

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

**Die Rolle des adaptiven Immunsystems in der Genese des Angiotensin-II induzierten
Hypertonus und dessen kardiovaskulären Endorganschädigungen unter
verschiedenen Salzdiäten**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors in der Humanmedizin an der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Frau Andra Stubbe

geboren am 22.09.1989 in Potsdam

Hamburg 2017

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 20.03.2018**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. med. Christian Krebs

Meinen Eltern
Margit und Andreas Stubbe

#mypartneringoldenshoes

Den Busybladders

An dieser Stelle möchte ich alle grüßen, die mich kennen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1. Definition von Bluthochdruck und klinische Relevanz der Thematik..... | 1 |
| 1.2. Prävalenz | 4 |
| 1.3. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) | 4 |
| 1.4. Hypertensiogene Effekte von Sauerstoffradikalen | 9 |
| 1.5. Endokrine, hypertensiogene Wirkungen von Angiotensin II | 12 |
| 1.6. Aldosteron und therapieresistente Hypertonie..... | 13 |
| 1.7. Blutdruckeinstellung und Therapieresistenter Bluthochdruck..... | 14 |
| 1.8. Inflammation, Immunsystem und Bluthochdruck | 16 |
| 1.8.1. Historischer Kontext | 16 |
| 1.8.2. Das angeborene und erworbene Immunsystem | 17 |
| 1.8.3. Aktivierung von T-Lymphozyten | 17 |
| 1.8.4. Hypertensiogene Effekte proinflammatorischer Zytokine | 19 |
| 1.8.5. Die Rolle des adaptiven Immunsystems in der Hypertonusgenese | 21 |
| 2. Wissenschaftliche Fragestellung | 25 |
| 3. Material und Methoden | 26 |
| 3.1. Der Tierversuch | 26 |
| 3.2. Verwendete Mauslinien | 26 |
| 3.2.1. Der C57BL/6J WT | 26 |
| 3.2.2. Der Rag-1 -/- KO..... | 27 |
| 3.3. Versuchstierhaltung | 27 |
| 3.4. Protokoll der tierexperimentellen Arbeit..... | 28 |
| 3.4.1. Endpunkte, Methoden und Gruppeneinteilungen | 28 |
| 3.4.2. Versuchsablauf | 30 |
| 3.4.3. Basis- und Speziessalzdäten | 31 |
| 3.5. Bestimmung von Blutdruck, Herzfrequenz und Aktivität mittels Radiotelemetrie | 32 |
| 3.5.1. Implantation der Telemetriesender | 32 |
| 3.5.2. Der Telemetriesender..... | 32 |
| 3.5.3. Messintervalle | 33 |
| 3.5.4. Weiterverarbeitung der kardiovaskulären Parameter | 34 |
| 3.5.5. Vorbereitung des Senders | 35 |
| 3.5.6. Vorbereitung der Versuchstiere | 35 |
| 3.5.7. Prozedere der Implantation | 36 |
| 3.5.8. Postoperative Versorgung | 37 |
| 3.5.9. Postoperative Ausschlusskriterien | 38 |

| | |
|--|-----|
| 3.6. Implantation von osmotischen Minipumpen..... | 38 |
| 3.6.1. Eckdaten der osmotischen Minipumpen..... | 38 |
| 3.6.2. Befüllen der Pumpen | 39 |
| 3.6.3. Das Prozedere der Implantation..... | 39 |
| 3.6.4. Postoperative Versorgung | 40 |
| 3.7. Untersuchungen von Plasma und Urin | 40 |
| 3.7.1. Bestimmung der Hormone des systemischen RAAS aus dem Plasma | 40 |
| 3.7.2. Bestimmung des Wasser- und Elektrolythaushalts und der Kreatinin-Clearance..... | 44 |
| 3.8. Organentnahme und Genotypisierung | 49 |
| 3.8.1. Aorta, Entnahme..... | 49 |
| 3.8.2. Herz, Entnahme | 49 |
| 3.8.3. Niere, Entnahme..... | 50 |
| 3.8.4. Milz | 50 |
| 3.8.5. Tibia-Längenmessung | 50 |
| 3.8.6. Genotypisierung | 50 |
| 3. 9. Endorganschädigung | 52 |
| 3.9.1. Histologische Untersuchungen..... | 52 |
| 3.9.2. Funktionelle Untersuchung der Gefäßreagibilität mittels Myographie | 55 |
| 3.10. Statistik..... | 60 |
| 4. Ergebnisse | 64 |
| 4.1. Radiotelemetrische Messergebnisse | 64 |
| 4.2.1. Mittlerer Arterieller Druck (MAP), Systolischer (SBP) und Diastolischer Druck (DBP) | 64 |
| 4.2.2. Herzfrequenz (HF) und Aktivität..... | 84 |
| 4.2.3. Zusammenfassung Blutdruckdaten | 89 |
| 4.3. Untersuchung von Plasma und Urin..... | 91 |
| 4.3.1. Hormone des systemischen RAAS (Plasma) | 91 |
| 4.3.2. Kreatinin-Clearance, Wasser- und Elektrolythaushalt, Stoffwechselläufige | 94 |
| 4.3.3. Zusammenfassung zu den Untersuchungen von Plasma und Urin | 102 |
| 4.4. Endorganschädigungen | 104 |
| 4.4.1. Histopathologie Aorta und Herz | 104 |
| 4.4.2. Funktionelle Untersuchung der Gefäßreagibilität mittels Myographie | 111 |
| 4.4.3. Zusammenfassung zu den Ergebnissen hinsichtlich der Endorganschäden | 118 |
| 4.5. Milzgewichte | 119 |
| 5. Diskussion..... | 123 |
| 5.1. Verifizierung des Genotyps | 123 |
| 5.2. Semi-sterile Haltungsbedingungen bei Immundefizienz | 123 |

| | |
|---|-----|
| 5.3. Radio-Telemetrie Methode..... | 124 |
| 5.4. ATII induzierte Hypertonie mittels osmotischer Minipumpen | 125 |
| 5.5. Organbadmethode | 126 |
| 5.6. PSR Scoring zur Eruiierung des Ausmaßes der Herzfibrose | 129 |
| 5.7. Quotient aus Herzgewicht zu Tibialänge als Surrogat für Herzhypertrophie | 130 |
| 5.8. Mediafläche als Surrogat für ATII induzierte, vaskuläre Endorganschädigung..... | 130 |
| 5.9. Erfassung des Salz- und Wasserhaushaltes mittels Stoffwechselkäfigen | 131 |
| 5.10. Diskussion der Blutdruckparameter..... | 132 |
| 5.11. Diskussion der Herzfrequenz und Aktivität..... | 136 |
| 5.12. kardiovaskuläre Endorganschädigungen | 137 |
| 5.13. Angiotensin-II Dosierung im Modell der experimentellen Hypertonie..... | 138 |
| 5.14. Dauer der Angiotensin-II Zufuhr | 140 |
| 5.15. Pleiotrope, Immunsystem- <i>unabhängige</i> Angiotensin-II Effekte | 142 |
| 5.16. Weiterführende Untersuchungen..... | 144 |
| 5.17. Die Relevanz unspezifischer Immunreize..... | 150 |
| 5.18. Die Rolle des adaptiven Immunsystems in der Genese des arteriellen Hypertonus | 152 |
| 6. Zusammenfassung..... | 156 |
| 6. Abstract | 157 |
| 7. Abkürzungsverzeichnis | 158 |
| 8. Literaturverzeichnis..... | 160 |
| 9. Abbildungsverzeichnis..... | 176 |
| 10. Tabellenverzeichnis..... | 180 |
| 11. Danksagung | 181 |
| 12. Eidesstattliche Erklärung..... | 182 |

1. Einleitung

1.1. Definition von Bluthochdruck und klinische Relevanz der Thematik

Die Modifizierung des Ohm'schen Gesetzes nach den Regeln der Flussdynamik erlaubt eine einfache Sichtweise auf den Blutdruck. Demnach ist er das Produkt aus dem Gefäßwiderstand der Arterien des Widerstandssystems und dem Blutfluss, der einerseits durch das zirkulierende Blutvolumen und andererseits durch die Auswurfleistung des linken Ventrikels determiniert ist (Coffman 2011). Diese Blutdruckkomponenten unterliegen einer Reihe von regulatorischen Einflüssen durch verschiedene Organsysteme, die für die Blutdruckhomöostase verantwortlich sind; allen voran das sympathische und zentrale Nervensystem und das Gefäßsystem, sowie das Herz und die Nieren (Coffman 2011). Dauerhafte Fehlregulationen innerhalb dieses komplexen Systems führen zur Entstehung von Bluthochdruck. Jüngste Entdeckungen zeigen, dass auch das Immunsystem entscheidend in die Pathophysiologie der Hypertonie involviert ist (Harrison et al. 2011, Touyz 2012). Hypertonie ist demnach das Resultat aus dynamischen Interaktionen zwischen psychischen, physiologischen, multiplen genetischen, sowie umweltbedingten Faktoren (Touyz 2012) und kann als ein Syndrom aus multifaktoriellen und komplexen Störungen, die verschiedene Organsysteme betreffen, verstanden werden (Montezano & Touyz 2014). In den Leitlinien der *European Society of Hypertension* (ESH), der *European Society of Cardiology* (ESC) und der *American Heart Association* (AHA) von 2013 war die arterielle Hypertonie als ein Blutdruck von $\geq 140/90$ mmHg definiert (Mancia et al. 2013) bzw. lag *per definitionem* vor, wenn der Patient Antihypertensiva einnimmt (Mancia et al. 2013, Mozaffarian et al. 2015). Gemäß der aktuellen Leitlinien von 2017 liegt eine arterielle Hypertonie jedoch bereits ab Blutdruckwerten von 130 mmHg systolisch und/oder 80 mmHg diastolisch vor (Whelton, Carey, Aronow, et al. 2017).

Ätiologisch unterscheidet man die primäre (auch essentielle oder arterielle) Hypertonie, die bei ca. 90 % der Hypertoniepatienten vorliegt, von der selteneren, sekundären Hypertonie, die bei 10 % der Patienten im Rahmen einer anderen Grunderkrankung auftritt (z.B. endokrine Störungen, Hyperaldosteronismus oder Gefäßfehlbildungen wie Nierenarterienstenose). In dieser Arbeit soll der Fokus auf die immunologische Genese und neue Therapiemöglichkeiten der primären Hypertonie gelegt werden. Die Genese der essentiellen Hypertonie ist noch nicht vollständig entschlüsselt, es wird jedoch ein genetischer Polymorphismus in mind. 29 blutdruckregulierenden Genen angenommen (Author Manuscript 2011, Mancia et al. 2013). Dies betrifft vor allem Gene, die für das Renin-Angiotensin-Aldosteron System kodieren. Seit Jahrzehnten belegt eine Vielzahl an epidemiologischen Studien, dass die Morbidität und Mortalität bei Hypertoniepatienten durch die erhöhte Inzidenz von kardio- und zerebrovaskulären Ereignissen (Wolf-Maier et al. 2003,

Tocci et al. 2008), sowie renalen Folgeerkrankungen (Hsu et al. 2015) im Vergleich zu normotensiven Patienten epochal erhöht sind. So sind weltweit mit 50-60 % über die Hälfte der Schlaganfälle und mit knapp 50 % die Hälfte der Herzinfarkte auf Bluthochdruck zurückzuführen (Anon 2002, Lawes et al. 2008). Seit 2010 gilt Bluthochdruck weltweit als der Hauptrisikofaktor für den Tod durch kardiovaskuläre Ereignisse, Schlaganfall und chronische Nierenerkrankungen (Anon 2014). Selbst ein geringer Blutdruckanstieg erhöht bereits das kardiovaskuläre Risiko deutlich. So zeigt eine großangelegte metaanalytische Beobachtungsstudie mit einer Million Probanden aus dem Jahre 2002, dass das Risiko für einen ischämischen Myokardinfarkt oder Schlaganfall bereits ab einem Blutdrucklevel von 115 / 75 mmHg in einem logarithmisch-linearen Verhältnis mit der Höhe des Blutdrucks zunimmt und sich dabei pro Anstieg des Drucks um systolisch 20 mmHg und diastolisch 10 mmHg verdoppelt (Lewington et al. 2002). Vor diesem Hintergrund wurde eine neue, riskante Blutdruckkategorie, die so genannte *Prähypertonie*¹, unter die normale bis normal-hohe Blutdruckwerte von 120-139/80-89mmHg zusammengefasst werden, definiert (Bakris et al. 2003). Seither wurde gezeigt, dass sich auch eine langfristig bestehende *Prähypertonie*, vor allem mit Blutdruckwerten im normal-hohen Bereich, ebenso wie die Hypertonie, gefährdend auf die entsprechenden Organsysteme auswirken kann (England 2001, Huang et al. 2013).

¹ Der Begriff *Prähypertonie* taucht in der Definition und Klassifizierung der arteriellen Hypertonie der aktuellen Leitlinien von 2017 nicht mehr auf. Stattdessen wird der Begriff *erhöhter Blutdruck* verwendet.

| Kategorie | Systolischer Druck / mmHg | Diastolischer Druck / mmHg |
|---|-------------------------------|-------------------------------|
| Normaler Blutdruck (Leitlinie 2017) Optimaler Blutdruck (Leitlinie 2013) | < 120 | < 80 |
| Erhöhter Blutdruck (Leitlinie 2017) Normal/Prähypertonie (Leitlinie 2013) | 120-129 | 80-84 |
| Hypertonie Grad 1 (Leitlinie 2017) Hoch Normaler Blutdruck/Prähypertonie (Leitlinie 2013) | 130-139 | 85-89 |
| Hypertonie Grad 2 (Leitlinie 2017) Hypertonie Grad 1 (Leitlinie 2013) | 140-159 | 90-99 |
| Hypertonie Grad 2 (Leitlinie 2013) | 160-179 | 100-109 |
| Hypertensive Krise (Leitlinie 2017) Hypertonie Grad 3 (Leitlinie 2013) | ≥ 180 ≥ 180 | ≥ 120 ≥ 110 |
| Hypertensiver Notfall (Leitlinie 2017) | ≥ 180 + Endorganschädigung | ≥ 120 + Endorganschädigung |
| Isolierte systolische Hypertonie (Leitlinie 2013) | ≥ 140 | < 90 |

Tabelle 1-1: Definition und Klassifizierung von Bluthochdruck in mmHg nach aktuellen Leitlinien 2017 (Whelton, Carey, Aronow, et al. 2017) im Vergleich zu den ESC/ESH/AHA Leitlinien 2013 (Mancia et al. 2013). Die Blutdruckkategorie wird nach dem höchsten Blutdrucklevel (systolisch oder diastolisch) definiert. Die isolierte systolische Hypertonie sollte ebenfalls nach Grad 1, 2 und 3, entsprechend der systolischen Werte, kategorisiert werden (Leitlinie 2013).

Der diastolische Blutdruck (DBP, engl.: *Diastolic Blood Pressure*) und der systolische Blutdruck (SBP, engl.: *Systolic Blood Pressure*) spielen in der Risikostratifizierung für kardiovaskuläre Erkrankungen eine altersabhängige Rolle. Die Auswertung der Framingham Studie ergibt, dass mit steigendem Alter auch die Prävalenz der isolierten systolischen Hypertonie bei beiden Geschlechtern zunimmt. Dieser Anstieg ist ab dem 55. Lebensjahr bei Frauen allerdings steiler als bei Männern. Die ISH geht mit einem 2-5 fach erhöhten Risiko, an einer kardiovaskulären Erkrankung zu versterben, einher (Kannel et al. 1980). Im Gegensatz zum SBP bleibt der DBP mit zunehmendem Alter konstant bzw. fällt jenseits des 60. Lebensjahres leicht ab (Franklin et al. 1997). Dementsprechend steigt im Alter die Differenz zwischen SBP und DBP, die so genannte Pulsamplitude (PA). Basierend auf den Beobachtungen aus der Framingham Studie resultiert aus einer erhöhten Pulsamplitude eine vermehrte arterielle Steifigkeit (Franklin et al. 1999). Letztere gilt als *unabhängiger* Prädiktor für die kardiovaskuläre Mortalität bei Patienten mit essentieller Hypertonie (Laurent et al. 2001). Dementsprechend ist auch die Pulsamplitude als eine wichtige Risikokomponente für kardiovaskuläre Ereignisse und als Indikator für bereits bestehende Gefäßerkrankungen zu

werten (Franklin et al. 1999, Safar 2000). Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass sich mit steigendem Alter der Patienten die Relevanz des DBP und SBP für Folgeerkrankungen hin zum SBP verschiebt (Kennel 2009).

1.2. Prävalenz

Aufgrund der Hypertoniedefinition in den aktuellen Leitlinien von 2017 werden mehr Menschen als Hypertoniker klassifiziert. So ist die Prävalenz der arteriellen Hypertonie in der nordamerikanischen Bevölkerung von 32% auf 46% gestiegen (Whelton et al. 2017). Die Prävalenz von Bluthochdruck steigt signifikant mit dem Alter an und ist bei Afroamerikanern häufiger vertreten, als bei Kaukasiern, Asiaten oder Hispano-Amerikanern (Whelton et al. 2017). Hypertonie ist allerdings nicht nur ein Phänomen in Industrieländern. Die Prävalenz von Bluthochdruck variiert zwischen 30-60 % weltweit (Wolf-Maier et al. 2003, Mancia et al. 2013). In der Höhe des durchschnittlichen SBP ist in vielen westlichen Industrieländern mit hohem Einkommen (z.B. Nordamerika, Westeuropa) seit 1980 ein konstantes Niveau und sogar ein deutlicher Abwärtstrend zu beobachten. Im Vergleich zu Nordamerika ist die Hypertonieprävalenz und die Höhe des SBP in europäischen Industriestaaten und vor allem bei Männern und Frauen mit hohem Einkommen in Westeuropa am höchsten (Wolf-Maier et al. 2003, Danaei et al. 2011). In Entwicklungs- und Schwellenländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen steigt der SBP hingegen tendenziell an und ist weltweit in West- und Ostafrika am höchsten (Danaei et al. 2011, Anon 2014). Analysen gehen davon aus, dass die Häufigkeit der Hypertonie vor allem auch in Entwicklungsländern aufgrund von rasantem Bevölkerungswachstum, demografischem Wandel und durch Änderungen des Lebensstils, die mit dem wachsenden Problem von bluthochdruckbegünstigenden Erkrankungen wie Diabetes und Übergewicht (Touyz 2012) einhergehen, weiterhin ansteigen wird. Hatten im Jahr 2000 ab einem Alter von 20 Jahren mit 26,4 % noch etwas mehr als ein Viertel der Weltbevölkerung Bluthochdruck, wird bis 2025 mit einem globalen Anstieg auf 29 % gerechnet, was etwa 1,56 Milliarden Menschen entspricht (Kearney et al. 2005). Aufgrund der hohen und steigenden Prävalenz des Bluthochdrucks sind kardiovaskuläre Erkrankungen innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte von 1990 bis 2010 pandemisch derart stark angestiegen (Kearney et al. 2005), dass kardiovaskuläre Erkrankungen wie der ischämische Myokardinfarkt oder Schlaganfall als Folge des Bluthochdrucks seit 2010 europa- und auch weltweit Haupttodesursache sind (Murray et al. 2012, Nowbar et al. 2014, Whelton et al. 2017). Dies zeigt, dass die Hypertonie ein erhebliches globales Gesundheitsproblem darstellt.

1.3. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Die Nieren und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielen im systemischen Kontext eine entscheidende Rolle in der Wasser- und Elektrolythomöostase des

Organismus, sowie in der Kontrolle des arteriellen Drucks und der Gewebepерfusion (Atlas 2007). Das Oktapeptid Angiotensin II (ATII) und das Mineralkortikoid Aldosteron sind dabei die potenten Effektoren am Ende der Signalkaskade, die durch die Erhöhung des Gefäßtonus (ATII) und des Plasmavolumens (Aldosteron) zu einem systemischen Blutdruckanstieg führen. Dieser Mechanismus ist vor allem dann sinnvoll, wenn durch größere Blutverluste die systemische Durchblutung der Organe, vor allem der Nieren, gefährdet ist. Im Verlauf der letzten Jahrzehnte wurde gezeigt, dass neben dem klassischen, systemisch endokrinen RAAS auch ein so genanntes gewebeeigenes, lokales RAAS existiert. Demnach wird ATII auch in anderen Organsystemen, *unabhängig* von der systemischen Durchblutungssituation, synthetisiert. Die Entschlüsselung der einzelnen Komponenten des RAAS und deren (patho)physiologischer Wirkung auf den Organismus ebnete den Weg für die Entwicklung der modernen Pharmakotherapie der essentiellen Hypertonie grundlegend; bedenkt man, dass die heutige therapeutische Strategie überwiegend darin besteht, in das RAAS einzugreifen und es zu inhibieren, um den Blutdruck zu senken.

Renin—Angiotensinogen

Am Anfang der Kaskade steht Renin, welches in den juxtaglomerulären Zellen der afferenten (und teilweise auch efferenten) Arteriolen der Nierenglomeruli gebildet und gespeichert wird. Die Reninsekretion aus den *Granulae* der juxtaglomerulären Zellen wird hauptsächlich durch vier Faktoren reguliert: 1. durch renale Barorezeptoren in den afferenten Arteriolen, die den renalen Perfusionsdruck messen, 2. durch *Macula Densa* Zellen der distalen Nierentubuli, die sich in enger Nachbarschaft zu den JG-Zellen befinden und Veränderungen in der Kochsalz-(NaCl)-Konzentration registrieren, 3. durch Stimulation des Sympathikus via beta-1-adrenergen (β_1) Rezeptoren, 4. durch einen negativen Feedbackmechanismus zwischen Angiotensin II (AT II) und den JG-Zellen. Durch ein Sinken des renalen Perfusionsdrucks oder der renal filtrierte NaCl-Konzentration entlang der distalen Tubuli, sowie durch Erhöhung des Sympathikotonus wird die Reninsekretion stimuliert. Als Schrittmacherenzym katalysiert Renin die Bildung des Dekapeptids Angiotensin I (Ang I 1-10) aus seinem Substrat Angiotensinogen. Der Hauptanteil des in der Blutbahn zirkulierenden Angiotensinogen wird konstitutiv von der Leber gebildet und freigesetzt (Campbell & Habener 1986, Stec et al. 1999, Carey & Siragy 2003), sodass die Plasmakonzentration an Angiotensinogen stabil ist (Atlas 2007). Neben der Leber bilden auch eine Reihe extrahepatischer Gewebe Angiotensinogen, wie etwa das Herz, das Gehirn und Fettgewebe, die Gefäße, Nieren und Nebennieren, sowie die Plazenta (Campbell & Habener 1986, Campbell 1987, Paul et al. 1993, Carey & Siragy 2003, Dickson & Sigmund 2006). Studien mit transgenen Maus- und Rattenmodellen belegen, dass Angiotensinogen eine bedeutende Rolle in der Entstehung von Bluthochdruck und dessen Folgeschäden spielt. So wurde gezeigt, dass eine erhöhte gewebespezifische, intrarenale Expression von Angiotensinogen,

bei gleichzeitig normalen Plasmaspiegeln der anderen Komponenten des systemischen, endokrinen RAAS (Aldosteron, ATII), zu einem systemischen Hypertonus führt. (Davisson et al. 1999, Sachelletti et al. 2006). Das intrarenale Angiotensinogen wird in den proximalen Tubuluszellen der Niere gebildet und dient dabei als Grundlage für die Synthese von intrarenalem, lokalem ATII (Nishiyama 2007, McMaster et al. 2015). Das lokal synthetisierte ATII wirkt antinatriuretisch, indem es die Salz- und Wasserretention durch direkte Wirkung auf Na^+ -Transporter sowohl des proximalen, als auch des distalen Nephrons erhöht. So stimuliert es u.a. den apikalen Na^+ / H^+ Austauscher, sowie den basolateralen $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$ Kotransporter und die basolaterale Na^+ / K^+ ATPase im proximalen Tubulus. Dadurch können die systemisch blutdrucksteigernden Effekte mit einer vermehrten, gewebespezifischen Angiotensinogen Expression teilweise erklärt werden (Garvin & Ph 1991, Eiam-Ong et al. 1993, Nishiyama 2007, McMaster et al. 2015).

Angiotensin I—Angiotensin-Converting Enzyme—Angiotensin II

Das *Angiotensin-Converting-Enzyme-1* (ACE) katalysiert durch Hydrolyse des Dekapeptids ATI (1-10) die Bildung des biologisch aktiven und potenten Vasokonstriktors ATII (Carey & Siragy 2003, Atlas 2007), dem Endprodukt des RAAS neben Aldosteron (Soubrier et al. 1993). ACE ist eine membrangebundene Exopeptidase, die auf verschiedenen Zelltypen, unter anderem auf Gefäßendothelzellen (Caldwell et al. 1976) und Epithelzellen des proximalen Tubulus der Niere (Ward et al. 1975) vorkommt. Neben ATI werden auch andere Substrate durch ACE modifiziert. So wird z.B. der Vasodilatator Bradykinin (Kuoppala et al. 2000) in inaktive Metabolite umwandelt (Carey & Siragy 2003). Daraus folgt, dass aus der enzymatischen Aktivität von ACE eine vermehrte Vasokonstriktion und dementsprechend eine verminderte Vasodilatation resultieren (Carey & Siragy 2003, Atlas 2007). Es sei angemerkt, dass neben dem hypertensiven Arm des RAAS auch eine anti-hypertensive Wirkweise des RAAS existiert. So wurde, als weiterer Bestandteil des RAAS, das *Angiotensin Converting Enzyme-2*, ein zum ACE-1 homologes Enzym entdeckt. ACE-2 wandelt das Oktapeptid ATII (1-8) in das Heptapeptid AT (1-7) um. Dieses besitzt vermutlich antiproliferative Wirkungen und führt, über die Förderung der Vasodilatation und Natriurese, zu einer Blutdrucksenkung. Neben ACE-2 gibt es auch andere proteolytisch aktive Peptidasen (Carboxypeptidasen, Endopeptidasen, Aminopeptidasen A und N), die aus ATII (1-8) Angiotensin III und IV (ATII III und IV) bilden. Letztere entfalten ihre Wirkungen über diverse andere Angiotensin Rezeptorsubtypen, wie $\text{AT}_4\text{-R}$, die unter anderem über die Freisetzung von **Plasminogen-Activator-Inhibitor-1** (PAI-1) die Endothelfunktion modulieren. Die zuletzt genannten Mechanismen sind hinsichtlich ihrer tatsächlichen, klinisch relevanten Bedeutung *in vivo* jedoch noch nicht umfassend erforscht (Atlas 2007).

Angiotensin II–Angiotensin II Rezeptoren

Insgesamt sind bislang vier **Angiotensin Rezeptorsubtypen** (ATR, AT₁₋₄R) beschrieben worden. Die kardiovaskulären, renalen, neuronalen und endokrinen Wirkungen von ATII werden hauptsächlich durch AT₁R-Rezeptoren und weiterhin durch AT₂-Rezeptoren mediiert (de Gasparo et al. 2000, Atlas 2007). Je nach Bindung an einen bestimmten Subtyp sind die Wirkungen von ATII vielfältig und teilweise diametral zueinander. Die blutdrucksteigernden Effekte von ATII wie Vasokonstriktion, Förderung der Aldosteron-Freisetzung und Natriumretention, sowie Erhöhung des oxidativen Stress und Zellproliferation werden überwiegend durch AT₁-Rezeptoren vermittelt. Über die Bindung von ATII an AT₂-Rezeptoren werden hingegen eher blutdrucksenkende Effekte wie Vasodilatation und Natriuresis begünstigt. ATR kommen ubiquitär in verschiedensten Geweben des Körpers vor. Das erklärt die pleiotropen Effekte, die ATII auf verschiedene, kreislaufregulierende Zielorgane als Hauptverursacher für die Entstehung von Bluthochdruck hat (Garrido & Griendling 2009). Dementsprechend sind auch extrarenale Organe und Organsysteme, wie das Herz, Gehirn und Gefäßsystem, in der Lage, gewebespezifisches, lokales ATII zu produzieren (Campbell 1987). Tatsächlich werden über 90 % des im Gewebe nachgewiesenen ATII lokal synthetisiert und stammen nicht aus dem Plasma (te Riet et al. 2015). Nach aktueller Auffassung diffundieren hierfür Renin, dessen Hauptquelle die Nieren sind, und Angiotensinogen, das hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird, aus der Blutbahn ins Interstitium der Zielorgane, wodurch diese mithilfe des membrangebundenen, ubiquitär vorkommenden *Angiotensin-Converting-Enzyme 1* in der Lage sind, ATII zu produzieren (te Riet et al. 2015). Das auf diese Weise gebildete ATII bindet schnell an lokale AT₁-Rezeptoren (te Riet et al. 2015), woraufhin der ATII / AT₁-Rezeptor Komplex von den Zellen durch Endozytose internalisiert wird. Die Internalisierung ist offenbar wichtig für die Aktivierung der ATII induzierten Signalkaskaden (Schelling et al. 1992, van Kats et al. 1997). Die lokalen ATII Konzentrationen sind im Gewebe oftmals hoch und korrelieren mit der AT₁-Rezeptordichte desselben Gewebes (van Kats et al. 1997).

Angiotensin II induzierte Signalkaskaden

AT₁R gehören zur Familie der **G-Protein gekoppelten Rezeptoren** (GPR). Die Bindung von ATII an AT₁R stimuliert die intrazellulär gelegenen, heterotrimeren G-Proteine. Über die G_q Signalkaskade wird die transmembran lokalisierte Phospholipase C (PLC) aktiviert. Diese spaltet aus transmembranen Phospholipiden Inositol-(1,4,5)-Triphosphat (IP₃) und Di-Acylglycerin (DAG) ab. Mithilfe von Kalzium und DAG wird schließlich die Protein-Kinase C (PKC), das intrazelluläre Effektorprotein des G_q Weges, aktiviert (Kim et al. 2015). Dabei verläuft die Signaltransduktion, die durch die Bindung von ATII an AT₁R induziert wird schrittweise in zwei Phasen ab. In der 1. Phase stimuliert die ATII Bindung die GPR abhängige PKC Signalkaskade (G_q). In einer anschließenden 2. Phase wird der GPR durch GPR-Kinasen phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Diese Inaktivierung des GPR induziert

schließlich die β -Arrestin Rekrutierung. β -Arrestin dient schließlich als Adapter für zytosolische Serin-/Threonin- und Tyrosinkinase, die in der Funktion als Signalproteine die Gentranskription regulieren. β -Arrestin führt nach Bindung an GPR zur Internalisierung des ATII / GPR Komplex und Inaktivierung des PKC *Signaling*. Gleichzeitig werden jedoch GPR *unabhängige* Signalwege über β -Arrestin aktiviert, wozu auch der Ras (engl. *rat sarcoma*)-abhängige *Mitogen-Activated Protein Kinasen* (MAPK) Weg zählt (Ma & Pei 2007, Aplin et al. 2009, Kim et al. 2015). Dementsprechend induziert ATII über die Bindung an AT₁R sowohl GPR abhängige, als auch GPR *unabhängige* Signalwege. Beide Mechanismen fördern letztendlich die vermehrte Transkription und Genexpression von Wachstumsfaktoren (TGF β , engl. *Transforming Growth Factor β*), proinflammatorischen Zytokinen (IL-6, TGF α), extrazelluläre-Matrix-assoziierten Proteinen und Enzymen (Matrix-Metalloproteinasen), die Prozesse wie Zellproliferation und –wachstum, Inflammation, Fibrose, Differenzierung und Apoptose fördern (de Gasparo et al. 2000, J. Rassow et al. 2008, te Riet et al. 2015). Überdies kommt es, *unabhängig* von den beschriebenen Signalkaskaden, durch Bindung von ATII an AT₁-Rezeptoren auch direkt zur Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur von systemischen und renalen Arteriolen (te Riet et al. 2015). Dies erfolgt unter anderem durch die ATII induzierte Aktivierung der in den Myozyten der glatten Gefäßmuskulatur transmembranös lokalisierten NAD(P)H Oxidase (Fukui et al. 1997).

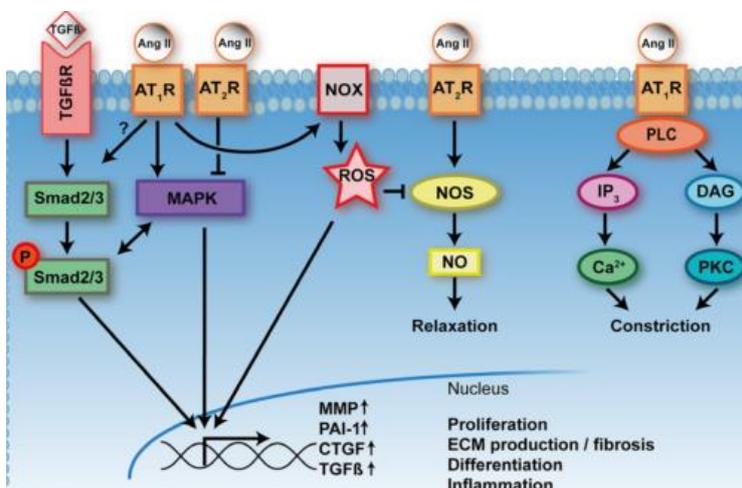


Abbildung 1-1: Intrazelluläre Effekte von ATII auf den Gefäßtonus und auf *Remodeling*prozesse via AT₁R und AT₂R, Signalkaskaden (te Riet et al. 2015). MAPK: **Mitogen-Activated Protein Kinase**, NOX: transmembranöse **NAD(P)H Oxidase**, ROS: engl. *Reactive Oxygen Species* (= Sauerstoff-Radikale), NOS: **NO-Synthase**, NO: engl. *Nitric Oxide* (= Stickstoff-Monoxid), PLC: **Phospho-Lipase C**, IP₃: **Inositol-(1,4,5)-Triphosphat**, DAG: **Di-Acyl-Glycerin**, PKC: **Protein-Kinase C**, MMP: **Matrix Metalloproteinase**, PAI-1: **Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1**, CTGF: engl. *Connective-Tissue-Growth Factor*, TGF β : engl. *Transforming Growth Factor β* , ECM: engl. *Extracellular Matrix*.

Auch die in den Endothelzellen transmembranös lokalisierte NAD(P)H Oxidase wird durch AT₁R mediertes PKC *Signaling* aktiviert (Mollnau 2002). Die Produktion von Sauerstoffradikalen (engl.: *Reactive Oxygen Species*, ROS) wie Superoxid und Wasserstoffperoxid ist die Folge. ROS stimulieren wiederum diverse Signalkaskaden, in denen neben MAP- auch RhoA/Rho-Kinasen wichtige Rollen spielen. Sauerstoffradikale

fördern selbst Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Inflammation, sowie die Produktion von extrazellulärer Matrix. Dies geht vor allem mit einer Fibrosierung (*Remodeling*) einher. Gleichzeitig wird über die ROS induzierten Signaltransduktionen die Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase gehemmt. Dadurch wird die Bildung des vasodilatatorisch wirksamen Stickstoffmonoxids (NO, engl. *nitric oxide*) eingeschränkt. Dies begünstigt zum einen die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion und Gefäßsteifigkeit und fördert zum anderen die transendotheliale T-Zellmigration (Yao et al. 2010, Montezano & Touyz 2014).

Zusammengefasst resultieren aus dem ATII / AT₁R *Signaling* G Protein Rezeptor-abhängig und G Protein Rezeptor *unabhängig* vermittelte Effekte, die überwiegend zu einer Dysbalance zwischen Wachstum und Apoptose führen (te Riet et al. 2015). Diese Effekte sind vaskuläre Inflammation, Zellproliferation und –wachstum, T-Zellmigration, sowie die Fibrose durch Produktion von extrazellulärer Matrix und extrazellulärer-Matrix-assoziierten Proteinen (Kollagen, Elastin, Fibrillin, Fibronectin). Es erfolgt ein phänotypischer *Switch* von kontraktile Gefäßwandbestandteilen hin zu bindegewebigen Gefäßstrukturen (te Riet et al. 2015). Konsequenz dieser strukturellen Umbauprozesse ist der Verlust der arteriellen Elastizität und die Zunahme der Arterienversteifung, die ein *unabhängiger* Prädiktor für kardiovaskuläre Mortalität bei Patienten mit essentieller Hypertonie ist (Laurent et al. 2001). Die Arterienversteifung führt hämodynamisch zu einem Anstieg der Pulsamplitude durch den Anstieg des SBP, dessen Höhe ein wichtiger Risikofaktor für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen ist (Kannel et al. 1980, Franklin et al. 1999, Kennel 2009). Von maßgeblicher Bedeutung für die Vermittlung der schädlichen Wirkungen von ATII auf das Kreislaufsystem sind dabei oxidative Prozesse, wie die Bildung von Sauerstoffradikalen.

1.4. Hypertensiogene Effekte von Sauerstoffradikalen

Studien belegen, dass ATII die Bildung von ROS durch die Induktion der NAD(P)H Oxidase stimuliert und diese ATII induzierte ROS Produktion eine kritische Rolle in der Hypertoniegenese spielt (Rajagopalan et al. 1996, Garrido & Griendling 2009). So zeigen tierexperimentelle *Knock out* (KO) Modelle, dass der Blutdruck bei denjenigen Mäusen, die durch gezielten Gen-KO eine defiziente NAD(P)H Oxidase aufweisen, niedriger als in der Wildtyp (WT) Kontrollgruppe ist. Unter ATII Infusion reagieren diese KO Mäuse überdies mit einem signifikant milderem Blutdruckanstieg (Landmesser et al. 2002, Lai et al. 2012). Das gezielte *Membrane-Targeting* mit Superoxid Dismutase, einem antioxidativ wirkenden Enzym, das ROS neutralisiert, senkt den Blutdruck in experimentellen Hypertoniemodellen mit spontan hypertensiven Ratten (SHR) und ATII (Harrison 2014). Sicher ist, dass ROS in verschiedenen Organen und Organsystemen, ebenso wie ATII, pleiotrope Effekte hervorrufen, die zu einer Blutdruckerhöhung führen.

Gefäßsystem

Über die oben beschriebenen Signalwege in den Zellen begünstigen ROS vaskuläre *Remodeling*prozesse, einschließlich der Hypertrophie der vaskulären, glatten Gefäßmuskulatur (Weber et al. 2004). Dementsprechend sind sie in die Pathogenese von chronischen entzündlichen Gefäßerkrankungen wie Arteriosklerose, die die Entstehung von Bluthochdruck (Arterienversteifung) und Schlaganfall fördert, involviert (Atlas 2007). ROS beeinflussen den Blutdruck nicht nur indirekt über *Remodeling*prozesse negativ. Sie sind auch direkt an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt. Sie wirken vasokonstriktorisch, verschlechtern die endothelabhängige Relaxation unter Acetylcholin (Rajagopalan et al. 1996) und steigern dadurch den Gefäßwiderstand (Garrido & Griendling 2009). Für das Gleichgewicht des Gefäßtonus und die Aufrechterhaltung eines normalen Blutdrucks sind neben vasokonstriktorischen Komponenten wie den ROS vor allem vasodilatatorische Komponenten wie NO entscheidend (Tang et al. 2003). NO gilt als potenter Vasodilatator, der als endothelabhängiger Dilatationsfaktor die gefäßrelaxierende Wirkung von Bradykinin, Substanz P und Acetylcholin vermittelt (Huang et al. 1995). Acetylcholin bindet an muskarinerge M3/5 Rezeptoren auf den Endothelzellen, woraufhin die NO-Synthase durch den Ca^{2+} -Calmodulin Komplex aktiviert wird und aus L-Arginin NADPH-abhängig NO synthetisiert (Adams et al. 1989, Palmer & Moncada 1989). Das gebildete NO diffundiert in die glatten Gefäßmuskelzellen und aktiviert die lösliche Guanylatzyklase, die wiederum die Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat katalysiert. Dadurch wird die Proteinkinase G stimuliert. Schlussendlich führt die daraufhin ausgelöste Kaskade zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Pfeifer et al. 1998).

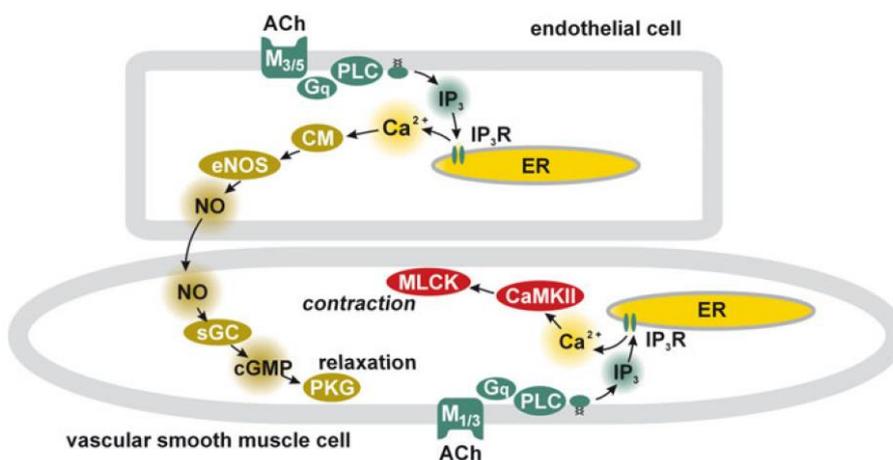


Abbildung 1-2: Endothelabhängige Vasodilatation durch Bindung von Acetylcholin an muskarinerge Rezeptoren. Signalkaskade (Harvey 2012). M3/5 und M1/3: Muskarinerges Rezeptor, PLC: Phospho-Lipase C, IP3: Inositol-(1,4,5)-Triphosphat, IP3R: Inositol-(1,4,5)-Triphosphat Rezeptor, ER: Endoplasmatisches Retikulum, CM: Calmodulin, eNOS: endotheliale NO-Synthase, NO: engl. Nitric Oxide, sGC: engl. soluble Guanylate Cyclase, cGMP: engl.: cyclic Guanosine-Mono-Phosphate, PKG: Protein-Kinase G, CaMKII: engl.. Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II, MLCK: engl.. Myosin-Light-Chain Kinase.

Die glatte Gefäßmuskulatur besitzt ebenfalls (eigene) muskarinerge M3 Rezeptoren (M1/3), über die Acetylcholin binden und so direkt, ohne Umweg über das Endothel, auf die Gefäßmuskulatur einwirken kann (s. Abbildung 1-2). Diese Bindung löst jedoch keine

Vasodilatation aus, sondern eine Vasokonstriktion (Furchgott & Zawadzki 1980, Harvey 2012). Die NAD(P)H Oxidase bildet für das Gleichgewicht des Gefäßtonus das Gegengewicht zur eNOS. Die durch die NAD(P)H Oxidase induzierte ROS Produktion führt nachweislich zu einer Beeinträchtigung des NO/cGMP *Signaling*, also des Signalwegs, aus dem die Vasodilatation resultiert (Mollnau 2002). Im *2 kidney-1 clip* Modell kommt es nach Steigerung der NAD(P)H Oxidase Aktivität durch ATII zu einer verminderten Vasodilatation der Gefäße bei Zufuhr von exo- und endogenen Nitrovasodilatoren (Heitzer et al. 1999). Diese Imbalance zwischen verminderter NO Bioverfügbarkeit und erhöhter ROS Produktion führt zu einer endothelialen Dysfunktion (Garrido & Griendling 2009). Die endotheliale Dysfunktion mit konsekutiv erhöhtem Gefäßtonus ist jedoch nicht nur die Folge eines langjährig bestehenden Bluthochdrucks, sondern sie kann umgekehrt auch die Entstehung der essentiellen Hypertonie durch dauerhaft erhöhte Gefäßkontraktion fördern (Guzik et al. 2007, Garrido & Griendling 2009). In Abwesenheit eines intakten Endothels bzw. in einem dysfunktionalem Endothel mit überschießender ROS Produktion und geringerer eNOS Aktivität können vasodilatatorische Transmitter wie Acetylcholin über das Endothel nicht mehr dilatatorisch wirken und verursachen direkt über die glatte Gefäßmuskulatur eine Vasokonstriktion, was als Surrogat für ein hypertoniegeschädigtes Gefäßsystem steht. Dies kann an isolierten Gefäßen *in vitro* mittels Myographien untersucht werden.

Herz

Im Herzen wird durch Dehnung des Ventrikelmyokards, z.B. bei erhöhtem enddiastolischen Füllungsdruck, die Sekretion von autokrinem ATII aus dem T-System (Kim et al. 2015) der kardialen Myozyten stimuliert. Lokale AT₁R mediiieren anschließend sowohl G-Protein abhängige, als auch G-Protein *unabhängige* Signaltransduktionen (Wei et al. 2003, Aplin et al. 2009), die die Entwicklung einer Herzhypertrophie fördern (Sadoshima & Izumo 1993, Hein et al. 1997, Adams et al. 1998, Paradis et al. 2000, Zhai et al. 2005). Das kardiale ATII/AT₁R *Signaling* stimuliert Fibroblasten, die ihrerseits zur Kollagensynthese angeregt werden (Sadoshima & Izumo 1993, Adams et al. 1998, Paradis et al. 2000). Somit steht ATII, ebenso wie im Gefäßsystem, auch am Herzen mit strukturellen Umwandlungsprozessen in Verbindung. Zusätzlich fördert es, durch Modulation transmuraler Ionenkanäle der Myozyten, das so genannte elektrische *Remodeling*. Die AT₁R vermittelte Inhibition der Na⁺/K⁺ ATPase, der *delayed rectifier* K⁺ Kanäle (I_{Kr}, I_{Ks}), und der transienten K⁺ Auswärtsströme (I_{to}) sowie die gleichzeitige Stimulierung von L-Typ Calcium (Ca²⁺) Kanälen (I_{ca,L}) verlängern das QT-Intervall und somit die Dauer eines Aktionspotentials (Rivard et al. 2008, Gao et al. 2014). Die Konsequenz sind ein höheres Risiko für das Auftreten kardialer Arrhythmien (Rivard et al. 2008) sowie eine gesteigerte Kontraktilität des Ventrikelmyokards (Gao et al. 2014). Dies begünstigt neben den rein strukturellen Umwandlungsprozessen zusätzlich die Entwicklung einer Herzhypertrophie, die in einer dekompensierten Herzinsuffizienz mit dauerhaft erhöhtem Sympathikotonus münden kann.

Nieren, Zentrales Nervensystem und das Immunsystem

ROS beeinflussen den Blutdruck überdies durch hypertensiogene Effekte an der Niere. Dort führen sie durch verstärkte Expression von ATII und Aldosteron zu einer vermehrten Salz- und Wasserretention, wodurch ein volumenbedingter Blutdruckanstieg begünstigt wird. Weiterhin ist bekannt, dass ROS im ZNS u.a. den Anstieg des Sympathikotonus fördern (Harrison et al. 2011, Montezano & Touyz 2014). Neben den genannten Organen haben ROS vor allem auch Auswirkungen auf die Zellen des Immunsystems, wie die T-Lymphozyten. Über NF κ B-medierte (engl. *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) Gentranskription wird die Synthese des proinflammatorischen Zytokins TNF α (**Tumor-Nekrose-Faktor α**) in den T-Zellen gesteigert (Hoch et al. 2009). Die von den Sauerstoffradikalen aktivierten Signalkaskaden in den T-Lymphozyten steigern die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen, wodurch Entzündungszellen aus dem Gefäßsystem in peripheres Gewebe migrieren, dadurch das entzündliche Milieu aufrecht erhalten und somit Endorganschäden fördern können (Harrison et al. 2011).

Zusammenfassend spielt die ATII induzierte ROS Produktion eine entscheidende, pathophysiologische Rolle bei den Entstehungsprozessen von kardialen, vaskulären und renalen Erkrankungen wie der Herzhypertrophie, Arteriosklerose und der chronischen Niereninsuffizienz, indem sie Bluthochdruck und endotheliale Dysfunktion durch vaskuläres und kardiales Remodeling, sowie Endorganschädigungen durch Inflammation fördern (Montezano & Touyz 2014).

1.5. Endokrine, hypertensiogene Wirkungen von Angiotensin II

Neben der Stimulation der ROS Synthese über AT₁-Rzeptoren und deren medierte *Remodeling*prozesse und Gefäßtonus-Regulierungen im kardiovaskulären System entfaltet ATII durch die Bindung an AT₁-Rezeptoren auch seine endokrine Wirkung über das sympathische Nervensystem. Durch die Bindung an AT₁R und das daraufhin ausgelöste PKC / IP₃ *Signaling* fördert ATII an den sympathischen Ganglien die Freisetzung der Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin aus den postganglionären präsynaptischen Varikositäten mit allen anschließenden durch Noradrenalin und Adrenalin bekannten blutdrucksteigernden Konsequenzen. Umgekehrt stimuliert Noradrenalin über die Bindung an β_1 -Adrenorezeptoren in den juxtaglomerulären Zellen der Niere die Bildung und Freisetzung von Renin und somit die ATII Synthese (Rosenthal & Kolloch 2004). In der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde führt das ATII / AT₁-Rezeptor *Signaling* zur Synthese und Sekretion von Aldosteron. Als Steroidhormon entfaltet Aldosteron seine genomische Wirkung durch Bindung an zytoplasmatische/nukleäre Mineralkortikoid-Rezeptoren innerhalb der Zellen des Sammelrohres im distalen Nephron des Nierentubulussystems (te Riet et al. 2015). Diese Bindung führt zu einer verstärkten Expression von Aldosteron-responsiven Genen und dementsprechend zu einem vermehrten Einbau von basolateral lokalisierten Na⁺/K⁺

ATPasen (Whorwood et al. 1994, Derfoul et al. 1998) und luminal gelegenen epithelialen Na⁺ Kanälen (ENaC, *engl.: epithelial Na⁺ channel*) (Stockand et al. 1999, Mick et al. 2001) in die Zellmembranen (Thomas & Itani 2004, Jaffe 2005, Zhang et al. 2007, te Riet et al. 2015). Daraus resultiert eine verstärkte Na⁺ Retention, die zu einer Blutvolumenexpansion und schließlich zu einem volumenbedingtem Blutdruckanstieg führt (te Riet et al. 2015).

1.6. Aldosteron und therapieresistente Hypertonie

Zu den endokrinen ATII Wirkungen gehört u.a. auch die Stimulation der Aldosteron-Freisetzung, die mit einer Blutdruckerhöhung einhergeht. Der Aldosteron induzierte Blutdruckanstieg ist nicht nur auf dessen renale Wirkung, die verstärkte Salzretention, zurückzuführen. Studien des vergangenen Jahrzehnts haben gezeigt, dass Aldosteron, über offenbar nicht-genomische Wirkmechanismen, eine Vielzahl an extrarenalen und schnell auftretenden Effekten, vor allem auf das kardiovaskuläre System und insbesondere auf vaskuläre Remodelingprozesse, hat (te Riet et al. 2015). So führt die intravenöse Applikation von 0,5 mg Aldosteron bei gesunden Männern innerhalb von wenigen Minuten zu einem statistisch signifikanten Anstieg des systemischen Gefäßwiderstandes und Blutdrucks (Schmidt et al. 1999). Funktionelle Aldosteron-sensitive **M**ineralokortikoid-**R**ezeptoren (MR) sind hierbei nicht nur in den Nieren, sondern auch im Herzen, sowie auf Endothelzellen (*engl. endothelial cells, EC*) und den glatten Gefäßmuskelzellen (*engl. vascular smooth muscle cells, VSMC*) lokalisiert (Funder et al. 1989, Lombès et al. 1992, Kornel 1994, Jaffe 2005). Es wurde gezeigt, dass diese EC-MR und VSMC-MR eine Schlüsselrolle in der Regulierung des Gefäßtonus und des Blutdrucks spielen. So haben VSMC-MR Knock-Out Mäuse im Vergleich zur Wildtypkontrolle einen mildereren Blutdruckanstieg und einen weniger stark kontraktilen Gefäßtonus, sowie eine verminderte ROS Produktion in Reaktion auf ATII Infusion (McCurley et al. 2012). Mäuse mit einer Überexpression an EC-MR wiederum zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe als Reaktion auf ATII einen signifikant stärkeren Blutdruckanstieg und einen erhöhten kontraktilen Gefäßtonus (Nguyen Dinh Cat et al. 2010). Die Blockierung von Aldosteronrezeptoren führt bei Patienten mit Herzversagen zu einer beachtlichen Senkung der Morbidität und Mortalität (Pitt, B et al. 2003). Dies wird unter anderem der medikamentösen Reduktion von Aldosteron induzierter, kardialer Fibrose zugeschrieben. Die Aldosteronblockade schützt normotensive, alte und mit DOCA-salz (*engl. Di-oxy-corticosteron-acetat*)² behandelte Ratten, unabhängig vom Blutdruck, vor einem Anstieg der vaskulären und kardialen Fibrose und verbessert die arterielle Steifigkeit (Lacolley et al. 2001, Lacolley 2002). Es gibt Hinweise, dass diese pathophysiologischen Wirkungen von Aldosteron nicht ausschließlich über Mineralokortikoid-Rezeptoren mediiert werden (Boldyreff & Wehling 2003). Dennoch kann vielen von Aldosteron induzierten Effekten durch die Behandlung mit Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten entgegengewirkt

² DOCA-Salzdiät = Hochsalzdiät mit einem Aldosteronderivat kombiniert. Hier ist ATII maximal supprimiert.

werden. So zeigt Savoia et. al., dass bei einjähriger Behandlung von Hypertoniepatienten mit Eplerenon die Media-Kollagen / Elastin-Ratio gesenkt und dementsprechend die Arteriensteifigkeit reduziert wird (Savoia et al. 2008). Nach Behandlung gleicht die Elastizität der Gefäße dem Niveau von normotensiven Patienten. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Blockade der MR zu einer Reduktion von zirkulierenden Entzündungsmediatoren führt (Savoia et al. 2008). Aldosteron scheint weiterhin eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer therapieresistenten Hypertonie zu spielen (te Riet et al. 2015). Ein Blutdruck wird dann als resistent bewertet, wenn eine Lebensstiländerung (Gewichtsabnahme, Kochsalzrestriktion, mehr Bewegung) in Kombination mit einem Diuretikum und zwei weiteren Antihypertensiva nicht zu einer Blutdrucksenkung von unter 140 / 90 mmHg führen (Mancia et al. 2013). So zeigt eine Studie, dass die Gabe von Spironolacton zusätzlich zur antihypertensiven Therapie oder auch als alleiniger Ersatz zu ausgeprägten Blutdrucksenkungen von durchschnittlich 20-25 mmHg systolisch und 10 mmHg diastolisch führt, sodass viele Patienten mit resistenter Hypertonie einen Blutdruck von weniger als 140/90 mmHg erreichen (Ouzan et al. 2002, Sharabi et al. 2006, Chapman et al. 2007). Der primäre Hyperaldosteronismus ist nicht selten eine mögliche Ursache von therapieresistenter Hypertonie. Unter hypertensiven Patienten ist die Prävalenz des zumeist normokaliämischen primären Hyperaldosteronismus (je nach Population und Diagnoseprotokoll) mit 10-15 % (Jansen et al. 2014) und teilweise mit mehr als 20 % stark verbreitet (Calhoun et al. 2002, Mosso et al. 2003, Jansen et al. 2008, Funder et al. 2008, te Riet et al. 2015). Bei Patienten mit erhöhter Aldosterion-Renin-Ratio und erhöhter Plasma-Aldosteronkonzentration ist der Erfolg der Blutdruckeinstellung niedriger (te Riet et al. 2015). Aufgrund der klinischen Relevanz hinsichtlich des massiv erhöhten kardiovaskulären Risikos bei Hyperaldosteronismus wird empfohlen, die ARR in Hochrisikogruppen unter Hypertoniepatienten als Suchtest auf den primären Hyperaldosteronismus anzuwenden (Funder et al. 2008), da sich in diesen Gruppen hohe Prävalenzen von primärem Hyperaldosteronismus finden lassen. Bei Patienten mit einer auffälligen Ratio sollten weitere Bestätigungstests (Captopril-Test, Dexamethason Suppressionstest, orale/intravenöse Kochsalzbelastung) durchgeführt werden (Funder et al. 2008).

1.7. Blutdruckeinstellung und Therapieresistenter Bluthochdruck

Die signifikante Senkung der erhöhten Morbidität und Mortalität von Hypertoniepatienten durch antihypertensive Therapie ist mittlerweile mehrfach belegt und gilt allgemein hin als *unumstritten*. In den Leitlinien von 2017 wird bei Vorliegen einer Hypertonie Grad 2 ($\geq 140/90$ mmHg) zur Initiierung einer pharmakologischen Therapie gleich die medikamentöse Kombinationstherapie empfohlen. Bei Patienten mit einer Hypertonie Grad 1 ($\geq 130-139/80-89$ mmHg) kann laut aktuellen Leitlinien eine medikamentöse Monotherapie mit einem Zielblutdruck von $< 130/80$ mmHg erwogen werden (Whelton, Carey, Chair, et al. 2017). Im

Vordergrund der aktuellen Therapieempfehlungen stehen für Patienten mit erhöhtem Blutdruck (120-129/<80mmHg), sowie auch supportiv zur medikamentösen Therapie für Patienten mit Hypertonie Grad 1 und 2 die Lebensstiländerungen³ und die *DASH* Diät⁴. Die diätischen Maßnahmen und die regelmäßige, körperliche Belastung haben unter den Lebensstiländerungen den größten Einfluss auf die Reduktion des systolischen Blutdrucks, der dadurch um bis zu 11mmHg gesenkt werden kann (Whelton, Carey, Chair, et al. 2017). Problematisch ist allerdings zum einen, dass sich ein erheblicher Teil der Patienten *unklar* darüber ist, dass eine arterielle Hypertonie vorliegt und zum anderen, dass bei bereits diagnostizierten hypertensiven Patienten der Bluthochdruck nicht ausreichend kontrolliert ist und dadurch das empfohlene Therapieziel nur selten erreicht wird (Mozaffarian et al. 2015). So sind sich weltweit nur 50-75 % der Männer und Frauen bewusst, dass sie zu hohen Blutdruck haben. Bei nur etwas mehr als der Hälfte (50-60 %) der Bluthochdruckpatienten wird die Hypertonie therapiert und bei nur 30-40 % der therapierten Hypertoniepatienten gelingt eine adäquate Blutdruckeinstellung (Kearney et al. 2004, Pereira et al. 2009). Grund für die ungenügende Blutdruckkontrolle ist unter anderem die Untertherapie. Nur weniger als 1/3 der Patienten mit *unkontrolliertem* Bluthochdruck bekommen eine Kombinationstherapie aus drei Antihypertensiva. Eine optimale Blutdruckeinstellung wird weiterhin durch die Anwesenheit von zusätzlichen und in vielen Patienten oftmals koexistenten kardiovaskulären Risikofaktoren, die die arterielle Elastizität negativ beeinflussen, erschwert. Dazu zählen Faktoren wie das Altern, Rauchen, Diabetes Mellitus und Arteriosklerose (Amar et al. 2003, Mancia et al. 2013). Weitere Risikofaktoren für die Entwicklung einer resistenten Hypertonie sind vor allem Übergewicht, chronische Nierenerkrankungen, erhöhte Salzzufuhr über die Nahrung und exzessiver Alkoholkonsum (auch *Binge Drinking*, Mancia et al. 2013). So ist z.B. bekannt, dass das durch Adipositas bedingte Schlafapnoe-Syndrom zu einer Therapieresistenz der Hypertonie führen kann (Hermann et al. 2000). Auf die dabei entscheidende Rolle von Hyperaldosteronismus wurde bereits eingegangen. Die Prävalenz der resistenten Hypertonie reicht unter der gesamtheitlichen Bluthochdruckpopulation schätzungsweise von 5 bis 30 % (Štrauch et al. 2003, Fagard 2012, Mancia et al. 2013). Zu den Medikamenten der *ersten* Wahl bei der Therapie der Hypertonie gehören neben Calciumantagonisten und Diuretika vor allem Inhibitoren des RAAS wie ACE-Hemmer und AT1-Rezeptorantagonisten. Durch das Eingreifen in das RAAS kommt es nach einer anfänglichen Senkung der Aldosteron- und ATII Konzentration im Plasma zu einer kompensatorischen Aldosteron-Eskalation (auch engl. *Aldosterone Escape*, *Aldosterone Breakthrough*, Mancia et al. 2013). Der Erfolg in der Blutdrucksenkung durch Aldosteronrezeptor-Antagonisten wie Spironolacton oder Eplerenon als Zusatzmedikation im

³ Reduktion von Gewicht, Alkohol- und Nikotinkonsum, Ausdauersport (90-150min/Woche).

