

Diese kann einerseits durch von T-Lymphozyten sezernierte inflammatorisch-wirksame Zytokine und andererseits durch die zusätzlich durch T-Lymphozyten begünstigte Einwanderung weiterer Entzündungszellen in die Gefäßwände vollzogen werden (Madhur et al. 2010).

Zusätzlich wirkt AT-II auch auf AT-1-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten. Die durch die Bindung gesteigerte Zellproliferation (Nataraj et al. 1999) sowie vermehrte Einwanderung (Silva-Filho et al. 2011) der T-Lymphozyten in die Gefäßwände könnte eine zusätzliche Verstärkung der inflammatorischen Reaktion innerhalb der Gefäße und damit der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie bedingen.

## **2. Zielsetzung der Dissertation**

In der Hoffnung auf neue, kausale Therapieoptionen der arteriellen Hypertonie ist das Interesse an Auswirkungen immunologischer Prozesse auf die Blutdruckregulation stark gewachsen.

Die vorliegende Studie fokussiert sich auf potenziell daran beteiligte Komponenten des Immunsystems: die Myeloperoxidase, ein vorläufig in neutrophilen Granulozyten vorkommendes Enzym, und die T-Lymphozyten, zentraler Bestandteil der zellulären Immunabwehr.

Es wird die Frage verfolgt, inwieweit der Blutdruck unter Ruhebedingungen sowie die Entwicklung einer AT-II vermittelten Hypertonie durch die T-Lymphozyten und die MPO beeinflusst werden.

Die MPO soll als möglicher Interaktionspartner der T-Lymphozyten untersucht werden. Diese könnte über ihre oxidativen Stoffwechselprodukte Teil des jüngst publizierten Einflusses von T-Lymphozyten auf die AT-II-vermittelte Hypertension in Mäusen sein.

Zu diesem Zweck werden 4 Mauslinien auf der Basis eines gemeinsamen Rag-Knockout Hintergrundes verglichen. Dieser führt in den entsprechenden Tieren zu einem Fehlen funktioneller T- und B-Lymphozyten.

Rag-Knockout Mäuse werden weitergehend mit einer MPO-Knockout Linie verkreuzt. Die daraus resultierenden Genotypen werden dann teilweise einem T-Lymphozyten-Transfer aus gesunden Spendertieren unterzogen, so dass sich insgesamt 4 Versuchsgruppen ergeben (s. Tabelle 15).

	Rag Knockout	T-Lymphozyten Transfer
MPO Wildtyp	<b>MPO<sup>+</sup> T<sup>-</sup></b>	<b>MPO<sup>+</sup> T<sup>+</sup></b>
MPO Knockout	<b>MPO<sup>-</sup> T<sup>-</sup></b>	<b>MPO<sup>-</sup> T<sup>+</sup></b>

Tab.1: Zusammensetzung der 4 Versuchsgruppen. Die T-Lymphozyten transfundierten Mäuse (=T+) haben ebenfalls einen Rag Knockout-Genotyp.

Auf diese Weise können die Effekte der MPO-Defizienz, der B-/T-Lymphozyten-Defizienz als auch mögliche Interaktionen zwischen T-Lymphozyten und der MPO untersucht werden.

Als zentrale Untersuchungsmethode wurden telemetrische Messungen der hämodynamischen Parameter Blutdruck und Herzfrequenz durchgeführt.

Durch die Quantifizierung hämodynamisch bedingter Endorgan-Schäden im Herz-Kreislauf-System, u.a. an Herz und Aorta, sollen weitere, möglicherweise klinisch relevante Auswirkungen der Hypertonie in Abhängigkeit vom Immunstatus geprüft werden.

Durch die Zusammenschau der Ergebnisse soll die vorliegende Arbeit zum weiteren Verständnis der in der Blutdruckregulation beteiligten Prozesse, besonders im Rahmen der arteriellen Hypertonie, beitragen und auf diese Weise Ansätze für zukünftige Therapie-Konzepte aufzeigen.

# 3. Material und Methoden

## 3.1. Material

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Analyse-Software	Dataquest Version 4.0 / A.R.T. Systems
Durchlauferhitzer für OP-Platz	Haake
Eppi Reaktionsgefäße	Eppendorf
Feinwaage	Sartorius excellence
Gas-Absorber	Fluovac / FMI GMBH + Veteranry Fluosorber / The Harvard Apparatus
Grafische Auswertungs-Software	GraphPad Prism® Version 5.0
Käfige	Typ 2 L / Tecniplast
Käfig-Filterdeckel	Reusable Filter Covers / Tecniplast
MACS-Trennsäulen	Separation Columns 25LS / MACS
MACS-Filter	Preserperation Filters / MACS
Maushaltungsschrank	Scantainer / Scanburas
Micro-Osmotic Pumps (AT-II-Gabe)	Model 1002 / Alzet (0.25 µl/h, 14 d)
Mini-Zentrifuge	Biofuge pico / Heraeus
Narkoseeinheit	Isofluran+ Vet.Med.Vapor / FMI GMBH
Neubauer-Zählkammer	Thoma
Shaker	MSI Minishaker / IKA
Spritzen	Braun
Telemetrie Empfänger	Physio Tel Receiver RPC1 / DSI
Telemetrie Sender	TA11Pa-C10 / DSI
T-Zell-Sorter	Quadro / MACS + Multi-Stand / MACS
Waage	Mettler Toledo
Werkbank	Heraeus Instruments
Zellfilter (Porengröße 40µm und 70µm)	40µm/70µm Cell Strainer / Falcon®
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R / Eppendorf

Tabelle 2. : Laborgeräte & Software

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezeichnung / Hersteller</u>
Angiotensin II	AT II human / Sigma
Concavalin A (from Jack bean)	Sigma
EDTA	GIBCO
Enrofloxacin 2,50%	Baytril / Bayer
Formaldehydlösung 4,00%	Histofix / Roti
Glukose-Lösung G5	Braun
HBSS	Hanks Salt Solution 1fach / Biochrom AG
Isofluran 100%	Forene / Abbott
Ketamin 10mg/ml	Actavis Deutschland
Natrium-Chlorid-Lösung 0,9%	Braun
Pan T-Zell-Isolations-Kit	Kit II mouse / MACS
1 x PBS	Fluka / Biochemika
RPMI	RPMI 1640 + L-Glutamine / GIBCO
Trypanblau 0,4%	Sigma
Xylazine 2,00%	Rompun / Bayer

Tabelle 3 : Reagenzien & Antikörper-Sets

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Mauslinien & Haltung

#### Etablierung der Mauslinien

Als „Knockout-Mäuse“ werden Tiere bezeichnet, die durch Deaktivierung von spezifischen Genen (=Gen Knockout) bestimmte Erbinformationen verlieren oder neu aufweisen.

Hierzu werden embryonale Stammzellen aus Mauslinien gewonnen und durch das Einbringen von DNA-Vektoren genetisch manipuliert.

Der DNA Vektor enthält eine modifizierte Form des Zielgens und ersetzt es bei der in diesem Projekt verwendeten Mauslinie mittels homologer Rekombination im Genom.

Um die erwünschte selektive Immunsuppression zu erhalten wurde im vorliegenden Fall durch die als „targeted gene disruption“ bezeichnete Technik das „Recombination activation gen-1“ (= Rag-1) ausgeschaltet (Mombaerts et al. 1992). Die entstehende als „Rag1tm1Mom“ bezeichnete Mutation führt zur Expressierung ausschließlich unreifer B- und T-Lymphozyten, die auf Grund einer Mutation im Antigen-Rezeptor nicht funktions- und überlebensfähig sind (Mombaerts et al. 1992).

Zur Selektion von erfolgreich integrierten Zellen wurde in den Vektor ein sogenannter pgK-neo Marker integriert. Er enthält eine Neomycin-Resistenz, die durch das Phosphoglycerat-Kinase-Gen des Mausgenoms aktiviert wird. Durch eine positive Selektion unter Neomycin-Therapie überleben nur Zellen, die den Vektor erfolgreich integriert haben (Wassarman and Soriano 2010).

Die zweite in diesem Projekt verwendete Mauslinie zeigt einen „Knockout“ des Enzyms Myeloperoxidase. Das Einbringen des entsprechenden Gen-Vektors in das Genom der murinen Stammzellen erfolgt nach einem ähnlichen Verfahren. An den Vektor wurde zusätzlich zur Neomycin-Resistenz die Thymidinkinase des Herpes-simplex-Virus (HSV-tk) gekoppelt. Diese wird bei korrekter Integration des Vektors zerstört und bietet auf diese Weise der abschließenden Ganciclovir-Therapie kein Angriffsziel mehr, so dass nur die entsprechend erfolgreich modifizierten Zellen überleben (Schmidt-Haupt 2011).

In beiden Fällen wurden die so selektierten Zellen in Blastocysten transferiert und einer murinen Leihmutter intrauterin implantiert. Die resultierende Maus-Chimäre, die aus injizierten Zellen und Empfänger-Zellen hervorgegangen ist, wurde danach beim Vorliegen der Mutation in den Keimzellen weiter verpaart. Um sicher zu stellen, dass die gekreuzten Mäuse sich ausschließlich im gewünschten Gen unterscheiden ist eine anschließende Rückkreuzung in den Hintergrund der Wildtyp-Mauslinie (C57BL/6J) über mindestens 10 Generationen erfolgt.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Herkunft</u>
Wildtyp	C57BL/6J Jackson Laboratory (Stock number: 000664)
MPO-Knockout	B6.129X1-Mpotm1Lus/J Jackson Laboratory (Stock number: 004265)
Rag-Knockout	B6.129S7-Rag1tm1Mom/J Jackson Laboratory (Stock number: 002216)
MPO / Rag -Verpaarung	Versuchstierhaltung UK-Eppendorf

Tab.4: verwendete Mauslinien

### Maushaltung

Die Tiere waren bei Versuchsbeginn 10-16 Wochen alt und wurden eine Woche vor Versuchsbeginn aus der Aufzucht der zentralen Versuchstierhaltung des Universitäts-Klinikums Eppendorf in die Räume des Instituts der Physiologie überführt, um eine vollständige Erholung der Mäuse von eventuellem Stress durch Transport-Belastung und Umgebungsveränderung zu garantieren.

Die Unterbringung erfolgte stets bei standardisierten Haltungsbedingungen (Kontrolle von Raumtemperatur, Lichtregime und Luftfeuchtigkeit). Futter (Pellet-Trockenfutter der Firma LasVendi ROD 16-R) und Wasser (autoklaviertes Leitungswasser) standen den Tieren stets ad libitum zur Verfügung.

Untergebracht waren die Tiere in Typ 2 long-Käfigen (Firma Tecniplast), die mit Filterdeckeln (Reusable Filter Covers, Firma Tecniplast), Einstreu (Weichholzgranulat) und „cage enrichment“ (Zellstoffblättern und Kunststoffhaus) ausgestattet waren.

Um einen aussagekräftigen und störungsfreien Versuchsablauf über die Dauer des Experiments zu gewähren, erfuhren alle verwendeten Tiere eine ihrem defizitären Immunstatus entsprechende Haltung. Die Käfige wurden mit Filterdeckel in einer „Ventilated Cabinet“ (Scantainer) untergebracht, die durch Filterung der den Scantainer durchströmenden Luft den Schutz der Tiere vor Kontamination und Infektion bietet. Jegliche an den Mäusen vollzogene Eingriffe (Operationen, Käfigwechsel, Wiegen, etc.) wurde unter einer Produktschutz-Werkbank (Firma Hereus Instruments) durchgeführt. Die genutzten Geräte und das OP-Besteck wurden vor Gebrauch desinfiziert beziehungsweise autoklaviert, ebenso wie Käfige, Futter und Wasser der Mäuse.

Die beschriebenen Maßnahmen führten dazu, dass es bei keinem der Versuchstiere zu einer erkennbaren Beeinträchtigung durch Infektionen kam.



Sämtliche Versuchstiere zeigten durchgehend normales Ess- und Trinkverhalten, einen regelrechten Tag-Nacht-Rhythmus sowie eine unauffällige Agilität.

Um eine möglichst stressfreie Umgebung zu schaffen, erfolgten die Messungen bis zur AT-II-Gabe an den Wochenenden (48h: Freitag 19:00 Uhr – Sonntag 19:00 Uhr). Für den anschließenden, durchgängigen, 14-tägigen AT-II-Messzeitraum wurden Störungen der Tiere auf ein Minimum reduziert.

Täglich erfolgte eine Mausvisite zur Kontrolle des Gesundheitsstatus der Tiere. Dabei wurden zusätzlich zu den gemessenen Kreislaufparametern augenscheinliche Aspekte wie Atmungsfrequenz, Fell- und Ernährungszustand sowie Mobilität und Verhalten beurteilt. Darüber hinaus wurden alle Versuchstiere wöchentlich unter sterilen Bedingungen gewogen und die Ergebnisse protokolliert. Alle dargestellten Körpergewichte sind Nettogewichte, d.h. das Gewicht des Telemetriesenders (1,4g) und der osmotischen Pumpe (0,2g) wurden ggf. vom Bruttokörpergewicht subtrahiert.

Lediglich zwei Tiere erfuhren einen vorzeitigen Versuchs-Abbruch durch Funktionsausfall der Telemetriesender. Eine Dysfunktion der Telemetriesender führte zudem zum Ausschluss weniger Blutdruckdaten aus der Auswertung (s.Tabelle 3.6.).

### Genehmigung

Die Genehmigung für Haltung und Interventionen erfolgte gemäß §8 Tierschutzgesetz durch die Hamburger Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz am 16.03.2011 für eine Dauer von 3 Jahren. Genehmigungsnummer: 14/11

Verantwortlicher Leiter des Tierversuchs ist Prof. Dr. med. Heimo Ehmke (Direktor des Institutes für zelluläre und integrative Physiologie, Universitätsklinikum Eppendorf).

Stellvertretende Leiterin und exekutive Wissenschaftlerin ist Dr. med. Anika Seniuk (Wissenschaftlerin im Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, Universitätsklinikum Eppendorf).

Für mich lag eine Genehmigung von oben genannter Behörde für Pflege und Versorgung der Tiere, sowie Organentnahmen an den toten Tieren vor.

### 3.2.2. Versuchs-Ablauf und Endpunkte

Es wurden 4 primären Versuchsgruppen gebildet, die alle einen Rag-Knockout als genetische Grundlage hatten:

<b>Rag-Genotyp</b>	<b>MPO-Genotyp</b>	<b>T-Lymphozyten</b>	<b>n</b>
Rag-Knockout	MPO-Knockout: MPO <sup>-</sup>	Sham-Gruppe: T <sup>-</sup>	6
Rag-Knockout	MPO-Wildtyp: MPO <sup>+</sup>	Sham-Gruppe: T <sup>-</sup>	7
Rag-Knockout	MPO-Knockout; MPO <sup>-</sup>	Transfer erfolgt: T <sup>+</sup>	6
Rag-Knockout	MPO-Wildtyp: MPO <sup>+</sup>	Transfer erfolgt: T <sup>+</sup>	6

Tabelle 5 : untersuchte Versuchsgruppen

Sämtliche Versuchstiere durchliefen das gleiche Schema:

1. Initiale Genotypisierung unmittelbar nach Geburt
2. Genotypisierung nach Versuchseinschluss zur Verifizierung
3. Telemetriesender-Implantation
4. mindestens 10-tägige Rekonvaleszenz- und Habituations-Zeit
5. 48h Telemetrie-Basismessungen „prä-Transfer“, gefolgt von 4 weiteren 48h Basismessungen „post-Transfer“ nach T-Lymphozyten bzw. Sham-Transfer
6. Implantation der AT-II-Pumpen
7. durchgängige, 14tägige Telemetrie-Messung unter AT-II-Infusion
8. Organentnahme und erneute Genotypisierung

Um eine Vergleichsmöglichkeit mit AT-II unbehandelten Tieren bei Analyse der Endorganschädigung zu erhalten, wurden zusätzlich Gruppen analog mit T-Lymphozyten/Sham-Injektion behandelt und ihnen im Anschluss mit 0,9% Kochsalz-Lösung gefüllte osmotische Pumpen implantiert (s.4.6.). Telemetrische Messungen erfolgten in diesen Gruppen nicht.

### 3.2.3. Genotypisierung

Die Genotypisierung dient dem gezielten Nachweis genetischer Veränderungen. Die in dieser Dissertation hierzu verwendete Methode ist die Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain Reaction; PCR) mit anschließender Agarosegelelektrophorese.

Im Rahmen einer PCR werden durch die multiple Amplifikation (35 Zyklen) einer hochspezifischen DNA-Sequenz vielfache Kopien dieses DNA-Abschnitts erstellt und somit der Genotyp qualitativ bestimmbar.

Zunächst wird hierzu den Tieren eine Schwanz- oder Ohrbiopsie entnommen. Anschließend wird die Probe in einem Thermomixer durch eine Lyse-Lösung (DirectPCR Lysis Reagent Tail, Firma: Viagen Biotech) erst bei 65° für 2 Stunden und dann bei 95° für 10 Minuten verdaut. 2 ml des so gewonnenen Gewebelysats werden anschließend mit 20µL des folgendem Standardansatzes versetzt:

Substrat	Volumen
PCR Puffer (Firma: Invitrogen)	20µL
Dinukleotidtriphosphate (Firma: Invitrogen)	4µL
Primer für Rag- / MPO-Gen (Firma: Eurofins MWG Operon)	Je 4µL
Taq-Polymerase (Firma: Invitrogen)	2µL
Magnesiumchlorid (Firma: Invitrogen)	6µL
Wasser (autoklaviert)	136µL

Tabelle 6: Eingesetzter Standardansatz für 10 Proben

Zusätzlich zum Probenlysat wurde bei jeder PCR eine Negativ-Kontrolle (Standardansatz ohne Probe) und eine Positiv-Kontrolle (DNA-Probe einer Wildtypmaus) eingesetzt um methodische Fehler detektieren zu können.

Durchgeführt wurde die PCR in einem Thermo Cycler der Firma GeneAmp und bestand aus einem sich wiederholenden Zyklus von drei Schritten. Zunächst wird die Probe für 30 Minuten auf 93°C erhitzt. Ziel der Temperatursteigerung ist die Denaturierung und damit die Öffnung der DNA-Doppelstränge für die Polymerasen. Die anschließende 30 minütige Abkühlung des Substrats auf 58°C ermöglicht den Primern die Bindung an die DNA und wird als Hybridisierung bezeichnet.

Durch die Bindung der Primer beginnen nun die Polymerasen weitere Nukleotide an die beiden entstehenden, ihrer DNA-Vorlage jeweils komplementären DNA-Stränge zu hängen.

Eine nochmalige 45-minütige Erhöhung der Temperatur auf 72°C stellt die für die Polymerasen optimale Arbeitsbedingung her.

Die ständige Wiederholung dieser drei Schritte führt zu einer exponentiell zunehmenden Amplifikation der durch die beiden Primer definierten DNA-Sequenz, so dass nach insgesamt 35 Zyklen aus einem einzigen DNA-Doppelstrang weit mehr als eine Million identischer DNA-Moleküle entstehen. Die Proben werden im Anschluss zur Vorbereitung für die Gelelektrophorese auf 4°C gekühlt (Müller 2001).

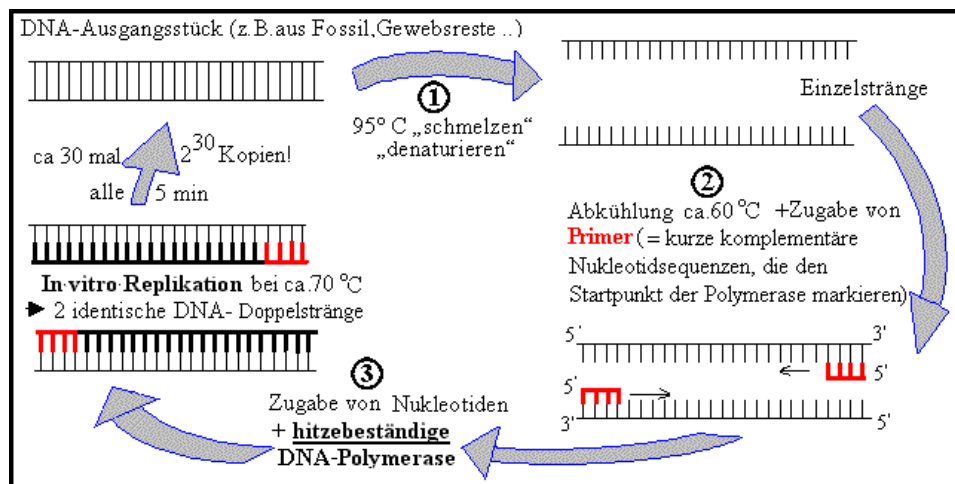


Abbildung 2 : schematische Darstellung des 3-schrittigen Zyklus einer PCR (Scheffel 2014)

Für die abschließende Agarosegelelektrophorese wird 1,2%ige Agarose mit TBE-Puffer und 6µl/100ml Ethidiumbromid in horizontale Trennkammern gegossen. Die DNA-Fragmente werden in die so geschaffenen Gel-Taschen gegeben und unter eine Spannung von 110V über 45min gesetzt (Spannungsquelle: EPS 600, Firma Pharmacia). Aufnahmen der Gele mittels Kamera unter UV-Licht (Wellenlänge 254nm) dienen der Ergebnisdokumentation.

### 3.2.4. Implantation der Telemetriesender

Für die in diesem Projekt verwendeten immundefizienten Tiere fand die gesamte OP unter einer Produktschutz-Werkbank in einem sterilen Arbeitsumfeld statt. Die Mäuse waren über die gesamte Dauer des Eingriffs auf einer 37°C-Wärmeplatte gelagert.

Implantiert wurde der TA11Pa-C10 - Sendertyp von DSI mit einem Gewicht von 1,4 g und einem Volumen von 1,1 ccm.

Zur Festlegung des Nullwertes wurden am Tag vor der OP Messungen der Sender in isotoner NaCl-Lösung in ihren sterilen Verpackungen durchgeführt. Sender mit Abweichungen vom Nullwert von mehr als 4mmHg wurden verworfen.

Grundsätzlich werden die Mäuse gewichtsadaptiert zunächst mit einer Ketamin / Xylazin - Injektion i.p. narkotisiert (Dosierung: 0,12mg Ketamin und 0,0016mg Xylazin/g Körpergewicht (Bodyweight: BW); entspricht: 0,01ml/g BW des folgenden Ansatz: 12mg Ketamin© + 0,16 mg Rompun© ad 1 ml NaCl).

Zudem erhalten die Tiere Enrofloxacin (Baytril©, 5mg/kg BW ad 1ml NaCl s.c.) zur perioperativen antibiotischen Abdeckung und eine Schmerzprophylaxe mit Carprofen (Rimadyl©, 5 mg/kg BW s.c.).

Die narkotisierten, spontan atmenden Mäuse werden in Rückenlage auf eine Korkunterlage fixiert und der Halsbereich durch die Unterlage einer Wundkomresse zur besseren Darstellung des OP-Feldes leicht überstreckt.

Nun werden die Tiere frontal im Bereich des Halses rasiert und die enthaarte Fläche mit Jod-Lösung (Betasisodona©) desinfiziert.

Vor dem Hautschnitt wird eine ausreichende Narkosetiefe durch das Fehlen des Zwischenzehreflexes überprüft.

Nach ca. 1cm langer Inzision im desinfizierten Bereich und Präparation des subkutanen Gewebes wird mittels einer stumpfen Schere eine subkutane Tasche in die linke Flanke zur späteren Sender-Platzierung präpariert.

Anschließend wird die linke Arteria carotis communis durch Präparation bis zur Bifurkation in die Arteria carotis externa und interna dargestellt und auf Höhe der Bifurkation durch einen Knoten unwiderruflich verschlossen. Eine intermittierende Zügelung weiter proximal dient der Unterbindung der lokalen Blutzufuhr während des Eingriffs.

Nun wird entlang einer Kanüle als Führungshilfe der Katheter des Senders ca. 1,2cm ab Bifurkation in den abgebundenen Bereich der Arterie nach proximal eingeführt und unter Lösen der Zügelung mit der Spitze bis in die Aorta vorgeschoben.

Die korrekte Lage sowie die Funktionsfähigkeit des Senders wird durch eine kurze Messung noch am narkotisierten Tier verifiziert.

Nach Befestigung des Katheters durch mehrere Ligaturen und anschließende zusätzliche Fixierung der Knoten mit Histoacrylgewebekleber (Fa. Braun) wird die Sendeeinheit in die zuvor vorbereitete subkutane Tasche in der linken Flanke platziert.

Der Hautschnitt wird mit Einzelknopfnähten im Abstand von 1-2mm (Mersilene 5-0, Ethicon©) verschlossen und die Naht mit Jod desinfiziert. Bis zum vollständigen Abklingen der Narkose werden die Käfige der Tiere halbseitig auf Wärmeplatten platziert, um den Mäusen eine ständige, aber freiwillige externe Wärmezufuhr zu ermöglichen. Zusätzlich zu der normalen Futter- und Wasserversorgung werden den Tieren in den ersten 24h postoperativ kleine Schalen mit 5%-Glukose Lösung sowie in der Glukoselösung eingeweichte Futter-Pellets angeboten.

Die Erholungsphase beträgt bei allen Tieren etwa 2-4 Tage. Vereinzelt neigen die Tiere in den ersten Tagen dazu, sich die Fäden der Naht aufzubeißen, so dass diese Defekte unter Isofluran-Narkose übernäht werden müssen. Nach erfolgter Wundheilung zeigen aber auch diese Mäuse eine vollständige Toleranz gegenüber den implantierten Messendern.

	operierte Tiere gesamt	Falscher Genotyp in Kontrolle	Sender im Verlauf defekt	In Auswertung eingegangen
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	11	1	4	6
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	13	2	4	7
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	6	0	0	6
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	6	0	0	6

Tabelle 7: Erfolg der durchgeführten Telemetrie-Operationen in den vier Versuchsgruppen

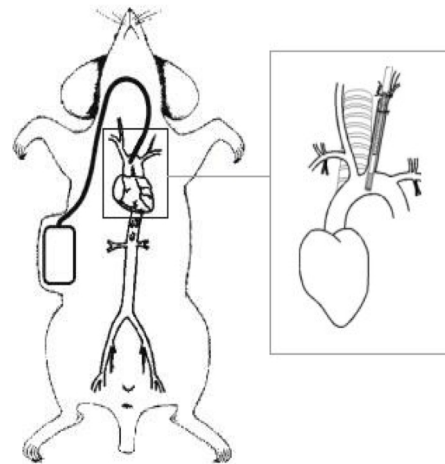
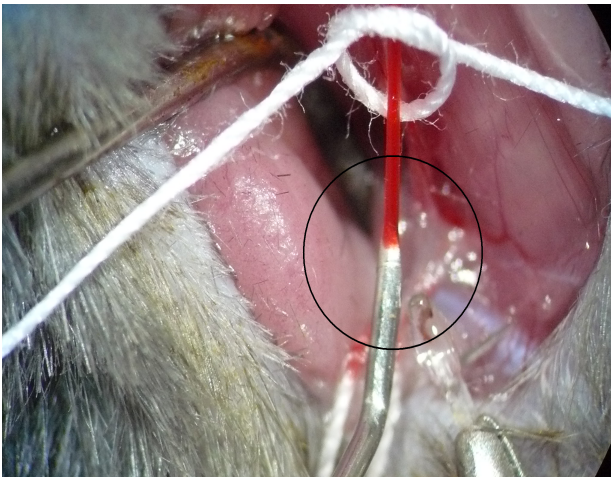


Abbildung 3 (links) : Punktion der Arteria carotis; im schwarzen Kreis ist die Spitze des einzuführenden Katheters erkennbar (eigene Abbildung)

Abbildung 4 (rechts) : Schemenhafte Zeichnung der Lage und Positionierung des eingebrachten Telemetrie-Senders (Huetteman 2009)

### 3.2.5. Telemetrische Messung

Ein- und Ausschalten der Sender ist mit Hilfe eines Magneten durch die Käfigwand hindurch möglich, so dass die Tiere davon unbeeinflusst bleiben.

Der eingeschaltete Sender übermittelt die in Echtzeit gewonnenen Daten an die unter dem Käfig positionierte Receiver-Platte, über die eine Weiterleitung an den Computer erfolgt. Die aufgezeichneten Parameter können durch eine Analyse-Software (Dataquest A.R.T. System Version 4.0) ausgewertet werden.

Die Basismessungen beginnen jeweils am Freitag um 19:00 Uhr und erfolgen über einem 48h-Zeitraum, während die Messungen unter AT-II durchgehend für den Zeitraum der 14-tägigen AT-II-Gabe erfolgten. In beiden Fällen werden die Werte jeweils alle 5 Minuten kontinuierlich für einen Zeitraum von 60 Sekunden ermittelt (s. Abbildung 6).

Es wurden die Parameter Aktivität, Herzfrequenz, mittlerer arterieller Blutdruck, systolischer und diastolischer Blutdruck ausgewertet.

Die Herzfrequenz wird indirekt über das „Peak-to-Peak“ Intervall des Kurvenverlaufs des Blutdrucks berechnet.

Als Messgröße der Aktivität wird die von der Empfänger-Platte gemessene Signalstärke genutzt und die Anzahl der registrierten Änderungen der Signalstärke innerhalb eines Messzeitraums als Aktivitäts-Maß ausgewertet.

Die so ermittelten Aktivitäts-Werte sind abhängig von Distanz und Geschwindigkeit der Bewegung und können daher nur als relative Messung interpretiert werden, lassen also z.B. keinen direkten Schluss auf die zurückgelegte Strecke der Tiere zu.

Systolischer und diastolischer Blutdruck werden über den Verlauf der Steigung der Blutdruckkurve errechnet, indem der maximale bzw. minimale Wert vor einer endgültigen Vorzeichen-Umkehr der Steigung als systolischer bzw. diastolischer Wert dieses Herzzyklus gewertet wird.

Der mittlere arterielle Blutdruck wird durch die Integral Berechnung der „Peak-to-Peak“-Fläche der Blutdruckkurve mit anschließender Mittelwertbildung bestimmt.

### 3.2.6. Telemetrische Auswertung

Im Anschluss an die Messungen erfolgt die Analyse der Ursprungs-Werte durch die arithmetische Mittelung auf 5min- und 1h-Werte mittels der Analyse-Software und Excel.

Aus diesen wird ein Tag- (=07:00 Uhr – 18:00 Uhr) und ein Nachtwert (=18:00 Uhr – 07:00 Uhr) für die Verlaufsdarstellungen gebildet. Für die Basis- und Ruhemessungen werden die auf diese Weise an den Wochenenden ermittelten Werte von 2 Tagen auf einen virtuellen 24h-Tag gemittelt.

Während der AT-II-Gabe werden dagegen einzelne Tag- und Nacht-Werte genutzt.

Darüber hinaus werden stündliche, auf einen virtuellen Tag gemittelte Werte für die zirkadianen Darstellungen genutzt.

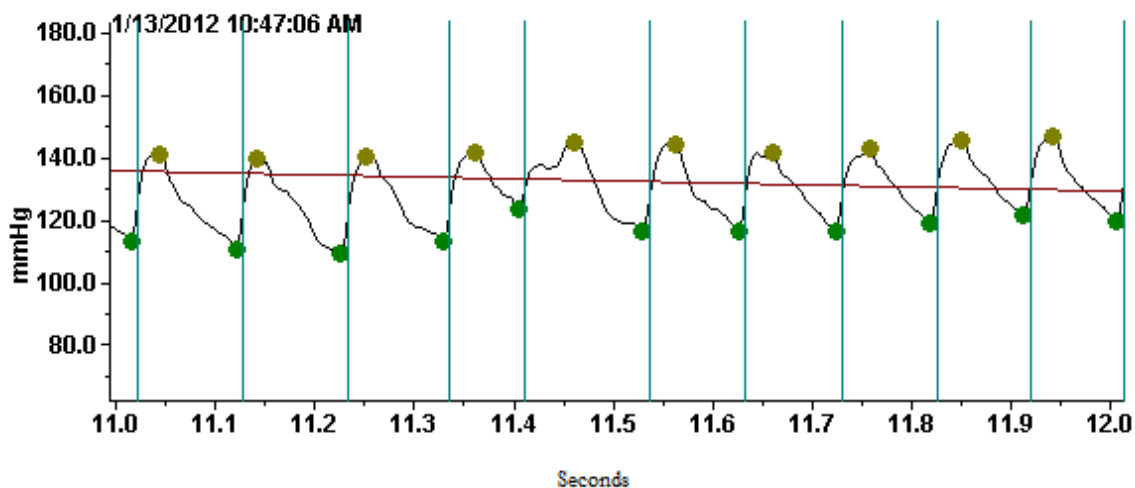


Abbildung 5: Exemplarischer Ausschnitt aus einer Messung. Rot: MAP; Gelb: Systole; Grün: Diastole (1 Sekunde)



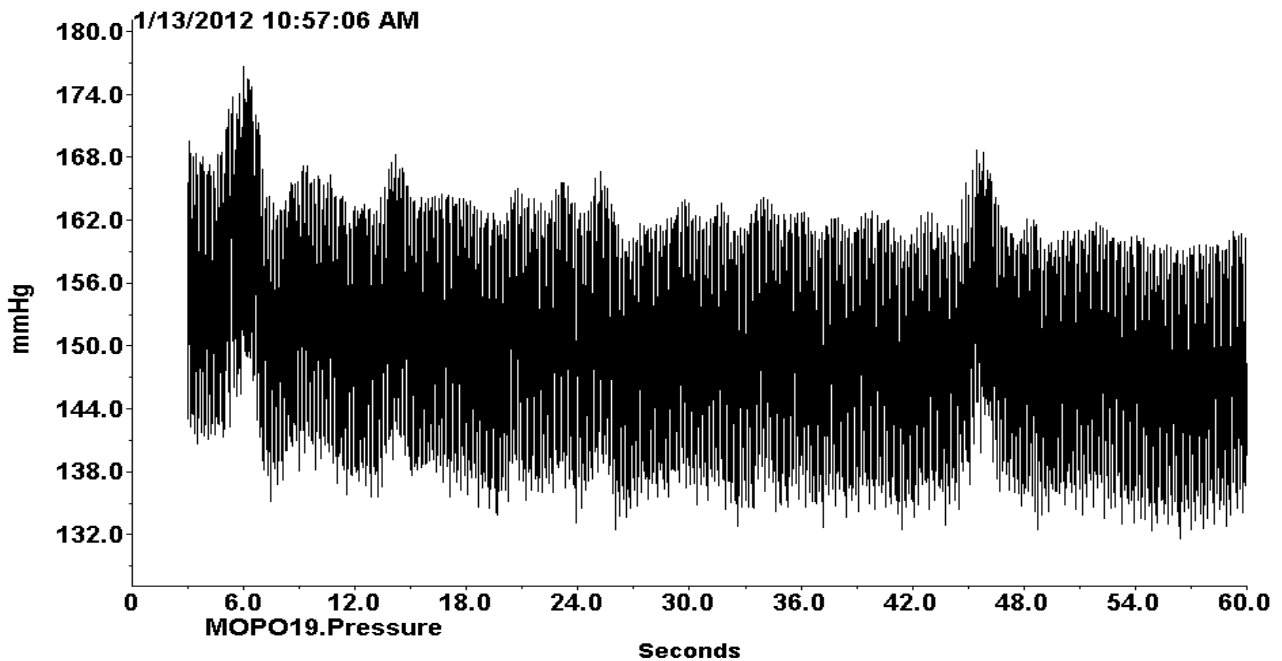


Abbildung 6: exemplarischer Ausschnitt aus einer Messung (1 Minute)

### 3.2.7. T-Lymphozyten Separation

Zur Gewinnung von Spender-T-Lymphozyten werden Wildtyp-Spendermäuse (C57Bl/6J) durch zervikale Dislokation unter tiefer Isofluran-Anästhesie getötet.

Das Abdomen wird eröffnet, die Milz unter Trennung vom umliegenden Gewebe entnommen und in eisgekühltes HBSS überführt.

Alle weiteren Schritte erfolgen unter möglichst sterilen Bedingungen. Die Milz wird durch einen 70 µm Zellfilter mit einem Spritzen-Stempel manuell zerkleinert. Die Suspension wird in 15ml HBSS aufgenommen, bei 300g und 4°C für 10min zentrifugiert und das so gewonnene Zellpellet in 1,5ml Erythrozyten-Lysis Puffer (s.Tabelle 10) resuspendiert. Nach 5min Inkubation erfolgt der Stopp des Lyse-Prozesses durch die Hinzugabe von 20ml HBSS, gefolgt von einer dreifachen Aufreinigung der Suspension durch jeweilige Zentrifugation mit anschließender Resuspension in MACS Puffer. Abschließend filtert man durch einen 40 µm Zellfilter.

Zur Bestimmung von Zellzahl und Anteil lebender Zellen werden 10 µl der Zell-Suspension mittels Trypanblau gefärbt und anschließend mit Hilfe einer Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop ausgewertet.

Die für den Transfer benötigten T-Lymphozyten werden durch weitere Aufreinigung und anschließende T-Zell-Anreicherung unter Verwendung des MACS-Systems aus der Milz-Zell-Suspension gewonnen:

Das „Magnetic-activated cell sorting“ ermöglicht die Gewinnung einer spezifischen Zellpopulation aus einer zuvor immuno-magnetisch behandelten Zellsuspension.

Grundlage des Verfahrens ist die Markierung von Zellen mit monoklonalen Antikörpern und die anschließende Kopplung der gebundenen Antikörper an Eisenoxid-Partikel, sogenannte „Microbeads“.

Das Reaktionsgemisch wird über eine Trennsäule pipetiert, deren Filter magnetisiert wurde. Durch die Anziehungskraft des so erzeugten Magnetfeldes verbleiben die immuno-magnetisch behafteten Zellen im Filter. Die nicht markierten Zellen passieren dagegen die Säule und werden auf diese Weise von den markierten Zellen getrennt.

Um eine potentielle Aktivierung der Zielzellen durch die Bindung von Antikörpern zu vermeiden, wird im Falle der T-Lymphozyten-Selektion das Verfahren der sogenannten negativen Selektion bevorzugt: Hierbei werden T-Lymphozyten als einzige Zellart nicht markiert und können so unbeschadet die Säule passieren. Alle anderen Zellen der Milz-Zell-Suspension verbleiben in der MACS-Säule.

#### Durchführung:

Alle Arbeitsschritte bis zur Auftragung der Suspension auf die Trennsäule werden auf Eis bei etwa 4°C vorgenommen:

Der angesetzte MACS-Puffer (s.Tabelle 9) wird mittels einer Unterdruck-Filtration (Druckfilter Sartolab® P20) unter einer Produktschutz-Werkbank sterilisiert.

Zunächst erfolgt mittels Zentrifugation und anschließender Resuspension die Überführung der gewonnenen Zelllösung in MACS-Puffer. Anschließend werden die Zellzahl bestimmt, die Antikörper in Form des Isolation Kit und, nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten, die MicroBeads beigefügt.

Nach abermaliger, 15-minütiger Inkubation werden ungebundene Antikörper und MicroBeads durch eine Zentrifugation entfernt. Das resuspendierte Pellet wird auf die vorgespülte magnetische Trennsäule mit aufgesetztem Preseparation-Filter pipetiert. Das abschließende Spülen mit MACS-Puffer garantiert eine hohe Anreicherung von T-Lymphozyten in der den Filter durchlaufenden Lösung.

Verwendete Sets	Dosierung
Pan-T-Cell Isolation Kit II (Firma MACS Art.Nr.: #130-095-130)	10µl pro 10 <sup>7</sup> Zellen
Anti-Biotin MicroBeads (Firma MACS Art.Nr.: #130-090-485)	20µl pro 10 <sup>7</sup> Zellen

Tabelle 8: Antikörper-Sets

99,6% 1xPBS (Firma Fluka)
0,4% EDTA 0,5M (Firma Gibco)
5 g/l BSA (Firma Sigma-Aldrich)

Tab.9: Zusammensetzung des MACS-Puffer

82,9 g/l NH <sub>4</sub> Cl (Firma Sigma Aldrich)
10 g/l KHCO <sub>3</sub> (Firma Merck)
0,34 g/l EDTA (Firma Gibco)
pH-Einstellung auf 7,4 mittels 1M HCl / 1M NaOH

Tabelle 10: Zusammensetzung der Erythrozyten-Lyse-Suspension

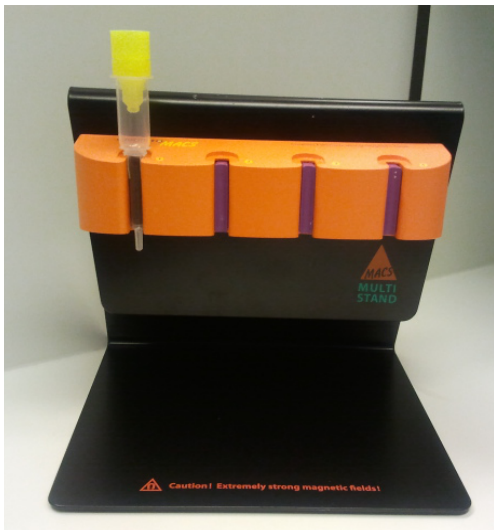


Abbildung 7: MACS-Trennsäule mit aufgesetztem Preseparation-Filter

### 3.2.8. FACS-Analyse

Die auch als Durchflusszytometrie bezeichnete FACS-Untersuchung (=Fluorescence-activated cell sorting) ist ein Verfahren zur Analyse von Zellsuspensionen. Hierbei werden die Zellen einzeln und mit hoher Geschwindigkeit von Laserstrahlen getroffen, was spezifische, von Detektoren ausgewertete optische Emissionen durch die verschiedenen Zellen hervorruft.