⁴ Mehr Obst, Gemüse, Vollkornprodukte, fettarme Produkte, Reduktion von Salz- und Kaliumzufuhr.

Rahmen eines therapieresistenten Hypertoniesettings wird mit dem Entgegenwirken gegen den Aldosteron-*Escape* erklärt (Mancia et al. 2013).

Vor diesem Hintergrund der Entwicklung einer Therapieresistenz bei einem nicht *unerheblichen* Teil der Patienten und der damit einhergehenden, massiven kardialen Morbidität und Mortalität wird anhaltend nach neuen und effektiven interventionellen Therapiemöglichkeiten wie der renalen Denervation, der ATII-Impfung oder der Optimierung der Karotis-Barorezeptor-Stimulation, aber auch nach medikamentösen Alternativen, die z.B. den protektiven Arm des RAAS adressieren (AT₂ Rezeptor Stimulation), geforscht. In den letzten zwei Jahrzehnten rückte hierfür auch die Rolle des Immunsystems in der Hypertoniegenese in das Zentrum der Aufmerksamkeit.

1.8. Inflammation, Immunsystem und Bluthochdruck

1.8.1. Historischer Kontext

In den letzten Jahrzehnten hat sich gezeigt, dass Hypertonie vor allem auch als immunologischer Prozess zu verstehen ist, wonach Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems in das Interstitium von blutdruckregulierenden Organen migrieren, dort proinflammatorische Zytokine (IL-6, IFN γ , TNF α) freisetzen und oxidativen Stress fördern (Mcmaster et al. 2015). Bereits vor einem halben Jahrhundert haben Grollman und White belegt, dass das Immunsystem anscheinend eine nicht *unerhebliche* Relevanz für die Blutdruckregulierung hat (White & Grollman 1964). Ratten bildeten nach einem partialen Niereninfarkt Antikörper gegen Nierengewebe. Eine Immunsuppression konnte den Blutdruck dieser Ratten wieder senken (Mcmaster et al. 2015, White & Grollman 1964). In einem weiteren Experiment führte der Transfer von Zellen aus den Lymphknoten dieser Ratten zu einem Anstieg des Blutdrucks in gesunden Tieren (Mcmaster et al. 2015, Okuda & Grollman 1967). 1970 beobachtete Olsen schließlich eine entzündliche Reaktion der Gefäße nach ATII Infusion. Er beschrieb eine Migration von mononukleären Zellen in die *Tunica media* und *Adventitia* der Gefäße, wobei es sich bei den periarteriellen Infiltraten, nach seinen Beschreibungen, mehrheitlich um T-Lymphozyten handelte (Mcmaster et al. 2015, Olsen 1972). Es folgten weitere tierexperimentelle Studien, die den Einfluss des Immunsystems auf die Entwicklung von Bluthochdruck zementierten. So gibt es Daten, die zeigen, dass die Behandlung von spontan hypertensiven Ratten mit Antithymozyten-Serum den Blutdruck der Ratten senkt (Bendich et al. 1981) und dass, im Gegensatz dazu, der Splenozyten-Transfer von Ratten, die mit DOCA-Salz, einem Aldosteronderivat, behandelt worden waren, in unbehandelten, normotensiven Empfängertieren zu einem Blutdruckanstieg führt (Mcmaster et al. 2015, Olsen 1980).

1.8.2. Das angeborene und erworbene Immunsystem

Makrophagen und Monozyten sind als zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems von immenser Bedeutung für die blutdruckregulierenden Organsysteme, allem voran für das kardiovaskuläre System. So spielt die Akkumulation von Lipiden und Entzündungszellen in der Intima der Gefäße eine zentrale Rolle in der Entwicklung von chronisch entzündlichen Gefäßerkrankungen. (Mcmaster et al. 2015). Die Aktivierung von Makrophagen durch Stimulation ihrer *Toll-like*-Rezeptoren führt auch zur Produktion von Sauerstoffradikalen, die die vaskuläre Kontraktilität steigern und vaskuläres *Remodeling* fördern (Mcmaster et al. 2015). Dem gegenüber steht das erworbene Immunsystem, zu dessen zellulären Bestandteilen die T- und B-Lymphozyten gehören. Über Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, dendritische Zellen) werden die Zellen des erworbenen Immunsystems aktiviert (T-Lymphozyten) und zur Synthese von Antikörpern (B-Lymphozyten) angeregt. Von größter Relevanz ist in diesem Zusammenhang auch die kürzlich publizierte Erkenntnis, dass T-Lymphozyten, als Bestandteil des erworbenen Immunsystems, ein intrakrines RAAS besitzen. Dementsprechend sind sie zur endogenen ATII Bildung befähigt und exprimieren außerdem Angiotensin-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, was dazu führt, dass sie durch ATII selbst adressiert werden können. Das endogen synthetisierte ATII der T-Lymphozyten fördert über die Bindung an AT₁ Rezeptoren auf der Membran der T-Lymphozyten, im Sinne einer Autostimulation, die TNF α Synthese der T-Zellen und induziert die T-Zell-eigene NADPH Oxidase, woraufhin ROS gebildet werden. Die auf diese Weise von den T-Zellen produzierten Sauerstoffradikale stimulieren zusätzlich die TNF α und IFN γ Expression (Hoch et al. 2009). Das von T-Lymphozyten synthetisierte TNF α aktiviert wiederum die NAD(P)H Oxidase der glatten Gefäßmuskulatur (De Keulenaer et al. 1998), was letztendlich auch die ROS Produktion der Gefäße selbst steigert und mit vaskulärer Dysfunktion assoziiert ist. Dies ist mit einem *Circulus Vitiosus* gleichzusetzen (Guzik et al. 2007).

1.8.3. Aktivierung von T-Lymphozyten

Nachdem molekulare Strukturen von den antigenpräsentierenden Zellen als fremd erkannt und phagozytiert worden sind, werden Bruchteile ihrer pathogenen Peptide in einem großen Molekül, zusammen mit den so genannten *Major Histocompatibility Complexes* (MHC), auf der Zellmembran der antigenpräsentierenden Zelle den T-Lymphozyten präsentiert (Mcmaster et al. 2015, Ivanova & Orekhov 2015). Man unterscheidet MHC Klasse I (MHC I) Moleküle, die CD8⁺ T-Lymphozyten aktivieren und nahezu ubiquitär von allen kernhaltigen Zellen des Körpers an der Membranoberfläche exponiert werden von MHC Klasse II (MHC II) Molekülen, die CD4⁺ T-Lymphozyten stimulieren und nur von antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten) exprimiert werden (Mcmaster et al. 2015). Für die antigen-spezifische T-Zell Stimulation sind drei Signale nötig. 1. Die

Bindung des T-Zellrezeptors an den Peptid / MHC Komplex der antigenpräsentierenden Zelle im Sinne des Schlüssel-Schloss-Prinzips, 2. Die zusätzliche Bindung eines sich auf der Zellmembran der antigenpräsentierenden Zelle befindenden Liganden an den Ko-Rezeptor auf der T-Zelloberfläche. Dieser Vorgang stellt eine *unabdingbare*, kostimulatorische Reaktion dar. Hierfür ist die Anwesenheit des B7-Liganden (entspricht CD80, 86) auf der Membran der dendritischen Zelle und die Anwesenheit des CD28 Rezeptors auf der T-Zelloberfläche wichtig. 3. Die von der antigenpräsentierenden Zelle synthetisierten Zytokine binden über entsprechende Zytokinrezeptoren an die T-Zelle. Die Aktivierung der T-Zelle erfolgt nur, wenn beide Signale über Rezeptor- und Ko-Rezeptorstimulation ausgelöst worden sind (Gutcher & Becher 2007, McMaster et al. 2015). Um eine einmal stimulierte Immunantwort zu limitieren, exprimieren die stimulierten T-Zellen im Verlauf der Immunreaktion das zytotoxische Lymphozytenantigen 4 (CTLA-4, engl. *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*). CTLA-4 bindet den B7 Liganden auf der dendritischen Zelle und verhindert somit die weitere Interaktion zwischen der antigenpräsentierenden Zelle und dem T-Lymphozyt. Folge ist die Hemmung der T-Zellaktivierung. Diesen Mechanismus macht man sich für die Therapie von Autoimmunerkrankungen (rheumatoide Arthritis) und in der Transplantationsmedizin zu Nutze (McMaster et al. 2015). Die Aktivierung von T-Lymphozyten führt zur Modifizierung ihrer Zelloberfläche (Harrison et al. 2011, McMaster et al. 2015). Letzteres befähigt die differenzierten T_H-Effektorzellen durch Expression von Integrinen zur Emigration aus den sekundären lymphatischen Organen und aus der Blutstrombahn zur Immigration in nicht lymphoides, peripheres Gewebe. Im peripheren Gewebe unterhalten T_H-Lymphozyten durch Produktion von proinflammatorischen Zytokinen weiterhin das entzündliche Milieu und rekrutieren für die erfolgreiche Immunabwehr, je nach Erreger- und Zytokinprofil, bevorzugt eine bestimmte Linie von Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, Granulozyten). Für die Migration in das entzündliche Gewebe müssen die Lymphozyten zunächst das Endothel der Blutgefäße durchwandern. Dieser Prozess der Diapedese gliedert sich in mehrere Schritte: 1. Oligosaccharide auf der Zellmembran der Leukozyten binden locker an bestimmte Endothelrezeptoren aus der Familie der Selektine. Die Bindung von Pathogenen, deren Membranstruktur als pathogenassoziiertes Muster von den *Toll-like* Rezeptoren der Endothelzellen identifiziert wird, führt zu einer verstärkten Expression der endothelialen Selektine und zu einer vermehrten Freisetzung von Chemokinen. Chemokine locken Immunzellen an den Ort des Geschehens, ein Phänomen, das als Chemotaxis bezeichnet wird. Die Anheftung der Immunzellen an das Endothel gewährt zunächst, dass sie über die Oberfläche des Endothels rollen können und nicht mit dem Blut weggespült werden. 2. Integrine, als für die Diapedese der Leukozyten wichtige transmembrane Proteine, werden vermehrt von den Leukozyten exprimiert und in die Zellmembran der Immunzellen eingebaut. 3. Es kommt zur Bindung der Integrine an entsprechende Endothelrezeptoren, wie ICAM-1

(engl. *intercellular adhesion molecule-1*). Chemokine, die während dieser Vorgänge gebildet werden, induzieren und verstärken diese Bindung, sodass die Leukozyten nun fest am Endothel haften bleiben. 4. Es kommt zur Diapedese (Carlos & Harlan 1994, Campbell et al. 1998, Olson & Ley 2002). Die gewebespezifische Migration der T_H-Effektorzellen („*Homing*“) erfolgt dabei durch die Expression eines bestimmten Rezeptormusters auf der T-Zelloberfläche. ATII führt zu einer verstärkten Expression des CCR5 Rezeptors und des Hyaluronon-Rezeptors CD44 auf den T-Lymphozyten, sodass diese vermehrt in die Gefäßwände migrieren können (Guzik et al. 2007).

1.8.4. Hypertensiogene Effekte proinflammatorischer Zytokine

Während gemeinhin chronische Gefäßerkrankungen wie Arteriosklerose als chronisch entzündliche Erkrankung gelten, ist die immunologische Perspektive in der Hypertoniegenese und die Auffassung der Hypertonie als ebenfalls chronisch entzündliche Systemerkrankung relativ neu. Bei Mäusen mit einer ATII induzierten Hypertonie lassen sich vermehrt CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Adventitia und im perivaskulären Fett der Aorta nachweisen, wobei ein hoher prozentualer Anteil dieser T-Zellen den CCR5 Rezeptor, der für die Gewebemigration wichtig ist, exprimieren (Guzik et al. 2007). Dies legt den Schluss nahe, dass ATII als hypertensiver Stimulus die Diapedese von zirkulierenden, aktiven T-Zellen in die Gefäßwände fördert (Guzik et al. 2007). Entzündungszellen und Zytokine werden mit der Aggravation von kardiovaskulären und renalen Endorganschäden, sowie mit einer therapieresistenten Hypertonie in Verbindung gebracht. Sie erhöhen den systemischen Widerstand durch Vasokonstriktion und Arterienversteifung via vaskuläres *Remodeling* und steigern über eine vermehrte Salz- und Wasserretention in der Niere das Blutvolumen. Dies entspricht zwei wichtigen Mechanismen, die für die Blutdruckregulierung entscheidend sind und auf diese Weise eine bestehende Hypertonie verschlimmern (McMaster et al. 2015). Das von immigrierten T_H1-Zellen synthetisierte Zytokin TNF α destabilisiert die mRNA der NO-Synthase, wodurch die Fähigkeit des Endothels NO zu synthetisieren, beeinträchtigt wird. Dies geht mit einer Dysbalance zwischen endothelabhängiger Vasodilatation und Vasokonstriktion einher (Sun et al. 2012, McMaster et al. 2015). Die Migration von T-Lymphozyten in das Niereninterstitium ist ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der so genannten salzsensitiven Hypertonie. Wie auch im Gefäßsystem führt TNF α durch Induktion des Rho-Kinase Signalwegs in den Tubuluszellen des dicken aufsteigenden Asts der Henle-Schleife zu einer verminderten NO-Synthase Bildung und dementsprechend zu einer Abnahme der NO Produktion (Ramseyer et al. 2012). Da NO im distalen Tubulus und im Sammelrohr des Nephrons die Salz- und Wasserretention hemmt, kommt es zu einer verstärkten Salz-Resorption (Garvin et al. 2011). Die daraus resultierende Blutdrucksteigerung kann durch die Gabe des TNF α Antagonisten Etanercept rückgängig gemacht werden (Guzik et al. 2007). TNF α -/- KO Mäuse zeigen zudem im Vergleich zur

Wildtypkontrolle eine geringere linksventrikuläre Hypertrophie und einen geringeren Blutdruckanstieg bei ATII Infusion. Ebenfalls ist der ATII induzierte Salzappetit, gemessen an der Salz- und Wasseraufnahme, bei TNF α -/- KO Mäusen im Vergleich zum Wildtyp vermindert (Sriramula et al. 2008). Dies lässt sich z.B. mithilfe von Stoffwechselläkigen, die auch in dieser Arbeit zur Anwendung kommen, erfassen. Die genannten Wirkungen werden auch durch andere Zytokine hervorgerufen, wobei die Zytokine teilweise synergistisch und kostimulatorisch wirken. So erhöhen IL-6 und IFN γ ebenfalls die renale Salzretention. IL-6 erhöht die Aktivität von dem ENaC Kanal im Sammelrohr der Niere (Li et al. 2010) und IFN γ führt über den JAK (**Janus-Kinase**)/STAT mediierten Signalweg zu einer vermehrten intrarenalen Angiotensinogen Expression, was mit einer gesteigerten Synthese von lokalem, intrarenalem ATII einhergeht (Satou et al. 2012). Wie bereits beschrieben, stimuliert das intrarenal gebildete, lokale ATII die Natrium-Transporter im proximalen und distalen Nephron, sodass die Salzretention verstärkt wird. IL-6 ist überdies der entscheidende Stimulus für die Polarisierung der T_H-Vorläuferzellen zu dem proinflammatorischen T_H17-Phänotyp (Mcmaster et al. 2015). IL-17 führt zu einer beachtlichen Senkung der Stickstoffmonoxid-Produktion in den renalen Gefäßen (Nguyen et al. 2013). Daraus ergeben sich dieselben vaskulären und renalen Konsequenzen, wie endotheliale Dysfunktion und vermehrte Salzretention, die auch für TNF α beschrieben worden sind. Die Daten aus verschiedenen tierexperimentellen Studien mit IFN γ -/-, IL-6 -/-, IL-17 -/- KO Mausmodellen zeigen konsistent, dass bei Abwesenheit dieser proinflammatorischen Zytokine der Blutdruckanstieg und die vaskuläre ROS Produktion durch ATII Infusion und / oder Hochsalzdiät im Vergleich zur Wildtypkontrolle deutlich geringer ausfallen. Die KO Mäuse sind insgesamt vor hypertensiven Endorganschäden, wie der Abnahme der glomerulären Filtrationsrate durch oxidativen Stress in der Niere oder der kardialen und renalen Fibrose, sowie der Hypertrophie von Herz und glatter Gefäßmuskulatur, geschützt (Lee et al. 2006, Marko et al. 2012, McMaster et al. 2015, Saleh et al. 2015). Das Zytokin IL-17 spielt zudem bei der Infiltration von Leukozyten in die Gefäßwände anscheinend eine zentrale Rolle. In IL-17 -/- KO Mäusen ist die totale Anzahl an Leukozyten in der Gefäßwand erheblich reduziert (Mcmaster et al. 2015). Diese Erkenntnisse belegen, dass die Hypertonie ebenfalls als eine chronisch entzündliche Systemerkrankung gewertet werden kann. Dies bietet neue Ansatzpunkte für die Therapie der essentiellen Hypertonie. Die meisten Studien beschreiben die vermehrte Gewebsinfiltration und Stimulation von T-Lymphozyten vor allem im Rahmen eines ATII induzierten Hypertoniemodells. Eine Studie zur Rolle des Immunsystems in der salzsensitiven Hypertonie mit salzsensitiven Dahl-Ratten zeigt, dass auch eine erhöhte Salzzufuhr in Form einer 4 %igen Hochsalzdiät bereits zu einer signifikant gesteigerten Migration von T-Lymphozyten und Makrophagen in das perivaskuläre und peritubuläre Nierengewebe führt. Nach Umstellung der 0,4 % igen auf eine 4 % ige Salzdiät steigt das lokale, intrarenal gebildete ATII *unverhältnismäßig* stark an und korreliert sowohl mit dem

deutlich vermehrten renalen Entzündungszellinfiltrat, als auch mit dem Anstieg des Blutdrucks und der vermehrten Albuminexkretion als Surrogat für die Nierenschädigung (Mattson 2014). Diese Ergebnisse der salzsensitiven Dahl-Ratten ähneln den Beobachtungen, die an salzsensitiven Hypertoniepatienten gemacht werden (Bartter & Branch 1979, Bigazzi et al. 1994, Bigazzi et al. 1994).

1.8.5. Die Rolle des adaptiven Immunsystems in der Hypertonusgenese

Hypertensive Stimuli wie ATII, Aldosteron und Hochsalzdiät können das ZNS beeinflussen und somit in die Blutdruckregulierung eingreifen. ATII und Salz überwinden die Blut-Hirn-Schranke und führen in den zirkumventrikulären Organen zu einer vermehrten ROS Produktion in den Neuronen. Diese neuronale ROS Produktion führt zu einer Erhöhung des Sympathikotonus (Harrison et al. 2010, Lob et al. 2010, Blaustein et al. 2012). Die damit einhergehenden Effekte, die schließlich zur Blutdruckerhöhung führen, sind hinlänglich bekannt. Noradrenalin und Adrenalin führen durch die Interaktion mit Adrenorezeptoren zu einer Vasokonstriktion, einer erhöhten Herzfrequenz und Kontraktilität, sowie zu einer vermehrten Reninfreisetzung in der Niere mit konsekutiver Erhöhung der Salz- und Wasserretention. Die Bedeutung der zerebralen ROS Produktion für die Regulierung des Sympathikotonus und Blutdrucks wird in Experimenten deutlich, bei denen die in den zirkumventrikulären Organen exprimierte, antioxidativ wirksame Superoxid-Dismutase in KO Tieren ausgeschaltet ist. Das Fehlen der Antioxidase führte bei lokaler, intracerebroventrikulärer ATII Zufuhr mit einer Dosierung von 140 ng/kg/d zu einem signifikanten Blutdruckanstieg und zu einer vermehrten T-Zellaktivierung und Migration in die Gefäße mit konsekutiver Gefäßinflammation (Harrison et al. 2010, Lob et al. 2010). Dies entspricht umgerechnet einer Menge von $0,097 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und ist um mehr als das 1.443 Fache niedriger, als die in dieser Arbeit systemisch, subkutan verabreichte ATII Dosis ($490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Da sekundär immunologische Organe ebenfalls von sympathischen Nervenfasern innerviert werden, wirkt sich die Stimulation des Sympathikus neben dem reno-kardiovaskulären System auch auf die Lymphknoten, Milz und die Immunzellen aus. Die Stimulation der naiven, CD4 positiven T_H -Vorläuferzellen durch Noradrenalin führt zu einer Differenzierung der T_H P zu T_H 1-Zellen und somit zu einer 2-4 fach erhöhten IFN γ Synthese (Swanson et al. 2001). Dies verdeutlicht die Verbindung zwischen den zentralen Effekten von Hochsalzdiät und ATII und der peripheren Aktivierung des Immunsystems (Ganta et al. 2005, Harrison et al. 2011). Auch ohne den Umweg über das ZNS führen ATII und ROS zu direkten vasokonstriktorisches und anti-natriuretischen Effekten. Die Erhöhung des systemischen Widerstands (Vasokonstriktion) und des zirkulierenden Blutvolumens (Salzretention) begünstigt die Entwicklung eines Prähypertonus. Das dadurch insgesamt hypertensive Milieu fördert die Bildung von Neoantigenen. Bei Neoantigenen handelt es sich um oxidativ veränderte, immunogene Proteine, wie γ -Ketoaldehyde (auch Isoketale). Für die

Bildung der Isoketale spielt vor allem die NADPH Oxidase der dendritischen Zellen eine zentrale Rolle. In hypertensiven Mäusen, die ATII oder DOCA-Salz erhielten, ist die NADPH Oxidase der dendritischen Zellen erheblich aktiviert. Die in den dendritischen Zellen gebildeten Neoantigene (Isoketale) sind hochreaktiv und verändern zytosolische Proteine in den dendritischen Zellen derart, dass Peptidbruchstücke von ihnen in MHC-I Komplexen auf der Zellmembranoberfläche den T-Lymphozyten präsentiert werden. Die Folge ist eine verstärkte Aktivierung von T-Lymphozyten, die zu einem proinflammatorischen Phänotyp differenzieren. Die auf diese Weise aktivierten T-Zellen synthetisieren schließlich ihrerseits hypertensiogene, proinflammatorische Zytokine (IFN γ , IL-17 sowie TNF α), was über oben genannte Mechanismen in den blutdruckregulierenden, renovaskulokardialen Organsystemen die Entstehung einer Hypertonie begünstigt bzw. die Aggravation einer bereits bestehenden Hypertonie zur Konsequenz hat. Konsistent mit dieser Theorie sind Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien, die zeigen, dass der Transfer derartig stimulierter dendritischer Zellen in den Empfängermäusen eine deutliche Verschlechterung der Hypertonie bewirkt. Andererseits kann durch Substanzen, wie den 2-Hydroxybenzolaminen, die die Isoketalsynthese inhibieren, die Aktivierung von T-Lymphozyten durch dendritische Zellen verhindert und ein Blutdruckanstieg in Empfängermäusen reduziert werden (Kirabo et al. 2014, McMaster et al. 2015). Auch Hitzeschockproteine wie HSP70 stehen im Verdacht, als hypertensiogene Neoantigene zu wirken und T-Zellen zu aktivieren (Wade et al. 2016).

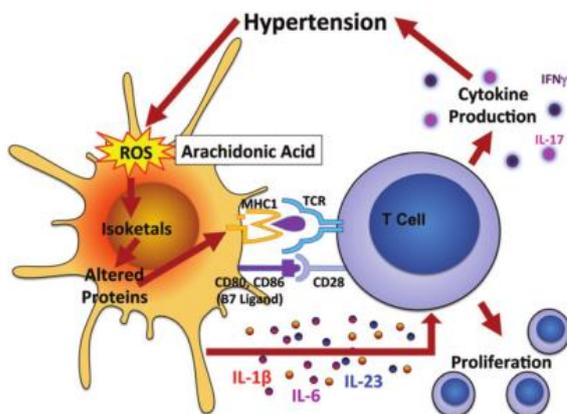


Abbildung 1-3: T-Zellaktivierung durch die Produktion von oxidativ modifizierten Proteinen, den Isoketalen (McMaster et al. 2015).

Die aktivierten T-Zellen infiltrieren schließlich das Nierengewebe und die Gefäßwände und führen dort über Prozesse wie vaskuläre Inflammation, Sauerstoffradikal-Bildung, sowie über die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, allen voran IL-17 (Nguyen et al. 2013) zur Vasokonstriktion der Widerstandsgefäße und zu einer vermehrten Salz- und Wasserretention. Die daraufhin provozierte Aggravation der Hypertonie fördert wiederum die Bildung von Neoantigenen. Ein *Circulus Vitiosus* entsteht, der vor allem bei Patienten mit schwerer Grad III oder resistenter Hypertonie eine wichtige Rolle spielen mag und als therapeutischer

Angriffspunkt für neue Medikamente wichtig ist, um die systemische Hypertonieerkrankung adäquat zu behandeln (Kirabo et al. 2014, McMaster et al. 2015).

Spezielle Rolle der T-Lymphozyten in der Hypertoniegenese

Für die Grundannahme, dass T-Lymphozyten die Blutdruckregulierung beeinflussen, sorgte eine groß angelegte Studie, die zwischen 1983 und 2003 bei fast 6.000 HIV positiven Probanden durchgeführt worden war. Die Untersuchungen ergaben, dass die Prävalenz für eine systolische Hypertonie bei HIV positiven Teilnehmern ohne cART (engl. *combined antiretroviral therapy*) signifikant niedriger war, als bei HIV positiven Probanden mit cART oder bei HIV negativen Männern. Nach Beginn der cART glich sich die Hypertonieinzidenz der zuvor unbehandelten HIV positiven Probanden innerhalb von zwei Jahren der Kontrollpopulation an (Seaberg et al. 2005). Tierexperimentelle Studien liefern zusätzlich Evidenz, dass die experimentelle Hypertonie stark vom erworbenen Immunsystem abhängig ist (Harrison et al. 2010). So zeigen Guzik *et. al.*, dass Rag-1 *-/-* KO Mäuse, die keine reifen T- und B-Zellen besitzen, auf prolongierte ATII Infusion und DOCA-Salz Behandlung im Vergleich zu C57BL/6J Wildtypmäusen mit einem abgeschwächten Blutdruckanstieg reagieren und deutlich weniger ATII induzierte Gefäßschäden (vaskuläre Dysfunktion, vaskuläres *Remodeling*, vaskuläre Hypertrophie) aufweisen. Das Ausmaß der vaskulären ROS Produktion ist demnach bei Rag-1 *-/-* KO Mäusen ebenfalls geringer, als bei C57BL/6J Mäusen (Guzik et al. 2007). Eine weitere wichtige Erkenntnis dieser Studie ist, dass der Transfer von T-Zellen in den Rag-1 *-/-* KO sowohl die Blutdruckantwort, als auch die ROS Produktion als Antwort auf hypertensive Stimuli (ATII, DOCA-Salz) wieder herstellt und zu einer Verschlechterung der endothelabhängigen Gefäßrelaxation führt. Der Transfer von B-Lymphozyten übt hierbei nur einen geringen Effekt auf die Wiederherstellung der ATII induzierten Blutdruckantwort aus (Guzik et al. 2007). In Guziks Arbeit wurde zudem überprüft, welchen Einfluss die T-Lymphozyten mit ihren AT₁ Rezeptoren und ihren transmembranen NADPH Oxidasen auf den systemischen Kreislauf im ATII induzierten Hypertoniemodell haben. Hierfür wurden T-Zellen aus zwei verschiedenen KO Mausmodellen gewonnen und in Rag-1 *-/-* KO Mäuse transferiert: 1. aus AT₁ Rezeptor *-/-* KO Mäusen, und 2. aus p47 *-/-* KO Mäusen, deren T-Zellen eine defiziente NADPH Oxidase in Ermangelung der p47 Untereinheit aufweisen. So führte der Transfer von diesen AT₁R *-/-* und p47 *-/-* T-Zellen im Vergleich zum Transfer von Wildtyp-T-Zellen in den Empfänger-RAG-Mäusen zu einem niedrigeren Blutdruckanstieg und zu einer geringeren ROS Produktion nach ATII Infusion (Guzik et al. 2007). Die durch ATII und vor allem durch ROS induzierte TNF α Synthese der T-Zellen scheint dabei maßgeblich an der Entstehung von Bluthochdruck beteiligt zu sein. Dies lassen Daten vermuten, die zeigen, dass die zusätzliche Behandlung von C57BL/6J Wildtyptieren mit Etanercept, einem TNF α Antagonisten, während der ATII Infusion die Mäuse vor einem Blutdruckanstieg schützt und die vaskuläre ROS Produktion verringert (Guzik et al. 2007). Bemerkenswert an der Studie von Guzik *et. al.* ist zudem, dass

C57BL/6J Wildtypmäuse auch in einem experimentellen Hypertoniemodell mit DOCA-Salz ohne ATII, ebenso wie mit ATII, einen stärkeren Blutdruckanstieg zeigen, als die T-Zell defizienten Rag-1 ^{-/-} KO Mäuse. Dies zeigt, dass T-Zellen offenbar nicht nur nach Induktion von ATII ihre blutdrucksteigernden Effekte entfalten, sondern auch in Gegenwart von Hochsalzdiät stimuliert werden können. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen von Kleinewietfeld und Tietze *et. al.*, wonach Hochsalzdiät murine und humane T_H17-Zellen aktiviert (Kleinewietfeld *et al.* 2013). Das Signaturzytokin IL-17 greift über komplexe Mechanismen im Niereninterstitium in die Regulierung der Salzhomöostase ein und verschiebt diese zugunsten der Salzretention und zulasten der Salzausscheidung. Dass die Förderung der Salzretention im Nephron durch aktivierte T-Lymphozyten und ihre Zytokine zumindest in Teilen für die bedeutende Steigerung des Blutdrucks verantwortlich ist, stützt eine an immundefizienten SCID-Mäusen (engl. *severe combined immunodeficiency*) durchgeführte tierexperimentelle Studie, die belegt, dass die Abwesenheit von Lymphozyten zu einer verstärkten Salzexkretion führt (Crowley *et al.* 2010). Dies wird in dieser Arbeit mithilfe von Stoffwechselfähigen an den immundefizienten Rag-1 ^{-/-} KO Mäusen im Vergleich zum immunkompetenten C57BL/6J WT untersucht. Die verstärkte Salzexkretion bei Immundefizienz ist dabei mit einer vermehrten renalen Expression der Cyclooxygenasen 1 und 2, sowie einer erhöhten Ausscheidung von Prostaglandin E₂ und Prostaglandin I₂ (auch Prostazyklin) Metaboliten im Urin assoziiert (Crowley *et al.* 2010).

2. Wissenschaftliche Fragestellung

Um den Einfluss der T-Lymphozyten auf die Modulation des Blutdrucks genauer zu untersuchen, wird in dieser Arbeit der immunkompetente C57BL/6J Wildtyp mit der immundefizienten Rag-1 ^{-/-} Mauslinie in Hinblick auf das Ausmaß der ATII induzierten Blutdruckantwort und der kardiovaskulären Endorganschädigungen verglichen. Vorausgegangene Arbeiten unseres Instituts konnten keinen Blutdruckunterschied zwischen den Mauslinien unter normalkonzentrierter Salzdiät (0,3 % Na⁺) mit ATII Behandlung zeigen. In dieser Arbeit wurden daher Blutdruckmessungen und weitere Untersuchungen zum kardiovaskulären System mit verschiedenen Salzdiäten (3 %ige Hochsalzdiät, 0,02%ige Niedrigsalzdiät) durchgeführt. Es wird erwartet, dass die beiden Zustandsformen (1. Hochsalzdiät, 2. hochreguliertes ATII bei Niedrigsalzdiät) über die beschriebenen Mechanismen eine Stimulation der T-Lymphozyten bei dem immunkompetenten C57BL/6J Wildtyp bewirken und demzufolge nun unter exogener ATII Zufuhr sichtbare Blutdruckunterschiede zwischen den Genotypen erfassbar werden. Zu untersuchen ist, ob sich bereits unter den verschiedenen Salzdiäten *ohne* ATII durch die veränderte RAAS-Aktivität unterschiedliche Blutdruckreaktionen zwischen den Genotypen zeigen. Gleiches gilt für das Ausmaß der Endorganschäden. Es wird angenommen, dass die Blutdruckantwort abhängig von der zugeführten Salzdiät ist, der Blutdruckanstieg unter Hochsalzdiät folglich stärker ausgeprägt ist, als unter Niedrigsalzdiät und dass es einen Unterschied zwischen den Mauslinien gibt. Im Sinne der Grundlagenforschung wird in dieser Arbeit zusätzlich untersucht, ob sich die beiden Genotypen aufgrund der Immundefizienz des Rag-1 ^{-/-} KO per se grundsätzlich in der Regulierung des systemischen RAAS voneinander unterscheiden. Da Studien gezeigt haben, dass die Abwesenheit von T-Lymphozyten in ATII induzierten Hypertoniemodellen mit SCID-Mäusen zu einer vermehrten Natriurese im Vergleich zum Wildtyp führt (Crowley et al. 2010) und T-Zellen in die Niere migrieren und zu Entzündung, Fibrose und vermehrter Salzretention führen können, wird in dieser Arbeit zudem geprüft, ob sich die beiden Genotypen hinsichtlich der Salzaufnahme und -exkretion, sowie bezüglich der Kreatinin-Clearance voneinander unterscheiden. Die Bestimmung der Hormone des systemischen RAAS und die Messung des Salz-, Wasser- und Elektrolythaushalts dienen zudem der Kontrolle, ob die verschiedenen Salzdiäten erfolgreich eingesetzt und von den Tieren aufgenommen wurden. Erwartungsgemäß wird die Aktivität von Aldosteron und Renin im Plasma unter Hochsalzdiät signifikant niedriger sein, als unter Niedrigsalzdiät. Zudem wird erwartet, dass die Salzausscheidung der Tiere unter Hochsalzdiät signifikant höher ist, als unter Niedrigsalzdiät.

3. Material und Methoden

3.1. Der Tierversuch

Die tierexperimentelle Arbeit wurde nach § 8 Abs. 1 (Fassung vom 18. Mai 2006, BGBl. I S. 1207, 1313) des Tierschutzgesetzes von der Behörde für Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, Billstraße 80, 20539 Hamburg genehmigt (Nr. des genehmigten Versuchsvorhabens: 11/14 und 47/13). Verantwortlicher Leiter des Versuchs ist Prof. Dr. Heimo Ehmke, der Direktor des Instituts für zelluläre und integrative Physiologie am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Martinistraße 52, D-20246 Hamburg. Alle invasiven Eingriffe am lebenden Tier wurden von der Wissenschaftlerin und stellvertretenden Leiterin des Projekts Frau Dr. med. Anika Seniuk, Fachärztin für Physiologie aus dem Institut für zelluläre und integrative Physiologie am UKE durchgeführt. Mir erteilte die Behörde für Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen die Genehmigung zur Pflege und Versorgung der Tiere, sowie zur Organentnahme bei den toten Tieren.

3.2. Verwendete Mauslinien

Für die Erarbeitung der Fragestellung wurden ausschließlich 12 bis 20 Wochen alte Männchen der immunkompetenten C57BL/6J WT- und der immundefizienten Rag-1 ^{-/-} KO-Mauslinie auf C57BL/6J WT Hintergrund verwendet. Beide Genotypen werden seit Jahrzehnten von internationalen Laboren bei wissenschaftlichen Fragestellungen zum Einfluss des Immunsystems auf die Blutdruckregulierung in der Forschung eingesetzt.

3.2.1. Der C57BL/6J WT

Das Genom der C57BL/6J WT Maus war das erste, welches vollständig sequenziert wurde. Der Genotyp ist der weltweit am häufigsten zu Forschungszwecken eingesetzte Inzuchtmausstamm (*The Jackson Laboratory* ©2017, *Mouse Strain Datasheet – 000664*, [Online im Internet] URL: <https://www.jax.org/strain/000664> [Stand: 09.07.2017]). Die C57BL/6J WT Mauslinie dient als Allzweck- und Hintergrundstamm für die Erzeugung von kongenitalen Mutationen. Vorteil ist, dass die Linie eine maximale Expression verschiedener Mutationen zulässt, gegenüber vielen Tumoren jedoch refraktär ist. Der Genotyp ist anfällig für diätbedingte Fettleibigkeit, Diabetes Mellitus Typ 2 und Atherosklerose (*The Jackson Laboratory* ©2017, *Mouse Strain Datasheet – 000664*, [Online im Internet] URL: <https://www.jax.org/strain/000664> [Stand: 09.07.2017]). In dieser Arbeit wurde mit männlichen Wurfgeschwistern von *Charles Rivers Laboratories International, Inc.*⁵ gearbeitet.

⁵ Sulzfeld, Detuschland (Hauptsitz in Wilmington, USA).

Diese Tiere stammen genetisch von Mäusen aus *The Jackson Laboratory* (USA) ab was durch das *J* im Namen gekennzeichnet ist.

3.2.2. Der Rag-1 *-/-* KO

RAG steht für **R**ecombination **A**ctivating **G**ene 1. Das Gen befindet sich im Organismus der *Mus Musculus* (Hausmaus) auf Chromosom 2 (*The Jackson Laboratory* ©2017, *Mouse Strain Datasheet – 002216*, [Online im Internet] URL: <https://www.jax.org/strain/002216> [Stand: 09.07.2017]). RAG wird mit der Aktivierung und Beschleunigung der V(D)J Rekombination von Immunglobulinen und *Toll-like* Rezeptoren in Zusammenhang gebracht. Die V(D)J Rekombination (auch somatische Rekombination) ist ein elementarer Schritt im Rahmen der Lymphozytenreifung, bei dem die Exons der Gene, die für die variable bzw. antigen-bindende Domäne der Immunglobuline und *Toll-like* Rezeptoren kodieren, neu aneinander geordnet werden (Schatz et al. 1992). Die Ausschaltung des Gens verursacht eine Differenzierungsblockade der B- und T-Lymphozyten. Durchfluss-Zytometrien belegen, dass die Ausreifung der Lymphozyten in einem unreifen Stadium arretiert. Somit besitzt die Rag-1 *-/-* Knockout (KO) Maus im Vergleich zum Wildtyp kleinere lymphatische Organe (Thymus, Milz, Knochenmark) und verfügt weder über reife B-, noch T-Zellen (Mombaerts et al. 1992). Dementsprechend sind diese Mäuse in Ermangelung des adaptiven Immunsystems als immundefizient einzustufen. Die KO Mäuse sind in Hinblick auf das Rag-1 Gen homozygot. In seiner Gesundheit und seiner Fruchtbarkeit unterscheidet sich der Rag-1 *-/-* KO bis zu einem Alter von 21 Wochen nicht vom Wildtyp. Weiterhin zeigen sich bei den KO Mäusen weder Verhaltensauffälligkeiten, noch histopathologische Unterschiede in der Gehirnstruktur (Mombaerts et al. 1992). Rag-1 *-/-* KO Mäuse stammen genetisch von der C567BL/6J Mauslinie ab. Die für diese tierexperimentelle Studie verwendeten Tiere sind direkte Nachkommen von 2009 direkt aus *The Jackson Laboratory*, USA importierten Zuchttieren. Aufgrund der Immundefizienz fand die Zucht in der Zentralen Versuchstierhaltung am UKE unter sterilen Bedingungen statt. Eine Woche vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in Einzelhaltung in das Labor des IZIP überführt.

3.3. Versuchstierhaltung

Über die gesamte Zeit bis zum finalen Versuch, der retrobulbären Blutentnahme und der Organentnahme, verbrachten die Mäuse konsequent in Einzelhaltung in den Maushaltungsräumen des IZIP. Die Maushaltungsräume sind Räume ohne Tageslicht mit Raumklima unter Standardbedingungen (Relative Luftfeuchtigkeit 45-65 %, Temperatur 20-24 °C). Beide Parameter wurden von einem Hygrometer⁶ täglich kontrolliert. Der Tag-/Nachtrhythmus wurde mittels einer Zeitschaltuhr organisiert (Dunkel-/Wachphase: 19:00-07:00, Hell-/Schlafphase: 07:00-19:00). Aufgrund der Immuninkompetenz der Rag-1 *-/-* KO

⁶ RH520A, Extech, USA.

Mauslinie wurde mit den Tieren beider Mauslinien stets unter semi-sterilen Bedingungen gearbeitet, um eventuell gefundene Unterschiede nicht auf eine unterschiedliche Behandlung der Mauslinien zurückführen zu können. Die Männchen beider Mauslinien wurden in einem offenen Käfigsystem aus Plexiglas⁷ mit Filterhauben, die sie von der Außenluft abschotteten, gehalten. Die Filterhauben schützen die Mäuse dabei nach Herstellerangaben nachweislich vor einer mikrobiellen Kontamination aus der Luft (TECNIPLAST 2015, Filterhauben von Tecniplast, *Housing* - Ausstattung für Tierhaltungen, [Online im Internet] URL: <http://www.tecniplast.it/usermedia/de/Housing%20/CAT001TED%20Tierhaltung.pdf> [Stand: 25.09.2016]). Die einzelnen Käfige der Mäuse standen in dem Maushaltungsraum zusammen in einem ventilierten Käfigschrank⁸. Hier befanden sich auch die Empfängerplatten für die telemetrische Blutdruckmessung, auf denen sich die Mäuse während der Messung befanden. Durch eine Ventilationseinheit an der Decke des Schrankes wurde die zugeführte Luft, die durch eine Öffnung am Schrankboden wieder entwich, gefiltert. Auf diese Weise konnte die Umgebung der Mäuse so keimarm wie möglich gestaltet werden. Die Einzelkäfige selbst, sowie alle Bestandteile des Käfigs, wozu jeweils ein Gehäuse, 1-2 cm hoher, staubfreier Einstreu, eine Trinkflasche (450 ml), ein Abdeckgitter mit integrierter Futterraufe, eine Filterhaube, sowie weiteres *Cage Enrichment* (ein Maushäuschen, Zellstoff als Nestbaumaterial) zählen, wurden vor Gebrauch autoklaviert und bis zum Versuchsbeginn steril verpackt. Die Käfigeinsätze der Mäuse (inklusive Gehäuse mit Einstreu, *Cage Enrichment*) wurden einmal wöchentlich unter einer Laborwerkbank⁹ gewechselt. Bei groben Verschmutzungen der Trinkflaschen, Trinkflaschendeckel oder der Futterraufe wurden auch diese erneuert. Als Trinkwasser diente den Mäusen sowohl vor, als auch nach Start der Spezialdiäten autoklaviertes Leitungswasser. Die Versuchstiere hatten über den gesamten Versuchszeitraum sowohl zur Nahrung, als auch zum Trinkwasser Zugang *ad libitum*. Jede Maus wurde einmal täglich visitiert und auf Gesundheitsstatus (Fellpflege als Surrogat), Verhaltens- und Ernährungszustand hin kontrolliert. Mindestens einmal wöchentlich wurde zudem das Gewicht jeder Maus eruiert und protokolliert.

3.4. Protokoll der tierexperimentellen Arbeit

3.4.1. Endpunkte, Methoden und Gruppeneinteilungen

Für die Erarbeitung der Fragestellungen wurden drei verschiedene Versuchsreihen angesetzt:

⁷ Modell 1284L Eurostandard Typ II L, TECNIPLAST, Deutschland.

⁸ Scantainer, Scanbur-Bk, Dänemark.

⁹ Heraeus, Hanau, Deutschland.

- Zur Ermittlung des Blutdrucks und anderer kardiovaskulärer Parameter (mittlerer arterieller Druck, systolischer und diastolischer Druck, Herzfrequenz, Aktivität) wurde den Mäusen ein Telemetriesender in die *A. carotis* implantiert (Telemetriemäuse).
- Für die Messung der Hormone des systemischen RAAS aus dem Blut (Plasma-Reninaktivität (PRA), Plasma-Aldosteronkonzentration) und aus dem Nierengewebe (quantitative Bestimmung der Renin mRNA) mussten die Tiere für den finalen Versuch, die retrobulbäre Blutentnahme (BE), an eine stressfreie Gasnarkose durch vorheriges Training gewöhnt werden (Trainingsmäuse).
- Zur Ermittlung der GFR (Kreatinin-Clearance), des Salz-, Wasser- und Elektrolythaushaltes, sowie zur Erfassung der Futter- und Trinkmenge wurden die Versuchstiere in speziellen Käfigen, den Metabolischen Käfigen, untergebracht (MK-Mäuse).

| Endpunkte | Methode(n) | Diätgruppen |
|--|--|---|
| Vitalparameter (Blutdruck, Herzfrequenz, Aktivität) | Radio-Telemetrie | Rag-1 -/- KO und C57BL/6J WT, Niedrig-, und Hochsalzdiät jeweils mit und ohne ATII (n pro Gruppe = 7-8) |
| Untersuchung des Plasmas: Bestimmung des RAAS Hormonstatus (Plasma-Aldosteronkonzentration, Plasma-Reninaktivität, quantitative Bestimmung der Renin mRNA, Elektrolytbestimmung im Plasma) | Retrobulbäre Blutentnahme, Radio-Immunoassays, RT-qPCR, Blutgasanalysen, Messung der Elektrolytkonzentration im Plasma mittels Spotchem EL SE 1520), | Rag-1 -/- KO und C57BL/6J WT, Niedrig-, Kontroll- und Hochsalzdiät ohne ATII (n pro Gruppe = 10-11) |
| Organentnahme und Verifizierung des Genotyps (Entnahme von Aorta, Herz, Nieren, Milz, Längenmessung derTibia) | Tibia-Amputation und Messung der Unterschenkellänge zur rechnerischen Quantifizierung der Herzhypertrophie (s.o.), wiegen von Herz und Milz, Genotypisierung mittels Milzgewichten (indirekt) und PCR (direkt) | Rag-1 -/- KO und C57BL/6J WT, Niedrig-, Kontroll- und Hochsalzdiät mit und ohne ATII (n pro Gruppe = 12-22) |

| Endpunkte | Methode(n) | Diätgruppen |
|--|--|--|
| Kardiovaskuläre Endorganschädigungen (Aorta, Herz) | Histologische Untersuchung von Herz und Aorta, Quantifizierung der Herzhypertrophie (Quotient aus Ventrikelgewicht [g]/ Tibialänge [cm] und Herzgewicht [mg]/ Körpergewicht [g], Funktionelle Untersuchung der Gefäßreagibilität mittels Myographie, isometrische Tonusmessungen im Organbad (Aorta) | Rag-1 -/- KO und C57BL/6J WT, Niedrig-, Kontroll- und Hochsalzdiät mit und ohne ATII (n pro Gruppe = 8-22) |

Tabelle 3-1: Überblick über Endpunkte, Methoden und Gruppeneinteilung der tierexperimentellen Arbeit.

Für die Messung der Vitalparameter wurden beide Mauslinien jeweils in eine Niedrig- und Hochsalzdiätgruppe unterteilt, sodass es vier Gruppen insgesamt und zwei Gruppen pro Mauslinie gab. Die jeweiligen Versuchsgruppen bestanden aus mind. sieben und max. acht Tieren. Als Kontrollblutdruck wurde der Blutdruck unter Basisbedingungen (0,3 % Na⁺ im Futter) derselben Mäuse, die später auch Niedrig- bzw. Hochsalzdiät und im weiteren Verlauf zusätzlich ATII erhielten, herangezogen. Experimente mit normalkonzentrierter Salz- bzw. Basisdiät (0,3 % Na⁺ im Futter) und zusätzlicher ATII Behandlung wurden bereits durch den vorangegangenen Doktoranden bearbeitet und veröffentlicht¹⁰. Für die Versuchsreihen mit den Trainings- und MK-Mäusen wurden beide Mauslinien jeweils in eine Niedrigsalz-, Kontrollsalz- und Hochsalzdiätgruppe mit n=10-11 pro Gruppe eingeteilt, sodass es sechs Gruppen insgesamt und drei Gruppen pro Mauslinie gab. Zur Eruiierung der kardiovaskulären Endorganschädigung wurden die Organe aller Diätgruppen mit und ohne ATII Behandlung herangezogen.

3.4.2. Versuchsablauf

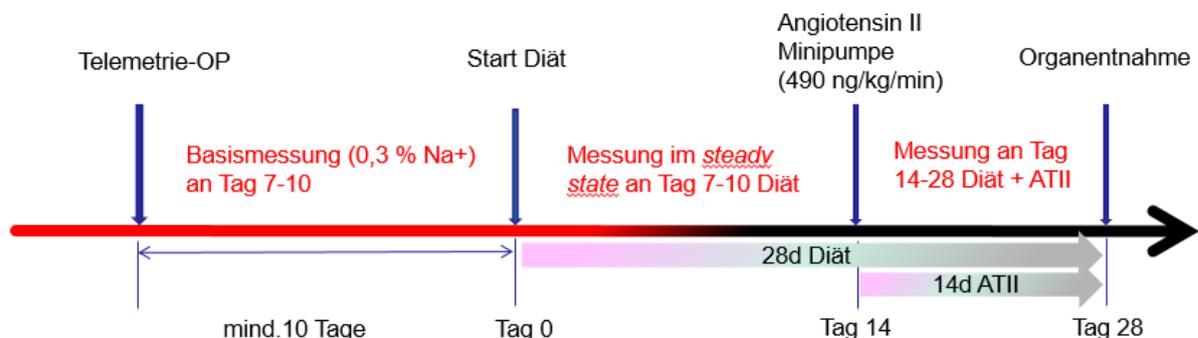


Abbildung 3-1: Zeitstrahl des Experiments.

¹⁰ Dissertation von Jonas Leonhard Thiele: „Experimentelle Untersuchungen zur Hämodynamik & kardiovaskulären Schäden einer Angiotensin-II induzierten arteriellen Hypertonie in Rag-1 -/- Mäusen“, Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, Prof. Dr. med. Heimo Ehmke, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 2015.

Nach Implantation der Telemetriesender zur Aufzeichnung der Vitalparameter wurde eine zehntägige Ruhepause für die Mäuse eingehalten. Während dieser Phase erhielten die Tiere, wie auch vor der OP, LASQCdiet® ROD16R-Futter (= Basisdiät mit 0,3 % Na⁺ im Futter). An Tag 11 begann schließlich die Gabe der Spezialdiät (= Tag 0), deren Dauer insgesamt 28 Tage betrug. Während der letzten 14 Tage der Diät wurde bei den Telemetriemäusen zusätzlich ATII über miniosmotische Pumpen mit einer Dosis von 490 ng/kg [Mausgewicht, MG]/min verabreicht. Die radiotelemetrische Messung der Vitalparameter erfolgte kontinuierlich, während sich die Mäuse unter der jeweiligen Behandlung (Basis, Diät, Diät+ATII Gabe) im *steady state* befanden. Die Trainings- und MK-Mäuse erhielten ebenfalls über insgesamt 28 Tage die Spezialdiäten. Im Unterschied zu den Telemetriemäusen entfiel bei diesen Versuchsreihen die 14-tägige ATII Gabe am Ende der Diät. Das Ausmaß der kardiovaskulären Endorganschädigung wurde bei allen Diätgruppen aller drei Versuchsreihen (mit und ohne ATII Behandlung) eruiert.

3.4.3. Basis- und Spezialsalzdiäten

Vor Beginn der Niedrig- bzw. Hochsalzdiät erhielten die Mäuse als Basisdiät zertifiziertes LASQCdiet® ROD16R-Futter¹¹. Laut Hersteller entspricht dieses Futter dem *New Scientific Standard* und wurde während der Herstellung mit Gammabestrahlung (mind. 21 kGy) sterilisiert und als sterile Diät vakuumiert in zehn Kilogramm schweren PP-Siegeleimern (L-Box) geliefert¹². Diese Eimer wurden zum Auffüllen der Futterraufe, ebenso, wie die Käfige selbst, stets unter der Laborwerkbank geöffnet und wiederverschlossen, um die Umgebung der immundefizienten Rag-1 -/- Mauslinie und ihrer Kontrollgruppe so pathogenarm wie möglich zu halten. Die Salzkonzentration des LASQCdiet® ROD16R-Futters betrug 3.000 mg/kg [Futter], was 0,3 % Salz entspricht. Mit Beginn der Niedrig- bzw. Hochsalz-Spezialdiät wurden die Mäuse beider Genotypen randomisiert in die finale Diätgruppe eingeteilt. Die zu Beginn für eine Maus gewählte Diät blieb über die gesamte Versuchszeit für diese Maus so bestehen. Die Spezialsalz-Diätdauer betrug insgesamt 28 Tage. Das Spezialfutter wurde bei der Firma Altromin Spezialfutter¹³ bestellt. Insgesamt kamen drei verschiedene Kochsalz-Diäten zur Anwendung (siehe Tabelle 3-3). Bei der Wahl der Diäten wurde darauf geachtet, dass sie sich lediglich in ihrer Natriumchlorid-Konzentration voneinander unterschieden, nicht jedoch hinsichtlich der restlichen Nahrungsbestandteile.

¹¹ LASvendi, Soest, Deutschland.

¹² LASvendi ©2017, Rod16-R Alleinfutter für Zucht und Haltung von Maus & Ratte, gammabestrahlt für Barrierehaltungen und Isolatoren [Online im Internet] URL: <http://www.lasvendi.com/de/lasqcdiets/maus-ratte/rod16-r.html> [Stand 11.07.2017].

¹³ Lage, Deutschland, lfd. Bestellnr.: C1036-06 -1036-08.

| Diät | Na ⁺ Konzentration in mg/kg [Futter] | Cl ⁻ Konzentration in mg/kg [Futter] | K ⁺ Konzentration in mg/kg [Futter] |
|---------------------------------|---|---|--|
| Kontrollsalz (Ifd. Nr.: 103606) | 3.000 (=0,3 % Na ⁺) | 4,550 | 7,088 |
| Niedrigsalz (Ifd. Nr.: 103607) | 200,059 (=0,02 % Na ⁺) | 0,222 | 7,088 |
| Hochsalz (Ifd. Nr.: 103608) | 30.000,389 (=3 % Na ⁺) | 46,277 | 7,085 |

Tabelle 3-2: Elektrolytzusammensetzung der Spezial-Salzdiäten für Niedrigsalz-, Kontrollsalz- und Hochsalzdiät.

3.5. Bestimmung von Blutdruck, Herzfrequenz und Aktivität mittels Radiotelemetrie

3.5.1. Implantation der Telemetriesender

Alle Operationen führte die wissenschaftliche Mitarbeiterin und stellvertretende Leiterin dieses Projekts Frau Dr. med. Anika Seniuk, Fachärztin für Physiologie (IZIP, UKE Hamburg) durch. Mir oblagen assistierende Tätigkeiten an der Maus. Die Telemetrie ermöglichte die Aufzeichnung verschiedener, kardiovaskulärer Parameter wie Blutdruck (SBP, MAP, DBP), Herzfrequenz und Aktivität (Bewegungsregistrierung / Minute) bei vollem Bewusstsein in einem sich frei bewegenden, ungestörten Tier.

3.5.2. Der Telemetriesender

Für die Erfassung der Vitalparameter kamen zylindrisch geformte, 1,4 g schwere und 1,1 cm³ große PhysioTel® PA Transmitter von *Data Science International* (USA) zum Einsatz (Data Science International, ©2017, *Miniature Mouse Telemetry*, [Online im Internet] URL: [https://www.datasci.com/products/implantable-telemetry/mouse-\(miniature\)](https://www.datasci.com/products/implantable-telemetry/mouse-(miniature)) [Stand: 09.07.2017])



Abbildung 3-2: telemetrisches Messinstrument PhysioTel® mit Sendereinheit, Batterie und Messkatheter vom Typ PA-C10, Copyright *Data Science International (DSI)* [Online im Internet] URL: [https://www.datasci.com/products/implantable-telemetry/mouse-\(miniature\)/pa-c10](https://www.datasci.com/products/implantable-telemetry/mouse-(miniature)/pa-c10) [Stand 24.09.2016].

Das minimale Mausegewicht sollte für die Implantation laut Hersteller mind. 17 g betragen. All unsere Versuchstiere erfüllten zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs diese Voraussetzung. Die Laufzeit der Batterie beträgt sechs Wochen (Data Science International ©2017, DSI

PhysioTel PA-C10 Pressure Transmitter for Mice, [Online im Internet] URL: [https://www.datasci.com/products/implantable-telemetry/mouse-\(miniature\)/pa-c10](https://www.datasci.com/products/implantable-telemetry/mouse-(miniature)/pa-c10) [Stand: 09.07.2017]). Nach Implantation in die Maus kann der Sender mittels eines externen Magneten über eine Magnet-Relais-Schaltung aus-und eingeschaltet werden. Per Funkübertragung werden die Daten des Senders von unter den Einzelkäfigen platzierten PhysioTel® Receivers¹⁴ empfangen und von dort schließlich auf den Computer übertragen.

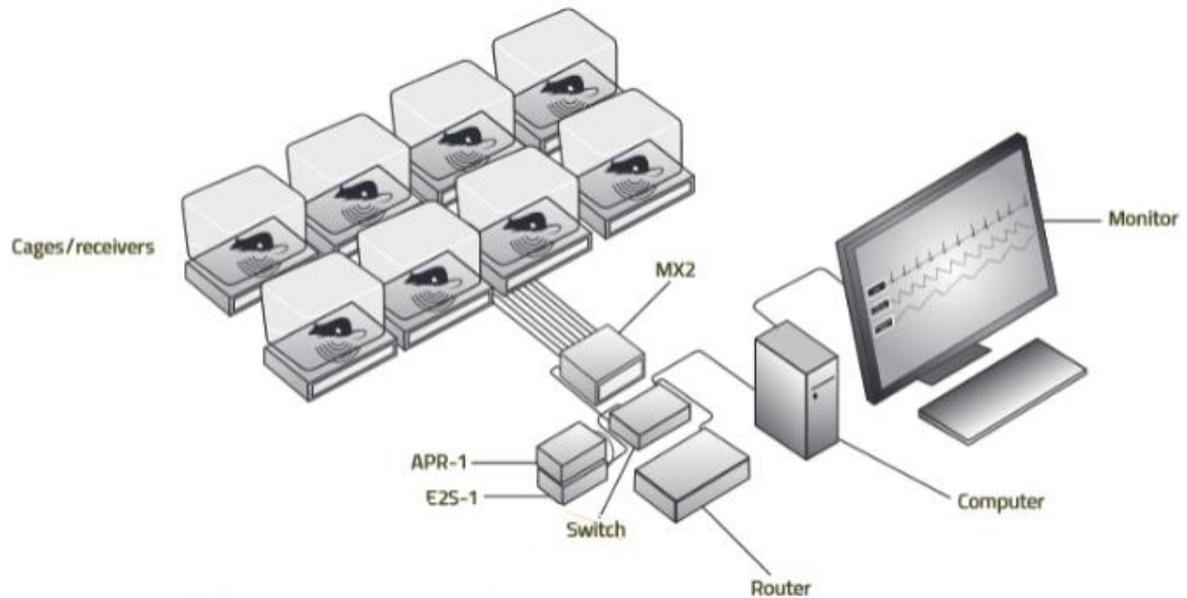


Abbildung 3-3: Telemetrische Blutdruckmessung und -aufzeichnung durch die PhysioTel und Physio Tel HD Telemetrie-Plattform mit PhysioTel® Receivers und Matrix 2.0 (MX2) zur Koordinierung der Kommunikation zwischen den implantierten Sendern, dem Reciever und dem erfassenden Computer, Copyright: *Data Science International (DSI), Implantable Telemetry Hardware*, [Online im Internet] URL: <https://www.datasci.com/products/implantable-telemetry/telemetry-hardware> [Stand: 24.09.2016].