Ausgangspunkt des Durchflusszytometers ist die Durchflusszelle. In diese wird die Zellsuspension aus der Probe aufgenommen und in einem schmalen Flüssigkeitsfilm (=Hüllflüssigkeit, eng. „sheath fluid“) gelöst durch das Gerät geführt.

Die einzelnen Zellen werden jetzt durch eine Lichtquelle, meist Laser verschiedener Wellenlängen, beschossen.

Sammellinsen bündeln die im engen Winkel (=FSC, 1-20°) sowie im 90°-Winkel (=SSC) zur Ausrichtung des Lasers eingehende Streuung und leiten sie zu Detektoren, meist Signalverstärkenden Photomultipliern, wo sie digitalisiert werden.

Zur Auswertung des durch Fluoreszenz erzeugten Signals sind zudem ein Farbfiltersystem sowie weitere, für bestimmte Wellenlängen spezifische Detektoren nötig (Röntgen 2005).

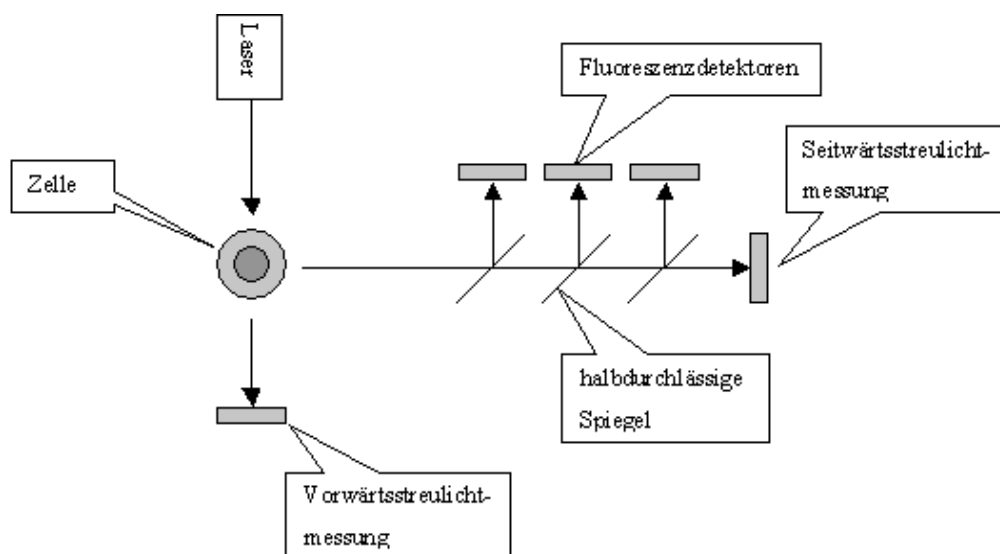


Abbildung 8: schematisches Prinzip eines Durchflusszytometers (Röntgen 2005)

Die spezifische Reflektion der Lichtstrahlen gibt Aufschluss über Eigenschaften der Zelle wie Art und Größe.

Die Streuung wird, in Bezug auf die ursprüngliche Richtung des Laserstrahls, in Vorwärtsstreuung (FSC= Forward Scatter) und Seitwärtsstreuung (SSC= Sidewards Scatter) unterteilt.

Während der FSC hauptsächlich vom Volumen der Zelle abhängt, basiert die Menge des SSC auf verschiedenen Eigenschaften wie der Granularität, der Vesikel-Anzahl und der Größe des Zellkerns. Eine Erweiterung der Durchflusszytometrie stellt der Gebrauch von Fluoreszenzfarbstoffen dar. Diese können durch eine Laserbestrahlung zur Emission von Licht angeregt werden.

Durch eine Kopplung der Farbstoffe an monoklonale Antikörper, die spezifisch an definierten Oberflächenstrukturen der Zellen binden, gelingt es, Subpopulationen ähnlicher Größe, Struktur und Oberflächeneigenschaften zu identifizieren.

Die Untersuchung wurde von uns einerseits zur Bestimmung der Reinheit der transfundierten T-Zellpopulationen zu Versuchsbeginn genutzt, andererseits sollte der Erfolg der durchgeführten T-Lymphozyten-Transfers am Versuchsende verifiziert werden.

Zu diesem Zweck wurde die Zellsuspension mit einer Lösung aus verschiedenen Antikörpern behandelt.

<u>Ziel-Rezeptor</u>	<u>genutzter Antikörper</u>	<u>Vorkommen</u>
CD 4	APC	Thymozyten, T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen
CD 19	FITC	B-Zellen
CD 3	AF700	Thymozyten, T-Lymphozyten
CD 62L	V450	naive T-Lymphozyten
CD44	Pe	aktivierte T-Lymphozyten
CD 45	PerCP	alle hämatopoetischen Zellen
Gr-1(=Ly6G)	APC	Granulozyten

Tabelle 11.: Ziel-Rezeptoren der eingesetzten Antikörper und Spezifität

#### Vorbereitung der Zellen für FACS-Analyse:

Zur Abbindung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine Behandlung mit 5µl Mäuseserum, bevor die Antikörper-Lösung hinzugegeben wird. Nach einer Inkubationszeit von 20min kann die Zellsuspension nach abschließender Zentrifugation und Resuspendierung der Durchflusszytometrie zugeführt werden.

#### Validierung T-Zell-Aufreinigung

Nach Etablierung der Aufreinigungsmethode konnte für die jeweiligen T-Lymphozyten-Transfers eine stets relativ reine T-Zell-Population in der FACS-Untersuchung bestätigt werden. Die erhobenen T-Zell-Anteile an der Gesamt-Zell-Masse lagen zwischen 74% und 98%.

Dabei sollte darauf hingewiesen werden, dass die erhobenen FACS-Messwerte gemäß unseren Erfahrungen Schwankungen unterliegen, die trotz sorgfältiger Aufreinigung und FACS-Vorbereitung die erhobenen Messwerte tendenziell verschlechtern.

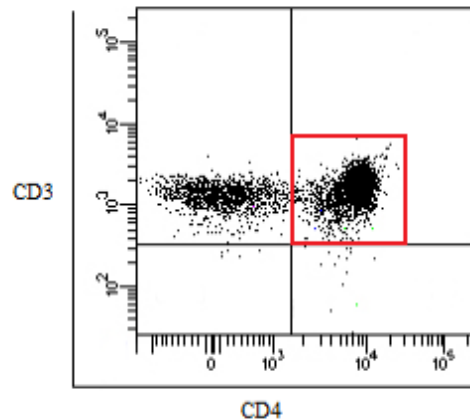


Abbildung 9: Beispielhafte T-Zell-Aufreinigung: Das eingezeichnete Raster unterteilt die Populationen in CD3 positive/negative bzw. CD4 positive/negative Zellen. Der Anteil CD3<sup>+</sup> Zellen ist in dieser Auswertung nahezu 100%. Im markierten Quadranten sind T-Lymphozyten lokalisiert (CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>), die in dieser Aufreinigung mit ca. 91% einen hohen Anteil an der CD3<sup>+</sup> - Gesamtzellmenge haben.

### 3.2.9. T-Lymphozyten-Transfer

Nach Aufreinigung der T-Lymphozyten und anschließender Reinheitskontrolle mittels FACS-Untersuchung werden die T-Lymphozyten in der Neubauer-Zählkammer quantifiziert und in einer Konzentration von 10<sup>7</sup> Zellen / 100µl gelöst in 0,9% NaCl-Lösung in eine 1ml-Spritze aufgezogen. Zur Förderung der venösen Durchblutung wird der Schwanz der Mäuse unter sterilen Bedingungen für 1-2min in ein 45° warmes Wasserbad getaucht (s.Abbildung 10).

Anschließend wird die Maus in einer speziellen Halterung (s.Abbildung 11) fixiert und die Schwanzvene mit einem kleinen, venösen Zugang (Gauge-Größe: 22 „blau“, Innendurchmesser: 0,6mm, Firma Braun) punktiert. Da es bei dieser Punktion auch bei intravasaler Lage nicht zwingend zu einem Blutrückfluss kommt, wird vor der Zell-Applikation eine Probe-Injektion von wenigen Mikroliter vorgewärmte 0,9% NaCl-Lösung durchgeführt.

Kommt es zu keinem Anschwellen durch paravasale Injektion, werden im Anschluss  $10^7$  T-Lymphozyten, gelöst in  $100\mu\text{l}$  0,9% NaCl-Lösung, appliziert und abschließend nochmals wenige Mikroliter 0,9% NaCl-Lösung nachgespült, um die im Totraum der Kanüle verbliebenen Zellen zu mobilisieren und ein Verbleiben der Zellen im Gefäßsystem zu sichern.

Die Punktionsstelle wird für wenige Sekunden manuell abgedrückt und die Tiere nach kurzer Überwachungsphase in die Käfige zurück überführt.

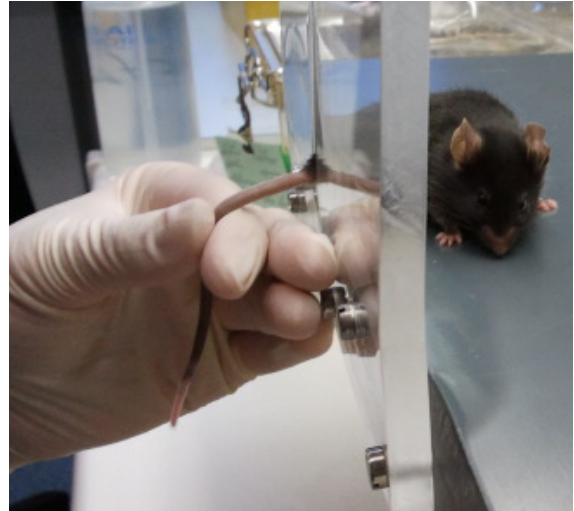
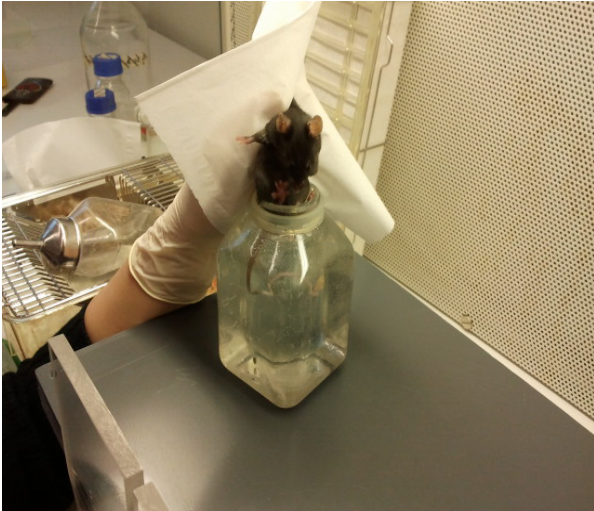


Abb.10(links): Erwärmung der Schwanz-Vene in  $45^{\circ}\text{C}$ -Wasser

Abb.11(rechts): Fixierung der Maus zur Darstellung der Vene

### 3.2.10. AT-II-Pumpen

Zur Induktion einer arteriellen Hypertonie wurde den Tieren eine kontinuierlich Angiotensin-II freisetzende osmotische Mini-Pumpe (Firma Alzet, Typ 1002) implantiert. Durch die permanente gleichmäßige Abgabe des Hormons in einer Dosierung von  $1,5\text{ ng/min/g}$  Körpergewicht erzeugen diese Pumpen einen dauerhaft erhöhten Angiotensin-II-Spiegel im Kreislaufsystem der Maus und führen so zur Entwicklung einer arteriellen Hypertonie.

#### Durchführung:

Zunächst müssen die Pumpen gewichtsadaptiert mit Angiotensin-II befüllt werden. Einfluss in die Berechnung der erforderlichen Menge nehmen dabei sowohl das Gewicht der Mäuse als auch die Pump-Geschwindigkeit der jeweiligen Charge der Minipumpen.

Hierzu wurden Durchschnittsgewichte der jeweils operierten Mausgruppen bestimmt. Die verwendeten Pumpen haben eine Abgabe-Geschwindigkeit von  $0,24$  bis  $0,25\ \mu\text{l/min}$  bei einem Füllungsvolumen von  $100\mu\text{l}$ .

Das tatsächlich in die Pumpe eingebrachte Volumen wird abschließend auf einer Feinwaage überprüft, um Luftblasen gegebenenfalls zu detektieren und eine Unterdosierung zu verhindern.

Die befüllten Pumpen werden dann unter sterilen Bedingungen in einer Produktschutz-Werkbank implantiert.

Die Maus wird zunächst einer ausreichenden Anästhesie mittels Isofluran-Luft-Gasgemisch unterzogen. Die Narkosegas-Konzentration richtet sich dabei nach regelmäßiger Kontrolle von Atemfrequenz und Schmerzreiz-Reaktion und liegt ca. zwischen 2 bis 4% Isofluran.

Im Anschluss erfolgt eine Rasur und lokale Jod-Desinfektion der Nuchal-Region, gefolgt von einem ca. 5mm langen Hautschnitt. Im so eröffneten Subkutanraum wird mittels einer stumpfen Schere eine Tasche an der rechten Seite präpariert, in die mit nach kaudal zeigender Öffnung die Pumpe platziert wird.

Anschließend wird der Hautschnitt in Einzelknopfnah vernäht und erneut mit Jod desinfiziert.

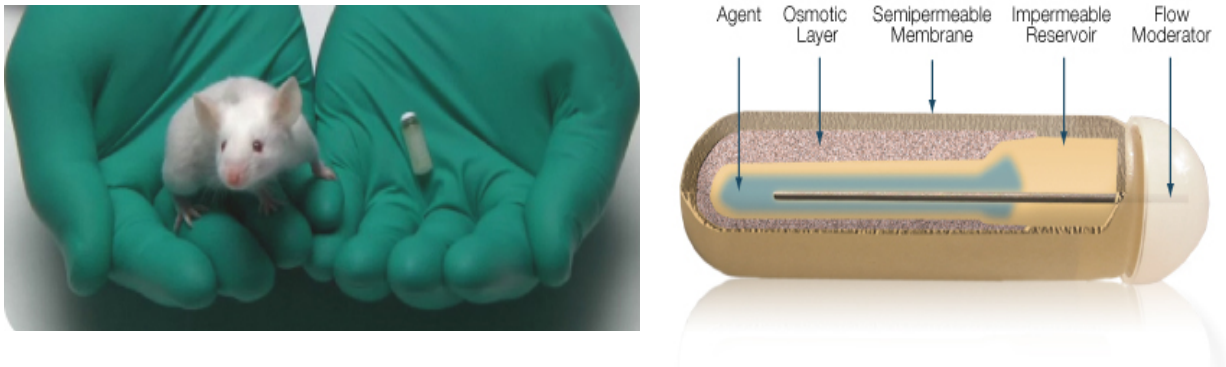


Abb.12: Maus-Infusions-Pumpe der Firma Alzet (links) und schematischer Aufbau (rechts) (Alzet© 2014)

### 3.2.11. Messung der aortalen Relaxationsfähigkeit

Eine anerkannte Methode zur Bestimmung der Relaxationsfähigkeit arterieller Gefäße ist die Myographie. Hierzu müssen die zu untersuchenden Gefäße, in diesem Projekt Aorten, zunächst unversehrt aus den Versuchstieren entnommen werden. Nach Entnahme des Herzens wird die Aorta thoracica entlang der Wirbelsäule unter Vermeidung von Zug oder mechanischem Druck freigelegt und schließlich über dem Durchtritt durch das Zwerchfell abgesetzt. Das Präparat wird dann sofort in eine gekühlte PBS-Lösung aufgenommen.

Vor der eigentlichen Untersuchung muss das Gefäß von umgebendem Binde- und Fettgewebe unter Mikroskopsicht befreit werden.



Vier Millimeter dicke Ringe des Präparats werden über Triangel-förmige Drähte auf den Kraftmesser aufgebracht und in das mit Krebs-Solution (s.Tabelle 12) gefüllte Organbad überführt. Durch Fixation auf der einen Seite und Koppelung an den Kraftmesser auf der anderen Seite liefert der Versuchsaufbau kontinuierlich Informationen über die aktuelle Kontraktionskraft des Gefäß-Rings.

Um die Bedingungen für die Dauer des Experiments (3-4 Stunden) der Situation im Körper anzugleichen, wird das Organbad von nun an kontinuierlich mit Carbogengas (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) bei einer Temperatur von 37°C begast.

Nach langsamer manueller Vorspannung der Gefäße auf einen Zielwert von 1,1 Gramm erfolgt eine zweimalige Anflutung einer 2M KCl-Lösung mit anschließender Entleerung. Der Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration führte zur Membran-Depolarisation in den Gefäßmuskelzellen. Der daraus resultierende spannungsabhängige Calcium-Einstrom führt zu einer maximalen Kontraktion der Gefäßmuskulatur und liefert auf diese Weise den Beweis der Vitalität des untersuchten Gefäßpräparates. Wenn kein Spannungsanstieg feststellbar ist, ist das Gefäß nicht vital und zu verwerfen.

Ist die Vitalität des Gefäßes erhalten, kann dessen Kontraktionsminimum und -maximum bestimmt werden. Hierzu wird im Anschluss an die KCl-Spülung das Organbad mit der Krebs-Lösung gespült und der angezeigte Kraftwert als 0% definiert.

Durch Prostaglandin-F<sub>2</sub>-alpha (Sigma Aldrich: CAS-Nr.: 38562-01-5) wird eine maximale, endothel-unabhängige Kontraktion verursacht und dieser Wert als 100% Kraftwert definiert. Durch die Bindung von PGF<sub>2</sub>alpha an den Prostaglandin-Rezeptor der Gefäßmuskulatur kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipase C mit einem daraus resultierenden Anstieg der Umwandlung von Phosphatidylinositol zu Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> führt dann über eine Öffnung von Calcium-Kanälen zu einer Kontraktion der Muskelzelle (Ansari et al. 2003; Lum Min et al. 1995).

Für jeden Aortenring wird nun im maximalen Kontraktionszustand eine Dosis-Wirkungskurve für Acetylcholin (ACh) und Nitroglyzerin (NTG) erhoben. Alle 2 Minuten wird die Konzentration von ACh bzw. NTG erhöht, bis die Relaxation ein Maximum erreicht.

Die Messungen für ACh und NTG finden nacheinander statt. Zur Sicherung einer identischen Ausgangslage wird das Organbad zwischen den beiden Messungen zweimal mit Krebs-Lösung gespült und dann erneut eine maximale Kontraktion durch Prostaglandin-F<sub>2</sub>-alpha erzeugt.

Acetylcholin stimuliert u.a. das Endothel über eine Aktivierung intrazellulärer Synthasen zu einem Anstieg der NO-Konzentration (NO).

NO, in diesem Zusammenhang auch als „Endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichnet, führt über eine Aktivierung der intrazellulären Guanylat-Zyklase zu einer Vasodilatation über die Relaxation der Gefäßmuskulatur.

Zu beachten ist, dass Acetylcholin jedoch andererseits auch eine gegensätzliche, direkt-kontraktile Wirkung auf die Gefäßmuskelzellen ausüben kann, die bei geschädigtem Endothel überwiegt (Ignarro et al. 1987; Ludmer et al. 1986).

Im zweiten Durchgang wird durch die anschließende, direkte Applikation von NTG, einem NO-Donator, die endothel-unabhängige Relaxation der Gefäße beurteilt.

Die Kontraktionskraft der Aorten-Ringe wird über die gesamte Zeit mittels der Chart 4.0 Software aufgezeichnet und nach Abschluss des Experimentes in Excel ausgewertet.

Grundsätzlich wurden von jedem Versuchstier zwei Aorten-Ringe analysiert und deren Kraftwerte abschließend gemittelt. Dies geschah zum Ausschluss von Fehlmessungen, die u.a. durch eine Verletzung der Gefäßstruktur trotz vorsichtiger Präparation auftreten können.

<b>Stoff</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Massenkonzentration (g/l)</b>
NaCl	J.T. Baker	5,78
KCl	Merck	0,35
NaHCO <sub>3</sub>	Merck	2,625
CaCl <sub>2</sub>	Merck	0,367
MgSO <sub>4</sub>	Merck	0,296
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	0,175
7D-Glukose	Merck	2,5
Indometacin	Sigma Aldrich	1,192
1M HCl	Merck	Einstellung auf pH 7,35

Tabelle 12: Zusammensetzung der Krebs-Lösung



Abb.13: Fixierung der Aortenringe in die Triangel-Drähte

### 3.2.12. Aorten-Histologie

Als Ergänzung der funktionellen Untersuchung der Aorten-Relaxationsfähigkeit erfolgt eine histologische Untersuchung der Gefäße. Die für die Relaxationsmessungen nicht verwendeten Aorten-Anteile werden, fixiert in Formalin (Roti© Histofix 4%), von der UKE Mousepathology Facility in Paraffin aufgenommen und auf 3µm dicke Präparate zugeschnitten. Diese werden anschließend einer Elastika-van-Gieson-Färbung unterzogen und können histologisch untersucht werden. Hierzu werden digitale Aufnahmen der mikroskopischen Untersuchung erstellt und diese anschließend mittels der „ImageJ“ Software ausgewertet. Besonderes Interesse gilt dabei der muskulären Tunica media der Aorten. Begrenzt wird diese in Richtung Endothel durch die Membrana elastica interna und in Richtung Adventitia durch die Mebrana elastica externa. Die Flächenbestimmung der Tunica media erfolgte durch Subtraktion des durch die Membrana elastica interna begrenzten Gefäßlumens von der durch die Membrana elastica externa umrandete Gesamtfläche. Außerdem kann durch die Mittelung von 10 Messungen des Abstands zwischen Mebrana elastica interna und externa auch die Dicke der Tunica media bestimmt (s.Abbildung 14). Beide Größen wurden zur besseren Vergleichbarkeit ins Verhältnis zum Körpergewicht des jeweiligen Versuchstieres gesetzt.



Abbildung 14: Methodik der histologischen Auswertung der Aorten-Ringe. Schwarz umrandet sind die Membrana elastica interna und externa. Zusätzlich werden an den 10 schwarzen Strichen Dickemessungen vorgenommen.

### 3.2.13. Herzgewichte

Zur Quantifikation einer kardialen Hypertrophie hat sich die sogenannte Heart-Weight/Body-Weight-Ratio (= HW/BW-Ratio) bewährt. Dabei wird das Gewicht der murinen Herz-Ventrikel ins Verhältnis zum Körpergewicht der Maus gesetzt.

Zur Bestimmung des Körpergewichts wird die Maus am Tag des Versuchsendes unmittelbar vor der Organentnahme gewogen. Nach erfolgter cervikaler Dislokation und Thoraxeröffnung wird das Herz entnommen. Unter dem Mikroskop werden dann beide Vorhöfe und eventuelle Gefäßreste abpräpariert um ausschließlich das Ventrikelgewicht auf einer Feinwaage bestimmt.

Das Herzgewicht wird dann als absoluter Wert und in Form des HW/BW-Ratio ausgewertet.

### 3.2.14. In vitro – Stimulierung von T-Lymphozyten

Zur Aufdeckung spezifischer Interaktionen zwischen der MPO und T-Lymphozyten wurden zusätzlich Zellkultur-Experimente durchgeführt. Aufgereinigte T-Lymphozyten werden dabei hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht. Die T-Lymphozyten werden in ein Zellkultur-Medium eingebracht (s.u.), sowohl mit MPO als auch AT-II versetzt und ihr Interleukin-2-Gehalt als Aktivitätsparameter mittels eines „Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) ermittelt.

### Inkubation der T-Lymphozyten in 96well Platten

Ausgangspunkt ist die Gewinnung von reinen, murinen T-Lymphozyten aus gesunden Wildtyp-Spendermäusen (s. 3.2.6.). Diese werden in einer Konzentration von  $4 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$  in Mikroreaktionsgefäße („Eppendorfer Reaktionsgefäße“) gefüllt. Im Anschluss werden humane oder murine MPO sowie AT-II in verschiedenen Konzentrationen beigelegt. Zusätzlich werden reine T-Lymphozyten-Ansätze, Negativkontrollen mit reiner Medium-Lösung sowie Positiv-Kontrollen mit Concanavalin A, einem potenten T-Lymphozyten-Aktivator, angesetzt.

Vom jeweiligen Ansatz werden nun jeweils  $150 \mu\text{l}$  mit jeweils  $4 \times 10^5$  T-Lymphozyten in die CD3-beschichteten Wells (T-Cell Activation Plate, Corning®: #354725) pipettiert und für 24h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach einer einmaligen Zentrifugation werden  $150 \mu\text{l}$  des Überstandes abpipettiert und in flüssigem Stickstoff bis zur ELISA-Untersuchung konserviert. Vor der ELISA-Untersuchung werden alle Proben erneut zentrifugiert um eventuelle Zellreste als Störfaktor in der ELISA-Untersuchung zu vermeiden.

Die ELISA-Ergebnisse der jeweils als Doppelbestimmung angesetzten Proben werden gemittelt.

Beispiel-Ansätze	Eppendorfer-Zylinder
Leer-Ansatz	310 $\mu\text{l}$ Medium
ConA-Ansatz (Zieldosis $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )	200 $\mu\text{l}$ T-Lymphozyten-Suspension ( $=8 \times 10^5$ Zellen) + 9,3 $\mu\text{l}$ Con-A-Lösung (Ansatz-Konzentration $0,033 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 100,7 $\mu\text{l}$ Medium
reine T-Lymphozyten	200 $\mu\text{l}$ T-Lymphozyten-Suspension ( $=8 \times 10^5$ Zellen) + 110 $\mu\text{l}$ Medium
+ murine MPO (Zieldosis: $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ )	200 $\mu\text{l}$ T-Lymphozyten-Suspension ( $=8 \times 10^5$ Zellen) + 6,2 $\mu\text{l}$ murine MPO-Lösung (Ansatz-Konzentration $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) + 103,8 $\mu\text{l}$ Medium
+ humane MPO (Zieldosis: $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ )	200 $\mu\text{l}$ T-Lymphozyten-Suspension ( $=8 \times 10^5$ Zellen) + 6,2 $\mu\text{l}$ humaner MPO-Lösung (Ansatz-Konzentration $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) + 103,8 $\mu\text{l}$ Medium
+ AT-II (Zieldosis: $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ )	200 $\mu\text{l}$ T-Lymphozyten-Suspension ( $=8 \times 10^5$ Zellen) + 6,2 $\mu\text{l}$ AT-II Lösung (Ansatz-Konzentration $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) + 103,8 $\mu\text{l}$ Medium

Tabelle 13: Beispielbefüllung der Eppendorfer Zylinder für einen Versuchsablauf

Verwendete Komponenten	Hersteller
Concanvalin A (Stocklösung: 0,033 µg/µl)	Sigma© #C6904
Medium	90ml RPMI (Gibco©) + 10ml FCS (Gibco©)
MPO human (Stocklösung: 1µg/µl)	R&D Systems© #3174-MP-250
MPO murin (Stocklösung: 1µg/µl)	R&D Systems© #3667-MP-250
AT-II human (Stocklösung: 1mg/ml)	Sigma© #A9525

Tabelle 14: eingesetzte Komponenten

### IL-2 ELISA-Untersuchung

Die anschließende ELISA-Untersuchung ist ein Antikörper-basiertes Nachweisverfahren, das sowohl qualitativ als auch quantitativ angewendet werden kann. Man unterscheidet direkte, indirekte und sogenannte Capture-Testansätzen.

In der vorliegende Arbeit wurde ein Capture-Ansatz (=Sandwich-ELISA) eingesetzt (IL-2 ELISA Firma Thermo; Art.Nr.: #Emil2). Dabei binden bereits im Well fixierte Antikörper spezifische Antigene der untersuchten Probe. Nach dem Auswaschen ungebundener Probenpartikel wird ein zweiter Antikörper zugegeben, der ein anderes Epitop des Antigens als Zielstruktur hat. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Nach abermaligem Auswaschen ermöglicht ein an den zweiten Antikörper gekoppeltes Enzym durch einen Farbumschlag eines zugegebenen, chromogenen Substrats eine Quantifizierung mittels Photometer. Der Vorteil des Sandwich-ELISA liegt vor allen Dingen in der Reduktion von Streusignalen (Wollenberger et al. 2012).

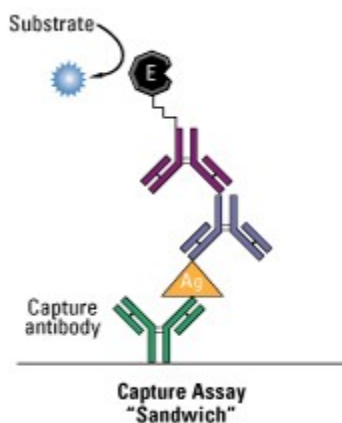


Abb.15: Schematische Darstellung des „Sandwich“-ELISA. Ag = Antigen, E = gekoppeltes Enzym (Thermo scientific 2014)

### Durchführung:

Zunächst werden insgesamt 4 Standard-Proben durch eine Verdünnungsreihe der ursprünglichen 850µg/µl Standard-Lösung hergestellt. Die zu untersuchenden Proben werden jeweils mit Pufferlösung in einem 1 zu 5 und einem 1 zu 10 Verdünnungsansatz, gemeinsam mit den Standard- und Leerproben auf die Antikörper-vorbeschichteten Wells gegeben (50µl der Proben je Well). Die Verdünnung der Proben ist notwendig, um am Ende der Auswertung IL-2-Konzentrationen innerhalb der angelegten Standard-Verdünnungsreihe (0 bis 850µg/µl) zu erhalten.

Nach einer 2-stündigen Inkubation werden die Wells entleert und mehrmals mit Pufferlösung (Tween 20 Detergent Solution) gespült, um die nicht-gebundenen Partikel zu entfernen. Es erfolgt dann die Zugabe des zweiten, mit Meerrettichperoxidase(HRP) gekoppelten Antikörpers (100µl Conjugate Concentrate/Well) sowie eine erneute Inkubation für 1 Stunde mit anschließender Spülung. Nach Zugabe des HRP-Substrat (100µl TMB Substrat/Well) kommt es nach einer 30minütigen Inkubation im Dunkeln konzentrationsabhängig zu einem blauen Farbumschlag in den IL2-haltigen Wells, der durch die Hinzugabe einer Stopp-Lösung (100µl Stop Solution/Well) unterbunden wird. Abschließend wird die IL2-Konzentration in einem Photometer durch die Messung der Absorption bei den Wellenlängen 550nm und 450nm quantifiziert.

Im Verhältnis der Ergebnisse mit den Werten der Standard-Kurve kann so die IL-2-Konzentration der Proben bestimmt werden.

### 3.2.15. Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels der GraphPad Prism Software ermittelt. Zu Grunde liegend waren hierzu verschiedene statistische Testverfahren, abhängig von der vorliegenden Fragestellung.

Zur Untersuchung von Kurven-Verläufen, z.B. des Blutdrucks, der Herzfrequenz oder der Aktivität, wurde eine Two-Way ANOVA-Testung angewendet. Die Beurteilung der vorliegenden Balken-Diagramme erfolgte mittels One-Way-ANOVA und anschließendem Newman-Keuls-Test.

In allen Fällen wurde die Nullhypothese, d.h. die Gleichheit der verglichenen Versuchsgruppen, bei einem Signifikanz-Niveau kleiner 0,05 verworfen. Zusätzlich wurden drei Schwellen der Irrtumswahrscheinlichkeit genutzt:

$p < 0,05$	= 1 Stern „ * “
$p < 0,01$	= 2 Sterne „ ** “
$p < 0,001$	= 3 Sterne „ *** “

In der statistischen Analyse der Aorten-Untersuchung beziehen sich die angegebenen Prozent-Angaben auf die zuvor bestimmte maximale Kontraktion unter PGF $2\alpha$ -Stimulation.

Zur weiteren statistischen Auswertung wurde mittels „curve fit“, einer Non-linearen Regressions-Analyse, der Logarithmus der mittleren effektiven Dosis (logEC50), die Steigung (slope) sowie die maximale Relaxation (Max) berechnet.

Der logEC50 gibt Auskunft über die Konzentration, die zur Erreichung der beobachteten halb-maximalen Relaxation notwendig gewesen wäre.

Die Steigung beschreibt den Anstieg der ermittelten Relaxationswerte in Reaktion auf die verschiedenen ACh/NTG-Konzentrationen zu. Die angegebenen Steigungswerte ergeben sich aus dem Verhältnis der ermittelten, non-linearen Regressionskurven zu der Standard Dosis-Bindungs-Kurve (GraphPad Software 2015).

Zur Sicherung der statistischen Qualität der Arbeit erfolgte eine statistische Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des UKE.



# 4. Ergebnisse

## 4.1. Telemetrie-OP Erfolg

Über den Versuchszeitraum wurde insgesamt 36 Mäusen ein Telemetrie-Sender implantiert . Davon konnten 25 in die abschließende Auswertung einbezogen werden. 8 Tiere mussten auf Grund eines Defekts der Telemetrie-Sender im Verlauf der Zeit ausgeschlossen werden. 3 weitere mussten auf Grund eines initial falsch bestimmten Genotyps aus dem Versuch entnommen werden.

Versuchsgruppen	Gesamt	Ausschluss	Daten einbezogen
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	11	5	6
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	13	6	7
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	6	0	6
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	6	0	6

Tab.15: Übersicht der im Versuchsablauf verwendeten Tiere

## 4.2. Telemetrie-Daten

### 4.2.1. T-Lymphozyten-Transfer

Die am 5. Tag nach Versuchsbeginn durchgeführte Schwanzvenen-Punktion zur Applikation von T-Lymphozyten/Sham-Punktion wurde von den Tieren gut toleriert. Es kam weder zu Nachblutungen an der Einstichstelle, noch zeigten die Mäuse ein geändertes Fress- oder Aktivitäts-Verhalten. Der Eingriff führte zu keiner Änderung der dargestellten Parameter: mittlerer, arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz (HF) und Aktivität (A).

### Mittlerer arterieller Blutdruck: Tag

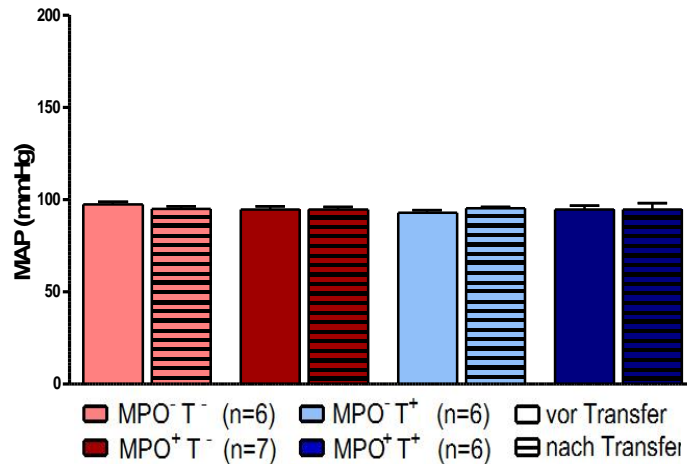


Abbildung 16: Vergleich der Nacht-Messungen des mittleren, arteriellen Blutdrucks vor (=„prä-Transfer“ Basismessung, 1 gemittelte Wochenendmessung) und nach (=„post-Transfer“ Basismessungen, 4 gemittelte Wochenendmessungen) vollzogenem T-Lymphozyten-Transfer/Sham-Punktion. [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Tag: 07:00-19:00Uhr.

### Mittlerer arterieller Blutdruck: Nacht

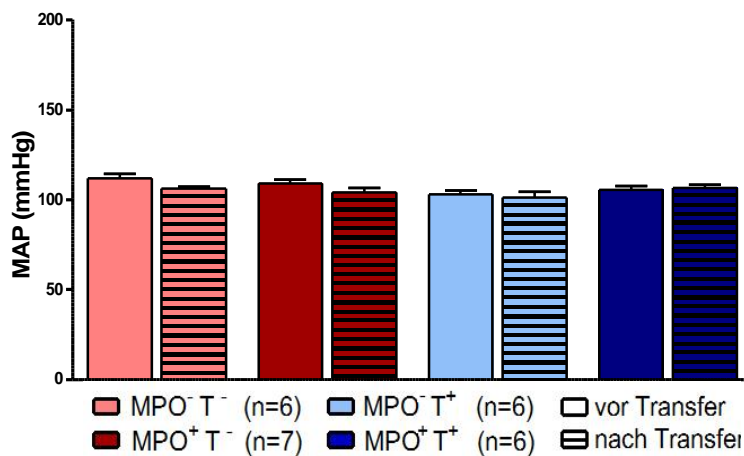


Abbildung 17: Vergleich der Tag-Messungen des mittleren, arteriellen Blutdrucks vor (=„prä-Transfer“ Basismessung, 1 gemittelte Wochenendmessung) und nach (=„post-Transfer“ Basismessungen, 4 gemittelte Wochenendmessungen) vollzogenem T-Lymphozyten-Transfer/Sham-Punktion [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Nacht: 19:00-07:00Uhr.

### Herzfrequenz-Messung: Tag

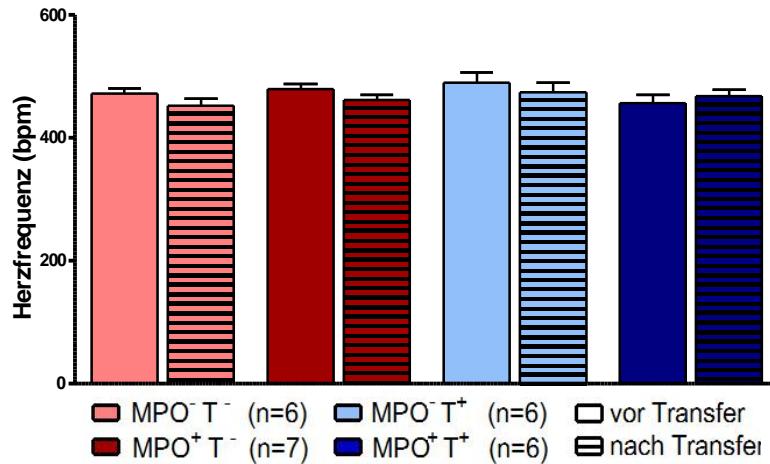


Abb.18: Vergleich der Tag-Messungen der Herzfrequenz vor (=„prä-Transfer“ Basismessung, 1 gemittelte Wochenendmessung) und nach (=„post-Transfer“ Basismessungen, 4 gemittelte Wochenend-messungen) vollzogenem T-Lymphozyten-Transfer/Sham-Punktion [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Tag: 07:00-19:00Uhr.

### Herzfrequenz-Messung: Nacht

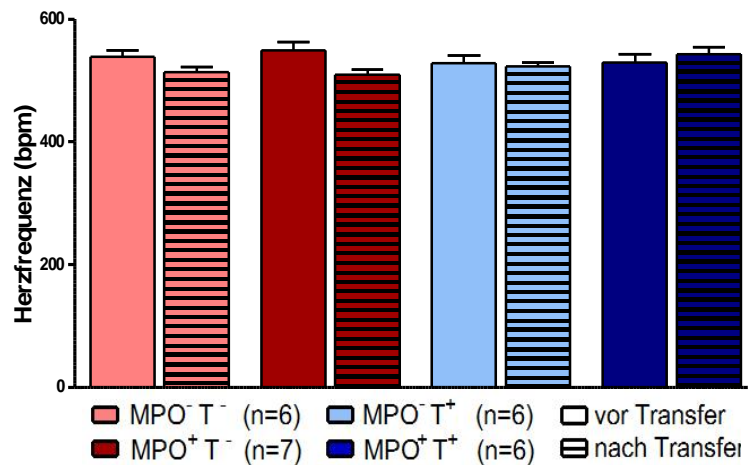


Abbildung 19: Vergleich der Nacht-Messungen der Herzfrequenz vor (=„prä-Transfer“ Basismessung, 1 gemittelte Wochenendmessung) und nach (=„post-Transfer“ Basismessungen, 4 gemittelte Wochenend-messungen) vollzogenem T-Lymphozyten-Transfer/Sham-Punktion [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Nacht: 19:00-07:00Uhr.

### Aktivitäts-Messung: Tag

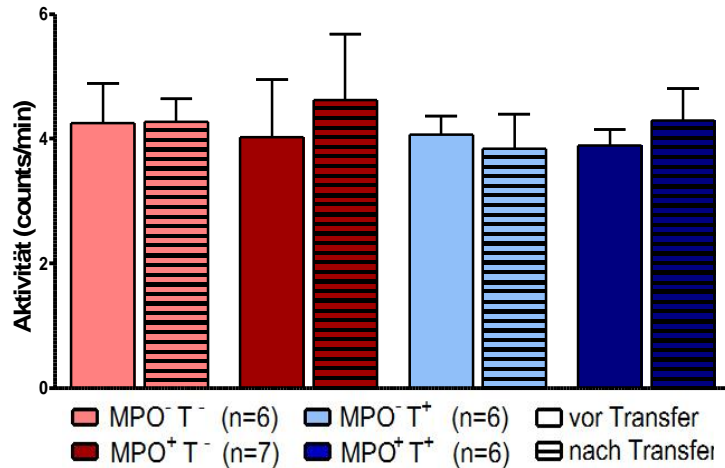


Abbildung 20: Vergleich der Tag-Messungen der Aktivität vor (=„prä-Transfer“ Basismessung, 1 gemittelte Wochenend-messung) und nach (=„post-Transfer“ Basismessungen, 4 gemittelte Wochenendmessungen) vollzogenem T-Lymphozyten-Transfer/Sham-Punktion [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Tag: 07:00-19:00Uhr.

### Aktivitäts-Messung: Nacht

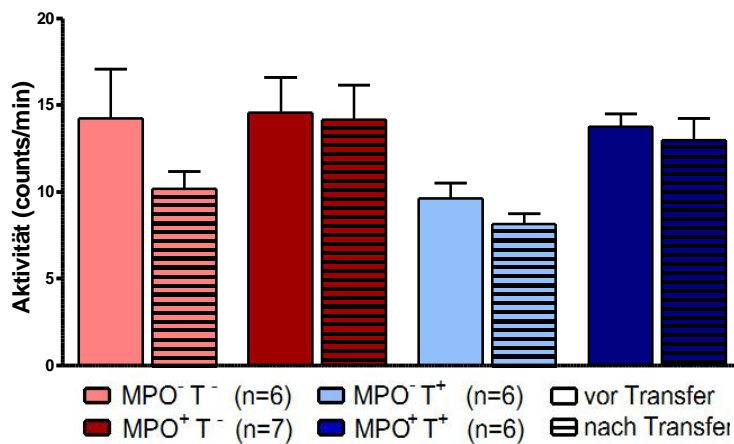


Abbildung 21: Vergleich der Nacht-Messungen der Aktivität vor (=„prä-Transfer“ Basismessung, 1 gemittelte Wochenend-messung) und nach (=„post-Transfer“ Basismessungen, 4 gemittelte Wochenendmessungen) vollzogenem T-Lymphozyten-Transfer/Sham-Punktion [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Nacht: 19:00-07:00Uhr.

<u>Mittlerer arterieller Blutdruck</u>								
Gruppen	Tag (mmHg)		Nacht (mmHg)		Differenz		P-Wert	
	vor Transfer	nach Transfer	vor Transfer	nach Transfer	Tag	Nacht	Tag	Nacht
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	97,01 ± 1,5	94,9 ± 1,4	111,7 ± 2,5	106 ± 1,3	2,2%	5,1%	>0,05	>0,05
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	94,31 ± 1,9	94,29 ± 1,4	108,9 ± 2,1	104 ± 2,3	0,02%	4,5%	>0,05	>0,05
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	94,27 ± 2,2	94,44 ± 3,6	103 ± 2,3	101,3 ± 3,0	-0,2%	1,7%	>0,05	>0,05
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	92,65 ± 1,5	95,23 ± 0,4	105,5 ± 2,1	106,8 ± 1,5	-2,8%	-1,2%	>0,05	>0,05

Tabelle 16: Mittlerer, arterieller Blutdruck: Absolute Tag/Nacht-Werte der Messung vor („prä-Transfer“ Basismessung, 1 gemittelte Wochenendmessung) und nach („post-Transfer“ Basismessungen, 4 gemittelte Wochenendmessungen) vollzogenem T-Lymphozyten-Transfer/Sham-Punktion [arithmetische Mittelwerte ± SEM] und deren mittlere, prozentuale Differenz in Bezug auf den „vor Transfer“-Wert. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test.

<u>Herzfrequenz</u>								
Gruppen	Tag (Schläge/min)		Nacht (Schläge/min)		Differenz		P-Wert	
	vor Transfer	nach Transfer	vor Transfer	nach Transfer	Tag	Nacht	Tag	Nacht
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	472,4 ± 9,0	452 ± 11,4	538±11,3	514 ± 8,1	4,3%	4,4%	>0,05	>0,05
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	479 ± 8,7	462 ± 7,9	549 ± 14,2	509 ± 9,0	3,5%	7,2%	>0,05	>0,05
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	491 ± 16,1	475 ± 15,5	529 ± 11,9	524 ± 5,4	3,2%	0,9%	>0,05	>0,05
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	457 ± 13,3	468 ± 10,6	529 ± 13,0	542 ± 11,3	-2,5%	-2,4%	>0,05	>0,05

Tabelle 17: Herzfrequenz: Absolute Tag/Nacht-Werte der Messung vor („prä-Transfer“ Basismessung, 1 gemittelte Wochenendmessung) und nach („post-Transfer“ Basismessungen, 4 gemittelte Wochenendmessungen) vollzogenem T-Lymphozyten-Transfer/Sham-Punktion [arithmetische Mittelwerte ± SEM] und deren mittlere, prozentuale Differenz in Bezug auf den „vor Transfer“-Wert. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test.

Aktivität								
Gruppen	Tag (Ereignisse/min)		Nacht (Ereignisse/min)		Differenz		P-Wert	
	vor Transfer	nach Transfer	vor Transfer	nach Transfer	Tag	Nacht	Tag	Nacht
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	4,25 ± 0,6	4,27 ± 0,4	14,24 ± 2,8	10,2 ± 1,0	-0,5%	+28%	>0,05	>0,05
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	4,03 ± 0,9	4,62 ± 1,1	14,57 ± 2,0	14,15 ± 2,0	-15%	+2,9%	>0,05	>0,05
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	4,07 ± 0,3	3,84 ± 0,6	9,61 ± 0,9	8,16 ± 0,6	+5,7%	+15%	>0,05	>0,05
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	3,9 ± 0,3	4,3 ± 0,5	13,75 ± 0,7	12,98 ± 1,2	-10%	+5,6%	>0,05	>0,05

Tabelle 18: Aktivität: Absolute Tag/Nacht-Werte der Messung vor (=„prä-Transfer“ Basismessung, 1 gemittelte Wochenendmessung) und nach (=„post-Transfer“Basismessungen, 4 gemittelte Wochenendmessungen) vollzogenem T-Lymphozyten-Transfer/Sham-Punktion [arithmetische Mittelwerte ± SEM] und deren mittlere, prozentuale Differenz in Bezug auf den „vor Transfer“-Wert. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test.

## 4.2.2. Basismessungen

Da durch den T-Lymphozyten/Sham-Transfer die telemetrischen Parameter unbeeinflusst blieben, konnten die vor dem Transfer ermittelten Daten mit den Messungen bis zur AT-II-Gabe zusammengefasst werden.

Dementsprechend wurden über insgesamt 5 Messungen (1 Messung vor Transfer und 4 Messungen nach Transfer) jeweils für einen 48h-Zeitraum telemetrische Daten der Mäuse gewonnen und zu einer Basis-Messperiode zusammengefasst.

### Blutdruck

Die verschiedenen Versuchsgruppen zeigen unter Ruhebedingungen einen stabilen mittleren arteriellen Blutdruck. Zur Nacht steigen die Blutdruckwerte in allen Gruppen gegenüber dem Tag deutlich an.

#### Mittlerer, arterieller Blutdruck: Tag

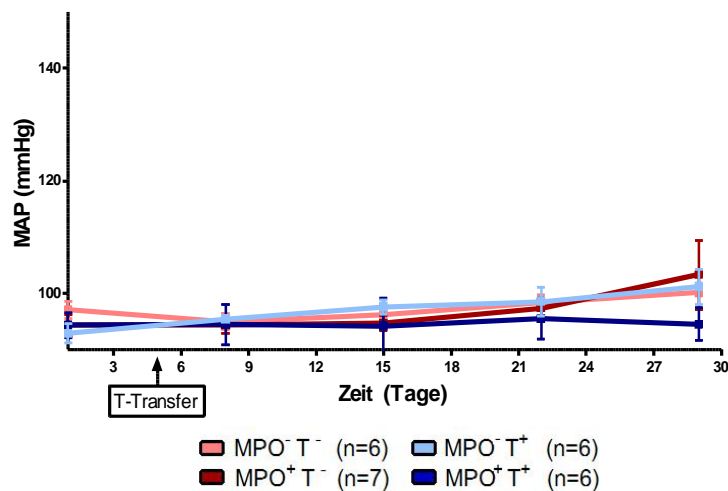


Abbildung 21: Mittlerer, arterieller Blutdruck: Zeitlicher Verlauf der Tag-Werte [arithmetische Mittelwerte/d  $\pm$  SEM]. Der T-Lymphozyten-Transfer bzw. die Sham-Punktion sind als „T-Transfer“ gekennzeichnet.

### Mittlerer, arterieller Blutdruck: Nacht

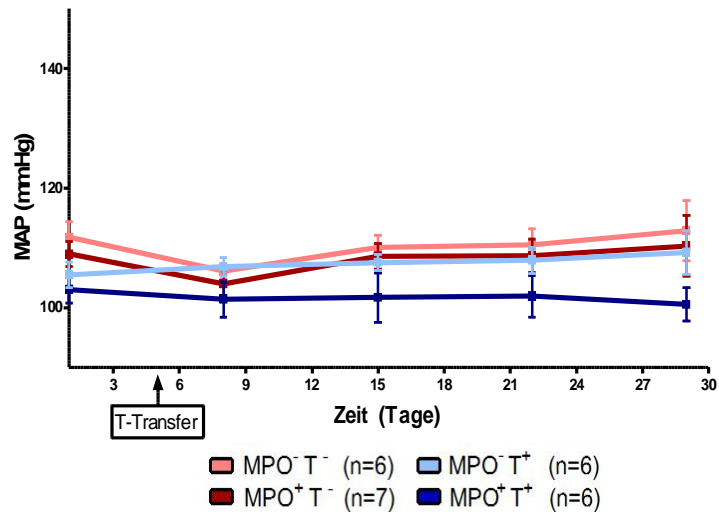


Abbildung 22: Mittlerer, arterieller Blutdruck: Zeitlicher Verlauf der Nacht-Werte [arithmetische Mittelwerte/d ± SEM]. Der T-Lymphozyten-Transfer bzw. die Sham-Punktion sind als „T-Transfer“ gekennzeichnet.

### Mittlerer, arterieller Blutdruck: Tag/Nacht

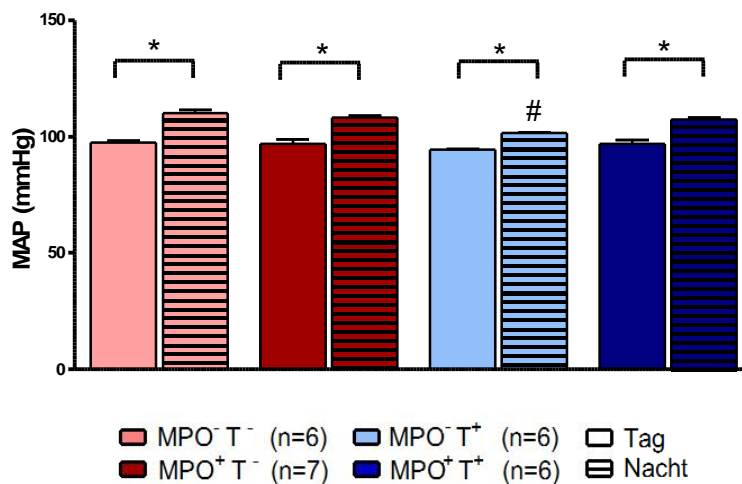


Abbildung 23: Mittlerer, arterieller Blutdruck: Tag/Nacht-Vergleich durch Mittelwert-Bildung aller 5 Basismessungen [arithmetische Mittelwerte ± SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \*Die nächtlichen MAP-Werte aller Gruppen sind im Tag-Nacht-Vergleich signifikant erhöht. #Die MPO<sup>+</sup> T<sup>+</sup> Gruppe zeigt in der Nacht gegenüber den anderen 3 Gruppen bei Nacht signifikant erniedrigte MAP-Werte.



### Zirkadianer Verlauf: MAP/Aktivität

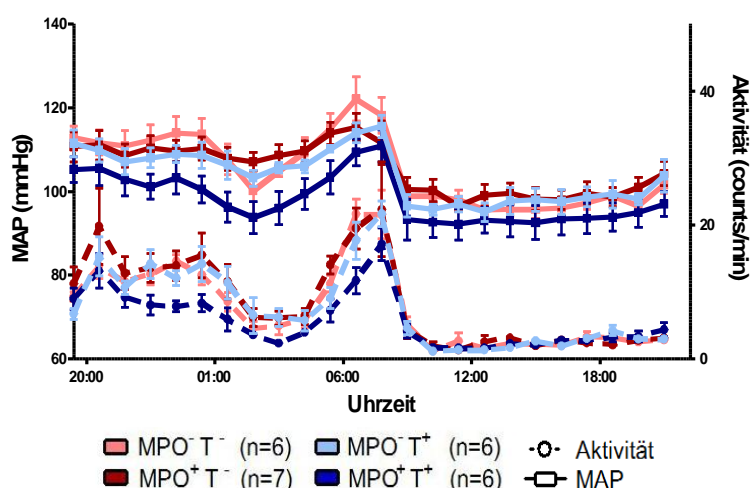


Abbildung 24: Mittlerer, arterieller Blutdruck: Tag/Nacht-Vergleich durch zirkadiane Mittelung des letzten 48h Messintervalls vor AT-II-Gabe [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test.

	MAP Tag (mmHg)	MAP Nacht(mmHg)	Mittlere Differenz	P-Wert
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	97,31 $\pm$ 0,88	110,2 $\pm$ 1,16	+13%	*
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	96,95 $\pm$ 1,90	108,2 $\pm$ 0,96	+12%	*
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	94,56 $\pm$ 0,24	101,6 $\pm$ 0,40	+7%	*
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	97,72 $\pm$ 1,75	107,4 $\pm$ 0,61	+10%	*

Tabelle 19: Mittlerer arterieller Blutdruck: Absolute Tag/Nacht-Werte aller gewonnenen Basiswerte (=Ruhemessung + 4 Basismessungen nach Transfer) [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM] und deren mittlere, prozentuale Differenz in Bezug auf den Tag-Wert. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test.

Die Versuchsgruppe MPO<sup>+</sup>T<sup>+</sup> zeigt in der Nacht signifikant erniedrigte MAP-Werte gegenüber den anderen 3 Gruppen bei Nacht. Die Analyse der arithmetischen Mittelwerte der Tag- und Nachtmessungen verdeutlicht den signifikanten Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks in allen Versuchsgruppen zur Nacht hin (s. Tabelle 19).

Zusammenfassend unterliegt der mittlere arterielle Blutdruck der Mäuse aller Gruppen, wie in Abbildung 24 zu erkennen, analog ihrer körperlichen Aktivität einem Tag-Nacht-Rhythmus.

Nachts (zwischen 19:00 und 7:00 Uhr) zeigt sich ein deutlich höherer mittlerer arterieller Blutdruck als tagsüber (7:00 bis 19:00 Uhr). Die tägliche Ruhephase geht mit einem Absinken des mittlerer arteriellen Blutdrucks in allen Gruppen einher. Es zeigt sich analog zur Differenz in der arithmetischen Mittelung ein reduzierter Anstieg der MAP-Werte mit Beginn der Nacht der MPO<sup>+</sup> T<sup>+</sup> Gruppe. Dieser Verlauf ist analog zu der ebenfalls verminderten Aktivität der Gruppe zu diesem Zeitpunkt.

Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass eine mögliche Interaktion zwischen der lokomotorischer Aktivität und dem mittleren arteriellen Blutdrucks bestehen könnte. Dies wurde in Form einer aktivitätsbereinigten Auswertung des Blutdrucks untersucht: Hierzu wurden die ermittelten 5-Minuten Werte dem mittleren, arteriellen Blutdruck der einzelnen Versuchstiere hinsichtlich ihrer Aktivität zum selben Zeitpunkt in die beiden Cluster „Aktivität = 0 counts/min“ (=inaktiv) und „Aktivität > 0 counts/min“ (=aktiv) unterteilt. Anschließend wurde für jedes Versuchstier ein Blutdruck-Mittelwert für jedes der beiden Cluster gebildet. Die Mittelwerte der einzelnen Tiere wurden in die 4 Versuchsgruppen gebündelt.

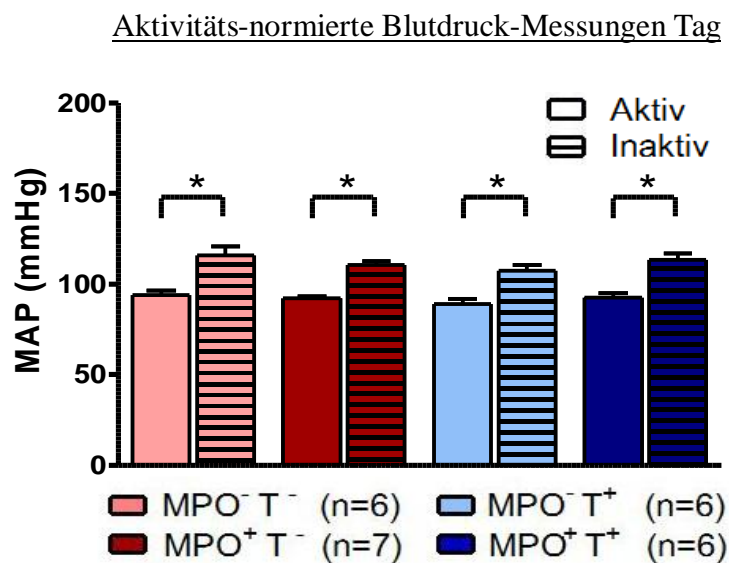


Abbildung 25: Mittlerer arterieller Blutdruck Tag: Verteilung der Werte auf die 2 Aktivitäts-Cluster „inaktiv“ und „aktiv“ zur aktivitätsunabhängigen Normierung der Blutdruck-Messwerte [arithmetische Mittelwerte ± SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \*Die Blutdruck-Werte aller Gruppen sind im Cluster der hohen Aktivität im Vergleich zum Cluster der fehlenden Aktivität signifikant erhöht.

### Aktivitäts-normierte Blutdruck-Messungen Nacht

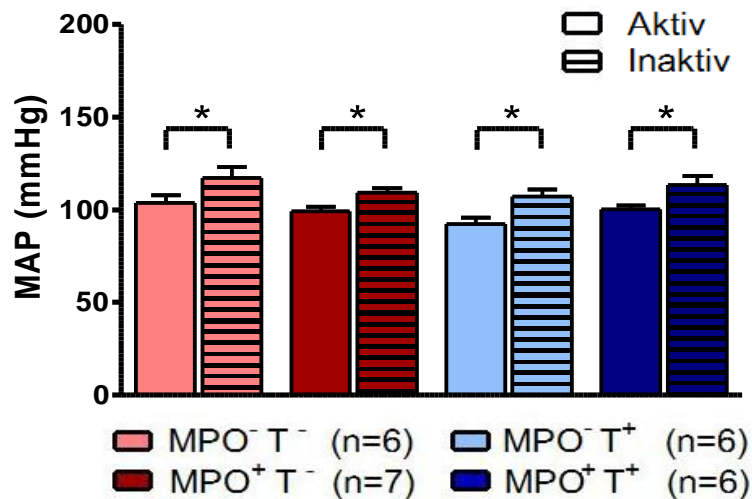


Abbildung 26: Mittlerer arterieller Blutdruck Nacht: Verteilung der Werte auf die 2 Aktivitäts-Cluster „inaktiv“ und „aktiv“ zur aktivitätsunabhängigen Normierung der Blutdruck-Messwerte [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \*Die Blutdruck-Werte aller Gruppen sind im Cluster der hohen Aktivität im Vergleich zum Cluster der fehlenden Aktivität signifikant erhöht.

Es zeigt sich im Vergleich der Werte bei Aktivität gegenüber den Werten bei Inaktivität in allen 4 Gruppen ein signifikanter Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks und somit eine positive Korrelation zwischen den Aktivitäts- und Blutdruck-Werten. Demgegenüber zeigen sich in dieser Form der Auswertung keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den 4 Versuchsgruppen, so dass die Ursache für die zuvor festgehaltene Blutdruck-Differenz zwischen der MPO<sup>+</sup> T<sup>+</sup> Gruppe gegenüber den anderen Gruppen im unterschiedlichen Aktivitäts-Verhalten der Mäuse zu finden ist.

### Herzfrequenz

Die Herzfrequenz zeigt vor Beginn der AT-II-Stimulation gruppeninterne Stabilität. Wie beim Blutdruck unterscheiden sich die Herzfrequenzen im Tag-Nacht-Vergleich signifikant in allen 4 Gruppen (s. Abbildung 29 und Tabelle 20).

### Herzfrequenz: Tag

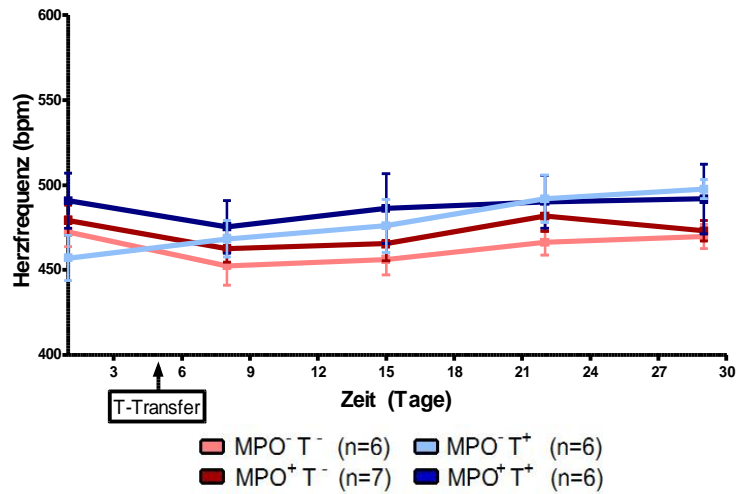


Abbildung 27: Herzfrequenz: Zeitlicher Verlauf der Tag Werte [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Der T-Lymphozyten-Transfer bzw. die Sham-Punktion sind als „T-Transfer“ gekennzeichnet.

### Herzfrequenz: Nacht

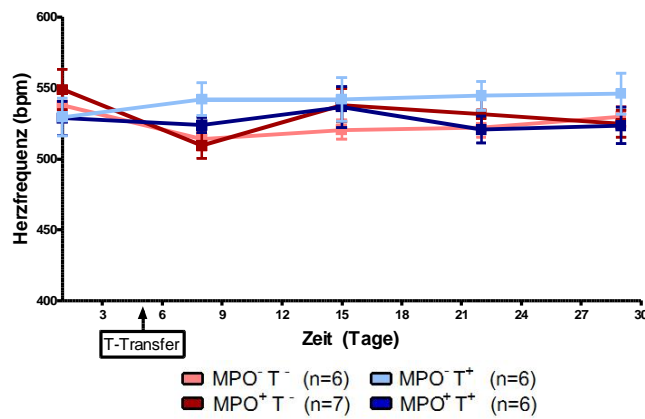


Abbildung 28: Herzfrequenz: Zeitlicher Verlauf der Nachtwerte [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Der T-Lymphozyten-Transfer bzw. die Sham-Punktion sind als „T-Transfer“ gekennzeichnet.

### Herzfrequenz-Messung: Tag/Nacht

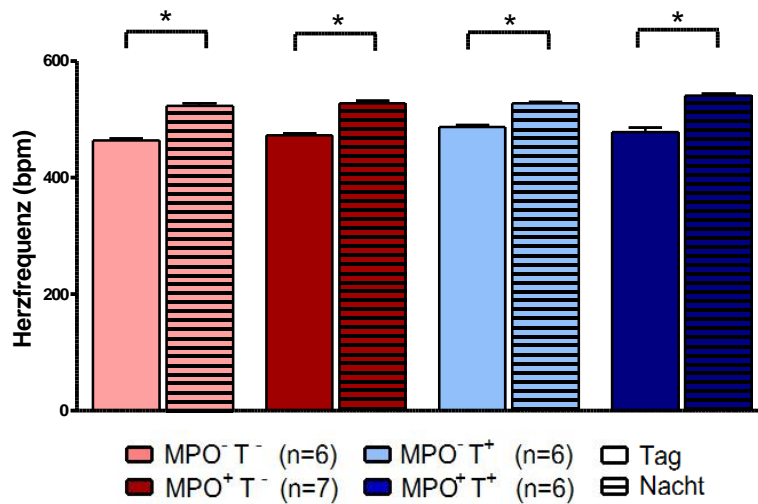


Abbildung 29: Herzfrequenz: Tag/Nacht-Vergleich durch Mittelwert-Bildung aller 5 Basismessungen [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \*Die Herzfrequenzen aller Gruppen sind im Tag-Nacht-Vergleich in der Nacht signifikant gegenüber dem Tag erhöht.

### Zirkadianer Verlauf: Herzfrequenz/Aktivität

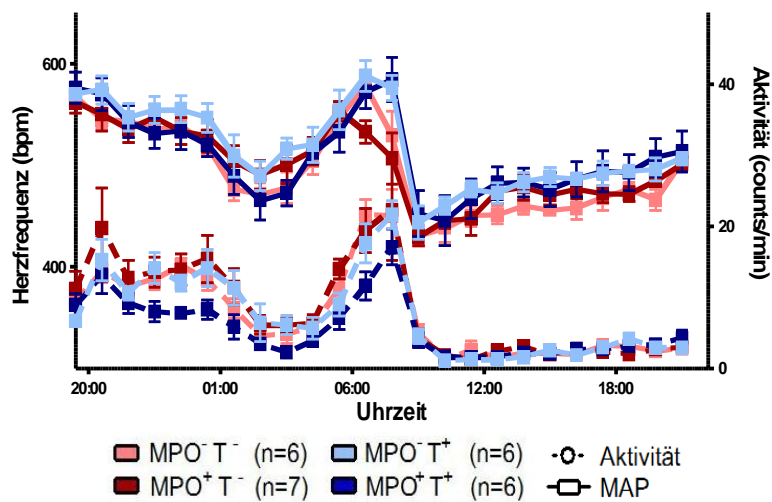


Abbildung 30: Herzfrequenz: Tag/Nacht-Vergleich durch zirkadiane Mittelung des letzten 48h Messintervalls vor AT-II-Gabe [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test.

Herzfrequenz				
Versuchsgruppen	Tag (Schläge/min)	Nacht (Schläge/min)	Mittlere Differenz	P-Wert
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	463,3 ± 3,9	503,1 ± 8,2	+9%	***
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	472,1 ± 3,4	526,6 ± 5,7	+12%	***
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	486,8 ± 3,0	526,5 ± 2,8	+8%	***
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	478,1 ± 7,4	540,6 ± 2,9	+13%	***

Tabelle 20: Herzfrequenz: Absolute Tag/Nacht-Werte aller Basis-Werte (=Ruhemessung + 4 Basismessungen nach Transfer) [arithmetische Mittelwerte ± SEM] und deren mittlere, prozentuale Differenz in Bezug auf den Tag-Wert. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test..

Die Entwicklung der Herzfrequenz im Verlauf eines „virtuellen“ Tages (arithmetische Mittelung der letzten Ruhe-Messung auf 24 stündliche Werte) lässt deutlich gesteigerte Frequenzen in der Zeit zwischen 07.00 und 19.00 erkennen. Die Gruppen untereinander vergleichend sind keine Unterschiede im Verlauf erkennbar (s.Abbildung 29). Im Vergleich der arithmetischen Mittelwerte sind die Herzfrequenzen der MPO<sup>-</sup>T<sup>+</sup> Gruppe in der Nacht signifikant gegenüber der MPO<sup>-</sup>T<sup>-</sup> Gruppe erhöht.

Entsprechend der weiteren Analyse des mittleren arteriellen Blutdrucks wurden die Daten für die Herzfrequenzen aktivitätsnormiert ausgewertet (genaues Vorgehen s.4.2.2. „Blutdruck“).

Dort zeigen sich im Vergleich zwischen den beiden Clustern unter hoher Aktivität signifikant erhöhte Herzfrequenzen gegenüber geringer Aktivität in allen Versuchsgruppen. Innerhalb der beiden Cluster gibt es jedoch im Vergleich der Gruppen untereinander keine Unterschiede (Vgl. Abbildungen 31 und 32).

Dementsprechend ist, analog zur Analyse des Blutdrucks, der schwach signifikante Unterschied der Herzfrequenzen der MPO<sup>-</sup>T<sup>+</sup> und MPO<sup>-</sup>T<sup>-</sup> Gruppe in der Betrachtung der arithmetischen Mittelwerte im unterschiedlichen Aktivitäts-Verhalten der Mäuse zu finden.

### Aktivitäts-normierte Herzfrequenz-Messungen Tag

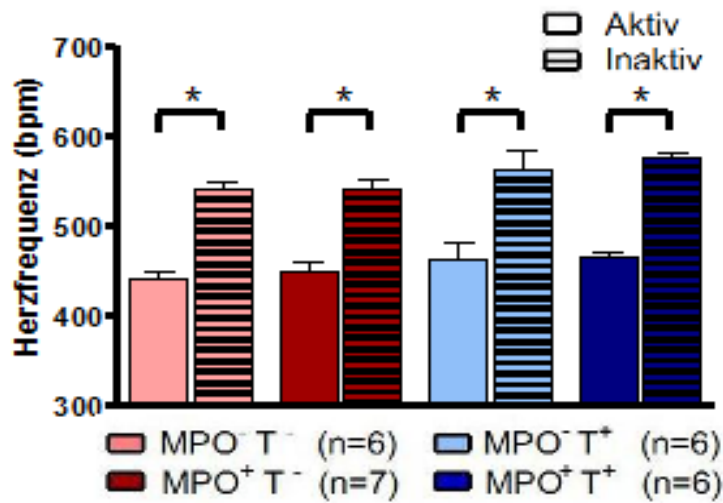


Abbildung 31: HF: Tag-Verteilung der Werte auf die 2 Aktivitäts-Cluster „inaktiv“ und „aktiv“ zur aktivitätsunabhängigen Normierung der Herzfrequenz [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \*Die Herzfrequenz-Werte aller Gruppen sind im Cluster der hohen Aktivität im Vergleich zum Cluster der fehlenden Aktivität signifikant erhöht.

### Aktivitäts-normierte Herzfrequenz-Messungen Nacht

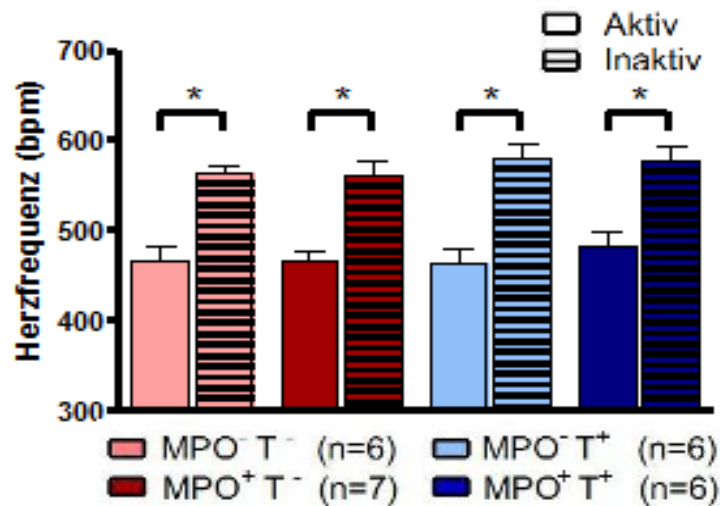


Abbildung 32: HF: Nacht-Verteilung der Werte auf die 2 Aktivitäts-Cluster „inaktiv“ und „aktiv“ zur aktivitätsunabhängigen Normierung der Herzfrequenz [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \*Die Herzfrequenz-Werte aller Gruppen sind im Cluster der hohen Aktivität im Vergleich zum Cluster der fehlenden Aktivität signifikant erhöht.

## Aktivität

Die verschiedenen Versuchsgruppen zeigen in den 5 Basismessungen am Tag nahezu identische, niedrige Aktivitätsniveaus. In der Nacht kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Aktivität in allen 4 Gruppen verbunden mit einer Zunahme der Streuung.

### Aktivitäts-Messung: Tag

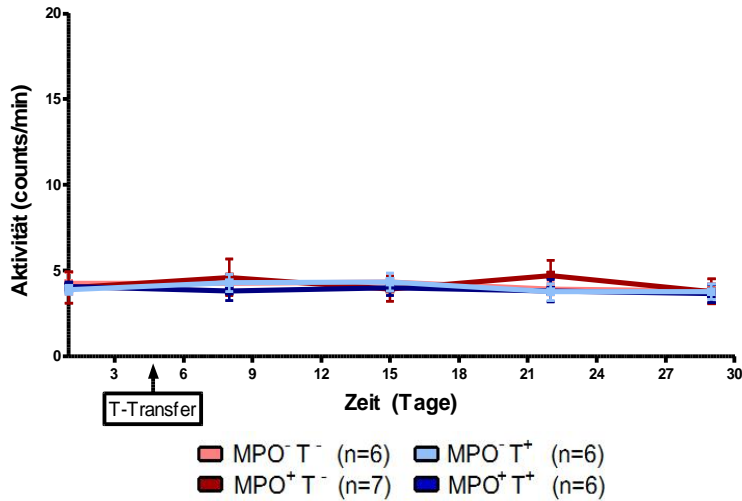


Abbildung 33: Aktivität: Zeitlicher Verlauf der Tag-Werte [arithmetische Mittelwerte/d  $\pm$  SEM]. Der T-Lymphozyten-Transfer bzw. die Sham-Punktion sind als „T-Transfer“ gekennzeichnet.

### Aktivitäts-Messung: Nacht

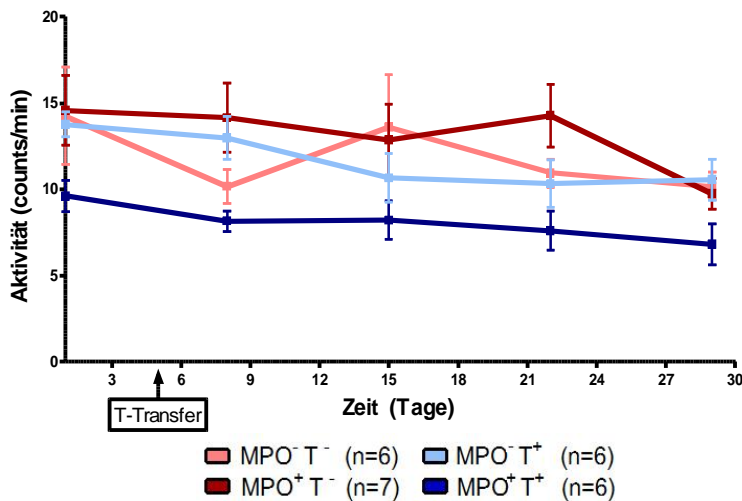


Abbildung 34: Aktivität: Zeitlicher Verlauf der Nacht-Werte [arithmetische Mittelwerte/d  $\pm$  SEM]. Der T-Lymphozyten-Transfer bzw. die Sham-Punktion sind als „T-Transfer“ gekennzeichnet.



### Aktivitäts-Messung: Tag/Nacht

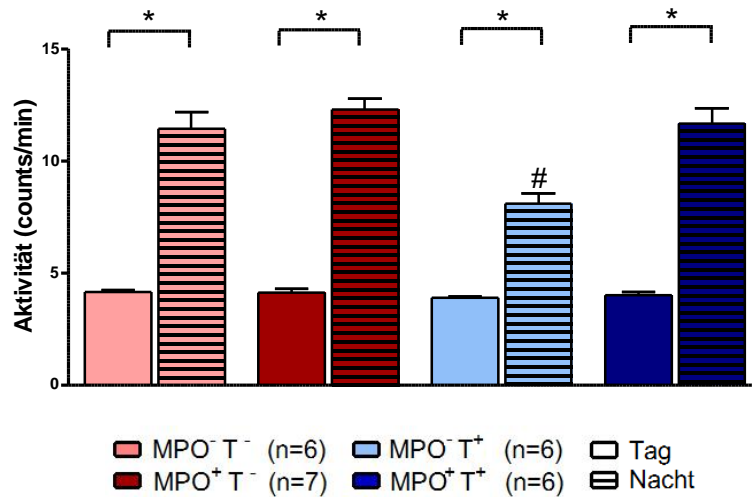


Abbildung 35: Aktivität: Tag/Nacht-Vergleich durch Mittelwert-Bildung aller 5 Basismessungen [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \*Alle Gruppen zeigen im Tag-Nacht Vergleich signifikant erhöhte Aktivitätsniveaus in der Nacht. #Die Aktivität der MPO<sup>+</sup>T<sup>+</sup> Gruppe ist in der Nacht gegenüber den anderen Gruppen bei Nacht signifikant erniedrigt.

### Zirkadianer Verlauf: Aktivität

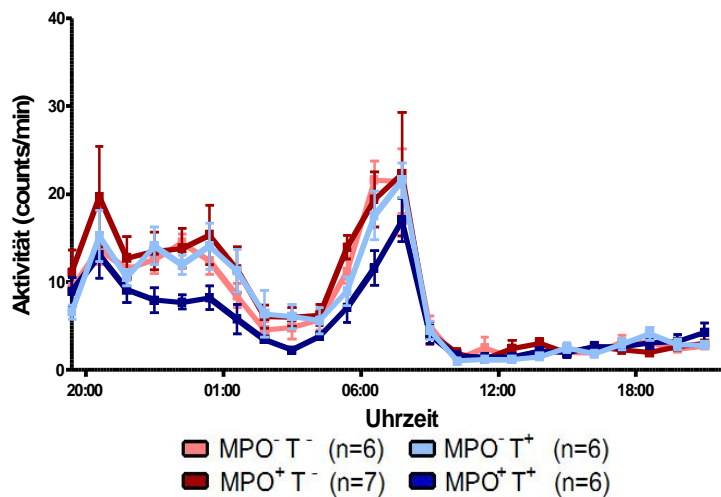


Abbildung 36: Aktivität: Tag/Nacht-Vergleich durch zirkadiane Mittelung des letzten 48h Messintervalls vor AT-II-Gabe [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test.

<u>Aktivität</u>				
Gruppen	Tag (Ereignisse/min)	Nacht (Ereignisse/min)	% - Differenz	P-Wert
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	3,93 ± 0,13	11,44 ± 0,75	+191%	***
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	4,11 ± 0,18	12,29 ± 0,51	+199%	***
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	3,88 ± 0,07	8,08 ± 0,46	+108%	***
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	4,01 ± 0,13	11,65 ± 0,71	+190%	***

Tabelle 21: Aktivität: Absolute Tag/Nacht-Werte aller 5 Basismessungen [arithmetische Mittelwerte ± SEM] und deren mittlere, prozentuale Differenz in Bezug auf den Tag-Wert. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test..

Dem Kurvenverlauf aus Abbildungen 33 und 34 entsprechend zeigen sich bei der Betrachtung der arithmetischen Mittelwerte (Abbildung 36, Tabelle 21) ein signifikanter Anstieg der lokomotorischen Aktivität zur Nacht in allen Gruppen. Zwischen den einzelnen Gruppen zeigen sich am Tag keine Unterschiede bezüglich der Aktivitätsniveaus. In der Nacht ist die Aktivität der MPO<sup>+</sup>T<sup>+</sup> Gruppe gegenüber allen anderen Gruppen signifikant erniedrigt.

Insgesamt zeigt sich ein ausgeprägter Tag-Nacht-Rhythmus aller Versuchsgruppen. Liegt die Aktivität der Mäuse in ihre Ruhephase zwischen 07.00 und 19.00 Uhr nur leicht über 0 Ereignissen/min, so steigt sie mit Beginn der nachtaktiven Phase schlagartig an.

### 4.2.3. Angiotensin-II-Behandlung

4 Wochen nach T-Lymphozyten-Transfer/Sham-Behandlung erhielten die Tiere Angiotensin-II subkutan. Über 14 Tage sollte so der Verlauf einer arteriellen Hypertonie mittels telemetrischer Messungen von Blutdruck, Herzfrequenz und Aktivität dokumentiert werden.

#### Blutdruck

Die blutdrucksteigernde Wirkung des AT-II führt in allen Versuchsgruppen sowohl am Tag als auch in der Nacht zu einem generellen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks.

Am Tag kann gruppenvergleichend eine signifikante Erniedrigung des Blutdrucks der Gruppe  $MPO^+ T^+$  gegenüber den anderen drei Gruppen festgestellt werden ( $p < 0,01$ ). Darüber hinaus zeigt sich der Blutdruck der Gruppe  $MPO^+ T^-$  im Vergleich mit dem Blutdruck den anderen Gruppen marginal signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ).

In der Nacht sind ebenfalls sämtliche MAP-Werte aller Gruppen gegenüber den Basis-MAP-Werten signifikant erhöht.

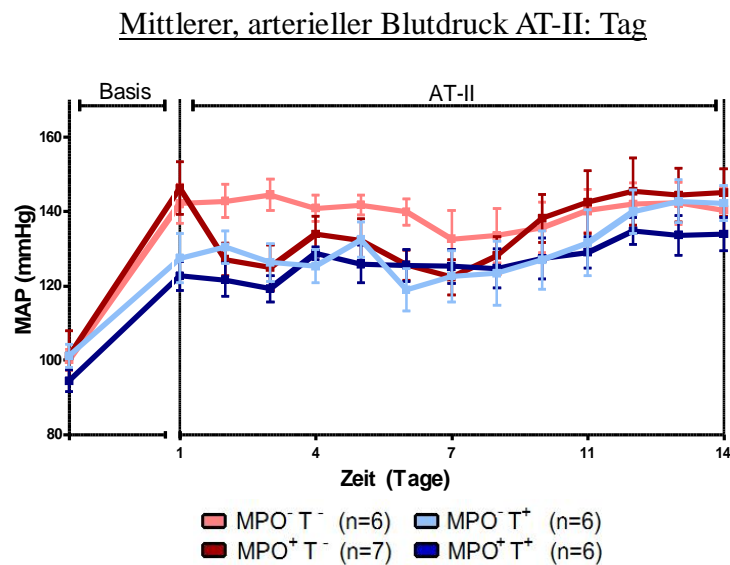


Abbildung 37: Mittlerer, arterieller Blutdruck: Zeitlicher Verlauf am Tag. „Basis“ entspricht der letzten Basismessung vor Beginn der 14tägigen AT-II Gabe [arithmetische Mittelwerte/d  $\pm$  SEM].