3.5.3. Messintervalle

Mithilfe des Computerprogramms *Dataquest A.R.T.TM Gold Acquisition*, Version 4.31 von *Data Science International (USA)* konnten die Telemetriedaten erfasst, analysiert und auf dem Computer¹⁵ gespeichert werden. Alle fünf Minuten erfolgte die kontinuierliche Aufzeichnung der Parameter für insgesamt eine Minute (vier Minuten ohne Datenaufzeichnung, eine Minute mit kontinuierlicher Datenerfassung), sodass sich insgesamt 144 Werte pro 12 h Nacht (19:00 bis 07:00) bzw. pro 12 h Tag (07:00 bis 19:00) ergaben.

¹⁴ Modell RPC-1 von *Data Science International*.

¹⁵ Optiplex GX270, Dell, USA.

| Time Stamp | RagBl6D08.Systolic | RagBl6D08.Pressure | RagBl6D08.Heart Rate |
|------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| 24.06.2013 19:00 | 151,876 | 138,411 | 642,757 |
| 24.06.2013 19:05 | 152,429 | 141,8 | 549,366 |
| 24.06.2013 19:10 | 185,611 | 178,459 | 592,021 |
| 24.06.2013 19:15 | 158,912 | 155,915 | 445,294 |
| 24.06.2013 19:20 | 141,231 | 135,297 | 421,384 |
| 24.06.2013 19:25 | 149,911 | 141,364 | 433,875 |
| 24.06.2013 19:30 | 122,925 | 115,263 | 543,852 |
| 24.06.2013 19:35 | 140,26 | 129,902 | 682,458 |
| 24.06.2013 19:40 | 124,711 | 114,926 | 522,971 |
| 24.06.2013 19:45 | 132,279 | 121,682 | 668,43 |

Abbildung 3-4: Fünfminutenwerte aller Parameter, beispielhafter Auszug aus der MS Excel Tabelle 2013, importiert mithilfe von *Dataquest A.R.T.™ Gold Acquisition and Analysis*, DSI™ (USA).

3.5.4. Weiterverarbeitung der kardiovaskulären Parameter

Die Software *Dataquest A.R.T.™ Analysis*, Version 4.0 von *Data Science International* ermöglichte den Transfer der Daten in eine Excel Tabelle¹⁶. Überdies gewährleistete die Software die Berechnung des gleitenden Mittelwertes (engl. *Moving Average*) aus den Rohdaten. Die alle fünf Minuten für eine Minute kontinuierlich erfassten Messwerte wurden auf diese Weise geglättet, sodass man für jeden Parameter Einstundenwerte erhielt. Dies ergab folglich jeweils 12 Werte für 12 h Nacht und 12 h Tag. Nach dem Import in eine Excel¹⁷ Tabelle wurden diese Einstundenwerte weiter bearbeitet. Relevant ist in dieser Arbeit der Vergleich des Verlaufs aller Parameter beider Mauslinien unter den beiden Spezialsalzdiäten mit und ohne ATII Behandlung. Hierfür wurden die 12 Einstundenwerte einer ganzen Nacht/eines ganzen Tages zu einem einzigen Wert gemittelt. Auf diese Weise erhält man für jeden Vitalparameter einen Wert pro Nacht/pro Tag und pro Diät mit/ohne ATII. So ergeben sich bei einer Messung über 72 h jeweils drei Nacht- und Tageswerte für die Parameter unter Basis- und Spezialsalzdiät, sowie 14 Nacht- bzw. 13 Tageswerte für die Parameter unter Spezialsalzdiät mit ATII Behandlung. Die Veränderung jedes Parameters durch Beginn der Spezialsalzdiät oder der ATII Behandlung kann somit in einem Liniendiagramm dargestellt werden. Mittelt man die Werte der drei Nächte/Tage zu einem einzigen Wert, ergibt sich für jeden Parameter ein Wert aus insgesamt drei Nächten/Tagen für die Basis- und Spezialsalzdiät bzw. ein Wert aus den letzten drei Nächten/Tagen für die Spezialsalzdiäten mit ATII Behandlung. Auf diese Weise lässt sich jeder Parameter in seiner absoluten Ausprägung unter Basisbedingungen und während der Spezialsalzdiäten mit und ATII Behandlung in einem Balkendiagramm darstellen und zwischen den Genotypen vergleichen. Zum Vergleich, ob sich die Genotypen in ihrem Ruheblutdruck voneinander unterscheiden, wurde der Blutdruck auf die Aktivität der Mäuse normiert. So können eventuell gefundene Unterschiede im Blutdruckverhalten nicht auf eine unterschiedlich starke Aktivität der Genotypen zurückgeführt werden. Hierfür wurden die alle fünf Minuten für eine Minute gemessenen Blutdruckwerte nach Aktivität = 0 und Aktivität > 0 sortiert. Bei einer Messung

¹⁶ Microsoft Corporation, Excel 2013, USA.

¹⁷ Ebd.

über 72 h unter Basis- und Speziessalzdiät bzw. über die letzten 72 h unter Speziessalzdiät mit ATII ergeben sich pro Nacht/Tag und pro Aktivitätsgrad jeweils drei Werte pro Diät (Basis-, Hoch-, Niedrigsalzdiät) und Intervention (mit/ohne ATII). Diese drei Werte pro Diät/Intervention werden erneut jeweils zu einem Wert gemittelt. Auf diese Weise erhält man sowohl für die Nacht, als auch für den Tag einen Wert pro Aktivitätsgrad und pro Diät/Intervention. Auf diese Weise wird der Ruheblutdruck (Aktivität = 0 und > 0) in seiner absoluten Höhe mittels Balkendiagramm dargestellt und zwischen den Genotypen verglichen. Die graphische Darstellung, Analyse und statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad – Prism®, Version 5.02.

3.5.5. Vorbereitung des Senders

Vor Implantation *in vivo* musste der Telemetriesender geeicht werden. Hierfür wurde das Messgerät in 0,9 % ige Kochsalzlösung eingelegt und über 24 h bei atmosphärischem Umgebungsdruck auf die Messplatte¹⁸ gelegt und eingeschaltet. Die Daten wurden über diesen Zeitraum kontinuierlich aufgezeichnet. Am darauffolgenden Tag wurde die Abweichung des mittleren arteriellen Drucks vom Nullpunkt abgelesen und dokumentiert. Dabei wurde eine Abweichung von maximal +/- 4 mmHg toleriert. Sender mit einer stärkergradigen Abweichung wurden nicht implantiert.

3.5.6. Vorbereitung der Versuchstiere

Bis zur OP erhielten die Mäuse LASQCdiet® ROD16R-Futter. An einem Operationstag wurden sowohl Rag-1 -/- KO-, als auch C57BL/6J WT Mäuse jeweils in derselben Anzahl operiert (drei C57BL/6J WT, drei Rag-1 -/- KO). Pro Tag wurden max. sechs Tiere operiert. Da bei der KO Mauslinie eine Immundefizienz bestand, wurden die Versuchstiere beider Genotypen unter der Gebläsewerkbank mit sterilen Handschuhen, Mundschutz, sterilem Kittel, sterilem Abdecktuch, autoklaviertem OP-Besteck und Einmalmaterial operiert. Die Dauer der Operation belief sich im Durchschnitt auf bis zu einer Stunde pro Tier. Präoperativ erhielten die Mäuse intraperitoneal eine gewichtsadaptierte Anästhesie mit einem Narkosegemisch aus 120 mg/kg Ketamin (Albrecht, Deutschland) und 16 mg/kg Xylazin (Bayer, Deutschland)¹⁹. Nach Applikation wurde die Maus in ihren Käfig zurückgesetzt. Vor Beginn der endgültigem Beginn der OP (Schnitt) wurde stets eine ausreichende Narkosetiefe, die mithilfe des Zehenkneifreflex²⁰ überprüft worden ist, (i.d.R. 10-15 min) abgewartet. War der Reflex weiterhin auslösbar, mussten weitere Minuten abgewartet und gegebenenfalls das Narkotikum nachgespritzt werden. Peri- und postoperativ erhielten die

¹⁸ PhysioTel® Receiver, DSI™, USA.

¹⁹ 0,12 ml Ketamin (= 12 mg) + 0,08 ml Xylazin (= 1,6 mg) wurden ad 1 ml mit 0,9 %iger NaCl-Lsg. vermengt, anschließend i.p. Applikation von 10 ml pro kg [Mausgewicht, MG].

²⁰ Der Reflex war positiv, wenn man mit den Fingernägeln von Daumen und Zeigefinger in die Zehen eines Hinterbeines der Maus kniff und daraufhin das ausgestreckte Bein zum Körper gezogen wurde.

Mäuse zwecks Infektionsprophylaxe subkutan eine gewichtsadaptierte Antibiose mit 5 mg/kg Enrofloxacin²¹, sowie eine Schmerzprophylaxe mit 8,25 mg/kg Carprofen²².

3.5.7. Prozedere der Implantation

Die Maus wurde nach erfolgreicher Anästhesie aus dem Käfig in Rückenlagerung auf eine Korkplatte, die sich wiederum auf einer Wärmeplatte befand, umgelagert. Auf diese Weise sollte eine Unterkühlung der Maus während der OP verhindert werden. Die Beinchen wurden vorsichtig gestreckt und mit Tesa-Krepp® auf der Korkplatte fixiert. Der Kopf der Maus wurde mittels einer Kompresse im Nacken überstreckt und durch einen Faden, der die vorderen Schneidezähne umschlang, in dieser Haltung fixiert. Um einer Austrocknung der Augen und somit einem Kornealschaden vorzubeugen, wurde Bepanthen® Augen-und Nasensalbe²³ mit einem Wattestäbchen auf die Augen aufgetragen. Anschließend wurden die Mäuse von submandibulär bis sternal rasiert. Die Region wurde anschließend mit Povidon-Iod-Lösung²⁴ desinfiziert. Die fixierte Maus auf der Korkplatte wurde schließlich mit dem überstreckten Kopf zur Operateurin hin positioniert. Es erfolgte eine drei Zentimeter lange Inzision, sowie die Präparation einer subkutanen 1,5 cm x 1,5 cm großen Tasche im linken Flankenbereich (zwischen Vorder-und Hinterbeinen). Die Haut und das Subkutangewebe wurden zwischen den *Glandulae submandibulares* durchtrennt und die *Vagina carotica* des linken *Trigonum caroticum* im *Spatium parapharyngeale* freipräpariert. Die *A. carotis communis* wurde anschließend bis zur Bifurkation von dem restlichen Gefäß-Nerven-Strang getrennt. Kranial der Bifurkation wurde die Arterie mit einem geknoteten Haltezügel abgebunden. Auf mittlerer Strecke unterhalb des kranialen Knotens wurde ein loser Knoten vorgelegt und am kaudalen Ende der *A. carotis communis* ein nicht geknoteter Haltezügel angelegt. Der Sender wurde anschließend auf einer feuchten Kompresse neben der Maus platziert und der Katheter mit einer Schlitz-Pinzette in die Arterie bis zur *Aorta* und bis zur Markierung des Katheters vorgeschoben (Markierung entspricht 10 mm).

²¹ Baytril 2,5 %®, Bayer, Deutschland, 1:10 Verdünnung: 0,1 ml Baytril 2,5 %® ad 1 ml mit 0,9 %iger NaCl-Lösung, anschließend Applikation von 2ml pro kg [MG].

²² Rimadyl®, Pfizer, USA, 1:10 Verdünnung: 0,05 ml Rimadyl® ad 0,5 ml mit 0,9 %iger NaCl-Lsg., anschließend Applikation von 1,67 ml pro kg [MG].

²³ Bayer, Leverkusen, Deutschland.

²⁴ Betaisodona®, Mundipharma, Deutschland.

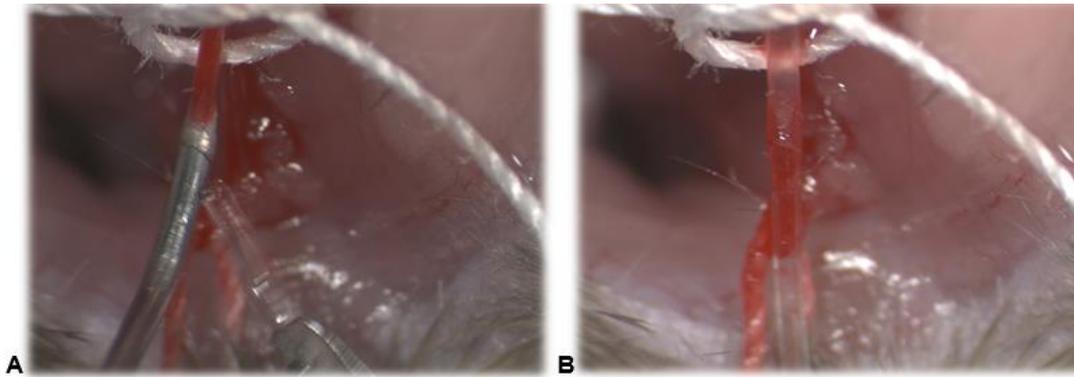


Abbildung 3-5: Implantation Messkatheter. Sicht durch das Mikroskop. A) Vorschieben des Messkatheters mit Pinzette bis in die Aorta, B) liegender Katheter in der *A. carotis communis*, IZIP, UKE.

Nachdem der Katheter in der Arterie platziert worden war, wurde er mittels Knoten fixiert. Um die Intaktheit und Funktion des Senders zu überprüfen, wurde die narkotisierte Maus mitsamt des Senders intraoperativ auf die PhysioTel® Messplatte²⁵ gelegt. Mithilfe eines Magneten wurde der Sender eingeschaltet und schließlich eine Blutdruckanalyse am nebenstehenden Rechner durchgeführt. Erschien ein adäquates Signal (realistische Blutdruckkurve mit Werten um 120/80 mmHg), wurde der Katheter endgültig mit Doppelknoten fixiert. Die Knoten wurden zusätzlich mit HISTOACRYL® Gewebeklebstoff (Braun, Deutschland) benetzt, um einen festeren Sitz zu garantieren. Die Telemetriesendeeinheit wurde schließlich endgültig in die zuvor freipräparierte subkutane Tasche platziert. Abschließend erfolgte die Wundversorgung durch Einzelknopfnah (vier bis sieben Knoten) mit Mersilene 5.0 Nahtmaterial (Ethicon, USA). Um eine Hypoglykämie postoperativ zu verhindern, erhielten die Mäuse im Anschluss eine NaCl-Glukose-Mischung s.c.²⁶. Zuletzt wurden die Mäuse wieder in ihre ursprünglichen Käfige auf Zellstoff zurückverlegt.

3.5.8. Postoperative Versorgung

Da postoperativ von einer gestörten Wärmeregulierung der Mäuse auszugehen war, wurde eine Hälfte der Käfige für bis zu drei Tage auf eine Wärmeplatte gestellt, sodass die Tiere selbst entscheiden konnten, ob sie die Wärme als angenehm empfinden. Mit der Gabe von Trinken und Futter wurde gewartet, bis die Mäuse vollständig bei Bewusstsein waren. Um die Nahrungs- und Flüssigkeitszufuhr postoperativ zu erleichtern, wurden zwei kleine Petrischalen in den Käfig gestellt. Eine Petrischale enthielt das LASQCdiet® ROD16R-Futter, welches in 5 % iger Glukose-Lsg. eingeweicht worden war. Die andere Petrischale beinhaltete für die Flüssigkeitsaufnahme ebenfalls eine 5 % ige Glukose-Lsg. Zusätzlich wurde trockenes Pelletfutter in die Käfige gestreut, falls die Mäuse das aufgeweichte Futter nicht mochten, aber noch zu kraftlos waren, um sich zum Fressen zur im Abdeckgitter integrierten Futtertraufe zu strecken. Der Gesundheitsstatus der Tiere (Fellpflege, Aktivität),

²⁵ Data Science International, USA.

²⁶ Im Verhältnis 1:1: 5 % ige Glukose-Lsg. mit 0,9 % iger NaCl-Lsg.

wie auch die OP Wunde (Nahtsuffizienz, Nachblutungen) wurden mind. einmal bis mehrmals täglich kontrolliert. Bei starker Wundmanipulation wurde die Wunde unter Isoflurannarkose (Florene®, Abbott, USA) revidiert. Die Käfige wurden fünf Tage nach der OP gewechselt. Für insgesamt zehn Tage nach Implantation des Senders wurde eine Ruhephase für die Mäuse eingehalten und am siebten Tag schließlich mit den Blutdruckmessungen unter Basisbedingungen für eine Dauer von drei Tagen begonnen.

3.5.9. Postoperative Ausschlusskriterien

Jede Maus wurde während der drei Tage postoperativ nach sieben Kriterien begutachtet und ihr Gesundheitszustand bewertet. Dabei wurden pro Kategorie Punkte von null bis zwei vergeben:

| Kriterium | 0 | 1 | 2 |
|------------------------|-----------|---------------|------|
| Gewichtsverlust > 20 % | Nein | ja | - |
| Trinken | >2 ml | <2 ml | 0 ml |
| Fell | glänzend | struppig | - |
| Augen | klar/wach | trübe | - |
| Bewegung | spontan | auf anstupsen | nein |
| Nestbau | Ja | nein | - |
| Stattgehabte Blutung | Nein | minimal | ja |

Tabelle 3-3: postoperative Bewertungskriterien des Gesundheitszustandes der Versuchstiere

In Abhängigkeit von der Gesamtpunktzahl entschied sich, ob das Experiment mit der Maus abubrechen war. Der Ausschluss erfolgte, wenn die Maus eine Gesamtpunktzahl von:

≥ vier Punkte 24 h postoperativ und

≥ drei Punkte 48 h und 72 h postoperativ erreichte.

3.6. Implantation von osmotischen Minipumpen

Durch die subkutane Implantation von osmotisch wirksamen Pumpen, die kontinuierlich eine definierte Menge von 490 ng/kg [MG]/min ATII in die Maus abgaben, konnte der Blutdruck erhöht und somit untersucht werden, inwiefern sich die beiden Mauslinien hinsichtlich ihrer Blutdruckreaktion und ihrer kardiovaskulären Endorganschädigung durch den AT II induzierten Hypertonus voneinander unterschieden.

3.6.1. Eckdaten der osmotischen Minipumpen

Für die Implantation wurden miniosmotische Pumpen vom derzeit kleinsten erhältlichen Typus von ALZET® *Osmotic Pumps*, Modell 1002 verwendet. Die Pumpen hatten eine

Länge von 1,5 cm, einen Durchmesser von 0,6 cm und ein Leergewicht von 0,4 g. Nach Herstellerangaben von ALZET® nehmen die Pumpen ihre Pumpfunktion vier bis sechs Stunden nach deren Befüllen auf. Daher erfolgten die Vorbereitung der Pumpen und die Implantation in die Versuchstiere stets vormittags bis spätestens 12:00 Uhr. So konnte die erste Blutdruckmessung unter ATII bereits am selben Abend zur ersten Aktivphase (Nacht) um 19:00 Uhr beginnen. Laut Hersteller ALZET® fördern die Pumpen während einer Zeitperiode von mind. 4 h bis max. 336 h (= 14 d) zuverlässig und konstant eine definierte Menge AT II pro Stunde bei einem Konfidenzintervall von zehn Prozent (KI [332,64 h ≈ 13 d; 339,36 h ≈ 14 d]). Sie verblieben nach Implantation insgesamt 14 Tage in der Maus. Dies entspricht dem Protokoll von Guzik aus dessen Paper *The Role of the T-cell in Genesis of Angiotensin II induced Hypertension and vascular Dysfunction* (Guzik et al. 2007). Es erfolgte eine kontinuierliche Aufzeichnung der Blutdruckwerte für insgesamt 324h (= 14 Nächte, 13 Tage). Das Material ist steril und eignet sich nur für den einmaligen Gebrauch (ALZET®, September 2016).

3.6.2. Befüllen der Pumpen

Vor der Implantation wurden die Pumpen orientierend an Vorarbeiten (Guzik et al. 2007) mit ATII von Sigma Aldrich® befüllt. Hierfür wurde das ATII Pulver gewichtsadaptiert und entsprechend der Pumprate, die vom Hersteller mit 0,24-0,25 µl/min definiert war, in 0,9 % iger NaCl-Lsg. soweit gelöst, bis eine Dosis von 490 ng/kg [MG]/min erreicht wurde. Dies entsprach einer mittleren ATII Dosis (niedrige Dosis 160 ng*kg⁻¹*min⁻¹, hohe Dosis 1,5 ng*g⁻¹*min⁻¹). Die Pumpen wurden unter sterilen Bedingungen (sterile Handschuhe, Mundschutz, steriler Kittel, steriles Einwegmaterial, autoklaviertes OP-Besteck) unter der Gebläsewerkbank mit ATII bei Raumtemperatur befüllt und anschließend bis zur Implantation in steriler, isotoner 0,9 % iger Kochsalzlösung aufbewahrt.

3.6.3. Das Prozedere der Implantation

In einem Durchgang wurden sowohl Rag-1 -/- KO Mäuse, als auch C57BL/6J WT Mäuse der Intervention unterzogen. Die Dauer der Operation belief sich auf 10-15 min pro Tier. Für die Implantation wurde die Maus mit einem Isofluran-Luft-Gasgemisch mit einer Dosis von 4 Vol. % in einer speziellen, vorher desinfizierten Einleitungskammer in Narkose gelegt, bis die Reflexe (Zehenkneifreflex) vollständig erloschen waren. Das Tier wurde sodann auf eine Korkplatte in Bauchlage umgelagert. Mittels einer zuvor desinfizierten Narkosemaske wurde die inhalative Gasnarkose bei einer Dosis von 2 % bis 3 Vol. % Isofluran (Florene®, Abbott, USA) weitergeführt. Die Maus atmete selbstständig. Die Narkosetiefe wurde regelmäßig vom Operateur durch Beobachtung der Atemfrequenz und Reaktion auf Schmerzreize überprüft. Zudem wurde eine Schmerzprophylaxe mit Carprofen²⁷ in einer Dosierung von 8,25 mg /kg

²⁷ Rimadyl®, Pfizer, USA, 1:10 Verdünnung, Schema ebd.

[MG] durchgeführt. Schließlich wurde eine etwa 1,5 cm x 1,5 cm große Fläche im Nacken der Maus rasiert und die Haut mit Povidon-Iod-Lsg.²⁸ desinfiziert, sodass eine ca. 0,5 cm lange Inzision der Nackenhaut erfolgen konnte. Anschließend begann die Präparation einer ca. 1 cm x 1,5 cm großen subkutanen Tasche in der zum Telemetriesender kontralateral gelegenen Flanke. In diese Tasche wurde die Minipumpe unter möglichst sterilen Bedingungen platziert. Zuletzt erfolgte die Wundversorgung durch Einzelknotennaht mit zwei bis drei Knoten²⁹, sodass die Maus schließlich zurück in ihren Käfig gesetzt werden konnte. Durchschnittlich erwachten die Tiere nach ca. drei bis fünf Minuten.

3.6.4. Postoperative Versorgung

Nach dem Eingriff erfolgten tägliche Kontrollen des Gesundheitszustandes und der OP-Wunde. Bei Auftreten von Nahtinsuffizienzen wurden diese unter Isoflurannarkose revidiert.

3.7. Untersuchungen von Plasma und Urin

3.7.1. Bestimmung der Hormone des systemischen RAAS aus dem Plasma

Da es sich bei den Hormonen RAAS um stressinduzierbare Hormone handelt, wurden die Mäuse auf den Vorgang der CO₂-Narkose präkonditioniert, um während der Blutentnahme so stressfrei wie möglich zu sein. Andernfalls würden die ermittelten Werte nicht die physiologischen Gegebenheiten unter Ruhe widerspiegeln. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse 9 Tage vor der retrobulbären Blutentnahme mit Druckluftbegasung an den Narkosevorgang gewöhnt, um am zehnten Tag schließlich mit einem Gasgemisch aus 80 % CO₂ und 20 % O₂ in Narkose versetzt zu werden. Für dieses Training wurden die Mäuse bereits eine Woche vor Trainingsbeginn in einen speziell für diesen Versuch vorgesehenen Maushaltungsraum umgesetzt, um sich zu akklimatisieren. Der Raum wurde zuvor desinfiziert und war während der Trainingszeit von insgesamt zehn Tagen ausschließlich für die Rag-1 -/- KO Mäuse und deren Kontrollgruppe vorgesehen. Wie auch in der Zeit vor dem Training verbrachten die Männchen die 10 Tage in diesem Raum in Einzelhaltung unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur 21°C, Luftfeuchtigkeit 49 %). Es wurde stets mit sterilen Handschuhen, Mundschutz und sterilem Kittel gearbeitet. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde umgestellt und an den menschlichen Biorhythmus angepasst, sodass das Training vormittags stattfinden konnte. Eine Zeitschaltuhr regulierte die Hell- und Dunkelperioden. Zwischen 11:00 bis 23:00 währte die Dunkelphase (Aktivphase), zwischen 23:00 und 11:00 dauerte die Hellphase (Ruhephase). Da die Hormone des RAAS in ihrer Plasmakonzentration einer circadianen Rhythmik unterliegen, musste die Blutentnahme zu einem Zeitpunkt der höchsten Hormonausschüttung im Blut der Tiere erfolgen. Dieser

²⁸ Betaisodona®, Mundipharma, Deutschland.

²⁹ Mersilene 5.0 Nahtmaterial, Ethicon, USA.

Zeitpunkt liegt kurz vor dem Übergang von der Ruhephase in die Aktivphase (Nikolaeva et al. 2012), in dieser Arbeit folglich bei 10:00. Vor diesem Hintergrund wurde der Zeitpunkt für das Training auf 09:30 Uhr festgelegt, was etwa einer guten Stunde vor dem Übergang der Tiere von einem inaktiven (Raum = hell) in einen aktiven (Raum = dunkel) Zustand entsprach. Mit diesem Sicherheitsfenster von einer Stunde (zu berücksichtigen war die Zeitspanne zwischen Eintritt der Narkose und Blutentnahme bei mehreren Tieren) konnte die retrobulbäre Blutentnahme zu einem Zeitpunkt der höchsten Hormonkonzentration des RAAS erfolgen. Während der gesamten Versuchszeit erhielten die Versuchstiere ausschließlich Spezialdiätfutter von Altromin®. ATII wurde nicht verabreicht, da exogen zugeführtes ATII das systemische RAAS supprimiert und somit die Messergebnisse verzerrt hätte.

Narkosetraining der Versuchstiere

Für das Training wurden täglich ca. 1 h vor dem Beginn der Dunkelphase 8 L Druckluft innerhalb von 30 s in den Käfig der Mäuse eingeleitet. Hierfür mussten die Druckluftflasche und die Flasche mit dem CO₂/ O₂ Gemisch vor ihrer Nutzung auf einen Luftstrom von 4 L pro 15 s geeicht werden. Hierfür ließ man für 15 s Luft in einen mit Wasser befüllten Plastikeimer (max. Volumen 5 L), der sich mit der Öffnung nach unten zeigend in einem größeren Wassereimer (max. Volumen 10 L) befand, einströmen. Mithilfe des Druckminderers an den Flaschen ließ sich der gewünschte Druck bzw. die benötigte Geschwindigkeit, mit der die Luft in den Käfig strömen sollte, justieren. Hatte man die richtige Einstellung gefunden, wurde die gewünschte Position am Druckminderer mit einem Stift markiert. Für die kurze Zeit, in der die Druckluft in die Käfige der Mäuse einströmte, wurde der Filterdeckel der Käfige gegen den Plexiglasdeckel, der über einen Schlauch mit der Druckluftflasche verbunden war, ausgetauscht. Am zehnten Tag wurde schließlich statt Druckluft das Narkosegas (80 % CO₂ und 20 % O₂) für 30-45 s in die Käfige eingeleitet, bis die jeweilige Maus tief schlief. Anschließend wurde die Maus so schnell wie möglich in Narkose mit einem 4 %igen Isofluran – Luft - Gemisch überführt, die Narkosetiefe mit dem Zehenkneifreflex überprüft. Abschließend erfolgte die retrobulbäre Blutentnahme unter Stressfreiheit.

Plasmagewinnung, Retrobulbäre Blutentnahme

Die retrobulbäre Blutentnahme erfolgte durch die wissenschaftliche Mitarbeiterin und stellvertretende Leiterin dieses Projekts Frau Dr. med. Anika Seniuk, Fachärztin für Physiologie (IZIP, UKE Hamburg). Assistierende Tätigkeiten, sowie die postmortale Nephrektomie erfolgten durch mich.

Für die Hormonanalyse wurde ein Plasmavolumen von mehr als 200 µl benötigt. Dieser Blutverlust war nicht mehr mit dem Leben der Mäuse vereinbar, sodass sie nach dem Ausbluten unter fortwährender Narkose ohne zwischenzeitliches Erwachen mittels zervikaler

Dislokation getötet wurden und für weitere Organentnahmen zur Verfügung standen. Das Blut für die Bestimmung der PRA wurde bei der retrobulbären Blutentnahme in Mikro-Hämatokritkapillaren³⁰ abgeleitet. Diese wurden zuvor mit 5 µl 0,3M Na⁺-EDTA befüllt, um eine vorzeitige Blutgerinnung zu verhindern. Die blutfreie Seite der Kapillarröhrchen wurde anschließend mit Wachs aus dem Hämatokrit-Versiegelungskitt³¹ verschlossen. Nachdem das Blut von allen Versuchstieren entnommen worden war, wurde es in den Hämatokritkapillaren mit der HÄMATOKRIT200®-Zentrifuge³² (16.060 x g, 5 min) zentrifugiert. Der Plasma-Überstand wurde in Eppendorf® Tubes³³ pipettiert und bei -20 °C Kühlschranks temperatur aufbewahrt. Das Blut für die Bestimmung der Plasmaaldosteronkonzentration wurde bei der retrobulbären Blutentnahme in ein Lithium-Heparin Mikro-Probengefäß 1,3 ml³⁴ gefüllt. Bis die Blutproben von allen Mäusen entnommen worden waren, wurden die Mikro-Probengefäße auf Eis gelagert und schließlich mit der Eppendorf® Zentrifuge 5417R (2.000 x g, 10 min, 4 °C) zentrifugiert. Schließlich wurden 200 µl des Plasma-Überstands ebenfalls in Eppendorf® Tubes pipettiert und bei -20 °C aufbewahrt. Da in dieser Arbeit zusätzlich zur PRA die quantitative Bestimmung der renalen Renin mRNA durchgeführt werden sollte, wurden die Versuchstiere nach der zervikalen Dislokation beidseitig nephrektomiert und aus dem Nierengewebe die Menge an Renin mRNA bestimmt.

Ermittlung der Plasma-Aldosteronkonzentration und Plasma-Reninaktivität

Die Bestimmungen der Plasma-Aldosteronkonzentration und der PRA erfolgten jeweils mithilfe eines Radioimmunoassays (RIA) und wurden von der Medizinisch Technischen Angestellten Frau Telse Kock (†) aus dem IZIP am UKE Hamburg vorgenommen. Die Methode wurde von R. Yalow und S. Berson entwickelt und 1960 erstmals publiziert (Yalow & Berson 1960). Das Prinzip des Radioimmunoassays basiert auf einer kompetitiven Antigen-Antikörper-Reaktion zur quantitativen Bestimmung eines Substrates. Eine radioaktiv markierte Substanz, deren Konzentration genau bekannt ist³⁵, konkurriert mit der entsprechenden Substanz aus der zu untersuchenden Probe³⁶, deren Konzentration ermittelt werden soll, um eine definierte Antikörpermenge³⁷. Das radioaktiv markierte Antigen wird durch das Antigen aus der Probe kompetitiv verdrängt. Je höher folglich die Konzentration der Substanz aus der zu untersuchenden Probe ist, desto weniger Bindungen kommen zwischen radioaktiv markierter Substanz und Antikörper zustande. Die Konzentration der Substanz in der Probe wird schließlich anhand einer Eichkurve nach Entfernung der

³⁰ Brand®, Wertheim, Deutschland.

³¹ Ebd.

³² Hettich LAB Technology, Tuttlingen, Deutschland.

³³ Eppendorf Instrumente GmbH, Hamburg, Deutschland.

³⁴ Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland.

³⁵ Yalow und Berson: bovines Insulin – I¹³¹.

³⁶ Yalow und Berson: humanes Insulin.

³⁷ Yalow und Berson: Antikörper gegen bovines Insulin, gewonnen aus Meerschweinenserum.

ungebundenen Antigene bestimmt³⁸. Basierend auf dieser Methode erfolgte auch die Messung der Plasmaaldosteronkonzentration mit dem Immunotech® RIA kit von Beckman Coulter, Inc., Deutschland. Die Bestimmung der PRA erfolgte über die pro Milliliter und pro Stunde aus Angiotensinogen gebildete Angiotensin I-Menge (Einheit: ng Ang I / ml / h). Die PRA ist sowohl von der Angiotensinogen-Konzentration, als auch von der Renin-Konzentration im Plasma abhängig. Eine Möglichkeit, die PRA *unabhängig* von Schwankungen der endogenen Angiotensinogen-Konzentration zu messen, ist, exogenes Angiotensinogen zu der Probe hinzuzufügen (Campbell et al. 2009). Das exogene Angiotensinogen wurde für dieses Projekt aus zuvor bilateral nephrektomierten männlichen Ratten (*Rattus norvegicus*) in dem derzeit gängigen Bestimmungsverfahren in ausreichender Menge gewonnen. Ratten eigneten sich gut, weil das Angiotensinogen der Ratte zu 99,5 % homolog zu dem der Maus ist (Kent et al. 2005). Aufgrund des höheren Plasmavolumens der Ratten konnte auf diese Weise die Anzahl der benötigten Versuchstiere minimiert werden. Das Maus-Plasma wurde schließlich zu dem Ratten-Angiotensinogen zugegeben und für 90 min bei 37 °C und einem pH von 6 inkubiert. Die Messung des gebildeten Angiotensin I erfolgte schließlich mit dem RIA kit von Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA.

Quantitative Bestimmung der renalen Renin mRNA

In dieser Arbeit erfolgte ergänzend zur Bestimmung der PRA die quantitative Bestimmung der von den Nieren exprimierten Renin mRNA durch die fluoreszenzbasierte, quantitative Echtzeit RT-qPCR (engl. *quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) mithilfe des LightCycler® 1.2 Geräts³⁹ unter Verwendung des QuantiTect SYBR® Green PCR kit⁴⁰. Die RT-PCR ist eine Methode zum Nachweis von RNA, indem die reverse Transkription und die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) aneinander gekoppelt werden. An einem Primer, der an den Startpunkt auf der mRNA bindet, erstellt die reverse Transkriptase schließlich einen DNA-Einzelstrang, der komplementär zur mRNA ist. An die auf diese Weise entstandene cDNA (engl. *complementary*) lagert sich ein weiterer Primer an und synthetisiert den zweiten DNA-Strang, der identisch zur mRNA Sequenz ist. Folgende Primer sind eingesetzt worden:

³⁸ Yalow und Berson: Quotient B / F aus gebundenem (*bound*) Insulin I¹³¹ und ungebundenem (*free*) Insulin I¹³¹ wurde als Funktion der Konzentration des zugegebenen Humaninsulins aufgetragen.

³⁹ Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz.

⁴⁰ Qiagen, Hilden, Deutschland.

| Primer | <i>Sense</i> (Komplementär-Strang) | <i>Antisense</i> (codogener Strang) |
|--------|--|--|
| Renin | 5'-CGG GAT CCG TGC AGC CGC CTC TAC CTT GCT TGT-3' | 5'-GGA ATT CGC AGC TCG GTG ACC TCT CCA AAG-3' |
| Rpl32 | 5'-GCA AGT TCC TGG TCC ACA ATG TCA-3' | 5'-ACT CAT TTT CTT CGC TGC GTA GCC-3' |

Tabelle 3-4: *Sense*- und *Antisense* Codierung der Primer für die PCR zur quantitativen Bestimmung der renalen Renin mRNA

Im Anschluss an die RT-qPCR können die DNA-Fragmente mithilfe der PCR Reaktion amplifiziert werden. Vor Durchführung der RT-qPCR wurde die mRNA aus den bei -80 °C eingefrorenen Nieren entsprechend den Beschreibungen von Chomczynski und Sacchi isoliert (Chomczynski & Sacchi 1987). Die Menge der gewonnenen Renin mRNA [$\mu\text{g/ml}$] ist insofern ein Korrelat für die Aktivierung des RAAS, als unter Hochsalzdiät (supprimiertes RAAS) weniger Renin mRNA von den Nieren exprimiert wird, als unter Niedrigsalzdiät (hochreguliertes RAAS). Um sicherzustellen, dass aus den Proben gleich viel mRNA isoliert worden ist, wurde die Menge des Renin-Transkripts gegen die mRNA Menge des ribosomalen Proteins L32 (rpL32) normalisiert. RpL32 ist ein häufig genutztes *Housekeeping* Gen bzw. Referenzgen (Thellin et al. 1999). Als Protein der Ribosomen wird es *unabhängig* von äußeren Bedingungen und somit *unabhängig* von der Salzzufuhr konstant in den Nieren exprimiert. Ist die Menge der rpl32 mRNA in allen Proben gleich, gilt dies als Bestätigung dafür, dass aus allen Proben gleich viel mRNA extrahiert worden ist und unterschiedliche Mengen an Renin mRNA auf die unterschiedlichen Salzdiäten zurückzuführen sind. Zu betonen ist, dass die PRA und die Menge der exprimierten Renin mRNA in einem eindeutigen Missverhältnis stehen. Die Höhe des Renin mRNA-Anstiegs unter Niedrigsalzdiät ist nicht zwangsläufig identisch mit der PRA unter Niedrigsalzdiät (Lübke-meier et al. 2011). Die quantitative Renin mRNA Bestimmung kann jedoch als grundsätzliche Orientierung um zum Vergleich mit den Ergebnissen der PRA dienen.

3.7.2. Bestimmung des Wasser- und Elektrolythaushalts und der Kreatinin-Clearance

Für diesen Versuch wurden die Mäuse in spezielle Käfige, so genannte Stoffwechselkäfige (metabolische Käfige) von Tecniplast®, Deutschland umgesetzt. Der Aufenthalt in den metabolischen Käfigen belief sich auf die letzten 96 h (= die letzten vier Tage) der insgesamt 28 Tage unter Spezialdiät. Der Versuch begann jeweils montags und endete freitags.



Abbildung 3-6: Stoffwechselkäfig für einzelne Mäuse, *Copyright Tecniplast® Group, innovation through passion™ (2014)*, Produkte, Analysis / Stoffwechselkäfige, Stoffwechselkäfige für einzelne Mäuse [Online im Internet] URL: <http://www.tecniplast.it/de/product/metabolic-cage-for-single-mouse.html> [Stand: 18.09.2016].

Aufgrund der speziellen Futtermittellieferung der metabolischen Käfige musste die Spezialdiät als krümelreies Mehlfutter von Altromin® in derselben Zusammensetzung wie das zuvor verwendete Pelletfutter verabreicht werden. Für die Umstellung hinsichtlich der Futterdarreichung wurde den Mäusen am Wochenende vor dem Versuchsbeginn die spezielle Futterraufe mit dem Mehlfutter in die normalen Käfige gestellt. Auf diese Weise konnten sich die Mäuse an die neue Form der Futtermittellieferung gewöhnen, sodass ein übermäßiger Gewichtsverlust nach Umsetzung in die metabolischen Käfige aufgrund einer Nahrungsverweigerung bei neuer Futterraufe und Futterkonsistenz vermieden werden konnte. Nach dem Wochenende wurden die Versuchstiere schließlich am Montag (Tag eins von vier) in die metabolischen Käfige umgesetzt. Die Käfige standen in einem speziell für diesen Versuch vorgesehenen Maushaltungsraum unter Standardbedingungen. Die Männchen blieben für diesen Versuch weiterhin in Einzelhaltung. Der Raum war für die Zeit des Versuchs nur für die Rag-1 ^{-/-} KO Mäuse und deren Kontrollgruppe reserviert. Er wurde zuvor desinfiziert. Es wurde stets mit sterilem Kittel, Handschuhen und Mundschutz gearbeitet. Durch die Architektur der Metabolischen Käfige wurden Exkremate wie Urin und Kot durch spezielle Gitterböden, auf denen sich die Mäuse permanent befanden, getrennt voneinander in dafür vorgesehene Behältnisse abgeleitet. Alle 24 h wurden die Urin- und Kotbehälter gewogen und entleert. Ebenfalls wurden alle 24 h der Gewichtsverlauf und die Futter-, sowie Trinkmenge dokumentiert. Für die finale Analyse des Urins wurde der 24 h-Sammelurin des vierten Tages im Stoffwechselkäfig benutzt. Es konnte davon ausgegangen werden, dass sich die Mäuse zu diesem Zeitpunkt bereits an die speziellen Käfige und an das spezielle krümelreie Mehlfutter adaptiert hatten und sich im *steady state* befanden. So wurde sichergestellt, dass die Werte kein verzerrtes Abbild von Schwankungen im Ess- und Trinkverhalten, sowie im Wasser- und Elektrolythaushalt im Rahmen der Umstellung und Gewöhnung an die neuen Käfige wiedergaben.

Bestimmung der Elektrolyt- und Kreatininkonzentration im Urin

Aus dem gewonnenen 24 h-Sammelurin des vierten Tages im metabolischen Käfig wurden folgende Parameter bestimmt:

- Urinmenge in *g* und Urinvolumen in *ml*
- Urindichte in *g/ml*
- Elektrolytkonzentration im Urin in *mmol/L*
- Mit dem Urin ausgeschiedene Menge der Elektrolyte Na^+ , K^+ , Cl^-
- Mit der Spezialdiät aufgenommene Menge der Elektrolyte

Urinmenge und Urindichte

Die Differenz von dem Gewicht der vollen Behälter und ihren Leergewichten gab Aufschluss über die ausgeschiedene Urinmenge in *g* pro Tag. Die Urindichte wurde mithilfe eines Hand-Refraktometers⁴¹ gemessen. Anhand einer scharfen Trennungslinie (durch das Okular sichtbar) konnte die optische Dichte der jeweiligen Urinprobe auf der Skala, die von 1.000 mg/ml bis 1.050 mg/ml reichte, abgelesen werden. Die Messung mit dem Refraktometer erfolgte bei einer Raumtemperatur von 21°C. Die Urinproben der unterschiedlichen Salzdiäten unterschieden sich insofern in ihrer optischen Dichte, als der Urin unter Hochsalzdiät weniger konzentriert und unter Niedrigsalzdiät stark konzentriert war. Um im Referenzbereich der Skala zu bleiben mussten die Urinproben der Versuchstiere entsprechend verdünnt werden⁴². Durch Division der Urinmenge in *g* und der Urindichte in *g/ml* erhielt man das Urinvolumen in *ml*, das innerhalb von 24 h ausgeschieden worden war.

Elektrolytkonzentration im Urin

Vor der potentiometrischen Elektrolytbestimmung im Urin durch das Analysegerät Spotchem EL SE-1520⁴³ mussten die Urinproben der unterschiedlichen Salzdiäten entsprechend verdünnt werden, um im Referenzbereich des Analysegeräts für die jeweiligen Elektrolyte zu bleiben⁴⁴. Die Urinkonzentrationen der Elektrolyte Natrium (Na^+), Chlorid (Cl^-) und Kalium (K^+) wurden nach der Verdünnung schließlich mithilfe des Analysegeräts Spotchem EL SE-1520 ermittelt. Die jeweilige Urinprobe wurde hierfür nebst einer Referenzlösung mittels Pipette auf Elektrolyt-Messplättchen appliziert. Die Messplättchen besaßen jeweils drei Paar ionenselektive Minielektroden. Insgesamt war ein Probenvolumen von 22 μl notwendig. Nachdem die Probe auf die Messplättchen pipettiert worden war, begann die automatische

⁴¹ NeoLab®, Heidelberg, Deutschland.

⁴² Für die Niedrigsalz- und Kontrollsalzdiätgruppe wurde eine 1:2 Verdünnung gewählt. Lag die Urindichte anschließend weiterhin außerhalb des Referenzbereiches, wurde eine 1:4 Verdünnung vorgenommen. Die Urinproben der Tiere, denen Hochsalzdiät verabreicht wurde, konnten unverdünnt auf das Messprisma des Refraktometers aufgetragen werden.

⁴³ Axon Lab®, Hauptsitz Schweiz.

⁴⁴ Referenzbereiche für Urinproben (1:1 Verdünnung mit destilliertem Wasser): Na^+ : 10-350 mmol/L, K^+ : 1-80 mmol/L, Cl^- : 3-300 mmol/L.

Messung. Das Gerät druckte nach einer Messzeit von einer Minute einen Papierstreifen mit den Elektrolytwerten der Probe in mmol/L aus.

Mit dem Urin ausgeschiedene Elektrolytmenge

Mithilfe der ermittelten/berechneten Urinmenge in *g*, Urindichte in *g/ml*, der Elektrolytkonzentration im Urin in *mmol/L*, sowie der Molekulargewichte der drei Elektrolyte in *g/mol* konnte schließlich die ausgeschiedene Menge der Elektrolyte an Tag vier in *mg* mithilfe einer MS Excel Tabelle berechnet werden. Hierfür wurde die Elektrolytkonzentration im Urin in *mg/L* (vorher Umrechnung von *mmol/L* in *mg/L*) mit der Urinmenge in *L/24 h* (vorher Umrechnung von *ml/24 h* in *L/24 h*) multipliziert

Mit der Spezialdiät aufgenommene Elektrolytmenge

Die Differenz zwischen dem Gewicht der frisch befüllten Futterraufen und ihrer Gewichte nach 24 h, abzüglich der Futterkrümel, die während des Fressens in den Kotbehälter fielen, gab Aufschluss über die pro Tag aufgenommene Mehlfuttermenge in *g*. In Kombination mit den Kenntnissen über die Elektrolytkonzentrationen in den Salzdiäten⁴⁵ konnten so die aufgenommenen Elektrolytmengen in *mg* mithilfe einer Excel Tabelle berechnet werden. Hierfür wurde die bekannte Elektrolytkonzentration in der Salzdiät in *g/kg* mit der Menge des gefressenen Mehlfeeders aus der Raufe in *kg* multipliziert. Letzteres ergibt sich aus der Differenz zwischen dem Gewicht der frisch befüllten Futterraufe und ihres Gewichts nach 24 h, abzüglich des Gewichts der Futterkrümel, die beim Fressen in den Kotbehälter fielen und nicht gefressen worden sind.

Messung der Kreatininkonzentration im Urin

Da die Kreatinin-Konzentrationen im Urin und Plasma der Maus außerhalb der Messbereiche der in den Laboren des UKE genutzten Geräte liegen, wurde die Kreatininkonzentration durch die Firma LABOKLIN GmbH und Co. KG⁴⁶ durchgeführt. Hierfür wurden die Urin- und Plasmaproben, die nach Gewinnung im Kühlschrank bei -5 °C gelagert worden sind, zentrifugiert. Der Überstand (mind. 120 µl) wurde anschließend in Eppendorf® Tubes pipettiert. Die Eppendorf® Tubes sind daraufhin gekühlt verschickt worden.

Messung der Elektrolyt- und Kreatininkonzentration im Plasma

Um die Ergebnisse zu komplettieren und um die Kreatinin-Clearance zu berechnen, erfolgte nach Ablauf der 96 h neben der Gewinnung des 24 h-Sammelurins vom vierten Tag eine retrobulbäre Blutentnahme zur Plasmagewinnung. Die Blutentnahme erfolgte unter 4 %iger Isofluran-Narkose. Für die Analyse wurde ein Plasmavolumen von mind. 200 µl benötigt,

⁴⁵ Niedrigsalzdiät: Na⁺: 0,2 g/kg, K⁺: 7,088 g/kg, Cl⁻: 0,223 g/kg, Kontrollsalzdiät: Na⁺: 3 g/kg, K⁺: 7,088 g/kg, Cl⁻: 4,550383, Hochsalzdiät: Na⁺: 30 g/kg, K⁺: 7,085 g/kg, Cl⁻: 46,277 g/kg.

⁴⁶ Bad Kissingen, Deutschland.

sodass die Tiere nach dem Ausbluten unter fortwährender Narkose mittels zervikaler Dislokation getötet wurden. Aus dem Plasma wurden folgende Parameter bestimmt:

- Plasma-Elektrolytkonzentration
- Plasma-Kreatininkonzentration

Plasma-Elektrolytkonzentration

Die Bestimmung der Plasma-Elektrolytkonzentration erfolgte, ebenso wie die Messung der Urin-Elektrolytkonzentration, mithilfe des Spotchem EL SE-1520⁴⁷. Die Plasmaproben konnten hierfür unverdünnt mit der Referenzlösung auf die Messplättchen pipettiert werden. Zudem dienten die auf diese Weise bestimmten Plasma-Elektrolytkonzentrationen in *mmol/L* als Vergleich zu den mittels Blutgasanalyse gemessenen Elektrolytkonzentrationen im Plasma.

Plasma-Kreatininkonzentration

Die Messung der Kreatininkonzentration im Plasma erfolgte, ebenso wie die Bestimmung der Kreatininkonzentration im Urin durch die Firma LABOKLIN GmbH und Co. KG. Wie auch die Urinproben wurden die Plasmaproben hierfür gekühlt verschickt.

Berechnung der Kreatinin-Clearance aus den Plasma- und Urinparametern

Mithilfe der Kenntnisse über die Elektrolyt- und Kreatininkonzentration im Urin konnten schließlich durch die Bestimmung der Plasma-Elektrolyt- und Kreatininkonzentration 1. die Kreatinin-Clearance (\approx GFR) sowie 2. die freie Elektrolyt-Exkretion (FE) mithilfe folgender Formeln berechnet werden:

$$1. \text{ Kreatinin-Clearance (ml/24 h)} = \text{Harnzeitvolumen (ml/24 h)} \times \frac{\text{Kreatinin-Urinkonzentration } (\mu\text{mol/L})}{\text{Kreatinin-Plasmakonzentration } (\mu\text{mol/L})}$$

Anschließend wurde das Ergebnis für die Kreatinin-Clearance in *ml/min* umgerechnet.

$$2. \text{ FE} = \frac{\text{Na-Urinkonzentration (mmol/L)} \times \text{Krea-Plasmakonzentration } (\mu\text{mol/L})}{\text{Na-Plasmakonzentration (mmol/L)} \times \text{Krea-Urinkonzentration } (\mu\text{mol/L})} \times 100$$

Für die aufgeführten Berechnungen wurden die Plasma-Elektrolytkonzentrationen verwendet, die mit dem Spotchem EL-SE 1520 gemessen wurden, da mit derselben Methode auch die Urin-Elektrolytkonzentrationen worden sind. Demnach fließen die Daten der Plasma-Elektrolytkonzentrationen, die mithilfe der Blutgasanalyse erhoben wurden, nicht mit in die Rechnung ein.

⁴⁷ Axon Lab® AG, Hauptsitz Schweiz.

3.8. Organentnahme und Genotypisierung

Nach Beendigung der Experimente an der lebenden Maus erfolgte die Organentnahme als finaler Versuch. Hierfür wurden die Versuchstiere zunächst in hochdosierte Isoflurannarkose gelegt und bei entsprechender Narkosetiefe mittels zervikaler Dislokation getötet. Im Anschluss daran wurden die Mäuse auf einer Korkplatte auf den Rücken gelagert. Die Extremitäten wurden gestreckt und mittels Tesakrepp® auf der Korkplatte fixiert. Schließlich erfolgte die Entnahme und Untersuchung folgender Organe:

- Aorta, zur Untersuchung der vaskulären Endorganschädigung nach funktionellen (isometrische Tonusmessungen *in vitro*, Organbad) und morphologischen (histologische Begutachtung der Mediahypertrophie) Aspekten
- Herz, zur Untersuchung der kardialen Endorganschädigung mittels histologischer Begutachtung des Fibrosegrades und rechnerischer Ermittlung des Ausmaßes der Herzhypertrophie
- Nieren, zur Gewinnung von Renin mRNA
- Milzgewicht
- Ohrbiopsie, zur wiederholten Genotypisierung
- Tibialängenmessung nach Tibia-Amputation zur rechnerischen Quantifizierung der Herzhypertrophie

3.8.1. Aorta, Entnahme

Mit einem Medianschnitt wurden Thorax und Abdomen eröffnet. Um in das hintere Mediastinum zu gelangen, wurde der Brustkorb entlang des Sternums aufgeschnitten und die Lunge vorsichtig beiseitegeschoben. Die *Pars descendens* der Aorta wurde sodann kurz vor dem Übergang der *Aorta thoracica* in die *Aorta abdominalis* am kranialen Zwerchfell mittels einer scharfen chirurgischen Schere abgesetzt. Mit einer weiteren chirurgischen Schere, die eine nach oben gebogene Schneide besaß, wurde die *Aorta thoracica* nun entlang der Wirbelsäule unter großzügiger Mitnahme des umliegenden perivaskulären Fett- und Bindegewebes unter Vermeidung von Zug freipräpariert. Kurz nach dem Abgang aus dem linken Ventrikel wurde schließlich die *Pars ascendens* der Aorta abgesetzt.

3.8.2. Herz, Entnahme

Das Herz wurde aus seinem *Situs* im mittleren Mediastinum mit einer scharfen chirurgischen Schere herausgeschnitten, in kalte NaCl-Lsg. überführt und ausgespült. Im Anschluss daran wurden beide Vorhöfe mitsamt den *Venae cavae* und *Venae Pulmonales* unter mikroskopischer Sicht von den Ventrikeln abgetrennt. Dies führte die stellvertretende Leiterin des Projekts Fr. Dr. med. Anika Seniuk, Fachärztin für Physiologie (IZIP, UKE), durch. Das

Gewicht der verbleibenden zwei leeren Ventrikel wurde sodann mittels einer Feinwaage⁴⁸ bestimmt. Schließlich wurde das Herz für die folgende histologische Untersuchung in phosphatgepufferte Formalinlösung⁴⁹ in Eppendorf® Tubes eingelegt.

3.8.3. Niere, Entnahme

Nach Tötung der Versuchstiere im Anschluss an den finalen Versuch wurden die Nieren mittels vorsichtiger Exenteration im Retroperitonealraum mithilfe zweier anatomischer Pinzetten freigelegt. Zügig erfolgte die beidseitige Nephrektomie unter Mitnahme des perirenal Fettgewebes mittels einer scharfen chirurgischen Schere mit gebogener Schneide. Um die postmortale Autolyse des Nierengewebes deutlich zu verzögern wurden beide Nieren auf eine Petrischale, die wiederum auf Eis gelagert wurde, gelegt. Dadurch gewann man Zeit, um die Nieren nacheinander mit einer scharfen Einmalklinge aus ihrer Gerota-Faszie durch vorsichtiges Einschneiden des äußeren Nierenrandes zu schälen. Anschließend wurde von jedem Tier jeweils 1 Niere in flüssigem Stickstoff bei -80 °C eingefroren und 1 Niere in Eppendorf® Tubes in Roti®-Histofix 4 % Formalinlösung eingelegt. Aus den in Stickstoff eingefrorenen Nieren wurde schließlich die Renin mRNA gewonnen und mittels RT-qPCR quantifiziert. Letzteres erfolgte durch die Medizinisch Technische Angestellte Frau Telse Kock (+) aus dem IZIP am UKE Hamburg.

3.8.4. Milz

Die Milz wurde nach beidseitiger Nephrektomie mittels zweier anatomischer Pinzetten aufgesucht, mit einer scharfen Schere am Hilus abgesetzt und mit der ISO9001 Feinwaage gewogen.

3.8.5. Tibia-Längenmessung

Zur Unterschenkelamputation wurde zunächst der Gelenkspalt des *Articulatio femorotibialis* ertastet und an diesem Punkt eine große, scharfe Schere angesetzt. Es erfolgte die Absetzung der Tibia. In Neutral-Null-Stellung wurde sodann der Gelenkspalt des *Articulatio talocruralis* unter der Achillessehne getastet und dort mit derselben Schere der Fuß von der Tibia abgetrennt. Die Länge des verbleibenden Unterschenkels (Tibia und Fibula) wurde mit dem Taschenmessschieber (150 mm, Horex 2226516 DIN 862) ausgemessen, in dem die Tibia zwischen dem Tibiaplateau und der Malleolengabel eingespannt wurde.

3.8.6. Genotypisierung

Zur direkten Verifizierung der Genotypen erfolgte nach den finalen Versuchen im Rahmen der Organentnahme die erneute Genotypisierung der Versuchstiere. Das Genom der Mäuse

⁴⁸ ISO 9001, Sartorius, Deutschland.

⁴⁹ Roti®-Histofix 4 %, Carl Roth, Deutschland.

wurde dazu auf das Rag1^{tm1Mom} Allel hin untersucht. Hierfür erfolgte eine Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) mit anschließender Agarosegelelektrophorese durch die Medizinisch Technische Assistentin Frau Telse Kock (†) in den Laboren des IZIP am UKE. Hierfür wurde den Mäusen *postmortem* mithilfe einer scharfen Schere eine Probe aus ihrem Ohr entnommen. Anschließend wurde das Gewebe in ein Reagenz, das DirectPCR®-Ear (Peqlab, Deutschland), überführt und bis zu 16 Stunden lysiert. Laut Hersteller ermöglicht dieses Reagenz, das gewonnene Lysat ohne zeitintensive DNA-Isolation nach kurzer Hitzebehandlung direkt in die PCR-Reaktion zu überführen. Die im Reagenz enthaltene Proteinase K setzt durch den Abbau von Proteinen Nukleinsäuren frei. Im Anschluss an die Lyse erfolgte die Inkubation der Lysate bei 85 °C für insgesamt 45 min. Durch die Inkubation bei 85 °C wurde die Proteinase K vollständig inaktiviert. Nach kurzem Zentrifugieren für ca. zehn Sekunden wurde der Überstand zur Genotypisierung in die PCR Reaktion und anschließend in die Agarosegelelektrophorese überführt.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur Vervielfältigung von bestimmten DNA-Sequenzen, wie z.B. dem Rag1^{tm1Mom} Allel. Sie umfasst bis zu 40 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten, die jeweils bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen, besteht. Zunächst wird die DNA bei 95 °C in ihre Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung).

| Primase | Sequenz | Primasetyp |
|---------|-----------------------------------|------------------|
| IME1746 | 5' GAG GTT CCG CTA CGA CTC TG 3' | Wildtyp vorwärts |
| IMR3104 | 5' CCG GAC AAG TTT TTC ATC GT 3' | Wildtyp / Mutant |
| IMR8162 | 5' TGG ATG TGG AAT GTG TGC GAG 3' | Mutant rückwärts |

Tabelle 3-5: Sequenzen der verwendeten Primasen für die PCR zur Genotypisierung.

In einem nächsten Schritt erfolgt bei 40-70 °C die Bindung der oben genannten Primasen, die für den zu untersuchenden DNA-Abschnitt spezifisch sind, an die Einzelstränge (Hybridisierung). Schließlich werden die Primer an ihrem freien 3' OH-Ende durch die thermostabile Taq-Polymerase unter Verwendung der DNA-Basen verlängert (DNA-Synthese). Am Ende eines Zyklus sind neue DNA-Doppelstränge entstanden, mit denen das Prozedere in einem sich anschließenden Zyklus wiederholt wird. Die während der PCR Reaktion entstandenen DNA-Stränge sind, je nach Genotyp, unterschiedlich lang; je nachdem, ob sie das Rag1^{tm1Mom} Allel besitzen oder nicht. Der Nachweis der amplifizierten DNA erfolgt schließlich durch die Gelelektrophorese (Rassow et al. 2008).

Gel-Elektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren, das der Auftrennung von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten nach ihrer Ladung und Größe dient (Rassow et al. 2008). Da die

Laufgeschwindigkeit der Fragmente innerhalb des angelegten Spannungsfeldes von 110 V umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist, trennten sich die zu untersuchenden, unterschiedlich langen DNA-Abschnitte innerhalb von 45 min in Banden auf. Die Banden mit ähnlicher Größe befinden sich in dem Agarosegelee dementsprechend auf derselben Höhe. Im Anschluss an die Auftrennung der DNA-Abschnitte dienten 6 µl/100 ml Ethidiumbromid von Sigma Aldrich, USA als Färbemittel für die unterschiedlich langen Banden, die dadurch mithilfe von UV-Licht in einem Wellenlängenbereich von 254 nm sichtbar gemacht werden konnten. Das entstandene Bild wurde mit einer CCD-Kamera⁵⁰ zu Dokumentationszwecken abfotografiert. Ein bekannter Abschnitt des Rag1-Allels diente schließlich für den Vergleich der Bandenlängen beider Genotypen als Positivkontrolle.