### Mittlerer, arterieller Blutdruck AT-II: Nacht

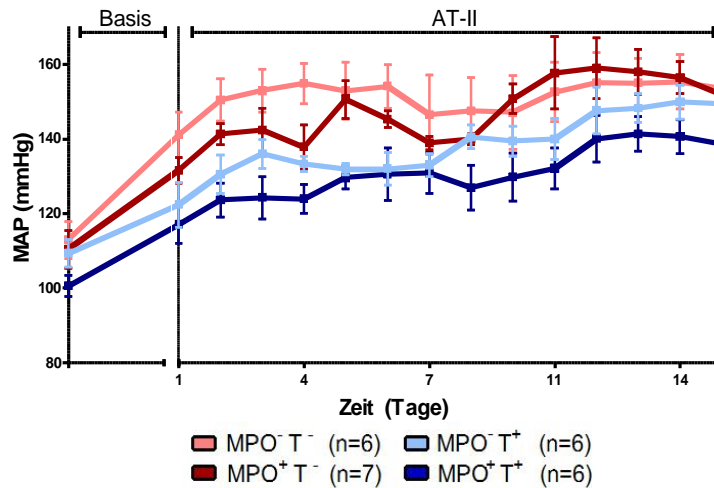


Abbildung 38: Mittlerer, arterieller Blutdruck: Zeitlicher Verlauf in der Nacht. „Basis“ entspricht der letzten Basismessung vor Beginn der 14tägigen AT-II Gabe [arithmetische Mittelwerte/d ± SEM].

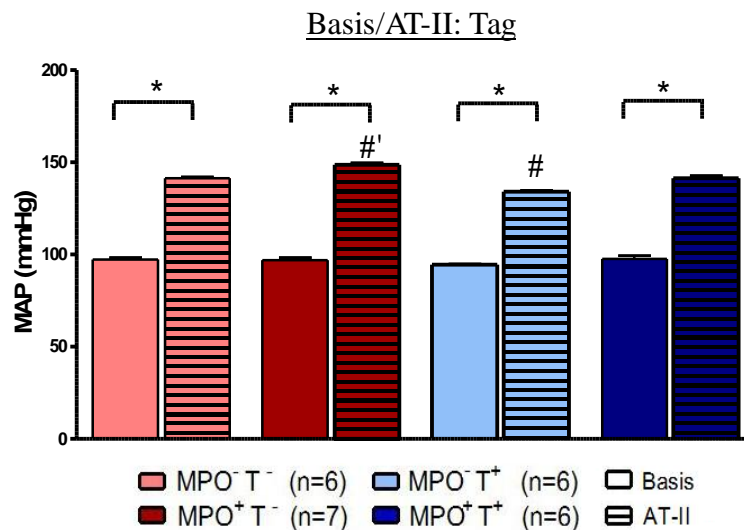


Abbildung 39: Mittlerer, arterieller Blutdruck: Vergleich der 5 Basis-Messungen gegen die letzten 3 Tage der AT-II-Gabe [arithmetische Mittelwerte/h ± SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \*Die Blutdruck-Werte aller Gruppen sind im Vergleich zwischen Basis- und AT-II-Gabe unter AT-II-Gabe signifikant erhöht. # Die Blutdruck-Werte der MPO<sup>+</sup>T<sup>+</sup> Gruppe sind gegenüber den anderen 3 Gruppen signifikant erniedrigt. #' Die Blutdruck-Werte der MPO<sup>+</sup>T<sup>-</sup> Gruppe sind gegenüber den anderen 3 Gruppen am Tag signifikant erhöht.

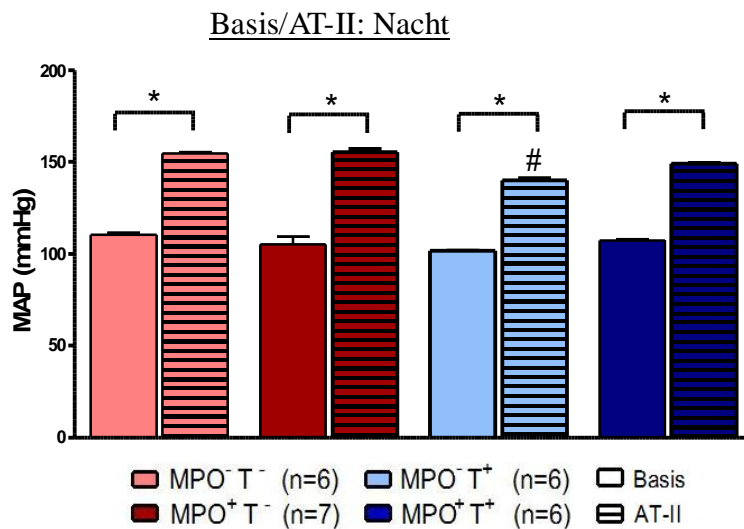


Abbildung 40: Mittlerer, arterieller Blutdruck: Vergleich der 5 Basis-Messungen gegen die letzten 3 Tage der AT-II-Gabe in der Nacht [arithmetische Mittelwerte/h  $\pm$  SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \*Die Blutdruck-Werte aller Gruppen sind im Vergleich zwischen Basis- und AT-II-Behandlung unter AT-II-Behandlung signifikant erhöht. # Die Blutdruck-Werte der MPO<sup>+</sup>T<sup>+</sup> Gruppe sind sowohl am Tag als auch in der Nacht gegenüber den anderen 3 Gruppen signifikant erniedrigt.

Zirkadianer Verlauf mittlerer, arterieller Blutdruck: Basis / AT-II

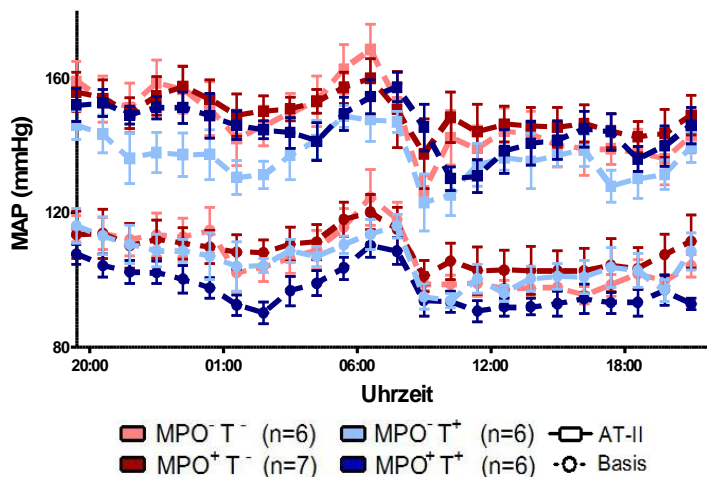


Abbildung 41: Mittlerer arterieller Blutdruck: Vergleich des zirkadianen Blutdruck-Verlaufes des letzten Tages der AT-II Gabe mit dem zirkadianen Verlauf der letzten Basismessung [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM].

<b>Mittlerer arterieller Blutdruck</b>				
<b>Tag-Werte</b>	Basis (mmHg)	AT-II (mmHg)	mittlere Differenz	P-Wert
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	97,31 ± 0,88	141,5 ± 0,59	+ 45%	*
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	96,76 ± 1,7	148,7 ± 0,52	+ 54%	*
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	94,56 ± 0,24	134,1 ± 0,35	+ 42%	*
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	97,72 ± 1,7	141,6 ± 0,8	+ 45%	*
<b>Nacht-Werte</b>				
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	110,2 ± 1,158	154,5 ± 0,5341	+40%	*
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	105 ± 4,12	155,3 ± 1,852	+48%	*
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	101,6 ± 0,4010	140,1 ± 0,8090	+38%	*
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	107,4 ± 0,6171	149,1 ± 0,4944	+39%	*

Tabelle 22: Mittlerer arterieller Blutdruck: Mittelung aller 5 Basismessungen und der letzten 3 Tage unter AT-II [arithmetische Mittelwerte ± SEM] und deren mittlere, prozentuale Differenz in Bezug auf den Basis-Wert. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test.

Auch in der Darstellung des Tagesverlaufs ist die deutliche Anhebung des mittleren arteriellen Blutdrucks unter AT-II-Gabe zu beobachten. Klar erkennbar bleibt die Tag-Nacht-Abhängigkeit der Werte (s.Abbildung 41).

Um auszuschließen, dass die beschriebenen Unterschiede aktivitätsabhängig sind, wurde eine aktivitätsnormierte Auswertung der AT-II-Messungen durchgeführt.

Aktivitätsnormierte MAP-Auswertung: Tag

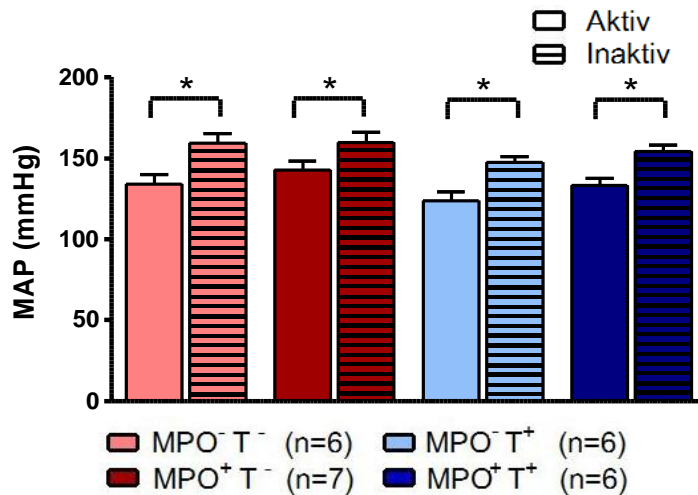


Abbildung 42: Mittlerer, arterieller Blutdruck: Verteilung der Tag-Werte auf die Aktivitäts-Cluster „inaktiv“ und „aktiv“ zur aktivitätsunabhängigen Normierung der MAP-Messwerte [arithmetische Mittelwerte ± SEM] Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \* Die MAP-Werte aller Gruppen sind im Cluster der hohen Aktivität im Vergleich mit dem Cluster fehlender Aktivität signifikant erhöht.

Aktivitätsnormierte MAP-Auswertung: Nacht

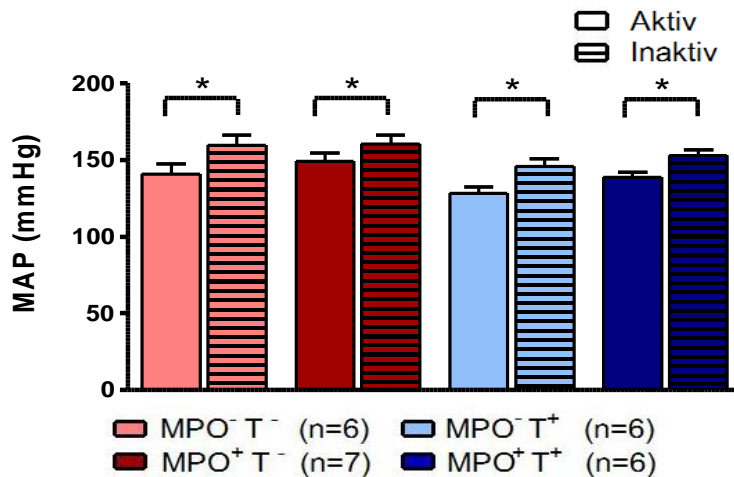


Abbildung 43: Mittlerer, arterieller Blutdruck: Verteilung der Nacht-Werte auf die Aktivitäts-Cluster „inaktiv“ und „aktiv“ zur aktivitätsunabhängigen Normierung der MAP-Messwerte [arithmetische Mittelwerte ± SEM] Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \* Die MAP-Werte aller Gruppen sind im Cluster der hohen Aktivität im Vergleich mit dem Cluster fehlender Aktivität signifikant erhöht.

In der Analyse der aktivitätsnormierten Auswertung (genaues Vorgehen s.4.2.2. „Blutdruck“) zeigt sich für alle 4 Gruppen ein signifikanter Anstieg des Blutdrucks bei Aktivität sowohl am Tag als auch in der Nacht. Zwischen den Gruppen liegen innerhalb des jeweiligen Clusters keine Unterschiede im mittleren, arteriellen Blutdruck vor.

### Systolischer und diastolischer Blutdruck

Zur differenzierten Auswertung des Blutdruckanstiegs unter AT-II wurden der systolische und diastolische Blutdruck ausgewertet. Da sich z.B. Gefäßveränderungen über die Beeinflussung des totalen, peripheren Widerstandes oder Veränderungen in der kardialen Funktion in unterschiedlichem Ausmaß auf den systolischen und diastolischen Blutdruck auswirken können, war diese Auswertung von zusätzlichem Interesse.

Hierbei zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Blutdruck-Werte aller Versuchsgruppen unter AT-II-Gabe im Vergleich zu den Basismessungen sowohl im systolischen als auch im diastolischen Druck (P für alle Gruppen <0,05). Gut zu erkennen ist der bereits beschriebene Anstieg der nächtlichen Werte des systolischen und diastolischen Blutdrucks im Vergleich zu den Werten am Tag sowohl während der Basismessungen als auch unter AT-II-Behandlung.

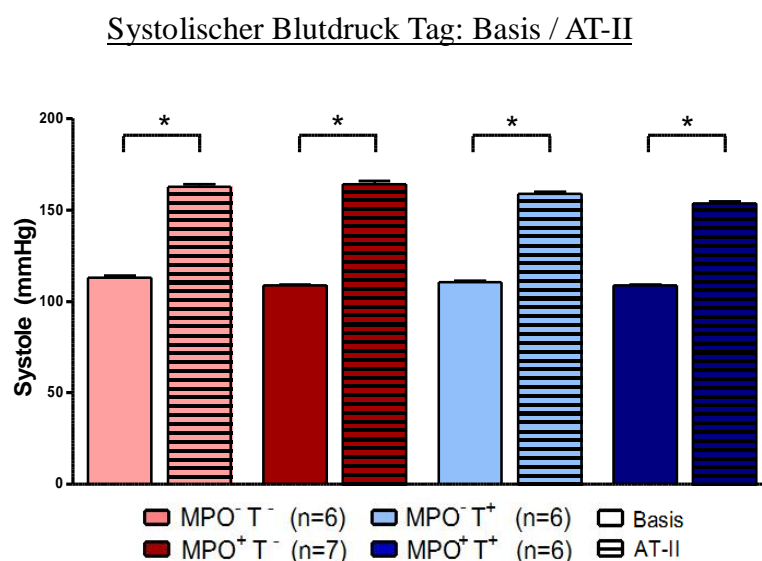


Abbildung 44: Systolischer Blutdruck: Vergleich des Mittelwertes der 5 Basismessungen gegenüber dem Mittelwert der Messungen unter AT-II-Behandlung (=letzte 3d AT-II-Gabe) am Tag [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. Alle Unterschiede innerhalb einer Gruppe zwischen Tag- und Nacht-Werten sowie zwischen Basis- und AT-II-Werten sind signifikant ( $p < 0,05$ ).



### Systolischer Blutdruck Nacht: Basis / AT-II

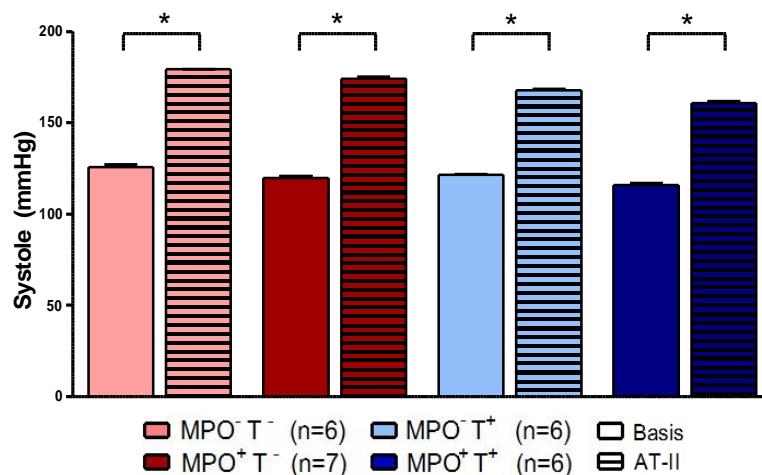


Abbildung 45: Systolischer Blutdruck: Vergleich des Mittelwertes der 5 Basismessungen gegenüber dem Mittelwert der Messungen unter AT-II-Behandlung (=letzte 3d AT-II-Gabe) in der Nacht [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. Alle Unterschiede innerhalb einer Gruppe zwischen Tag- und Nacht-Werten sowie zwischen Basis- und AT-II-Werten sind signifikant ( $p < 0,05$ ).

### Diastolischer Blutdruck Tag: Basis / AT-II

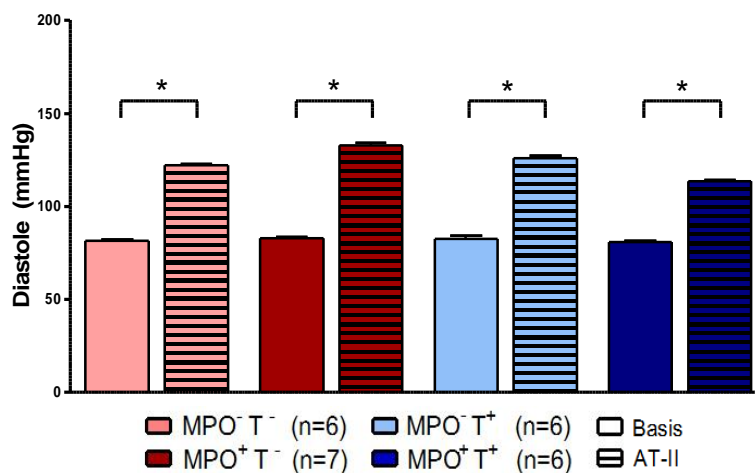


Abbildung 46: Diastolischer Blutdruck: Vergleich der 5 Basismessungen gegenüber den Messungen unter AT-II-Behandlung (=letzte 3d AT-II-Gabe) am Tag [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. Alle Unterschiede innerhalb einer Gruppe zwischen Basis- und AT-II-Werten sind signifikant ( $p < 0,05$ ).

### Diastolischer Blutdruck Nacht: Basis / AT-II

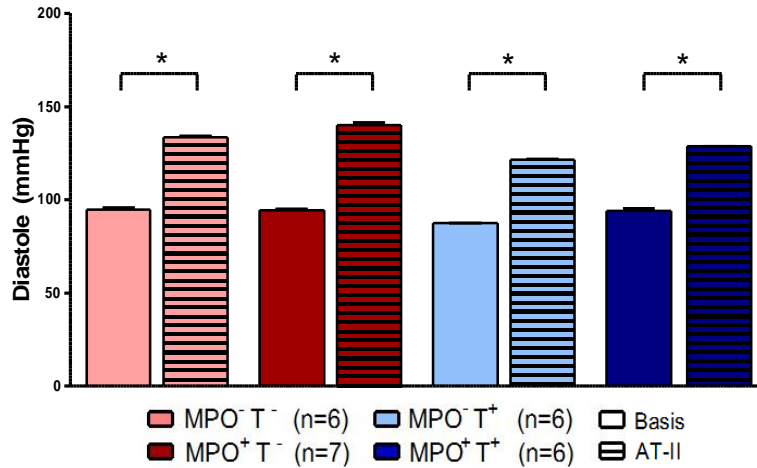


Abbildung 47: Diastolischer Blutdruck: Vergleich der 5 Basismessungen gegenüber den Messungen unter AT-II-Behandlung (=letzte 3d AT-II-Gabe) in der Nacht [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. Alle Unterschiede innerhalb einer Gruppe zwischen Basis- und AT-II-Werten sind signifikant ( $p < 0,05$ ).

### Blutdruckanstieg: Tag

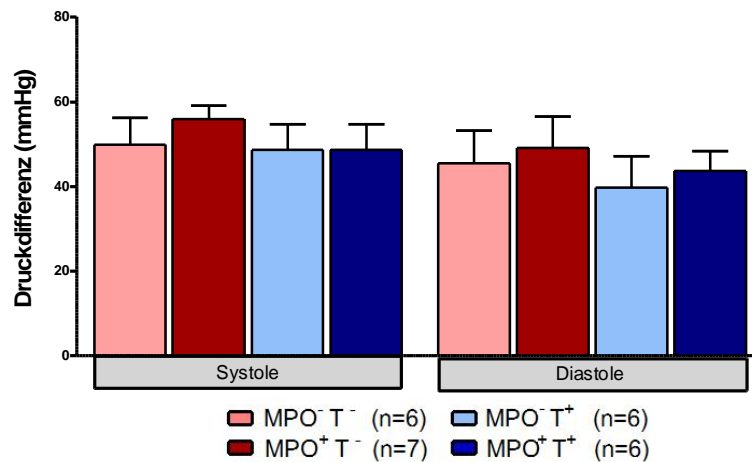


Abbildung 48: Blutdruckanstieg-Auswertung: Jeweils systolische und diastolische Druckdifferenz, berechnet aus der Differenz der Werte der AT-II-Messung (=letzte 3d AT-II Gabe) minus der Werte der Basismessungen am Tag. Statistische Testung: keine Signifikanz zwischen den verschiedenen Gruppen beziehungsweise zwischen Systole und Diastole [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM].

### Blutdruckanstieg: Nacht

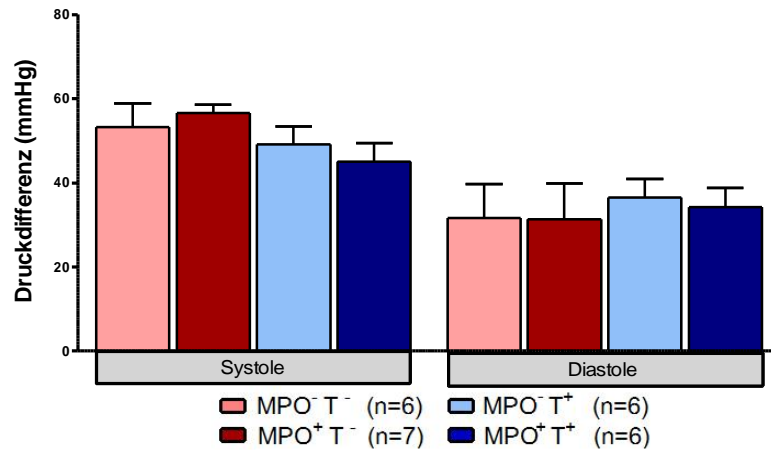


Abbildung 49: Blutdruckanstieg-Auswertung: Jeweils systolische und diastolische Druckdifferenz, berechnet aus der Differenz der Werte der AT-II-Messung (=letzte 3d AT-II Gabe) minus der Werte der Basismessungen in der Nacht. Statistische Testung: keine Signifikanz zwischen den verschiedenen Gruppen beziehungsweise zwischen Systole und Diastole [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM].

<b>Tag-Werte</b>	Syst.Blutdruck Basis (mmHg)	Syst.Blutdruck AT-II (mmHg)	systol. Blutdruck-Differenz: AT-II – Basis (mmHg)	Prozentualer Anstieg (%)
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	112,80	162,64	45,32	40,18
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	108,29	164,08	48,98	45,23
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	110,38	158,71	43,62	39,52
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	108,62	153,54	39,62	36,48
<b>Nacht-Werte</b>				
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	125,81	179,05	31,47	25,01
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	119,75	174,0	31,3	26,14
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	121,26	167,21	36,52	30,12
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	115,86	160,74	34,05	29,39

Tabelle 23: Systolischer Blutdruckanstieg unter AT-II: Differenz der Blutdruckwerte zwischen den letzten 3 Tage unter AT-II und den 5 Basismessungen [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM] für Systole und Diastole. Die mittlere Differenz ist in Prozent vom diastolischen Blutdruckwert angegeben.

<b>Tag- Werte</b>	diast.Blutdruck Basis (mmHg)	diast.Blutdruck AT-II (mmHg)	diast. Blutdruck-Differenz: AT-II – Basis (mmHg)	Prozentualer Anstieg (%)
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	81,22	122,07	+45,32	55,80
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	82,48	132,61	+48,98	59,38
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	82,2	125,8	+43,62	53,07
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	80,69	113,19	+39,62	49,10
<b>Nacht-Werte</b>				
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	94,54	133,38	+31,47	33,29
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	94,37	139,93	+31,3	33,17
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	87,23	121,37	+36,52	41,87
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	93,94	128,6	+34,05	36,25

Tabelle 24: Diastolischer Blutdruckanstieg unter AT-II: Differenz der Blutdruckwerte zwischen den letzten 3 Tage unter AT-II und den 5 Basismessungen [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM] für Systole und Diastole. Die mittlere Differenz ist in Prozent vom diastolischen Blutdruckwert angegeben.

Im Vergleich der Anstiege des systolischen und diastolischen Blutdrucks mit Beginn der AT-II-Behandlung zeigt sich in der Differenz-Auswertung (Abbildungen 48 und 49) keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppen untereinander vergleichend präsentieren sich weder in den Absolut-Werten noch in der Differenz-Auswertung signifikante Unterschiede.

## Herzfrequenz

Im Vergleich zum Blutdruck unterliegt die Herzfrequenz schon unter physiologischen Bedingungen einer permanenten Adaptation an die aktuelle hämodynamische Situation des Körpers, was die tendenziell größere Streuung der ermittelten Werte erklärt.

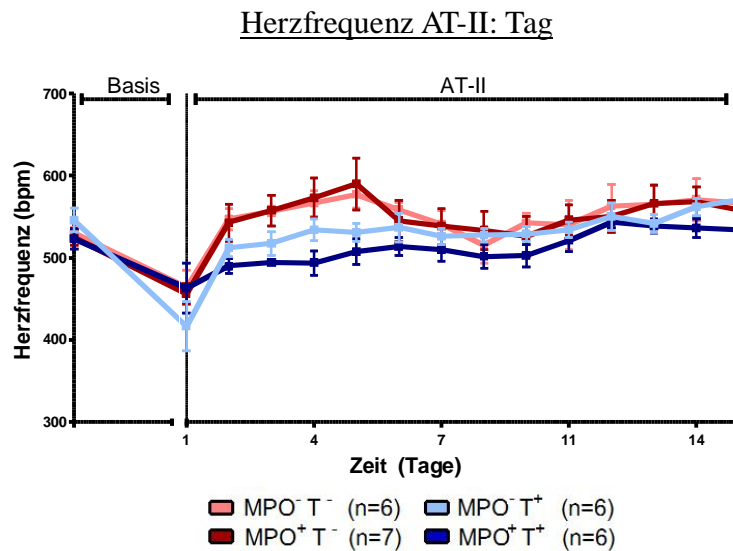


Abbildung 50: Herzfrequenz: Zeitlicher Verlauf am Tag. „Basis“ entspricht der letzten Basismessung vor Beginn der 14tägigen AT-II Gabe [arithmetische Mittelwerte/d  $\pm$  SEM].

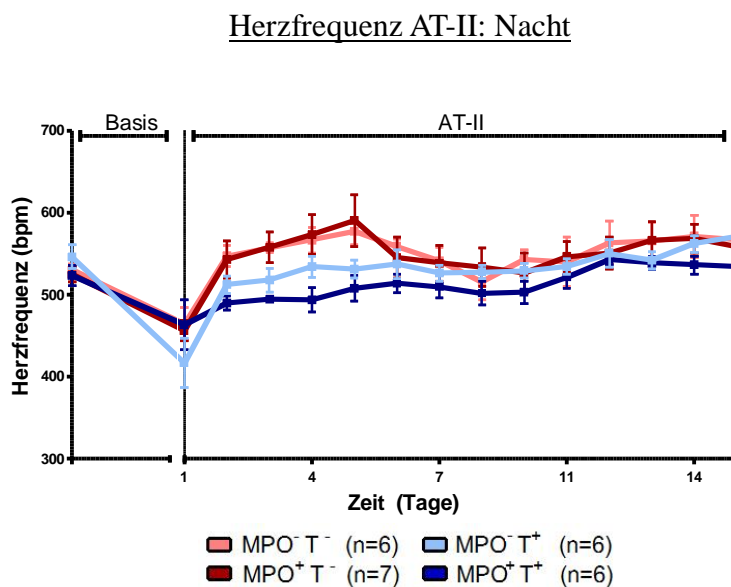


Abbildung 51: Herzfrequenz: Zeitlicher Verlauf bei Nacht. „Basis“ entspricht der letzten Basismessung vor Beginn der 14tägigen AT-II Gabe [arithmetische Mittelwerte/d  $\pm$  SEM].

### Herzfrequenz-Messung Basis/AT-II: Tag

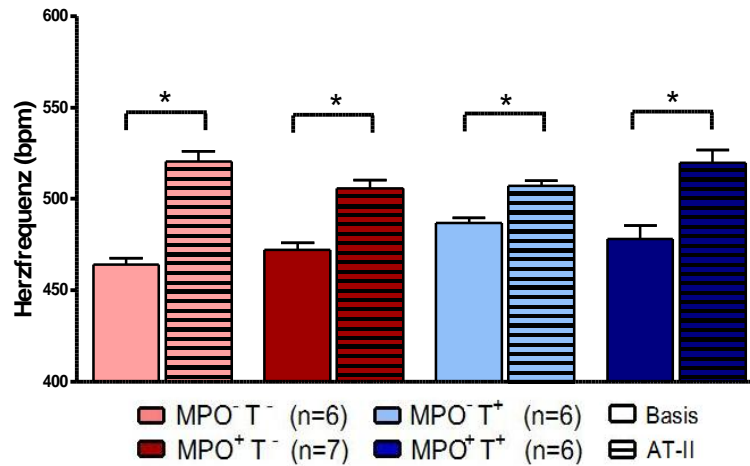


Abbildung 52: Herzfrequenz: Vergleich aller 5 Basismessungen gegenüber den letzten 3 Tagen der AT-II-Gabe am Tag [arithmetische Mittelwerte/h ± SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \*Die Herzfrequenzen der markierten Gruppen sind im Vergleich zwischen den Basismessungen und der AT-II-Behandlung unter AT-II-Gabe signifikant erhöht.

### Herzfrequenz-Messung Basis/AT-II: Nacht

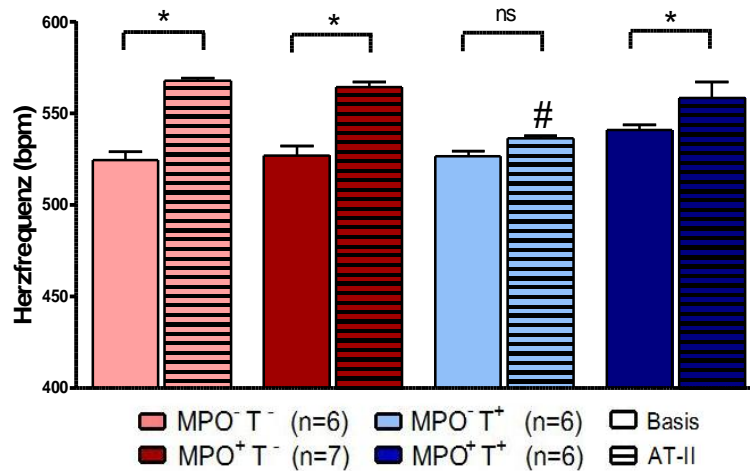


Abbildung 53: Herzfrequenz: Vergleich aller 5 Basismessungen gegenüber den letzten 3 Tagen der AT-II-Gabe in der Nacht [arithmetische Mittelwerte/h ± SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \*Die Herzfrequenzen der markierten Gruppen sind im Vergleich zwischen den Basismessungen und der AT-II-Behandlung unter AT-II-Gabe signifikant erhöht. #MPO<sup>+</sup> T<sup>+</sup> Gruppe zeigt gegenüber den anderen Gruppen unter AT-II-Gabe in der Nacht signifikant erniedrigte Herzfrequenzen.

### Zirkadianer Verlauf Herzfrequenz: Basis / AT-II

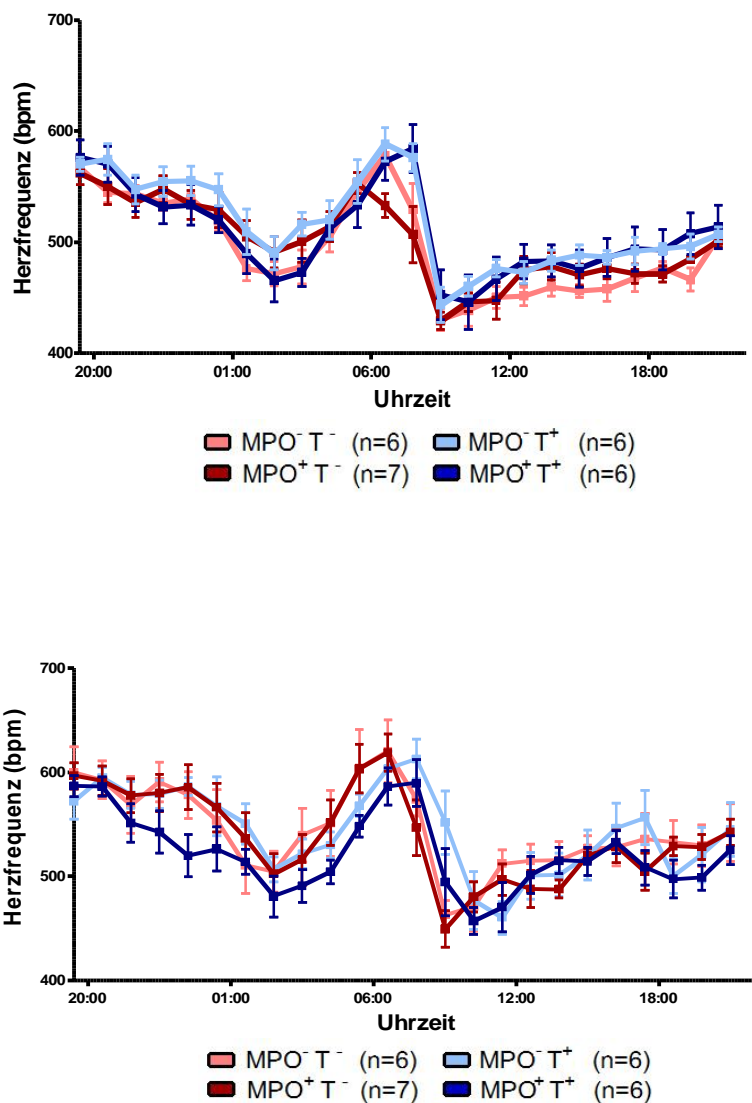


Abbildung 54: Vergleich des zirkadianen Verlaufs der Herzfrequenz der letzten Basismessung (oben) mit dem Verlauf des letzten Tages unter AT-II-Gabe (unten) [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]

Zirkadianer Verlauf Herzfrequenz AT-II: Herzfrequenz / Aktivität

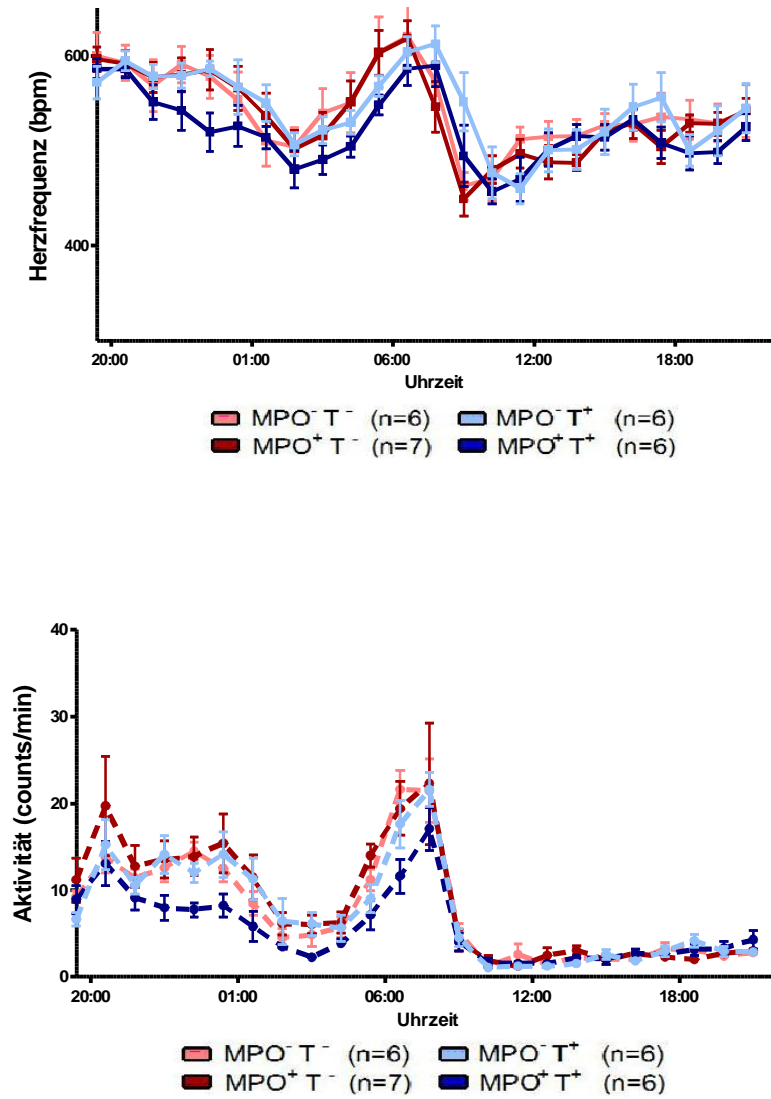


Abbildung 55: Vergleich des zirkadianen Verlaufes der Herzfrequenz am letzten Tage der AT-II Gabe (oben) mit der zirkadianen Aktivität des gleichen Tages (unten) [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM].



<b>Herzfrequenz</b>				
<b>Tag-Werte</b>	Basis (Schläge/min)	AT-II (Schläge/min)	Mittlere Differenz	P-Wert
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	463,9 ± 3,6	520,4 ± 5,9	+12%	*
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	472,3 ± 3,7	505,7 ± 4,6	+7%	*
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	486,8 ± 3,0	507 ± 3,0	+4%	*
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	478,1 ± 7,5	519,9 ± 6,8	+8%	*
<b>Nacht-Werte</b>				
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	524,7 ± 4,1	567,7 ± 1,6	+8%	*
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	526,6 ± 5,7	564,1 ± 3,1	+7%	*
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	526,5 ± 2,8	536,4 ± 1,2	+2%	> 0,05
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	540,6 ± 2,9	558,2 ± 8,5	+3%	*

Tabelle 25: Herzfrequenz : Vergleich der Mittelung aller 5 Basismessungen gegenüber den letzten 3 Tagen unter AT-II [arithmetische Mittelwerte ± SEM] und deren mittlere Differenz in Prozent in Bezug auf den Basiswert. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test.

Unter AT-II- Behandlung zeigen sich gruppeninterne Schwankungen der Herzfrequenz, die sich in allen 4 Populationen in vergleichbarem Ausmaß manifestieren.

Des weiteren kann in allen Gruppen ein initialer nächtlicher Abfall der Herzfrequenz nach Applikation der Pumpen festgestellt werden, der innerhalb von 2-3 Tage voll reversibel ist.

Der zirkadiane Verlauf der Herzfrequenz zeigt sich von der AT-II-Behandlung gänzlich unbeeinflusst.

Im Vergleich der arithmetischen Mittelwerte der letzten drei Tage unter AT-II-Behandlung gegenüber den Basismessungen kommt es in allen 4 Versuchsgruppen zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz am Tag. Die am Tag erhöhten Werte für die Herzfrequenz in den Basismessungen der MPO<sup>+</sup>T<sup>+</sup> Gruppe wurde bereits oben beschrieben (s. 4.2.2. „Herzfrequenz“). In der Nacht kommt es ebenfalls zu einem Anstieg der Herzfrequenz, der der in allen Gruppen außer in der MPO<sup>+</sup>T<sup>+</sup> Gruppe ebenfalls Signifikanz-Niveau erreicht. Die absoluten Herzfrequenzwerte der MPO<sup>+</sup>T<sup>+</sup> Gruppe sind nun ähnlich den Blutdruckwerten ebenfalls signifikant gegenüber den anderen drei Gruppen erniedrigt (p<0,05, Statistische Testung mit One-Way-Anova und anschließendem Newmann-Keuls-Test). Dies macht auch in der Interpretation der Herzfrequenzwerte eine aktivitätsnormierte Auswertung notwendig.

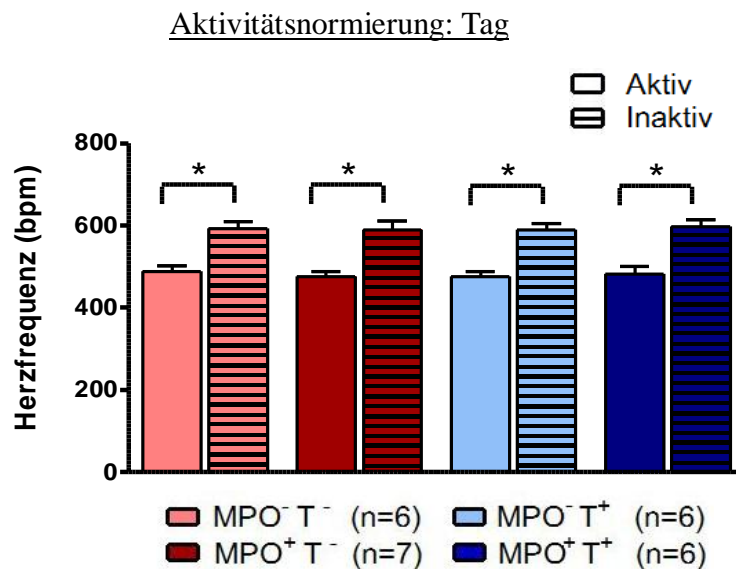


Abbildung 56: Herzfrequenz: Tag-Verteilung der Werte auf die 2 Aktivitäts-Cluster „inaktiv“ und „aktiv“ zur aktivitätsunabhängigen Normierung der Herzfrequenz-Messwerte [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \* Die Herzfrequenzen aller Gruppen sind im Cluster der erhöhten Aktivität gegenüber dem Cluster der fehlenden Aktivität signifikant erhöht.