3. 9. Endorganschädigung

3.9.1. Histologische Untersuchungen

Aorta

Die entnommene Aorta eines jeden Tieres wurde ohne Zeitverzug in separate Reagenzgläser in Krebs–Henseleit–Puffer überführt und bis zur isometrischen Tonusmessung im Organbad auf Eis gelagert. Im Anschluss an das Organbad wurden die Aorten in einer phosphatgepufferten Formalinlösung (Roti®-Histofix 4 %, Carl Roth, Deutschland) in Eppendorf® Tubes für die weitere histologische Untersuchung eingelegt.

| Puffer Lösung | Puffer-Zusammensetzung für 5 L Puffervolumen |
|------------------------|--|
| Krebs-Henseleit-Puffer | 0,1 M NaCl, 5 mM KCl, 2,5 mM CaCl ₂ , 1 mM MgSO ₄ , 25 mM NaHCO ₃ , 1 mM KH ₂ PO ₄ , 11 mM 7-D-Glukose, 10 µM Indomethacin + 5 Tropfen NaCl, pH-Wert mit HCl auf pH 7,35 einstellen |

Tabelle 3-6: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers.

Für die Färbung der *Aorta thoracica* wurde die Elastica-van-Giesson (E.V.G.) Färbung, welche elastische Fasern schwarz anfärbt, gewählt. Die Media der Mauseorten ist reich an elastischen Fasern und wird von der *Lamina elastica interna* bzw. *Lamina elastica externa* zur Intima bzw. zur Adventitia hin abgegrenzt. Zur Quantifizierung der ATII induzierten Mediahypertrophie wurden die Aorten zunächst mit einer im Mikroskop⁵¹ integrierten Kamera⁵² digitalisiert. Die Längeneichung in der Kamerasoftware erfolgte mit der Neubauerkammer als Eichobjektträger. Schließlich wurden die *Laminae elasticae interna*

⁵⁰ Engl. **C**harge **c**oupled **d**evice, ladungsgekoppelte Funktionsweise.

⁵¹ Leica, Deutschland.

⁵² Ebd.

und *externa* nacheinander mit der Computermaus manuell umfahren. Die endgültige Mediafläche in [cm²], die sich aus der Differenz zwischen den beiden Umfängen der *Laminae* ergibt, wurde von dem Programm „ImageJ 1.47f Fijii“⁵³ berechnet.



Abbildung 3-7: exemplarischer Vergleich zweier repräsentativer Aortenschnitte in E.V.G.-Färbung. A) Rag-1 KO mit Nidrigsalzdiät und ATII Behandlung, B) Rag-1-/- KO mit Nidrigsalzdiät ohne ATII Behandlung.

Herz

In dieser Arbeit wurde das Ausmaß der kardialen Endorganschädigung mittels zweier Surrogate, der Herzhypertrophie und der Herzfibrose, quantifiziert.

Herzhypertrophie

Das Ausmaß der Herzhypertrophie wurde rechnerisch ermittelt, indem der Quotient aus dem nach der Organentnahme ermittelten Ventrikelgewicht in Gramm (*g*) an Tag 28 der Diät mit oder ohne ATII und aus der nach Amputation gemessenen Tibialänge in Zentimeter (*cm*) gebildet wurde.

Herzfibrose

Nach dem Wiegen auf der Feinwaage⁵⁴ und dem Einlegen in phosphatgepufferte Roti® Histofix 4 %⁵⁵ Formalinlösung wurden die Herzen in die *Core Facility* für Mauspathologie (Gebäude O38, UKE, Hamburg) zur Anfertigung der Schnitte und der histologischen Färbungen transportiert. Für die Herzschnitte wurde die *PicroSirius Red* Färbung (PSR-Färbung) gewählt. Bei dieser Färbung erscheinen kollagenreiche Strukturen rot, sodass sie sich hervorragend zur Analyse des Ausmaßes des ATII induzierten *Remodeling* (Herzfibrose) eignet.

⁵³ Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA.

⁵⁴ Zertifiziert nach ISO 9001.

⁵⁵ Carl Roth, Deutschland.

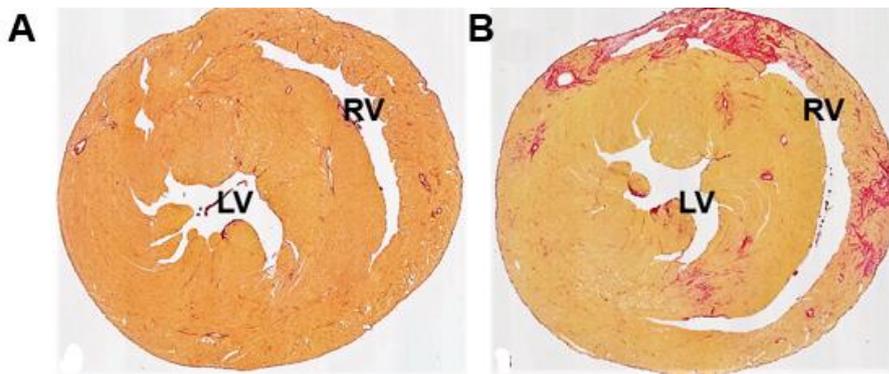


Abbildung 3-8: Exemplarischer Vergleich zweier repräsentativer Herzschnitte in *PicroSirius Red* Färbung. A) C57BL/6J WT Maus mit Kontrollsalzdiät (0,3 % Na⁺) ohne ATII, B) C57BL/6J WT Maus mit Hochsalzdiät (3 % Na⁺) mit ATII.

Zur Quantifizierung der Herzfibrose wurde jedes Präparat mikroskopisch bei 40 facher Vergrößerung in insgesamt zehn Gesichtsfelder (GF) eingeteilt (linker Ventrikel vier GF, Septum und rechter Ventrikel jeweils drei GF). Jedes Gesichtsfeld wurde mithilfe eines standardisierten *Scorings* von 0-2 nach Ausmaß der Fibrose bewertet.

| PSR Score | Morphologie |
|-----------|---|
| 0 | Keine Kollagenfasern (Kollagen in physiologisch kollagenhaltigen Strukturen wie Endokard inklusive Herzklappen, Muskelfaszen und Gefäßen wurde nicht mitbewertet) |
| 1 | Moderate Vermehrung kollagener Strukturen |
| 2 | starke Vermehrung kollagener Strukturen |

Tabelle 3-6: Schema des PSR-*Scoring* zur Quantifizierung der Herzfibrose.

Die mikroskopische Bewertung nach dem PSR-Score erfolgte für jedes einzelne Präparat insgesamt vier Mal an verschiedenen Tagen durch drei unterschiedliche Personen: zum einen durch mich und zum anderen durch zwei weitere AG-Mitglieder⁵⁶, die neutral und projektunabhängig waren. Die Objektträger wurden dem Mikroskopierenden randomisiert angereicht. Der Assistent notierte die vom Mikroskopierenden diktierten Scores für jedes Gesichtsfeld⁵⁷ eines Präparates in einer Liste, auf der die Studiennummern der Tiere, die denen auf den Objektträgern glich, aufgeführt wurden. Auf diese Weise erfolgte die Bewertung der Präparate verblindet. Die zehn Scores eines Präparats wurden am Ende zu einer Summe addiert. Durch die viermalige Bewertung erhielt man pro Präparat insgesamt vier Summen, aus denen das arithmetische Mittel berechnet worden ist. Die Höhe dieses Mittelwertes gilt als Surrogat für das Ausmaß der Herzfibrose.

⁵⁶ Herr Claudius Steffen und Herr Torben Neuss.

⁵⁷ 4x linker Ventrikel, 3x Septum, 3x rechter Ventrikel.

3.9.2. Funktionelle Untersuchung der Gefäßreagibilität mittels Myographie

Seit einigen Jahrzehnten weiß man aus Versuchen mit Kaninchenaorten um die dosisabhängige Wirkung von Acetylcholin auf den Gefäßtonus der glatten Gefäßmuskulatur (Furchgott & Bhadrakom 1953). Bei niedrigen Konzentrationen wirkt Acetylcholin vasodilatatorisch und bei höheren Konzentrationen vasokonstriktorisch (Roger et al. 1962). Bereits 1980 wurde an Kaninchenaorten erstmals demonstriert, dass Acetylcholin als potenter Vasodilatator in Abwesenheit eines intakten Endothels keine Gefäßrelaxation mehr hervorruft (Furchgott & Zawadzki 1980). Dies war ein Meilenstein in der Aufklärung der Acetylcholin-induzierten, endothelabhängigen Signalkaskade an deren Ende die Dilatation der glatten Gefäßmuskulatur steht. Es wurde vermutet, dass der dilatatorische Effekt durch eine Substanz vermittelt wird, deren Bildung durch die Bindung von Acetylcholin an Rezeptoren der Endothelzellen induziert wird. Diese als *Endothelium – Derived – Relaxing – Factor* bezeichnete Substanz (Cherry et al. 1982, Furchgott 1983) wurde Ende der 1980er schließlich als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (Palmer et al. 1987, Ignarro et al. 1988, (Furchgott & PM 1989). Darauf basierend kann mit der Organbad-Methode das Ausmaß der endothelialen Dysfunktion überprüft werden, indem durch die kumulative Gabe von Acetylcholin die endothelabhängige Relaxationsfähigkeit eines Gefäßes untersucht wird. Bei einer Reihe von kardiovaskulären Risikofaktoren, wie z.B. Bluthochdruck, zeigt sich eine abgeschwächte Ansprechbarkeit der Gefäße auf potente Vasodilatoren wie Acetylcholin (Panza et al. 1990, Linder et al. 1990, Panza et al. 1995).

Aufbau der Organbadapparatur

Das Organbad bestand aus sechs Glaskammern. In jede Kammer ragte ein für die Kraftaufnahme vorgesehener, feiner Draht, an dem die Aorten aufgehängt wurden. Hierfür wurden die Aorten zunächst auf zwei triangulär geformte, rostfreie Drähte gefädelt. Die obere Drahttriangel wurde an der Aufhängung befestigt, die untere auf einen sich in der Organbadkammer befindenden, unbeweglichen Haken gesetzt. Mithilfe von kleinen Rädchen konnten die Drähte, an denen die Aorten hingen, hoch- und heruntergezogen werden, wodurch die Aorten in Spannung gebracht werden konnten.

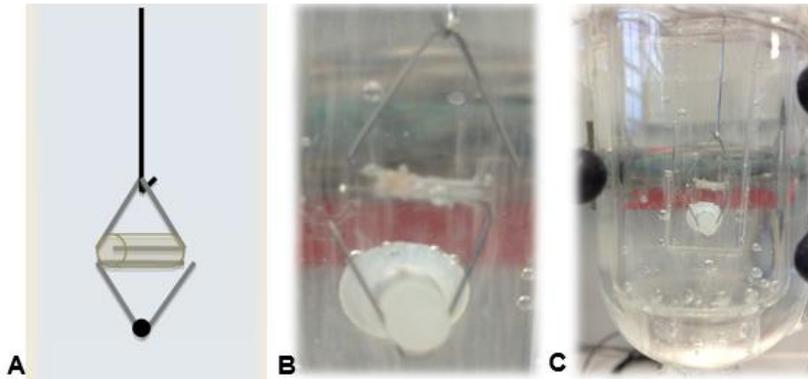


Abbildung 3-9: Organbad-Apparatur: A) schematische Darstellung der Aorten-Aufhängung an einem feinen Draht, der mit dem *Transducer* verbunden ist (nicht dargestellt). Zwischen zwei kleinen Triangel-Drähten ist die Aorta aufgespannt. Die obere Triangel hängt an dem Draht, der die Tonusänderungen misst, die untere Triangel ist auf einen in der Kammer befindlichen Haken geschoben, B) eingespannte Aorta in Krebs-Henseleit-Pufferlösung mit Carbogenbegasung (Organbad), C) Organbadkammer aus Plexiglas mit eingespannter Aorta. Foto: Claudius Steffen, IZIP, UKE Hamburg.

Jeder der Aufhängungs-Drähte war jeweils mit einem *Transducer* (= Kraftaufnehmer)⁵⁸, der die isometrischen Kraftentwicklungen der Aorta registrierte, verbunden. Hierbei funktionierten die Drähte wie Federkraftmesser: Kontrahierte sich die Aorta, zog sie an dem Draht, an dem sie aufgehängt war. Gemäß dem Hookeschen Gesetz wurde von dem *Transducer* anhand der Längenänderung des Drahtes die kontrahierende Kraft $[F]$ der Aortenringe in Newton (N) berechnet:

$$\text{Kraft } [F] \text{ in } (N) = \text{Federkonstante } [D] \times \text{Längenänderung } [\Delta L] \text{ in } (m)$$

Anhand der Formel

$$\text{Kraft } [F] \text{ in Newton } (N) = \text{Masse } [m] \text{ in } (kg) \times \text{Beschleunigung } [a] \text{ in } \left(\frac{m}{s^2}\right)$$

wurde die vom Kraftaufnehmer berechnete Kontraktionskraft $[F]$ nach der Masse $[m]$ umgestellt. Zur Verstärkung des vom jeweiligen *Transducer* registrierten Signals der Aorten dienten Verstärkerbrücken⁵⁹, die schließlich das durch die *Transducer* aufgenommene und verstärkte Signal auf den nebenstehenden PC⁶⁰ übertrugen. Mithilfe der Software Chart v4.0⁶¹ konnten die Kontraktionskraft und die Relaxation der Aorten in Gramm (g) vom Rechner aufgezeichnet und als Dosis-Wirkungs-Kurve am Computer-Bildschirm in Echtzeit verfolgt werden. Die Organbadkammern wurden vor Beginn des Experiments mit 25 ml des Krebs-Henseleit-Puffer befüllt (Organbad), auf 37 °C Körpertemperatur erwärmt und mit einem Gasgemisch (Carbogen, 95 % CO₂ und 5 % O₂) begast. Jede Kammer besaß einen eigenen Ablassstutzen, über den der Puffer aus der Kammer abgelassen werden konnte, um die Kammern durchzuspülen.

⁵⁸ Kent Scientific Corporation, Torrington, USA.

⁵⁹ Powerlab® Bridge Amplifier, ADInstruments, Colorado Springs, USA.

⁶⁰ Power Macintosh G4, Apple, Betriebssystem Mac OS 9.2.

⁶¹ ADInstruments, USA.

Organbadprozedere

Pro Organbad Versuch konnten die Aorten von drei Mäusen gleichzeitig gemessen werden. Es wurde stets darauf geachtet, dass in einem Durchgang beide Mauslinien (Rag-1 KO und C57BL/6J WT), sowie alle Diätgruppen (Niedrig-, Kontroll- und Hochsalzdiät) vertreten waren (z.B. 2 x Rag-1 KO Niedrig- und Hochsalzdiät, 1 x C57BL/6J Kontrollsalzdiät oder 2 x C57BL/6J Niedrig- und Hochsalzdiät, 1 x Rag-1 KO Kontrollsalzdiät). So wurde das Risiko für einen systematischen Fehler in den Ergebnissen verringert. Nachdem alle für den Durchgang benötigten Aorten entnommen worden waren, begann die Feinpräparation der Aorten unter dem Mikroskop bei 40 facher Vergrößerung mit einer chirurgischen Pinzette und einer scharfen Schere. Während das perivaskuläre Fettgewebe von der Aorta entfernt wurde, lagen die Aorten in mit Krebs-Henseleit-Puffer befüllten Petrischalen auf Eis.

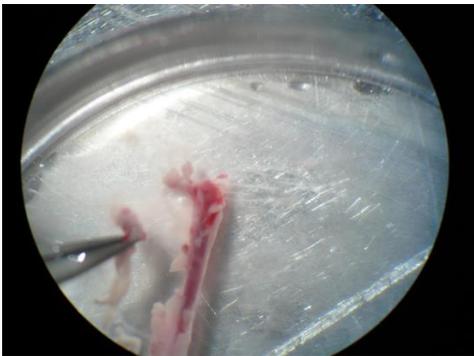


Abbildung 3-10: Feinpräparation der *Aorta thoracica* in Krebs-Henseleit-Puffer auf Eis unterm Mikroskop bei 40facher Vergrößerung. Foto: Claudius Steffen, IZIP, UKE Hamburg.

Nach der Feinpräparation wurden die Aorten mit einem scharfen Skalpell in zwei jeweils vier Millimeter lange Aortenringe geschnitten. Bei drei Tieren pro Durchgang erhielt man folglich sechs zu messende Aortenringe, sodass man von jedem Tier zwei Aortenstücke messen konnte. Jeder einzelne Aortenring wurde auf zwei triangulär geformte, rostfreie Drähte aufgefädelt. Diese Drahttriangeln waren an einer Ecke offen, sodass sie vorsichtig und ohne Beschädigung der Intima gegensätzlich in das Lumen der Aortenringe eingeführt werden konnten. Dies erfolgte ebenfalls unter mikroskopischer Sicht, während sich die Aorten weiterhin in mit Krebs-Henseleit-Puffer befüllten Petrischalen auf Eis befanden. Mit der oberen Drahttriangel wurde schließlich jeder der Aortenringe auf einen eigenen Draht aufgehängt. Die untere Drahttriangel wurde auf einen *unbeweglichen* Haken gesteckt. Mit einem kleinen Rädchen konnten die Drähte, an denen die Aortenringe aufgehängt waren, vorsichtig nach oben gezogen werden, sodass die Aortenringe stabil eingespannt wurden, ohne aber überdehnt zu werden und dadurch die Intima zu beschädigen. Jeder Aortenring wurde anschließend in eine eigene Organbadkammer mit jeweils 25 ml Krebs-Henseleit-Puffer eingetaucht. In der Äquilibrationsphase wurden die Aorten auf eine Vorspannung von 0,2 g gebracht. Sobald sich die Spannung stabilisiert hatte (Spannungsplateau), wurde die Spannung etwa alle sieben Minuten auf eine Endspannung von 1,1 g erhöht (Dauer ca. 35

min). Diese Spannung entspricht den *in vivo* Druckbedingungen. Nachdem sich die Spannung bei 1,1 g stabilisiert hatte (Spannungsplateau), wurden die Aorten insgesamt drei Mal mit 1 ml einer 2 M KCl-Lsg. (Endkonzentration im Organbad: 80mM)⁶² zur Kontraktion gebracht. Durch KCl wird das Ruhemembranpotential von -70 mV auf positivere Werte verschoben, sodass eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur erfolgt. Sofort nachdem ein Kraftaufbau verzeichnet worden war, wurde der Puffer mit der KCl-Lösung aus der Kammer abgelassen und die Kammer zwei Mal mit Puffer durchgespült, um das KCl vollständig auszuwaschen. Nach der dritten und letzten Zugabe von 1 ml der 2 M KCl-Lsg., wurden die Kammern erst nach 20 min ausgewaschen. Dieser Vorgang diente zum einen dem Vortraining der Aorten für die Kontraktion *ex vivo* mit Prostaglandin F2alpha und zum anderen der Vitalitätsprüfung. Zeigten die Aorten unter KCl keinen Kraftaufbau, wurden sie von der weiteren Messung ausgeschlossen. Die unter KCl erreichte Kontraktionskraft der Aorten wurde mit 100 % gleichgesetzt. Das Ausmaß des Spannungsaufbaus war direkt proportional zu der Inkubationsdauer mit KCl. Je länger die Aorten mit KCl bei 37 °C in Krebs-Henseleit-Puffer inkubiert wurden, desto stärker kontrahierten sie und desto länger dauerte nach dem Auswaschen von KCl der Spannungsabfall auf das Ausgangsniveau von 1,1 g. Daher wurden nach dem dritten Auswaschen von KCl mind. weitere 20 min für die vollständige Relaxation auf ein Niveau von 1,1 g abgewartet. Die Äquilibrationsphase war abgeschlossen. Die Aortenringe wurden nun erneut zur Kontraktion gebracht; diesmal mit 10 µl einer 10⁻² M PGF2α-Lösung⁶³ mit einer Endkonzentration von 4 µM PGF2α im Organbad. Daraufhin kontrahierten die Aortenringe um mind. 1 g (auf mind. 2,2 g). Dies entsprach etwa 80 % der Kontraktionskraft, die zuvor mit KCl erreicht worden war. Es wurde sodann abgewartet, bis die isometrische Kraftentwicklung der Aorta ein Spannungsplateau unter PGF2α erreicht hatte. Anschließend erfolgte die Überprüfung der endothelabhängigen Relaxationsfunktion der Gefäße durch kumulative Gabe von Acetylcholin⁶⁴ unter Erhöhung der Dosis in halblogarithmischen Schritten; beginnend bei einer Konzentration von 10⁻⁹ M und endend bei 10^{-5,5} M im 25 ml Organbad. Die Erhöhung der Acetylcholin-Konzentration auf das nächst höhere Niveau erfolgte stets, sobald die Aortenringe nach Relaxation ein Spannungsplateau erreicht hatten (etwa alle 5 min). Im Anschluss daran wurden die Kammern zwei Mal mit Puffer durchgespült. Nachdem nach 20-30 min wieder die Ausgangsspannung von 1,1 g erreicht worden war (Spannungsplateau), wurden die Aorten abermals mit 10 µl der 10⁻² M PGF2α Stammlsg. zur Kontraktion gebracht⁶⁵. Nachdem die Aortenringe erneut ein Spannungsplateau (ca. 2,2 g) erreichten, wurden sie durch

⁶² aus einer 2 M Stammlösung von KCl (112 g in 10 ml Aqua bidest.) wurde 1 ml in 25 ml Organbad-Puffer pipettiert.

⁶³ Sigma Aldrich, USA.

⁶⁴ Sigma Aldrich, USA, CAS-Nummer: 60-31-1.

⁶⁵ Endkonzentration von PGF2α im Organbad 4 µM.

kumulative Gabe von Nitroglycerin⁶⁶; beginnend bei einer Konzentration von 10^{-9} M und endend bei 10^{-5} M, zur Relaxation gebracht. Wie bei Acetylcholin wurde die Dosis in halblogarithmischen Schritten erhöht. Mit Nitroglycerin wurde die endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit der Gefäße überprüft.

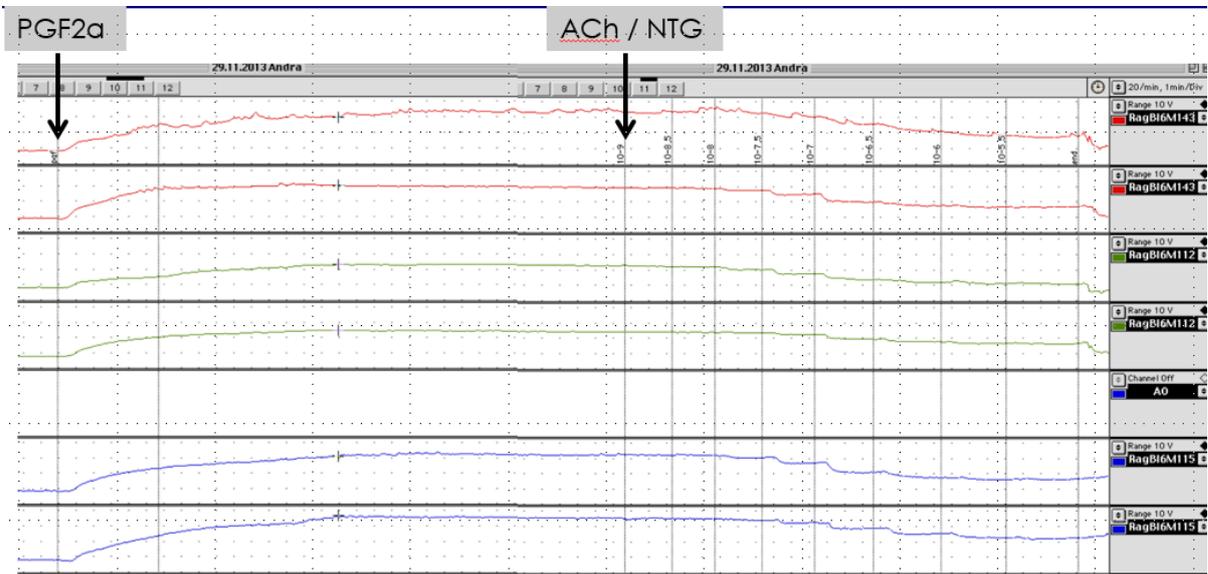


Abbildung 3-11: *In vitro* Messung Organbad, sechs Aortenringe (zwei pro Tier in einer Farbe). Original-Screenshot während des Versuchs, Dosis-Wirkungs-Kurven der Aortenringe, Anstieg im Kurvenverlauf als Ausdruck der Kontraktion nach Gabe von PGF2 α sowie stufenweiser Kurvenabfall als Ausdruck der Relaxation nach kumulativer Gabe von Acetylcholin bzw. Nitroglycerin deutlich zu erkennen.

Im Anschluss an die Nitroglycerin-Messung wurde der Puffer einzeln nacheinander aus den sechs Organbadkammern abgelassen und die Aortenringe in Eppendorf® Tubes mit Roti®-Histofix 4 % überführt, um für die histologische Bildgebung und Auswertung zur Verfügung zu stehen.

Auswertung der Organbaddaten

Die Werte der Dosis-Wirkungs-Kurve wurden mittels Microsoft Excel 2013 ausgewertet. Zunächst wurde die Differenz zwischen der Spannung der Aortenringe vor PGF2 α -Zugabe (= min. Spannung) und der Spannung, die nach PGF2 α -Zugabe von den Aortenringen erreicht worden ist (= max. Spannung), berechnet:

$$\text{Max. Spannung nach PGF2}\alpha - \text{min. Spannung vor PGF2}\alpha = \text{DELTA Spannung PGF2}\alpha \text{ in (g)}.$$

DELTA Spannung PGF2 α entsprach dem maximal möglichen Relaxationspotential der Aorten und wurde mit 100 % gleichgesetzt. Anschließend wurden die Differenzen zwischen dem Wert der max. Kontraktion nach PGF2 α und dem der Vasodilatation unter jeder

⁶⁶ Nitroglycerin-Lsg. 1 %, Merck®, Deutschland, CAS-Nummer: 55-63-0, Nitrolingual® infus., ATC-Code: C01DA02, G-Pohl Boskamp, Deutschland.

einzelnen Acetylcholin / Nitroglyzerin-Dosis berechnet. Diese Differenzen entsprachen dem prozentualen Anteil am max. Relaxationspotential DELTA Spannung PGF2 α :

$$\frac{\text{Max. Spannung nach PGF2}\alpha}{\text{DELTA Spannung PGF2}\alpha \text{ (vor und nach PGF2}\alpha \text{ Gabe)} \times 100}$$

Die Werte von zwei Aortenringen einer Maus wurden anschließend zu einem Wert gemittelt. Weiterhin wurde die mittlere Standardabweichung (engl. *standard error of the mean*, SEM) berechnet. Mithilfe der GraphPad Software PRISM® (Version 5.02) wurde für die Darstellung der Messpunkte der Dosis-Wirkungskurven unter Acetylcholin und Nitroglyzerin eine Ausgleichsrechnung nach dem Hill-Modell, einem nichtlinearen Regressions-Verfahren durchgeführt⁶⁷. Nach der *fitting-Analyse* konnten für die einzelnen Dosis-Wirkungskurven eines jeden Versuchstieres die folgenden Parameter ermittelt werden.

- LogEC₅₀-Wert: Dieser gibt die Vasodilatator-Konzentration an, die nötig ist, um eine halbmaximale Relaxation der Aortenringe zu beobachten. Hierdurch wird die Sensitivität der Aorten auf den jeweiligen Vasodilatator widerspiegelt. Je höher der Wert, desto weniger empfindlich reagiert das Gefäß auf Acetylcholin bzw. Nitroglyzerin.
- TOP-Werte: diese spiegeln die max. Relaxation der Aortenringe bei der Maximalkonzentration von Acetylcholin bzw. Nitroglyzerin wider.
- Steigung der Dosis-Wirkungskurve (engl.: *slope* oder Hill-Koeffizient). Der Koeffizient sagt etwas über die Anstiegssteilheit einer sigmoidalen Funktionskurve in ihrem Wendepunkt aus. Je größer die Steigung, desto rascher ist die Reaktion der Gefäße auf den jeweiligen Vasodilatator (Acetylcholin/Nitroglyzerin). Je niedriger der Wert, desto vorgeschädigter ist also das Gefäß.

Die genannten Werte, die man für die Aorten der einzelnen Mäuse erhielt, wurden schließlich zu einem Wert pro Diät (Niedrig-/Hochsalz) und Intervention (mit und ohne ATII) gemittelt und zwischen den Genotypen verglichen.

3.10. Statistik

Die statistische Auswertung, sowie die Erstellung der Grafiken erfolgten mit dem Programm „GraphPad Prism 5.02“ der GraphPad Software, Inc (USA). Zur Anwendung kommen folgende Tests:

- Gepaarter und ungepaarter T-Test

⁶⁷ Graphpad Prism Version 5.02 engl. „*nonlinear regression - curve fit* → ausgewählte Gleichung (engl. *equation*): *dose response – stimulation* → *log(agonist)* vs. *response – variable slope*“.

- Gepaarte und ungepaarte einfaktorielle Varianzanalysen (*1way ANOVA*) mit dem Newman-Keuls Posttest
- Kruskal Wallis Test (bei Varianzhomogenität) mit dem Dunn Posttest
- Gepaarte und ungepaarte zweifaktorielle Varianzanalysen (engl. *2way ANOVA*) mit dem Bonferroni Posttest

Für die Ergebnisse der gemessenen Parameter wird eine Normalverteilung angenommen. Die Testung auf Varianzhomogenität erfolgt mit dem Bartlett Test. Ist der p-Wert hier $>0,05$ sind die zu vergleichenden Gruppen varianzhomogen. Ein p-Wert $< 0,05$ gilt als statistisch signifikant. Die Messergebnisse werden zusammen mit dem Standardfehler (engl.: *standard error of the mean*, SEM) um das 95 % Konfidenzintervall angegeben. Die Nullhypothese H_0 lautet, dass sich die beiden Genotypen hinsichtlich der untersuchten Parameter (Blutdruck, Herzfrequenz, Aktivität, Endorganschädigung) nicht voneinander unterscheiden.

Der T-Test

Der T-Test gehört zu den parametrischen Verfahren und dient der Analyse von intervallskalierten Daten. Er untersucht, ob sich die arithmetischen Mittelwerte von zwei verbundenen (gepaarter t-Test) oder *unverbundenen* (*ungepaarter T-Test*) Stichproben voneinander unterscheiden. Voraussetzungen für die Durchführung des T-Tests sind, dass die Mittelwerte aus einer Grundgesamtheit entstammen und demnach sowohl varianzhomogen, als auch normalverteilt sind. In dieser Arbeit wird der zweiseitige T-Test (engl. *two tailed*) verwendet.

Einfaktorielle Varianzanalyse und Newman-Keuls Posttest

Die einfaktorielle Varianzanalyse (engl. *analysis of variance*, *1-way ANOVA*) gehört als F-Test zu den parametrischen Methoden und dient der Analyse von intervallskalierten Variablen. Mit dem Test wird untersucht, ob es statistische Unterschiede zwischen den Mittelwerten von mehr als zwei *unabhängigen* Stichproben gibt. Die Bezeichnung „einfaktoriell“ bedeutet in diesem Zusammenhang, dass der Einfluss von lediglich einer *unabhängigen* Variablen (z.B. Salzdiät) auf die abhängige Variable (z.B. Blutdruck) untersucht wird. Die *unabhängige* Variable (Salzdiät) liegt in mehreren Kategorien bzw. Faktorstufen J vor (z.B. Basisdiät, Hochsalzdiät, Hochsalzdiät mit ATII). So kann beispielsweise die Auswirkung von verschiedenen Salzdiäten mit und ohne ATII auf den Blutdruck der Rag-1 $-/-$ KO- oder C57BL/6J WT Maus untersucht werden. Voraussetzungen für die einfaktorielle Varianzanalyse sind die Varianzhomogenität und die Normalverteilung der Stichprobenmittelwerte. Beides wird in GraphPad Prism Version 5.02 direkt mit der Durchführung der ANOVA mit dem Bartlett Test überprüft. Die Teststatistik wird mit dem F-Wert angegeben. Der F-Wert entspricht dem Quotienten aus der Schätzung der Varianz zwischen den Gruppen und der Schätzung der Varianz innerhalb einer Gruppe. Ist der Quotient = 1 bedeutet dies, dass beide Varianzschätzungen gleich groß sind und sich die

Gruppen jeweils nicht signifikant voneinander unterscheiden. Die Ergebnisse der ANOVA werden nach den *APA-Styles* wie folgt angegeben:

$$F(J - 1, J - 1, n (\text{Tiere}) * J - J) = x, p = y^{68}.$$

Die Zahlen in den Klammern entsprechen den Freiheitsgraden des Tests, wobei x dem F-Wert (der Teststatistik) und y dem p-Wert entsprechen. Der F-Test ist ein globaler Test (auch Omnibustest). Er gibt an, dass sich die Faktorstufen signifikant voneinander unterscheiden, deckt aber nicht auf, zwischen welchen Gruppen genau die statistischen Unterschiede liegen. Dazu kommt der Newman-Keuls Posttest zur Anwendung.

Kruskal-Wallis Test und Dunn Posttest

Werden die Voraussetzungen für die ANOVA (Varianzhomogenität, Normalverteilung) nicht erfüllt, sind also die Varianzen der Gruppen signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$ im Bartlett Test), so muss ein anderer statistischer Test gewählt werden. Eine mögliche Alternative ist die Rangvarianzanalyse, auch Kruskal-Wallis Test. Der H-Test zählt zu den nichtparametrischen Verfahren. Nichtparametrische Tests werden auch „voraussetzungsfreie“ Tests genannt, da sie geringere Anforderungen an die Verteilung der Messwerte in der Grundgesamtheit stellen. Die Daten müssen lediglich ordinalskaliert sein (Ranganalyse). Die Normalverteilung wird nicht vorausgesetzt. Der Kruskal-Wallis Test kann, ebenso wie die *1way ANOVA*, nur den Einfluss von einer *unabhängigen* Variablen in ihren verschiedenen Faktorstufen auf eine abhängige Variable untersuchen (= Äquivalenztest zur einfaktoriellen Varianzanalyse). Die Messwerte (z.B. Blutdruckdaten) der zu vergleichenden Gruppen werden hierfür entsprechend ihrer Höhe oder ihres Betrags in eine auf- oder absteigende Reihenfolge gebracht. Jeder einzelne Wert wird entsprechend seiner Rangposition mit einem Rang versehen. Aus den ermittelten Rängen werden schließlich Rangsummen gebildet, indem jeweils die Ränge der Messwerte einer Gruppe summiert werden. Aus diesen Rangsummen wird die Teststatistik H, die mit $J - 1$ Freiheitsgraden Chi Quadrat verteilt ist, berechnet⁶⁹. Wie die einfaktorielle Varianzanalyse ist der Kruskal-Wallis Test ein Omnibustest. Er gibt lediglich Auskunft darüber, ob sich die Gruppen in ihren Tendenzen signifikant voneinander unterscheiden. Um zu detektieren, zwischen welchen Gruppen konkret die statistische Differenz liegt, werden post-hoc Mehrfachvergleiche mit dem Dunn Posttest durchgeführt.

⁶⁸ $J - 1$ = Anzahl der zu vergleichenden Gruppen (Faktorkategorien) minus 1; $n * J - J$ = Gesamtzahl der Versuchstiere minus Anzahl der Gruppen.

⁶⁹ Folgt die Teststatistik H einer Chi Quadrat Verteilung, wird die Teststatistik H mit dem kritischen Wert der durch die Freiheitsgrade und Signifikanzniveau definierten Chi Quadrat Verteilung abgeglichen. Die kritischen Werte der Chi Quadrat Verteilung sind aus Tabellen zu entnehmen. Ist der Betrag der Teststatistik höher als der kritische Wert, ist davon auszugehen, dass sich die Gruppen in ihren zentralen Tendenzen signifikant voneinander unterscheiden.

Zweifaktorielle Varianzanalyse und Bonferoni Posttest

Mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (engl. *2way ANOVA*) kann der Effekt von 2 *unabhängigen* Variablen (1. Verschiedene Salzdiäten mit und ohne ATII, 2. Genotyp) auf die abhängige Variable (Blutdruck) untersucht werden. Die Testvoraussetzungen für die *2way ANOVA* gleichen denen der *1way ANOVA*. Für die post-hoc Mehrfachvergleiche wird der Bonferoni Posttest verwendet. Die F-Teststatistik der zweifaktoriellen Varianzanalyse wird wie die der einfaktoriellen Varianzanalyse in *APA-Styles* angegeben.

Inkongruenz zwischen den Ergebnissen der globalen Tests (ANOVA) und den Posttests (Bonferroni)

Die Varianzanalysen und die Posttests stellen unterschiedliche Fragen. Die Varianzanalyse als Omnibus-Test fragt nach der Beziehung zwischen der *unabhängigen* Variablen und der abhängigen Variablen, wobei das Verhältnis der Varianzen aller Gruppen insgesamt berücksichtigt wird. Die post-hoc Mehrfachvergleiche suchen hingegen paarweise nach Unterschieden zwischen den Mittelwerten der einzelnen Gruppen. Aufgrund dessen kann es zuweilen zu Unstimmigkeiten zwischen dem Ergebnis des globalen Tests und des Posttests kommen. Der Bonferroni Posttest gilt im Allgemeinen als sehr konservativ (zu strenge Kontrolle des Fehlers 1. Art), sodass oftmals falsch negativ (= nicht signifikant) getestet wird. Daher kann es vorkommen, dass der Omnibustest (*1-* oder *2way ANOVA*) ergibt, dass sich die Gruppen signifikant voneinander unterscheiden bzw. die Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die abhängige Variable haben, der Posttest jedoch nicht aufdecken kann, zwischen welchen Gruppen genau der statistisch signifikante Unterschied liegt. Ergibt der originale Omnibus-Test in einem anders gearteten Fall, dass sich die Gruppen nicht signifikant voneinander unterscheiden bzw. die Faktoren keinen signifikanten Einfluss auf die abhängige Variable haben, müssen nach gängiger Meinung keine Posttests mehr durchgeführt werden. In der GraphPad Prism Version 5.02 werden die Posttests jedoch automatisch zu den Varianzanalysen mitgemacht. Im GraphPad Prism *Statistics Guide*⁷⁰ wird jedoch explizit darauf hingewiesen, dass bei nicht signifikantem Omnibus-Test aber signifikanten Ergebnissen im Posttest auf die Signifikanzen des Posttests vertraut werden kann und die signifikanten Ergebnisse mit angegeben werden sollten (*GraphPad Software, Statistics Guide*, [Stand: 10.10. 2016]). Demnach werden Unstimmigkeiten zwischen den globalen Tests und den Posttests stets mit angegeben und graphisch dargestellt. Überdies wird bei inkongruenten Ergebnissen ein T-Test derjenigen Gruppen, zwischen denen im Posttest ein signifikanter Unterschied bei nicht signifikantem Ergebnis der *ANOVA* gefunden wird, als ergänzende Information durchgeführt.

⁷⁰ http://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm?stat_relationship_between_overall_a.htm

4. Ergebnisse

4.1. Radiotelemetrische Messergebnisse

Im Folgenden werden die radiotelemetrischen Messdaten (MAP, SBP, DBP, Herzfrequenz, Aktivität) die von Versuchstieren unter Basisbedingungen (0,3 % Na⁺), Niedrigsalz-Spezialdiät (0,02 % Na⁺), Hochsalz-Spezialdiät (3 % Na⁺), sowie unter Niedrigsalz-Spezialdiät und Hochsalz-Spezialdiät jeweils in Kombination mit ATII (0,02 % oder 3 % Na⁺ + 490 ng*kg⁻¹*min⁻¹) erhoben wurden, aufgeführt.

4.2.1. Mittlerer Arterieller Druck (MAP), Systolischer (SBP) und Diastolischer Druck (DBP)

Entsprechend des murinen Biorhythmus ist der MAP nachts höher als tagsüber. Sowohl unter Basisbedingungen (Basisdiät), als auch unter den Spezialsalzdieten (Niedrig-/Hochsalzdiät) mit und *ohne* ATII verändert sich der MAP signifikant über die Zeit (Nacht/Tag, (p<0,0001).

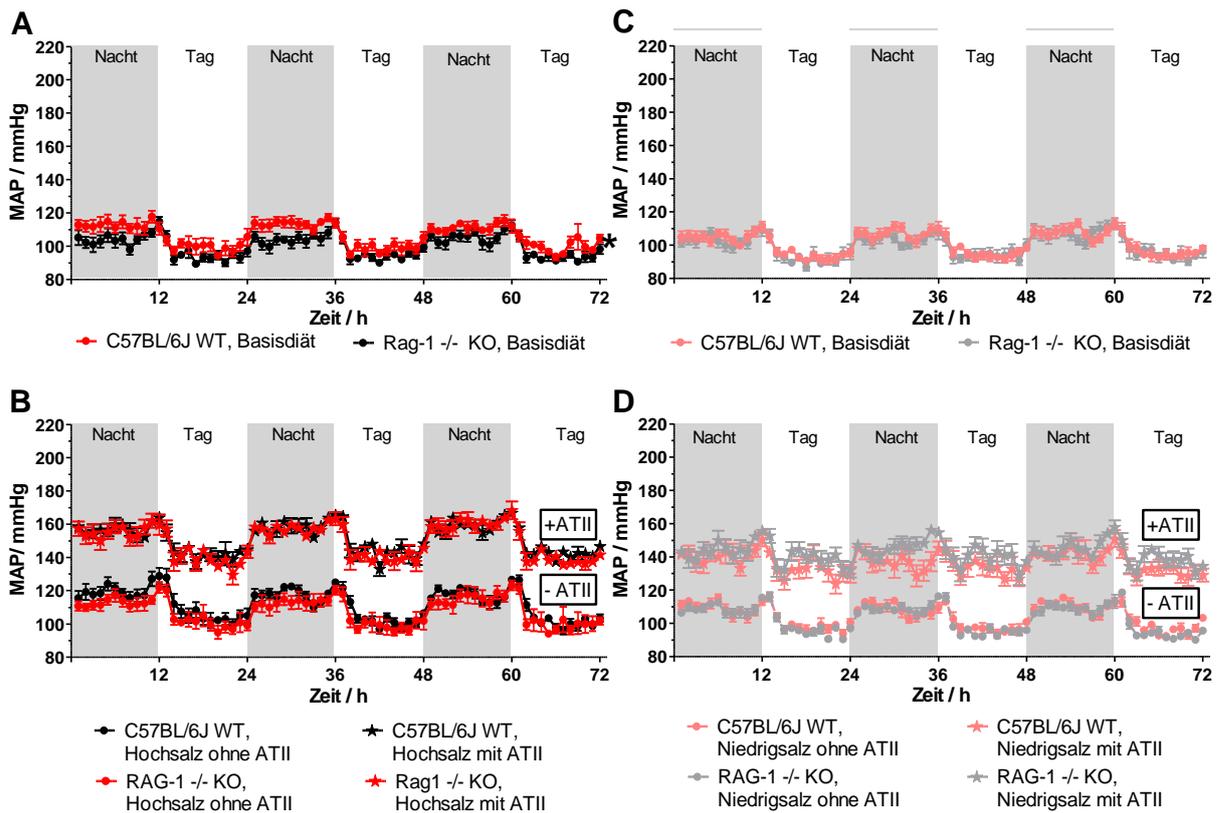


Abbildung 4-1: Einstundenwerte (Mittelwerte \pm SEM) des MAP über jeweils drei Nächte und Tage. Jeweils 12 Einstundenwerte entsprechen 1 Nacht/Tag. **A)** MAP unter Basisdiät (0,3 % Na⁺) von Mäusen, die später Hochsalzdiät +/- ATII erhalten (Faktor „Genotyp“: $F(1,13)=6,076$, $p=0,0284$), $n=7-8$, **B)** MAP unter Hochsalzdiät (3 % Na⁺) *ohne* ATII (Faktor „Genotyp“: $F(1,13)=1,280$, $p=0,2783$), $n=7-8$ und Hochsalzdiät mit ATII (Faktor „Genotyp“: $F(1,13)=0,3890$, $p=0,5436$), $n=7-8$, **C)** MAP unter Basisdiät (0,3 % Na⁺) von Mäusen, die später Niedrigsalzdiät +/- ATII erhalten (Faktor „Genotyp“: $F(1,14)=0,3533$, $p=0,5617$), $n=8$, **D)** MAP unter Niedrigsalzdiät (0,02 % Na⁺) *ohne* ATII (Faktor „Genotyp“: $F(1,14)=2,065$, $p=0,1727$), $n=8$ und Niedrigsalzdiät mit ATII (Faktor „Genotyp“: $F(1,14)=1,455$, $p=0,2478$), $n=8$. Statistik: 2-way ANOVA, *matching by columns*. Bonferroni Posttest.

Dies zeigt einen erhaltenen Tag-/Nachtrhythmus an (s. Abbildung 4-1). Kurz vor Beginn der täglichen Ruhephasen zeigen sich jeweils charakteristische Blutdruckspitzen. Zusammenfassend zeigen die Genotypen unter keiner Spezialsalzdiät (Niedrig-/Hochsalzdiät) und unter keiner Intervention (mit/ohne ATII) signifikante Unterschiede im Verlauf des MAP über 72 Stunden. Einzige Ausnahme sind die Mäuse in der Basisdiätgruppe, die später Hochsalzdiät mit und *ohne* ATII erhalten sollen. Hier zeigt sich ein signifikanter Blutdruckunterschied unter Basisbedingungen, wonach der MAP bei dem C57BL/6J WT signifikant höher ist, als bei dem Rag-1 *-/-* KO (s. Abbildung 4-1 A, Statistik Faktor „Genotyp“). Der Bonferroni Posttest detektiert jedoch bei keinem der 72 Zeitpunkte Signifikanzen, sodass konstatiert werden muss, dass es zwar Unterschiede im MAP zwischen den Genotypen unter Basisdiät gibt, jedoch unklar ist, zu welchen Zeitpunkten diese Unterschiede vorkommen. Der Unterschied im MAP ist während der drei Nächte/Tage unter Hochsalzdiät *ohne* ATII und während der letzten drei Nächte/Tage unter Hochsalzdiät mit ATII Infusion allerdings nicht mehr vorhanden (s. Abbildung 4-1 B, Statistik Faktor „Genotyp“), sodass die Signifikanz im Blutdruckunterschied zwischen den Genotypen unter Basisbedingungen bei den für die Hochsalzdiät randomisierten Versuchstieren als zufällig aufgetreten und klinisch irrelevant zu bewerten ist.

| Vitalparameter [mmHg] Mean +/- SEM, 95% Konfidenzintervall | C57BL/6J WT | Rag-1 <i>-/-</i> KO | Signifikanz |
|---|--|--------------------------------------|-------------|
| Basisdiät (Gruppe, die im Verlauf Niedrigsalzdiät mit/ohne ATII erhält) | | | |
| MAP | | | |
| Nacht | 107,0 +/- 1,946 [102,4-111,6] | 105,0 +/- 2,300 [99,56-110,4] | ns |
| Tag | 95,65 +/- 1,373 [92,40-98,90] | 94,58 +/- 2,395 [88,91-100,2] | ns |
| SBP | | | |
| Nacht | 117,5 +/- 2,669 [111,5-123,6] | 118,5 +/- 2,214 [113,3-123,8] | ns |
| Tag | 109,3 +/- 0,6152 [107,8-110,8] | 108,1 +/- 2,095 [103,1-113,0] | ns |
| DBP | | | |
| Nacht | 90,85 +/- 2,672 [84,81-96,89] | 91,26 +/- 2,625 [85,05-97,47] | ns |
| Tag | 82,07 +/- 1,409 [78,73-85,40] | 80,87 +/- 2,958 [73,88-87,87] | ns |

| Vitalparameter [mmHg] Mean +/- SEM, 95% Konfidenzintervall | C57BL/6J WT | Rag-1 -/- KO | Signifikanz |
|--|--|--|---------------------------------|
| Basisdiät (Gruppe, die im Verlauf Hochsalzdiät mit/ohne ATII erhält) | | | |
| MAP | | | |
| Nacht | 112,6 +/- 2,125 [107,6-117,6] | 105,1 +/- 2,704 [98,51- 111,7] | s * (p=0,0464) |
| Tag | 100,1 +/- 2,101 [95,60-105,5] | 94,79 +/- 1,488 [91,15- 98,43] | s * (p=0,0482) |
| SBP | | | |
| Nacht | 124,5 +/-2,645 [118,7-130,4] | 120,4 +/- 2,917 [113,3- 127,6] | ns |
| Tag | 113,5 +/- 1,685 [109,5-117,4] | 109,6 +/- 1,734 [105,4- 113,9] | ns |
| DBP | | | |
| Nacht | 101,2 +/- 2,715 [95,11-107,2] | 91,75 +/- 2,393 [86,23- 97,27] | s * (p=0,0205) |
| Tag | 89,93 +/- 4,896 [78,35-101,5] | 79,30 +/- 1,271 [76,19- 82,41] | ns |
| Niedrigsalzdiät ohne ATII | | | |
| MAP | | | |
| Nacht | 109,4 +/- 1,104 [106,8-112,0] | 109,0 +/- 1,298 [106,0- 112,2] | ns |
| Tag | 98,89 +/- 0,8151 [96,97-100,8] | 96,57 +/- 0,6510 [95,03- 98,1] | ns |
| SBP | | | |
| Nacht | 122,0 +/- 1,234 [119,1-124,8] | 124,8 +/- 1,238 [121,9- 127,8] | ns |
| Tag | 111,6 +/- 0,9358 [109,4-113,8] | 111,8 +/- 1,135 [109,1- 114,5] | ns |
| DBP | | | |
| Nacht | 95,04 +/- 1,292 [92,06-98,01] | 92,76 +/- 1,643 [88,87- 96,64] | ns |
| Tag | 85,62 +/- 1,355 [82,41-88,82] | 81,21 +/- 1,062 [78,70- 83,72] | ns |
| Hochsalzdiät ohne ATII | | | |
| MAP | | | |
| Nacht | 118,4 +/-1,944 [114,2-123,3] | 114,1 +/- 3,451 [105,7- 122,5] | ns |
| Tag | 104,9 +/- 1,865 [100,5-109,3] | 101,3 +/- 3,241 [93,41- 109,3] | ns |
| SBP | | | |
| Nacht | 132,8 +/- 2,024 [128,1-137,5] | 131,4 +/- 3,103 [124,1- 138,8] | ns |
| Tag | 118,1 +/- 2,046 [113,3-123,0] | 116,2 +/- 2,995 [108,9- 123,5] | ns |
| DBP | | | |
| Nacht | 105,6 +/- 2,340 [100,2-111,0] | 97,35 +/- 3,385 [89,07- 105,6] | ns |
| Tag | 91,42 +/- 1,952 [86,80-96,03] | 86,21 +/- 3,813 [76,88- 95,54] | ns |

| Vitalparameter [mmHg] Mean +/- SEM, 95% Konfidenzintervall | C57BL/6J WT | Rag-1 -/- KO | Signifikanz |
|--|---|--------------------------------------|---------------------------|
| Niedrigsalzdiät mit ATII | | | |
| MAP | | | |
| Nacht | 140,6 +/- 3,777 [131,7-149,5] | 146,0 +/- 2,923 [139,1-152,9] | ns |
| Tag | 132,7 +/- 3,940 [123,4-142,0] | 138,7 +/- 3,669 [103,1-147,4] | ns |
| SBP | | | |
| Nacht | 159,0 +/- 4,190 [149,1-168,9] | 166,7 +/- 3,859 [157,5-175,8] | ns |
| Tag | 150,2 +/- 4,119 [140,5-159,9] | 158,0 +/- 4,390 [147,6-168,3] | ns |
| DBP | | | |
| Nacht | 123,3 +/- 3,991 [113,8-132,7] | 127,4 +/- 2,502 [121,5-133,3] | ns |
| Tag | 116,3 +/- 4,312 [106,1-126,5] | 122,0 +/- 3,168 [114,5-129,5] | ns |
| Hochsalzdiät mit ATII | | | |
| MAP | | | |
| Nacht | 158,8 +/- 2,143 [153,7-163,8] | 158,2 +/- 2,417 [152,3-164,1] | ns |
| Tag | 143,8 +/- 1,713 [139,7-147,8] | 139,8 +/- 2,812 [132,9-146,7] | ns |
| SBP | | | |
| Nacht | 174,2 +/- 4,381 [163,8-184,6] | 186,9 +/- 2,051 [181,9-191,9] | s * p=0,0269 |
| Tag | 161,1 +/- 2,514 [155,2-167,1] | 164,4 +/- 1,653 [160,3-168,4] | ns |
| DBP | | | |
| Nacht | 142,0 +/- 2,499 [136,1-147,9] | 133,6 +/- 3,571 [124,9-142,4] | ns |
| Tag | 129,0 +/- 2,577 [122,9-135,1] | 118,5 +/- 3,911 [108,9-128,1] | s * (p=0,0392) |

Tabelle 4-1. Absolute Blutdruckwerte (MAP, SBP und DBP) unter allen Diäten (Basis-, Hoch-, Niedrigsalzdiät) und Interventionen (mit/ohne ATII), Nacht und Tag. Die 12 Einstundenwerte einer Nacht/eines Tages sind zu einem Wert pro Nacht/Tag gemittelt. Bei einer Messung über drei Nächte/Tage unter Basis- und Spezialsalzdiät (Hoch-/Niedrigsalzdiät) bzw. über die letzten drei Nächte/Tage unter Spezialsalzdiät mit ATII ergeben sich jeweils pro Diät und Intervention drei Einzelwerte. Diese drei (Nacht- und Tag-)Einzelwerte pro Diät/Intervention wurden erneut zu einem Wert gemittelt, sodass sich ein Wert für nachts und tagsüber pro Diät und Intervention ergibt. Statistik: T-Testung, *no paired test, two-tailed*.

Veränderung des MAP bei Umstellung der Diät von Basis- auf Hoch- bzw. Niedrigsalzdiät ohne ATII

Unter der Annahme, dass T-Lymphozyten durch Hochsalzdiät einerseits, sowie durch systemisch hochreguliertes ATII im Rahmen der Niedrigsalzdiät andererseits zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen stimuliert werden, soll die Veränderung des MAP bei Umstellung der Diät von der Basisdiät auf die jeweiligen Spezialsalzdiäten für beide

Genotypen im Verlauf dargestellt werden. Auffällig ist, dass beide Genotypen unter Hochsalzdiät eine Grad I Hypertonie (>130/80mmHg) entwickeln⁷¹ (s. Tabelle 4-1).

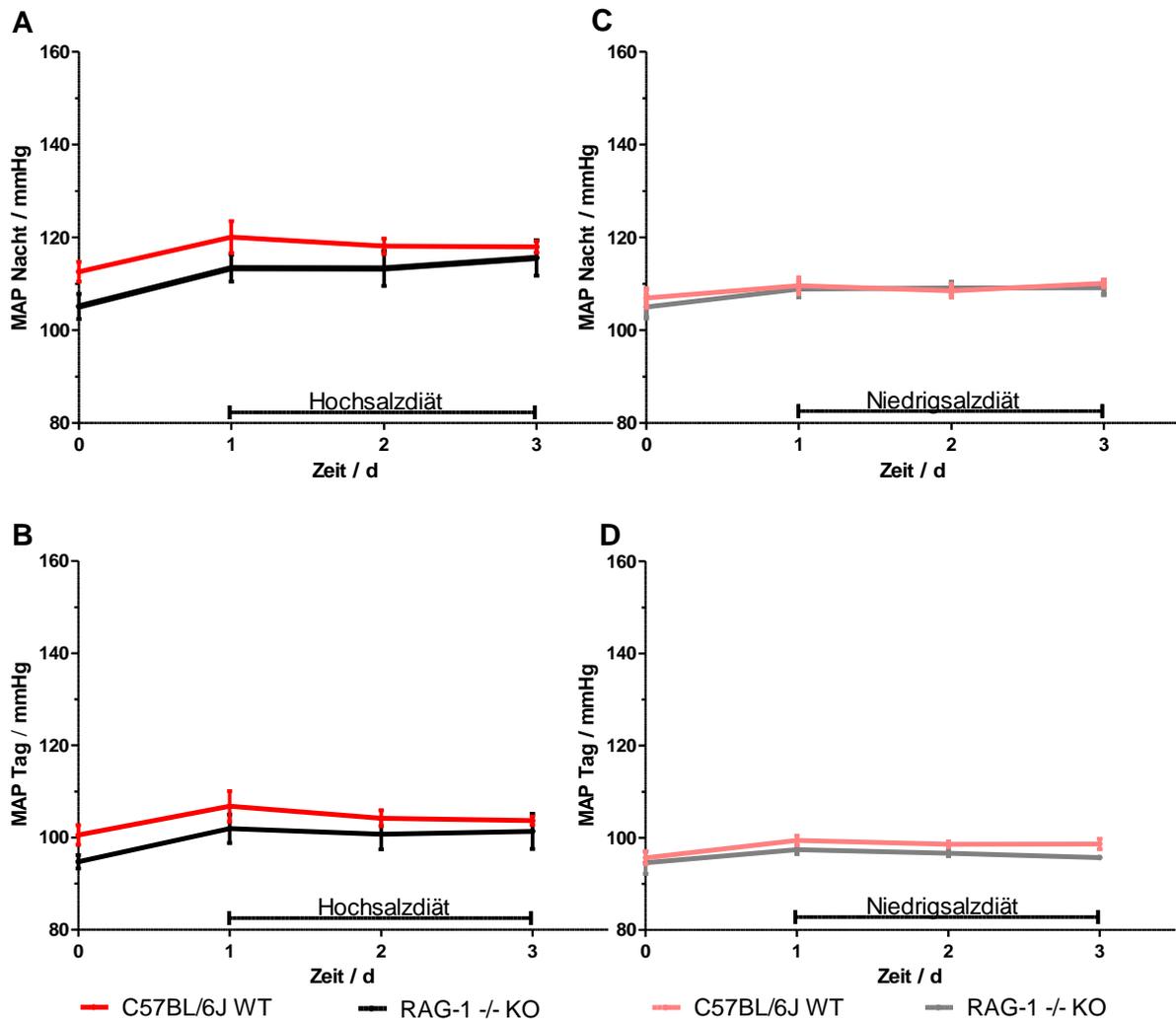


Abbildung 4-2: Veränderung des MAP bei Umstellung der Diät von Basis- auf Spezialsalzdiät (Hoch-/Niedrigsalzdiät). Die 12 Stundenwerte einer Nacht/eines Tages wurden zu einem Einzelwert pro Nacht/Tag gemittelt, sodass sich bei einer Messung über 72h pro Diät drei Einzelwerte für Nacht und Tag ergeben. Der Punkt „0“ auf der Zeitachse ist der Ausgangspunkt und entspricht dem gemittelten MAP aus drei Einzelwerten von jeweils drei Nächten und Tagen unter Basisdiät. **A)** Nächtlicher Verlauf des MAP von Basis- auf Hochsalzdiät (Faktor Genotyp: $F(1,13)=2,327$, $p=0,1511$), $n=7-8$, **B)** Täglicher Verlauf des MAP von Basis-auf Hochsalzdiät (Faktor Genotyp: $F(1,13)=1,968$, $p=0,1841$), $n=7-8$, **C)** Nächtlicher Verlauf des MAP von Basis- auf Niedrigsalzdiät (Faktor Genotyp: $F(1,14)=0,2296$, $p=0,6392$), $n=8$, **D)** Täglicher Verlauf des MAP von Basis- auf Niedrigsalzdiät (Faktor Genotyp: $F(1,14)=2,733$, $p=0,1205$), $n=8$. Statistik: 2-way ANOVA, *matching by columns* (alle Werte 1 Maus befinden sich in derselben Subkolonne). Bonferroni Posttest.

Vergleicht man die absoluten Werte des MAP (gemittelter MAP aus drei Nächten/Tagen unter Basisdiät und unter Hochsalz-/Niedrigsalzdiät) steigt der mittlere arterielle Druck lediglich bei der Rag-1 -/- KO Mauslinie unter Hochsalzdiät im Vergleich zur Basisdiät signifikant an (s. Abbildung 4-9 A, Statistik, s. Tabelle 4-1). Dies gilt nicht für den MAP unter Niedrigsalzdiät im Vergleich zur Basisdiät (s. Abbildung 4-9 D, Statistik, s. Tabelle 4-1). Bei der C57BL/6J WT Mauslinie ist der MAP unter Hochsalzdiät tendenziell zwar auch höher, als unter Basisdiät (s. Tabelle 4-1); dieser Unterschied ist hier jedoch nicht signifikant.

⁷¹ Definition und Klassifikation der arteriellen Hypertonie gemäß aktueller Leitlinien 2017.

Augenscheinlich steigt der MAP zwischen der Basisdiät und dem 1. Messpunkt unter Spezi­alsalzdiät (Hoch- und Niedrigsalz) bei beiden Genotypen leicht an, wobei er im weiteren Verlauf bis zum letzten Messpunkt unter Spezi­alsalzdiät entweder konstant bleibt oder wieder bis knapp über das Ausgangsniveau abfällt (s. Abbildung 4-2, vor allem A und B). Die zweifaktoriellen Varianzanalysen, die hier nach einer Veränderung über den Verlauf fragen, zeigen für beide Genotypen, dass der Faktor „Zeit/Spezi­alsalzdiät“ bei den Mäusen sowohl in der Hoch-, als auch in der Niedrigsalzdiätgruppe zu einer signifikanten Blutdruckänderung über die vier dargestellten Messzeitpunkte hinweg führt (2-way ANOVA, p-Werte zwischen $<0,0001$ und $0,0313$). Dieses signifikante Ergebnis ist auf die beschriebenen Blutdruckschwankungen als salzbedingter Effekt zurückzuführen. Weder bei Umstellung der Diät von Basis- auf Hochsalzdiät, noch bei Umstellung von Basis- auf Niedrigsalzdiät unterscheiden sich der C57BL/6J WT und der Rag-1 $-/-$ KO nachts- oder tagsüber hinsichtlich des Verlaufs ihres MAP signifikant voneinander (s. Abbildung 4-2 A-D, Statistik Faktor Genotyp).

Veränderung des MAP bei Zufuhr von exogenem ATII zusätzlich zur Hoch- und Nidrigsalzdiät

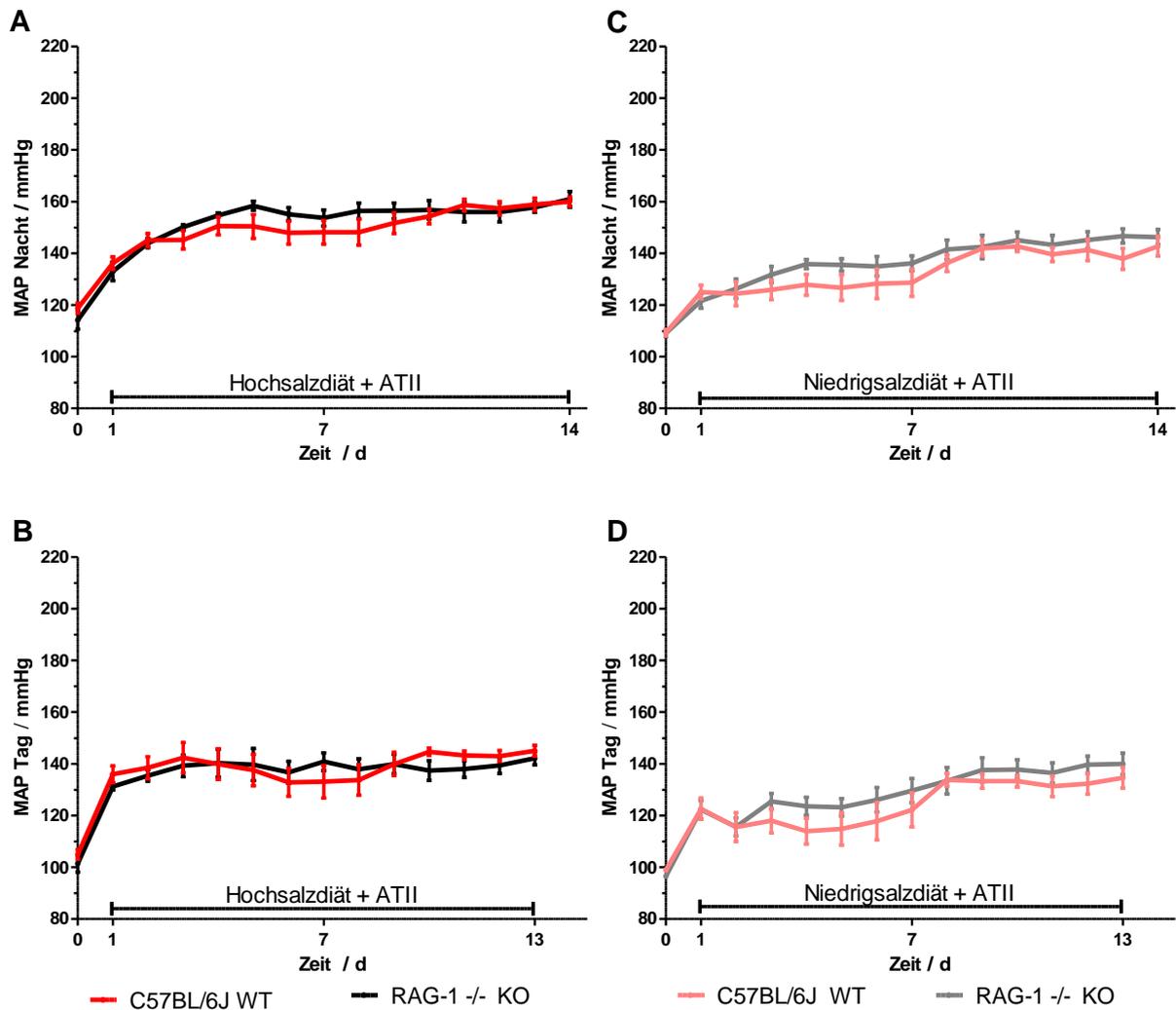


Abbildung 4-3 Veränderung des MAP durch exogene ATII Zufuhr zusätzlich zur Hochsalz- und Nidrigsalzdiät. Die 12 Einstundenwerte einer Nacht/eines Tages wurden zu einem Wert pro Nacht/Tag gemittelt. Der Punkt „0“ auf der Zeitachse ist der Ausgangspunkt und entspricht dem gemittelten MAP aus jeweils drei Nächten/Tagen unter Spezialsalzdiät (Hoch-bzw. Nidrigsalz). **A**) Nächtlicher Verlauf des MAP von Hochsalzdiät ohne ATII auf Hochsalzdiät mit ATII (Faktor Genotyp: $F(1,13)=0,6496$, $p=0,4348$), $n=7-8$, **B**) Täglicher Verlauf des MAP von Hochsalzdiät ohne ATII auf Hochsalzdiät mit ATII (Faktor Genotyp: $F(1,13)=0,07997$, $p=0,7818$), $n=7-8$, **C**) Nächtlicher Verlauf des MAP von Nidrigsalzdiät ohne ATII auf Nidrigsalzdiät mit ATII (Faktor Genotyp: $F(1,14)=1,702$, $p=0,2131$), $n=8$, **D**) Täglicher Verlauf des MAP von Nidrigsalzdiät ohne ATII auf Nidrigsalzdiät mit ATII (Faktor Genotyp: $F(1,14)=1,356$, $p=0,2636$), $n=8$. Statistik: 2-way ANOVA, *matching by columns* (alle Werte 1 Maus befinden sich in derselben Subkolumne). Bonferroni Posttest.

Die exogene ATII Zufuhr führt in den Mäusen beider Genotypen sowohl unter Hoch-, als auch unter Nidrigsalzdiät nachts- und tagsüber zu einem signifikanten Anstieg des MAP mit Entwicklung einer Grad II Hypertonie⁷² (s. Abbildung 4-3 A bis D, s. Tabelle 4-1). Demnach ist der Rag-1 -/- KO aufgrund seiner Immundefizienz nicht vor einer ATII induzierten Hypertonie geschützt. Sollte es unter Hochsalzdiät oder durch das endogen hochregulierte ATII unter Nidrigsalzdiät zu einer T-Zellvoraktivierung bei dem immunkompetenten C57BL/6J WT gekommen sein, führt diese bei exogener ATII Zufuhr zu keiner

⁷² Definition und Klassifikation der arteriellen Hypertonie gemäß aktueller Leitlinie 2017

unterschiedlichen Blutdruckantwort des C57BL/6J WT im Vergleich zu dem Rag-1 ^{-/-} KO. Die Genotypen unterscheiden sich weder hinsichtlich des Verlaufs des MAP über die dargestellten Zeitpunkte hinweg, noch bezüglich des am Ende der ATII Behandlung erreichten Blutdruckniveaus (s. Tabelle 4-1). Dies gilt sowohl für die Hoch-, als auch die Nidrigsalzdiätgruppe mit ATII und sowohl für die nächtliche Aktiv-, als auch für die tägliche Ruhephase. Demnach hat die *unabhängige Variable* „Genotyp“ keinen Einfluss auf die ATII induzierte Blutdruckantwort (s. Abbildung 4-3 A-D, Statistik Faktor Genotyp). Augenscheinlich ist der Anstieg des MAP bei beiden Mauslinien unter Hochsalzdiät mit ATII größer, als unter Nidrigsalzdiät mit ATII. Tatsächlich liegen die absoluten Blutdruckwerte unter Hochsalzdiät mit ATII bei beiden Genotypen über dem Niveau der absoluten Blutdruckwerte unter Nidrigsalzdiät mit ATII (s. Tabelle 4-1).

Auf Aktivität normierter MAP unter Basis-, Nidrig- und Hochsalzdiät mit und *ohne* ATII, absolute Werte

Um zu untersuchen, ob sich die beiden Genotypen hinsichtlich ihres Ruheblutdrucks (MAP bei Aktivität = 0) unterscheiden, wurde der MAP auf die Aktivität normiert (Aktivität = 0, Aktivität > 0).

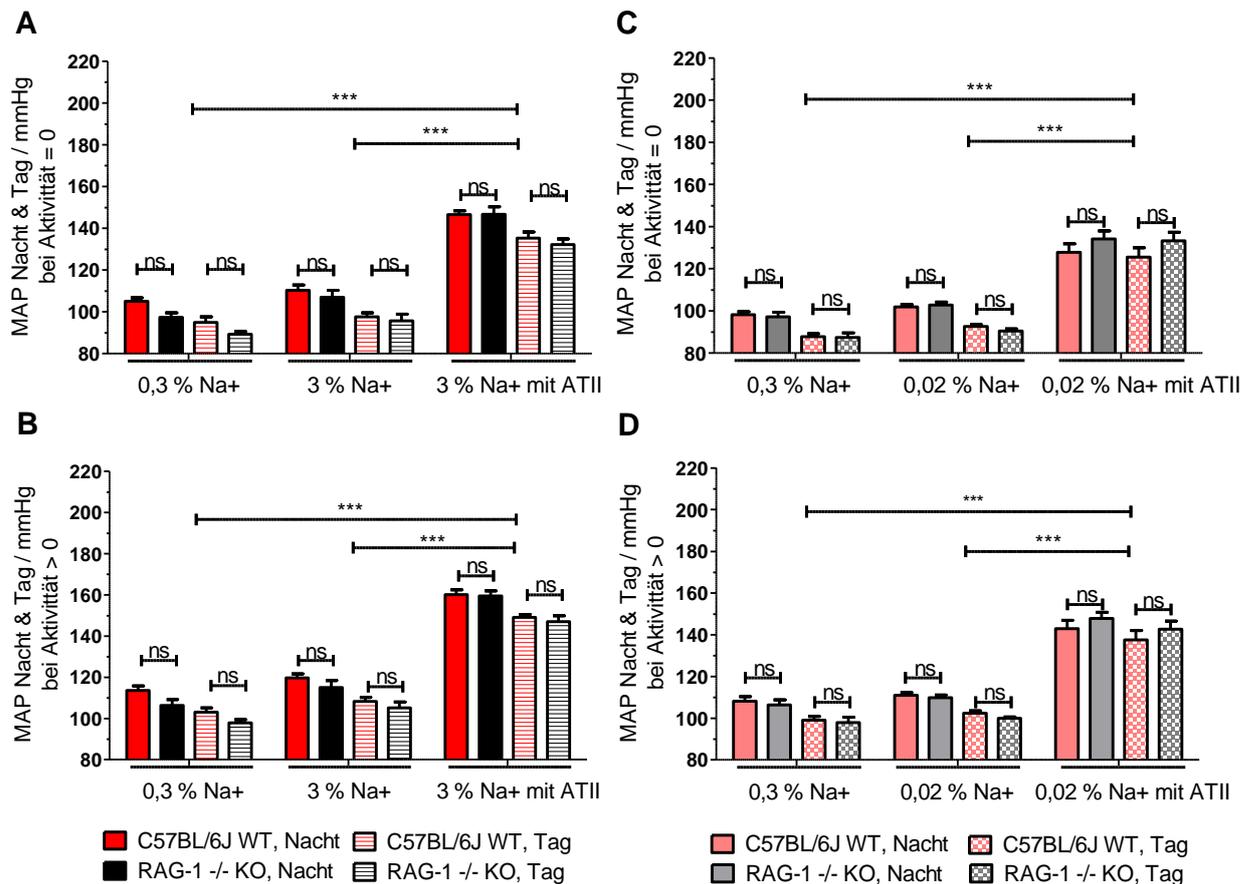


Abbildung 4-4: MAP unter Basis-, Hoch- und Niedrigsalzdiät mit und *ohne* ATII auf die Aktivität normiert. Die alle fünf Minuten aufgezeichneten Messwerte des MAP (pro Nacht/Tag jeweils insgesamt 144 Werte) wurden nach den Kategorien „Aktivität = 0“ und „Aktivität > 0“ sortiert. Die sich daraus pro Aktivitätsgrad ergebenden Blutdruckdaten wurden schließlich zu einem Wert pro Nacht/Tag gemittelt, sodass sich bei einer Messung über drei Nächte/Tage pro Diät (Basis-, Hoch- und Niedrigsalz) und Intervention (*ohne*/mit ATII) jeweils drei aktivitätsnormierte Nacht- und Tages-Blutdruckwerte ergaben. Diese wurden abermals zu einem MAP-Wert pro Diät und Intervention gemittelt. **A**) MAP Basis-, Hochsalzdiät mit und ohne ATII bei Aktivität = 0 (Faktor Genotyp Nacht: $F(1,13)=2,843$, $p=0,1156$, Tag: $F(1,13)=3,263$, $p=0,0941$), **B**) MAP Basis-, Hochsalzdiät mit und ohne ATII bei Aktivität > 0 (Faktor Genotyp Nacht: $F(1,13)=3,078$, $p=0,1029$, Tag: $F(1,13)=3,221$, $p=0,0960$), **C**) MAP Basis-, Niedrigsalzdiät mit und ohne ATII bei Aktivität = 0 (Faktor Genotyp Nacht: $F(1,14)=0,8392$, $p=0,3751$, Tag: $F(1,14)=0,4146$, $p=0,5300$), **D**) MAP Basis-, Niedrigsalzdiät mit und ohne ATII bei Aktivität > 0 ($F(1,14)=0,08118$, $p=0,7799$, Tag: $F(1,14)=0,03546$, $p=0,8533$), $n=$. Statistik: 2-way ANOVA, *repeated measures*, *matching by columns*. Bonferroni Posttest.

Der Faktor „Genotyp“ hat weder unter Basis-, noch unter Hochsalz- oder Niedrigsalzdiät mit oder *ohne* ATII einen Einfluss auf die Höhe des MAP. Dies gilt sowohl für in Ruhe (Aktivität = 0), als auch für die Werte bei einer Aktivität > 0 während der nächtlichen Aktiv- und der täglichen Ruhephase. Augenscheinlich ist in der Abbildung 4-4 A und B zu erkennen, dass der MAP des C57BL/6J WT unter Basisdiät sowohl bei Aktivität = 0, als auch bei Aktivität > 0 höher ist, als bei dem RAG-1 -/- KO. Dieser Unterschied ist hier jedoch, anders als in Abbildung 4-1 (Rohdaten, MAP über 72h) und der dazugehörigen Statistik, durch die Aufteilung des MAP in Ruheblutdruck und Blutdruck bei Aktivität > 0 statistisch nicht mehr signifikant (s. Abbildung 4-4 A und B, Statistik Faktor Genotyp Nacht und Tag). Die ATII Behandlung führt erwartungsgemäß unter allen Diäten (Basis-, Hoch- und Niedrigsalzdiät) sowohl während der Nacht, als auch während des Tages bei beiden Genotypen zu einem signifikanten Anstieg des Ruheblutdrucks (MAP bei Aktivität = 0) und des MAP bei Aktivität >

0 sowohl im Vergleich mit dem MAP unter Basis-, als auch unter Spezi­alsalzdiät *ohne* ATII Behandlung (p-Werte jeweils <0,0001). Insgesamt steigt der MAP bei dem immunkompetenten Wildtyp durch die Behandlung mit Hochsalzdiät und ATII im Vergleich zur Basisdiät im Durchschnitt um 42,34 % (Nacht: 41,03 %, Tag: 43,65 %) von 112,6 mmHg auf 158,8 mmHg (Nacht) bzw. von 100,1 mmHg auf 143,8 mmHg (Tag) und durch die Behandlung mit Niedrigsalzdiät und ATII um durchschnittlich 35,07 % (Nacht: 31,40 %, Tag: 38,73 %) von 107,0 mmHg auf 140,6 mmHg (Nacht) bzw. von 95,65 mmHg auf 132,7 mmHg (Tag) an. Bei der immundefizienten Rag-1 -/- KO Mauslinie kommt es durch die Behandlung mit Hochsalzdiät und ATII im Vergleich zur Basisdiät zu einem durchschnittlichen Anstieg des MAP um 49 % (Nacht: 50,52 %, Tag: 47,48 %) von 105,1 mmHg auf 158,2 mmHg (Nacht) bzw. von 94,79 mmHg auf 139,8 mmHg (Tag) und durch die Behandlung mit Niedrigsalzdiät und ATII zu einem durchschnittlichen Anstieg des MAP um 42,85 % (Nacht: 39,05 %, Tag: 46,65 %) von 105,0 mmHg auf 146,0 mmHg (Nacht) bzw. von 94,58 mmHg auf 138,7 mmHg (Tag)⁷³.

Veränderung des SBP und DBP bei Umstellung der Diät von Basis- auf Hoch- bzw. Niedrigsalzdiät ohne ATII

Da in Vergleichsarbeiten (Guzik et al. 2007) und auch in Vorarbeiten unseres Instituts (Philipp Oser, 2016)⁷⁴ der systolische und diastolische Blutdruck der C57BL/6J WT- und RAG-1 -/- KO Mäuse unter exogen zugeführtem ATII untersucht wurde und da überprüft werden soll, ob die Gleichheit beider Genotypen hinsichtlich des MAP unter den Spezi­alsalzdiäten mit und *ohne* ATII in dieser Arbeit auf ein unterschiedliches systolisches oder diastolisches Blutdruckverhalten zurückzuführen ist, sollen die Veränderungen des SBP und DBP sowohl bei Umstellung der Diät von Basis- auf Hoch- bzw. Niedrigsalzdiät-, als auch bei zusätzlicher Zufuhr von ATII zu den beiden Spezi­alsalzdiäten analysiert werden.

⁷³ Angabe der absoluten MAP-Werte, nicht aktivitätsnormiert. Berechnung der Prozentwerte mit den absoluten Werten aus Tabelle 4-1.

⁷⁴ Dissertation Philipp Oser: „MPO-T-Lymphozyten-Interaktion im Rahmen der Angiotensin-II-induzierten Hypertonie“, Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, Prof. Dr. med. Heimo Ehmke, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 2016.

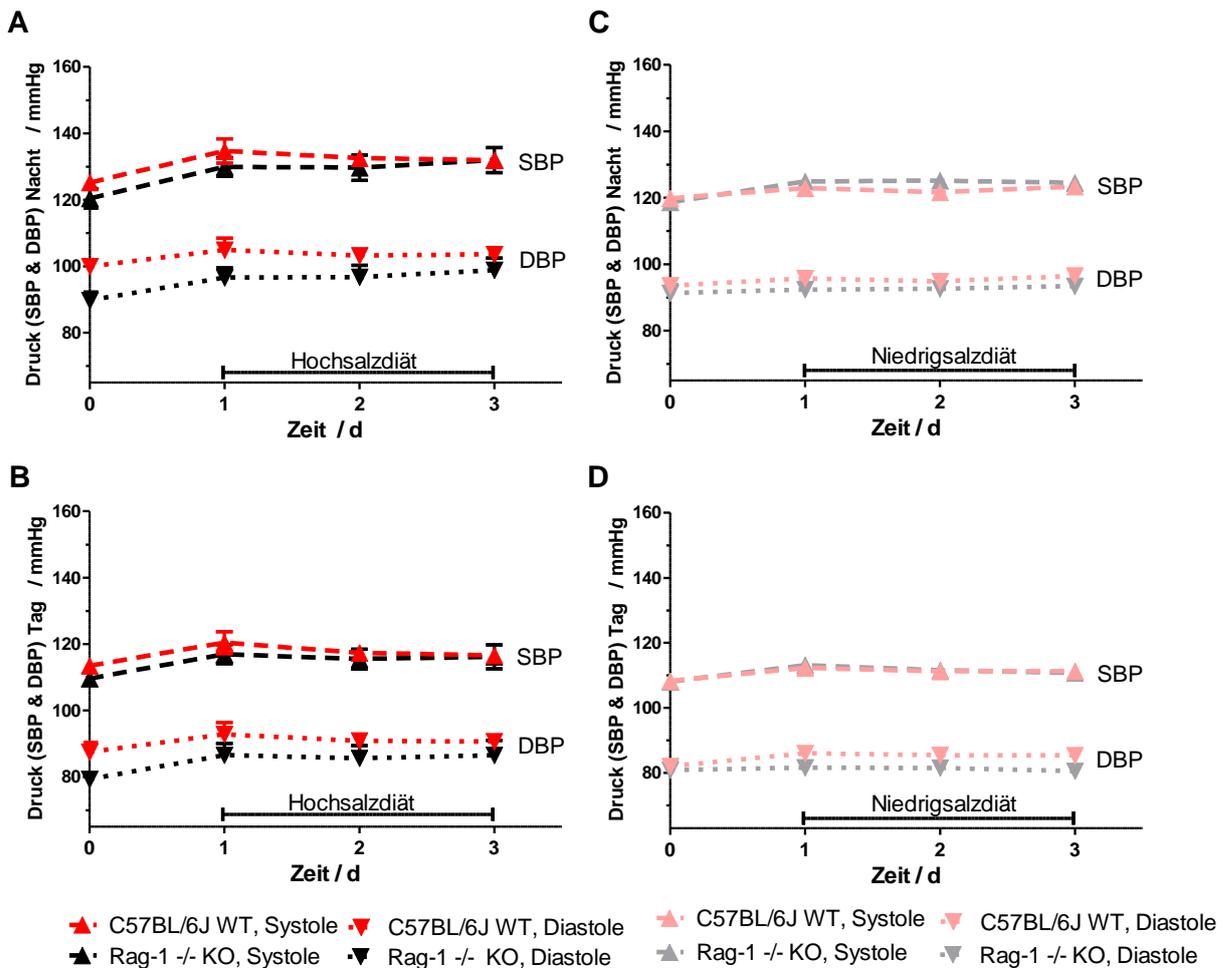


Abbildung 4-5: Veränderung des SBP und DBP bei Umstellung der Diät von Basis- auf Hoch- bzw. Nidrigsalzdiät. Die 12 Stundenwerte einer Nacht/eines Tages wurden zu einem Wert pro Nacht/Tag gemittelt, sodass sich bei einer Messung über drei Nächte/Tage jeweils drei Einzelwerte für den SBP und DBP ergeben. Der Punkt „0“ auf der Zeitachse dient als Ausgangspunkt und ist der gemittelte Blutdruckwert (SBP/DBP) aus drei Nächten und Tagen unter Basisdiät. **A**) Nächtlicher Verlauf des SBP und DBP von Basisdiät auf Hochsalzdiät ohne ATII (Faktor Genotyp, Systole: $F(1,13)=0,7068$, $p=0,4157$, Diastole: $F(1,13)=4,880$, $p=0,0457$), $n=7-8$, **B**) Täglicher Verlauf des SBP und DBP von Basisdiät auf Hochsalzdiät ohne ATII (Faktor Genotyp, Systole: $F(1,13)=0,6751$, $p=0,4261$, Diastole: $F(1,13)=3,129$, $p=0,1004$), $n=7-8$, **C**) Nächtlicher Verlauf des SBP und DBP von Basisdiät auf Nidrigsalzdiät ohne ATII (Faktor Genotyp, Systole: $F(1,14)=0,6099$, $p=0,4478$, Diastole: $F(1,14)=2,122$, $p=0,1673$), $n=8$, **D**) Täglicher Verlauf des SBP und DBP von Basisdiät auf Nidrigsalzdiät ohne ATII (Faktor Genotyp, Systole: $F(1,4)=0,004028$, $p=0,9503$, Diastole: $F(1,14)=4,194$, $p=0,0598$), $n=8$. Statistik: 2-way ANOVA, repeated measures, matching by column (alle Werte, 1 Maus befinden sich in einer Subkolumne). Bonferroni Posttest.

Die Genotypen unterscheiden sich hinsichtlich des systolischen und diastolischen Blutdruckverlaufs weder bei Umstellung der Diät von Basis- auf Hochsalzdiät, noch bei Umstellung von Basis- auf Nidrigsalzdiät signifikant voneinander. Die unabhängige Variable „Genotyp“ beeinflusst den SBP und DBP nicht (s. Abbildung 4-5 A-D, Statistik Faktor „Genotyp“). Dies gilt sowohl für die nächtliche Aktivphase, als auch die tägliche Ruhephase. Einzige Ausnahme ist der Verlauf des diastolischen Blutdrucks bei Umstellung der Diät von Basis- auf Hochsalzdiät während der Nacht. Hier ergibt die zweifaktorielle Varianzanalyse, dass der DBP des C57BL/6J WT mit $p=0,0457$ signifikant höher ist, als der DBP des Rag-1 -/- KO (s. Abbildung 4-5 A, Statistik Faktor „Genotyp“). Der Bonferroni Posttest kann jedoch nicht ermitteln, wo an den vier dargestellten Messzeitpunkten eine Signifikanz vorhanden ist.

In der Abbildung 4-5 A ist augenscheinlich zu erkennen, dass der aus drei Nächten/Tagen gemittelte DBP unter Basisdiät (Punkt „0“ auf der Zeitachse) während der Nacht und während des Tages bei den C57BL/6J WT Mäusen über dem Niveau des aus drei Nächten/Tagen gemittelten DBP der Rag-1^{-/-} KO Mäuse unter Basisdiät liegt. Der gemittelte DBP des C57BL/6J WT ist hier durchschnittlich um ca. 10 mmHg höher, als der DBP des Rag-1^{-/-} KO (nachts: 9,45 mmHg, tag: 10,36 mmHg, s. absolute Werte Tabelle 4-1). Dieser Unterschied im Ausgangspunkt für die Verläufe ist signifikant, da der Wildtyp unter Basisdiät einen signifikant höheren diastolischen Blutdruck hat als der *Knock-out* (T-Testung der gemittelten DBP-Werte, s. Tabelle 4-1). Dies erklärt den signifikant unterschiedlichen Verlauf des DBP bei Umstellung der Diät von Basis- auf Hochsalzdiät zwischen den Genotypen. Die Analyse des DBP und SBP bei Umstellung der Diät von Basis- auf Hoch- bzw. Niedrigsalzdiät hat gezeigt, dass sich die beiden Genotypen unter Basisdiät deswegen hinsichtlich des MAP unterscheiden, weil der C57BL/6J WT unter Basisdiät einen signifikant höheren diastolischen Blutdruck hat. Unter der Hochsalzdiät verschwindet dieser signifikante Unterschied. Die Veränderung des SBP und DBP bei den Mäusen beider Genotypen sind hier über die vier dargestellten Messzeitpunkte hinweg signifikant (p-Werte zwischen <0,0001 und 0,0282, nicht dargestellt). Dies ist, wie beim Verlauf des MAP bei Umstellung der Diät, auf salzbedingte Blutdruckschwankungen über die vier Messzeitpunkte hinweg zurückzuführen. Analog zum MAP kommt es augenscheinlich bei beiden Genotypen zwischen der Basisdiät und dem ersten Messzeitpunkt unter Hoch- bzw. Niedrigsalzdiät zu einem leichten Anstieg des SBP und DBP. Beide Blutdruckparameter bleiben bis zum letzten Messzeitpunkt unter den Spezialsalzdieten jedoch konstant hoch bzw. sinken wieder bis knapp über das Ausgangsniveau ab. Die Frage, ob die Spezialsalzdieten (Hoch-, Niedrigsalz) *ohne* ATII Zufuhr zu einer signifikanten Veränderung des MAP, SBP und DBP im Vergleich zu den Parametern unter Basisdiät führen, wird mit einfaktoriellen Varianzanalysen in Abbildung 4-9 (s.u.) gezeigt.

Veränderung des SBP und DBP bei exogener Zufuhr von ATII zusätzlich zur Hoch- und Niedrigsalzdiät

Um zu überprüfen, ob sich die beiden Genotypen hinsichtlich der systolischen und diastolischen Blutdruckreaktionen bei zusätzlicher, exogener ATII Zufuhr grundsätzlich voneinander unterscheiden, werden die Verläufe des SBP und DBP unter den beiden Spezialsalzdieten mit ATII Behandlung analysiert. Diese Untersuchung ist wichtig, um festzustellen, ob die Gleichheit beider Genotypen hinsichtlich des mittleren arteriellen Drucks unter zusätzlicher ATII Infusion, wie im vorherigen Abschnitt, auf ein unterschiedliches Verhalten der Genotypen im SBP und DBP zurückzuführen ist.

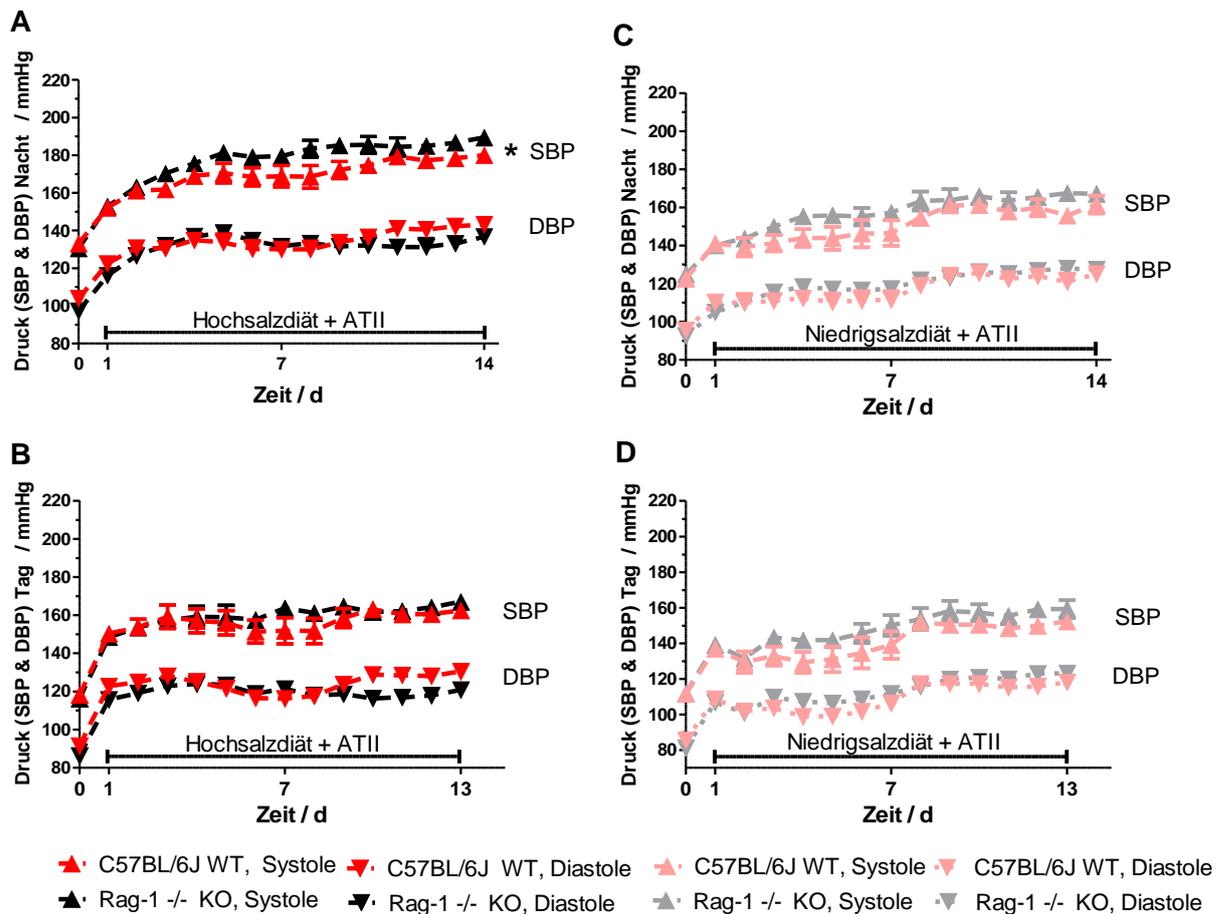


Abbildung 4-6: Veränderung des SBP und DBP durch exogene Zufuhr von ATII zusätzlich zur Hoch- und Niedrigsalzdiät. Der Punkt „0“ auf der Zeitachse dient als Ausgangswert und ist der gemittelte Wert (SBP/DBP) aus drei Nächten und Tagen unter Speziessalzdiät ohne ATII. **A**) Nächtlicher Verlauf des SBP und DBP von Hochsalzdiät ohne ATII auf Hochsalzdiät mit ATII (Faktor Genotyp, Systole: $F(1,13)=6,272$, $p=0,0262$, Diastole: $F(1,13)=0,7312$, $p=0,4080$), $n=7-8$, **B**) Täglicher Verlauf des SBP und DBP von Hochsalzdiät ohne ATII auf Hochsalzdiät mit ATII (Faktor Genotyp, Systole: $F(1,13)=0,6302$, $p=0,4415$, Diastole: $F(1,13)=1,099$, $p=0,3135$), $n=7-8$, **C**) Nächtlicher Verlauf des SBP und DBP von Niedrigsalzdiät ohne ATII auf Niedrigsalzdiät mit ATII (Faktor Genotyp, Systole: $F(1,14)=2,966$, $p=0,1070$, Diastole: $F(1,14)=0,6506$, $p=0,4334$), $n=8$, **D**) Täglicher Verlauf des SBP und DBP von Niedrigsalzdiät ohne ATII auf Niedrigsalzdiät mit ATII (Faktor Genotyp, Systole: $F(1,14)=2,237$, $p=0,1569$, Diastole: $F(1,14)=0,8457$, $p=0,3734$), $n=8$. Statistik: 2-way ANOVA, *matching by columns* (alle Werte 1 Maus befinden sich in derselben Subkolumne). Bonferroni Posttest.

Sowohl während der nächtlichen Aktiv-, als auch während der täglichen Ruhephasen kommt es bei den Mäusen beider Genotypen in beiden Diätgruppen zu einem signifikanten Blutdruckanstieg durch die exogene ATII Zufuhr (p -Wert jeweils $<0,0001$). Die Rag-1 -/- KO Mäuse erreichen dabei am Ende der ATII Zufuhr sowohl in der Hoch-, als auch in der Niedrigsalzdiätgruppe unter ATII das gleiche Blutdruckniveau, wie die C57BL/6J WT Mäuse. Die unabhängige Variable „Genotyp“ hat demnach keinen Einfluss auf die systolische oder diastolische Blutdruckantwort auf die zusätzliche ATII Zufuhr. Einzige Ausnahme ist hier der nächtliche Verlauf des SBP in der Hochsalzdiätgruppe mit ATII. Hier ist der systolische Druck des immundefizienten *Knock-out* signifikant höher, als bei dem immunkompetenten Wildtyp (s. Abbildung 4-6 A, Statistik Faktor Genotyp, Systole). Dieser signifikante Unterschied im SBP unter Hochsalzdiät mit ATII ist während der täglichen Ruhephase, sowie generell unter Niedrigsalzdiät nicht vorhanden. Unter Niedrigsalzdiät ist der Anstieg des systolischen und

diastolischen Blutdrucks bei beiden Mauslinien insgesamt geringer ausgeprägt, als unter Hochsalzdiät.

Auf Aktivität normierter SBP und DBP, Basis-, Hoch- und Niedrigsalz mit und ohne ATII

Um zu überprüfen, ob die Gleichheit beider Genotypen hinsichtlich des MAP bei einer Aktivität = 0 bzw. Aktivität > 0 auf ein unterschiedliches systolisches und diastolisches Blutdruckverhalten bei einer Aktivität = 0 und > 0 zurückzuführen ist, werden der SBP und DBP ebenfalls aktivitätsnormiert analysiert.

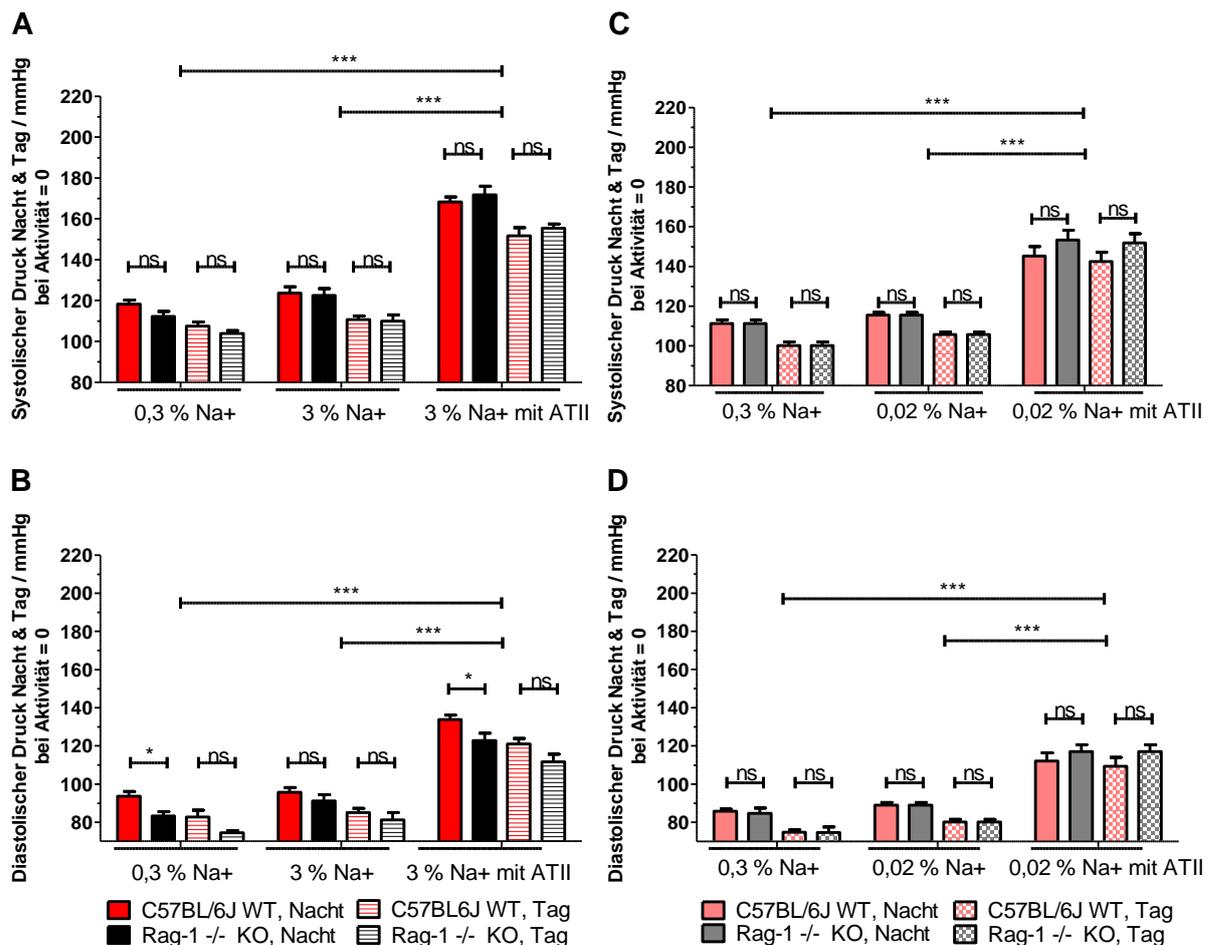


Abbildung 4-7: SBP und DBP für alle Diät- (Basis-, Hoch, Niedrigsalz) und Interventionsgruppen (mit/ohne ATII) auf eine Aktivität = 0 normiert. Die Werte ergeben sich aus den alle fünf Minuten gemessenen (pro Nacht/Tag jeweils insgesamt 144) Blutdruckdaten, die nach „Aktivität = 0“ und „Aktivität > 0“ sortiert und zu einem Wert pro Nacht/Tag gemittelt wurden. Bei einer Messung über 72 h ergeben sich jeweils drei Werte pro Diät und Intervention und pro Aktivitätsgrad. Diese Werte wurden abermals zu einem Nacht- und Tages-Wert pro Diät und Intervention und pro Aktivitätsgrad zusammengefasst. **A**) SBP Basis- Hochsalz mit/ohne ATII (Faktor Genotyp Nacht: $F(1,13)=0,4795$, $p=0,5008$, Tag: $F(1,13)=0,01151$, $p=0,9162$), $n=7-8$, **B**) DBP Basis- Hochsalz mit/ohne ATII (Faktor Genotyp Nacht: $F(1,13)=14,57$, $p=0,0021$, Tag: $F(1,13)=7,760$, $p=0,0154$), $n=7-8$, **C**) SBP Basis- Niedrigsalz mit/ohne ATII (Faktor Genotyp Nacht: $F(1,14)=1,121$, $p=0,3077$, Tag: $F(1,14)=1,381$, $p=0,2595$), $n=8$, **D**) DBP Basis- Niedrigsalz mit/ohne ATII (Faktor Genotyp Nacht: $F(1,14)=0,2718$, $p=0,6103$, Tag: $F(1,14)=0,8701$, $p=0,3667$), $n=8$. Statistik: 2-way ANOVA, repeated measures, matching by columns (alle Werte 1 Maus befinden sich in der derselben Subkolonne). Bonferroni Posttest.

Bei einer Aktivität = 0 gibt es hinsichtlich des systolischen Blutdrucks unter Basis-, Hoch- und Niedrigsalzdiät mit oder ohne ATII keinen signifikanten Unterschied zwischen den

Genotypen. Dies gilt sowohl für die Nacht, als auch für den Tag. Hier hat die *unabhängige* Variable „Genotyp“ keinen Einfluss auf das systolische Blutdruckniveau (s. Abbildung 4-7 Statistik A und C Faktor „Genotyp“, Nacht und Tag). Augenscheinlich ist das Niveau des SBP, das durch die zusätzliche ATII Behandlung erreicht wird, sowohl in der Hoch-, als auch in der Niedrigsalzdiätgruppe bei dem immundefizienten Rag-1 *-/-* KO etwas höher als bei dem immunkompetenten C57BL/6J WT (s. Abbildung 4-7 A und C, s. Tabelle 4-1). Dasselbe gilt nur bedingt für den diastolischen Blutdruck bei einer Aktivität = 0. Unter Niedrigsalzdiät mit und *ohne* ATII, sowie bei den Mäusen in der Basisdiätgruppe, die später auch Niedrigsalzdiät mit und *ohne* ATII erhielten, gibt es, ebenso wie bei dem SBP, zwischen den Genotypen keinen Unterschied hinsichtlich der Höhe des diastolischen Blutdrucks (s. Abbildung 4-7 D, Statistik). Im Gegensatz dazu gibt es bei den Mäusen in der Basisdiätgruppe, die im Verlauf Hochsalzdiät mit und *ohne* ATII erhielten, einen signifikanten Unterschied zwischen dem DBP des C57BL/6J WT und dem DBP des Rag-1 *-/-* KO. Hier ist der diastolische Blutdruck der Wildtypmäuse signifikant höher als der diastolische Druck der *Knock-out*-Mäuse. Dies gilt für die Basisdiätgruppe zumindest für die nächtliche Aktivphase. Das Ergebnis ist konsistent mit den in Abbildung 4-1 A und 4-5 A gezeigten und beschriebenen Ergebnissen. Bei einer Aktivität = 0 zeigt sich hier auch ein signifikanter Unterschied in der Höhe des DBP unter Hochsalzdiät mit ATII während der Nacht. Demnach ist auch hier der diastolische Blutdruck bei dem C57BL/6J WT signifikant höher, als bei dem Rag-1 *-/-* KO (s. Abbildung 4-7 B, Statistik Faktor „Genotyp“, Nacht), Vgl. absolute Werte Tabelle 4-1). Im Verlauf über 14 Nächte war dieser Unterschied im diastolischen Blutdruckniveau nicht signifikant (s. Abbildung 4-6 A und B, Statistik). Allerdings ist in Abbildung 4-6 A und B zu erkennen, dass der DBP während der ersten Tage unter Hochsalzdiät mit ATII bei beiden Genotypen gleich hoch ist, bei dem C57BL/6J WT während der letzten drei bis vier Tage unter ATII jedoch über das Niveau des DBP von dem Rag-1 *-/-* KO steigt. Da in Abbildung 4-7 die absoluten Werte aus eben diesen letzten drei Tagen unter ATII zu einem Wert gemittelt wurden, fällt dieser Unterschied hier signifikant aus.

Ähnliche Ergebnisse zeigen der systolische und diastolische Blutdruck der Mäuse beider Genotypen bei einer Aktivität > 0.

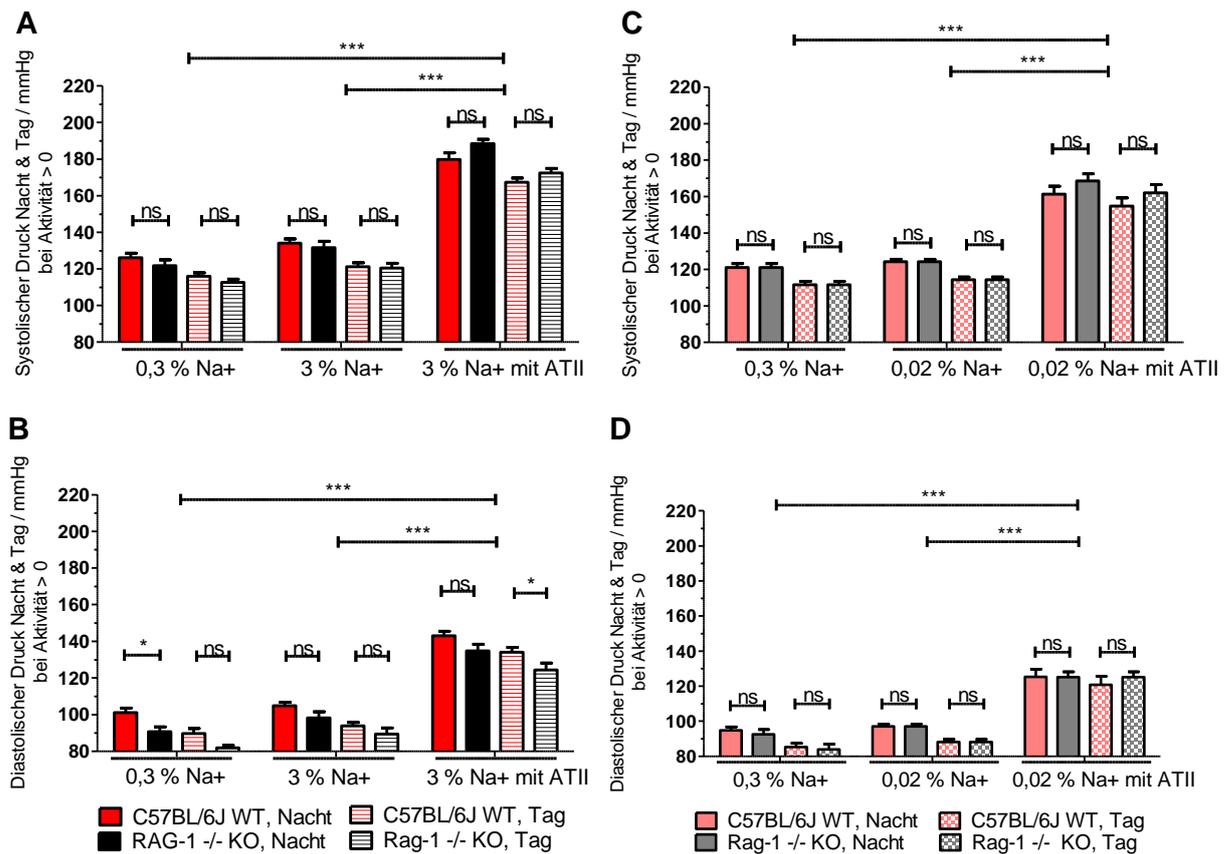


Abbildung 4-8: SBP und DBP für alle Diät- (Basis-, Hoch- und Niedrigsalzdiät)- und Interventionsgruppen (mit/ohne ATII) auf eine Aktivität > 0 normiert. Die Werte ergeben sich aus den alle fünf Minuten gemessenen (pro Nacht/Tag jeweils insgesamt 144) Blutdruckdaten, die nach „Aktivität = 0“ und „Aktivität > 0“ sortiert und zu einem Wert pro Nacht/Tag gemittelt wurden. Bei einer Messung über 72 h ergeben sich jeweils drei Nacht- und Tag-Werte pro Diät und Intervention und pro Aktivitätsgrad. Diese Werte wurden abermals zu einem Wert pro Diät und Intervention und pro Aktivitätsgrad zusammengefasst. **A**) SBP Basis- und Hochsalzdiät mit/ohne ATII (Faktor Genotyp Nacht: $F(1,13)=0,05467$, $p=0,8188$, Tag: $F(1,13)=0,0208$, $p=0,8873$), $n=7-8$, **B**) DBP Basis- und Hochsalzdiät mit/ohne ATII (Faktor Genotyp Nacht: $F(1,13)=10,98$, $p=0,0056$, Tag: $F(1,13)=10,44$, $p=0,0066$), $n=7-8$, **C**) SBP Basis- und Niedrigsalzdiät mit/ohne ATII (Faktor Genotyp Nacht: $F(1,14)=0,8608$, $p=0,3692$, Tag: $F(1,14)=0,6904$, $p=0,4200$), $n=8$, **D**) DBP Basis- und Niedrigsalzdiät mit/ohne ATII (Faktor Genotyp Nacht: $F(1,14)=0,09189$, $p=0,7662$, Tag: $F(1,14)=0,08524$, $p=0,7746$), $n=8$. Statistik: 2-way ANOVA, repeated measures, matching by columns. Bonferroni Posttest.

Wie auch bei einer Aktivität = 0 gibt es bei einer Aktivität > 0 hinsichtlich des systolischen Blutdrucks keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mauslinien unter Basis-, Hoch- und Niedrigsalzdiät mit oder ohne ATII. Dies gilt sowohl für die Nacht, als auch für den Tag (s. Abbildung 4-8 A und C, Statistik Faktor „Genotyp“, Nacht und Tag). Augenscheinlich liegt das Niveau des SBP bei dem Rag-1 -/- KO bei einer Aktivität > 0 sowohl unter Hoch-, als auch unter Niedrigsalzdiät mit zusätzlicher ATII Behandlung nachts- und tagsüber über dem Niveau des SBP der Wildtypmäuse (s. Abbildung 4-8 A und C, Vgl. absolute Werte Tabelle 4-1). Für den diastolischen Druck gilt bei einer Aktivität > 0 für die Basisdiätgruppe, die später Niedrigsalzdiät mit/ohne ATII erhielt, und für die Niedrigsalzdiätgruppen mit und ohne ATII, dass sich die Genotypen nicht signifikant voneinander unterscheiden (s. Abbildung 4-8 D). Im Gegensatz dazu haben die C57BL/6J WT- Mäuse der Basisdiätgruppe, die später auch Hochsalzdiät mit/ohne ATII erhielten, bei einer Aktivität > 0, ebenso wie bei einer Aktivität = 0, einen signifikant höheren DBP als die Rag-1 -/- KO-Mäuse. Zudem zeigt sich

hier, dass der Wildtyp bei einer Aktivität > 0 , ebenso wie bei einer Aktivität $= 0$, unter Hochsalzdiät mit ATII tagsüber ebenfalls einen signifikant höheren diastolischen Blutdruck im Vergleich zu dem *Knock-out* aufweist. Erwartungsgemäß führt die ATII Behandlung bei beiden Genotypen sowohl unter Hoch-, als auch unter Niedrigsalzdiät zu einem signifikanten Anstieg des SBP und DBP im Vergleich zum SBP und DBP unter Hoch- oder Niedrigsalzdiät *ohne* ATII bzw. im Vergleich zum SBP und DBP unter Basisdiät (p-Wert jeweils $< 0,0001$). Da aktuelle Arbeiten zeigen, dass immundefiziente Rag-1 $-/-$ KO Mäuse vor einer DOCA-Salz induzierten Hypertonie geschützt sind (Batchu et al. 2016) soll abschließend geklärt werden, ob es *ohne* exogene ATII Zufuhr auch nur durch die Gabe der Speziessalzdiäten (Hoch-, Niedrigsalz) allein bei den Tieren beider Mauslinien zu einer signifikanten Blutdruckveränderung in den Parametern MAP, SBP und DBP kommt.

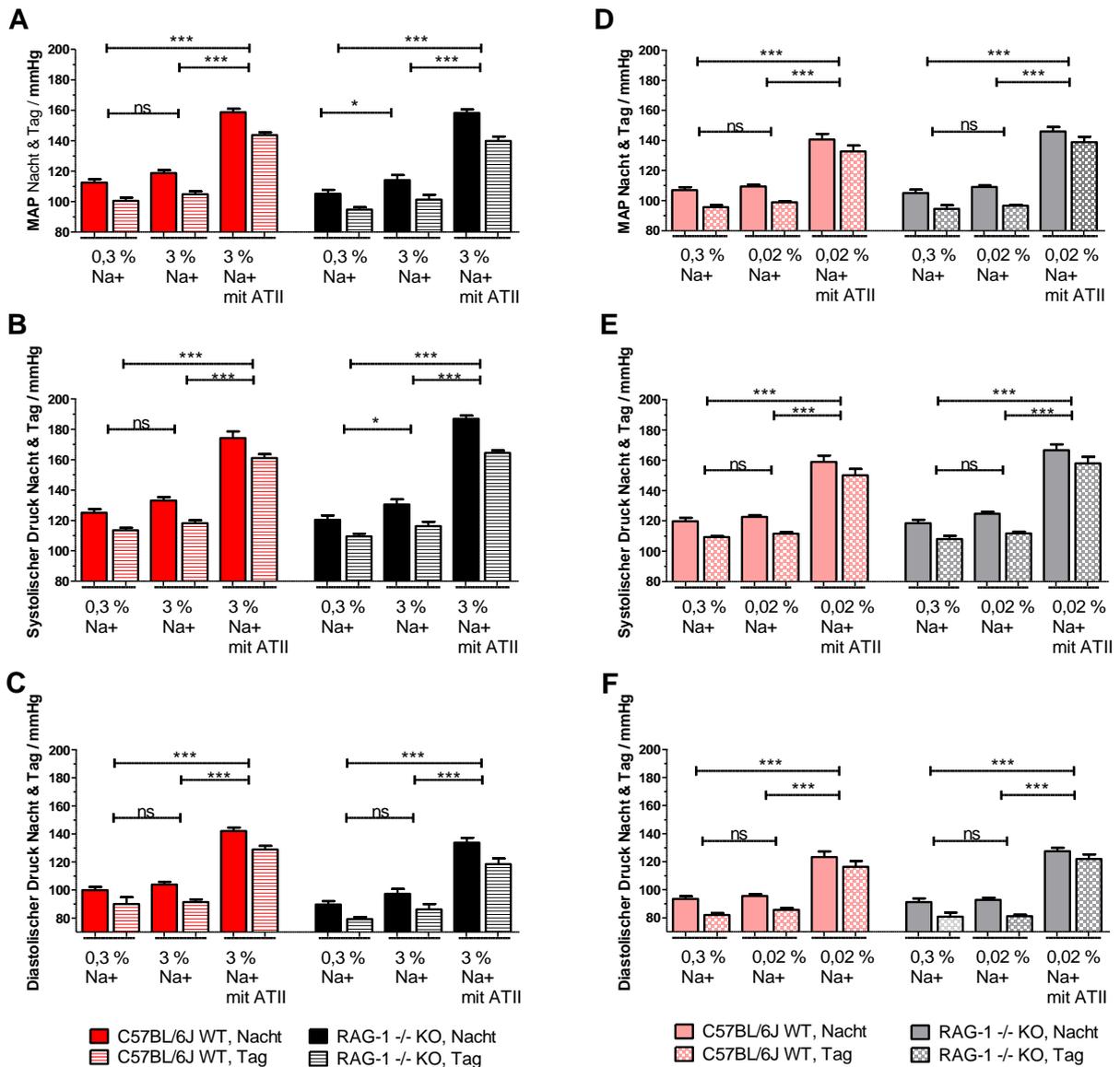


Abbildung 4-9: Veränderung des MAP, SBP und DBP bei beiden Genotypen über die Spezialsalzdiäten (Basis-, Hoch- und Niedrigsalz) und Interventionen (mit/ohne ATII) hinweg. Aus drei Nächten/Tagen unter Spezialsalzdiät bzw. aus den letzten drei Nächten/Tagen unter ATII gemittelte absolute Werte. **A)** MAP Basis-, Hochsalz mit/ohne ATII für C57BL/6J WT (Nacht: $F(2,7)=140,1$, $p<0,0001$, Tag: $F(2,7)=141,5$, $p<0,0001$, $n=8$) und Rag-1 -/- KO (Nacht: $F(2,6)=132,6$, $p<0,0001$, Tag: $F(2,6)=103,0$, $p<0,0001$, $n=7$). **B)** SBP Basis-, Hochsalz mit/ohne ATII für C57BL/6J WT (Nacht: $F(2,7)=72,14$, $p<0,0001$, Tag: $F(2,7)=210,0$, $p<0,0001$, $n=8$) und Rag-1 -/- KO (Nacht: $F(2,6)=167,6$, $p<0,0001$, Tag: $F(2,6)=229,1$, $p<0,0001$, $n=7$). **C)** DBP Basis-, Hochsalz mit/ohne ATII für C57BL/6J WT (Nacht: $F(2,7)=104,9$, $p<0,0001$, Tag: $F(2,6)=36,31$, $p<0,0001$, $n=8$) und Rag-1 -/- KO (Nacht: $F(2,6)=76,42$, $p<0,0001$, Tag: $F(2,6)=48,07$, $p<0,0001$, $n=7$). **D)** MAP Basis-, Niedrigsalz mit/ohne ATII für C57BL/6J WT (Nacht: $F(2,7)=57,36$, $p<0,0001$, Tag: $F(2,7)=81,65$, $p<0,0001$, $n=8$) und Rag-1 -/- KO (Nacht: $F(2,6)=101,4$, $p<0,0001$, Tag: $F(2,6)=133,3$, $p<0,0001$, $n=7$). **E)** SBP Basis-, Niedrigsalz mit/ohne ATII für C57BL/6J WT (Nacht: $F(2,7)=63,52$, $p<0,0001$, Tag: $F(2,7)=105,1$, $p<0,0001$, $n=8$) und Rag-1 -/- KO (Nacht: $F(2,6)=105,8$, $p<0,0001$, Tag: $F(2,6)=127,3$, $p<0,0001$, $n=7$). **F)** DBP Basis-, Niedrigsalz mit/ohne ATII für C57BL/6J WT (Nacht: $F(2,7)=46,30$, $p<0,0001$, Tag: $F(2,7)=57,95$, $p<0,0001$, $n=8$) und Rag-1 -/- KO (Nacht: $F(2,6)=86,85$, $p<0,0001$, Tag: $F(2,6)=139,9$, $p<0,0001$, $n=7$). Statistik: 1-way ANOVA, repeated measures. Newman-Keuls Posttest.