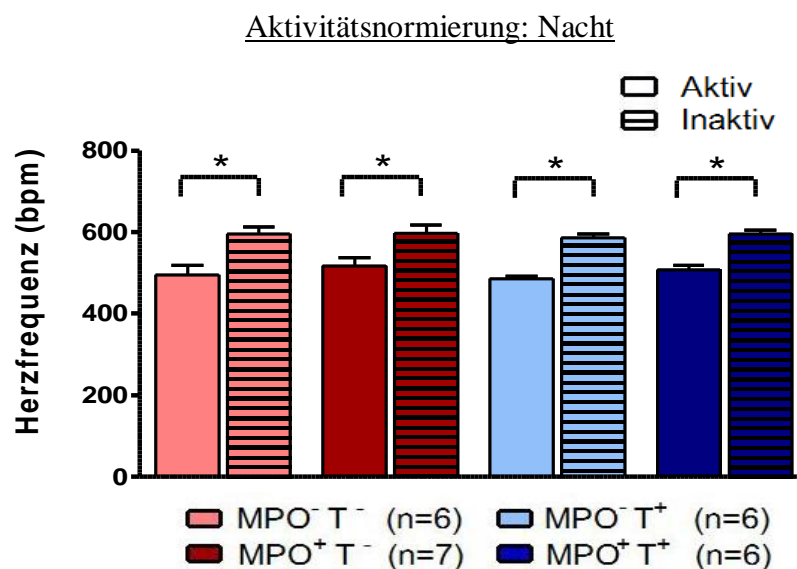


Abbildung 57: Herzfrequenz: Nacht-Verteilung der Werte auf die 2 Aktivitäts-Cluster „inaktiv“ und „aktiv“ zur aktivitätsunabhängigen Normierung der Herzfrequenz-Messwerte [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \* Die Herzfrequenzen aller Gruppen sind im Cluster der erhöhten Aktivität gegenüber dem Cluster der fehlenden Aktivität signifikant erhöht.

Die Auswertung der Herzfrequenz-Werte durch die Aktivitäts-Normierung (genaues Vorgehen s. 4.2.2. „Blutdruck“) ergibt am Tag als auch in der Nacht einen signifikanten Anstieg der Herzfrequenzen aller Versuchsgruppen im Cluster der erhöhten Aktivität gegenüber dem Cluster der fehlenden Aktivität. Innerhalb den Gruppen zeigen sich in dieser Auswertung keine signifikanten Unterschiede.

### Aktivität

Die Tages-Aktivität fällt unter AT-II-Gabe innerhalb aller Gruppen im Vergleich zu den Messungen vor AT-II-Gabe signifikant ab, ohne dass zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede auftreten.

Im Verlauf kommt es unmittelbar nach Beginn der Therapie zu einem Einbruch der nächtlichen Aktivität in allen 4 Versuchsgruppen. Ein anschließender Wiederanstieg der nächtlichen Aktivitäten reicht bis zum Ende der Versuchsreihe nur annähernd an die Ausgangswerte heran (s. Abbildung 58 und 59). Dieser Beobachtung folgend wurden für den Vergleich der Mittelwerte unter AT-II nur die letzten 3 Tage der AT-II-Behandlung herangezogen.

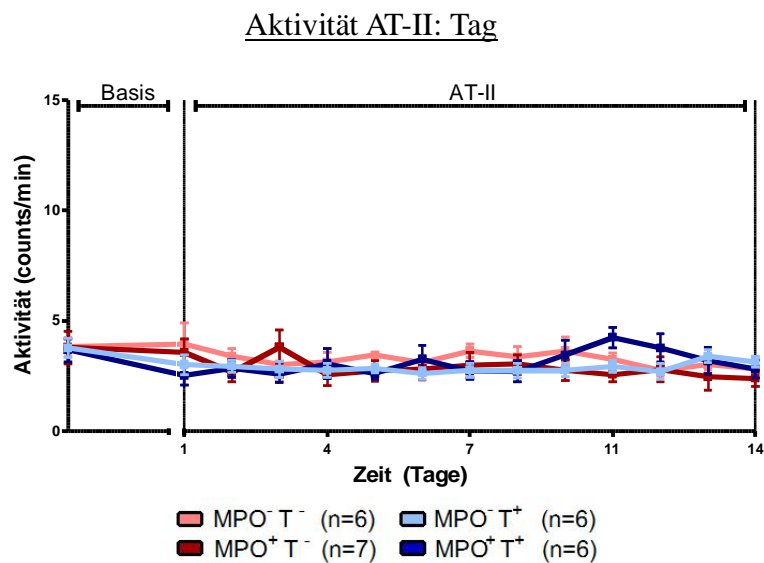


Abbildung 58: Aktivität: Zeitlicher Verlauf am Tag (l. „Basis“ entspricht der letzten Basismessung vor Beginn der 14tägigen AT-II Gabe [arithmetische Mittelwerte/d ± SEM]).

### Aktivität AT-II: Nacht

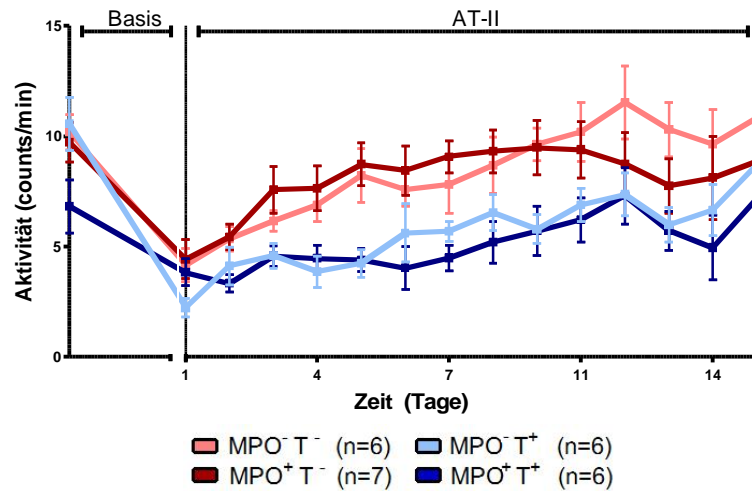


Abbildung 59: Aktivität: Zeitlicher Verlauf in der Nacht. „Basis“ entspricht der letzten Basismessung vor Beginn der 14tägigen AT-II Gabe [arithmetische Mittelwerte/d ± SEM].

### Aktivität Basis / AT-II: Tag

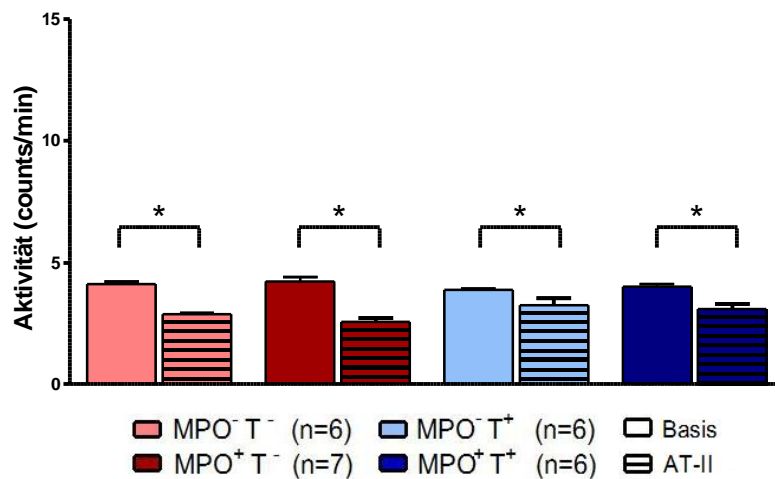


Abbildung 60: Aktivität Tag: Vergleich der 5 Basismessungen gegenüber den letzten 3 Tagen der AT-II-Gabe [arithmetische Mittelwerte/h ± SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \*Die Aktivitätswerte der Gruppen unter AT-II sind im Vergleich zwischen Basis und AT-II-Behandlung signifikant erniedrigt.

Aktivität Basis / AT-II: Nacht

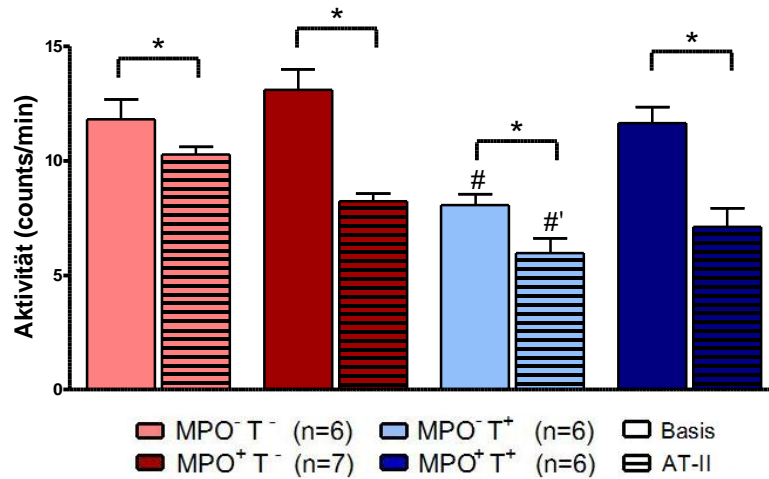
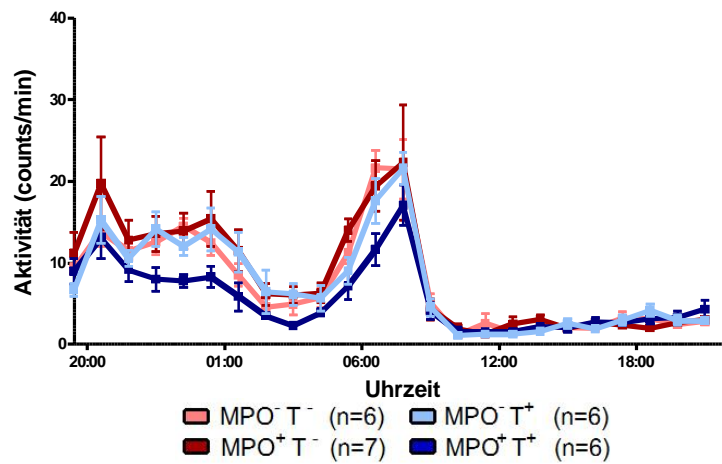


Abbildung 61: Aktivität Nacht: Vergleich der 5 Basismessungen gegenüber den letzten 3 Tagen der AT-II-Gabe [arithmetische Mittelwerte/h ± SEM]. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \*Die Aktivitätswerte der Gruppen unter AT-II sind im Vergleich zwischen Basis und AT-II-Behandlung signifikant erniedrigt. #Unter Basisbedingungen ist das Aktivitätsniveau der MPO<sup>+</sup> T<sup>+</sup> Gruppe gegenüber den Aktivitätsniveaus der anderen 3 Gruppen in der Nacht signifikant erniedrigt. #' Unter AT-II-Gabe ist das Aktivitätsniveau der MPO<sup>-</sup> T<sup>+</sup> Gruppe gegenüber MPO<sup>-</sup> T<sup>-</sup> in der Nacht signifikant erniedrigt.

### Zirkadianer Verlauf Aktivität: Basis



### Zirkadianer Verlauf Aktivität: AT-II

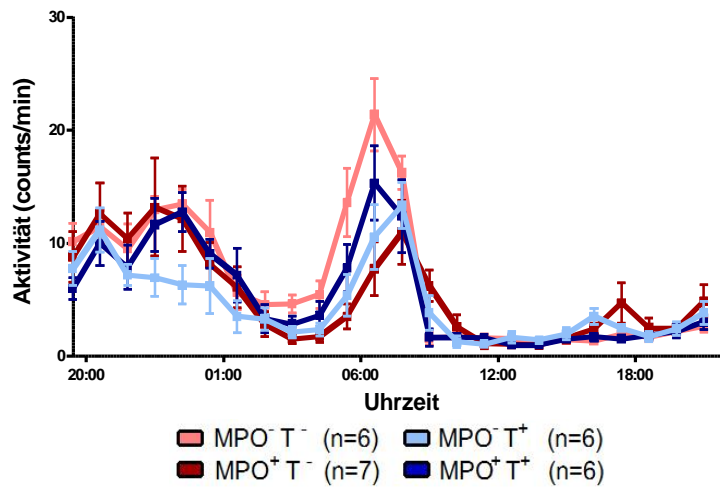


Abbildung 62: Aktivität: Vergleich des zirkadianen Verlaufs der letzten Ruhemessung (oben) gegen den zirkadianen Verlauf der letzten Messung unter AT-II (unten)

<b>Aktivität</b>				
<b>Tag - Werte</b>	Basis (Ereignisse/min)	AT-II (Ereignisse/min)	Mittlere Differenz	P-Wert
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	4,13 ± 0,10	3,06 ± 0,07	-22%	*
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	4,11 ± 0,18	2,79 ± 0,13	-32%	*
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	3,88 ± 0,07	3,26 ± 0,27	-11%	*
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	4,01 ± 0,13	3,09 ± 0,20	-23%	*
<b>Nacht - Werte</b>				
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	11,44 ± 0,75	9,98 ± 0,33	-13%	>0,05
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	12,29 ± 0,51	8,63 ± 0,25	-30%	*
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	8,08 ± 0,46	5,96 ± 0,65	-26%	>0,05
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	11,65 ± 0,71	7,13 ± 0,82	-39%	*

Tabelle 26: Aktivität: Vergleich der Mittelung der 5 Basismessungen gegenüber den letzten 3 Tagen unter AT-II [arithmetische Mittelwerte ± SEM] deren mittlere, prozentuale Differenz in Bezug auf den Basis-Wert. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test.

Der Vergleich der arithmetischen Mittelwerte der letzten drei Nacht-Messungen unter AT-II-Behandlung im Vergleich zu den Basismessungen zeigt eine signifikante Abnahme der Aktivitätsniveaus aller 4 Gruppen mit einer generellen Zunahme der Streuung in allen Gruppen .

Im Vergleich zwischen den Gruppen waren die Aktivitätswerte der MPO<sup>+</sup>T<sup>+</sup> Gruppe unter AT-II-Gabe, entsprechend den Basis-Messungen, signifikant erniedrigt, jedoch unter AT-II nur im Vergleich mit der Gruppe MPO<sup>-</sup>T<sup>-</sup>.

Bei Betrachten der erniedrigten Aktivitäten muss jedoch die ansteigende Tendenz aller Versuchsgruppen im Zeitverlauf der AT-II-Behandlung beachtet werden. Durch einen verlängerten Messzeitraum unter AT-II-Gabe hätte somit möglicherweise noch der Ausgleich des Aktivitätsunterschiedes zu den Basismessungen beobachtet werden können.

### **4.3. Milzzellen-Analyse mittels Durchflusszytometrie**

Am Ende jedes Versuchsdurchgangs sollte die Untersuchung der Milzzellen aus den Versuchstieren eine differenzierte Aufschlüsselung der zellulären immunologischen Zusammensetzung in den Versuchstieren möglich machen. Dabei war die Überprüfung eines erfolgreichen T-Lymphozyten-Transfers von primärem Interesse.

Da alle Versuchstiere einen genetischen Rag Knockout Hintergrund zeigen, besitzen sie keine funktionellen T- und B-Lymphozyten und sollten daher keine CD4-Aktivität in der FACS-Auswertung zeigen, da diese Rezeptoren lediglich auf reifen T-Lymphozyten zu finden sind. Einigen der Tiere wurden im Versuchsverlauf T-Lymphozyten transferiert, so dass diese sich im FACS durch eine CD4-Aktivität von den Sham-transferierten Tieren abgrenzen sollten.

In unseren Analysen an Milzzellen zeigte sich jedoch in sämtlichen Versuchstieren ein konstantes, unspezifisches CD4-Aktivitäts-„Rauschen“ (s. Abbildung 63). Trotz Variation der eingesetzten Antikörper sowie auch in Untersuchungen an unbehandelten Rag-Knockout Mäusen konnte dieses unspezifische Zellrauschen nicht eliminiert werden. Dementsprechend muss die Milz als untersuchtes Organ für das eingesetzte Verfahren in dieser Studie als nicht geeignet erachtet werden.

Eine weitere Analyse des Phänomens konnte in anderen Versuchen einer parallel laufenden Studie die Untersuchung des Bluts als geeignetes Medium für die FACS-Analyse aufzeigen. Hier ließen sich die transferierten T-Lymphozyten spezifisch im Blut der betroffenen Tiere nachweisen, wohingegen sich in Sham-transferierten Tieren keine CD4-positiven Zellen zeigten.

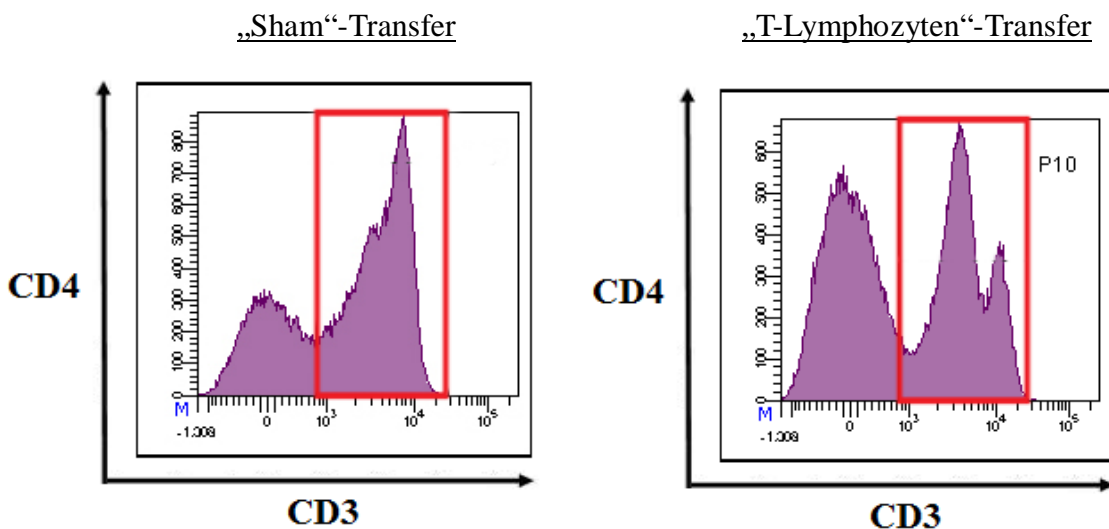


Abbildung 63: Beispielhafte Verteilung der CD3-positiven Signale innerhalb einer T-Zell transfundierten (links) und einer Sham-transfundierten (rechts) Maus mittels FACS Analyse.

Der eingerahmte Bereich definiert eine Signalintensität innerhalb derer man von einer CD4-Aktivität der Zellen ausgehen kann. Eine Detektion der transfundierten T-Lymphozyten ist anhand des dargestellten Signals nicht möglich.



## 4.4. Genotypisierung

Zur Verifizierung des korrekten genetischen Hintergrundes der Versuchstiere wurden in dieser Arbeit Genotypisierungen bei der Geburt, vor der T-Zell-Applikation und zum Versuchsende aus Ohr- oder Schwanzgewebe der Tiere angestrebt.

Fehler in der Züchtung und Verpaarung der verschiedenen Knockout-Linien, sowie eventuelle Vertauschungen im weiteren Verlauf der Experimente, sollten auf diese Weise ausgeschlossen werden.

Kurz nach der Geburt fand anhand einer ersten Genotypisierung die Auswahl der Tiere mit geeignetem Genotyp für die Studie statt. Zwei Versuchstiere, die aus der Zuchtbarriere falsch zugeordnet wurden und einen ungeeigneten Genotyp aufwiesen, konnten im späteren Verlauf durch eine weitere Genotypisierung aufgedeckt und aus der Studie ausgeschlossen werden (Tiere 4 und 7).

Einige Mäuse, die in den ersten beiden Genotypisierungen als MPO-Knockout in die Versuchsreihe gestartet waren, zeigten bei Versuchsende eine neue, schwache MPO-positive Bande als Ausdruck eines nachweisbaren MPO-Gens.

Die primäre Vermutung, das Phänomen beruhe auf methodischen Fehlern, wurde durch eine Wiederholung der Genotypisierung der betroffenen Mäuse unter Verwendung von Nierengewebe widerlegt, denn auch hier zeigten sich die beschriebenen neuen MPO-Wildtyp Banden.

In der weiteren Analyse des Phänomens zeigte sich, dass sämtliche betroffenen Tiere der gleichen Versuchsuntergruppe angehörten. Geboren als MPO-Knockout hatten alle Tiere eine T-Lymphozyten-Injektion aus Wildtyp-Tieren erhalten. Diese Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass die Ursache der neuen MPO-Bande durch die DNA der transferierten T-Lymphozyten aus Spender-MPO-Wildtyp-Mäusen (Typ C57Bl/6J) hervorgerufen wurde. Das beschriebene Phänomen konnte bei allen der insgesamt 6 ausgewerteten Tiere der MPO<sup>-</sup> T<sup>+</sup> Gruppe gezeigt werden und trat in keiner der anderen Versuchsgruppe auf.

Es gilt zu erwähnen, dass durch die Genotypisierung der Nachweis des MPO-Gens und nicht der MPO als Protein erfolgt. Da T-Lymphozyten Myeloperoxidase selbst nicht sezernieren, blieb der funktionelle MPO-Knockout auch in den transferierten Tieren erhalten.

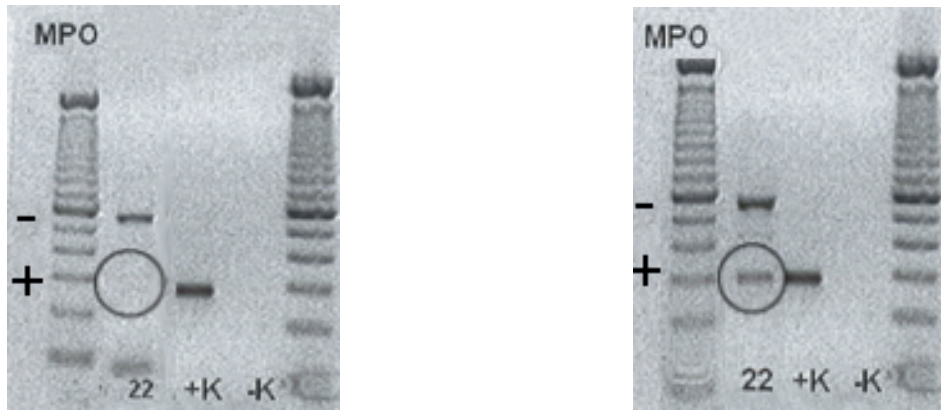


Abb.64: Exemplarische Gegenüberstellung der Genotypisierung einer MPO-Knockout-Maus vor (links) und nach (rechts) erfolgtem T-Zell-Transfer. Nach Transfer zeigt sich innerhalb des schwarzen Kreises ein 2. Balken auf Höhe der MPO-Positiv Kontrolle (K+) (Abbildung zur Verdeutlichung zugeschnitten).

## 4.5. Aorten-Untersuchung

Nach Versuchsende wurden die Aorten der 4 Gruppen auf ihre Relaxationsfähigkeit untersucht, um die durch die AT-II-Gabe auftretenden Endorganschäden in Form einer aortalen Dysfunktion zu detektieren und diesbezügliche Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppen zu bestimmen.

Um die AT-II behandelten Tiere mit unbehandelten Tieren vergleichen zu können wurden 4 zusätzliche Gruppen (alle Rag-Knockout; teilweise MPO Knockout) mit einer T-Lymphozyten/Sham-Injektion behandelt und ihnen im Anschluss statt der im Hauptversuch verwendeten AT-II-Pumpen als Sham-Versuch 0,9% NaCl befüllte Pumpen implantiert. Insgesamt wurden so 8 verschiedene Versuchsgruppen bezüglich ihrer aortalen Relaxationsfähigkeit verglichen (s.Tabelle 26).

Sham (NaCl 0,9%)	AT-II-Gabe
MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>	MPO <sup>-</sup> T <sup>-</sup>
MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	MPO <sup>+</sup> T <sup>-</sup>
MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	MPO <sup>+</sup> T <sup>+</sup>
MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	MPO <sup>-</sup> T <sup>+</sup>

Tab.26: Die 8 Versuchsgruppen der Aorten-Untersuchung

Es wurde die endothelabhängige (Ach-Gabe) und endothelunabhängige (NTG-Gabe) Relaxationsfähigkeit der Aorten untersucht. Zur Bestimmung des Relaxations-Minimums wurden die Aorten zunächst in Pufferlösung vollständig relaxiert.

Anschließend erfolgte mittels der Applikation des konstriktorisch wirkenden  $\text{PGF2}\alpha$  die Ermittlung des maximalen Kraftwertes bei vollständiger Kontraktion.

Durch die folgende Zugabe von zunächst ACh und in einem zweiter Versuchsdurchlauf, nach erneuter maximaler Kontraktion durch  $\text{PGF2}\alpha$ , von NTG in steigenden Konzentrationen wurden die Gefäße zunehmend relaxiert.

Die angegebenen Relaxationswerte beziehen sich auf den prozentualen Anteil der Relaxation ausgehend von den durch maximale Kontraktion erzeugten Kraftwerten.

Für die Abbildungen 4.10.1. wurden alle Punkte an eine Hill-Kurve angenähert. Der R<sup>2</sup>-Koeffizient, ein Faktor für die Qualität der Näherung beider Kurven lag dabei zwischen 80 und 98, mit Ausnahme der  $\text{MPO}^- \text{T}^-$  Gruppe (s.u.).

Sowohl in der endothelabhängigen (ACh) als auch endothelunabhängigen (NTG) Reaktion zeigt sich eine kontinuierliche, sigmoidale Zunahme der Relaxation in allen Gruppen bei steigender ACh/NTG - Konzentration.

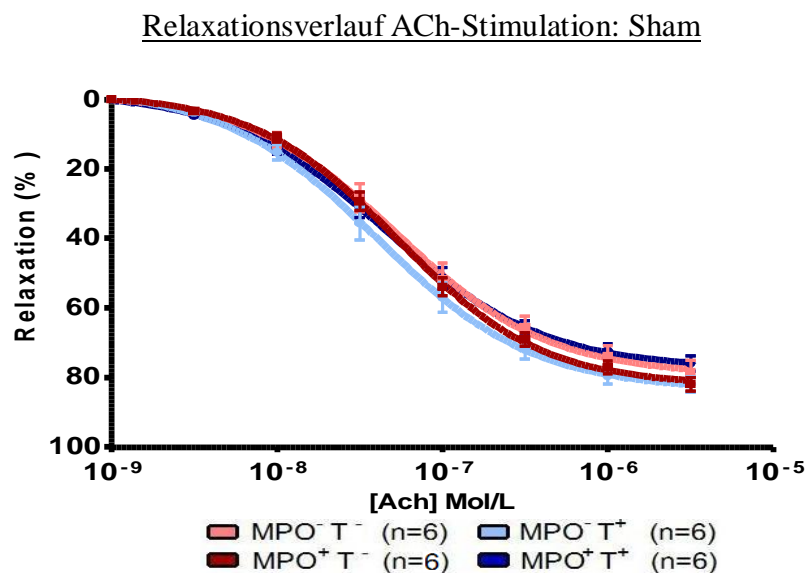


Abb.65: Übersichtsabbildung: Relaxation der Aorten aus unbehandelten Aorten auf steigende ACh- (=endothel-abhängige Reaktion) Konzentrationen.

### Relaxationsverlauf ACh-Stimulation: AT-II

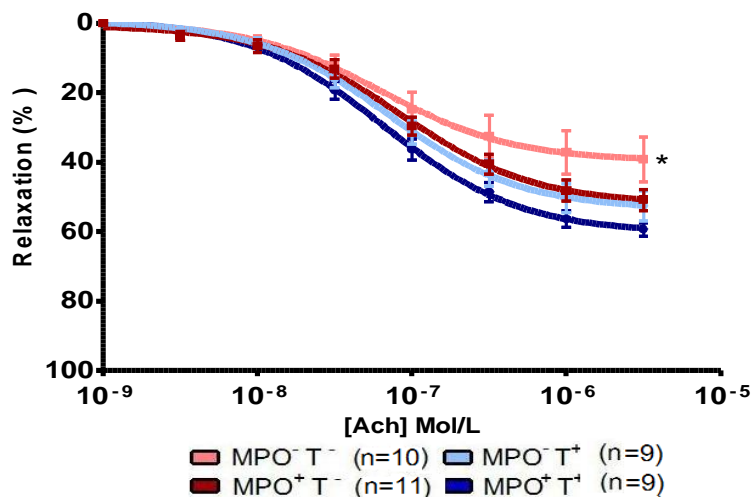


Abb.66: Übersichtsabbildung: Relaxation der Aorten aus AT-II-behandelten Aorten auf steigende ACh- (=endothel-abhängige Reaktion) Konzentrationen. \*Die eingezeichnete Signifikanz bezieht sich auf die ermittelten Maximal-Werte der Relaxation: Die Relaxierbarkeit der AT-II behandelten MPO<sup>-</sup>T<sup>-</sup> Gruppe ist gegenüber den anderen 3 AT-II-behandelten Gruppen signifikant vermindert (s.Abbildung 69).

### Relaxationsverlauf NTG-Stimulation: Sham

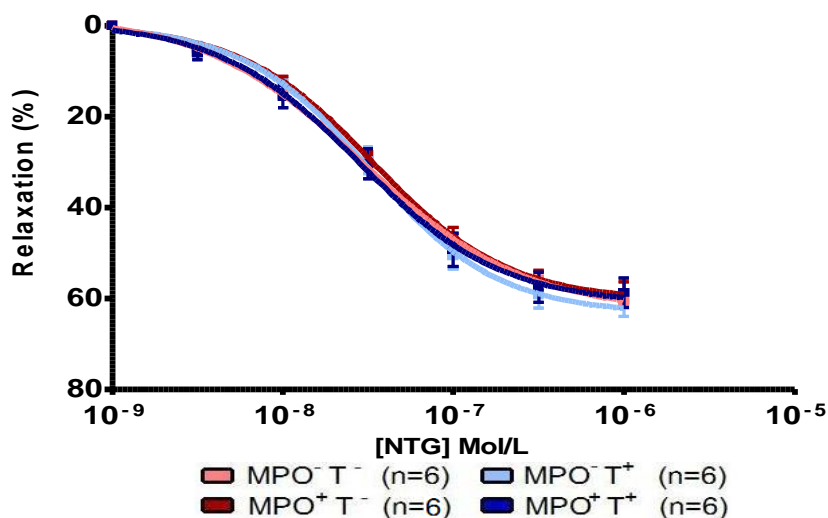


Abb.67: Übersichtsabbildung: Relaxation der Aorten aus unbehandelten Aorten auf steigende NTG- (=endothel-unabhängige Reaktion) Konzentrationen.

### Relaxationsverlauf NTG-Stimulation: AT-II

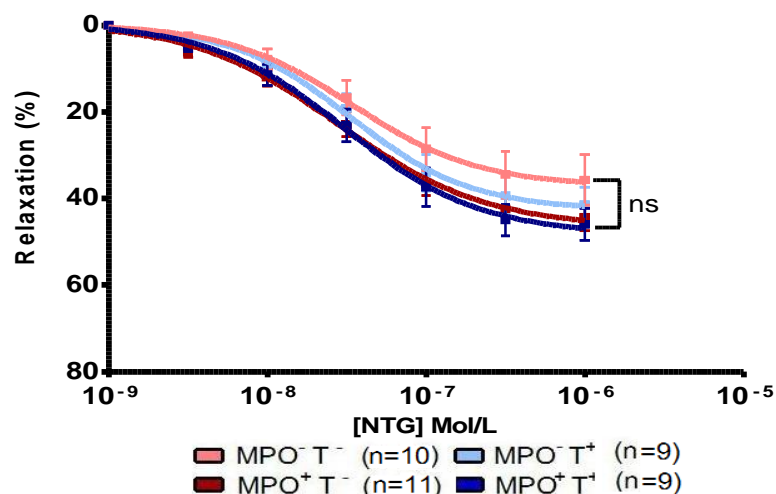


Abb.68: Übersichtsabbildung: Relaxation der Aorten aus AT-II-behandelten Aorten auf steigende NTG- (=endothel-unabhängige Reaktion) Konzentrationen. Die eingezeichnete Testung bezieht sich auf die ermittelten Maximal-Werte der Relaxation: Die Relaxierbarkeit der AT-II behandelten MPO<sup>-</sup>T<sup>-</sup> Gruppe ist gegenüber den anderen 3 AT-II-behandelten Gruppen unter NTG-Stimulation nicht signifikant erniedrigt (s.Abbildung 70).

### Max.Relaxation: ACh-Stimulation

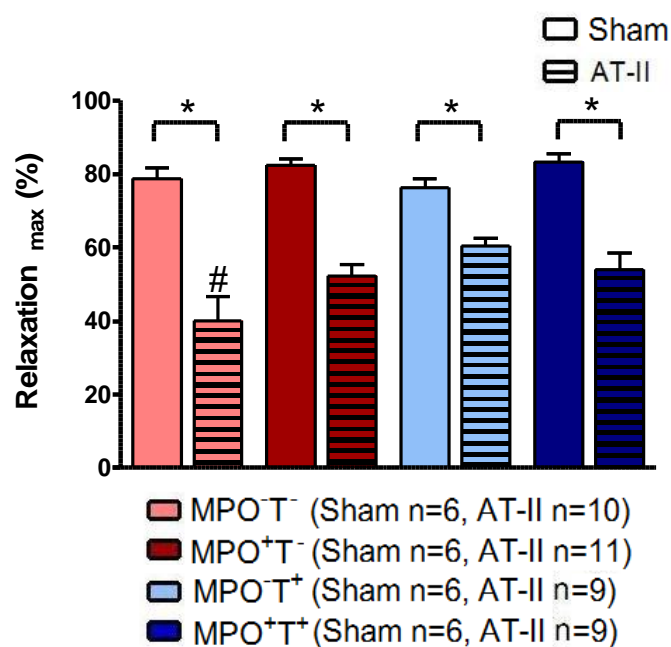


Abb.69: Maximale Relaxationsantwort der Aorten aus Sham- und AT-II-behandelten Aorten auf ACh(links)- und NTG(rechts). Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test.

Die Relaxierbarkeit aller AT-II behandelten Aorten ist im Vergleich zu den unbehandelten Aorten signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ). # Die Relaxierbarkeit der AT-II behandelten MPO<sup>-</sup>T<sup>-</sup> Gruppe ist gegenüber den anderen 3 AT-II-behandelten Gruppen signifikant erniedrigt.

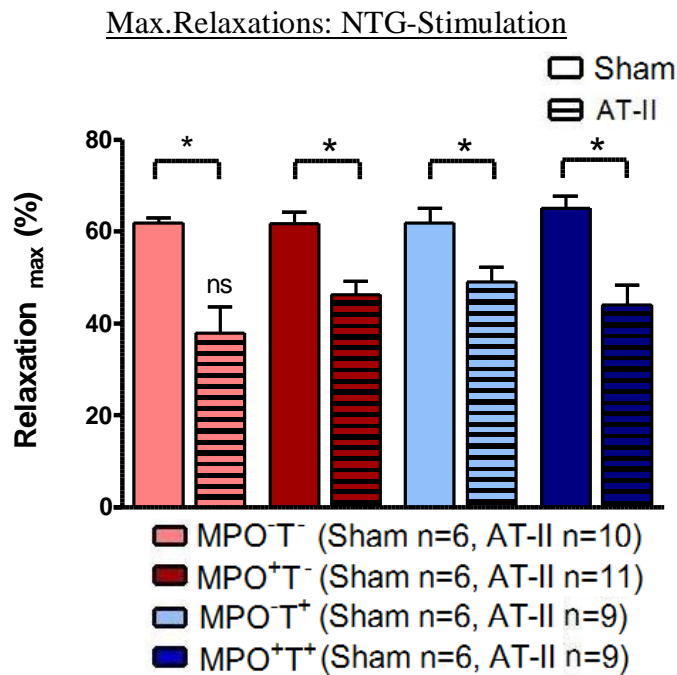


Abb.70: Maximale Relaxationsantwort der Aorten aus Sham- und AT-II-behandelten Aorten auf ACh(links)- und NTG(rechts). Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. Die Relaxierbarkeit aller AT-II behandelten Aorten ist im Vergleich zu den unbehandelten Aorten signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ). # Die Relaxierbarkeit der AT-II behandelten MPO<sup>-</sup>T<sup>-</sup> Gruppe ist gegenüber den anderen 3 AT-II-behandelten Gruppen signifikant erniedrigt.

### Log-EC50: ACh-Stimulation

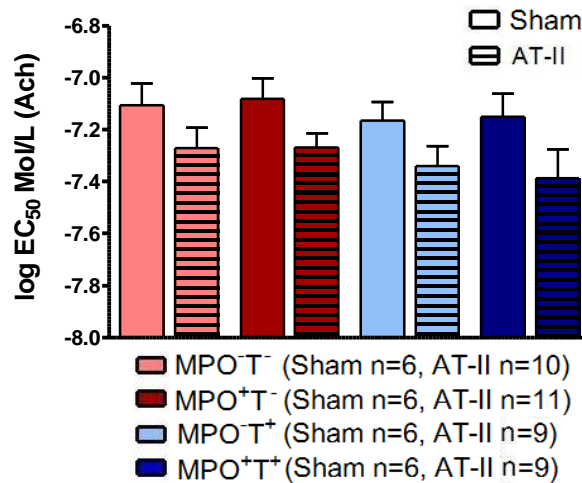


Abb.71: Log EC<sub>50</sub>-Werte der Dosis-Wirkungs-Kurven von Aorten aus Sham- und AT-II-behandelten Aorten unter ACh-Relaxation. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

### Log-EC50: NTG-Stimulation

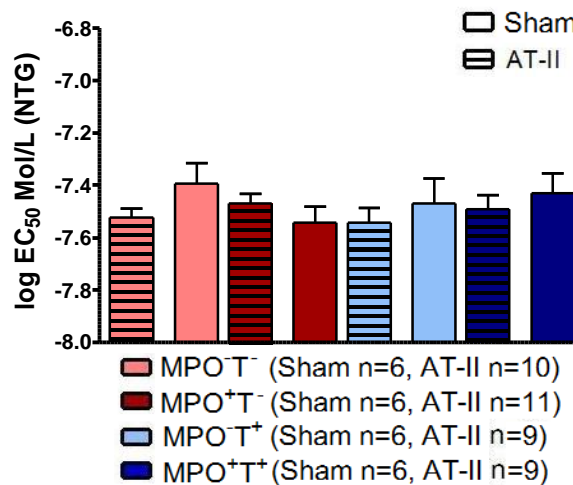


Abb.72: Log EC<sub>50</sub>-Werte der Dosis-Wirkungs-Kurven von Aorten aus Sham- und AT-II-behandelten Aorten unter NTG-Relaxation. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

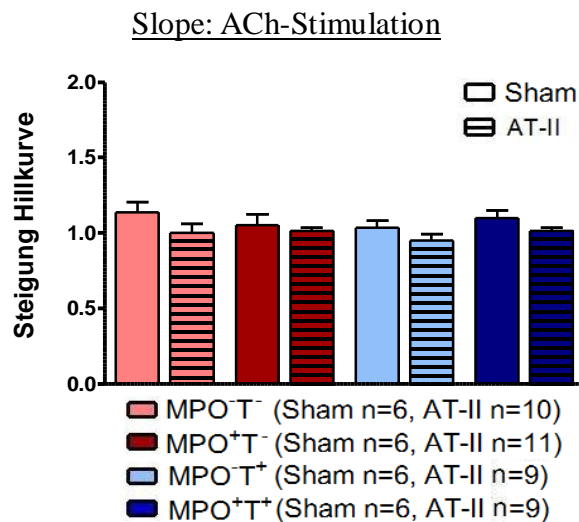


Abb.73: Slope-Werte der Dosis-Wirkungs-Kurve von Sham- und AT-II-behandelten Aorten unter ACh-Relaxation. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

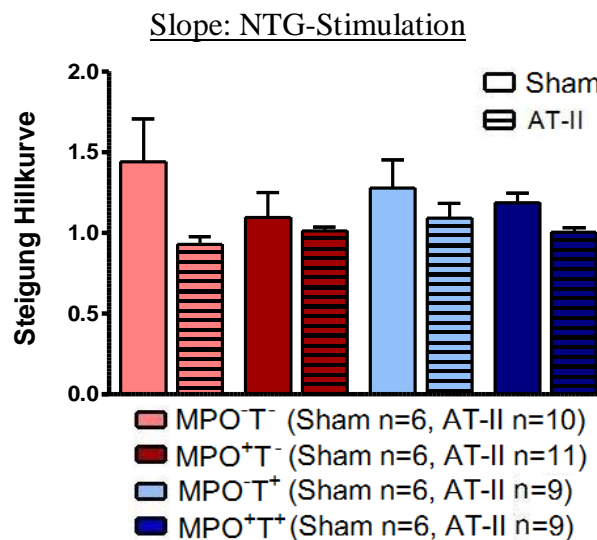


Abb.74: Slope-Werte der Dosis-Wirkungs-Kurve von Sham- und AT-II-behandelten Aorten unter NTG-Relaxation. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

Die Auswertung der aus den Hill Kurven gewonnenen Parameter zeigt eine erniedrigte maximale Relaxationsfähigkeit aller Aorten aus mit AT-II behandelten Tieren im Vergleich zu den Gefäßen aus unbehandelten Tieren. Dies wird sowohl aus den Übersichtsabbildungen als auch in Bezug auf die maximale Relaxationsantwort der Näherungskurve ersichtlich und gilt sowohl unter ACh- als auch unter NTG-Stimulation der Aorten. (p für alle Gruppen <0,05).



Innerhalb der AT-II behandelten Gruppen zeigt sich unter ACh-Stimulation in der Betrachtung der maximalen Relaxationswerte eine signifikant erniedrigte Relaxation der Aortenringe der Gruppe MPO<sup>-</sup>T<sup>-</sup> gegenüber den Aorten der anderen AT-II-behandelten Gruppen ( $p < 0,05$ ).