Die Blutdruckparameter (MAP, SBP und DBP) unterscheiden sich bei den Mäusen beider Genotypen jeweils zwischen den drei Diät- und Interventionsgruppen (Basis-, Hochsalzdiät mit und ohne ATII einerseits und Basis-, Niedrigsalzdiät mit und ohne ATII andererseits) signifikant voneinander (s. Abbildung 4-9 A bis F, Statistik). Mithilfe des Newman-Keuls

Posttest wurde aufgedeckt, dass es sowohl in der Hoch-, als auch in der Nidrigsalzdiätgruppe durch die ATII Zufuhr bei beiden Genotypen jeweils zu einem signifikanten Blutdruckanstieg gegenüber 1. der Basisdiät- und 2. der Speziatsalzdiät *ohne* ATII kommt. Die beiden Speziatsalzdiäten (Hoch- oder Nidrigsalzdiät) *ohne* ATII führen hingegen in der Regel nicht zu einer signifikanten Veränderung des MAP, SBP oder DBP gegenüber den Basisdiätgruppen.

Ausnahme ist hier die Hochsalzdiätgruppe der Rag-1 *-/-* KO Mauslinie, bei der der MAP und der SBP unter Hochsalzdiät *ohne* ATII signifikant höher sind, als der MAP und SBP unter Basisdiät (s. Abbildung 4-9 A und B, s. Tabelle 4-1).

Vergleich von MAP, SBP und DBP zwischen der (Basis-)Hoch- und Niedrigsalzdiät mit und ohne ATII

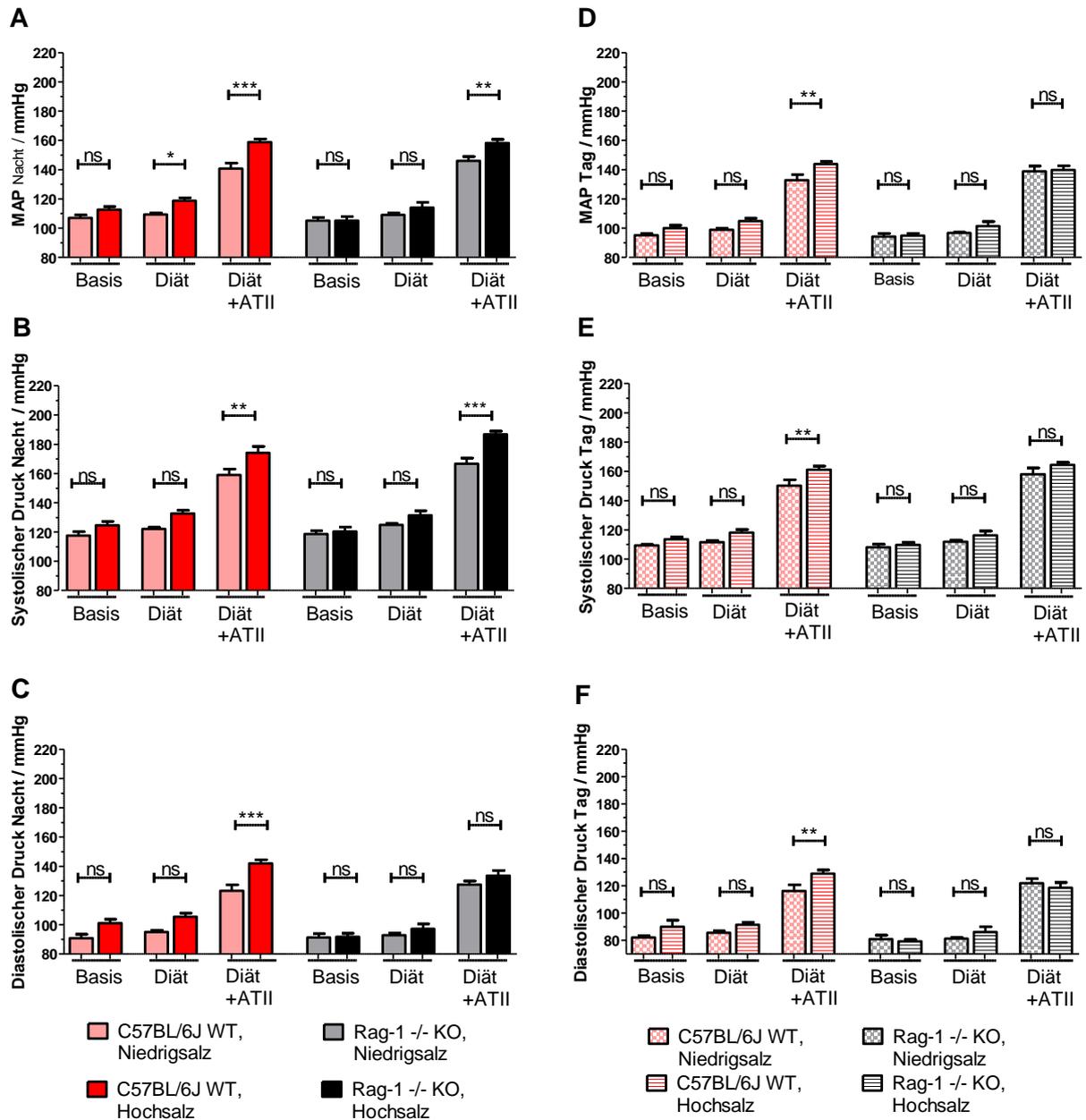


Abbildung 4-10 Vergleich der absoluten Blutdruckwerte des MAP, SBP und DBP zwischen Basis-, Hoch- und Niedrigsalzdiät mit und ohne ATII, Nacht und Tag. **A**) MAP Nacht alle Diät- und Interventionsgruppen (Faktor Diät, C57BL/6J WT: $F(1,14)=33,52$, $p<0,0001$, $n=8$, Rag-1 -/- KO: $F(1,13)=5,791$, $p=0,0317$, $n=7$), **B**) SBP Nacht alle Diät- und Interventionsgruppen (Faktor Diät, C57BL/6J WT: $F(1,14)=16,70$, $p=0,0011$, $n=8$, Rag-1 -/- KO: $F(1,13)=14,64$, $p=0,0021$, $n=7$), **C**) DBP Nacht alle Diät- und Interventionsgruppen (Faktor Diät, C57BL/6J WT: $F(1,14)=27,45$, $p=0,0001$, $n=8$, Rag-1 -/- KO: $F(1,13)=1,354$, $p=0,2655$, $n=7$), **D**) MAP Tag alle Diät- und Interventionsgruppen (Faktor Diät, C57BL/6J WT: $F(1,14)=16,76$, $p=0,0011$, $n=8$, Rag-1 -/- KO: $F(1,13)=0,7666$, $p=0,3972$, $n=7$), **E**) SBP Tag alle Diät- und Interventionsgruppen (Faktor Diät, C57BL/6J WT: $F(1,13)=10,57$, $p=0,0058$, $n=8$, Rag-1 -/- KO: $F(1,13)=2,808$, $p=0,1176$, $n=7$), **F**) DBP Tag alle Diät- und Interventionsgruppen (Faktor Diät, C57BL/6J WT: $F(1,14)=13,76$, $p=0,0023$, $n=8$, Rag-1 -/- KO: $F(1,13)=0,001970$, $p=0,9653$, $n=7$). Statistik: 2-way ANOVA, repeated measures, matching by column. Bonferroni Posttest.

Bei dem immunkompetenten Wildtyp sind die drei Blutdruckparameter (MAP, SBP und DBP) bei Gabe von zwei hypertensiven Stimuli (Hochsalzdiät mit ATII) sowohl während der nächtlichen Aktiv-, als auch während der täglichen Ruhephase signifikant höher, als bei der

Gabe von lediglich einem hypertensiven Stimulus, sprich als unter Nidrigsalzdiät mit ATII (s. Abbildung 4-10 A bis F, Statistik Faktor Diät).

Das gleiche gilt nur bedingt für die immundefiziente Rag-1 ^{-/-} KO-Mauslinie. Hier beeinflusst die *unabhängige Variable* „Diät“ nur den MAP und SBP signifikant. Demnach sind der MAP und SBP unter zwei hypertensiven Stimuli wie Hochsalzdiät und ATII signifikant höher, als bei einem hypertensiven Stimulus wie Nidrigsalzdiät mit ATII. Wenngleich der DBP unter Hochsalzdiät mit ATII augenscheinlich auch höher ist, als unter Nidrigsalzdiät mit ATII (s. Abbildung 4-10 A bis F, s. absolute Werte Tabelle 4-1), so ist dieser Unterschied hier nicht signifikant. Der signifikante Einfluss der Diät bei zusätzlicher, exogener ATII Zufuhr beeinflusst bei dem Rag-1 ^{-/-} KO den MAP und SBP, im Unterschied zu dem immunkompetenten C57BL/6J WT, auch nur während der nächtlichen Aktivphase (s. Abbildung 4-10 A-F, Statistik Faktor Diät). Unter Hochsalzdiät *ohne* ATII haben die Tiere beider Mauslinien keinen signifikant höheren Blutdruck, als unter Nidrigsalzdiät ohne ATII.

4.2.2. Herzfrequenz (HF) und Aktivität

Um zu untersuchen, ob sich der fehlende Unterschied im Blutdruck (MAP, SBP, DBP) zwischen den beiden Genotypen auch in der Herzfrequenz und Aktivität zeigt, werden beide Parameter unter allen Diät- (Basis-, Hoch- und Nidrigsalz) und Interventionsgruppen (mit/ohne ATII) analysiert.

| Herzfrequenz [bpm] Mean +/- SEM, 95% Konfidenzintervall | C57BL/6J WT | Rag-1 ^{-/-} KO | Signifikanz |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------|
| Basisdiät (Gruppe, die im Verlauf Nidrigsalz mit/ohne ATII erhielt) | | | |
| Nacht | 530,5 +/- 23,05 [476,0-585,0] | 511,9 +/- 19,26 [466,4-557,5] | ns |
| Tag | 478,2 +/- 14,19 [444,6-511,7] | 458,2 +/- 20,92 [408,7-507,6] | ns |
| Basisdiät (Gruppe, die im Verlauf Hochsalz mit/ohne ATII erhielt) | | | |
| Nacht | 522,2 +/- 17,90 [479,9-564,6] | 515,3 +/- 15,33 [477,8-552,8] | ns |
| Tag | 454,2 +/- 11,10 [427,9-480,4] | 464,9 +/- 10,81 [438,5-491,4] | ns |
| Nidrigsalzdiät | | | |
| Nacht | 546,2 +/- 21,65 [495,0-597,3] | 536,5 +/- 16,74 [496,9-576,0] | ns |
| Tag | 489,5 +/- 15,24 [453,5-525,6] | 462,7 +/- 11,15 [436,4-489,1] | ns |
| Hochsalzdiät | | | |
| Nacht | 570,1 +/- 13,07 [539,2-601,0] | 545,7 +/- 17,72 [502,3-589,0] | ns |

| Herzfrequenz [bpm] Mean +/- SEM, 95% Konfidenzintervall | C57BL/6J WT | Rag-1 -/- KO | Signifikanz |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------|
| Tag | 498,6 +/- 8,961 [477,4-519,8] | 469,8 +/- 13,37 [437,1-502,5] | ns |
| Niedrigsalzdiät mit ATII | | | |
| Nacht | 566,2 +/- 18,16 [523,3-609,2] | 554,2 +/- 14,23 [520,6-587,9] | ns |
| Tag | 512,7 +/- 15,18 [476,8-548,6] | 485,8 +/- 8,108 [466,6-505,0] | ns |
| Hochsalzdiät mit ATII | | | |
| Nacht | 571,1 +/- 14,03 [537,9-604,3] | 580,7 +/- 7,864 [561,5-600,0] | ns |
| Tag | 510,4 +/- 4,499 [499,8-521,0] | 512,0 +/- 16,34 [472,0-552,0] | ns |

Tabelle 4-2: Absolute Werte Herzfrequenz unter allen Diäten und Interventionen. Absolute Werte jeweils gemittelt aus den drei Nächten/Tagen unter Basis- bzw. Spezialsalzdiät (Hoch-/Niedrigsalz) und aus den letzten drei Nächten/Tagen unter Spezialsalzdiät mit ATII. Statistik: 2-way ANOVA, *repeated measures, matching by column* jeweils für Nacht und Tag, Faktor „Genotyp“. Bonferroni Posttest.

Sowohl unter Basis-, als auch unter Hoch- und Niedrigsalzdiät mit oder *ohne* ATII unterscheiden sich die Mäuse beider Genotypen weder bei einer Aktivität = 0 (Ruhefrequenz), noch bei einer Aktivität > 0 hinsichtlich ihrer Herzfrequenz signifikant voneinander. Demnach hat die *unabhängige Variable* „Genotyp“ keinen Einfluss auf die Herzfrequenz.

Dies gilt sowohl für die Nacht, als auch für den Tag (s. Abbildung 4-11 A-F, Statistik Faktor Genotyp, Nacht und Tag).

Anzumerken ist, dass trotz nicht signifikanter zweifaktorieller Varianzanalyse der Bonferroni Posttest einen signifikanten Unterschied zwischen dem C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO hinsichtlich der nächtlichen Ruhefrequenz (Herzfrequenz = 0) unter Hochsalzdiät mit ATII anzeigt. Demnach ist die Herzfrequenz des Rag-1 -/- KO unter Hochsalzdiät und ATII bei einer Aktivität = 0 nachts mit 544,31 bpm um ca. 54 bpm signifikant höher, als die Ruhefrequenz des C57BL/6J WT mit 490,60 bpm.

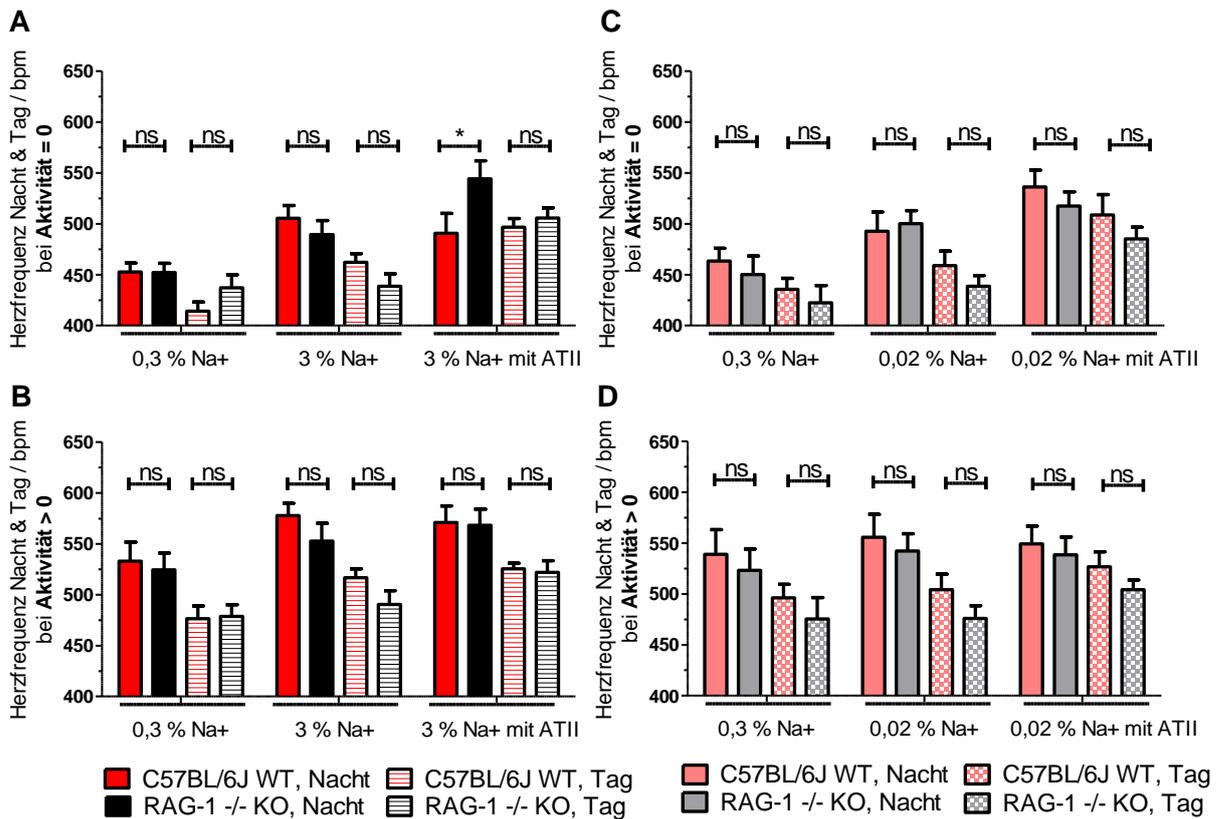


Abbildung 4-11: Herzfrequenz für alle Diät- und Interventionsgruppen auf eine Aktivität = 0 und > 0 normiert. Die Werte ergeben sich aus den alle fünf Minuten gemessenen (pro Nacht/Tag jeweils insgesamt 144) Blutdruckdaten, die nach „Aktivität = 0“ und „Aktivität > 0“ sortiert und zu einem Wert pro Nacht/Tag gemittelt wurden. Bei einer Messung über 72 h ergeben sich jeweils drei Nacht- und Tag-Werte pro Diät und Intervention und pro Aktivitätsgrad. Diese Werte wurden abermals zu einem Wert pro Diät und Intervention und pro Aktivitätsgrad zusammengefasst **A**) HF Basis- und Hochsalzdiät mit/ohne ATII bei Aktivität = 0 (Faktor Genotyp, Nacht: $F(1,13)=1,449$, $p=0,2501$, Tag: $F(1,13)=0,05867$, $p=0,8124$), $n=7-8$, **B**) HF Basis- und Hochsalzdiät mit/ohne ATII bei Aktivität > 0 (Faktor Genotyp, Nacht: $F(1,13)=0,7062$, $p=0,4159$, Tag: $F(1,13)=0,6796$, $p=0,4246$), $n=7-8$, **C**) HF Basis- und Niedrigsalzdiät mit/ohne ATII bei Aktivität = 0 (Faktor Genotyp Nacht: $F(1,14)=0,2378$, $p=0,6333$, Tag: $F(1,14)=1,234$, $p=0,2853$), $n=8$, **D**) HF Basis- und Niedrigsalzdiät mit/ohne ATII bei Aktivität > 0 (Faktor Genotyp Nacht: $F(1,14)=0,3732$, $p=0,5511$, Tag: $F(1,14)=2,122$, $p=0,1627$), $n=8$. Statistik: 2-way ANOVA, repeated measures, matching by columns. Bonferroni Posttest.

Entsprechend des GraphPad Prism *Statistics Guide*, wonach auf ein signifikantes Ergebnis des Posttests bei Diskrepanz zu einem nicht signifikanten Ergebnis im Omnibus-Test vertraut werden kann, wird das Ergebnis des Bonferroni Posttests dargestellt. Ein aufgrund der Diskrepanz zwischen dem globalen Test und dem Posttest durchgeführter T-Test ergibt mit $p=0,0444$ ein dem Bonferroni Posttest entsprechendes Ergebnis. Bei beiden Genotypen verändert sich die Herzfrequenz über die Diäten (Basis-, Hoch-, Niedrigsalz) und Interventionen (mit/ohne ATII) hinweg signifikant (p -Werte zwischen $<0,0001$ bis $0,0285$, nicht dargestellt).

Grundsätzlich wird die Herzfrequenz, ebenso wie die Blutdruckparameter, am meisten durch die exogene ATII Zufuhr beeinflusst⁷⁵.

⁷⁵ Die absoluten Werte der Herzfrequenz für die Nächte und Tage unter den jeweiligen Diät (Basis-, Hoch-, Niedrigsalzdiät) und Interventionen (mit/ohne ATII) wurden zu einem Wert pro Diät/Intervention gemittelt. Aus

Einzige Ausnahme ist hier der C57BL/6J WT unter Basis- bzw. Hochsalzdiät mit/*ohne* ATII. Hier erfolgt der stärkste Herzfrequenzanstieg vor allem durch die Umstellung der Diät von Basis- auf Hochsalzdiät (+46,15 bpm), wohingegen sich die Herzfrequenz durch die zusätzliche Gabe von ATII zur Hochsalzdiät weniger stark (+6,4 bpm) verändert (s. Tabelle 4-2).

Vergleich Herzfrequenz zwischen (Basis-)Niedrig- und Hochsalzdiät mit und *ohne* ATII

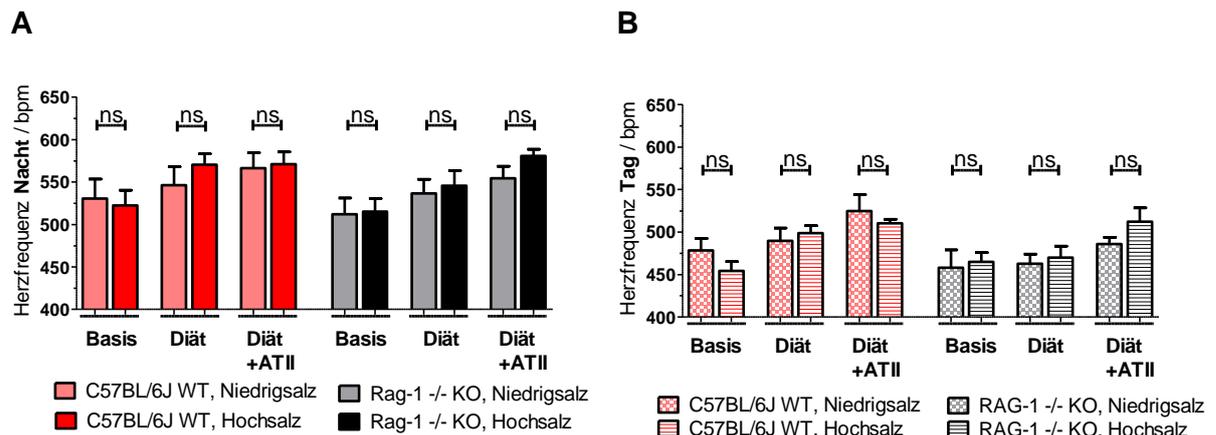


Abbildung 4-12: Vergleich der absoluten Herzfrequenzen zwischen Basis-, Hoch- und Niedrigsalzdiät mit und *ohne* ATII, Nacht und Tag. Die 12 Einstundenwerte pro Nacht/Tag wurden zu einem Wert pro Nacht/Tag gemittelt. Bei einer Messung über drei Nächte/Tage unter Speziessalzdiät bzw. über die letzten drei Nächte/Tage unter Speziessalzdiät mit ATII ergeben sich für die Herzfrequenz jeweils drei gemittelte Nacht- und Tag-Einzelwerte pro Diät und Intervention. Diese drei Werte wurden abermals zu einem Wert gemittelt, sodass sich ein Wert pro Diät/Intervention jeweils ein Wert für die Nacht und den Tag ergibt. **A**) HF Nacht alle Diät- und Interventionsgruppen (Faktor Diät, C57BL/6J WT: $F(1,14)=0,1008$, $p=0,7555$, $n=8$, Rag-1 -/- KO: $F(1,13)=0,5888$, $p=0,4566$, $n=7$), **B**) HF Tag alle Diät- und Interventionsgruppen (Faktor Diät, C57BL/6J WT: $F(1,14)=0,4802$, $p=0,4997$, $n=8$, Rag-1 -/- KO: $F(1,13)=1,131$, $p=0,3069$, $n=7$). Statistik: 2-way ANOVA, repeated measures, matching by column. Bonferroni Posttest.

Bei beiden Genotypen hat die Art der Diät (Hoch- oder Niedrigsalzdiät), anders als bei den Blutdruckparametern, weder nachts-, noch tagsüber einen signifikanten Einfluss auf die absolute Höhe der Herzfrequenz (s. Abbildung 4-12, Statistik Faktor Diät).

Aktivität unter Basis-, Hoch- und Niedrigsalzdiät mit und *ohne* ATII

Die *unabhängige Variable* „Genotyp“ hat bei beiden Mauslinien keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität. Weder unter Basis-, noch unter Hoch- und Niedrigsalzdiät mit oder *ohne* ATII unterscheiden sich die Genotypen hinsichtlich ihrer Aktivität. Dies gilt sowohl für die nächtliche Aktivitäts-, als auch für die tägliche Ruhephase (s. Tabelle 4-3, s. Abbildung 4-13 A und B, Statistik Faktor „Genotyp“, Nacht und Tag).

diesen gemittelten Werten wurden 1. die Differenzen zwischen Speziessalzdiät *ohne* ATII minus Basisdiät und 2. die Differenzen zwischen Speziessalzdiät mit ATII minus Speziessalzdiät *ohne* ATII berechnet. Auf diese Weise kann ermittelt werden, ob die Speziessalzdiät oder die ATII Behandlung den größeren Einfluss auf die Herzfrequenz hat.

| Aktivität [counts/min] Mean +/- SEM, 95% Konfidenzintervall | C57BL/6J WT | Rag-1 -/- KO | Signifikanz |
|---|---------------------------------------|---|-------------|
| Basisdiät (Gruppe, die im Verlauf Niedrigsalzdiät mit/ohne ATII erhält) | | | |
| Nacht | 19,10 +/- 3,627 [10,52-27,67] | 12,99 +/- 0,9329 [10,79-15,20] | ns |
| Tag | 5,506 +/- 0,9068 [3,362-7,650] | 4,027 +/- 0,4555 [2,950-5,104] | ns |
| Basisdiät (Gruppe, die im Verlauf Hochsalzdiät mit/ohne ATII erhält) | | | |
| Nacht | 14,47 +/- 1,350 [11,28-17,66] | 13,26 +/- 1,189 [10,35-16,17] | ns |
| Tag | 3,558 +/- 0,3699 [2,638-4,433] | 4,247 +/- 0,5912 [2,800-5,693] | ns |
| Niedrigsalzdiät | | | |
| Nacht | 18,12 +/- 3,711 [9,344-26,89] | 14,64 +/- 1,546 [10,98-18,29] | ns |
| Tag | 5,729 +/- 0,6785 [4,124-7,333] | 4,680 +/- 0,5638 [3,347-6,014] | ns |
| Hochsalzdiät | | | |
| Nacht | 15,38 +/- 1,375 [12,13-18,63] | 15,66 +/- 1,502 [11,98-19,34] | ns |
| Tag | 5,401 +/- 0,7496 [3,629-7,174] | 5,200 +/- +/- 0,4705 [4,049-6,351] | ns |
| Niedrigsalzdiät mit ATII | | | |
| Nacht | 15,12 +/- 3,050 [7,910-22,33] | 16,77 +/- 2,219 [11,52-22,02] | ns |
| Tag | 4,986 +/- 0,6928 [3,347-6,624] | 4,561 +/- 0,6845 [2,942-6,179] | ns |
| Hochsalzdiät mit ATII | | | |
| Nacht | 14,53 +/- 0,7246 [12,81-16,24] | 14,15 +/- 3,249 [6,203-22,10] | ns |
| Tag | 5,412 +/- 1,111 [2,784-8,039] | 4,467 +/- 1,045 [1,911-7,024] | ns |

Tabelle 4-3: Absolute Werte Aktivität unter allen Diäten und Interventionen. Absolute Werte jeweils gemittelt aus den drei Nächten/Tagen unter Basis- bzw. Spezialsalzdiät (Hoch-/Niedrigsalz) und aus den letzten drei Nächten/Tagen unter Spezialsalzdiät mit ATII. Statistik: 2-way ANOVA, *repeated measures, matching by column*, Faktor „Genotyp“ für Nacht und Tag, Bonferroni Posttest.

Augenscheinlich ist gut zu erkennen, dass die Aktivität beider Genotypen während des Tages deutlich geringer ist, als während der Nacht (s. Abbildung 4-13 A und B). Dieser Unterschied ist bei beiden Mauslinien sowohl unter Basis-, als auch unter Hoch- und Niedrigsalzdiät mit und *ohne* ATII signifikant (T-Tests mit p-Werten jeweils <0,0001). Dies spricht für einen erhaltenen Tag-/Nachtrhythmus.

Die Aktivität ist zudem *unabhängig* von der ATII Behandlung. Sie verändert sich bei beiden Genotypen über die Diäten und Interventionen hinweg nicht signifikant (1-way ANOVAs mit Newman-Keuls Posttest jeweils für Rag-1 -/- KO und C57BL/6J WT, sowie jeweils für Nacht und Tag mit p-Werten zwischen 0,0834 bis 0,7979).

Der Blutdruckanstieg, sowie die Herzfrequenzsteigerung nach ATII Zufuhr sind bei beiden Genotypen demnach nicht durch eine bloße Erhöhung der Aktivität unter ATII zu erklären.

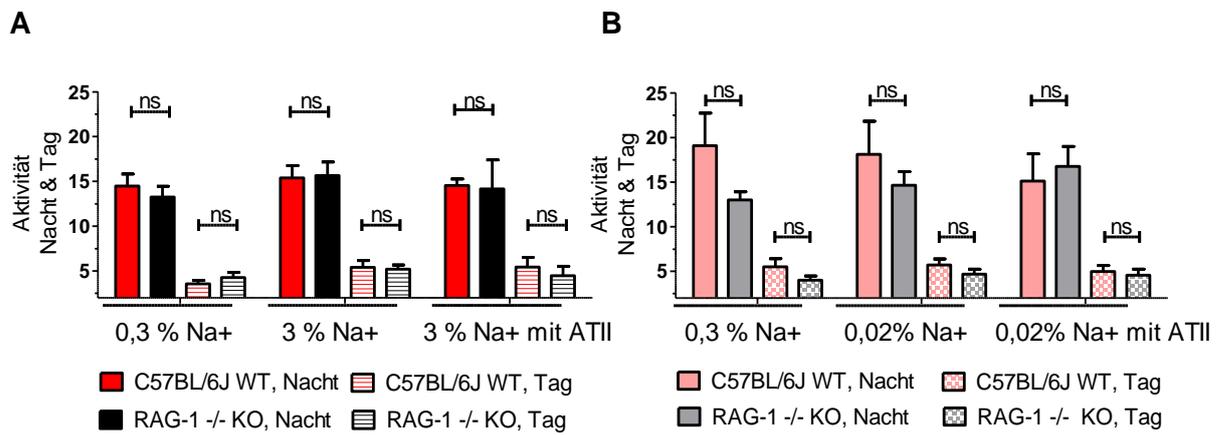


Abbildung 4-13: Absolute Werte Aktivität unter allen Diät (Basis-, Hoch-, Niedrigsalz)- und Interventionsgruppen (mit/ohne ATII). Die 12 Einstundenwerte pro Nacht/Tag wurden zu einem Wert pro Nacht/Tag. Bei einer Messung über drei Nächte/Tage unter Spezialsalzdiät bzw. über die letzten drei Nächte/Tage unter Spezialsalzdiät mit ATII ergeben sich für die Aktivität pro Nacht/Tag jeweils drei gemittelte Werte pro Diät und Intervention. Diese drei Werte wurden abermals zu einem Wert gemittelt, sodass sich ein Wert pro Nacht/Tag und pro Diät/Intervention ergibt. **A)** Aktivität Basis- und Hochsalzdiät mit/ohne ATII, Nacht/Tag (Faktor Genotyp, Nacht: $F(1,13)=0,05998$, $p=0,8104$, Tag: $F(1,13)=0,0479$, $p=0,8301$), $n=7-8$, **B)** Aktivität Basis- und Niedrigsalzdiät mit/ohne ATII, Nacht/Tag (Faktor Genotyp, Nacht: $F(1,14)=0,5426$, $p=0,4735$, Tag: $F(1,14)=1,250$, $p=0,2824$), $n=7$. Statistik: 2-way ANOVA, repeated measures, matching by column. Bonferroni Posttest.

Die Aktivität ist zudem bei beiden Genotypen *unabhängig* von der Art der Diät (s. Abbildung 4-14 und Statistik Faktor Diät).

Vergleich Aktivität zwischen (Basis-)Niedrig- und Hochsalzdiät mit und *ohne* ATII

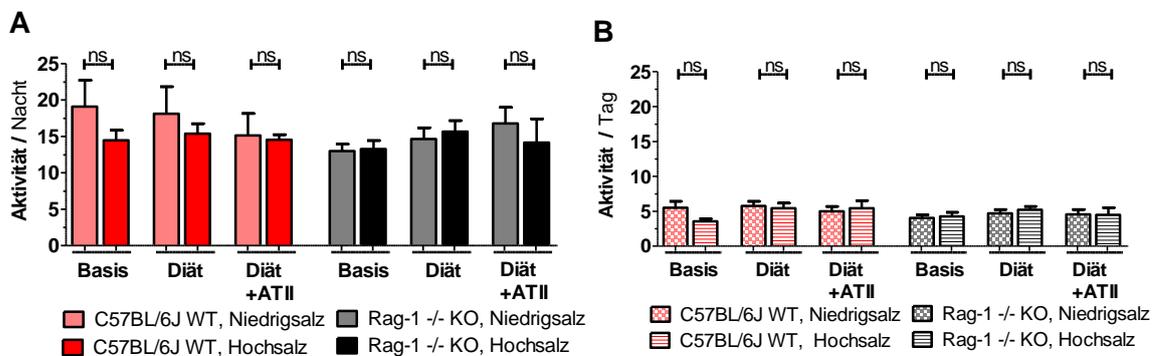


Abbildung 4-14: Vergleich der Aktivitäten zwischen Basis-, Hoch- und Niedrigsalzdiät mit und *ohne* ATII, Nacht und Tag. Die 12 Einstundenwerte pro Nacht/Tag wurden zu einem Wert pro Nacht/Tag gemittelt. Bei einer Messung über drei Nächte/Tage unter Spezialsalzdiät bzw. über die letzten drei Nächte/Tage unter Spezialsalzdiät mit ATII ergeben sich für die Aktivität pro Nacht/Tag jeweils drei gemittelte Einzelwerte pro Diät und Intervention. Diese drei Werte wurden abermals zu einem Wert gemittelt, sodass sich ein Wert pro Nacht/Tag und pro Diät/Intervention ergibt. **A)** Aktivität Nacht alle Diät- und Interventionsgruppen (Faktor Diät, C57BL/6J WT: $F(1,14)=0,5982$, $p=0,4521$, $n=8$, Rag-1 -/- KO: $F(1,13)=0,04386$, $p=0,8374$, $n=7$), **B)** Aktivität Tag alle Diät- und Interventionsgruppen (Faktor Diät, C57BL/6J WT: $F(1,14)=0,5989$, $p=0,4519$, $n=8$, Rag-1 -/- KO: $F(1,13)=0,07991$, $p=0,7819$, $n=7$). Statistik: 2-way ANOVA, repeated measures, matching by column. Bonferroni Posttest.

4.2.3. Zusammenfassung Blutdruckdaten

- Die beiden Genotypen unterscheiden sich grundsätzlich weder unter Hoch-, noch unter Niedrigsalzdiät mit oder *ohne* ATII hinsichtlich des MAP, SBP und DBP signifikant voneinander. Lediglich in der Basisdiätgruppe, die im Verlauf auch

Hochsalzdiät mit und *ohne* ATII erhielt, und auch unter Hochsalzdiät mit ATII hat der immunkompetente C57BL/6J WT einen signifikant höheren, auf die Aktivität normierten, diastolischen Blutdruck als der Rag-1 *-/-* KO. Dieser signifikant höhere DBP der Wildtypmäuse erklärt den signifikant höheren MAP des C57BL/6J WT unter Basisdiät. Trotz signifikant höherem DBP des C57BL/6J WT unter Hochsalzdiät mit ATII unterscheiden sich die beiden Mauslinien dennoch nicht hinsichtlich ihres MAP unter Hochsalzdiät mit ATII, da der immundefiziente Rag-1 *-/-* KO unter Hochsalzdiät mit ATII einen höheren systolischen Blutdruck aufweist.

- Die Zufuhr von exogenem ATII zusätzlich zu den beiden Spezialsalzdiäten führt bei beiden Genotypen zu einem signifikanten Anstieg des Blutdrucks. Beide Mauslinien entwickeln eine Grad II Hypertonie. Der immundefiziente Rag-1 *-/-* KO ist demnach nicht vor einer ATII induzierten Hypertonie geschützt.
- Unter Hochsalzdiät *ohne* exogene ATII Zufuhr entwickeln die Mäuse beider Genotypen eine Grad I Hypertonie. Bei dem Rag-1 *-/-* KO ist der Anstieg des MAP und SBP unter Hochsalzdiät *ohne* ATII im Vergleich zur Basisdiät signifikant. Im Gegensatz dazu führt die Hochsalzdiät *ohne* ATII bei dem C57BL/6J WT zu keinem signifikanten Anstieg der Blutdruckparameter. Die Niedrigsalzdiät führt hingegen *ohne* exogene ATII Zufuhr weder bei dem Rag-1 *-/-* KO, noch bei dem C57BL/6J WT zu einer signifikanten Veränderung des Blutdrucks.
- Die Salzkonzentration im Futter (Niedrig- oder Hochsalzdiät) hat in Kombination mit ATII einen signifikanten Einfluss auf die Blutdruckparameter. Bei beiden Genotypen ist der Blutdruck (SBP, MAP, DBP) unter Einfluss von zwei hypertensiven Stimuli (Hochsalzdiät+ATII) signifikant höher, als unter Einfluss von einem hypertensiven Stimulus (Niedrigsalzdiät+ATII). Ausgenommen ist hier der DBP des Rag-1 *-/-* KO, der durch die exogene Salzzufuhr in Kombination von ATII nicht signifikant beeinflusst wird.

Herzfrequenz und Aktivität

- Die beiden Genotypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Herzfrequenz grundsätzlich weder unter Basis-, noch unter Hoch- bzw. unter Niedrigsalzdiät mit oder *ohne* ATII signifikant voneinander. Lediglich unter Hochsalzdiät mit ATII hat der Rag-1 *-/-* KO während der nächtlichen Aktivphase eine höhere Ruhefrequenz (Herzfrequenz bei Aktivität = 0) als der C57BL/6J WT.
- Die Herzfrequenz verändert sich bei beiden Genotypen vor allem durch die ATII Behandlung signifikant. Ausnahme ist der C57BL/6J WT, bei dem vor allem die Hochsalzdiät zu einem starken Anstieg der Herzfrequenz führt (+46,15bpm), die ATII Behandlung jedoch nicht (+6,4bpm).
- Die Salzkonzentration im Futter (Diät) hat keinen Einfluss auf die Höhe der Herzfrequenz.

- Hinsichtlich der Aktivität unterscheiden sich die Genotypen weder unter Basis-, noch unter Niedrig- und Hochsalzdiät mit oder *ohne* ATII signifikant voneinander. Dabei wird die Aktivität bei beiden Genotypen weder durch die Art der Diät, noch durch die exogene ATII Zufuhr signifikant beeinflusst, sodass der Anstieg der Blutdruckparameter und der Herzfrequenz unter ATII Behandlung bei beiden Mauslinien *unabhängig* von der Aktivität sind und nicht auf eine bloße Aktivitätszunahme der Tiere zurückgeführt werden können.

4.3. Untersuchung von Plasma und Urin

4.3.1. Hormone des systemischen RAAS (Plasma)

Plasma-Aldosteronkonzentration unter Basis-, Hoch- und Niedrigsalzdiät

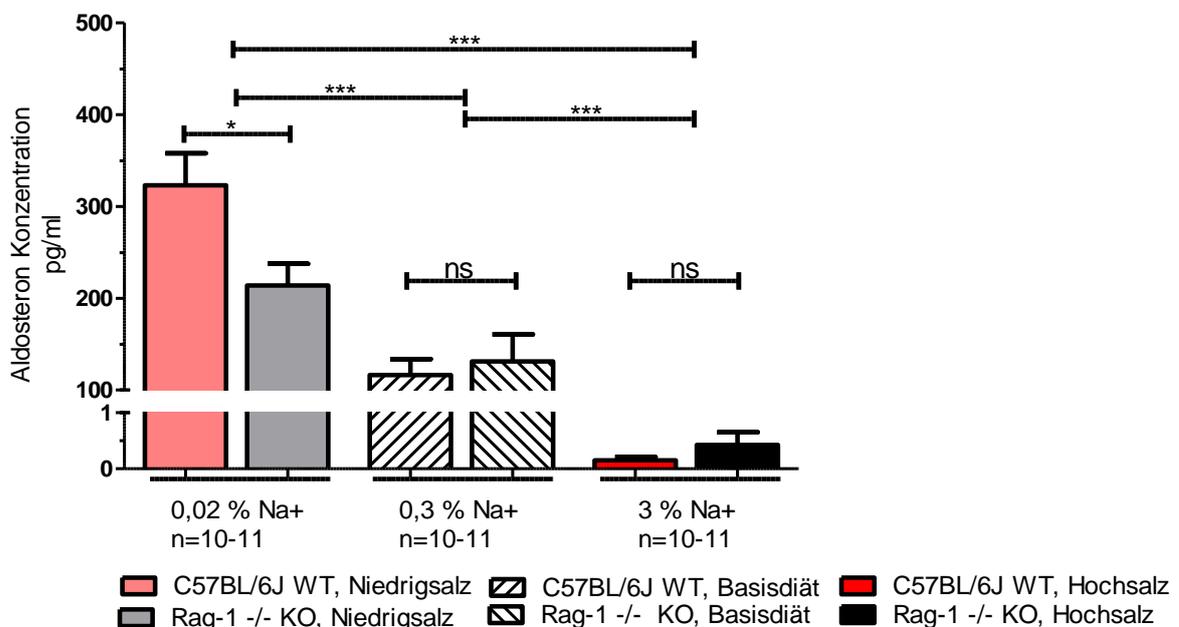


Abbildung 4-15: Plasma-Aldosteronkonzentration für Basis-, Niedrig- und Hochsalzdiät ohne ATII. C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO im Vergleich. Niedrigsalzdiät: 1. Faktor Genotyp: $F(1,38)=3,118$, $p=0,0855$, 2. Faktor Niedrigsalzdiät: $F(1,38)=29,40$, $p<0,0001$, Hochsalzdiät: 1. Faktor Genotyp: $F(1,38)=0,2065$, $p=0,6521$, 2. Faktor Hochsalzdiät: $F(1,38)=54,58$, $p<0,0001$. Statistik: 2way ANOVA, *not repeated measures*. Bonferroni Posttest.

Der Genotyp hat keinen signifikanten Einfluss auf die Aldosteronkonzentration im Plasma (s. Abbildung 4-15 Statistik Faktor „Genotyp“ unter Hoch- und Niedrigsalzdiät). Allerdings findet der Bonferroni Posttest einen signifikanten Unterschied zwischen dem C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO unter Niedrigsalzdiät, wonach die Aldosteronkonzentration im Plasma nach Hochregulierung unter Niedrigsalzdiät im Rag-1 -/- KO niedriger ist, als die Aldosteronkonzentration im Plasma im C57BL/6J WT. Aufgrund der Diskrepanz zwischen dem nicht signifikanten Ergebnis des Omnibus-Tests und dem signifikanten Ergebnis des Posttests wurde ein weiterer ungepaarter T-Test durchgeführt. Dieser ergibt mit $p=0,0167$

dasselbe Ergebnis, wie der Bonferoni Posttest. Beide Spezialsalzdiäten haben im Vergleich zur Basisdiät jeweils einen signifikanten Einfluss auf die Aldosteronkonzentration im Plasma (s. Abbildung 4-15 Statistik Faktor „Niedrigsalzdiät“ und Faktor „Hochsalzdiät“). Auch der direkte Vergleich der Niedrig- und Hochsalzdiätgruppen ergibt für beide Mauslinien, dass die Aldosteronkonzentration unter Hochsalzdiät signifikant niedriger ist, als unter Niedrigsalzdiät (jeweils ungepaarte T-Testungen, C57BL/6J WT: $p < 0,0001$, Rag-1 $-/-$ KO: $p = 0,0002$).

Plasma-Reninaktivität (PRA) und Quotient aus Renin mRNA : L32 mRNA : L32 mRNA

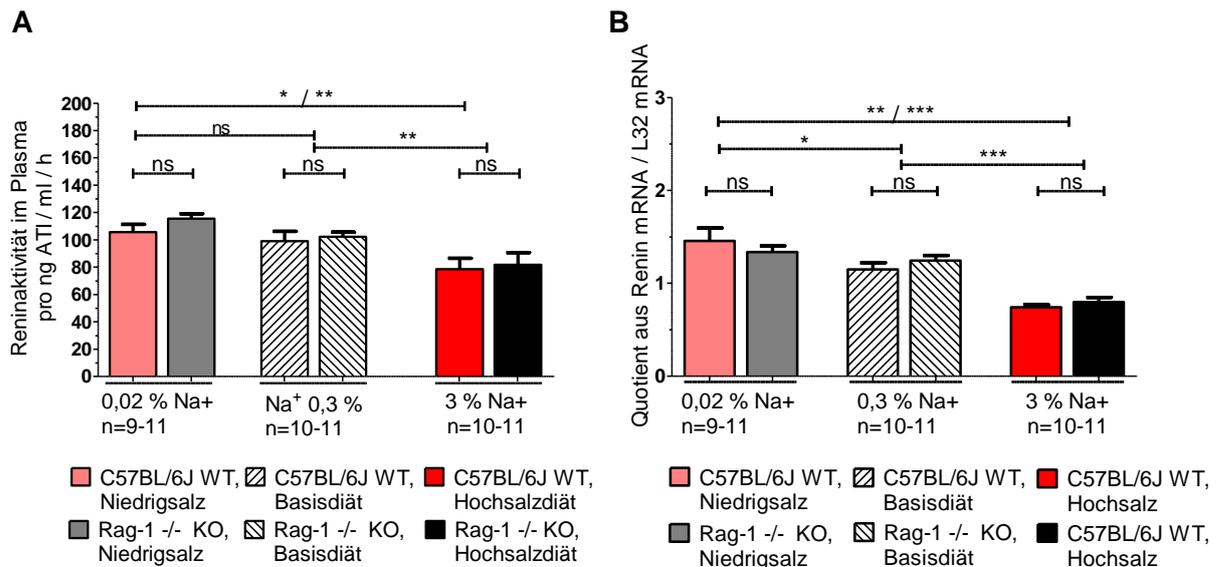


Abbildung 4-16: Reninaktivität im Plasma und Quotient Renin/L32 mRNA unter Basis-, Niedrig- und Hochsalzdiät ohne ATII. C57BL/6J WT und Rag-1 $-/-$ KO im Vergleich. **A**) Reninaktivität im Plasma unter Niedrigsalzdiät: 1. Faktor Genotyp: $F(1,37)=1,606$, $p=0,2130$, 2. Faktor Niedrigsalzdiät $F(1,37)=3,589$, $p=0,0660$ und unter Hochsalzdiät: Faktor Genotyp: $F(1,38)=0,1998$, $p=0,6575$, 2. Faktor Hochsalzdiät: $F(1,38)=7,826$, $p=0,0080$, **B**) Quotient aus Renin/L32 mRNA unter Niedrigsalzdiät: 1. Faktor Genotyp: $F(1,38)=0,01707$, $p=0,8968$, 2. Faktor Niedrigsalzdiät: $F(1,38)=4,921$, $p=0,0326$ und unter Hochsalzdiät: 1. Faktor Genotyp: $F(1,38)=1,873$, $p=0,1793$, 2. Faktor Hochsalzdiät: $F(1,38)=60,91$, $p < 0,0001$, Statistik: 2-way ANOVA, not repeated measures. Bonferoni Posttest.

Zwischen dem immunkompetenten WT und der immundefizienten KO Mauslinie gibt es weder unter Basis-, noch unter Niedrig- oder Hochsalzdiät einen statistischen Unterschied hinsichtlich der PRA (s. Abbildung 4-16 A und B Statistik Faktor Genotyp). Die Hochsalzdiät führt bei den Tieren beider Mauslinien zu einer signifikanten Erniedrigung der PRA im Vergleich zur Basisdiät (s. Abbildung 4-16 A, Statistik Faktor Hochsalzdiät, $p=0,0080$). Die Niedrigsalzdiät hingegen führt im Vergleich zur Basisdiät bei beiden Genotypen zu keinem signifikanten Anstieg der PRA (s. Abbildung 4-16 A, Statistik Faktor Niedrigsalzdiät, $p=0,0600$). In den Niedrigsalzdiätgruppen ist die Plasma-Reninaktivität erwartungsgemäß signifikant höher als in den Hochsalzdiätgruppen (ungepaarter T-Test: C57BL/6J WT: $p=0,0135$, Rag-1 $-/-$ KO: $p=0,0071$). Ergänzend zur PRA wurde in dieser Arbeit auch die Renin mRNA Menge aus den Nieren der Mäuse bestimmt. Zur Normierung auf die eingesetzte mRNA Menge wurde der Quotient aus Renin mRNA und L32 mRNA gebildet (s.

Abbildung 4-16 B). Das Housekeeping Gen L32 wird *unabhängig* von der zugeführten Salzkonzentration⁷⁶ und *unabhängig* von dem Genotyp exprimiert⁷⁷ (nicht dargestellt).

Der Renin mRNA / L32 mRNA Quotient zeigt, dass sowohl die Niedrig-, als auch die Hochsalzdiät im Vergleich zur Basisdiät bei beiden Genotypen zu einer signifikant veränderten Expression der Renin mRNA führt (s. Abbildung 4-16 B Statistik Faktor „Niedrigsalzdiät“ und Faktor „Hochsalzdiät“). Auch der direkte Vergleich der Spezielsalzdiäten führt erwartungsgemäß zu dem Ergebnis, dass die Nieren der Niedrigsalzdiätgruppen beider Mauslinien signifikant mehr Renin mRNA exprimieren, als die Nieren beider Mauslinien unter Hochsalzdiät (*ungepaarter T-Test*: C57BL/6J WT: $p=0,0011$, Rag-1 -/- KO: $p<0,0001$). Wie auch bei der PRA hat der Faktor „Genotyp“ keinen signifikanten Einfluss auf die abhängige Variable „Renin mRNA Menge“ (s. Abbildung 4-16 B Statistik Faktor Genotyp).

Zusammenfassend haben die unterschiedlich stark konzentrierten Salzdiäten erfolgreich zu unterschiedlichen Aktivitätszuständen des systemischen RAAS in den Versuchstieren beider Genotypen geführt. Grundsätzlich gibt es zwischen den Mauslinien hinsichtlich der Hochregulierung oder Supprimierung der Hormone des RAAS keinen signifikanten Unterschied mit Ausnahme der Plasma-Aldosteronkonzentration unter Niedrigsalzdiät. Hier ist die Aldosteronkonzentration im Plasma beim Rag-1 -/- KO signifikant niedriger hochreguliert, als beim C57BL/6J WT.

⁷⁶ einfaktorielle Varianzanalysen mit Newmankeuls Posttest: 1. C57BL/6J WT $F(2,28)=0,5732$, $p=0,5702$, 2. Rag-1 -/- KO $F(2,29)=0,2252$, $p=0,7998$.

⁷⁷ Zweifaktorielle Varianzanalysen mit Bonferroni Posttest: 1. Für Hochsalzdiät, Faktor Genotyp: $F(1,39)=1,327$, $p=0,2568$, 2. Für Niedrigsalzdiät, Faktor Genotyp: $F(1,36)=0,002229$, $p=0,9626$.

4.3.2. Kreatinin-Clearance, Wasser- und Elektrolythaushalt, Stoffwechselkäfige

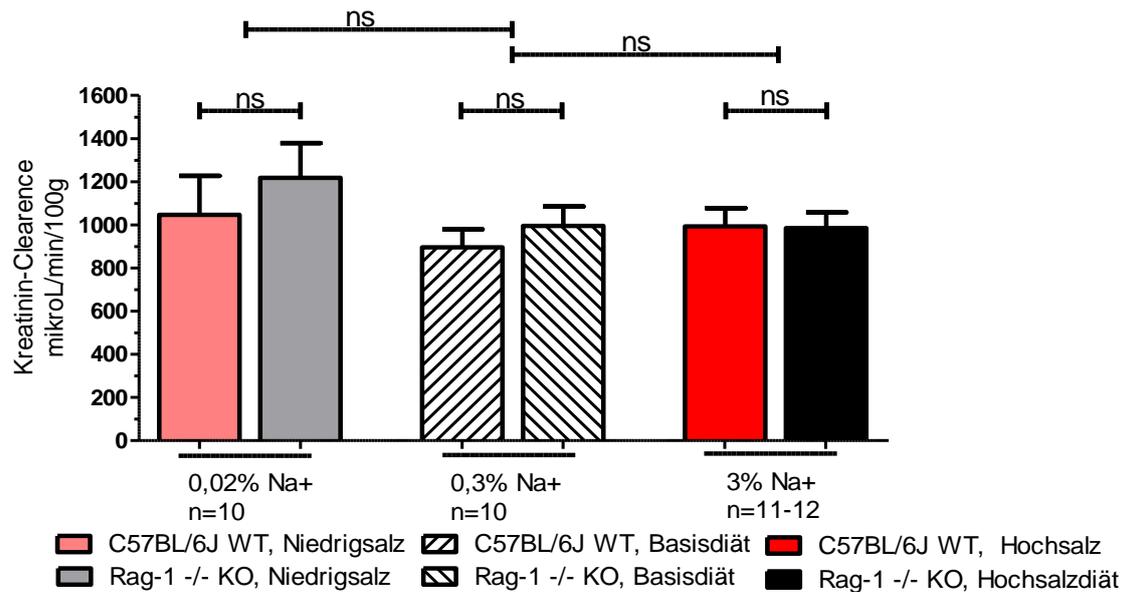


Abbildung 4-17: Kreatinin-Clearance [$\mu\text{L}/\text{min}$] auf 100 g Mausgewicht normiert als Surrogat für die Nierenfunktion unter Niedrig-, Basis- und Hochsalzdiät ohne ATII für C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO im Vergleich. Für Niedersalzdiet gilt: 1. Faktor Genotyp: $F(1,36)=0,9910$, $p=0,3261$, 2. Faktor Niedersalzdiet: $F(1,36)=1,892$, $p=0,1775$, für Hochsalzdiet gilt: 1. Faktor Genotyp: $F(1,39)=0,2938$, $p=0,5909$, 2. Faktor Hochsalzdiet: $F(1,39)=0,2739$, $p=0,6037$. Statistik: 2-way ANOVA, not repeated measures. Bonferroni Posttest.

Die beiden Genotypen unterscheiden sich weder unter Basis-, noch unter Niedrig- oder Hochsalzdiät ohne ATII hinsichtlich ihrer Nierenfunktion signifikant voneinander. Die unabhängige Variable „Genotyp“ hat demnach keinen Einfluss auf die Kreatinin-Clearance (s. Abbildung 4-17 Statistik Faktor „Genotyp“ für Niedrig- und Hochsalzdiät). Ebenso wenig haben die Spezialediäten bei beiden Mauslinien keinen signifikanten Effekt auf die Nierenfunktion (s. Abbildung 4-17 Statistik Faktor „Niedrigsalz“ und Faktor „Hochsalz“). Die Abwesenheit des Immunsystems bei dem Rag-1 -/- KO führt per se folglich weder bei hochreguliertem, noch bei supprimiertem RAAS und auch nicht unter physiologischen Bedingungen (Basisdiät) zu einer im Vergleich zum immunkompetenten C57BL/6J WT veränderten Nierenfunktion. Hätte es zwischen den Genotypen einen Unterschied hinsichtlich der Nierenfunktion gegeben, hätten etwaige Blutdruckunterschiede darauf zurückgeführt werden können. Da zwischen den beiden Mauslinien jedoch weder unter Niedrig-, noch unter Hochsalzdiät *ohne* zusätzliche ATII Infusion signifikante Blutdruckunterschiede gemessen worden sind, wurde die Kreatinin-Clearance der Versuchstiere unter Spezialediät mit ATII nicht mehr bestimmt, da eventuell zu findende Unterschiede offenbar nicht blutdruckrelevant sind.

Mit dem Futter aufgenommene Salzmenge (Elektrolyteinfuhr)

Mithilfe der zuvor aus der Differenz zwischen dem Gewicht der frisch befüllten Futterraufen und dem Gewicht der Futterraufe nach 24 h⁷⁸ berechneten Futtermengen in [g] und der Kenntnis über die Diätzusammensetzung (Na⁺-, K⁺- und Cl⁻ - Konzentration in [mg] / [kg] Diät) konnte die pro Tag aufgenommene Elektrolyt-Menge berechnet werden.

Natriumchlorid Einfuhr

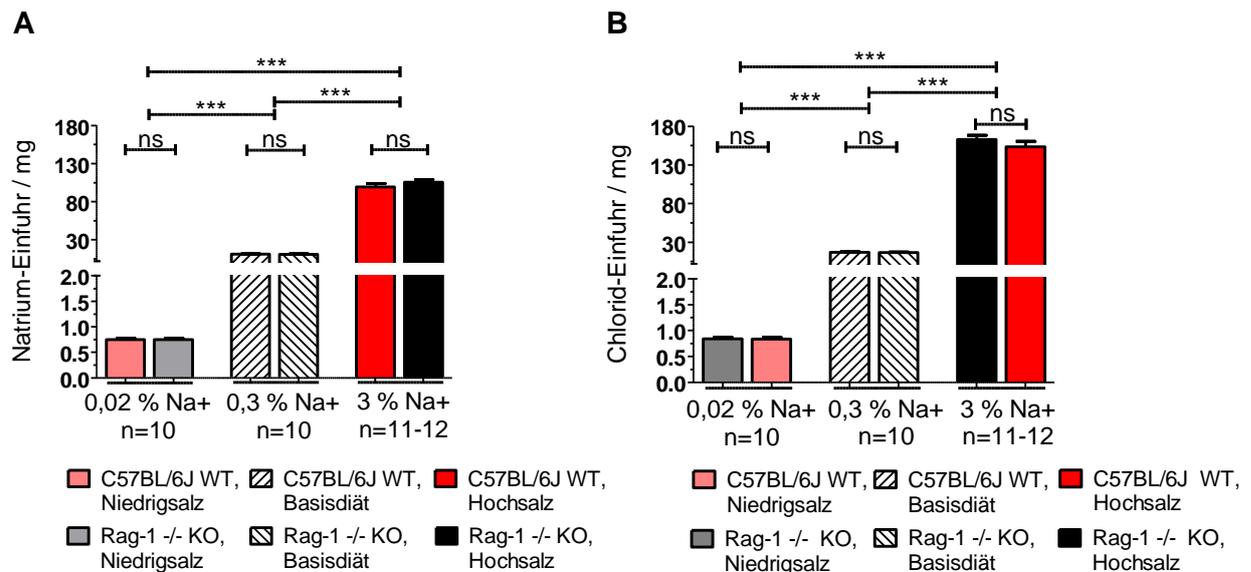


Abbildung 4-18: Natrium Einfuhr in [mg] unter Niedrig-, Basis- und Hochsalzdiät ohne zusätzliche ATII Infusion. C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO im Vergleich. **A**) Natrium-Einfuhr in [mg] für Niedrigsalzdiät: 1. Faktor Genotyp: $F(1,36)=0,1023$, $p=0,7509$, 2. Faktor Niedrigsalzdiät: $F(1,36)=1612$, $p<0,0001$ und für Hochsalzdiät: 1. Faktor Genotyp: $F(1,39)=0,9157$, $p=0,3445$, 2. Faktor Hochsalzdiät: $F(1,39)=839,6$, $p<0,0001$, **B**) Chlorid-Einfuhr in [mg] für Niedrigsalzdiät: 1. Faktor Genotyp: $F(1,36)=0,1031$, $p=0,7500$, 2. Faktor Niedrigsalzdiät: $F(1,36)=1678$, $p<0,0001$ und für Hochsalzdiät: 1. Faktor Genotyp: $F(1,39)=0,9167$, $p=0,3442$, 2. Faktor Hochsalzdiät: $F(1,39)=843,2$, $p<0,0001$. Statistik: 2-way ANOVA, not repeated measures. Bonferroni Posttest.

Weder unter Basis-, noch unter Niedrig- oder Hochsalzdiät nehmen die Mäuse der beiden Genotypen eine signifikant unterschiedliche Salzmenge zu sich. Der Faktor „Genotyp“ hat demnach in keiner der Diätgruppen einen Einfluss auf die Natriumchlorid-Zufuhr (s. Abbildung 4-18 A und B Statistik Faktor „Genotyp“ für Niedrig- und Hochsalzdiät).

Die Spezialsalzdiäten führen erwartungsgemäß zu einer signifikant unterschiedlichen Salzzufuhr. Der Vergleich mit jeweils der Basisdiätgruppe zeigt, dass die Mäuse beider Genotypen unter Niedrigsalzdiät signifikant weniger und unter Hochsalzdiät signifikant mehr Salz zu sich nehmen (s. Abbildung 4-18 A und B Statistik Faktor „Niedrigsalz“ und Faktor „Hochsalz“ jeweils $p<0,0001$). Auch der direkte Vergleich der beiden Spezialsalzdiäten zeigt, dass den Mäusen bei beiden Genotypen mit der Hochsalzdiät signifikant mehr Salz mit dem Futter zugeführt wird, als mit der Niedrigsalzdiät (ungepaarter T-Test, Natrium und Chlorid jeweils: C57BL/6J WT: $p<0,0001$, Rag-1 -/- KO: $p=0,0001$).

⁷⁸ Abzüglich der Futterkrümel aus der Kotschale.

Plasma-Elektrolytkonzentration

Die Elektrolytkonzentrationen in [mmol / L] wurden aus einer am letzten Tag der Diät (Tag 28) retrobulbär entnommenen Blutprobe mithilfe von Blutgasanalysen gemessen. Da die Elektrolytkonzentrationen im Urin mithilfe des Spotchem EL SE 1520 analysiert wurden, wurden die Elektrolytkonzentrationen im Plasma neben den BGA ebenfalls mithilfe des Spotchem EL SE-1520 gemessen. Die Werte sind für beide Messmethoden in einer Tabelle aufgeführt.

| Parameter [mmol/L] Mean +/- SEM, 95% Konfidenz- intervall | C57BL/6J WT | Rag-1 -/- KO | Signifikanz |
|--|--|--|---------------------------------|
| Niedrigsalzdiät | | | |
| Plasma-Natrium | | | |
| BGA | 148,1 +/- 0,4843 [147,0-149,2] | 151,2 +/- 2,585 [145,4-157,0] | ns |
| Spotchem EL SE 1520 | 142,9 +/- 0,9826 [140,7-145,1] | 144,5 +/- 1,128 [141,9-148,1] | ns |
| Plasma-Chlorid | | | |
| BGA | 116,5 +/- 0,4534 [115,5-117,5] | 117,4 +/- 0,5617 [116,1-118,7] | ns |
| Spotchem EL SE 1520 | 122,3 +/- 0,9781 [120,1-124,5] | 126,7 +/- 1,770 [122,7-130,7] | ns |
| Plasma-Kalium | | | |
| BGA | 4,378 +/- 0,04938 [4,264-4,492] | 4,490 +/- 0,07063 [4,330-4,650] | ns |
| Spotchem EL SE 1520 | 4,650 +/- 0,09804 [4,428-4,872] | 5,090 +/- 0,1059 [4,850-5,330] | s** (p=0,0069) |
| Plasma-Kreatinin/μmol/L | 13,08 +/- 0,9221 [10,99-15,17] | 11,49 +/- 1,266 [8,626-14,35] | ns |
| Basisdiät | | | |
| Plasma-Natrium | | | |
| BGA | 147,8 +/- 0,4899 [146,7-148,9] | 148,1 +/- 0,5859 [146,8-149,4] | ns |
| Spotchem EL SE 1520 | 141,0 +/- 1,155 [138,4-143,6] | 144,1 +/- 1,487 [140,7-147,5] | ns |

4. Ergebnisse

| Parameter [mmol/L] Mean +/- SEM, 95% Konfidenz- intervall | C57BL/6J WT | Rag-1 -/- KO | Signifikanz |
|--|---------------------------------------|--|-------------|
| Plasma-Chlorid | | | |
| BGA | 117,7 +/- 1,506 [114,3-121,1] | 116,8 +/- 0,6960 [115,2-118,4] | ns |
| Spotchem EL SE 1520 | 128,8 +/- 2,471 [123,2-134,4] | 123,1 +/- 1,595 [119,5-126,7] | ns |
| Basisdiät | | | |
| Plasma-Kalium | | | |
| BGA | 5,000 +/- 0,3733 [4,156-5,844] | 4,660 +/- 0,1024 [4,428-4,892] | ns |
| Spotchem EL SE 1520 | 5,260 +/- 0,1641 [4,889-5,631] | 5,290 +/- 0,09597 [5,073-5,507] | ns |
| Plasma-Kreatinin/μmol/L | 13,61 +/- 0,7996 [11,80-15,42] | 13,93 +/- 0,8026 [12,11-15,75] | ns |
| Hochsalzdiät | | | |
| Plasma-Natrium | | | |
| BGA | 148,1 +/- 0,6098 [146,7-149,4] | 149,7 +/- 0,6044 [148,4-151,1] | ns |
| Spotchem EL SE 1520 | 143,5 +/- 1,495 [140,2-146,8] | 146,7 +/- 1,184 [144,1-149,4] | |
| Plasma-Chlorid | | | |
| BGA | 115,5 +/- 0,6455 [114,1-116,9] | 116,5 +/- 0,5619 [115,3-117,8] | ns |
| Spotchem EL SE 1520 | 124,4 +/- 4,909 [113,6-135,2] | 126,7 +/- 3,563 [118,8-134,7] | Ns |
| Plasma-Kalium | | | |
| BGA | 4,445 +/- 0,1397 [4,134-4,757] | 4,409 +/- 0,1057 [4,174-4,645] | ns |

| Parameter [mmol/L] Mean +/- SEM, 95% Konfidenz- intervall | C57BL/6J WT | Rag-1 -/- KO | Signifikanz |
|--|---|---|-------------|
| Spotchem EL SE 1520 | 5,242 +/- 0,1505 [4,910- 5,573] | 5,218 +/- 0,1482 [4,888- 5,548] | ns |
| Plasma-Kreatinin | 14,73 +/- 1,108 [12,30- 17,17] | 12,69 +/- 0,9055 [10,67- 14,71] | ns |

Tabelle 4-4: Elektrolytkonzentrationen (Na+, Cl-, K+) im Plasma mit 1. Blutgasanalysen und 2. mit dem Spotchem EL SE 1520 Messgerät von Axonlab für Niedrig-, Basis- und Hochsalzdiät in [mmol/L] ermittelt. Statistik: 2-way ANOVA, *not repeated measures*. Bonferroni Posttest und ungepaarter T-Test.

Die Elektrolytkonzentrationen im Plasma sind bei beiden Genotypen unter allen Diäten gleich hoch. Der Faktor „Diät“ hat folglich keinen signifikanten Einfluss auf die Plasma-Elektrolytkonzentrationen. Dies gilt sowohl für die Messungen mittels BGA, als auch für die Analysen mittels Spotchem EL SE 1520 (p-Werte zwischen 0,0577 bis 0,9165). Ebenso zeigt sich hinsichtlich der Plasma-Elektrolytkonzentrationen unter keiner Diät ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen. Die *unabhängige Variable* „Genotyp“ hat folglich auch keinen Einfluss auf den Elektrolytstatus im Plasma⁷⁹.

Freie Exkretion der Elektrolyte Natrium und Chlorid

Die Freie Exkretion (FE) der Elektrolyte wurde rechnerisch aus der Serum- und Urin-Konzentration des jeweiligen Elektrolyts (hierfür Messung mittels Spotchem EL SE-1520 verwendet), sowie der Serum- und Urin-Konzentration von Kreatinin (gemessen vom Labor Laboklin, Deutschland) für alle Diätgruppen ohne ATII Behandlung beider Genotypen ermittelt.

⁷⁹ Hiervon weicht lediglich die Plasma-Kaliumkonzentration, die mit dem Spotchem EL SE 1520 gemessen worden ist ab. Nebenbefundlich ist die mit dem Spotchem EL SE 1520 gemessene Kaliumkonzentration bei beiden Genotypen unter Niedrigsalzdiät signifikant niedriger, als unter Basisdiät (2-way ANOVA, Faktor Niedrigsalzdiät: $F(1,36)=11,52$, $p=0,0017$) und, zumindest beim C57BL/6J WT, auch signifikant niedriger als unter Hochsalzdiät (ungepaarter T-Test, C57BL/6J WT: $p=0,0051$, Rag-1 -/- KO: $p=0,4989$). Der Bonferroni Posttest ergibt trotz nicht signifikanter zweifaktorieller Varianzanalyse, dass die C57BL/6J WT Mäuse unter Niedrigsalzdiät signifikant weniger Kalium im Plasma haben, als die Rag-1 -/- KO Mäuse. Die mithilfe der Blutgasanalysen ermittelten Plasma-Kaliumkonzentrationen ergeben diese Signifikanzen nicht.

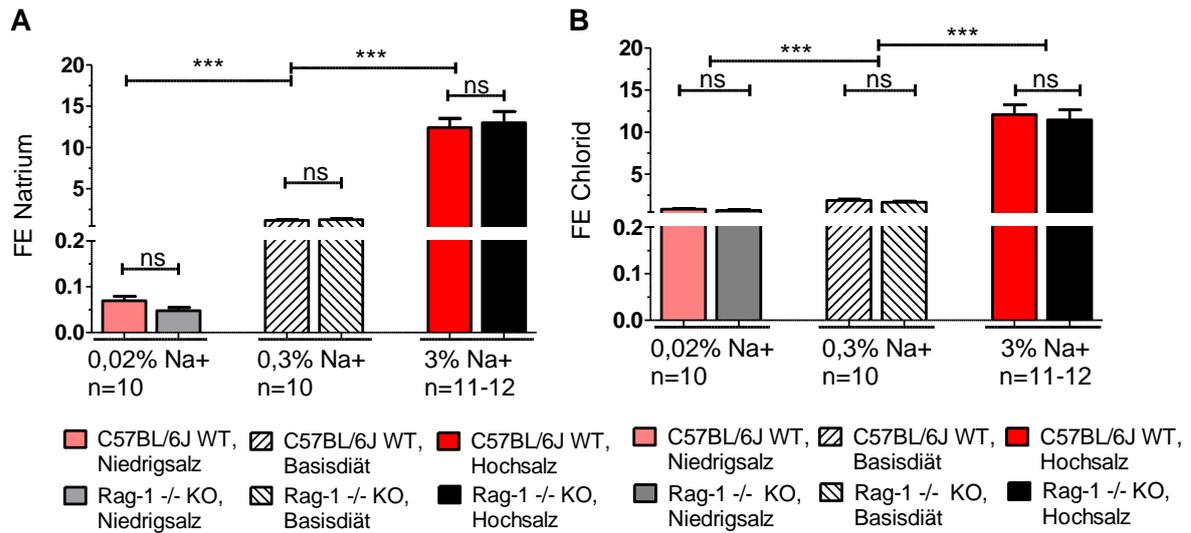


Abbildung 4-19: **A**) Freie Exkretion Natrium (für Niedrigsalz, 1. Faktor Genotyp: $F(1,36)=0,3797$, $p=0,5416$, 2. Faktor Niedrigsalzdiät: $F(1,36)=278,0$, $p<0,0001$ und für Hochsalzdiät 1. Faktor Genotyp: $F(1,39)=0,1416$, $p=0,7087$, 2. Faktor Hochsalzdiät: $F(1,39)=146,4$, $p<0,0001$, **B**) Freie Exkretion Chlorid (für Niedrigsalzdiät, 1. Faktor Genotyp: $F(1,36)=2,450$, $p=0,1263$, 2. Faktor Niedrigsalzdiät: $F(1,36)=66,07$, $p<0,0001$ und für Hochsalzdiät 1. Faktor Genotyp: $F(1,39)=0,2217$, $p=0,6404$, 2. Faktor Hochsalzdiät: $F(1,39)=120,4$, $p<0,0001$. Statistik: 2-way ANOVA, not repeated measures. Bonferroni Posttest.

Die Niedrigsalzdiät führt im Vergleich zur Basis- und Hochsalzdiät⁸⁰ bei den Mäusen beider Genotypen zu einer signifikant niedrigeren Salzausscheidung, wohingegen die Hochsalzdiät bei beiden Mauslinien zu einer signifikant höheren Salzausscheidung im Vergleich zur Basis- und Niedrigsalzdiät führt. Die *unabhängige Variable* „Diät“ hat folglich bei beiden Genotypen einen signifikanten Einfluss auf die Ausscheidung der Elektrolyte

Natrium und Chlorid (s. Abbildung 4-19 A und B, Statistik Faktor „Niedrigsalz“ und Faktor „Hochsalz“). Im Gegensatz dazu hat die *unabhängige Variable* „Genotyp“ weder unter Basis-, noch unter Niedrig- oder Hochsalzdiät einen signifikanten Einfluss auf die freie Exkretion von Salz. Die Mauslinien unterscheiden sich hinsichtlich der freien Exkretion von Natrium und Chlorid nicht (s. Abbildung 4-19 A und B, Statistik Faktor „Genotyp“ für Niedrig- und Hochsalzdiät). Die Abwesenheit des Immunsystems führt beim Rag-1 -/- KO im Vergleich zum C57BL/6J WT folglich zu keiner vermehrten bzw. veränderten Kochsalzausscheidung.

⁸⁰ Vergleich von Niedrig- und Hochsalzdiät für FE Natrium und Chlorid für beide Genotypen jeweils mit ungepaarten T-Tests: p-Werte für C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO jeweils $<0,0001$.

| Parameter [mmol/L] Mean +/- SEM, 95% Konfidenz- intervall | C57BL/6J WT | Rag-1 -/- KO | Signifikanz |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| Niedrigsalzdiät | | | |
| Urinkonzentration-Natrium | | | |
| | 35,60 +/- 5,381 [23,43-47,77] | 23,10 +/- 1,690 [19,28-26,92] | ns |
| Urinkonzentration-Chlorid | | | |
| | 362,7 +/- 31,61 [291,2-434,2] | 289,2 +/- 25,72 [231,0-347,7] | ns |
| Basisdiät | | | |
| Urinkonzentration-Natrium | | | |
| | 452,0 +/- 32,29 [378,9-525,1] | 381,6 +/- 20,59 [335-428,2] | ns |
| Urinkonzentration-Chlorid | | | |
| | 649,6 +/- 65,73 [500,9-798,3] | 415,2 +/- 24,66 [359,4-471,0] | S** (p=0,0015) |
| Hochsalzdiät | | | |
| Urinkonzentration-Natrium | | | |
| | 967,3 +/- 30,44 [900,3-1034] | 961,6 +/- 99,54 [739,9-1183] | ns |
| Urinkonzentration-Chlorid | | | |
| | 816,7 +/- 44,11 [719,6-913,8] | 737,1 +/- 86,71 [543,9-930,3] | ns |

Tabelle 4-5: Urinkonzentration von Natriumchlorid für C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO unter allen Diäten. Statistik: ungepaarte T-Testung und Man-Whitney bei Varianzinhomogenität.

Trinkmenge

Um zu untersuchen, ob die Abwesenheit des Immunsystems bei der Rag1- -/- KO Mauslinie per se zu einem veränderten Durst führt, wurde die Trinkmenge der Mäuse beider Genotypen unter Basis- und Hoch-, sowie Niedrigsalz mit und ohne ATII analysiert. Hierfür wurden die Trinkflaschen der Versuchstiere nach Befüllung mit autoklaviertem Leitungswasser zu Beginn und am Ende der Woche (= sieben Tage) gewogen. Die Differenz wurde durch sieben geteilt, um die Trinkmenge in [g] pro Tag für beide Genotypen zu ermitteln.

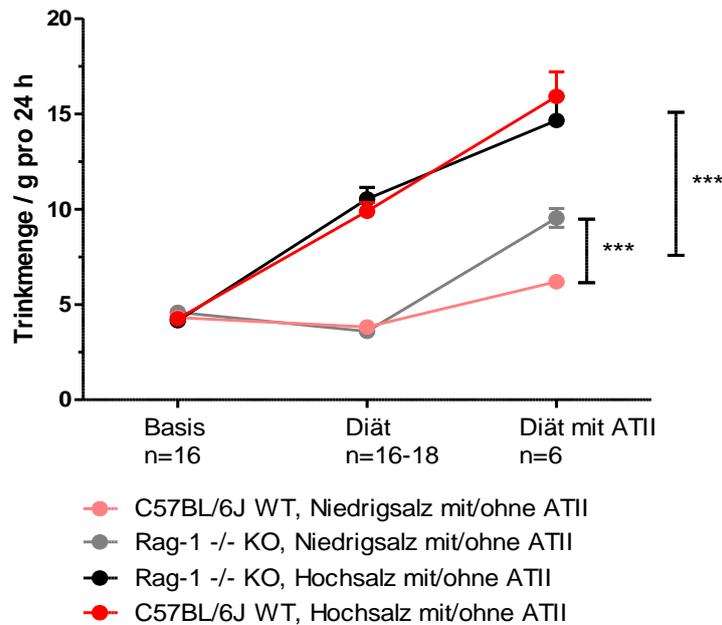


Abbildung 4-20: Trinkmenge in [g] unter Niedrig-, Basis- und Hochsalzdiät mit und ohne ATII Behandlung. C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO im Vergleich. Für Niedrigsalz 1. Faktor Genotyp: $F(1,70)=13,47$, $p=0,0005$, 2. Faktor Intervention: $F(2,70)=52,51$, $p<0,0001$ und für Hochsalzdiät 1. Faktor Genotyp: $F(1,73)=0,2216$, $p=0,6393$, 2. Faktor Intervention: $F(2,73)=152,7$, $p<0,0001$ (Statistik: 2-way ANOVA, not repeated measures. Bonferroni Posttest).

Die Mäuse beider Genotypen trinken jeweils unter Hochsalzdiät ohne und mit ATII signifikant mehr als unter Basis- und Niedrigsalzdiät ohne und mit ATII. Anders als die Hochsalzdiät führt die Niedrigsalzdiät ohne zusätzliche ATII Infusion im Vergleich zur Basisdiät bei beiden Genotypen nicht zu einer signifikant veränderten Trinkmenge⁸¹. Grundsätzlich nimmt die Trinkmenge sowohl unter Hoch-, als auch unter Niedrigsalzdiät durch die exogene ATII Zufuhr zusätzlich zur Spezialsalzdiät erwartungsgemäß signifikant zu (s. Abbildung 4-20 Faktor „Intervention“ für Niedrig- und Hochsalzdiät). Zumindest unter Basis- und Niedrigsalzdiät ohne ATII, sowie unter Hochsalzdiät mit und ohne ATII gibt es zwischen den Genotypen hinsichtlich der Trinkmenge keine signifikanten Unterschiede. Lediglich unter Niedrigsalzdiät mit ATII trinkt die immundefiziente Rag-1 -/- KO Mauslinie signifikant mehr Wasser, als der immunkompetente C57BL/6J WT (s. Abbildung 4-20 Statistik Faktor „Genotyp“ für Niedrigsalzdiät). Zusammenfassend belegen die oben dargestellten Ergebnisse, dass unterschiedlich wirksame Salzdiäten erfolgreich verwendet und von den Versuchstieren entsprechend aufgenommen worden sind. Wie erwartet ist die mit dem Futter zugeführte Natrium- und Chloridmenge, sowie die freie Natrium- und Chloridexkretion unter Hochsalzdiät bei beiden Genotypen signifikant höher, als unter Basis- und Niedrigsalzdiät. Diese signifikanten Unterschiede sind nicht auf unterschiedliche Elektrolytkonzentrationen im Plasma zurückzuführen, da die Plasma-Natrium-, sowie Plasma-Chloridkonzentrationen bei

⁸¹ einfaktorielle Varianzanalyse und Newman-Keuls Posttest bei C57BL/6J WT: $F(2,47)=87,50$, $p<0,0001$, Kruskal-Wallis Test und Dunn Posttest bei signifikant verschiedenen Varianzen (Bartlett Test $p<0,0001$) bei Rag-1 -/- KO: $H(2,46)=33,52$, $p<0,0001$). In Abbildung zwischen Verlauf Basis→Hochsalz ohne ATII→Hochsalz mit ATII und Verlauf Basis→Niedrigsalz ohne ATII→Niedrigsalz mit ATII drei Sterne ***.

beiden Genotypen unter allen Diäten gleich hoch sind. Folglich ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass es gelungen ist, in den einzelnen Diätgruppen unterschiedliche RAAS-Aktivierungszustände (Hochregulierung bzw. Supprimierung) durch unterschiedliche Na⁺ Konzentrationen (0,02 %, 0,3 % und 3 %) im Futter bei über alle Diätgruppen hinweg nahezu gleicher K⁺ Zufuhr herbeizuführen. Zwischen den Genotypen gibt es hinsichtlich der Salzaufnahme und -ausscheidung keinerlei signifikante Unterschiede. Die Immundefizienz des Rag-1 -/- KO führt demnach im Vergleich zum C57BL/6J WT per se zu keinem veränderten Salzhaushalt.

4.3.3. Zusammenfassung zu den Untersuchungen von Plasma und Urin

Hormone des RAAS

- Die beiden Genotypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Plasma-Aldosteronkonzentration und ihrer Plasma-Reninaktivität (bzw. hinsichtlich des Quotienten aus Renin mRNA / L32 mRNA) weder unter Basis-, noch unter Hoch- oder Niedrigsalzdiät signifikant voneinander. Lediglich unter Hochregulierung des systemischen RAAS bei Gabe von Niedrigsalzdiät hat der immunkompetente C57BL/6J WT eine signifikant höhere Aldosteronkonzentration im Plasma als der immundefiziente Rag-1 -/- KO.

Wasser- und Elektrolythaushalt, Kreatinin-Clearance

- Hinsichtlich der Natrium- und Chlorid-, sowie Kaliumkonzentration im Plasma gibt es weder zwischen den beiden Genotypen, noch zwischen den einzelnen Diäten (Basis-, Hoch- und Niedrigsalz) signifikante Unterschiede. Unterschiedliche Salzdiäten führen folglich bei beiden Mauslinien nicht zu unterschiedlichen Salzkonzentrationen im Plasma. Auch hinsichtlich der Elektrolytkonzentration im Urin unterscheiden sich die beiden Genotypen weder unter Basis-, noch unter Niedrig- oder Hochsalzdiät signifikant voneinander (nicht dargestellt).
- Versuchstiere unter Hochsalzdiät haben eine signifikant höhere Salzkonzentration im Urin, als jeweils Versuchstiere unter Basis- bzw. Niedrigsalzdiät. Ebenso haben Mäuse unter Niedrigsalzdiät eine signifikant geringere Salzkonzentration im Urin als jeweils Tiere unter Basis- und Hochsalzdiät (nicht dargestellt, s. Tabelle 4-5). Die Abwesenheit des erworbenen Immunsystems führt beim Rag-1 -/- KO zu keiner veränderten Salzausscheidung gegenüber dem C57BL/6J WT.
- Die Art der Diät beeinflusst hingegen 1. die freie Exkretion von Natrium und Chlorid, sowie 2. die mit dem Futter zugeführte Salzmenge signifikant. Erwartungsgemäß sind 1. die Freie Exkretion von Natriumchlorid und 2. die mit dem Futter aufgenommene Salzmenge jeweils unter Niedrigsalzdiät signifikant niedriger, als unter Basis- und Hochsalzdiät bzw. jeweils unter Hochsalzdiät signifikant höher, als unter Basis- und

Niedrigsalzdiät. Zwischen den Genotypen gibt es jedoch weder hinsichtlich der freien Salzexkretion, noch hinsichtlich der mit dem Futter aufgenommenen Salzmenge einen signifikanten Unterschied. Die Immundefizienz der Rag-1 $-/-$ KO Mauslinie führt folglich zu keiner reduzierten Salzaufnahme oder vermehrten Salzexkretion, sprich zu keinem veränderten Salzhaushalt gegenüber dem C57BL/6J WT.

- Diese Daten belegen, dass den Mäusen unterschiedliche Salzdiäten zugeführt und diese von den Tieren erfolgreich aufgenommen worden sind.
- Unter Hochsalzdiät mit und *ohne* ATII trinken die Tiere beider Mauslinien erwartungsgemäß jeweils signifikant mehr, als unter Basis- und Niedrigsalzdiät mit und *ohne* ATII. Grundsätzlich unterscheiden sich die beiden Genotypen hinsichtlich der Trinkmenge unter den verschiedenen Salzdiäten mit und *ohne* ATII nicht. Lediglich unter Niedrigsalzdiät mit zusätzlicher ATII Behandlung nimmt der immundefiziente Rag-1 $-/-$ KO eine signifikant größere Trinkmenge zu sich, als der immunkompetente C57BL/6J WT.
- Weder die *unabhängige Variable* „Diät“, noch die *unabhängige Variable* „Genotyp“ haben einen signifikanten Einfluss auf die Kreatinin-Clearance. Die Abwesenheit des Immunsystems bei der Rag-1 $-/-$ KO Mauslinie führt per se zu keiner veränderten Nierenfunktion.

4.4. Endorganschädigungen

4.4.1. Histopathologie Aorta und Herz

Aorta

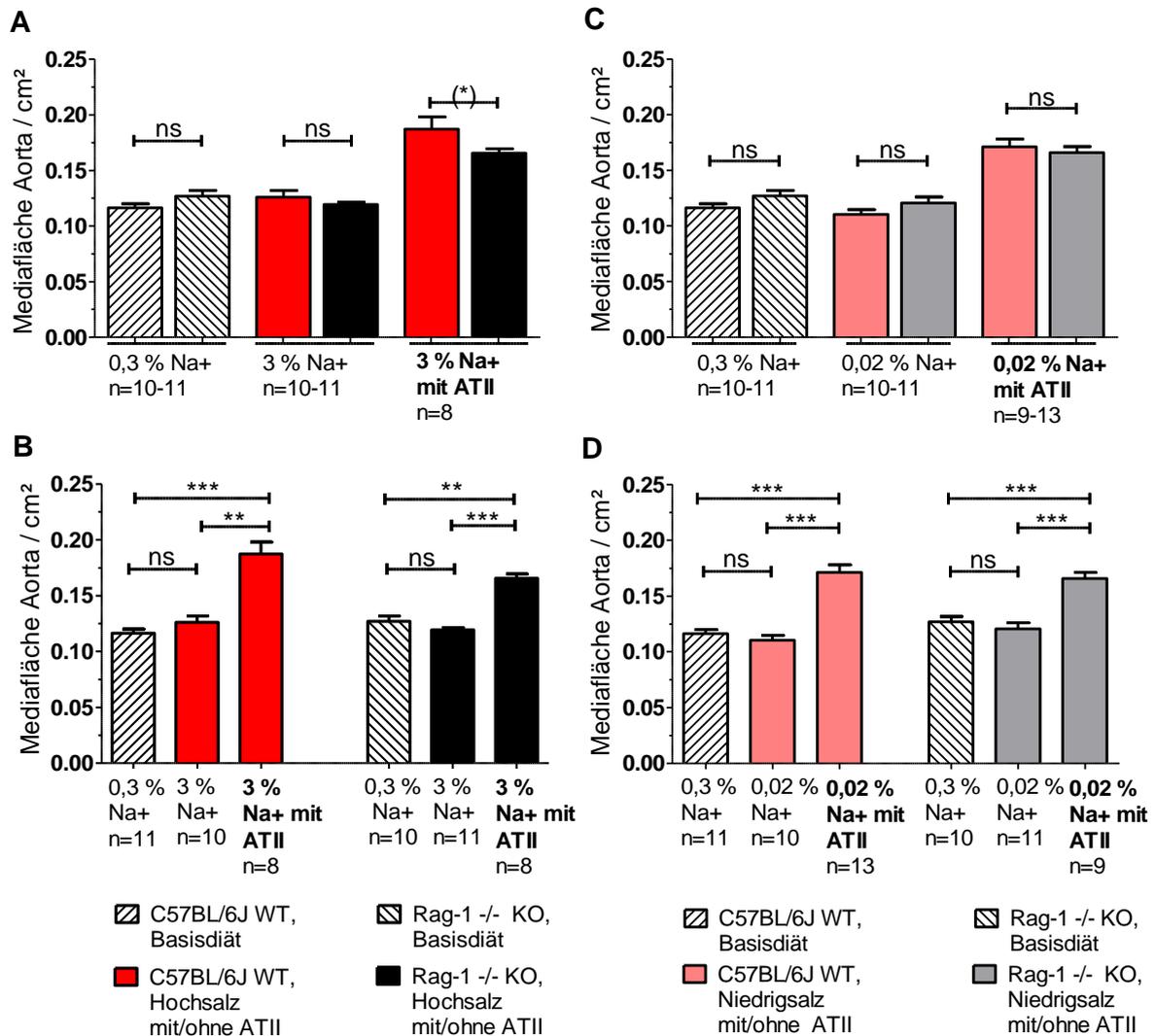


Abbildung 4-21 Mediafläche der Aorta in cm² von mit Basis-, Niedrig- und Hochsalzdiät ohne und mit ATII vorbehandelten Versuchstieren. **A)** Mediafläche unter Basis-, Hochsalzdiät mit und ohne ATII, Vergleich C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO (Faktor Genotyp: $F(1,52)=1,838$, $p=0,1811$), **B)** Veränderung der Mediafläche jeweils beim C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO über die Diäten Basis- und Hochsalzdiät und über die Intervention Hochsalzdiät mit ATII hinweg (C57BL/6J WT: $H(2,26)=17,31$, $p=0,0002$ (Bartlett Test $p=0,0294$), Rag-1 -/- KO: $H(2,26)=17,12$, $p=0,0002$ (Bartlett Test $p=0,0475$), **C)** Mediafläche unter Basis-, Niedersalzdiät mit und ohne ATII, Vergleich C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO (Faktor Genotyp: $F(1,58)=1,345$, $p=0,2509$), **D)** Veränderung der Mediafläche jeweils beim C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO über die Diäten Basis- und Niedersalzdiät und über die Intervention Niedersalzdiät mit ATII hinweg (C57BL/6J WT: $H(2,31)=22,98$, $p<0,0001$ (Bartlett Test $p=0,0345$), Rag-1 -/- KO: $F(2,27)=20,47$, $p<0,0001$). Statistik: A) und C) 2-way ANOVA, *not repeated measures*. Bonferroni Posttest B) Kruskal Wallis Tests, *not repeated measures* bei signifikant verschiedenen Varianzen (Bartlett Test bei beiden Genotypen jeweils mit $p < 0,05$). Dunn Posttest, D) Kruskal-Wallis Test für C57BL/6J WT bei Bartlett Test $< 0,05$, *not repeated measures* und 1-way ANOVA, *not repeated measures* für Rag-1 -/- KO bei Bartlett Test $p > 0,05$. Newman-Keuls Posttest.

Weder unter Basis-, noch unter Niedrig- und Hochsalzdiät mit oder *ohne* ATII Zufuhr unterscheiden sich die Genotypen hinsichtlich der Mediafläche (s. Abbildung 4-21 A und C, Statistik Faktor „Genotyp“). Der Bonferroni Posttest zeigt lediglich unter Hochsalzdiät mit ATII

einen signifikanten Unterschied zwischen dem C57BL/6J WT und dem Rag-1 $-/-$ KO, wonach die Mediahypertrophie bei dem C57BL/6J WT mit $0,1873 \text{ cm}^2$ ($\pm 0,01077$, 95 % KI: $[0,1618-0,2127]$) um $0,02150 \text{ cm}^2$ stärker ausgeprägt ist, als bei dem Rag-1 $-/-$ KO mit $0,1658 \text{ cm}^2$ ($\pm 0,003658$, 95 % KI: $[0,1571-0,1744]$). Aufgrund der Diskrepanz zwischen der nicht signifikanten zweifaktoriellen Varianzanalyse und dem signifikanten Ergebnis im Posttest wurde ein ungepaarter T-Test für die beiden Gruppen „C57BL/6J WT Hochsalzdiät mit ATII“ und „Rag-1 $-/-$ KO Hochsalzdiät mit ATII“ durchgeführt. Dieser zeigt, dem Ergebnis der nicht signifikanten 2-way ANOVA entsprechend, dass es auch zwischen der immunkompetenten WT- und der immundefizienten KO-Mauslinie keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Mediafläche unter Hochsalzdiät mit ATII gibt ($p=0,0797$). Daher wurde die Signifikanz des Bonferroni Posttests (ein Stern*) hier der Vollständigkeit halber in Klammern gesetzt. Bei den Mäusen beider Genotypen kommt es jeweils durch die zusätzliche Zufuhr von exogenem ATII zu einer signifikanten Vergrößerung der Mediafläche im Vergleich zur Basis-, Niedrig- und Hochsalzdiät *ohne* ATII Behandlung. Die beiden Speziessalzdiäten (Hoch- und Niedrigsalz) hingegen führen bei keiner der beiden Mauslinien zu einer signifikanten Veränderung der Mediafläche im Vergleich zur Basisdiät (s. Abbildung 4-21 B und D, Statistik).

Vergleich Mediafläche in [cm^2] zwischen (Basis-)Niedrig- und Hochsalzdiät mit und *ohne* ATII

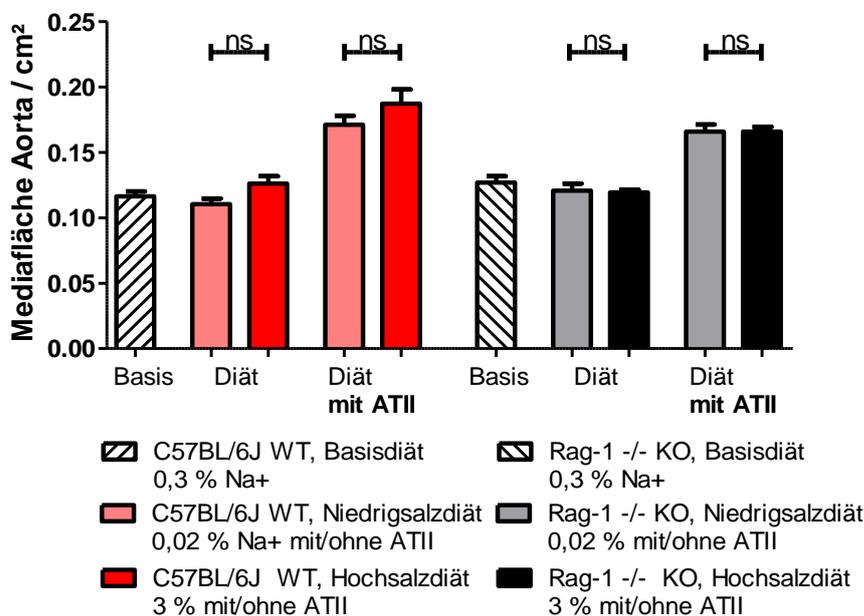


Abbildung 4-22: Direkter Vergleich der Mediafläche (Faktor Diät) zwischen Basis-, Niedrig- und Hochsalzdiät mit und *ohne* zusätzliche ATII Infusion für jeweils C57BL/6J WT (Faktor Diät: $F(1,47)=4,623$, $p=0,0385$) und Rag-1 $-/-$ KO (Faktor Diät: $F(1,44)=0,01570$, $p=0,9008$). Statistik: 2-way ANOVA, *not repeated measures*. Bonferroni Posttest.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergibt für den C57BL/6J WT, dass die *unabhängige* Variable „Diät“ einen signifikanten Einfluss auf die *abhängige* Variable „Mediafläche“ hat. Der

Bonferroni Posttest detektiert jedoch nicht, wo genau die signifikanten Unterschiede liegen. Augenscheinlich ist die Mediafläche der Aorten sowohl unter Hochsalzdiät *ohne* ATII (0,1261 cm² +/- 0,005711 [0,1132-0,1390]), als auch unter Hochsalzdiät mit ATII (0,1873 cm² +/- 0,01077 [0,1618-0,2127]) jeweils größer, als unter Niedrigsalzdiät *ohne* ATII (0,1104 cm² +/- 0,004318 [0,1006-0,1202]) und unter Niedrigsalzdiät mit ATII (0,1711 cm² +/- 0,006938 [0,1560-0,1862]). Beim Rag-1 *-/-* KO ergibt die 2-way ANOVA, dass die Diät keinen signifikanten Einfluss auf die Mediafläche hat (s. F-Teststatistik Abbildung 4-22).

Herzhypertrophie

Die Herzhypertrophie als Surrogat für die kardiale Endorganschädigung wurde durch Bildung des Quotienten aus Herz (-bzw. Ventrikel-)gewicht in [g] und Tibialänge in [cm] berechnet.

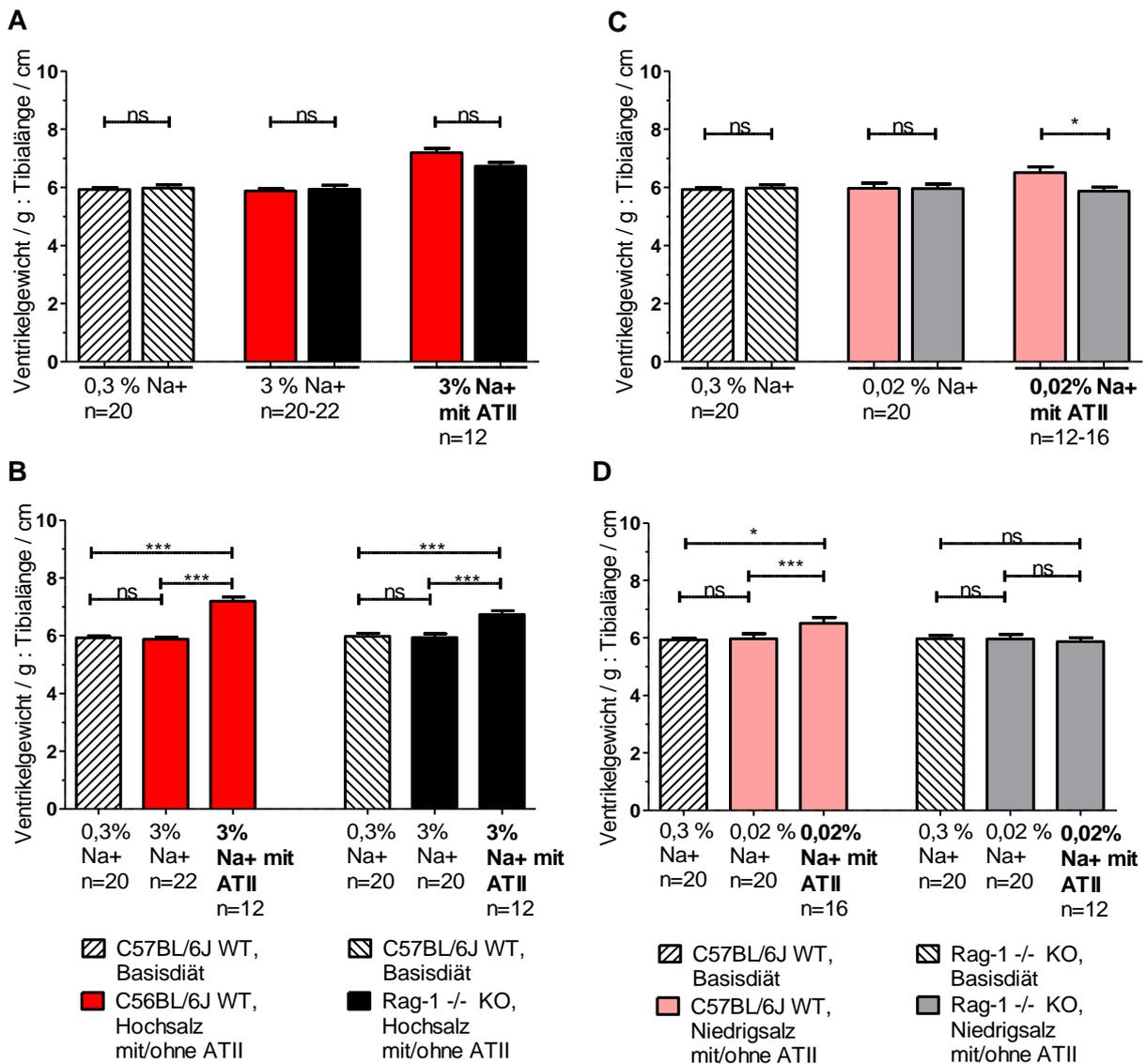


Abbildung 4-23: Herzhypertrophie als Quotient aus Ventrikelgewicht [g] / Tibialänge [cm] unter allen Diäten und Interventionen. **A**) Vergleich C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO unter Basis-, Hochsalzdiät mit und- ohne ATII (**Faktor Genotyp: $F(1,100)=1,712$, $p=0,1937$**). **B**) Veränderung der Herzhypertrophie jeweils bei C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO über die Diäten Basis- und Hochsalzdiät und über die Intervention Hochsalzdiät mit ATII hinweg (**C57BL/6J WT: $F(2,51)=55,37$, $p<0,0001$** , **Rag-1 -/- KO: $F(2,49)=9,393$, $p=0,0004$**), **C**) Vergleich C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO unter Basis-, Niedrigsalzdiät mit und- ohne ATII (**Faktor Genotyp: $F(1,102)=2,664$, $p=0,1057$**), **D**) Veränderung der Herzhypertrophie jeweils bei C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO über die Diäten Basis- und Niedrigsalzdiät und über die Intervention Niedrigsalzdiät mit ATII hinweg (**C57BL/6J WT: $H(2,53)=13,35$, $p=0,0013$ (bei Bartlett Test $p=0,0004$)**, **Rag-1 -/- KO: $F(2,49)=0,1415$, $p=0,8684$**). Statistik: A) und C) 2-way ANOVA, *not repeated measures*. Bonferroni Posttest, B) 1-way ANOVA, *not repeated measures*. Newman-Keuls Posttest, beide Genotypen, D) Kurskal-Wallis Test für C57BL/6J WT bei signifikant verschiedenen Varianzen (Bartlett Test $p<0,05$), *repeated measures*. Dunn Posttest und 1-way ANOVA für Rag-1 -/- KO mit Newman-Keuls Posttest.

Weder unter Basis-, noch unter Niedrig- und Hochsalzdiät mit oder *ohne* ATII gibt es zwischen den Mäusen beider Genotypen hinsichtlich des Ausmaßes der Herzhypertrophie einen signifikanten Unterschied (s. Abbildung 4-23 A und C, Statistik Faktor „Genotyp“). Die *unabhängige Variable* „Genotyp“ hat demnach keinen signifikanten Einfluss auf die kardiale Endorganschädigung. Lediglich unter Niedrigsalzdiät mit ATII zeigt der Bonferroni Posttest, entgegen dem nicht signifikanten Ergebnis der zweifaktoriellen Varianzanalyse, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen dem C57BL/6J WT und dem Rag-1 -/- KO gibt,

wonach das Ausmaß der Herzhypertrophie bei dem C57BL/6J WT mit 6,513 (+/-0,1940, 95 % KI: [6,099-6,926]) um 0,6444 signifikant stärker ausgeprägt ist als bei dem Rag-1 -/- KO mit 5,868 (+/-0,1401, 95 % KI: [5,560-6,177]). Ein aufgrund der Diskrepanz zwischen der 2-way ANOVA und dem Posttest durchgeführter ungepaarter T-Test für die beiden Gruppen „C57BL/6J WT Nidrigsalzdiät mit ATII“ und „Rag-1 -/- KO Nidrigsalzdiät mit ATII“ ergibt mit $p=0,0181$ ein dem Bonferroni Posttest entsprechendes Ergebnis. Die exogene ATII Zufuhr führt bei beiden Genotypen nur unter Hochsalzdiät (= 2 hypertensive Stimuli) jeweils zu einem signifikanten Anstieg der Herzhypertrophie im Vergleich zum Ausmaß der Herzhypertrophie unter Basissalz- und Hochsalzdiät *ohne* ATII Behandlung (s. Abbildung 4-23 B). Unter Nidrigsalzdiät hingegen verändert sich das Ausmaß der Herzhypertrophie durch die zusätzliche ATII Infusion bei der immundefizienten Rag-1 -/- KO Mauslinie nicht (s. Abbildung 4-23 D, F-Statistik für Rag-1 -/- KO). Im Gegensatz dazu steigt das Ausmaß der Herzhypertrophie bei dem immunkompetenten C57BL/6J WT durch ATII auch unter Nidrigsalzdiät signifikant an (s. Abbildung 4-23 D, F-Statistik für C57BL/6J WT). Die beiden Spezialsalzdiäten (Hoch- und Nidrigsalz) *ohne* zusätzliche ATII Infusion führen jeweils bei keinem der beiden Genotypen zu einer signifikanten Veränderung der Herzhypertrophie im Vergleich zur Basisdiät.

Herzfibrose

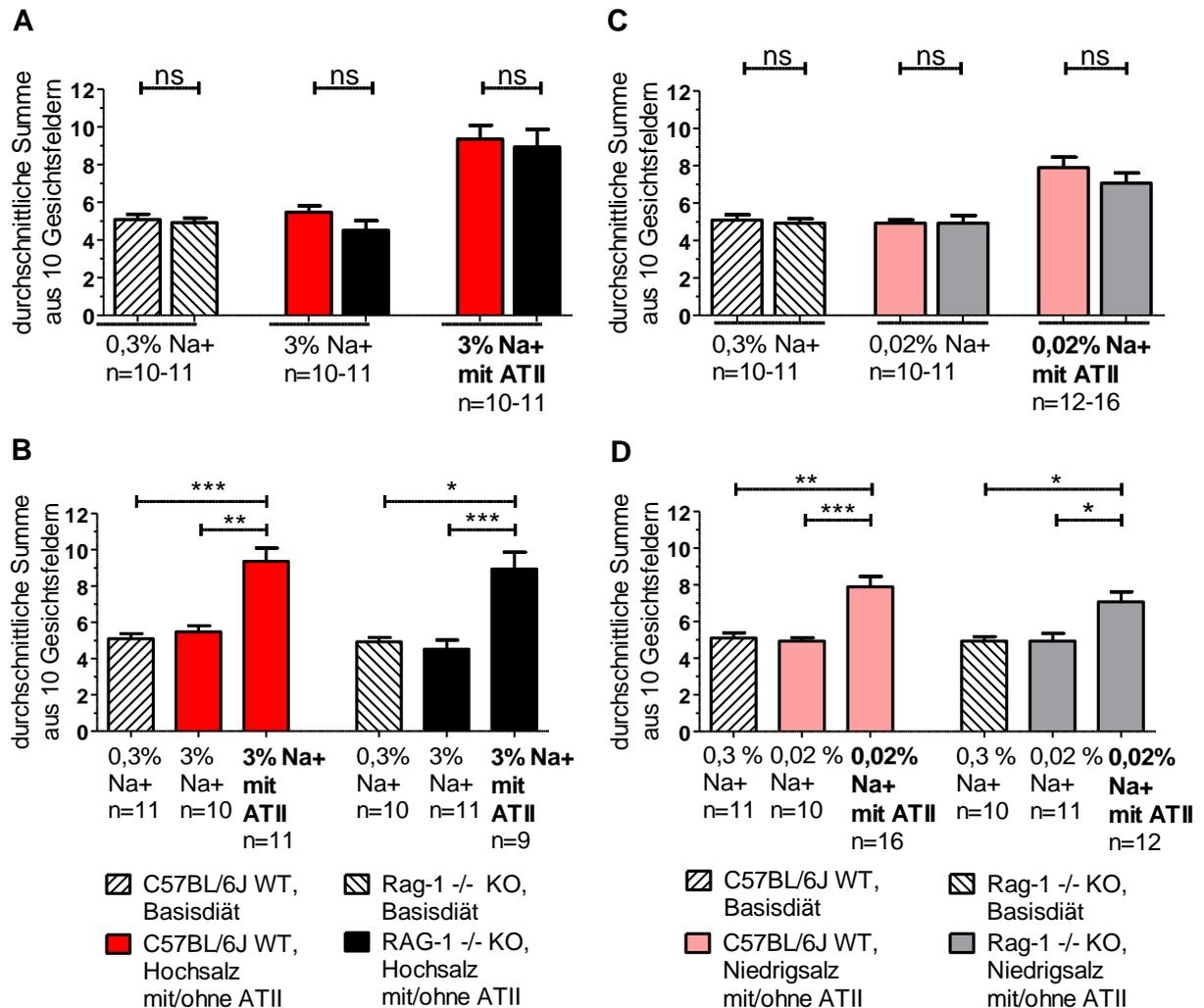


Abbildung 4-24 Herzfibrose als durchschnittliche Summe aus 10 mikroskopisch bewerteten Gesichtsfeldern, **A**) Vergleich C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO unter Basis-, Hochsalzdiät mit und ohne ATII (Faktor Genotyp: $F(1,57)=2,193$, $p=0,1441$). **B**) Veränderung der Herzfibrose jeweils bei C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO über die Diäten Basis- und Hochsalzdiät und über die Intervention Hochsalzdiät mit ATII hinweg (C57BL/6J WT: $H(2,29)=17,55$, $p=0,0002$ (Bartlett Test $p=0,0059$), Rag-1 -/- KO: $H(2,27)=14,97$, $p=0,0006$ (Bartlett Test $p=0,0030$), **C**) Vergleich C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO unter Basis-, Niedrigsalzdiät mit und ohne ATII (Faktor Genotyp: $F(1,64)=0,7716$, $p=0,3830$), **D**) Veränderung der Herzfibrose jeweils bei C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO über die Diäten Basis- und Niedrigsalzdiät und über die Intervention Niedrigsalzdiät mit ATII hinweg (C57BL/6J WT: $H(2,34)=18,56$, $p<0,0001$ (Bartlett Test $p<0,0001$) Rag-1 -/- KO: $H(2,30)=10,08$, $p=0,0065$ (Bartlett Test $p=0,0345$). Statistik: A) und C) 2-way ANOVA, *not repeated measures*. Bonferroni Posttest, B) und D) Kurskal-Wallis Test bei signifikant verschiedenen Varianzen (Bartlett Test $p<0,05$), beide Genotypen, *not repeated measures*. Dunn Posttest.

Die Mäuse beider Genotypen unterscheiden sich hinsichtlich des Ausmaßes der Herzfibrose unter Basis- und Niedrig-, sowie Hochsalzdiät mit oder *ohne* ATII nicht signifikant voneinander (s. Abbildung 4-24 A und C, Statistik Faktor „Genotyp“). Die Tiere beider Mauslinien weisen jeweils nach zusätzlicher ATII Behandlung sowohl unter Hoch-, als auch unter Niedrigsalzdiät signifikant mehr Herzfibrose auf als unter Basisdiät einerseits und unter den beiden Spezialsalzdiäten *ohne* ATII Gabe andererseits (s. Abbildung 4-24 B und D, Statistik für jeweils C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO). Die Spezialsalzdiäten ohne zusätzliche

ATII Infusion führen hingegen bei beiden Genotypen zu keiner signifikanten Veränderung der Herzfibrose im Vergleich zur Basisdiät.

Vergleich der Herzhypertrophie (Quotient Ventrikelgewicht/Tibiallänge) und Herzfibrose (durchschnittliche Summe/10 Gesichtsfelder) zwischen (Basis-)Hoch- und Nidrigsalzdiät mit/ohne ATII

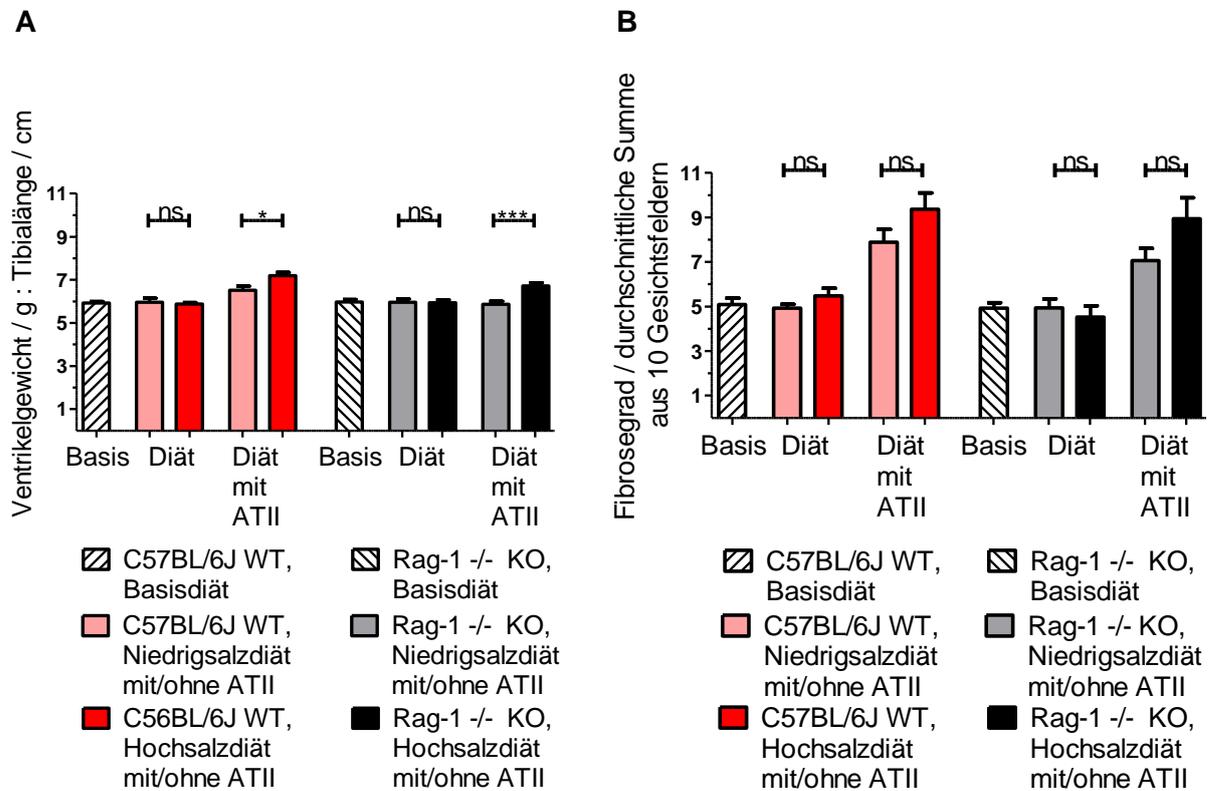


Abbildung 4-25: **A)** Direkter Vergleich der Herzhypertrophie (Faktor Diät) zwischen Basis-, Niedrig- und Hochsalzdiät mit und *ohne* zusätzliche ATII Infusion für jeweils C57BL/6J WT (Faktor Diät: $F(2,104)=3,586$, $p=0,0611$) und Rag-1 -/- KO (Faktor Diät: $F(1,79)=5,971$, $p=0,0163$), **B).** Direkter Vergleich der Herzfibrose zwischen Basis-, Niedrig- und Hochsalzdiät mit und *ohne* zusätzliche ATII Infusion für jeweils C57BL/6J WT (Faktor Diät: $F(1,53)=2,862$, $p=0,0956$) und Rag-1 -/- KO (Faktor Diät: $F(1,49)=0,4143$, $p=0,5223$). Statistik: 2-way ANOVA, *not repeated measures*. Bonferroni Posttest.

Bei beiden Genotypen ist das Ausmaß der Herzhypertrophie unter Hochsalzdiät mit ATII signifikant stärker ausgeprägt, als unter Nidrigsalzdiät mit ATII (s. Abbildung 4-25 A). Die zweifaktorielle Varianzanalyse fällt bei dem C57BL/6J WT zwar nicht signifikant aus, der Bonferroni Posttest zeigt jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen dem Ausmaß der Herzhypertrophie unter Hochsalzdiät mit ATII und Nidrigsalzdiät mit ATII. Ein aufgrund dieser Diskrepanz durchgeführter T-Test ergibt mit $p=0,0143$ ein dem Bonferroni Posttest entsprechendes Ergebnis, wonach die Herzhypertrophie bei dem immunkompetenten C57BL/6J WT unter Hochsalzdiät mit ATII mit 7.193 (± 0.1497 , 95 % KI: [6,864-7,523]) signifikant stärker ausgeprägt ist als unter Nidrigsalzdiät mit ATII mit 6.513 (± 0.1940 , 95 % KI: [6,099-6,926]). Hinsichtlich des Ausmaßes der Herzfibrose hat die Diät bei beiden Genotypen hier keinen signifikanten Einfluss (s. Abbildung 4-25 B, Statistik Faktor „Diät“).

4.4.2. Funktionelle Untersuchung der Gefäßreagibilität mittels Myographie

Die aus jeweils zwei Aortenringen pro Maus mittels isometrischer Tonusmessungen *in vitro* ermittelten Dosis-Wirkungskurven zur Gefäßreagibilität unter Ach und NTG wurden zu einer Dosis-Wirkungskurve pro Tier gemittelt und mittels nicht-linearer Regression (Hill-Methode) *gefittet* ($R^2 > 0,9$)⁸². Anschließend wurden die Dosis-Wirkungskurven der Tiere in die jeweilige Diät (Hoch-, Niedrigsalz)- bzw. Interventionsgruppe (mit/*ohne* ATII) gruppiert. Sowohl bei kumulativer Gabe von 1. Acetylcholin, als auch bei kumulativer Gabe von 2. Nitroglycerin ist ein sigmoidaler Kurvenverlauf für die 1. endothelabhängige und 2. endothelunabhängige Vasodilatation zu erkennen.