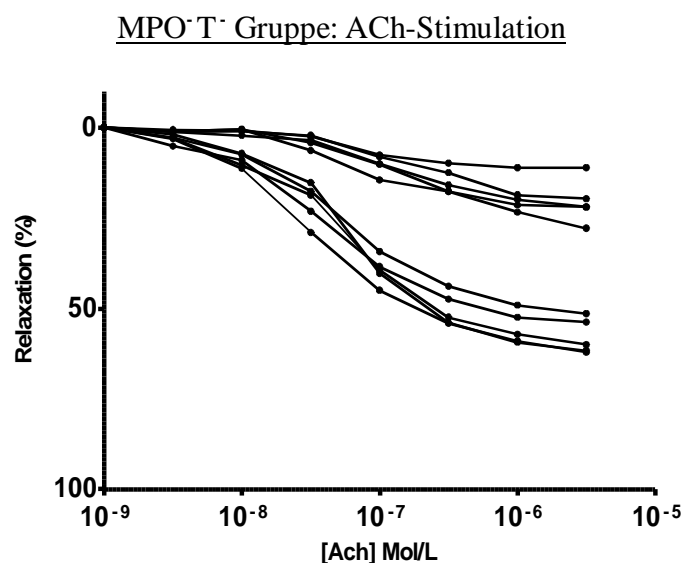
Die Betrachtung der NTG-vermittelten Relaxation ergibt keine gruppenvergleichenden Unterschiede, wenngleich auch hier die Aorten der Gruppe MPO<sup>-</sup>T<sup>-</sup> die geringste maximale Relaxation aufweisen.

In der Analyse der Slope-Werte sowie der mittleren, effektiven Konzentration (LogEC50) der Hill-Kurven sind keine Unterschiede zwischen den 8 verschiedenen Versuchsgruppen sichtbar (alle statistischen Testungen mit One-Way-Anova und anschließendem Newmann-Keuls-Test).

Die beschriebene signifikante Differenz der MPO<sup>-</sup>T<sup>-</sup> Gruppe zu den anderen Gruppen veranlasste uns zu einer genaueren Analyse der einzelnen Werte jedes Tieres (s. Abbildung 75). Während eine Teilgruppe der Tiere ( $n = 4$ ) unter ACh-Stimulation eine, mit den anderen Gruppen vergleichbare maximale Relaxationsfähigkeit der Aorten zeigt (51% bis 61%), ist die Relaxationsfähigkeit der Aorten der anderen Teilgruppe ( $n = 4$ ) deutlich eingeschränkt (11% bis 27%).

Unter NTG-Relaxation zeigten zwei Tiere eine deutlich bessere Relaxation als unter ACh-Relaxation, die für die gesamte Kohorte eine Anhebung des arithmetischen Mittelwertes zur Folge hat und sich somit kein signifikanter Unterschied im Vergleich mit den anderen 3 AT-II behandelten Gruppen unter NTG-Relaxation einstellt. Die beschriebene Teilung innerhalb dieser Gruppe bleibt aber deutlich erkennbar.

Diese verbesserte NTG-Relaxation lässt vermuten, dass der Gefäßschaden der betroffenen Aorten sich auf das Endothel konzentriert, das das angebotene ACh-Signal nicht zur Relaxation nutzen kann.



#### MPO<sup>-</sup>T<sup>-</sup> Gruppe: NTG-Stimulation

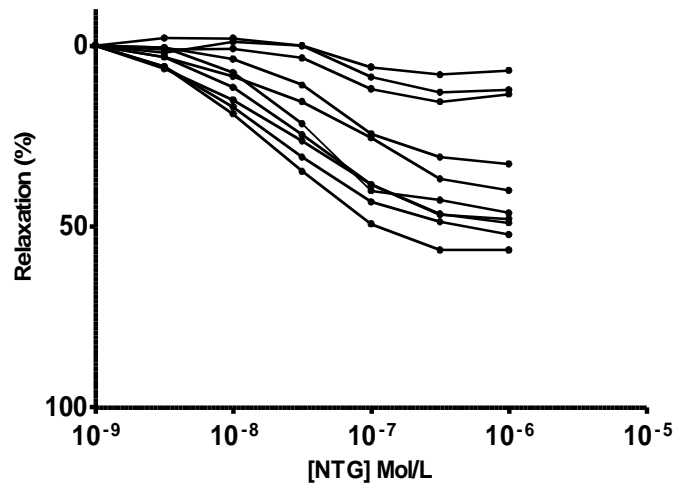


Abbildung 75: Einzelmessungen der ACh- und NTG-Relaxation in der Versuchsgruppe MPO<sup>-</sup>T<sup>-</sup>.

## 4.6. Aorten-Histologie

Als weitere Untersuchung der Gefäßveränderungen wurden Stichproben der Aorten aller 4 Versuchsgruppen einer histologischen Auswertung unterzogen. Zur Untersuchung der Auswirkung der AT-II-Behandlung wurden zusätzliche histologische Schnitte von unbehandelten C57Bl6 Wildtyp-Mäusen sowie Rag Knockout-Tieren durchgeführt.

Zum Ausgleich gewichtsbedingter Unterschiede wurde ein Quotient aus der Fläche beziehungsweise der Dicke der Aorten und dem Gewicht der jeweiligen Maus erstellt [Fläche(μm<sup>2</sup>)/Gewicht(g), bzw. Dicke(μm)/Gewicht(g)].

Weder in der Analyse der Media-Flächen noch der Media-Dicken der untersuchten Aorten zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den vier AT-II behandelten Versuchsgruppen. Die mit AT-II behandelten Aorten sind jedoch, mit Ausnahme der Gruppe MPO<sup>-</sup>T<sup>+</sup>, bezüglich ihrer Media-Fläche und -Dicke gegenüber den Aorten der unbehandelten Gruppen signifikant erhöht. Die Aorten-Dicke der MPO<sup>-</sup>T<sup>+</sup> Gruppe ist zwar tendenziell ebenfalls im Vergleich zu den Aorten der unbehandelten Gruppen erhöht, erreicht aber keine Signifikanz. Die Untersuchung erscheint grundsätzlich als weitere Nachweis-Möglichkeit AT-II vermittelter Gefäßwandveränderungen geeignet.

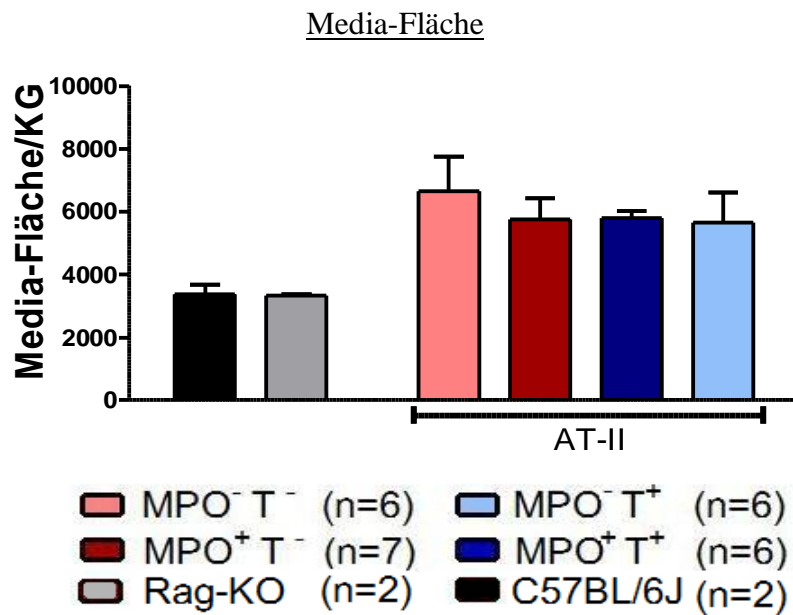


Abbildung 76: Media-Fläche der Aorten der vier Versuchsgruppen im Vergleich zu Rag-Knockout-Mäusen und C57Bl/6J-Wildmäusen, die keine AT-II-Behandlung erhielten. Es erfolgte eine Normierung auf das Körpergewicht der Tiere. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der dargestellten Gruppen.

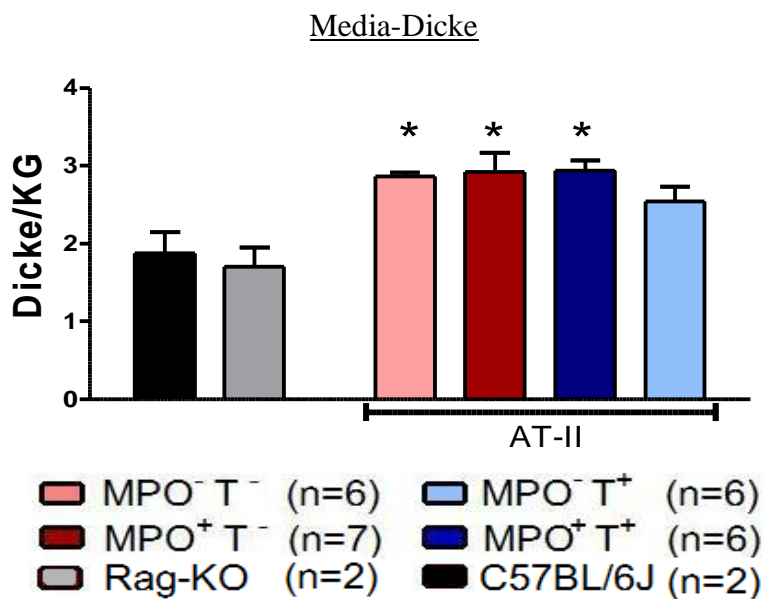
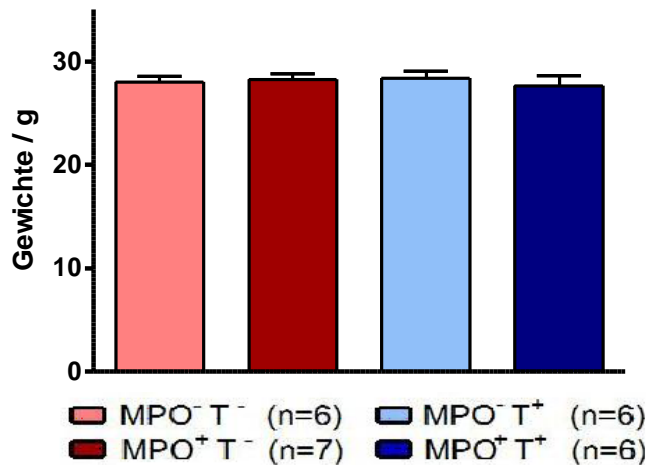


Abbildung 77: Media-Dicke der Aorten der vier Versuchsgruppen im Vergleich zu Rag-Knockout-Mäusen und C57Bl/6J-Wildmäusen, die keine AT-II-Behandlung erhielten. Es erfolgte eine Normierung auf das Körpergewicht der Tiere. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. \*Die Dicke der markierten drei Gruppen ist gegen die Aorten-Fläche der Rag-KO- und Bl6-Gruppe signifikant erhöht.

## 4.7. Körpergewichte

Im Anschluss an die Telemetrie-Operation kommt es in allen Versuchsgruppen zu einem vergleichbaren, nicht signifikanten Gewichtsverlust (Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test; Daten nicht gezeigt).

Körpergewichte Versuchsstart



Körpergewichte Versuchsende

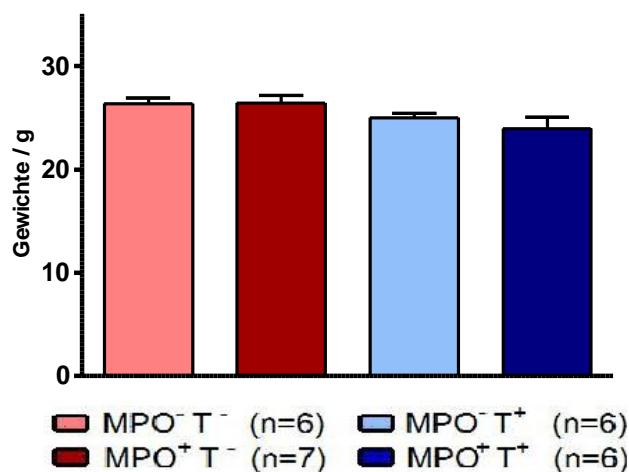


Abb.78: Körpergewichte der 4 Versuchsgruppen zu Versuchsstart (oben) und zu Versuchsende (unten). Statistische Testung mittels One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test: Keine signifikanten Unterschiede.

Bis zum Ende des Versuchsverlaufs bleiben die Gewichte der Tiere gegenüber dem Ausgangswert leicht erniedrigt, ohne jedoch weiter zu sinken.

Im abschließenden Vergleich zwischen den Gewichten der 4 Versuchsgruppen vor und nach 14 Tagen AT-II-Gabe zeigen sich keine signifikanten Gewichtsveränderungen (s. Abbildung 78).

## 4.8. Herzgewichte

Die Untersuchung der absoluten Herzgewichte zum Ende der AT-II- oder Sham-Behandlung zeigt keine signifikanten Unterschiede innerhalb der AT-II-behandelten Versuchsgruppen und auch nicht im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollgruppen.

Unter Berücksichtigung des jeweiligen Körpergewichts im Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis (HW/BW-Ratio) ist eine signifikant erhöhte HW/BW-Ratio der AT-II behandelten Tiere im Vergleich mit den unbehandelten Gruppen erkennbar ( $p < 0,05$ ).

Wildtyp Tiere (C57BL/6J), deren Immunsystem voll ausgeprägt ist, haben im Vergleich zu den 4 AT-II behandelten Versuchsgruppen ein darüber hinaus signifikant erhöhtes HW/BW-Ratio.

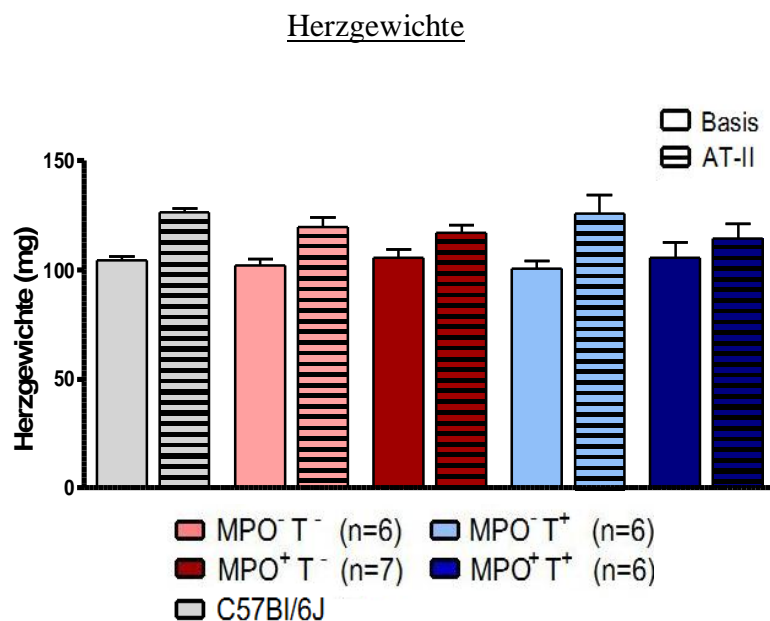


Abb.79: Absolute Herzgewichte [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Dargestellt sind die 4 AT-II behandelten Versuchsgruppen, AT-II behandelte/unbehandelte C57BL/6J Tiere sowie die mit 0,9% NaCl behandelte Sham-Gruppen. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test. Keine signifikanten Unterschiede.

### Herzgewicht/Körpergewicht-Quotient

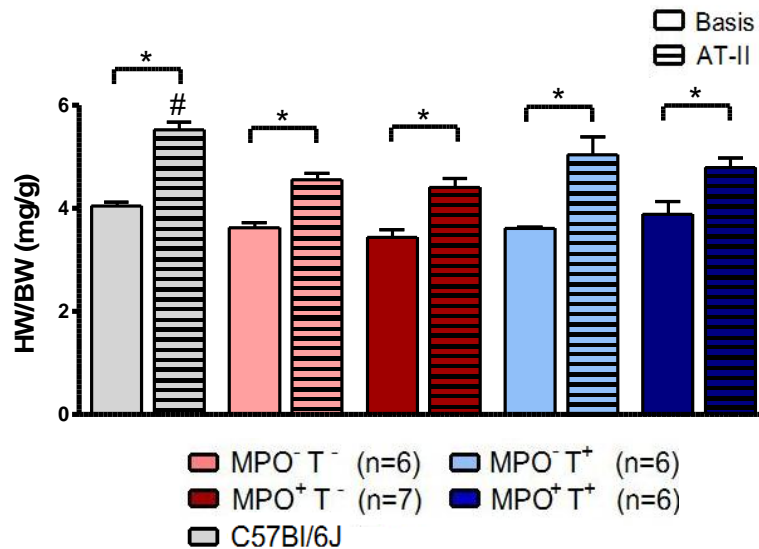


Abbildung 80: Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]. Dargestellt sind die 4 AT-II behandelten Versuchsgruppen, AT-II behandelte/unbehandelte C57BL/6J Tiere sowie die mit 0,9% NaCl behandelten Sham-Gruppen. \*Die HW/BW Ratio aller AT-II behandelten Gruppen ist im Vergleich zu den unbehandelten Gruppen signifikant erhöht. #Die HW/BW-Ratio der AT-II behandelten C57BL/6J Gruppe ist gegen den HW/BW-Ratios aller anderen Gruppen signifikant erhöht. Statistische Testung: One-Way-Anova und Newmann-Keuls-Post-Test.

Der zusätzliche Vergleich der 4 mit AT-II behandelten, primären Versuchsgruppen mit Tieren, die bei ansonsten gleichem Genotyp anstatt einer AT-II-Behandlung mit 0,9% NaCl-Lösung behandelt wurden, zeigt eine signifikante Erhöhung des HW/BW-Ratio in allen AT-II behandelten Gruppen, unabhängig vom vorliegenden Genotyp.

Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass die beschriebenen Kontrollgruppen keine Telemetrie-Operation erhielten und daher tendenziell ein leicht erhöhtes Körpergewicht aufwiesen, was die Vergleichbarkeit der Gruppen erschweren könnten.

## **4.9. In vitro – Stimulation von T-Lymphozyten**

Die in vitro Untersuchungen sollten direkte Interaktionen zwischen den potenziell blutdruckrelevanten Faktoren MPO, T-Lymphozyten und AT-II nachweisen. Hierzu wurden T-Lymphozyten aus gesunden Wildtyp-Mäusen gewonnen und mit Concanavalin A, einem potenten T-Lymphozyten Stimulator, sowie verschiedenen Konzentrationen von MPO und AT-II versetzt.

Im Anschluss wurde als Marker des Ausmaß der T-Lymphozyten-Stimulation die Konzentration von IL-2 im Überstand der Reaktionsgefäße mittels eines ELISA bestimmt.

Die zunächst gemäß Literaturrecherchen für uns als geeignet erachtete Inkubation von T-Lymphozyten in CD3-beschichteten Wells führte bereits ohne zusätzliche Stimulation der T-Lymphozyten zu stark ansteigenden IL-2 Werten. Diese lagen bei unbehandelten T-Lymphozyten sogar noch über den Werten der Positiv-Kontrollen durch das Concanavalin A und waren daher für eine Untersuchung verschiedener Stimulanzen auf die T-Lymphozyten Aktivierung nicht verwertbar (Daten nicht gezeigt).

Daher wurden die T-Lymphozyten im weiteren Verlauf in unbeschichteten 96-Well-Platten inkubiert. Hier zeigte sich ein gutes Ansprechen der T-Lymphozyten auf Concanavalin A unter der die T-Lymphozyten eine maximale Stimulation als Positivkontrolle erzielten.

Sowohl durch AT-II allein als auch durch verschiedene Dosierungen der MPO konnte eine, im Vergleich zum unstimulierten T-Lymphozyten-Ansatz, erhöhte IL2-Konzentration gemessen werden, wobei die IL-2 Antwort auf eine alleinige AT-II Gabe relativ gering ausfiel. In Bezug auf die MPO zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der ermittelten IL-2-Werte.

Eine Kombination der beiden Faktoren MPO und AT-II zeigte einen überadditiven Effekt im Vergleich zur jeweiligen einzelnen Gabe der beiden Stimulanzen.

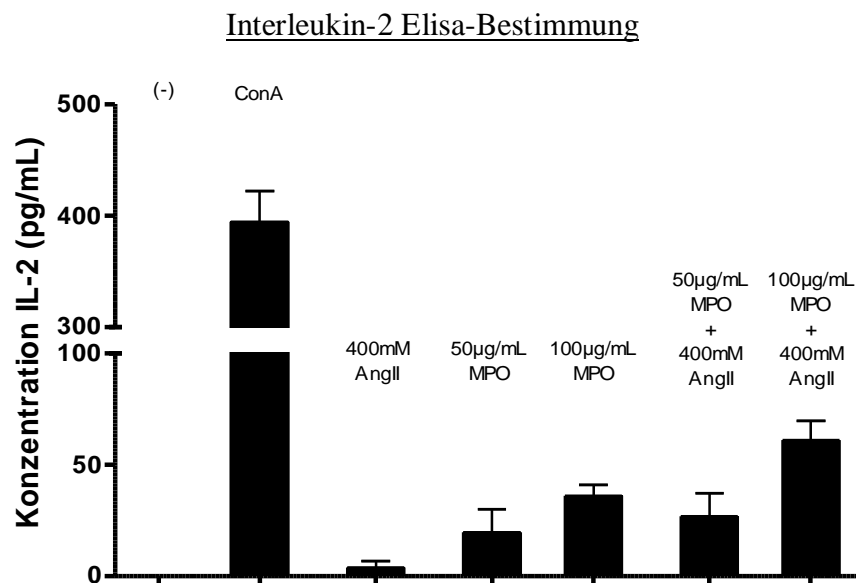


Abbildung 81: IL-2 Konzentrations-Bestimmung durch in vitro-Stimulation von T-Lymphozyten mit anschließendem ELISA [arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM]

# 5. Diskussion

## 5.1. Mauslinien-Generierung und T-Lymphozyten-Transfer

Als Fragestellung der vorliegenden Arbeit galt die Untersuchung, ob das angeborene und erworbene Immunsystem Auswirkungen auf die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie durch eine AT-II-Behandlung haben.

Zu diesem Zweck wurden Mauslinien generiert, die durch unterschiedliche Veränderungen in ihrem Immunsystem Vergleiche zwischen den verschiedenen Komponenten des Immunsystems ermöglichen.

Eine immundefiziente Mauslinie wurde neu am Institut etabliert, die sogenannte „Rag-Knockout“-Maus, die sich durch das Fehlen funktioneller T- und B-Lymphozyten auszeichnet.

Zudem konnte auf die bereits im Institut in früheren Experimenten eingesetzte „MPO – Knockout“-Linie zugegriffen werden.

Die Verpaarung dieser beiden Mauslinien schuf die genetischen Voraussetzungen der Arbeit. Der genetische Hintergrund (C57Bl/6J) der Tiere wurde durch konsequent durchgeführte, inzüchtige Verpaarung sicher gestellt. Durch mehrfache Genotypisierungen wurden die genetischen Veränderungen der Versuchstiere gesichert.

In Arbeiten anderer Institute (Guzik et al. 2007) konnte durch einen T-Lymphozyten-Transfer aus gesunden Spendermäusen ein deutlicher Blutdruckanstieg unter AT-II-Behandlung in Rag Knockout-Tieren beobachtet werden, die ohne Transfer eine nur minimale Blutdruckantwort auf die AT-II-Gabe zeigten.

Zur genaueren Untersuchung dieses sogenannten „Rescue-Phänomens“ der Bluthochdruckentwicklung wurde auch in dieser Arbeit ein Teil der Mäuse einem T-Lymphozyten-Transfer unterzogen.

Die zu diesem Zweck aus C57Bl/6J-Wildtyp Mäusen, d.h. dem gleichen genetischen Hintergrund aller Versuchsgruppen, aufgereinigten T-Lymphozyten wurden vor dem Transfer einer flusscytometrischen Untersuchung (FACS) unterzogen, die in sämtlichen Fällen einen hohen T-Lymphozyten Anteil der Lösung (74-98%) nachwies. Andere Arbeiten, die ebenfalls einen T-Zell-Transfer vollzogen, gaben vergleichbare T-Lymphozyten-Anteile in der Zellsuspension an (Guzik et al. 2007).



Die gewonnenen T-Lymphozyten wurden den Mäusen über einen Zugang in der Schwanzvene injiziert. Eine erste Möglichkeit der Verifizierung eines korrekten Transfers bestand schon während der Applikation. Nach der erfolgten Punktion der Vene wurde zunächst ein Anspülen des venösen Zugangs mit NaCl versucht. Bei paravasaler Lage des Katheters konnte dies nicht gelingen und führte zu einer Anschwellung des umgebenden Gewebes. Auf diese Weise konnte eine paravenöse Applikation der T-Zell-Suspension verhindert werden. Um sicher zu stellen, dass auch bis zum Versuchsende eine T-Zell-Population in den entsprechenden Mäusen persistierte sollte eine finale FACS-Untersuchung von Milzzellen den Nachweis einer vitalen T-Lymphozyten-Population erbringen. Die im Ergebnis-Teil thematisierten Schwierigkeiten in der Interpretation der gewonnenen Daten verhinderten eine einheitliche Bewertung der verschiedenen Versuchsdurchgänge. Die beobachtete Inkohärenz lässt vermuten, dass die Milz als untersuchtes Organ für den Versuchszweck nicht ideal gewählt ist. Diesbezügliche Recherchen hinsichtlich eventueller Kreuzreaktionen der verwendeten Antikörper mit anderen Zellreihen innerhalb der Milz führten zu der Hypothese, dass die hohe allgemeine Affinität Dendritischer Zellen zu immunologischen Antikörpern, u.a. CD4-Rezeptoren, in der Milz für Störsignale verantwortlich sein könnte. Da die Existenz und Funktionalität von Dendritischen Zellen im vorliegenden Rag-1 Knockout-Modell bisher weder als eingeschränkt noch modifiziert beschrieben wurde, könnte daher auf diese Weise eine mögliche Verblendung der FACS-Untersuchung stattgefunden haben. (Mombaerts et al. 1992; Shortman and Liu 2002)

Noch wahrscheinlicher scheint uns die Hypothese von Falk et al. 1996, die eine mögliche Existenz unreifer, immunologischer Vorläuferzellen und deren Akkumulation in der Milz von Rag-KO-Mäusen als Erklärungsansatz der beobachteten Aktivitäts-Muster diskutiert (Falk et al. 1996).

Die in späteren Studien an einem ähnlichen Mausmodell durchgeführten FACS-Untersuchung des Bluts von Versuchstieren konnte die gewünschte, spezifische Detektion transferierter T-Lymphozyten erzielen, so dass diese Methodik für weitere Versuche deutlich zweckdienlicher erscheint.

Die Genotypisierung diene neben der Verifizierung des Genotyps und der Vermeidung von Vertauschungen auch der Qualitätssicherung durchgeführter T-Lymphozyten-Transfers.

Eine Literaturrecherche auf vergleichbare Phänomene erbrachte, dass bereits 2003 der Nachweis transferierter Immunzellen mittels PCR in verschiedenen Organen der Empfängermause erzielt werden konnte (Moeller et al. 2003). Des weiteren gelang die Entwicklung einer quantitativen PCR-Methodik zur Bestimmung der transferierten Menge genetisch manipulierter CD8<sup>+</sup> Zellen in Leber und Milz der Empfänger-Mäuse (Wright et al. 2005).

Der genetische Nachweis systemisch eingebrachter T-Lymphozyten aus peripherem Gewebe, wie in dieser Arbeit geschehen, wurde bisher jedoch noch nicht beschrieben. Weitere Studien des Instituts, die ebenfalls transferierte T-Lymphozyten in Empfänger-Mäusen aufsuchten, zeigten kohärente Ergebnisse.

Die Ursache für die mögliche Detektion des Zell-Transfers im Ohr-Gewebe der Tiere muss die Folge einer systemischen Verteilung der Zellen im Körper der Mäuse sein. Ähnlich dem menschlichen Ohr, besteht auch das Gewebe des Maus-Außenohrs aus gut vaskularisiertem Knorpel, dessen Versorgung durch Diffusion gesichert wird (Treuting et al. 2012) . Auf welche Weise die T-Lymphozyten sich im Auricula-Gewebe lokalisieren, lässt sich rückwirkend nicht bestimmen. Grundsätzlich erscheint, in Anbetracht der verhältnismäßig langen Zeit zwischen Transfer und Untersuchung, ein durch Zellvermehrung erzieltes Überdauern der T-Lymphozyten und somit deren genetische MPO-WT-Signal im Blut wahrscheinlich. Die auf diese Weise erzielte Nachweisbarkeit einer T-Lymphozyten-Präsenz bis zu 6 Wochen nach Transfer bekräftigen die Methodik des T-Lymphozyten-Transfers als systemisch wirksame Beeinflussung des immunologischen Status der Versuchstiere.

Von Interesse und potenziell großer Praktikabilität wären weitere Untersuchungen und Ausweitungen der entdeckten Nachweis-Methode. Wäre die Entwicklung einer quantitativ aussagekräftigen PCR hinsichtlich der Menge an T-Lymphozyten möglich, so könnte die aufwändige und kostspielige Methode der FACS-Analyse durch die deutlich einfachere Genotypisierung zumindest ergänzt werden.

Jedoch fehlt im aktuellen Versuchs-Aufbau die Möglichkeit, T-Lymphozyten in Empfänger-Mäusen mit einem MPO-Wildtyp Genotyp nachzuweisen, da die MPO-Gen enthaltende DNA der transferierten T-Lymphozyten in der Genotypisierung durch die eigene MPO-positive Bande der Maus überlagert wird. Es stellt sich zudem die Frage, wieso nur im MPO-Gen und nicht im Rag-1-Gen ein Nachweis der DNA aus Spender-Lymphozyten gelingt. Für den Moment ist die Durchflusscytometrie zu Recht wissenschaftlicher Standard zum Nachweis eines erfolgreichen adoptiven Zell-Transfers. Unabhängig davon ist in dieser Arbeit, obgleich die Milz sich als ungeeignetes Zielorgan des gewünschten T-Lymphozyten-Nachweis erwiesen hat, durch die anderen eingesetzten Verfahren von einem erfolgreichen T-Lymphozyten-Transfer auszugehen.

## 5.2. Mauslinien-Haltung

Die im Versuchsaufbau verwendeten Mauslinien haben durch das Fehlen funktioneller B- und T-Lymphozyten eine Einschränkung ihrer immunologischen Kompetenz, was sie theoretisch für Infektionen prädestiniert. Tatsächlich wird in der Literatur der grundsätzlich fast identische Phänotyp von Rag Knockout-Mäusen und SCID-Mäusen („Severely combined immunodeficiency“), einer häufig zu schwerwiegenden Infektionen führende, genetische Mutation, beschrieben (Mombaerts et al. 1992). Auf der anderen Seite finden sich nur vereinzelte Hinweise auf eine relevante Infektneigung des Rag Knockouts, wie z.B. ein deutlich aggravierter Verlauf einer *Brucella melitensis*-Infektion in Rag Knockout-Tieren (Izadjoo et al. 2000).

Die Haltung der Tiere musste an diese besondere Situation angepasst werden. Durch die Unterbringung der Tiere in einem entsprechenden vor Keimen schützenden Käfigsystem, die Gabe von autoklaviertem Futter und Wasser sowie die konsequente Behandlung unter sterilen Bedingungen sollte eine möglichst keimfreie Umgebung geschaffen werden.

Die Tiere gaben in ihrem Verhalten, Aussehen und ihren erhobenen Messwerten (Blutdruck, Herzfrequenz und Aktivität) keinerlei Hinweise auf ein infektiöses Geschehen während der Versuchszeit. Auch die postoperativen Phasen nach Telemetriesender- und AT-II-Pumpen-Implantation gestalteten sich in einer mit Wildtyp-Mäusen vergleichbaren Weise.

Nichtsdestotrotz kann die Einflussnahme einer „stillen“ Infektion auf die erhaltenen Messwerte nicht ausgeschlossen werden. Eine Infektion könnte dabei sowohl eine hyperdynamie als auch eine hypodynamie Kreislaufreaktion der Tiere als Folge haben, so konnte u.a. bereits die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie als Folge einer Cytomegalie-Virus Infektion in Mausmodellen gezeigt werden (Cheng et al. 2009). Zusammenfassend kann die Haltungsweise in seiner hier vorliegenden Form als optimal bewertet werden, es ergaben sich keine Hinweise auf infektbedingte Effekte in den erhobenen Messwerten.

### 5.3. Die Telemetrie-Operation

Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit waren die Untersuchungen der Herz-Kreislauf-Parameter, die Unterschiede in der Entwicklung einer AT-II-bedingten Hypertonie in den verschiedenen Versuchsgruppen detektieren sollten.

Der aktuelle Goldstandard zur Blutdruckbestimmung in der Maus ist die Radiotelemetrie; ein Verfahren, das 2000 von der Firma DSI entwickelt wurde und seitdem durch seine effiziente und exakte Messweise immer größere Anwendung findet (Mills et al. 2000).

Anhand der gewonnenen Ergebnisse zeigte sich dabei kein Anhalt, dass die Mäuse durch die Sender-Implantation in ihrer natürlichen Verhaltensweisen beeinflusst wurden. Nach einer postoperativen Erholungsphase zeigten alle Tiere stabile Werte in Blutdruck, Herzfrequenz und Aktivität sowie im Fress- und Hygieneverhalten. Die gewonnenen Messwerte sind in ihrer Qualität zudem vergleichbar mit bereits im Institut untersuchten Wildtyp-Mäusen (Daten hier nicht gezeigt), so dass das Verfahren auch im Rag-1-Knockout-Modell als gut geeignet zu erachten ist.

Es ergaben sich keine Hinweise auf eine durch die notwendige Ligatur der linken A.carotis Beeinflussung der Gehirn-Durchblutung, einem ebenfalls an der Blutdruckregulation beteiligten Organ.

In anderen Studien konnten durch histologische Untersuchungen kein Nachweis ischämischer Areale im Hirnstamm als Zeichen eingeschränkter Hirnperfusion im Anschluss an eine Telemetrie-Operation beobachtet werden (Kaïdi et al. 2007).

Acht Tiere mussten auf Grund einer Fehlfunktion der Telemetrie-Messung vom Versuch ausgeschlossen werden. Die generierten Werte lagen in diesen Fällen entweder bereits während der Basismessungen deutlich außerhalb des als physiologisch zu erachtenden Rahmens, beziehungsweise war die Analyse der Druckkurven aufgrund der unzureichenden Datenqualität nicht auswertbar. Ursächlich könnten eine Katheterdislokation oder eine Besiedlung der Katheterspitze mit thrombogener oder bakterieller Vegetation gewesen sein. Bei der Untersuchung der betroffenen Tiere ließen sich jedoch beide Hypothesen nicht abschließend bestätigen oder widerlegen.

## 5.4. Das AT-II-Modell für die arterielle Hypertonie

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung immunologischer Einflüsse auf die arterielle Hypertonie. Voraussetzung hierfür war die Wahl eines geeigneten murinen Hypertonie-Modells. Die Methodik der subkutanen AT-II-Gabe über osmotische Minipumpen erschien eine geeignete Wahl zu sein. Auf Grund der gut durchführbaren und durch eine Vielzahl von Studien etablierten Methodik konnte auf eine immense Datenlage in Bezug auf die Effekte der AT-II-Gabe auf die verschiedenen Komponenten des kardiovaskulären Systems zurückgegriffen werden. Darüber hinaus weisen aktuelle Studien auf eine Beteiligung von AT-II in der Vermittlung verschiedener immunologischer Effekte hin. T-Lymphozyten werden in ihrer Aktivität durch AT-II beeinflusst und zu einer vermehrten Einwanderung aus der Blutbahn in Gewebe stimuliert (Silva-Filho et al. 2011). Dieser stimulierende Einfluss von AT-II auf T-Lymphozyten konnte auch im Rahmen dieser Arbeit durch in vitro Experimente bestätigt werden, die eine vermehrte IL-2 Sekretion als Ausdruck gesteigerter Aktivität von T-Lymphozyten unter AT-II-Gabe beobachten konnten.

Dementsprechend wurde ein großer Teil der aktuellen Studienlage zur Beeinflussung der arteriellen Hypertonie durch T-Lymphozyten im AT-II-Modell untersucht.

Ebenso wurden die Daten, die einen Einfluss der MPO auf die Entstehung einer arteriellen Hypertonie vermuten lassen, im AT-II-Modell ermittelt: Rudolph et al. zeigten 2010 eine durch MPO-Knockout reduzierte Blutdruck-Antwort auf eine AT-II-Behandlung.

Im Verlauf der 14-tägigen Verabreichung von AT-II konnte in allen Versuchstieren ein zu erwartender Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks verzeichnet werden. Die dabei in allen Versuchsgruppen erreichten Anstiege auf ca. 140% des Ausgangswertes entsprechen anderen AT-II-Versuchsreihen gleicher Dauer und Dosis (Friedrichs 2011).

Eine weitere deutliche Auswirkung der AT-II-Gabe spiegelt sich auf vaskulärer Ebene wieder: Die Untersuchung der Aorten der Versuchstiere bezüglich ihrer Relaxationsfähigkeit zeigt eine durchweg signifikante Reduktion in allen AT-II-behandelten Gruppen im Vergleich zu Sham-behandelten Mäusen. Die dabei gemessene Abnahme der maximalen Relaxationsfähigkeit um ca. 30% unter ACh-Stimulation und um ca. 20% unter NTG-Stimulation steht im Einklang mit Ergebnissen anderer Versuchsreihen, die unter AT-II-Behandlungen ähnlicher Dosis und Dauer vergleichbare Werte zeigten (Sydow et al. 2012).

Auch die Auswertung der Heart-Weight/Body-Weight Ratio zeigte als Effekt der AT-II-Gabe ein signifikant erhöhtes Herzgewicht der AT-II behandelten Tiere.

Dabei lagen die Werte ohne AT-II Behandlung im Rahmen der in der Literatur zu erwartenden Werte von Wildtyp-Mäusen, während die Werte AT-II behandelte Tiere in dieser Studie etwas hinter denen von AT-II behandelten Wildtyp-Mäusen zurück blieben. Die HW/BW-Ratio unserer eigenen AT-II behandelten C57Bl6-Wildtyp-Tiere entsprachen wiederum den aus der Literatur zu erwartenden Werten (Collins et al. 2004).

Zusammenfassend schuf das gewählte AT-II-Modell eine aussagekräftige Ausgangslage für die Beurteilung der immunologischen Einflüsse auf den arteriellen Blutdruck. Es zeigten sich auch in den hier verwendeten Mauslinien deutliche Effekte auf den Blutdruck sowie in den zu untersuchenden Organsystemen.

## **5.5. Versuchsgruppen im Vergleich**

### **5.5.1. MAP**

Die vor der AT-II-Gabe nahezu identischen Blutdrücke zwischen den verschiedenen Gruppen lassen darauf schließen, dass unter physiologischen Bedingungen die Regulation des Blutdrucks nur wenig durch immunologische Systeme beeinflusst wird und gegebenenfalls erst unter Stresssituationen die immunologische Modulation an Relevanz gewinnt. Zu ähnlichen Schlüssen kamen bereits andere Arbeiten, die ebenfalls keinen Einfluss von T-Lymphozyten (Marvar et al. 2012) beziehungsweise MPO (Rudolph et al. 2010; Friedrichs 2011) auf die basalen Blutdruckwerte verzeichneten.

In allen vier Versuchsgruppen konnte ein signifikanter Anstieg des Blutdrucks als Reaktion auf die AT-II-Stimulation beobachtet werden. Der Anstieg zeigte sich dabei im vergleichbaren Ausmaß in Systole und Diastole. Beim Vergleich innerhalb einer Gruppe zeigen sich zwischen systolischen und diastolischem Anstieg keine Unterschiede. Beide Blutdruckwerte scheinen somit gleichermaßen für den Anstieg des MAP verantwortlich zu sein.

Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Erniedrigung des mittleren arteriellen Blutdrucks der MPO<sup>+</sup>T<sup>+</sup> Gruppe sowie eine marginale Erhöhung der MPO<sup>+</sup>T Gruppe gegenüber den jeweils anderen Gruppen. Zur weiteren Untersuchung dieser Blutdruckdifferenzen erfolgte die aktivitätsnormierte Auswertung der Daten, die klären sollte inwieweit unterschiedliche Aktivitätsgrade der Tiere eine direkte Erklärung für diese Unterschiede in den Blutdruckwerten sein könnten. Diese Form der Auswertung fand bereits in anderen Publikationen in vergleichbarer Weise Anwendung (McGuire et al. 2008).

Die initial beobachteten Blutdruckunterschiede waren hier nicht mehr nachweisbar, so dass wohl die unterschiedliche Aktivitätsniveaus für die Blutdruckunterschiede verantwortlich waren.

In jedem Fall führte das Fehlen von T-Lymphozyten durch den genetischen Rag-KO, anders als in den Arbeiten von Guzik et al., nicht generell zu einem nahezu Ausbleiben der hypertensiven Reaktion auf AT-II. Der vergleichbare Verlauf des Blutdrucks, unabhängig von der Präsenz von T-Lymphozyten, wirft die Frage nach der Ursache für dieses, den Vorarbeiten nicht entsprechende Ergebnis auf.

Bei Vergleich der experimentellen Aufbauten der vorliegenden Arbeit mit der Arbeit von Guzik et al. findet sich bei sonst nahezu identischen Bedingungen eine unterschiedliche verwendete AT-II-Konzentration. Während in der Arbeit von „Guzik et al.“ 0,49 ng/min/kg AT-II verwendet wurden, war die Konzentration in dieser Arbeit auf 1,5 ng/min/kg festgelegt worden. Die Konzentration war der an diesem Institut in zahlreichen AT-II-Modellen bewährten Konzentration angeglichen worden um Vergleichsmöglichkeiten zu früheren Arbeiten zu schaffen.

Gleichwohl gilt es zu bedenken, dass der Dosierung der täglichen AT-II-Dosis eine entscheidende Bedeutung zukommen kann: Ergebnisse verschiedenster Forschungsansätze weisen darauf hin, dass AT-II-induzierte Effekte in großem Maße von der eingesetzten Dosis abhängig sind. So konnten z.B. in einem niedrig dosierten AT-II-Modell Gefäß-Veränderungen ohne gleichzeitige Anhebung des arteriellen Blutdrucks nachgewiesen werden (Su et al. 1998).

Rückwirkend betrachtet könnten die differierenden Konzentrationen daher eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse sein; die deutlich höhere AT-II Konzentration in dieser Arbeit hat möglicherweise zu einer Überdeckung von feinen Unterschieden z.B. auf Gefäßebene geführt, so dass eine Beeinflussung durch T-Lymphozyten ohne phänotypische Auswirkung blieb.

Andererseits wurde die höhere Konzentration gewählt um einen aussagekräftigen Anstieg des Blutdrucks zu erzeugen. Eine vergleichende Versuchsreihe mit reduzierter AT-II-Konzentration wäre von großem Interesse und wurde aus diesem Grund bereits initiiert.

In dieser hier vorliegenden Arbeit wurde den Empfänger-mäusen eine Zellzahl von  $1 \times 10^7$  T-Lymphozyten injiziert, während in der entsprechenden Arbeit von Guzik et al. eine verabreichte Zellzahl von  $2 \times 10^7$  Zellen angegeben wurde. Unseren Erfahrungen folgend, erschien uns diese Menge in der Planung der Experimente als unpraktikabel. Die durch uns genutzte MACS-Zell-Aufreinigung konnte im Idealfall aus 1-2 Spender-Mäusen, die für einen Empfänger notwendigen 10 Millionen Zellen gewinnen, so dass die Anpassung an die Angaben von Guzik et al. eine Verdopplung der benötigten Spender-Tiere bedeutet hätte.

Zudem konnten in anderen Studien (Turner et al. 2012; Zhou et al. 2006) mit der von uns gewählten Menge bereits die jeweils gewünschten T-Lymphozyten-vermittelten Prozesse nachgewiesen werden. Die geringere Anzahl transfundierter T-Lymphozyten muss trotzdem als mögliche Ursache der unterschiedlichen Ergebnissen beider Arbeiten in Erwägung gezogen werden. Eine daraus resultierende geringere durch die T-Lymphozyten vermittelte Immunantwort könnte mögliche Unterschiede in der Blutdruckentwicklung verdeckt haben. Dies hätte jedoch den Ergebnissen von Guzik et al. folgend zu einem deutlich reduzierten Blutdruckanstieg in allen 4 Versuchsgruppen führen müssen, der jedoch in der vorliegenden Arbeit in allen Gruppen deutlich vorhanden war.

Auf der anderen Seite gilt es aber auch zu bedenken, dass die Belastung des Organismus mit einer so großen Masse an Immunzellen auch unerwünschte Nebenreaktionen zur Folge haben könnte. Die möglicherweise vermehrt stattfindende Apoptose transfundierter T-Lymphozyten könnte, vermittelt durch auch in Rag-Tieren vorhandene, angeborene Immunzellen wie z.B. Makrophagen (Mombaerts et al. 1992), zu einer entzündlichen Veränderung des Gefäßsystems führen und auf diese Weise die von Guzik et al. beobachteten Blutdruckunterschiede erklären.

In der Publikation von Guzik et al. wurden, neben den invasiv erhobenen Telemetrie-Messungen, zudem auch Blutdruckmessungen mittels der Schwanzmanschette vollzogen. Aus der vorliegenden Publikation ist nicht klar ersichtlich zu welchen Anteilen sich die publizierten Ergebnisse aus den beiden Messmethoden zusammensetzen. Die Ergebnisse der Tail-Cuff-Methode gilt es kritisch zu betrachten, da sie durch ihre erhöhte Anfälligkeit für interindividuelle Streuung, u.a. durch Stress und unzureichende Gewöhnung der Tiere an die Prozedur, der Telemetrie-Messung in Genauigkeit und Reproduzierbarkeit deutlich unterlegen ist (Daugherty et al. 2000).

Grundsätzlich erscheint eine Involvierung von T-Lymphozyten in die Ätiologie der arteriellen Hypertonie nicht unwahrscheinlich, auch wenn in dieser Studie kein derartiger Nachweis möglich war. Der phänotypische Nachweis des hypertensiologischen Potenzials von T-Lymphozyten durch Guzik et al (Guzik et al. 2007), sowie die spezifische blutdrucksenkende Wirkung von T<sub>reg</sub>-Zellen (Barhoumi et al. 2011), oft als funktionelle Gegenspieler der CD4- und CD8-T-Lymphozyten erachtet, stellen die bisher nachdrücklichsten Ergebnisse für diese Hypothese dar.

Außerdem konnten weitere Arbeiten auf molekularer Ebene eine Vielzahl von möglichen Interaktionsmöglichkeiten speziell von T-Lymphozyten auf die Blutgefäße unter AT-II-Gabe nachweisen. So wurde bereits eine Atherosklerose-fördernde Cytokin-Sekretion sowie eine Plaquestabilisierende Wirkung von verschiedenen T-Lymphozyten Subtypen berichtet. (Haraba et al. 2011; Mazzolai et al. 2004)

Des Weiteren konnten bereits erste humane Studien entsprechende Korrelate in hypertensiven Patienten finden:



Es konnte ein erhöhter Anteil an CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in Patienten mit arterieller Hypertonie nachgewiesen werden (Youn et al. 2013).

Untersuchungen von HIV-positiven Patienten mit einer T-Lymphozyten-Anzahl im Blut unter 200/μl, die einer hochaktiven retroviralen Therapie (HAART) unterzogen wurden, zeigten eine deutlich reduzierte Hypertonie-Prävalenz zu Therapiebeginn, die mit anhaltender Medikamenten-Gabe bis auf die Prävalenz der Gesamt-Bevölkerung anstieg. Es gilt jedoch zu beachten, dass diese Ergebnisse in keinsten Weise spezifisch für einen Einfluss durch T-Lymphozyten sind, jedoch stehen sie in Einklang mit den bereits genannten aktuellen Beobachtungen (Seaberg et al. 2005).

Auf der anderen Seite reduzierten transferierte T-Lymphozyten die Blutdruckantwort auf eine AT-II-induzierte Hypertonie in männlichen Versuchstieren, während weibliche Tiere keinerlei Reaktion auf einen Zell-Transfer zeigten. Als Ursache für diese Beobachtung wurde eine in weiblichen Tieren durch hormonelle Einflüsse reduzierte Aktivierung von T-Lymphozyten durch AT-II diskutiert (Pollow et al. 2014).

In der Zusammenschau der jüngsten Studien publizierten Harrison et al. die Hypothese einer durch AT-II oder andere hypertensive Stimuli geförderten Einwanderung von T-Lymphozyten und anderen Immunzellen in die Nieren und den periadventitiellen Raum arterieller Gefäße. Dort sollen, ausgelöst durch die Sekretion von Zytokinen wie TNF-alpha, inflammatorische Prozesse die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie, u.a. durch die vermehrte Vasokonstriktion in Folge reduzierter NO-Spiegel, begünstigen (Harrison and Guzik 2011). Leider ließ sich diese Hypothese in dieser Arbeit nicht bestätigen.

Die Betrachtung der Myeloperoxidase als zusätzlicher potenzieller Einflussfaktor basierte auf eigenen Ergebnissen der Arbeitsgruppe. Als Nebenbefund in einer Arbeit zur Ätiologie des Vorhofflimmerns fand sich verglichen mit Wildtyp-Mäusen eine verminderte Blutdruckantwort auf eine AT-II-Behandlung in Versuchstieren mit einem MPO-Gen-Knockout.

Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Dissertation unter Rag-KO-Bedingungen nicht reproduziert werden. Die Versuchsgruppen mit einem genetischen MPO-Defekt zeigten vergleichbare Reaktionen auf die AT-II Therapie wie die MPO-Wildtypen.

Ein Grund dafür könnte sein, dass durch die Verwendung des Rag-Knockout-Modells keine ausschließliche Betrachtung der MPO-Genotypen bestand: Die Ausschaltung des Rag-Gens stellt einen erheblichen Eingriff in das Immunsystem der Mäuse dar (Mombaerts et al. 1992). Da zudem der T-Lymphozyten-Transfer erst im Alter von >12 Wochen erfolgte, fehlten in der Wachstumsphase der Tieren die T-Lymphozyten als wichtiger Bestandteil in der Entwicklung des Immunsystems (Janeway and Walport 2001b).

So lassen die vorliegenden Ergebnisse wichtige Schlüsse, aber letztlich keine abschließende Beurteilung zu. Die möglicherweise notwendige Präsenz eines voll ausgeprägten Immunsystems für die Unterschiede im MPO-Phänotyp müssten durch Versuchsgruppen ohne Rag-KO in vollem Umfang reproduziert werden, um einen abschließenden Vergleich zu erlauben.

Eine Beteiligung der MPO in der Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie erscheint, unabhängig von den Ergebnissen dieser Dissertation, wahrscheinlich. Neben den Ergebnissen von Baldus et al. spekulierten bereits andere Arbeiten über das hypertensive Potenzial der MPO. So wurde bereits eine über die Reduktion endothelialer Stickstoffmonoxid-Spiegel vermittelte Vasokonstriktion durch die MPO-Aktivität beschrieben (Eiserich et al. 2002). Des Weiteren wurde die MPO mit einer direkten Schädigung von Gefäßen durch die vermehrte Einwanderung neutrophiler Granulozyten in Verbindung gebracht. Diese enthalten hohe Anteile an MPO und könnten über die Sezernierung ihrer reaktionsfreudigen Stoffwechselprodukte oxidativen Stress an Gefäßwänden verursachen, der wiederum einen Blutdruckanstieg erzeugt (Van der Zwan et al. 2010).

Die der vorliegende Dissertation zu Grunde liegende Hypothese lag in einer möglichen Interaktion von T-Lymphozyten und MPO-getriggerten Prozessen. So wurde bereits die Möglichkeit einer vermehrten MPO-Exprimierung auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten durch TNFalpha, ein u.a. von T-Lymphozyten sezerniertes Zytokin, diskutiert (Hsieh et al. 2007).

Ebenso konnte eine Stimulation der Aktivität von T-Lymphozyten durch reaktive Sauerstoff-Produkte (Reactive Oxygen Species ROS) nachgewiesen werden. Das in der entsprechenden Arbeit als entscheidend hervorgehobene oxidativwirkende Agens  $H_2O_2$  ist das Hauptreaktionsprodukt der MPO. (Kaminski et al. 2010)

Die verschiedenen Studienergebnisse zusammenfassend war über eine Interaktion von T-Lymphozyten und MPO spekuliert worden, die auf diese Weise sowohl die Ergebnisse zum Einfluss der MPO auf die arterielle Hypertonie von Rudolph et al. als auch die aktuellen Studien zur Rolle der T-Lymphozyten in der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie, u.a. von Guzik et al., erklären würde. Diese Hypothese konnte in der vorliegenden Arbeit in vivo nicht bestätigt werden. Die fehlenden Unterschiede des Blutdruckanstiegs unter AT-II erlauben keine Aussage über eine Interaktion zwischen T-Lymphozyten und MPO.

Jedoch war die IL-2 Konzentration stimulierter T-Lymphozyten in durchgeführten „in vitro“ Experimenten am größten, wenn sowohl MPO als auch AT-II präsent waren. Dieser Effekt könnte auf einer Co-Stimulation durch die beiden Substrate oder aber auf zwei verschiedenen, voneinander unabhängigen Aktivierungsprozessen der T-Lymphozyten beruhen.

Im ersten Fall wäre dies ein starkes Indiz dafür, dass auch „in vivo“ das Zusammenspiel von MPO und T-Lymphozyten von Bedeutung in der Entwicklung der AT-II vermittelten, arteriellen Hypertonie sein könnte.

Weitere Studien zur Aufdeckung der durch die T-Lymphozyten vermittelten Prozesse sollten weiterhin die Beteiligung der MPO als systemisch-aktives, inflammatorisches Enzym in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie in Betracht ziehen.

### **5.5.2. Aktivität & Herzfrequenz**

Die Herzfrequenzen der Tiere in Ruhe betrachtend konnten stabile Werte in allen 4 Versuchsgruppen erhoben werden, die bei 460 bis 480bpm am Tag und 520 bis 560bpm in der Nacht lagen. Diese gemessenen Werte entsprechen sowohl den allgemeinen Erfahrungen des Instituts als auch publizierten Daten in verschiedenen C57Bl/6J-Maus-Modellen (Whitesall et al. 2004).

Unter basalen Bedingungen scheint dabei keine Beeinflussung durch T-Lymphozyten oder die MPO statt zu finden. Die in den absoluten Werten noch messbare signifikante Erhöhung der Herzfrequenz am Tag bei der MPO<sup>+</sup>T<sup>+</sup> Gruppe gegenüber den anderen Gruppen hatte nach Normierung auf ihre Aktivitätsniveaus keinen Bestand. Andere Arbeiten kamen ebenfalls zu der Erkenntnis, dass sowohl T-Lymphozyten (Guzik et al. 2007) als auch die MPO (Rudolph et al. 2010) keinen Einfluss auf die Herzfrequenz unter Ruhebedingungen haben.

Der Einbruch der Herzfrequenzen unmittelbar nach Beginn der AT-II-Behandlung stellt, in Anbetracht der im selben Zeitraum verminderten lokomotorischen Aktivität, wahrscheinlich eine Reaktion der Tiere auf die OP mit anschließender Erholungsphase dar. Ebenfalls möglich könnte es sich um eine durch z.B. Pressorezeptoren vermittelte Gegenreaktion auf den steigenden Blutdruck handeln; Literaturrecherchen ergaben jedoch keine Hinweise für einen solchen Zusammenhang.

In jedem Fall wird der Herzfrequenz-Abfall bei entsprechenden Versuchsverläufen regelhaft beobachtet und ist in seinem Ausmaß mit früheren AT-II-Experimenten des Institutes vergleichbar.

Im Verlauf der AT-II-Behandlung kam es langfristig zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz in drei der vier Gruppen, obwohl auch die MPO<sup>+</sup>T<sup>+</sup> Gruppe in der Tendenz eine ansteigende Frequenz zeigte.

Diese Beobachtung passt zu Studien, die eine tachykarde Wirkung von AT-II am AV-Knoten des Herzens nachweisen konnten (Saito et al. 1987).

Die Gruppen untereinander vergleichend wurden in der Analyse der absoluten Herzfrequenzwerte unter ATII-Gabe ein vermehrter, marginal signifikanter Anstieg der Herzfrequenz in den drei Gruppen gegenüber der Herzfrequenz der MPO<sup>+</sup>T<sup>+</sup> Gruppe verzeichnet, der jedoch in der Aktivitäts-bereinigten Analyse keinen Bestand hatte.

Zudem ermöglichten die tendenziell bereits erhöhten Ruhewerte der MPO<sup>+</sup>T<sup>+</sup> Gruppe eventuell nur eine geringere Steigerungsmöglichkeit durch AT-II-Gabe.

Insgesamt konnte kein Einfluss von T-Lymphozyten oder der MPO auf die Herzfrequenz von Versuchstieren unter AT-II-Behandlung nachgewiesen werden. Auch in anderen Arbeiten waren keine Unterschiede in der Herzfrequenz unter AT-II-Gabe festgestellt worden (Rag-WT und Rag-KO: Pollow et al. 2014; MPO WT und MPO KO: Rudolph et al. 2010).

Für die Interpretation der Aktivitäts-Werte gilt es zu bedenken, dass die gemessenen Werte in keinem direkten Verhältnis zum Bewegungsausmaß der Maus stehen müssen. So kann eine Maus theoretisch mit minimalen, aber stetigen Bewegungen ähnliche Messwerte wie eine sich ständig im Käfig bewegende Maus erzielen. Die Kreislaufstimulation, in dieser Studie durch Herzfrequenz und Blutdruck gemessen, kann daher nicht direkt aus der absoluten Höhe der Aktivitäts-Messungen abgeleitet werden. In der Betrachtung der gemessenen Aktivitäten ist daher besonders der zirkadiane Verlauf von Bedeutung. Dessen klarer Verlauf, sowohl in den Basismessungen als auch unter AT-II-Gabe, kann als Anhalt für erhaltene Vitalität sowie einen physiologisch erhaltenen Tag-Nacht-Rhythmus der Versuchstiere gewertet werden.

Die Bedeutung der signifikant erniedrigten, nächtlichen Aktivität der MPO<sup>+</sup>T<sup>+</sup> Gruppe bereits während der Basismessungen wie auch unter AT-II Gabe ist nicht klar einzuordnen. Die entsprechenden Tiere waren im Versuchsverlauf nicht auffällig; Anzeichen für eine körperliche Einschränkung durch eine Infektion oder eine anhaltende Verletzung im Anschluss an die Interventionen waren nicht erkennbar. Für den Fall, dass der Aktivitäts-Unterschied auf einer tatsächlich reduzierten Bewegung der Tiere beruht, konnten eventuell hierdurch verursachte Auswirkungen auf den Blutdruck und die Herzfrequenz durch die Aktivitäts-normierte Auswertung verhindert werden. Literatur-Recherchen zu verändertem Aktivitäts-Verhalten zeigen, dass Rag-KO Mäuse zu einer gesteigerten lokomotorischen Aktivität neigen (Cushman et al. 2003). Diese Tendenz könnte im vorliegenden Mausmodell durch die transfundierten T-Lymphozyten unterdrückt worden sein und somit die erniedrigten Werte der MPO<sup>+</sup>T<sup>+</sup> Gruppe erklären. Zudem zeigt auch die Gruppe MPO<sup>-</sup>T<sup>+</sup>, wenn auch in nicht signifikantem Ausmaß, eine leichte Abnahme der nächtlichen Aktivitäts-Werte. Des weiteren muss auch die Möglichkeit eines Zufallsbefunds in Betracht gezogen werden.

### 5.5.3. Untersuchung der Relaxationsfähigkeit an Aorten

In der Untersuchung der Aorten der Versuchstiere auf ihre Relaxationsfähigkeit zeigte sich in allen Gruppen unter AT-II-Gabe eine signifikant reduzierte endothelabhängige und endothelunabhängige Relaxation. Dies kann einerseits durch die nach AT-II-Gabe induzierte arterielle Hypertonie mit konsekutiver Druckbelastung der Gefäßwände (Rajagopalan et al. 1996), andererseits durch die unabhängig vom Blutdruck stattfindende proliferativen Einflüsse von AT-II auf die Muskel-Zellen der Gefäße (Su et al. 1998) erklärt werden. Im Ausmaß der Schädigung liegen die Daten hierbei im Einklang mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls Einschränkungen der Relaxationsfähigkeit im Bereich von 30% unter AT-II-Gabe gleicher Dauer und Dosis dokumentierten (Sydow et al. 2012)

Im Vergleich der Gruppen muss die signifikant verschlechterte Relaxationsbereitschaft von Aorten der MPO-T Gruppe gegenüber den anderen Gruppen unter AT-II diskutiert werden.

Diese fand sich sowohl unter Ach- (=endothelabhängig) als auch unter NTG- (=endothelunabhängig) Stimulation. Die interne Aufteilung der Gruppe in zwei Teilgruppen mit unterschiedlicher Reaktion lässt verschiedene Überlegungen zu.

Zunächst einmal muss die Möglichkeit eines methodischen Fehlers diskutiert werden. Durch eine Schädigung der Aorten-Ringe während der Präparation kann es zu einer deutlichen Verminderung der Relaxations-Werte kommen. Dagegen spricht das ausgeprägte und ausschließliche Auftreten des Phänomens in nur einer der vier Versuchsgruppen, die alle der gleichen Präparationstechnik und anschließender Versuchsdurchführung unterzogen wurden.

Als weiterer Erklärungsansatz muss der Immunstatus der Gruppe betrachtet werden. Durch das Fehlen von T-Lymphozyten sollten durch die AT-II-Behandlung induzierte, inflammatorische Prozesse am Gefäßsystem eher reduziert werden. Gleiches sollte für ein Fehlen der MPO gelten, für deren Reaktionspartner, wie z.B. HOCl, bereits schädigende Effekte an Gefäßen nachgewiesen werden konnten (Witting et al. 2005).

Versuche, die den Einfluss der NOX-Familie, eine Gruppe von NADPH-Oxidasen, auf Gefäßebene untersuchten, konnten zeigen, dass diese durch AT-II stimuliert werden (Wolf and Wenzel 2004: „Ang II increases through upregulation of p22phox, a subunit of the membrane-bound NAD(P)H-oxidase, the intracellular concentration of reactive oxygen species.“). Ebenfalls konnte bereits eine AT-II abhängige Stimulation der MPO in vitro nachgewiesen werden (Ji et al. 2008). Vorstellbar wäre in Anbetracht dieser Erkenntnisse eine durch das Fehlen der MPO zunehmende Stimulation der NOX-Familie durch AT-II und damit verbunden eine verminderte Relaxierbarkeit der Gefäße, die bereits in anderen Arbeiten beschrieben wurde (Sorescu et al. 2002).

Zuletzt muss ein exogener Einfluss auf die Versuchstiere mit der besonders ausgeprägten Abnahme der Relaxationsfähigkeit, z.B. durch eine Infektion, in Betracht gezogen werden.

Das in der MPO- T - Gruppe zusätzliche Fehlen der MPO kann als weitere Einschränkung der immunologischen Kompetenz, zusätzlich zu dem in allen Versuchstieren vorgelegenen Rag-Knockout erachtet werden. Klinische Anzeichen für eine Infektion der Tiere in Bezug auf hämodynamische Parameter oder beobachtetes Verhalten gab es jedoch nicht.

Insgesamt scheint zu einer abschließenden Beurteilung, besonders auf Grund der so nicht zu erwartend hohen gruppeninternen Streuung, eine Erhöhung der Fallzahl nötig.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann eine Abhängigkeit der Relaxationsfähigkeit von der Präsenz von T-Lymphozyten oder der MPO nicht eindeutig gezeigt werden, wobei für beide eine Einflussnahme möglich erscheint. Einige Studien spekulierten bereits über eine durch Zytokine der T-Lymphozyten vermittelte Entzündung und damit Schädigung von Gefäßwänden (Madhur et al. 2010), während andere Arbeiten auch über inflammatorisch-inhibitorisch wirksame Komponenten einer T-Lymphozyten-Aktivität berichteten (Rajagopalan et al. 1996). Das gezielte Ausschalten der T-Box, ein im Jahr 2000 entdeckter Transkriptions-Faktor von TH1 T-Lymphozyten, konnte in einem AT-II-Mausmodell zwar nicht den Blutdruck-Anstieg reduzieren, jedoch zeigte sich eine Abschwächung der vaskulären Schädigung sowie eine reduzierte Produktion von ROS. Damit konnte erstmalig die generelle Funktion von T-Lymphozyten in der Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie auf Gefäßebene weiter differenziert werden (Hausding et al. 2012).

Die MPO könnte vor allem über die Generierung von reaktionsfreudigen Produkten, wie HOCl, die Gefäßwände schädigen.

Der fehlende Nachweis in den vorliegenden Ergebnissen kann verschiedene Gründe haben. So könnte eventuell die 2-wöchige AT-II-Gabe zeitlich nicht ausgereicht haben um detektierbare Unterschiede an den Gefäßen zwischen den Versuchsgruppen zu erzeugen. Zudem unterliegt die Untersuchung methodisch bedingten Messschwankungen, so dass kleinere Unterschiede auf Grund der Streuung bei dieser geringen Mausezahl verloren gehen können.

Ebenso möglich ist, dass auf Grund der relativ hohen verabreichten AT-II-Dosis die beobachteten Aortenschäden in hohem Maße durch AT-II selbst verursacht wurden und der eventuell nur modulierende Effekt von MPO und T-Lymphozyten nicht zur Darstellung kam.

Zusammenfassend erscheint die Untersuchung der Relaxierbarkeit der Aorten als geeignet, zusätzlich zu den hämodynamischen Messungen, quantitative Aussagen über die Schwere hypertensiver Schädigung im AT-II-Mausmodell zu tätigen, jedoch sollte in weiteren Studien durch eine größere Fallzahl die Herausarbeitung eventueller Unterschiede erleichtert werden.

## 5.6. Herzgewichte und Körpergewichte

In der Untersuchung der Körpergewichte der Tiere zeigte sich zunächst ein gleichmäßiger, geringer Gewichtsverlust in allen Gruppen durch die Telemetrie-Operation. Dieser ist in der Literatur beschrieben, wird als unproblematisch für den weiteren Versuchsdurchgang erachtet und entsprach in seinem Ausmaß den allgemeinen Erfahrungen des Institutes mit der Telemetrie-Operation von gesunden C57Bl/6J-Mäusen (Bakker et al. 2014).

Im weiteren Verlauf der Studie waren die Körpergewichte aller Versuchstiere stabil, was als weiteres Indiz für einen guten Gesundheitszustand der Tiere erachtet werden kann.

Die Auswertung der Herzgewichte zeigte eine signifikante Erhöhung der Herzgewichte in allen AT-II behandelten Versuchstieren. Zwischen den 4 AT-II behandelten Versuchsgruppen kam es dabei zu keinen Unterschieden.

Im Vergleich zu AT-II behandelten C57BL/6J-Wildtyp-Tieren waren die Herzgewichte der 4 Versuchsgruppen jedoch signifikant erniedrigt. Ursächlich hierfür könnte das in den Wildtyp-Mäusen vergleichsweise ausgeprägtere Immunsystem sein, dass, im Vergleich zu dem Rag-KO-Hintergrund der 4 Versuchsgruppen, eine Herzhypertrophie zusätzlich begünstigen könnte.

Da auch die Herzhypertrophie der T-Lymphozyten transfundierten Tieren geringer war als die der Wildtyp-Mäuse muss davon ausgegangen werden, dass andere Anteile des Immunsystems in diesen Prozess involviert zu sein scheinen.

Andere Studien zeigten durch T-Lymphozyten begünstigte kardiale Schädigungen zudem vor allem im Rahmen einer gesteigerten Fibrose und Dilatation und nicht in einer muskulären Hypertrophie (Laroumanie et al. 2014), so dass die von uns durchgeführten Herzgewicht-Bestimmungen die durch T-Lymphozyten vermittelte kardialen Defekte eventuell nicht in vollem Umfang detektierten. Untersuchungen von histologischen Präparaten der Versuchstiere könnten hierzu in weiterführenden Studien Erkenntnisse liefern.

## 5.7. In vitro – Stimulierung von T-Lymphozyten

Wie schon im Ergebnisteil thematisiert konnte eine Inkubation auf CD3-Rezeptor-Wellen auf Grund einer maximalen Stimulation der T-Lymphozyten schon unter basalen Bedingungen keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen zeigen. Dies ist so bisher in der Literatur nicht diskutiert worden, jedoch wurde die Aktivierung von T-Lymphozyten in bestimmten CD3-Well-Sets als sehr ausgeprägt vermerkt (Verwilghen et al. 1991).

Die als Reaktion auf diese Beobachtung durchgeführten Inkubationen in unbeschichteten 96-Well-Platten zeigten hingegen verwertbare Ergebnisse. Diese Methodik ist in der Literatur bisher so nicht beschrieben, allerdings zeigten sich im Verlauf reproduzierbare, den Hypothesen entsprechende Ergebnisse.

So konnte gezeigt werden, dass MPO die IL2-Sekretion der T-Lymphozyten von C57Bl/6J-Mäusen steigert und die Anwesenheit der AT-II diesen Effekt noch verstärkt. AT-II alleine hatte dagegen kaum Einfluss auf die gemessene IL-2 Konzentration. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit nicht veröffentlichten Daten der Arbeitsgemeinschaft, die in einem ähnlichen Versuchsaufbau die Stimulation von humanen T-Lymphozyten durch MPO zeigen konnten.

Die Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, dass T-Lymphozyten einem direkten Einfluss durch AT-II unterliegen und somit zumindest teilweise für die durch AT-II-Gabe vermittelten Effekte verantwortlich sein könnten. Dabei scheint der auf der Oberfläche von T-Lymphozyten nachweisbare Angiotensin-I-Rezeptor für die Reaktion der Zellen auf die AT-II-Gabe verantwortlich zu sein („virtually all the effects of angiotensin II to modulate T-cell proliferation are mediated by AT1 receptors“ Nataraj et al. 1999). In einer in-vitro Studie reduzierte die Gabe von Losartan, einem AT-1-Rezeptor-Blocker, den über den Marker CD69 bestimmten Aktivitäts-Grad von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, obwohl die gleiche Studie keinen Aktivitäts-Gewinn der T-Lymphozyten unter AT-II-Gabe gemessen hatte (Silva-Filho et al. 2011).

Darüber hinaus kann die durch MPO-Gabe nochmals überadditiv gesteigerte Aktivität der T-Lymphozyten als Hinweis darauf gewertet werden, dass auch zwischen diesen beiden Stimuli eine direkte Verbindung besteht, die in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie von Bedeutung sein könnte.

Grundsätzlich erscheint für die behandelte Thematik der in vitro-Ansatz als zusätzliche Untersuchungsmöglichkeit für Interaktionen zwischen MPO, T-Lymphozyten und AT-II sinnvoll und erweitert die Aussagekraft der in vivo Beobachtungen um die Nachweis-Möglichkeit direkter Effekte zwischen den beteiligten Faktoren.



## 5.8. Einschränkung der Übertragbarkeit

Das MPO-System der Maus unterscheidet sich in einigen Punkten von dem des Menschen und so sind Rückschlüsse von Tier auf Mensch nicht ohne weiteres möglich. Der prozentuale Anteil Neutrophiler Granulozyten an zirkulierenden Leukozyten in Mäusen ist deutlich niedriger als im Menschen (Kolaczowska and Kubes 2013: „In humans, 50–70% of circulating leukocytes are neutrophils, whereas only 10–25% are in mice“). Zudem ist auch die gemessene MPO-Konzentration innerhalb der Granulozyten in Mäusen geringer als im Menschen (Malle et al. 2003: „about 10% to 20% of human levels“). Bezüglich der Aktivität der MPO gibt es in der Literatur, v.a. auf Grund unterschiedlicher methodischer Ansätze, derart stark variierende Aussagen, dass eine sichere Aussage bezüglich eventueller Unterschiede aktuell nicht möglich erscheint (Pulli et al. 2013). Des Weiteren zeigt der molekulare Aufbau des MPO-Gens der Maus im Vergleich zum Menschen einige Unterschiede, deren Bedeutung jedoch bisher nicht ermittelt werden konnten (Rutgers et al. 2003).

T-Lymphozyten zeigen in ihrer Entwicklung und Funktion ebenfalls eine Vielzahl von Unterschieden zwischen Mäusen und Menschen. Besonders im Reifungsprozess sind die beteiligten Hormone und Rezeptoren nur teilweise vergleichbar. Hinsichtlich der Funktion der reifen T-Lymphozyten ist sicherlich der markanteste Unterschied das Fehlen von MHCII-Rezeptor Expression auf murine Zellen (Mestas and Hughes 2004). Des Weiteren ist die CD4/CD8-Ratio in gesunden C57Bl/6J-Tieren etwas höher als beim Menschen (Myrick et al. 2002).

Insgesamt wurde bereits eine enorme Vielzahl divergenter Eigenschaften von Maus und Mensch beschrieben, deren klinische Bedeutung zu großen Teilen noch nicht verstanden ist. Aus diesem Grund ist allgemeine Vorsicht bei Übertragen muriner Erkenntnisse auf die Anwendung im Menschen geboten.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die arterielle Hypertonie ist sowohl in Bezug auf ihre Prävalenz als auch auf ihre Mortalität eine der bedeutendsten Erkrankungen unserer Zeit. Arbeiten der letzten Jahre konnten zeigen, dass verschiedene Anteile des menschlichen Immunsystems Einfluss auf die klinische Manifestation einer Hypertonie nehmen.

Diese Dissertation sollte weitere Erkenntnisse über die beteiligten Systeme sowie ihre Interaktionen untereinander beisteuern und konzentrierte sich dabei einerseits auf die T-Lymphozyten, für die in jüngsten Arbeiten ein direkter Zusammenhang mit der Entwicklung der arteriellen Hypertonie aufgezeigt wurde, sowie andererseits auf die MPO, ein proinflammatorisches Enzym neutrophiler Granulozyten, dessen systemische Relevanz aktuell ebenfalls wachsende Aufmerksamkeit erfährt.

Die zu Grunde liegende Hypothese ging von einer möglichen Interaktion zwischen den T-Lymphozyten und der MPO im Rahmen einer AT-II vermittelten Hypertonie aus, die sich durch eine Abschwächung des Blutdruckanstiegs beim Fehlen von T-Lymphozyten, MPO oder beiden zeigen könnte.

Zu diesem Zweck wurden genetisch veränderte Mäuse mit und ohne MPO anteilig einem T-Lymphozyten-Transfer unterzogen. Im Anschluss erfolgten radio-telemetrische Blutdruckmessungen unter Ruhe und unter AT-II-Gabe.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit keine eindeutige Beteiligung der T-Lymphozyten oder der MPO in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie gezeigt werden:

In den Telemetriemessungen konnten weder durch die T-Lymphozyten noch durch die MPO eine phänotypisch-relevante Beeinflussung der Blutdruckentwicklung gezeigt werden.

In der Untersuchung der hypertensiven Gefäßschädigung waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nachweisbar.

Unter Betrachtung der aktuell wachsenden Datenlage erscheint die Involvierung spezifischer Anteile des Immunsystems in der Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie nichtsdestotrotz wahrscheinlich. Die in dieser Arbeit generierten Daten verdeutlichen, dass dabei jedoch nicht von einem stringenten Zusammenhang ausgegangen werden sollte, sondern dass die jüngsten, in definierte Mausmodellen gewonnenen Erkenntnisse nicht ohne weiteres generalisierbar sind.

Die immunologische Beteiligung scheint einen vielschichtig modulierenden Charakter zu haben, dessen weitere Erforschung von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapie-Ansätze der arteriellen Hypertonie sein könnte. Bis jedoch die aktuell noch undurchsichtige Datenlage klinisch umsetzbare Therapieoptionen hervorbringen wird, ist noch weitreichende Forschung nötig.

# Abstract

Arterial hypertension is one of the most important diseases of our time in regard to both prevalence and mortality. Recent studies showed a link between the immune system and the onset of hypertension disease. The aim of this thesis was to provide additional findings about the involved immunological components and their interactions with each other.

Thus on the one hand it focused on the T cells, which are according to recent studies directly correlated with the development of arterial hypertension. On the other hand it focused on the myeloperoxidase (MPO), a pro inflammatory enzyme from neutrophilic granulocytes that is currently of particular interest due to the discovery of its role in system inflammatory processes.

The underlying hypothesis proposed a potential interaction between T cells and myeloperoxidase in the development of arterial hypertension, in this case triggered by AT-II. Thus a reduction of hypertension should be shown through the absence of either T cells or MPO, or both. To investigate these interactions, genetically modified mice with or without MPO were injected with T cells. Subsequently, telemetric measurements of blood pressure were performed in a normal state as well as when arterial hypertension was induced by injecting Angiotensin-II.

In summary, the present work showed no significant contribution neither of T cells, nor of MPO in the pathogenesis of arterial hypertension, since the telemetric measurements did not show any important phenotypical influence on the development of blood pressure. Similarly, histological analyses of the vessels for hypertensive damage did not show any significant difference between the experimental groups.

However, considering the growing scientific knowledge, an involvement of the human immune system in the pathophysiology of arterial hypertension seems to be likely. The results of this work emphasize that the current findings generated in specific mouse models are not to be generalized and that the interactions between arterial hypertension and the immune system seem to be multifaceted. In light of the numerous possibilities of a new target in the treatment of arterial hypertension, further investigation is crucial to promote the understanding in this research field.

# 7. Abkürzungsverzeichnis

A	Aktivität
Ach	Acetylcholin
NTG	Nitroglycerin
AT-II	Angiotensin-II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
FACS	Flourescence activated cell sorting system
HF	Herzfrequenz
HZV	Herz-Zeit-Volumen
IL	Interleukin
MHC	Major Histocompatibility Complex
MPO	Myeloperoxidase
NO <sub>x</sub>	Nitrogen Oxide
SEM	Standard Error of the Mean
T	T-Lymphozyten
TH	T-Helferzelle
TPR	Total peripherer Widerstand
ROS	Reaktive Sauersotfspezies
ZVD	Zentral venöser Druck

## 8. Literaturverzeichnis

- Alderman, Charles J. J., Peter R. Bunyard, Benjamin M. Chain, John C. Foreman, David S. Leake, and David R. Katz. 2002. "Effects of Oxidised Low Density Lipoprotein on Dendritic Cells: A Possible Immunoregulatory Component of the Atherogenic Micro-Environment?" *Cardiovascular Research* 55 (4): 806–19.
- "Alzet©." 2014. <http://www.alzet.com/images/home/ALZETvideo.jpg>. Accessed September 12.
- Andersen, Mads Hald, David Schrama, Per thor Straten, and Jürgen C. Becker. 2006. "Cytotoxic T Cells." *Journal of Investigative Dermatology* 126 (1): 32–41. doi:10.1038/sj.jid.5700001.
- Andrews, P. C., and N. I. Krinsky. 1981. "The Reductive Cleavage of Myeloperoxidase in Half-Producing Enzymically Active Hemi-Myeloperoxidase." *The Journal of Biological Chemistry* 256 (9): 4211–18.
- Ansari, Habib R., Angela M. Davis, Ismail Kaddour-Djebbar, and Ata A. Abdel-Latif. 2003. "Effects of Prostaglandin F2alpha and Latanoprost on Phosphoinositide Turnover, Myosin Light Chain Phosphorylation and Contraction in Cat Iris Sphincter." *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics: The Official Journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 19 (3): 217–31. doi:10.1089/108076803321908347.
- Aratani, Y., H. Koyama, S. Nyui, K. Suzuki, F. Kura, and N. Maeda. 1999. "Severe Impairment in Early Host Defense against *Candida Albicans* in Mice Deficient in Myeloperoxidase." *Infection and Immunity* 67 (4): 1828–36.
- Arnhold, J. 2004. "Properties, Functions, and Secretion of Human Myeloperoxidase." *Biochemistry. Biokhimija* 69 (1): 4–9.
- Asico, L., X. Zhang, J. Jiang, D. Cabrera, C. S. Escano, D. R. Sibley, X. Wang, et al. 2011. "Lack of Renal Dopamine D5 Receptors Promotes Hypertension." *Journal of the American Society of Nephrology* 22 (1): 82–89. doi:10.1681/ASN.2010050533.
- Bakker, Jaco, Rianne Klomp, Milene WM Rijnbeek, Saskia S Arndt, Ingrid HCHM Philippens, and Jan AM Langermans. 2014. "Recovery Time after Intra-Abdominal Transmitter Placement for Telemetric (neuro) Physiological Measurement in Freely Moving Common Marmosets (*Callitrix Jacchus*)." *Animal Biotelemetry* 2 (1): 10. doi:10.1186/2050-3385-2-10.
- Banday, Anees Ahmad, and Mustafa F. Lokhandwala. 2008. "Dopamine Receptors and Hypertension." *Current Hypertension Reports* 10 (4): 268–75.
- Barhoumi, Tlili, Daniel A Kasal, Melissa W Li, Layla Shbat, Pascal Laurant, Mario F Neves, Pierre Paradis, and Ernesto L Schiffrin. 2011a. "T Regulatory Lymphocytes Prevent Angiotensin II-Induced Hypertension and Vascular Injury." *Hypertension* 57 (3): 469–76. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.162941.
- Barhoumi, Tlili, Daniel A. Kasal, Melissa W. Li, Layla Shbat, Pascal Laurant, Mario F. Neves, Pierre Paradis, and Ernesto L. Schiffrin. 2011b. "T Regulatory Lymphocytes Prevent Angiotensin II-Induced Hypertension and Vascular Injury." *Hypertension* 57 (3): 469–76. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.162941.
- Bataillard, A, J C Freiche, M Vincent, J Sassard, and J L Touraine. 1986. "Antihypertensive Effect of Neonatal Thymectomy in the Genetically Hypertensive LH Rat." *Thymus* 8 (6): 321–30.
- Beer, Sandra. 2007. "Prämatüre und akzelerierte Arteriosklerose bei Systemischem Lupus Erythematodes." Dissertation. <http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=3635>.
- Blaustein, Mordecai P, Frans H H Leenen, Ling Chen, Vera A Golovina, John M Hamlyn, Thomas L Pallone, James W Van Huysse, Jin Zhang, and W Gil Wier. 2012. "How NaCl Raises Blood Pressure: A New Paradigm for the Pathogenesis of Salt-Dependent Hypertension." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 302 (5): H1031–49. doi:10.1152/ajpheart.00899.2011.

- Brennan, M. L., M. M. Anderson, D. M. Shih, X. D. Qu, X. Wang, A. C. Mehta, L. L. Lim, et al. 2001. "Increased Atherosclerosis in Myeloperoxidase-Deficient Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 107 (4): 419–30. doi:10.1172/JCI8797.
- Brody, M J. 1986. "Central Nervous System Mechanisms of Arterial Pressure Regulation." *Federation Proceedings* 45 (12): 2700–2706.
- Carretero, Oscar A., and Suzanne Oparil. 2000. "Essential Hypertension Part I: Definition and Etiology." *Circulation* 101 (3): 329–35. doi:10.1161/01.CIR.101.3.329.
- Cheng, Jilin, Qingen Ke, Zhuang Jin, Haibin Wang, Olivier Kocher, James P. Morgan, Jieli Zhang, and Clyde S. Crumpacker. 2009. "Cytomegalovirus Infection Causes an Increase of Arterial Blood Pressure." *PLoS Pathogens* 5 (5). doi:10.1371/journal.ppat.1000427.
- Coles, Barbara, Ceri A. Fielding, Stefan Rose-John, Jürgen Scheller, Simon A. Jones, and Valerie B. O'Donnell. 2007. "Classic Interleukin-6 Receptor Signaling and Interleukin-6 Trans-Signaling Differentially Control Angiotensin II-Dependent Hypertension, Cardiac Signal Transducer and Activator of Transcription-3 Activation, and Vascular Hypertrophy in Vivo." *The American Journal of Pathology* 171 (1): 315–25. doi:10.2353/ajpath.2007.061078.
- Collins, Alan R, Janet Schnee, Wei Wang, Sarah Kim, Michael C Fishbein, Dennis Bruemmer, Ronald E Law, Susanne Nicholas, Robert S Ross, and Willa A Hsueh. 2004. "Osteopontin Modulates Angiotensin II- Induced Fibrosis in the Intact Murine Heart." *Journal of the American College of Cardiology* 43 (9): 1698–1705. doi:10.1016/j.jacc.2003.11.058.
- Cowley AW, Jr, and Roman RJ. 1996. "The Role of the Kidney in Hypertension." *JAMA* 275 (20): 1581–89. doi:10.1001/jama.1996.03530440061038.
- Crowley, Steven D, Susan B Gurley, Maria J Herrera, Phillip Ruiz, Robert Griffiths, Anil P Kumar, Hyung-Suk Kim, Oliver Smithies, Thu H Le, and Thomas M Coffman. 2006. "Angiotensin II Causes Hypertension and Cardiac Hypertrophy through Its Receptors in the Kidney." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (47): 17985–90. doi:10.1073/pnas.0605545103.
- Cushman, Jesse, Jeannette Lo, Zhi Huang, Clive Wasserfall, and John M. Petitto. 2003. "Neurobehavioral Changes Resulting from Recombinase Activation Gene 1 Deletion." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10 (1): 13–18.
- Daugherty, A., J. L. Dunn, D. L. Rateri, and J. W. Heinecke. 1994. "Myeloperoxidase, a Catalyst for Lipoprotein Oxidation, Is Expressed in Human Atherosclerotic Lesions." *The Journal of Clinical Investigation* 94 (1): 437–44. doi:10.1172/JCI117342.
- Daugherty, A., M. W. Manning, and L. A. Cassis. 2000. "Angiotensin II Promotes Atherosclerotic Lesions and Aneurysms in Apolipoprotein E-Deficient Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 105 (11): 1605–12. doi:10.1172/JCI7818.
- Deimann, W. 1984. "Endogenous Peroxidase Activity in Mononuclear Phagocytes." *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 15 (2): 1–58.
- DiBona, G. F. 2000. "Nervous Kidney : Interaction Between Renal Sympathetic Nerves and the Renin-Angiotensin System in the Control of Renal Function." *Hypertension* 36 (6): 1083–88. doi:10.1161/01.HYP.36.6.1083.
- Eiserich, Jason P., Stephan Baldus, Marie-Luise Brennan, Wenxin Ma, Chunxiang Zhang, Albert Tousson, Laura Castro, et al. 2002. "Myeloperoxidase, a Leukocyte-Derived Vascular NO Oxidase." *Science (New York, N.Y.)* 296 (5577): 2391–94. doi:10.1126/science.1106830.
- Elloso, M. Merle, Mireia Gomez-Angelats, and Anne M. Fourie. 2012. "Targeting the Th17 Pathway in Psoriasis." *Journal of Leukocyte Biology* 92 (6): 1187–97. doi:10.1189/jlb.0212101.
- Elmarakby, Ahmed A., Jeffrey E. Quigley, John D. Imig, Jennifer S. Pollock, and David M. Pollock. 2008. "TNF-Alpha Inhibition Reduces Renal Injury in DOCA-Salt Hypertensive Rats." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294 (1): R76–83. doi:10.1152/ajpregu.00466.2007.

- Erdös, E G, and R A Skidgel. 1990. "Renal Metabolism of Angiotensin I and II." *Kidney International. Supplement* 30 (November): S24–27.
- Falk, I., A. J. Potocnik, T. Barthlott, C. N. Levelt, and K. Eichmann. 1996. "Immature T Cells in Peripheral Lymphoid Organs of Recombinase-Activating Gene-1/-2-Deficient Mice. Thymus Dependence and Responsiveness to Anti-CD3 Epsilon Antibody." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 156 (4): 1362–68.
- Fenna, R., J. Zeng, and C. Davey. 1995. "Structure of the Green Heme in Myeloperoxidase." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 316 (1): 653–56. doi:10.1006/abbi.1995.1086.
- Friedrichs, Kai Peter. 2011. "Die Bedeutung Der Myeloperoxidase in Der Pathophysiologie Des Vorhofflimmerns."
- Furjanic, Marianne. 2008. "Analyse Zur Offenheitsrate Der Arteria Thoracica Interna - versus Venenbypasses Anhand Angiographischer Daten Bei 663 Symptomatischen Patienten." Text.PhDThesis, lmu. <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/9495/>.
- Ganten. 1999. "Immunsystem Und Infektiologie." In , 315–37.
- GraphPad Software. 2015. "Curve Fitting - Hill Slope." [http://www.graphpad.com/guides/prism/6/curve-fitting/index.htm?reg\\_hill\\_slope.htm](http://www.graphpad.com/guides/prism/6/curve-fitting/index.htm?reg_hill_slope.htm). June 3.
- Griffin, S A, W C Brown, F MacPherson, J C McGrath, V G Wilson, N Korsgaard, M J Mulvany, and A F Lever. 1991. "Angiotensin II Causes Vascular Hypertrophy in Part by a Non-Pressor Mechanism." *Hypertension* 17 (5): 626–35.
- Griffith, Coulthard, and Pusey. 1996. "T Cell Responses to Myeloperoxidase (MPO) and Proteinase 3 (PR3) in Patients with Systemic Vasculitis." *Clinical and Experimental Immunology* 103 (2): 253–58. doi:10.1046/j.1365-2249.1996.d01-629.x.
- Guzik, Tomasz J, Nyssa E Hoch, Kathryn A Brown, Louise A McCann, Ayaz Rahman, Sergey Dikalov, Jorg Goronzy, Cornelia Weyand, and David G Harrison. 2007. "Role of the T Cell in the Genesis of Angiotensin II Induced Hypertension and Vascular Dysfunction." *The Journal of Experimental Medicine* 204 (10): 2449–60. doi:10.1084/jem.20070657.
- Hansson, Markus, Inge Olsson, and William M. Nauseef. 2006. "Biosynthesis, Processing, and Sorting of Human Myeloperoxidase." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 445 (2): 214–24. doi:10.1016/j.abb.2005.08.009.
- Haraba et al. 2011. "T Cells Are Active Participants in the Progression of Atherosclerotic Plaques." *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)* Vol. 6 Issue 4 (Oct-Dec2011): 1529.
- Harrison, David G, and Tomasz J Guzik. 2011. "Inflammation, Immunity, and Hypertension." *Hypertension* 57 (2): 132–40. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.163576.
- Harrison, David G, Antony Vinh, Heinrich Lob, and Meena S Madhur. 2010. "Role of the Adaptive Immune System in Hypertension." *Current Opinion in Pharmacology* 10 (2): 203–7. doi:10.1016/j.coph.2010.01.006.
- Harrison, J. E., and J. Schultz. 1976. "Studies on the Chlorinating Activity of Myeloperoxidase." *The Journal of Biological Chemistry* 251 (5): 1371–74.
- Hausding, Michael, Swenja Kröller-Schön, Isabell Schmidgen, Matthias Oelze, Thomas Münzel, Andreas Daiber, and Philip Wenzel. 2012. "The T Helper 1 Transcription Factor T Box Expressed in T Cells Is a Mediator of Angiotensin II Induced Inflammation, Vascular Dysfunction and Oxidative Stress in the Murine Vasculature." *Biophysical Journal* 102 (3): 476a – 477a. doi:10.1016/j.bpj.2011.11.2612.
- Hawkins, C. L., D. I. Pattison, and M. J. Davies. 2003. "Hypochlorite-Induced Oxidation of Amino Acids, Peptides and Proteins." *Amino Acids* 25 (3-4): 259–74. doi:10.1007/s00726-003-0016-x.
- Hazen, S. L., and J. W. Heinecke. 1997. "3-Chlorotyrosine, a Specific Marker of Myeloperoxidase-Catalyzed Oxidation, Is Markedly Elevated in Low Density Lipoprotein Isolated from

- Human Atherosclerotic Intima.” *The Journal of Clinical Investigation* 99 (9): 2075–81. doi:10.1172/JCI119379.
- Hazen, S. L., F. F. Hsu, D. M. Mueller, J. R. Crowley, and J. W. Heinecke. 1996. “Human Neutrophils Employ Chlorine Gas as an Oxidant during Phagocytosis.” *The Journal of Clinical Investigation* 98 (6): 1283–89. doi:10.1172/JCI118914.
- Hendel, Michael D, and John P Collister. 2005. “Contribution of the Subfornical Organ to Angiotensin II-Induced Hypertension.” *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 288 (2): H680–85. doi:10.1152/ajpheart.00823.2004.
- Howard, R. R., C. S. Fasano, L. Frey, and C. H. Miller. 1996. “Reference Intervals of CD3, CD4, CD8, CD4/CD8, and Absolute CD4 Values in Asian and Non-Asian Populations.” *Cytometry* 26 (3): 231–32. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19960915)26:3<231::AID-CYTO9>3.0.CO;2-H.
- Hsieh, S. C., H. S. Yu, S. H. Cheng, K. J. Li, M. C. Lu, C. H. Wu, C. Y. Tsai, and C. L. Yu. 2007. “Anti-Myeloperoxidase Antibodies Enhance Phagocytosis, IL-8 Production, and Glucose Uptake of Polymorphonuclear Neutrophils rather than Anti-Proteinase 3 Antibodies Leading to Activation-Induced Cell Death of the Neutrophils.” *Clinical Rheumatology* 26 (2): 216–24. doi:10.1007/s10067-006-0285-3.
- Huetteman, Daniel A., and Heather Bogie. 2009. “Direct Blood Pressure Monitoring in Laboratory Rodents via Implantable Radio Telemetry.” In *Cardiovascular Genomics*, edited by Keith DiPetrillo, 57–73. *Methods in Molecular Biology*™ 573. Humana Press. [http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-247-6\\_4](http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-247-6_4).
- Ichihara, S, T Senbonmatsu, E Price Jr, T Ichiki, F A Gaffney, and T Inagami. 2001. “Angiotensin II Type 2 Receptor Is Essential for Left Ventricular Hypertrophy and Cardiac Fibrosis in Chronic Angiotensin II-Induced Hypertension.” *Circulation* 104 (3): 346–51.
- Ignarro, L. J., G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, and G. Chaudhuri. 1987. “Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released from Artery and Vein Is Nitric Oxide.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (24): 9265–69.
- Izadjoo, M. J., Y. Polotsky, M. G. Mense, A. K. Bhattacharjee, C. M. Parnavitana, T. L. Hadfield, and D. L. Hoover. 2000. “Impaired Control of Brucella Melitensis Infection in Rag1-Deficient Mice.” *Infection and Immunity* 68 (9): 5314–20.
- Jadidi-Niaragh, F., and A. Mirshafiey. 2011. “Th17 Cell, the New Player of Neuroinflammatory Process in Multiple Sclerosis.” *Scandinavian Journal of Immunology* 74 (1): 1–13. doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02536.x.
- Janeway, and Walport. 2001. “Immunobiology.” In , 1–4.
- Ji, Yuan-yuan, Zhi-dong Wang, Jun-tian Liu, and Na Liu. 2008. “[Angiotensin II induces toll-like receptor 4 expression and myeloperoxidase activity in RAW264.7 cells].” *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi = Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology* 24 (11): 1037–39.
- Johansson, C., and P. Thorén. 1997. “The Effects of Triiodothyronine (T3) on Heart Rate, Temperature and ECG Measured with Telemetry in Freely Moving Mice.” *Acta Physiologica Scandinavica* 160 (2): 133–38. doi:10.1046/j.1365-201X.1997.00134.x.
- Jonas, B S, P Franks, and D D Ingram. 1997. “Are Symptoms of Anxiety and Depression Risk Factors for Hypertension? Longitudinal Evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey I Epidemiologic Follow-up Study.” *Archives of Family Medicine* 6 (1): 43–49.
- Kaïdi, S., F. Brutel, F. Van Deun, K. Kramer, R. Remie, W. Dewé, P. Remusat, A. Delaunois, and O. Depelchin. 2007. “Comparison of Two Methods (left Carotid Artery and Abdominal Aorta) for Surgical Implantation of Radiotelemetry Devices in CD-1 Mice.” *Laboratory Animals* 41 (3): 388–402. doi:10.1258/002367707781282839.



- Kaminski, Marcin M., Sven W. Sauer, Claus-Detlev Klemke, Dorothee Süß, Jürgen G. Okun, Peter H. Krammer, and Karsten Gülow. 2010. "Mitochondrial Reactive Oxygen Species Control T Cell Activation by Regulating IL-2 and IL-4 Expression: Mechanism of Ciprofloxacin-Mediated Immunosuppression." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184 (9): 4827–41. doi:10.4049/jimmunol.0901662.
- King, C. C., M. M. Jefferson, and E. L. Thomas. 1997. "Secretion and Inactivation of Myeloperoxidase by Isolated Neutrophils." *Journal of Leukocyte Biology* 61 (3): 293–302.
- Klebanoff, Seymour J. 2005. "Myeloperoxidase: Friend and Foe." *Journal of Leukocyte Biology* 77 (5): 598–625. doi:10.1189/jlb.1204697.
- Kolaczowska, Elzbieta, and Paul Kubes. 2013. "Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation." *Nature Reviews. Immunology* 13 (3): 159–75. doi:10.1038/nri3399.
- Kota, Sunil Kumar, Siva Krishna Kota, Sandip Panda, and Kirtikumar D. Modi. 2014. "A Case of Liddle's Syndrome; Unusual Presentation with Hypertensive Encephalopathy." *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation: An Official Publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia* 25 (4): 869–71.
- Kutter, D. 1998. "Prevalence of Myeloperoxidase Deficiency: Population Studies Using Bayer-Technicon Automated Hematology." *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 76 (10): 669–75.
- Kvakan, Heda, Markus Kleinewietfeld, Fatimunnisa Qadri, Joon-Keun Park, Robert Fischer, Ines Schwarz, Hans-Peter Rahn, et al. 2009. "Regulatory T Cells Ameliorate Angiotensin II-Induced Cardiac Damage." *Circulation* 119 (22): 2904–12. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.832782.
- Kyaw, Tin, Amy Winship, Christopher Tay, Peter Kanellakis, Hamid Hosseini, Anh Cao, Priscilla Li, Peter Tipping, Alex Bobik, and Ban-Hock Toh. 2013. "Cytotoxic and Proinflammatory CD8+ T Lymphocytes Promote Development of Vulnerable Atherosclerotic Plaques in apoE-Deficient Mice." *Circulation* 127 (9): 1028–39. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001347.
- Laroumanie, Fanny, Victorine Douin-Echinard, Joffrey Pozzo, Olivier Lairez, Florence Tortosa, Claire Vinel, Christine Delage, et al. 2014. "CD4+ T Cells Promote the Transition from Hypertrophy to Heart Failure during Chronic Pressure Overload." *Circulation* 129 (21): 2111–24. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007101.
- Lee, Ha-Na. 2012. "Mikrozirkulation Der Haut Und Intima-Media-Dicke Bei Ehemaligen Extrem Kleinen Frühgeborenen." Text.PhDThesis, lmu. <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/14357/>.
- Leeuwenburgh, C., M. M. Hardy, S. L. Hazen, P. Wagner, S. Oh-ishi, U. P. Steinbrecher, and J. W. Heinecke. 1997. "Reactive Nitrogen Intermediates Promote Low Density Lipoprotein Oxidation in Human Atherosclerotic Intima." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (3): 1433–36.
- Leopold, Jane A., Aamir Dam, Bradley A. Maron, Anne W. Scribner, Ronglih Liao, Diane E. Handy, Robert C. Stanton, Bertram Pitt, and Joseph Loscalzo. 2007. "Aldosterone Impairs Vascular Reactivity by Decreasing Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity." *Nature Medicine* 13 (2): 189–97. doi:10.1038/nm1545.
- Li, Jian-Jun, and Ji-Lin Chen. 2005. "Inflammation May Be a Bridge Connecting Hypertension and Atherosclerosis." *Medical Hypotheses* 64 (5): 925–29. doi:10.1016/j.mehy.2004.10.016.
- Link, and Bokemeyer. 2006. "Supportivtherapie Bei Malignen Erkrankungen." In , 136.
- Liu, Yi-Chien, Chi-Jung Chung, Horng-Sheng Shiue, Ya-Yun Cheng, Shiau-Rung Huang, Chien-Tien Su, and Yu-Mei Hsueh. 2013. "Genetic Polymorphisms of Myeloperoxidase and Their Effect on Hypertension." *Blood Pressure* 22 (5): 282–89. doi:10.3109/08037051.2012.759331.

- Long, D. A., K. L. Price, J. Herrera-Acosta, and R. J. Johnson. 2004. "How Does Angiotensin II Cause Renal Injury?" *Hypertension* 43 (4): 722–23. doi:10.1161/01.HYP.0000120964.22281.3e.
- Ludmer, P. L., A. P. Selwyn, T. L. Shook, R. R. Wayne, G. H. Mudge, R. W. Alexander, and P. Ganz. 1986. "Paradoxical Vasoconstriction Induced by Acetylcholine in Atherosclerotic Coronary Arteries." *The New England Journal of Medicine* 315 (17): 1046–51. doi:10.1056/NEJM198610233151702.
- Lum Min, S. A., and R. Tabrizchi. 1995. "Effects of 8-Bromoguanosine 3':5'-Cyclic Monophosphate on Phenylephrine-Induced Phosphatidylinositol Hydrolysis and Contraction in Rat Caudal Artery." *British Journal of Pharmacology* 116 (1): 1697–1703.
- Madhur, Meena S., Heinrich E. Lob, Louise A. McCann, Yoichiro Iwakura, Yelena Blinder, Tomasz J. Guzik, and David G. Harrison. 2010. "Interleukin 17 Promotes Angiotensin II-Induced Hypertension and Vascular Dysfunction." *Hypertension* 55 (2): 500–507. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.145094.
- Malle, Ernst, Thomas Buch, and Hermann-Josef Grone. 2003. "Myeloperoxidase in Kidney Disease." *Kidney International* 64 (6): 1956–67. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00336.x.
- Marcinkiewicz, J., B. M. Chain, E. Olszowska, S. Olszowski, and J. M. Zgliczyński. 1991. "Enhancement of Immunogenic Properties of Ovalbumin as a Result of Its Chlorination." *The International Journal of Biochemistry* 23 (12): 1393–95.
- Marvar, Paul J., Antony Vinh, Salim Thabet, Heinrich E. Lob, Duke Geem, Kerry J. Ressler, and David G. Harrison. 2012. "T Lymphocytes and Vascular Inflammation Contribute to Stress-Dependent Hypertension." *Biological Psychiatry* 71 (9): 774–82. doi:10.1016/j.biopsych.2012.01.017.
- Mayerl, Christina, Melanie Lukasser, Roland Sedivy, Harald Niederegger, Ruediger Seiler, and Georg Wick. 2006. "Atherosclerosis Research from Past to Present--on the Track of Two Pathologists with Opposing Views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow." *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 449 (1): 96–103. doi:10.1007/s00428-006-0176-7.
- Mazzolai, Lucia, Michel A. Duchosal, Martine Korber, Karima Bouzourene, Jean François Aubert, Hiroyuki Hao, Veronique Vallet, et al. 2004. "Endogenous Angiotensin II Induces Atherosclerotic Plaque Vulnerability and Elicits a Th1 Response in ApoE<sup>-/-</sup> Mice." *Hypertension* 44 (3): 277–82. doi:10.1161/01.HYP.0000140269.55873.7b.
- McGuire, John J., Bruce N. Van Vliet, and Sarah J. Halfyard. 2008. "Blood Pressures, Heart Rate and Locomotor Activity during Salt Loading and Angiotensin II Infusion in Protease-Activated Receptor 2 (PAR2) Knockout Mice." *BMC Physiology* 8: 20. doi:10.1186/1472-6793-8-20.
- Mestas, Javier, and Christopher C. W. Hughes. 2004. "Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology." *The Journal of Immunology* 172 (5): 2731–38. doi:10.4049/jimmunol.172.5.2731.
- Mills, P. A., D. A. Huettman, B. P. Brockway, L. M. Zwiers, A. J. Gelsema, R. S. Schwartz, and K. Kramer. 2000. "A New Method for Measurement of Blood Pressure, Heart Rate, and Activity in the Mouse by Radiotelemetry." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 88 (5): 1537–44.
- Moeller, Flemming, Finn C. Nielsen, and Lars B. Nielsen. 2003. "New Tools for Quantifying and Visualizing Adoptively Transferred Cells in Recipient Mice." *Journal of Immunological Methods* 282 (1-2): 73–82.
- Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou. 1992. "RAG-1-Deficient Mice Have No Mature B and T Lymphocytes." *Cell* 68 (5): 869–77.

- Muller, Dominik N, Erdenechimeg Shagdarsuren, Joon-Keun Park, Ralf Dechend, Eero Mervaala, Franziska Hampich, Anette Fiebeler, et al. 2002. "Immunosuppressive Treatment Protects against Angiotensin II-Induced Renal Damage." *The American Journal of Pathology* 161 (5): 1679–93. doi:10.1016/S0002-9440(10)64445-8.
- Müller, Hans-Joachim. 2001. *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Murphy, Kenneth. 2014. *Janeway's Immunobiology*. Taylor & Francis Limited.
- Myrick, C, R DiGuisto, J DeWolfe, E Bowen, J Kappler, P Marrack, and E K Wakeland. 2002. "Linkage Analysis of Variations in CD4:CD8 T Cell Subsets between C57BL/6 and DBA/2." *Genes and Immunity* 3 (3): 144–50. doi:10.1038/sj.gene.6363819.
- Nataraj, Chandra, Michael I. Oliverio, Roslyn B. Mannon, Peter J. Mannon, Laurent P. Audoly, Carmen S. Amuchastegui, Phillip Ruiz, Oliver Smithies, and Thomas M. Coffman. 1999. "Angiotensin II Regulates Cellular Immune Responses through a Calcineurin-Dependent Pathway." *Journal of Clinical Investigation* 104 (12): 1693–1701. doi:10.1172/JCI7451.
- Nauseef, William M. 2007. "How Human Neutrophils Kill and Degrade Microbes: An Integrated View." *Immunological Reviews* 219 (October): 88–102. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00550.x.
- Nauseef, W. M., S. McCormick, and H. Yi. 1992. "Roles of Heme Insertion and the Mannose-6-Phosphate Receptor in Processing of the Human Myeloid Lysosomal Enzyme, Myeloperoxidase." *Blood* 80 (10): 2622–33.
- Neuhauser, H., M. Thamm, and U. Ellert. 2013. "Blutdruck in Deutschland 2008–2011: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1)." *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 56 (5-6): 795–801. doi:10.1007/s00103-013-1669-6.
- Neumann, Jürgen. 2008. *Immunbiologie: Eine Einführung*. Auflage: 2008. Berlin; Heidelberg: Springer.
- Nicholls, Stephen J., and Stanley L. Hazen. 2009. "Myeloperoxidase, Modified Lipoproteins, and Atherogenesis." *Journal of Lipid Research* 50 (Suppl): S346–51. doi:10.1194/jlr.R800086-JLR200.
- Nicholls, Stephen J., W. H. Wilson Tang, Danielle Brennan, Marie-Luise Brennan, Shirley Mann, Steven E. Nissen, and Stanley L. Hazen. 2011. "Risk Prediction with Serial Myeloperoxidase Monitoring in Patients with Acute Chest Pain." *Clinical Chemistry* 57 (12): 1762–70. doi:10.1373/clinchem.2011.166827.
- Nitschke. 2006. *Humorale Und Zelluläre Immunantwort Gegen Das Prion-Protein*. <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bvb:20-opus-18409>.
- Onusko, Edward. 2003. "Diagnosing Secondary Hypertension." *American Family Physician* 67 (1): 67–74.
- Patschan, O, B Kuttler, U Heemann, A Uber, and R Rettig. 1997. "Kidneys from Normotensive Donors Lower Blood Pressure in Young Transplanted Spontaneously Hypertensive Rats." *The American Journal of Physiology* 273 (1 Pt 2): R175–80.
- Paul, Martin, Ali Poyan Mehr, and Reinhold Kreutz. 2006. "Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems." *Physiological Reviews* 86 (3): 747–803. doi:10.1152/physrev.00036.2005.
- Pollow, Dennis P., Jennifer Uhrlaub, Melissa J. Romero-Aleshire, Kathryn Sandberg, Janko Nikolich-Zugich, Heddwen L. Brooks, and Meredith Hay. 2014. "Sex Differences in T-Lymphocyte Tissue Infiltration and Development of Angiotensin II Hypertension." *Hypertension* 64 (2): 384–90. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03581.
- Prokopowicz, Zofia, Janusz Marcinkiewicz, David R. Katz, and Benjamin M. Chain. 2012. "Neutrophil Myeloperoxidase: Soldier and Statesman." *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* 60 (1): 43–54. doi:10.1007/s00005-011-0156-8.

- Pulli, Benjamin, Muhammad Ali, Reza Forghani, Stefan Schob, Kevin L. C. Hsieh, Gregory Wojtkiewicz, Jenny J. Linnoila, and John W. Chen. 2013. "Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples." *PloS One* 8 (7): e67976. doi:10.1371/journal.pone.0067976.
- Quiroz, Yasmir, Richard J. Johnson, and Bernardo Rodríguez-Iturbe. 2012. "The Role of T Cells in the Pathogenesis of Primary Hypertension." *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 27 Suppl 4 (December): iv2–5. doi:10.1093/ndt/gfs421.
- Rajagopalan, S., S. Kurz, T. Münzel, M. Tarpey, B. A. Freeman, K. K. Griendling, and D. G. Harrison. 1996. "Angiotensin II-Mediated Hypertension in the Rat Increases Vascular Superoxide Production via Membrane NADH/NADPH Oxidase Activation. Contribution to Alterations of Vasomotor Tone." *The Journal of Clinical Investigation* 97 (8): 1916–23. doi:10.1172/JCI118623.
- Reiner, S. L., and R. M. Locksley. 1995. "The Regulation of Immunity to *Leishmania Major*." *Annual Review of Immunology* 13: 151–77. doi:10.1146/annurev.iy.13.040195.001055.
- Rommel, Edgard. 2010. "Immunologie - Geschichte Vom Forschen." *Reflexe*, no. März: 1–4.
- Rettig, R, C G Folberth, H Stauss, D Kopf, R Waldherr, G Baldauf, and T Unger. 1990. "Hypertension in Rats Induced by Renal Grafts from Renovascular Hypertensive Donors." *Hypertension* 15 (4): 429–35.
- Rhodes, J. 2002. "Discovery of Immunopotentiatory Drugs: Current and Future Strategies." *Clinical and Experimental Immunology* 130 (3): 363–69. doi:10.1046/j.1365-2249.2002.02016.x.
- Röntgen. 2005. "Einfluss von Katecholaminen Auf Die Produktion Proinflammatorischer Zytokine in Monozyten."
- Rudolph, Volker, René P Andrié, Tanja K Rudolph, Kai Friedrichs, Anna Klinke, Birgit Hirsch-Hoffmann, Alexander P Schwoerer, et al. 2010. "Myeloperoxidase Acts as a Profibrotic Mediator of Atrial Fibrillation." *Nature Medicine* 16 (4): 470–74. doi:10.1038/nm.2124.
- Rummer, Caroline. 2000. "Einfluss der beiden endogenen Peptide Angiotensin II und Endothelin-1 auf die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten von menschlichem Vorhof- und Ventrikelmyokard." Text.Thesis.Doctoral. <http://www.freidok.uni-freiburg.de/volltexte/52/>.
- Rutgers, Abraham, Peter Heeringa, Joyce E. H. M. Giesen, Ruud T. Theunissen, Heinz Jacobs, and Jan Willem Cohen Tervaert. 2003. "Neutrophil Myeloperoxidase Activity and the Influence of Two Single-Nucleotide Promoter Polymorphisms." *British Journal of Haematology* 123 (3): 536–38.
- Saito, K, J S Gutkind, and J M Saavedra. 1987. "Angiotensin II Binding Sites in the Conduction System of Rat Hearts." *The American Journal of Physiology* 253 (6 Pt 2): H1618–22.
- Scheffel. 2014. "Moderne Verfahren Zur Identifikation von DNA: Der Genetische Fingerabdruck, Die Gelelektrophorese." <http://www.scheffel.org.bw.schule.de/faecher/science/biologie/molangewandt/3fingerprint/fingerprint.htm>. Accessed October 12.
- Schmidt-Haupt, Robin. 2011. "Die Rolle von Myeloperoxidase bei der Pathogenese Hypertonie-induzierter Nierenschäden [Elektronische Ressource] / Robin Schmidt-Haupt. Betreuer: Ulrich Wenzel." Online-Ressource, Hamburg: Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg.
- Seaberg, Eric C., Alvaro Muñoz, Ming Lu, Roger Detels, Joseph B. Margolick, Sharon A. Riddler, Carolyn M. Williams, John P. Phair, and Multicenter AIDS Cohort Study. 2005. "Association between Highly Active Antiretroviral Therapy and Hypertension in a Large Cohort of Men Followed from 1984 to 2003." *AIDS (London, England)* 19 (9): 953–60.
- Shortman, Ken, and Yong-Jun Liu. 2002. "Mouse and Human Dendritic Cell Subtypes." *Nature Reviews. Immunology* 2 (3): 151–61. doi:10.1038/nri746.

- Silva-Filho, João Luiz, Mariana Conceição Souza, Maria das Graças Henriques, Alexandre Morrot, Wilson Savino, Marise Pinheiro Nunes, Celso Caruso-Neves, and Ana Acacia Sá Pinheiro. 2011. "AT1 Receptor-Mediated Angiotensin II Activation and Chemotaxis of T Lymphocytes." *Molecular Immunology* 48 (15-16): 1835–43. doi:10.1016/j.molimm.2011.05.008.
- Soleimani, Manoocher. 2015. "Insulin Resistance and Hypertension: New Insights." *Kidney International* 87 (3): 497–99. doi:10.1038/ki.2014.392.
- Sorescu, Dan, Daiana Weiss, Bernard Lassègue, Roza E. Clempus, Katalin Szöcs, George P. Sorescu, Liisa Valppu, et al. 2002. "Superoxide Production and Expression of Nox Family Proteins in Human Atherosclerosis." *Circulation* 105 (12): 1429–35. doi:10.1161/01.CIR.0000012917.74432.66.
- Steinwald, Vera. 2009. "Interleukin-27 inhibiert die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen über signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)." May 6.
- Su, E. J., D. M. Lombardi, J. Siegal, and S. M. Schwartz. 1998. "Angiotensin II Induces Vascular Smooth Muscle Cell Replication Independent of Blood Pressure." *Hypertension* 31 (6): 1331–37.
- Sydow, Karsten, Christine Schmitz, Eike-Christin von Leitner, Robin von Leitner, Anna Klinke, Dorothee Atzler, Christian Krebs, et al. 2012. "Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 Is an Organ-Specific Mediator of End Organ Damage in a Murine Model of Hypertension." *PloS One* 7 (10): e48150. doi:10.1371/journal.pone.0048150.
- Tang, W. H. Wilson, Yuping Wu, Stephen J. Nicholls, and Stanley L. Hazen. 2011. "Plasma Myeloperoxidase Predicts Incident Cardiovascular Risks in Stable Patients Undergoing Medical Management for Coronary Artery Disease." *Clinical Chemistry* 57 (1): 33–39. doi:10.1373/clinchem.2010.152827.
- Thermo scientific. 2014. "Overview of ELISA." [Http://www.piercenet.com/method/overview-Elisa](http://www.piercenet.com/method/overview-Elisa). Accessed October 12.
- Touyz, R M, and C Berry. 2002. "Recent Advances in Angiotensin II Signaling." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]* 35 (9): 1001–15.
- Treuting, Piper M., Suzanne M. Dintzis, Charles W. Frevert, H. Denny Liggitt, and Kathleen S. Montine, eds. 2012. In *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*, 1st ed, 420. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press.
- Turnbull, Fiona, and Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. 2003. "Effects of Different Blood-Pressure-Lowering Regimens on Major Cardiovascular Events: Results of Prospectively-Designed Overviews of Randomised Trials." *Lancet* 362 (9395): 1527–35.
- Turner, Jan-Eric, Christian Krebs, Andre P. Tittel, Hans-Joachim Paust, Catherine Meyer-Schwesinger, Sabrina B. Bennstein, Oliver M. Steinmetz, et al. 2012. "IL-17A Production by Renal  $\Gamma\delta$  T Cells Promotes Kidney Injury in Crescentic GN." *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 23 (9): 1486–95. doi:10.1681/ASN.2012010040.
- Usberti, M., S. Federico, G. Di Minno, B. Ungaro, G. Ardillo, C. Pecoraro, B. Cianciaruso, A. M. Cerbone, F. Cirillo, and M. Pannain. 1985. "Effects of Angiotensin II on Plasma ADH, Prostaglandin Synthesis, and Water Excretion in Normal Humans." *The American Journal of Physiology* 248 (2 Pt 2): F254–59.
- Van Dalen, C. J., M. W. Whitehouse, C. C. Winterbourn, and A. J. Kettle. 1997. "Thiocyanate and Chloride as Competing Substrates for Myeloperoxidase." *The Biochemical Journal* 327 ( Pt 2) (October): 487–92.
- Van der Veen, Betty S., Menno P. J. de Winther, and Peter Heeringa. 2009. "Myeloperoxidase: Molecular Mechanisms of Action and Their Relevance to Human Health and Disease." *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (11): 2899–2937. doi:10.1089/ARS.2009.2538.

- Van der Zwan, Leonard P., Peter G. Scheffer, Jacqueline M. Dekker, Coen D. A. Stehouwer, Robert J. Heine, and Tom Teerlink. 2010. "Hyperglycemia and Oxidative Stress Strengthen the Association between Myeloperoxidase and Blood Pressure." *Hypertension* 55 (6): 1366–72. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.147231.
- Van der Zwan, Leonard P., Peter G. Scheffer, and Tom Teerlink. 2010. "Reduction of Myeloperoxidase Activity by Melatonin and Pycnogenol May Contribute to Their Blood Pressure Lowering Effect." *Hypertension* 56 (3): e34; author reply e35. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.158170.
- Verwilghen, J., M. L. Baroja, F. Van Vaeck, J. Van Damme, and J. L. Ceuppens. 1991. "Differences in the Stimulating Capacity of Immobilized Anti-CD3 Monoclonal Antibodies: Variable Dependence on Interleukin-1 as a Helper Signal for T-Cell Activation." *Immunology* 72 (2): 269–76.
- Viengchareun, Say, Damien Le Menuet, Laetitia Martinerie, Mathilde Munier, Laurent Pascual-Le Tallec, and Marc Lombès. 2007. "The Mineralocorticoid Receptor: Insights into Its Molecular and (patho)physiological Biology." *Nuclear Receptor Signaling* 5: e012. doi:10.1621/nrs.05012.
- Wang, Wenyu, Elisa T Lee, Richard R Fabsitz, Richard Devereux, Lyle Best, Thomas K Welty, and Barbara V Howard. 2006. "A Longitudinal Study of Hypertension Risk Factors and Their Relation to Cardiovascular Disease: The Strong Heart Study." *Hypertension* 47 (3): 403–9. doi:10.1161/01.HYP.0000200710.29498.80.
- Wassarman, Paul, and Philippe M. Soriano, eds. 2010. *Guide to Techniques in Mouse Development, Part B: Mouse Molecular Genetics: 477*. 1 edition. Academic Press.
- Weiss, Daiana, Dan Sorescu, and W.Robert Taylor. 2001. "Angiotensin II and Atherosclerosis." *The American Journal of Cardiology* 87 (8): 25–32. doi:10.1016/S0002-9149(01)01539-9.
- Whitesall, Steven E., Janet B. Hoff, Alan P. Vollmer, and Louis G. D'Alecy. 2004. "Comparison of Simultaneous Measurement of Mouse Systolic Arterial Blood Pressure by Radiotelemetry and Tail-Cuff Methods." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 286 (6): H2408–15. doi:10.1152/ajpheart.01089.2003.
- Whiteside, Theresa L. 2012. "What Are Regulatory T Cells (Treg) Regulating in Cancer and Why?" *Seminars in Cancer Biology* 22 (4): 327–34. doi:10.1016/j.semcancer.2012.03.004.
- Witting, Paul K., Ben J. Wu, Mark Raftery, Peter Southwell-Keely, and Roland Stocker. 2005. "Probucol Protects against Hypochlorite-Induced Endothelial Dysfunction: Identification of a Novel Pathway of Probucol Oxidation to a Biologically Active Intermediate." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (16): 15612–18. doi:10.1074/jbc.M414256200.
- Wolf, Gunter, and Ulrich O. Wenzel. 2004. "Angiotensin II and Cell Cycle Regulation." *Hypertension* 43 (4): 693–98. doi:10.1161/01.HYP.0000120963.09029.ca.
- Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, and et al. 2003. "HYpertension Prevalence and Blood Pressure Levels in 6 European Countries, Canada, and the United States." *JAMA* 289 (18): 2363–69. doi:10.1001/jama.289.18.2363.
- Wollenberger, Ulla, Reinhard Renneberg, Frank F. Bier, and Frieder W. Scheller. 2012. *Analytische Biochemie: Eine Praktische Einführung in Das Messen Mit Biomolekullen*. John Wiley & Sons.
- Wright, Kate O, Debbie A Murray, Nicholas I Crispe, and Robert H Pierce. 2005. "Quantitative PCR for Detection of the OT-1 Transgene." *BMC Immunology* 6 (August): 20. doi:10.1186/1471-2172-6-20.
- Youn, Jong-Chan, Hee Tae Yu, Beom Jin Lim, Myoung Ju Koh, Jino Lee, Dong-Yeop Chang, Yoon Seok Choi, et al. 2013. "Immunosenescent CD8+ T Cells and C-X-C Chemokine Receptor Type 3 Chemokines Are Increased in Human Hypertension." *Hypertension* 62 (1): 126–33. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.00689.

- Zanchetti, Alberto, M. Gene Bond, Michael Hennig, Albrecht Neiss, Giuseppe Mancina, Cesare Dal Palù, Lennart Hansson, et al. 2002. "Calcium Antagonist Lacidipine Slows down Progression of Asymptomatic Carotid Atherosclerosis: Principal Results of the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA), a Randomized, Double-Blind, Long-Term Trial." *Circulation* 106 (19): 2422–27.
- Zeno. 2014. "Wörterbucheintrag Latein-Deutsch Zu »immunis«. Karl Ernst Georges: Ausführliches ..." Accessed December 8. <http://www.zeno.org/Georges-1913/A/immunis>.
- Zhou, Xinghua, Anna-Karin L. Robertson, Charlotta Hjerpe, and Göran K. Hansson. 2006. "Adoptive Transfer of CD4+ T Cells Reactive to Modified Low-Density Lipoprotein Aggravates Atherosclerosis." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (4): 864–70. doi:10.1161/01.ATV.0000206122.61591.ff.

## 9. Danksagung

Mein Dank für die Ermöglichung und Unterstützung der Dissertation geht an Prof. Dr. med. Ehmke in dessen Institut ich so herzlich aufgenommen wurde und der zu jedem Zeitpunkt mit Rat und Tat zur Verfügung stand.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Seniuk, die mich so wunderbar auf meinem Weg begleitet und gehalten hat.

Herr Dr. rer. nat. Paust (3. Medizinische Klinik/Nephrologie, UKE) möchte ich für seinen unermüdlichen Einsatz am Durchfluscytometer und für motivierende Worte in dunklen Momenten der Ergebnissichtung danken.

Gleiches gilt für Herr Wiebold (Cardiovascular Research Center, UKE), dessen Erfahrung und Geduld die Aorten-Untersuchungen ermöglicht haben.

Vielen Dank auch an das gesamte Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, u.a. Frau Dr. rer. nat. Vitzthum, Herr Dipl.-Ing. Bassalay, Frau Kollien, Frau Kock und Frau Hölzel für eine so freundschaftliche und unglaublich hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.



# 10. Lebenslauf

Name/Anschrift: Oser Philipp  
Heitmannstraße 26  
22083 Hamburg  
Telefon privat: 0160 / 6348270  
Geburtsdatum: 20.03.1989

## Persönliche Daten

.....

Name	Philipp Oser
Geburtsdatum	20. März 1989
Geburtsort	Trier / Ehrang
Eltern	Dr. Bertil Oser Dr. Dorothea Oser
Familienstand	ledig

## Schule und Ausbildung

.....

1996 – 1998	Grundschule Trier / Ehrang
1998 – 2000	Grundschule Bernkastel-Kues
2000 – 2008	Nikolaus-von-Kues Gymnasium, Bernkastel-Kues
03.2008:	Ablegen der Abiturprüfung am Nikolaus-von-Kues Gymnasium
04.- 10.2008:	Zivildienst Deutsches Rotes Kreuz: Ausbildung und Arbeit als Rettungssanitäter
10.2008 – 10.2014:	Studium der Humanmedizin in Hamburg
ab 03.2015:	Assistenzarzt im Asklepios Klinikum Harburg

# 11. Eidesstattliche Erklärung & Versicherung

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: .....