⁸² *Nonlinear regression (curve fit), Dose response-stimulation, log(agonist) vs. response-variable slope.*

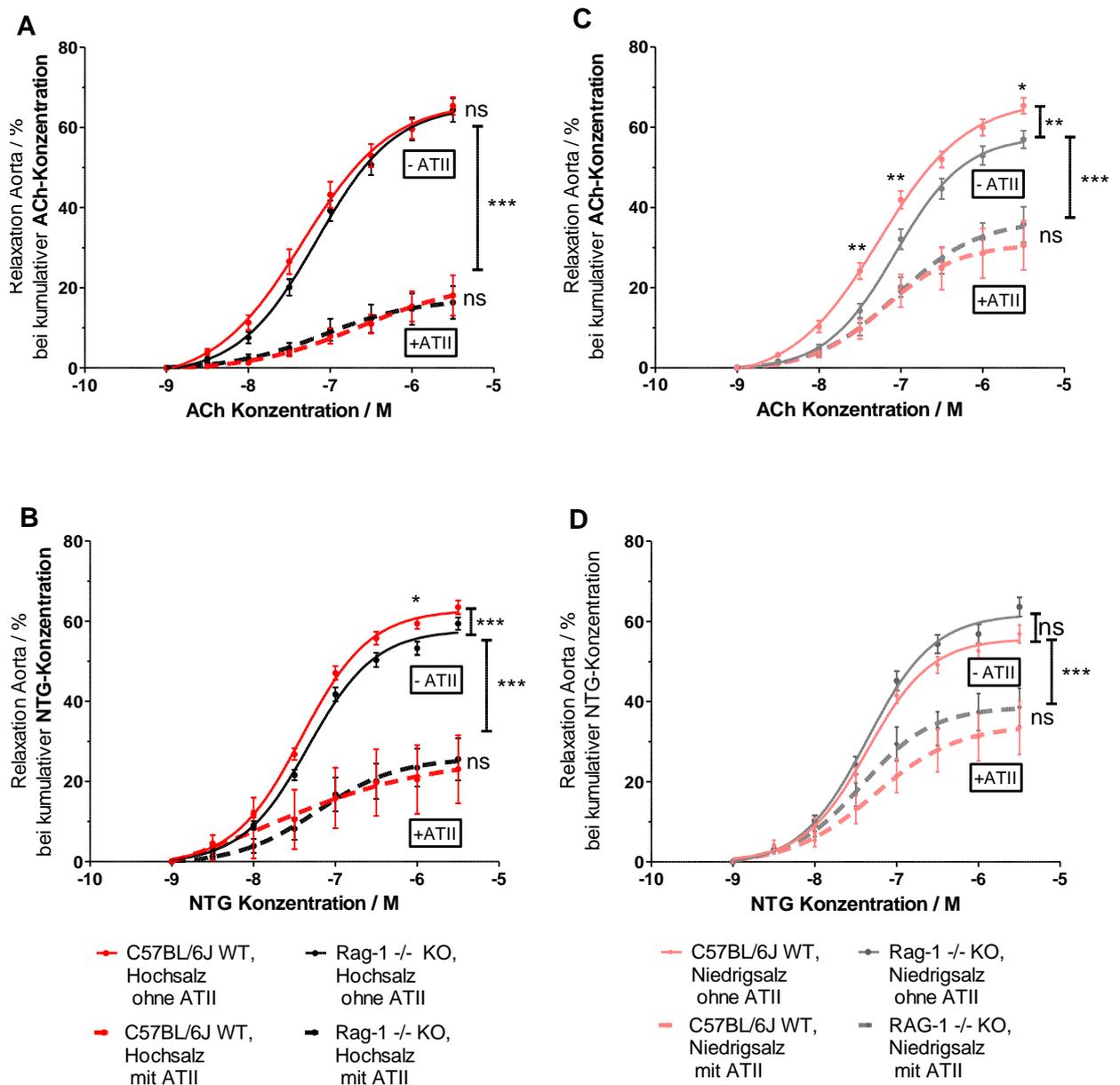


Abbildung 4-26: Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Gefäßrelaxation in [%] und der aufsteigenden Konzentration des Vasodilatators in [M]. **A**) Aortenringe von Mäusen mit Hochsalzdiät ohne und mit ATII Vorbehandlung **unter aufsteigender ACh-Konzentration** (Hochsalzdiät ohne ATII, Faktor Genotyp: $F(1,23)=0,8533, p=0,3652, n=12-13$, Hochsalzdiät mit ATII, Faktor Genotyp: $F(1,14)=0,01836, p=0,8942, n=8$), **B**) Aortenringe von Mäusen mit Hochsalzdiät ohne und mit ATII Vorbehandlung **unter aufsteigender NTG-Konzentration** (Hochsalzdiät ohne ATII, Faktor Genotyp: $F(1,23)=6,548, p=0,0175, n=12-13$, Hochsalzdiät mit ATII, Faktor Genotyp: $F(1,14)=0,001953, p=0,9654, n=8$), **C**) Aortenringe von Mäusen mit Niedrigsalzdiät ohne und mit ATII Vorbehandlung **unter aufsteigender ACh-Konzentration** (Niedrigsalzdiät *ohne* ATII, Faktor Genotyp: $F(1,23)=9,642, p=0,0052, n=11$, Niedrigsalzdiät mit ATII, Faktor Genotyp: $F(1,16)=0,1687, p=0,6867, n=9$), **D**) Aortenringe von Mäusen mit Niedrigsalzdiät *ohne* und mit ATII Vorbehandlung **unter aufsteigender NTG-Konzentration** (Niedrigsalzdiät *ohne* ATII, Faktor Genotyp: $F(1,23)=1,641, p=0,2136, n=11$, Niedrigsalzdiät mit ATII, Faktor Genotyp: $F(1,16)=0,7814, p=0,3898, n=9$). Statistik: 2-way ANOVA, *not repeated measures*. Bonferroni Posttest.

Sowohl unter Hoch-, als auch unter Niedrigsalzdiät führt die ATII Behandlung bei beiden Genotypen zu einer signifikant schlechteren Relaxationsfähigkeit (s. Abbildung 4-26 A bis D, drei Sterne ***, p-Werte jeweils zwischen $<0,0001$ bis $0,0008$, 2-way ANOVA, *not repeated measures*). Dabei gibt es zwischen dem immunkompetenten C57BL/6J WT und der immundefizienten Rag-1 -/- KO Mäusen nach insgesamt 14 tägiger ATII Zufuhr unter keiner

der beiden Spezialsalzdiäten einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der endothelabhängigen und endothelunabhängigen Relaxationsfähigkeit der Aorta (s. Abbildung 4-26 A bis D, Statistik Faktor „Genotyp“). Dies gilt sowohl für die Messungen mit Acetylcholin, als auch für die mit Nitroglycerin. Betrachtet man die Dosis-Wirkungskurven der Tiere, die lediglich Hoch- oder Niedrigsalzdiät *ohne* ATII erhalten haben, fällt auf, dass die Aorten der immundefizienten Rag-1 ^{-/-} KO-Mauslinie widererwarten unter Hochsalzdiät *ohne* ATII bei kumulativer Gabe von Nitroglycerin und auch unter Niedrigsalzdiät *ohne* ATII bei kumulativer Gabe von Acetylcholin und Nitroglycerin signifikant schlechter relaxieren als die Aorten der immunkompetenten C57BL/6J WT Mauslinie (s. Abbildung 4-26 B und C, Statistik Faktor „Genotyp“). Für die Aorten beider Genotypen in beiden Diätgruppen mit und *ohne* ATII Behandlung gilt, dass die Relaxationsfähigkeit der Gefäße mit zunehmender Konzentration des jeweiligen Vasodilatators (Acetylcholin oder Nitroglycerin) signifikant zunimmt (p-Werte jeweils <0,0001, 2-way ANOVA, *not repeated measures*. Bonferroni Posttest).

Maximale Relaxation der Aorten unter maximaler Dosis von Acetylcholin und Nitroglycerin

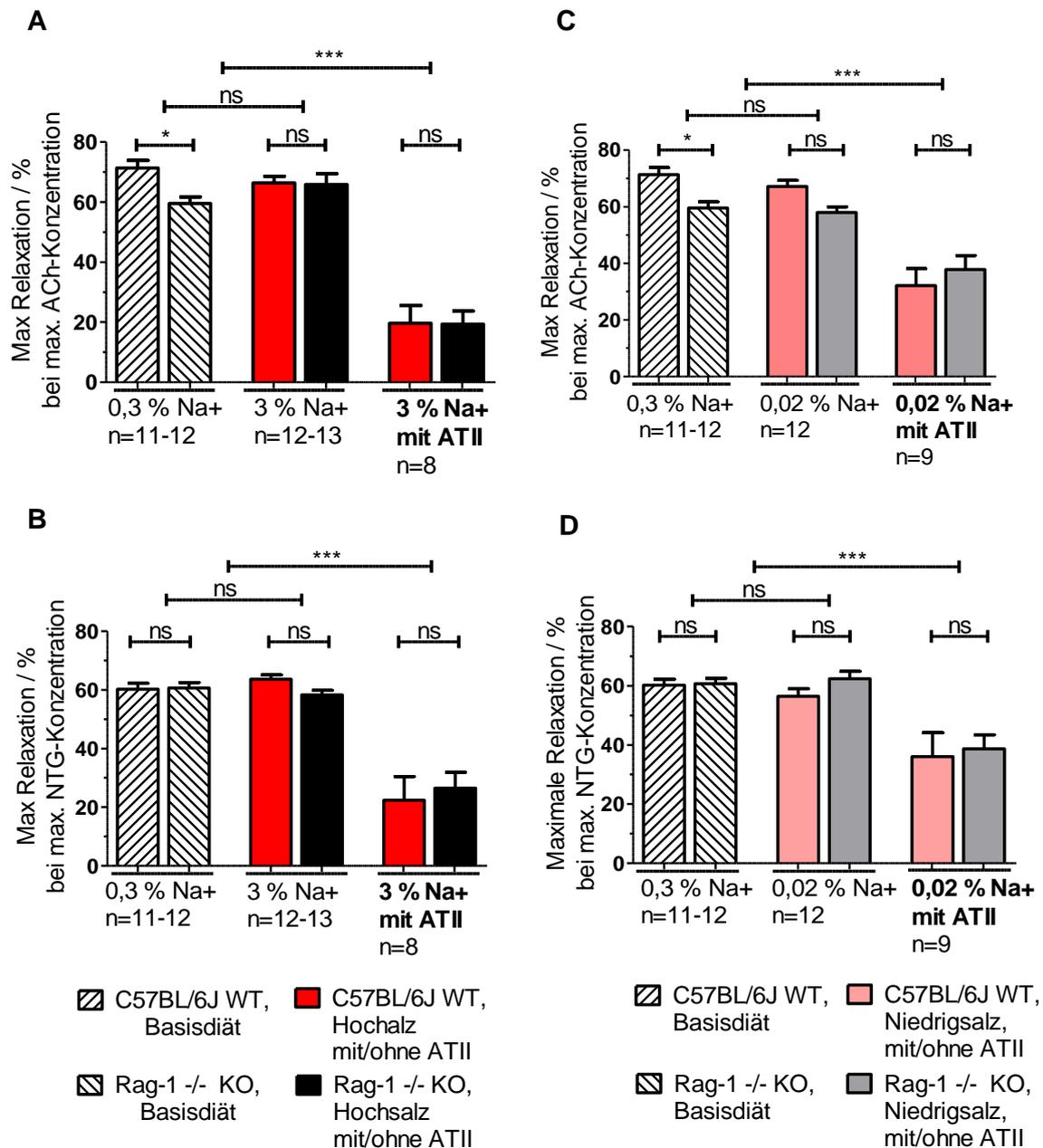


Abbildung 4-27: Maximale Vasodilatation in [%] unter maximaler Dosis von Acetylcholin bzw. von Nitroglycerin, Vergleich C67BL/6J WT vs. Rag-1 -/- KO. A) Top-Werte Acetylcholin unter Basis- und Hochsalzdiät mit und ohne ATII (Faktor Genotyp: $F(1,58)=2,268$, $p=0,1375$), B) Top-Werte Nitroglycerin unter Basis- und Hochsalzdiät mit und ohne ATII (Faktor Genotyp: $F(1,58)=0,006132$, $p=0,9379$), C) Top-Werte Acetylcholin unter Basis- und Niedrigsalzdiät mit und ohne ATII (Faktor Genotyp: $F(1,57)=3,540$, $p=0,0649$), D) Top-Werte Nitroglycerin unter Basis- und Niedrigsalzdiät mit und ohne ATII (Faktor Genotyp: $F(1,57)=0,9471$, $p=0,3344$). Statistik: 2-way ANOVA, *not repeated measures*. Bonferroni Posttest.

Hinsichtlich der maximalen Relaxationsfähigkeit bei maximaler Acetylcholin- bzw. Nitroglycerindosis gibt es zwischen den Aorten der Mäuse beider Genotypen keinen signifikanten Unterschied (s. Abbildung 4-27 A bis D, Statistik Faktor „Genotyp“). Lediglich unter Basisdiät findet der Bonferroni Posttest einen signifikanten Unterschied zwischen dem C57BL/6J WT und dem Rag-1 -/- KO hinsichtlich der maximalen Relaxationsfähigkeit unter

Sowohl bei den Messungen der Gefäßreagibilität mit Acetylcholin, als auch bei denen mit Nitroglycerin ist die maximale Relaxationsfähigkeit der Aorta bei maximaler Dosis des jeweiligen Vasodilatators bei dem immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO unter Hochsalzdiät mit ATII signifikant schlechter, als unter Niedrigsalzdiät mit ATII. Bei dem Vergleich der Hoch-, mit der Niedrigsalzdiät zeigt die zweifaktorielle Varianzanalyse für den Rag-1 $-/-$ KO zwar keinen signifikanten Einfluss der Diät auf die maximale Vasodilatation bei maximaler Acetylcholindosis an (s. Abbildung 4-28 A, Statistik: Faktor Diät, „Rag-1 $-/-$ KO“), allerdings findet der Bonferroni Posttest einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Diätgruppen des Rag-1 $-/-$ KO. Ein aufgrund der Diskrepanz des Ergebnis zwischen dem Omnibustest und dem Posttest durchgeführter ungepaarter T-Test für die beiden Gruppen „Rag-1 $-/-$ KO max. Relaxation Aorta unter max. Acetylcholindosis unter Hochsalzdiät mit ATII“ und „Rag-1 $-/-$ KO max. Relaxation Aorta unter max. Acetylcholindosis unter Niedrigsalzdiät mit ATII“ ergibt mit $p=0,0145$ (= zwei Sterne **) ein dem Posttest entsprechendes Ergebnis. Bei der immunkompetenten C57BL/6J WT Mauslinie hat die Diät weder für die Messungen mit Acetylcholin, noch für die Messungen mit Nitroglycerin einen signifikanten Einfluss auf die maximale Relaxation der Aorta (s. Abbildung 4-28 A und B, Statistik Faktor Diät „C57BL/6J WT“).

Hill-Parameter (LOG EC₅₀, Steigung)

Beide Parameter wurden mithilfe der nicht-linearen Regression (Ausgleichsrechnung) von der GraphPad Prism Software Version 5.02 für die Dosis-Wirkungskurven der Gefäßrelaxation in [%] und der aufsteigenden Konzentration in [M] des jeweiligen Vasodilatators (Acetylcholin, Nitroglycerin) für die Aorten beider Genotypen und aller Diät- bzw. Interventionsgruppen errechnet.

| Hill-Parameter SEM, 95 % Konfidenzintervall | C57BL/6J WT | Rag-1 $-/-$ KO | Signifikanz |
|---|--|--|----------------------------------|
| LOG EC₅₀ | | | |
| Messung mit Acetylcholin | | | |
| Basisdiät | -7,297 +/- 0,04765 [-7,401 bis -7,192] | -7,078 +/- 0,05954 [-7,211 bis -6,945] | s ** (p=0,0088) |
| Niedrigsalz | -7,261 +/- 0,07221 [-7,420 bis -7,102] | -7,056 +/- 0,04951 [-7,165 bis -6,947] | s * (p=0,0286) |
| Hochsalz | -7,332 +/- 0,07435 [-7,496 bis -7,168] | -7,156 +/- 0,04266 [-7,249 bis -7,063] | ns |
| Niedrigsalz mit ATII | -7,112 +/- 0,1824 [-7,532 bis -6,691] | -7,019 +/- 0,08820 [-7,223 bis -6,816] | ns |
| Hochsalz mit ATII | -6,943 +/- 0,1422 [-7,279 bis -6,607] | -6,810 +/- 0,2787 [-7,469 bis 6,151] | ns |

| Hill-Parameter SEM, 95 % Konfidenzintervall | C57BL/6J WT | Rag-1 -/- KO | Signifi-kanz |
|---|---|---|--------------|
| Messung mit Nitroglyzerin | | | |
| Basisdiät | -7,379 +/- 0,04269 [-7,473 bis -7,285] | -7,322 +/- 0,04315 [-7,418 bis -7,226] | ns |
| Niedrig salzdiät | -7,406 +/- 0,08267 [-7,588 bis -7,224] | -7,362 +/- 0,03252 [-7,434 bis -7,291] | ns |
| Hochsalzdiät | -7,422 +/- 0,02620 [-7,479 bis -7,364] | -7,321 +/- 0,03376 [-7,395 bis -7,247] | ns |
| Niedrig salzdiät mit ATII | -7,255 +/- 0,05790 [-7,389 bis -7,122] | -7,370 +/- 0,09481 [-7,589 bis -7,151] | ns |
| Hochsalzdiät mit ATII | -7,206 +/- 0,1927 [-7,662 bis -6,750] | -7,085 +/- 0,1763 [-7,502 bis -6,668] | ns |
| Steigung (Hill-Koeffizient) | | | |
| Messung mit Acetylcholin | | | |
| Basisdiät | 0,8576 +/- 0,02656 [0,7992-0,9161] | 0,9495 +/- 0,04199 [0,8560-1,043] | ns |
| Niedrigsalz | 0,8450 +/- 0,03760 [0,7662-0,9278] | 1,052 +/- 0,05212 [0,9377-1,167] | ns |
| Hochsalz | 0,8605 +/- 0,05343 [0,7429-0,9781] | 0,9490 +/- 0,04469 [0,8516-1,046] | ns |
| Niedrigsalz mit ATII | 1,182 +/- 0,1745 [0,7796-1,584] | 0,9976 +/- 0,1378 [0,6799-1,315] | ns |
| Hochsalz mit ATII | 0,9473 +/- 0,06191 [0,8009-1,094] | 0,8922 +/- 0,1288 [0,5877-1,197] | ns |
| Messung mit Nitroglyzerin | | | |
| Basisdiät | 1,190 +/- 0,07070 [1,035-1,346] | 1,137 +/- 0,06467 [0,9932-1,281] | ns |
| Niedrigsalz | 1,168 +/- 0,1037 [0,9396-1,396] | 1,113 +/- 0,08399 [0,9284-1,298] | ns |
| Hochsalz | 1,050 +/- 0,06529 [0,9068-1,194] | 1,070 +/- 0,05513 [0,9501-1,190] | ns |
| Niedrigsalz mit ATII | 1,039 +/- 0,1524 [0,6876-1,391] | 1,260 +/- 0,2037 [0,7902-1,730] | ns |
| Hochsalz mit ATII | 1,232 +/- 0,1599 [0,8536-1,610] | 1,380 +/- 0,3713 [0,5017-2,258] | ns |

Tabelle 4-6: Hill-Parameter (LOG EC₅₀ und Steigung) für die Dosis-Wirkungskurven der Gefäßreagibilität beider Genotypen unter allen Diäten (Basis-, Niedrig- und Hochsalz), sowie allen Interventionsgruppen (mit/ohne ATII) und dem jeweiligen Vasodilatator (Acetylcholin und Nitroglyzerin). C57BL/6J WT vs. Rag-1 -/- KO. Standardfehler des Mittelwertes und 95 % Konfidenzintervall. Statistik: 2-way ANOVA, *not repeated measures*. Bonferroni Posttest.

Unter der Gabe von zwei hypertensiven Stimuli (Hochsalzdiät und ATII) ist der LOG EC₅₀ Wert bei beiden Genotypen signifikant niedriger, als jeweils unter Basis- und Hochsalzdiät *ohne* ATII (ein hypertensiver Stimulus). Hochsalzdiät in Kombination mit exogener ATII Zufuhr verschlechtert folglich bei beiden Genotypen die Empfindlichkeit der Gefäße sowohl auf den Vasodilatator Acetylcholin, als auch auf den Vasodilatator Nitroglyzerin signifikant.

Dies gilt nicht für die Niedrigsalzdiätgruppe mit zusätzlicher ATII Zufuhr (ein hypertensiver Stimulus). Hier ist die Empfindlichkeit der Gefäße unter Niedrigsalzdiät mit ATII nicht signifikant geringer, als jeweils unter Basis- oder Niedrigsalzdiät *ohne* ATII⁸⁴.

Zwischen den Genotypen gibt es hinsichtlich der vaskulären Empfindlichkeit (LOG EC₅₀) gegenüber den beiden Vasodilatoren (Acetylcholin, Nitroglyzerin) und hinsichtlich der Promptheit der Gefäßrelaxation (Steigung) keinen signifikanten Unterschied.

Einzige Ausnahme ist die Empfindlichkeit (LOG EC₅₀) der Aorten gegenüber Acetylcholin unter Basis- und Niedrigsalzdiät *ohne* ATII. Hier ist der LOG EC₅₀ Wert bei der immundefizienten Rag-1 ^{-/-} KO Mauslinie signifikant niedriger, als bei dem immunkompetenten C57BL/6J WT (s. Tabelle 4-6 „LOG EC₅₀ unter Basis- und Niedrigsalzdiät“). Dies ist konsistent mit der in Abbildung 4-26 C und 4-27 A und C gezeigten, signifikant schlechteren, endothelabhängigen (Maximal)Relaxation bei kumulativer bzw. maximaler Acetylcholindosis des Rag-1 ^{-/-} KO unter Basis- und Niedrigsalzdiät ohne ATII.

4.4.3. Zusammenfassung zu den Ergebnissen hinsichtlich der Endorganschäden

Histopathologie Aorta und Herz

- Grundsätzlich unterscheiden sich die beiden Genotypen hinsichtlich der kardiovaskulären Endorganschäden (Herzfibrose, Herzhypertrophie, Mediahypertrophie Aorta, Endothelintegrität *in vitro*) nicht signifikant voneinander. In Ausnahmen ist jedoch der immunkompetente C57BL/6J WT teilweise stärker betroffen: So sind 1. das Ausmaß der Mediahypertrophie der Aorta unter Hochsalzdiät mit ATII und 2. Das Ausmaß der Herzhypertrophie unter Niedrigsalzdiät mit ATII bei dem C57BL6J WT jeweils signifikant stärker ausgeprägt, als bei dem immundefizienten Rag-1 ^{-/-} KO
- Die ATII Behandlung führt hinsichtlich der vier Parameter für kardiovaskuläre Endorganschädigung sowohl bei dem C57BL/6J WT, als auch bei dem Rag-1 ^{-/-} KO zu einer jeweils im Vergleich zu den Basis- und Spezialsalzdiätgruppen *ohne* ATII signifikant stärkeren Ausprägung der jeweiligen Endorganschädigung. Mit Ausnahme der Herzhypertrophie bei dem Rag-1 ^{-/-} KO unter Niedrigsalzdiät mit zusätzlicher ATII Zufuhr. Hier ist der Unterschied zur Herzhypertrophie unter Basis- und Niedrigsalzdiät *ohne* ATII nicht signifikant.

⁸⁴ zweifaktorielle Varianzanalysen, *not repeated measures* „Faktor Intervention“ 1. für Basis- und Hochsalzdiät mit oder ohne ATII bei Acetylcholin: p=0,0052 und bei Nitroglyzerin: p=0,0331 und 2. für Basis- und Niedrigsalzdiät mit oder ohne ATII bei Acetylcholin: p=0,3714 und bei Nitroglyzerin: p=0,5226. Bonferroni Posttest.

- Die *unabhängige* Variable „Diät“ beeinflusst lediglich das Ausmaß der Herzfibrose bei beiden Genotypen signifikant. Hier ist die Herzfibrose bei beiden Mauslinien jeweils unter Hochsalzdiät mit ATII (zwei hypertensive Stimuli) signifikant stärker ausgeprägt, als unter Niedrigsalzdiät mit ATII (ein hypertensiver Stimulus). Zwar sind die Media- und Herzhypertrophie bei beiden Genotypen unter Hochsalzdiät mit ATII tendenziell auch ausgeprägter als unter Niedrigsalzdiät mit ATII, allerdings sind diese Unterschiede hier nicht signifikant.
- Die Immundefizienz des Rag-1 *-/-* KO schützt *nicht* vor ATII induzierter, kardiovaskulärer Endorganschädigung.

Funktionelle Gefäßreagibilität der Aorta bei Acetylcholin und Nitroglyzerin, *in vitro* Messungen im Organbad

- Die ATII Behandlung führt bei beiden Genotypen sowohl unter Hoch-, als auch unter Niedrigsalzdiät *grundsätzlich* zu einer signifikant schlechteren endothelabhängigen (Acetylcholin) und endothelunabhängigen (Nitroglyzerin) Vasodilatation. Dabei die Relaxationsfähigkeit der Aorten bei beiden Genotypen unter Hoch- und Niedrigsalzdiät mit zusätzlicher ATII Vorbehandlung gleich schlecht. Die Immundefizienz des Rag-1 *-/-* KO schützt demnach *nicht* vor ATII induzierter Endotheldysfunktion gegenüber dem C57BL/6J WT. Im Gegensatz dazu führen die Spezialsalzdiäten *ohne ATII* bei keinem der beiden Genotypen zu einer signifikanten Verschlechterung der Gefäßreagibilität im Vergleich zur Basisdiät.
- Die Relaxationsfähigkeit der Aorten ist bei beiden Genotypen unter Hochsalzdiät mit ATII tendenziell schlechter, als unter Niedrigsalzdiät mit ATII, wobei dieser Unterschied hier nur bei der immundefizienten Rag-1 *-/-* KO Mauslinie signifikant ist.

4.5. Milzgewichte

Die Milz gehört zu den sekundär lymphatischen Organen. Daher wurden im Rahmen der Organentnahme nach dem finalen Versuch die Milzen der Tiere beider Mauslinien zur (indirekten) Verifizierung der Genotypen gewogen.

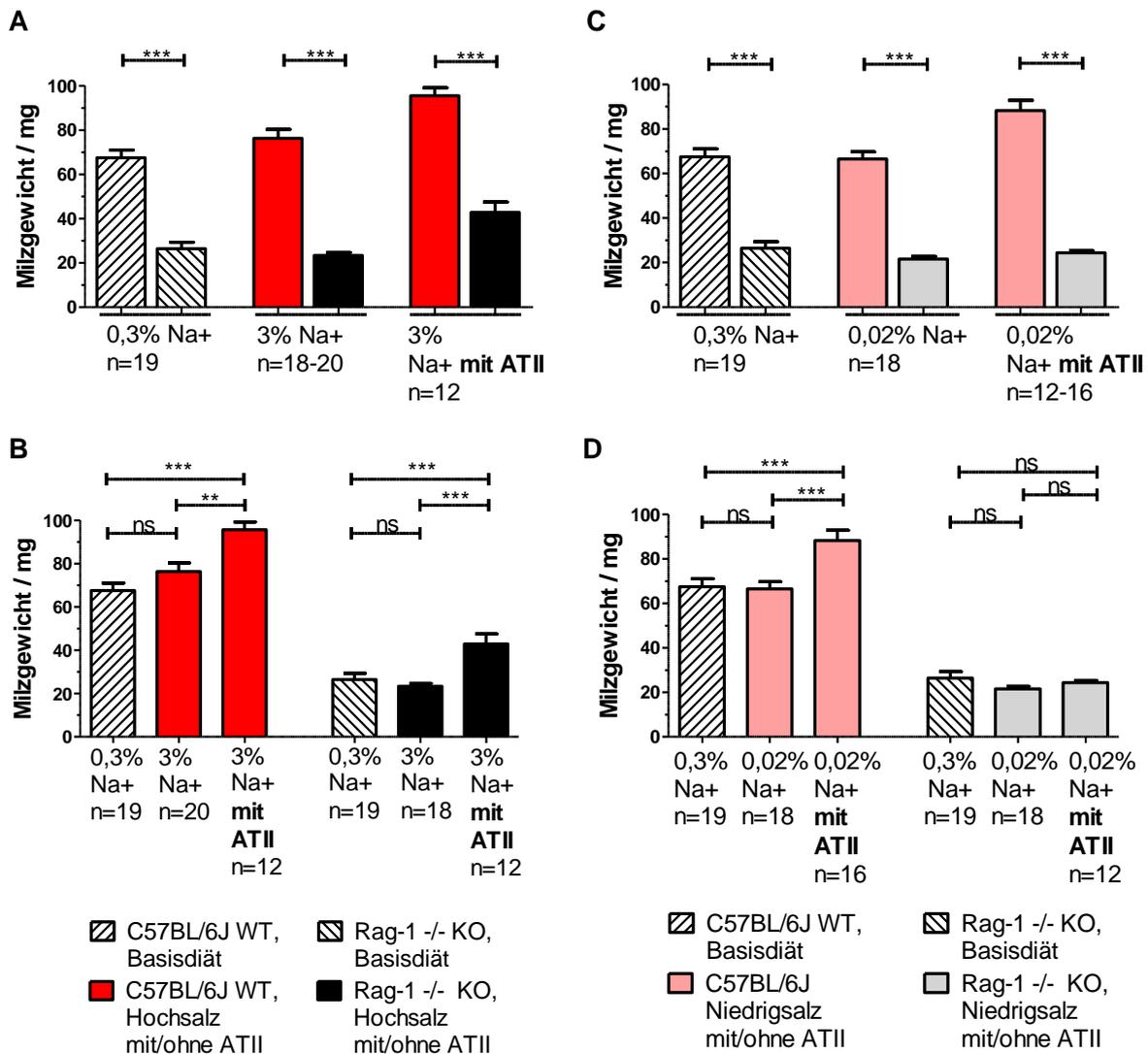


Abbildung 4-29: Milzgewichte beider Mauslinien unter allen Diät (Basis-, Hoch- und Niedrigsalz)- und Interventionsgruppen (mit/ohne ATII) **A**) Vergleich C57BL/6J WT vs. Rag-1 -/- KO unter Basis- und Hochsalzdiät mit und ohne ATII (Faktor Genotyp: $F(1,94)=302,0$, $p<0,0001$), **B**) Veränderung des Milzgewichts durch die Hochsalzdiät mit und ohne ATII für jeweils C57BL/6J WT ($F(2,48)=11,79$, $p<0,0001$) und Rag-1 -/- KO (Kruskal-Wallis Test bei $p=0,0016$ im Bartlett Test: $H(2,46)=21,86$, $p<0,0001$), **C**) Vergleich C57BL/6J WT vs. Rag-1 -/- KO unter Basis- und Niedrigsalzdiät mit und ohne ATII (Faktor Genotyp: $F(1,96)=380,8$ $p<0,0001$), **D**) Veränderung des Milzgewichts durch die Niedrigsalzdiät mit und ohne ATII für jeweils C57BL/6J WT ($F(2,48)=10,27$, $p=0,0002$) und Rag-1 -/- KO (Kruskal-Wallis Test bei $p<0,0001$ im Bartlett Test: $H(2,46)=3,864$, $p=0,1449$). Statistik: A) und C) 2-way ANOVA, *not repeated measures*. Bonferroni Posttest, B) und D) 1-way ANOVA, *not repeated measures*. Newman-Keuls Posttest und Kruskal Wallis Test (bei signifikant unterschiedlichen Varianzen im Bartlett Test $p<0,05$), *not repeated measures*. Dunn Posttest.

Die Milzen der immunkompetenten C57BL/6J WT Mäuse wiegen in allen Diätgruppen sowohl mit, als auch ohne ATII Behandlung signifikant mehr, als die der immundefizienten Rag-1 -/- KO Mäuse (s. Abbildung 4-29 A und C, Statistik Faktor „Genotyp“). Bei dem C57BL/6J WT führt die ATII Behandlung sowohl im Vergleich zur Basisdiät, als auch jeweils im Vergleich zur Hoch- und Niedrigsalzdiät ohne exogene ATII Zufuhr zu einer signifikanten Zunahme des Milzgewichts. Im Gegensatz dazu führen die beiden Spezialsalzdiäten ohne ATII im Vergleich zur Basisdiät zu keiner Gewichtszunahme der Milz (s. Abbildung 4-29 B und D Statistik für C57BL/6J WT). Auffällig ist hier, dass das Gewicht der Milz auch bei der immundefizienten Rag-1 -/- KO Mauslinie unter Hochsalzdiät mit ATII Zufuhr signifikant

gegenüber dem Gewicht unter Basis- und Hochsalzdiät *ohne* ATII ansteigt (s. Abbildung 4-29 B Statistik für Rag-1 $-/-$ KO). Dies gilt allerdings nicht für die Milzgewichte in der Nidrigsalzdiätgruppe. Hier führt die ATII Behandlung zu keiner signifikanten Gewichtszunahme der Milz im Vergleich zur Basis- bzw. Nidrigsalzdiät *ohne* ATII (s. Abbildung 4-29 D Statistik für Rag-1 $-/-$ KO).

Vergleich der Milzgewichte zwischen (Basis-)Hoch- und Nidrigsalzdiät mit und *ohne* ATII

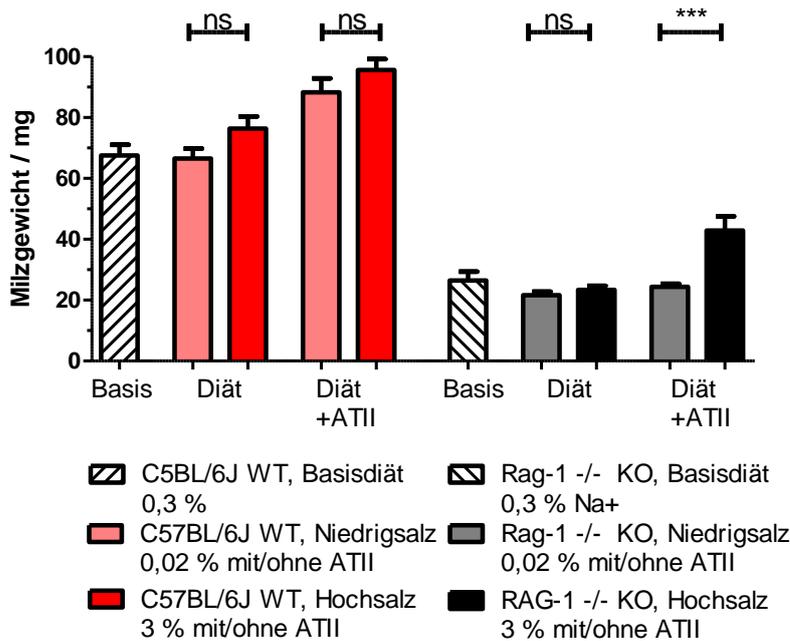


Abbildung 4-30: Vergleich der Milzgewichte unter Nidrig- und Hochsalzdiät mit und *ohne* ATII (Faktor Diät: C57BL/6J WT: $F(1,98)=3,345$, $p=0,0704$ $n=103$, Faktor Diät: Rag-1 $-/-$ KO: $F(1,92)=8,091$, $p=0,0055$, $n=97$). Statistik: 2way ANOVA, not repeated measures. Bonferroni Posttest.

Die *unabhängige* Variable „Diät“ hat lediglich bei dem Rag-1 $-/-$ KO einen signifikanten Einfluss auf das Milzgewicht. Demnach sind die Milzen bei der immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO Mauslinie bei der Behandlung mit zwei hypertensiven Stimuli (Hochsalzdiät mit ATII) signifikant schwerer als unter Nidrigsalzdiät mit ATII (ein hypertensiver Stimulus). Bei der immunkompetenten C57BL/6J WT Mauslinie sind die Milzen unter Hochsalzdiät mit und *ohne* ATII zwar tendenziell auch signifikant schwerer als unter Nidrigsalzdiät mit und *ohne* ATII, allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant (s Abbildung 4-30 Statistik Faktor „Diät“).

| Milzgewicht in [mg] | C57BL/6J WT Mean +/- SEM, 95% KI | Rag-1 -/- KO Mean +/- SEM, 95% KI | Signifikanz |
|--|---|---|-------------------------------|
| Basisdiät | 67,53 +/- 3,483 [60,21-74,84] | 26,47 +/- 2,879 [20,43-32,52] | s*** (p<0,0001) |
| Niedrigsalzdiät | 66,56 +/- 3,207 [59,79-73,32] | 21,67 +/- 1,120 [19,30-24,03] | s*** (p<0,0001) |
| Hochsalzdiät | 76,40 +/- 3,965 [68,10-84,70] | 23,39 +/- 1,351 [20,54-26,24] | s*** (p<0,0001) |
| Niedrigsalzdiät mit ATII | 88,28 +/- 4,552 [78,58-97,98] | 24,33 +/- 1,061 [22,0-26,67] | s*** (p<0,0001) |
| Hochsalzdiät mit ATII | 95,58 +/- 3,648 [87,55-103,6] | 42,91 +/- 4,662 [32,52-53,30] | s*** (p<0,0001) |
| Mausgewicht in [g] 28. Tag der Diät/finale Organentnahme | C57BL/6J WT Mean +/- SEM, 95% KI | Rag-1 -/- KO Mean +/- SEM, 95% KI | Signifikanz |
| Basisdiät | 27,34 +/- 0,3611 [26,58-28,09] | 28,72 +/- 0,4094 [27,87-29,58] | ns |
| Niedrigsalzdiät | 26,47 +/- 0,2037 [26,05-26,90] | 27,93 +/- 0,5898 [26,70-29,17] | S* (p=0,0243) |
| Hochsalzdiät | 26,42 +/- 0,6106 [25,15-27,69] | 26,82 +/- 0,5220 [25,73-27,91] | ns |
| Niedrigsalzdiät mit ATII | 26,12 +/- 0,4047 [25,26-26,98] | 25,74 +/- 0,5662 [24,49-26,98] | ns |
| Hochsalzdiät mit ATII | 26,68 +/- 0,3945 [25,81-27,55] | 25,37 +/- 0,6730 [23,89-26,85] | ns |
| Tibialänge in [cm] | C57BL/6J WT Mean +/- SEM, 95% KI | Rag-1 -/- KO Mean +/- SEM, 95% KI | Signifikanz |
| Basisdiät | 1,805 +/- 0,006939 [1,790-1,819] | 1,832 +/- 0,006699 [1,817-1,846] | S* (p=0,0002) |
| Niedrigsalzdiät | 1,793 +/- 0,003980 [1,785-1,801] | 1,820 +/- 0,007963 [1,803-1,836] | S* (p=0,0002) |
| Hochsalzdiät | 1,799 +/- 0,005918 [1,787-1,811] | 1,828 +/- 0,01092 [1,805-1,851] | S* (p=0,0045) |
| Niedrigsalz mit ATII | 1,822 +/- 0,006001 [1,809-1,835] | 1,834 +/- 0,008569 [1,815-1,853] | ns |
| Hochsalzdiät mit ATII | 1,817 +/- 0,007521 [1,800-1,833] | 1,822 +/- 0,01127 [1,797-1,846] | ns |

Tabelle 4-7: Milzgewicht [mg], Mausgewicht [g], Tibialänge [cm] für C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO unter Basis-, Niedrig- und Hochsalzdiät mit und *ohne* ATII. Das Mausgewicht entspricht dem Nettogewicht der Mäuse am letzten Tag der Diät (=Tag 28) vor Organentnahme abzüglich der miniosmotischen Pumpen und des Telemetriesenders. Statistik: 2-way ANOVA, *not repeated measures*, Bonferroni Posttest.

Um auszuschließen, dass die Ergebnisse hinsichtlich der Milzgewichte abhängig von der Körpergröße (gemessen an der Tibialänge in [cm]) oder abhängig vom Körpergewicht der Tiere sind, wurden die Milzgewichte einerseits auf die Tibialänge und andererseits auf das Mausgewicht durch Bildung des Quotienten aus Milzgewicht in [mg] : Tibialänge in [cm] bzw. Milzgewicht in [mg] : Mausgewicht in [g] normiert. Die Analysen mit diesen Quotienten ergeben dieselben Ergebnisse (nicht dargestellt), die auch in Abbildung 4-29 und 4-30 gezeigt sind.

5.Diskussion

5.1. Verifizierung des Genotyps

Die stets strikt metachrone Handhabung der Versuchstiere (1. Einzeltierhaltung, 2. kein gleichzeitiges Öffnen mehrerer Käfige zur Gewichtskontrolle, 3. deutliche Markierungen der Käfige mit dem jeweiligen Genotyp, 4. Prozess der Organentnahme zur Gewinnung von biologischem Material zur Datenerhebung wurde erst für ein Versuchstier durchgeführt und abgeschlossen, bevor mit dem nächsten weitergemacht wurde) minimierte das Risiko, Daten eines vermeintlichen Genotyps von einer anderen Mauslinie zu erheben. Überdies wurden die Genotypen vor und nach den Versuchen mittels PCR und Gelelektrophorese verifiziert. Die Testungen ergaben hier bei jeder Maus den erwarteten Genotyp, sodass Verwechslungen nahezu ausgeschlossen werden können. Phänotypisch sind die Milzen als sekundär lymphatisches bei den als immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO Genotyp gekennzeichneten Mäusen sowohl in der Basis-, als auch in der Niedrig-, und Hochsalzdiätgruppe mit und *ohne* ATII signifikant leichter, als beim immunkompetenten C57BL/6J WT. Diese indirekte Methode zur Verifizierung des Genotyps zeigt, dass die erwarteten Genotypen ihrem erwarteten Phänotyp entsprechen und es zu keinen Verwechslungen hinsichtlich der Handhabung der Mäuse und der Zuordnung ihrer Daten zu der richtigen Mauslinie gekommen ist.

5.2. Semi-sterile Haltungsbedingungen bei Immundefizienz

Aufgrund der Immundefizienz des Rag-1 $-/-$ KO und zur Minimierung des Risikos für durch unterschiedliche Haltung der Mauslinien verfälschte Daten, wurden beide Genotypen unter denselben semi-sterilen Bedingungen gehalten. So wurde auch bei dem Umgang mit dem immunkompetenten C57BL/6J WT auf die größt mögliche Reinlichkeit geachtet. Die Umgebung der Versuchstiere beider Mauslinien wurde durch die Filterung der Luft in den ventilierten Käfigschränken der Maushaltungsräume einerseits und durch die Gabe von autoklaviertem Wasser und gammabestrahelter Nahrung andererseits, sowie durch das Arbeiten unter der Gebläsewerkbank bei Öffnung der Käfige und postoperativer Antibiotikaprophylaxe so pathogenarm wie möglich gehalten. Aufgrund der Abwesenheit des erworbenen Immunsystems hat der Rag-1 $-/-$ KO ein erhöhtes Risiko für Infektionen. Unter immunsuppressiven Bedingungen ist vor allem das Zytomegalie-Virus (CMV, engl. *cytomegalie virus*) ein signifikanter Krankheitserreger (Kfutwah et al. 2017). Eine mögliche, subklinische Infektion der Mäuse durch mikrobielle Kontamination trotz aller Vorkehrungen ist daher nicht gänzlich auszuschließen. Diverse Studien mit Fokus auf die Pathogenese der essentiellen Hypertonie zeigen hierbei, dass sowohl beim Menschen, als auch bei der Maus eine Assoziation zwischen einer Infektion mit dem Zytomegalie-Virus und einer höheren Prävalenz von arterieller Hypertonie existiert (Cheng et al. 2009, Yu et al. 2011). Überdies

gibt es auch Hinweise, dass ein erhöhter CRP-Wert im Rahmen anderer Infektion, wie z.B. bei einer Peridontitis (Desvarieux et al. 2010), sowie das Vorhandensein von Antikörpern gegen das Hepatitis A Virus und gegen das Bakterium *Helicobacter pylori* mit einem erhöhten Risiko für Bluthochdruck verbunden sind (Zhu et al. 2004, Ji et al. 2017). Allerdings ergab sich bei den im Rahmen der regelmäßigen Mausvisiten durchgeführten Kontrollen des Trink-, Futter- und Gewichtsverlaufs, sowie der Evaluation des Fellstatus (glatt-glänzend oder matt-struppig) oder der Beobachtung der allgemeinen Aktivität (natürliches Fluchtverhalten oder in der Ecke kauend) zu keinem Zeitpunkt der Verdacht auf das Vorliegen einer derartigen Erkrankung bei den immundefizienten Tieren. Auch aus der Versuchstierhaltung des UKE wurde kein Auftreten von Infektionen gemeldet.

5.3. Radio-Telemetrie Methode

Die Messung des Blutdrucks war für diese Arbeit von zentraler Bedeutung und entsprach demnach der wichtigsten Methode für die Fragestellung, inwiefern T-Lymphozyten die ATII induzierte Blutdruckantwort modulieren. Neben dem mittleren arteriellen Druck, dem systolischen und diastolischen Druck wurden auch die Herzfrequenz und die Aktivität der Tiere gemessen. Die in dieser Arbeit zu diesem Zweck verwendete Telemetrie-Methode gilt seit Jahrzehnten aufgrund der Genauigkeit der Messmethode als Goldstandard (Mills et al. 2000). Allerdings handelt es sich hier um eine invasive Methode und in den Organismus eingebrachte Fremdkörper, wie der in die *A. carotis* eingesetzte Telemetrie-Katheter, sind grundsätzlich Infektionsquellen, die letztendlich den Blutdruck bei systemischer Ausbreitung beeinflussen können. Daher wurden alle Katheter nach der Organentnahme unter dem Mikroskop auf Auffälligkeiten wie Thromben, bakterielle Vegetationen oder Eiter hin überprüft. Diesbezüglich waren die entnommenen Materialien unauffällig, sodass der genannte Pathomechanismus als mögliche Fehlerquelle als sehr unwahrscheinlich zu bewerten ist. Insgesamt wurden 42 Versuchstiere der Telemetrie-Operation unterzogen (21 C57BL/6J WT und 21 Rag-1 ^{-/-} KO Mäuse). Davon starben zwei Rag-1 ^{-/-} KO Mäuse nach der Operation. Von den verbliebenen 19 Rag-1 ^{-/-} KO Mäusen mussten insgesamt vier und von den 21 C57BL/6J WT insgesamt fünf Tiere aufgrund von defekten Telemetrie-Sendern, die entweder kein Signal oder ein nicht mit dem Leben zu vereinbarenden, niedrigen Blutdruck bei augenscheinlich intakter Gesundheit der Mäuse anzeigten, von der Auswertung ausgeschlossen werden. Die in dieser Arbeit erhobenen telemetrischen Daten sind von sehr guter Qualität. Parameter hierfür ist neben einem jeweils realistischen, mit dem Leben zu vereinbarem Blutdruck der Tiere auch der erhaltene Tag-/Nachtrhythmus, der belegt, dass es sich bei den Messungen um keine Artefakte handelt. Der erhaltene Biorhythmus bei jedem einzelnen Tier spricht zudem dafür, dass die in die *A. carotis* eingeführten Telemetrie-Messkatheter im Verlauf nicht disloziert sind. Überdies wurde im Rahmen der Senderentnahme *postmortem* bei allen Tieren, von denen die Vitalparameter

ausgewertet wurden, die korrekte Lage des Katheters in der *A. carotis* festgestellt. Grobe Fehlmessungen hinsichtlich des Blutdrucks, der Herzfrequenz und Aktivität sind demnach auszuschließen. Weiterhin sind das Niveau des Blutdrucks und der Herzfrequenz, sowie die Verläufe dieser Parameter vor und nach ATII Gabe mit den hämodynamischen Messungen aus vorangegangenen Arbeiten mit einer ATII induzierten Hypertonie sowohl aus unserem Institut am UKE⁸⁵, als auch aus internationalen Laboren (Guzik et al. 2007, Crowley et al. 2010, Mian et al. 2016) vergleichbar.

5.4. ATII induzierte Hypertonie mittels osmotischer Minipumpen

Die s.c. Implantation von miniosmotischen Pumpen ist ein etabliertes Verfahren im tierexperimentellen Modell der ATII induzierten, arteriellen Hypertonie. Es wird seit mehreren Jahren in Arbeiten des IZIP und anderen Instituten am UKE (Wenzel et al. 2011), sowie in Arbeiten internationaler Labore angewandt (Rajagopalan et al. 1996). In dieser Arbeit führte die ATII Infusion über die implantierten, miniosmotischen Pumpen in der Hochsalzdiätgruppe zu einem durchschnittlichen (Nacht + Tag) MAP-Anstieg um 45,65 % (Rag-1 -/- KO: 49 %, C57BL/6J WT: 42,3 %) und in der Niedrigsalzdiätgruppe zu einem durchschnittlichen Blutdruckanstieg um 38,9 % (Rag-1 -/- KO: 42,8 %, C57BL/6J WT: 35 %). Demzufolge kommt es bei dem C57BL/6J WT unter Hochsalzdiät mit ATII insgesamt zu einem Anstieg des MAP auf 158,8 mmHg (nachts) bzw. auf 143,8 mmHg (tags) und unter Niedrigsalzdiät mit ATII auf 140,6 mmHg (nachts) bzw. auf 132,7 mmHg (tags). Bei dem Rag-1 -/- KO steigt der MAP unter Hochsalzdiät mit ATII auf insgesamt 158,2 mmHg (nachts) bzw. auf 139,8 mmHg (tags) und unter Niedrigsalzdiät mit ATII auf 146,0 mmHg (nachts) bzw. auf 138,7 mmHg (tags). Zwischen den Genotypen gibt es hinsichtlich der absolut erreichten Höhe des MAP folglich weder in der Hoch-, noch in der Niedrigsalzdiätgruppe signifikante Unterschiede. Der Rag-1 -/- KO ist demnach nicht vor einer ATII induzierten Hypertonie geschützt.

Die osmotischen Minipumpen von ALZET wurden mit einer zuvor berechneten, gewichtsadaptierten Menge einer ATII-/NaCl-Lösung derart befüllt, dass durchschnittlich in jeder Maus kontinuierlich eine ATII Dosis von $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ über die Pumpen abgegeben wurde. Aufgrund dieser Gewichtsadaptierung haben schwerere Mäuse tendenziell eine geringere ATII Menge pro Minute erhalten, als leichtere Mäuse. Zum Zeitpunkt der Implantation der miniosmotischen ATII Pumpen unterschieden sich die beiden Genotypen

⁸⁵ Dissertation von Jonas Leonhard Thiele: „Experimentelle Untersuchungen zur Hämodynamik & kardiovaskulären Schäden einer Angiotensin-II induzierten arteriellen Hypertonie in Rag-1-/- Mäusen“, Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, Prof. Dr. med. Heimo Ehmke, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf 2015,

⁸⁵ Dissertation Philipp Oser: „MPO-T-Lymphozyten-Interaktion im Rahmen der Angiotensin-II-induzierten Hypertonie“, Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, Prof. Dr. med. Heimo Ehmke, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 2016.

hinsichtlich ihres Gewichts jedoch weder in der Hoch-, noch in der Nidrigsalzdiätgruppe signifikant voneinander (s. Tabelle 5-1).

| Diät | durchschnittliches Gewicht in [g] vor Implantation der ATII Pumpen C57BL/6J WT (n=16) | durchschnittliches Gewicht [g] vor Implantation der ATII Pumpen Rag-1 -/- KO (n=15) | Signifikanz |
|-------------|--|--|-------------|
| Niedrigsalz | 27,80 g (n=8) | 28,26 g (n=8) | ns |
| Hochsalz | 28,01 g (n=8) | 27,07 g (n=7) | ns |

Tabelle 5-1: durchschnittliches Mausgewicht von C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO unter Niedrig- und Hochsalzdiät vor Implantation der ATII Pumpen. Ungepaarte T-Testung.

Demnach kann die Gleichheit beider Mauslinien hinsichtlich ihrer Blutdruckparameter nicht darauf zurückgeführt werden, dass die Rag-1 -/- KO Mäuse aufgrund etwaiger Gewichtsunterschiede evtl. eine höhere ATII Menge bekommen haben als die C57BL/6J WT Mäuse. Da die Minipumpen aus ein und derselben Charge sowohl für die Implantation in Rag-1 -/- KO-, als auch in C57BL/6J WT Tiere verwendet wurden, würden theoretisch mögliche Schwankungen bezüglich der Fördermenge zwischen verschiedenen Chargen beide Genotypen gleichermaßen betreffen, sodass ein systematischer Fehler ausgeschlossen werden kann. Das Blutdruckniveau das von den Mäusen beider Genotypen in dieser Arbeit durch die exogene Zufuhr von $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ATII erreicht wird, ist vergleichbar mit dem Blutdruckniveau beider Mauslinien in vorangegangenen Arbeiten des Instituts.

5.5. Organbadmethode

Vorteil der etablierten Organbad-Methode ist, dass man analoge *in vitro* Funktionsprüfungen mit einem Erfolgsorgan nach Explantation durchführen kann. In dieser Arbeit wurde in einem ersten Versuchsablauf die endothelabhängige Vasodilatation mithilfe von Acetylcholin und in einem zweiten Versuchsablauf die endothelunabhängige Vasodilatation mithilfe von Nitroglyzerin untersucht. Die Schwierigkeit bei diesem Versuch besteht darin, die Endothelschädigung während der Präparation der Gefäße (hier Aorten) vor Beginn der eigentlichen Versuche (bis die Gefäße im Organbad sind) so gering wie möglich zu halten. Während der Entnahme der Aorten aus der Maus, sowie während der Ablösung des perivaskulären Fetts unter dem Mikroskop ist die Schädigung des Endothels durch zu hohen Zug oder Druck möglich. Ebenso kann das Endothel bei dem gegensätzlichen Einführen der Drahttriangeln ins Gefäßlumen zum Aufspannen der Aorten im Organbad beschädigt werden, wenn die Drähte beim Einführen versehentlich am Endothel entlangschaben. Zudem ist es wichtig, für den Versuch lediglich zwei Aortenringe aus dem Abschnitt der *Aorta descendens* zu verwenden. Hierfür muss der *Arcus aortae* von der *Aorta descendens* scharf

abgetrennt werden, da die Verwendung von zwei Aortenringen aus unterschiedlichen Abschnitten der Aorta zu einer Verfälschung der Messwerte führen könnte. Bevor die Versuche beginnen, werden die Aortenringe im Organbad schließlich auf eine Vorspannung gebracht. Wird diese Vorspannung zu schnell zu hoch gewählt, kann es ebenfalls zu Endothelrissen kommen. In dieser Arbeit wurde eine max. Vorspannung der Aorten von 1,1 g (= 1,1 cN) nach schrittweiser Erhöhung der Spannung um 0,2 g pro sieben Minuten gewählt. Die Vorspannung soll generell die *in vivo* permanent bestehende Gefäß-Dehnung bzw. Wandspannung, der die Aorten durch die Pumpfunktion des Herzens und dem daraus resultierenden kontinuierlichen Blutfluss ausgesetzt sind, simulieren. Die Höhe der Vorspannung differiert in der Literatur stark. So gibt es viele Arbeiten, die noch geringere Vorspannungen (50-600 mg) als in dieser Arbeit gewählt haben (Pfeifer et al. 1998, Russell & Watts 2000) und Arbeiten, die eine wesentlich höhere Vorspannung von 2-3 g unter der Annahme, dass diese Spannung am ehesten dem in der Maus herrschenden MAP entspricht, angestrebt haben (Liu et al. 1997, Quaschnig et al. 2007). In dieser Arbeit erreichten die Versuchstiere *ohne ATII* Vorbehandlung unter Acetylcholin in der Niedrigsalzdiätgruppe eine durchschnittliche Maximalrelaxation von 62,55 % (C57BL/6J WT: 67,18 +/- 2,090 %, Rag-1 -/- KO: 57,92 +/- 2,059 %), in der Hochsalzdiätgruppe eine durchschnittliche Maximalrelaxation von 66,16 % (C57BL/6J WT: 66,42 +/- 2,160 %, Rag-1 -/- KO: 65,90 +/- 3,520 %) und in der Kontrollsalzdiätgruppe 65,42 % (C57BL/6J WT: 71,30 +/- 2,560 %, Rag-1 -/- KO: 59,55 +/- 2,136 %). Ähnliche Werte unter vergleichbaren Acetylcholin-Dosierungen wie in dieser Arbeit wurden auch in anderen, internationalen Arbeiten mit 63 +/- 9 % bei 10^{-5} M Acetylcholin (Vandeputte & Docherty 2002) und mit 60 +/- 5 % bei 3×10^{-9} M bis 10^{-5} M Acetylcholin (Pfeifer et al. 1998) erzielt. In anderen internationalen Arbeiten zeigen die Aortenringe, bei derselben Acetylcholin-Dosis wie in dieser Arbeit, deutlich bessere Maximalrelaxationen von bis zu 87 +/- 4 % (Schuh et al. 2003, Quaschnig et al. 2007). Auch in Vorarbeiten aus dem IZIP erreichen die Aortenringe mit Werten um die 80 % eine höhere Maximalrelaxation, als in dieser Arbeit^{86,87}. Ursächlich für diese Abweichungen kann zum einen die in den internationalen Arbeiten mit 2 g gewählte, stärkere Vorspannung und zum anderen ein unterschiedlich gut erhaltenes Endothel in den verschiedenen Arbeiten sein. Letzteres hängt mit der Qualität des handwerklichen Geschicks bzw. der Erfahrung während der Präparation der Aorten zusammen. In der Niedrigsalzdiätgruppe der mit $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ATII vorbehandelten Tiere erreichten die Aortenringe der Mäuse eine Maximalrelaxation von durchschnittlich 34,92 % (C57BL/6J WT:

⁸⁶ Dissertation von Jonas Leonhard Thiele: „Experimentelle Untersuchungen zur Hämodynamik & kardiovaskulären Schäden einer Angiotensin-II induzierten arteriellen Hypertonie in Rag-1-/- Mäusen“, Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, Prof. Dr. med. Heimo Ehmke, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf 2015.

⁸⁷ Dissertation Philipp Oser: „MPO-T-Lymphozyten-Interaktion im Rahmen der Angiotensin-II-induzierten Hypertonie“, Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, Prof. Dr. med. Heimo Ehmke, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 2016.

32,07 +/- 6,090 %, Rag-1 -/- KO: 37,77 +/- 4,966), wohingegen die maximale Vasodilatation der Aortenringe unter Hochsalzdiät mit ATII Vorbehandlung im Durchschnitt lediglich 19,51 % betrug (C57BL/6J WT: 19,67 +/- 5,949, Rag-1 -/- KO: 19,35 +/- 4,319 %). Im Vergleich zu Vorarbeiten aus dem IZIP, in denen trotz ATII Vorbehandlung mit teilweise höherer ATII Dosierung von $1,5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bei max. Acetylcholin-Dosis Relaxationswerte von 60 % erreicht wurden⁸⁸, sind die Maximalrelaxationen unter ATII in den jeweiligen Diätgruppen in dieser Arbeit deutlich schlechter. Neben einem möglicherweise schlechter erhaltenen Endothel könnte eine weitere Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse bei gleichen Versuchsbedingungen der Einsatz von verschiedenen Salzdiäten mit konsekutiv unterschiedlicher Aktivität des RAAS sein. In der vorangegangenen Arbeit wurde mit Basisdiät (0,3 % NaCl) und $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ATII gearbeitet. In dieser Arbeit wurden Niedrig (0,02 % NaCl)- und Hochsalzdiät (3 % NaCl) in Kombination mit $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ATII verwendet. Demnach erscheint es plausibel, dass die Maximalrelaxation der Aorten bei max. Acetylcholin-Dosis unter zwei hypertensiven Stimuli wie Hochsalzdiät mit ATII schlechter ist, als die Relaxationsfähigkeit der Gefäße unter einem hypertensiven Stimulus (Basisdiät mit ATII). Bezüglich der Daten zur endothelunabhängigen Relaxation unter NTG gibt es zwischen den vorangegangenen Arbeiten unseres Labors und dieser Arbeit hingegen geringere Diskrepanzen. In dieser Arbeit erreichten die Aortenringe von ATII unbehandelten Versuchstieren beider Genotypen in der Niedrigsalzdiät-Gruppe eine durchschnittliche Maximalrelaxation unter Nitroglycerin von 59,4 % (C57BL/6J WT: 56,45 +/- 2,584 %, Rag-1 -/- KO: 62,40 +/- 2,462 %) und in der Hochsalzdiät-Gruppe von ca. 61 % (C57BL/6J WT: 63,58 +/- 1,503 %, Rag-1 -/- KO: 58,35 +/- 1,464 %). In den Vorarbeiten lagen die Maximalrelaxationen der Aortenringe von Mäusen ohne ATII Behandlung unter Nitroglycerin ebenfalls bei zwischen 50-60 %. Das gleiche gilt für die mit $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ATII vorbehandelten Aortenringe. In dieser Arbeit wurden unter Nitroglycerin in beiden Diätgruppen bei beiden Mauslinien Relaxationswerte von 20-40 % beobachtet. In der Niedrigsalzdiät-Gruppe erreichten die Aortenringe unter max. Nitroglycerin-Dosis eine durchschnittliche Relaxation von 24,43 % (C57BL/6J WT: 22,36 +/- 8,063 %, Rag-1 -/- KO: 26,50 +/- 5,411 %) und in der Hochsalzdiät-Gruppe durchschnittlich 37,36 % (C57BL/6J WT: 36,09 +/- 8,022 %, Rag-1 -/- KO: 38,63 +/- 4,725 %). In vorangegangenen Arbeiten unseres Labors (mit teilweise höherer ATII Dosis von $1,5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)⁸⁹ liegen die Maximaldilatationen der Gefäße unter max. NTG-Dosis ebenfalls in einem vergleichbaren Bereich zwischen 30-50 %. Die Tatsache, dass sich die Daten zur endothelabhängigen Relaxation unter Acetylcholin in dieser Arbeit deutlich von denen vorangegangener Arbeiten unterscheiden, die Ergebnisse zur endothelunabhängigen Vasodilatation unter NTG jedoch nicht, erhärtet den Verdacht, dass die in dieser Arbeit verwendeten, unterschiedlich stark

⁸⁸ Dissertationen von Herrn Jonas Leonhard Thiele (2015) und Philipp Oser (2016). Ebd.

⁸⁹ Ebd.

konzentrierten Salzdiäten die Endotheldysfunktion unter ATII fördern. Nachfolgende Untersuchungen mit FACS Analysen könnten prüfen, ob es unter verschiedenen Salzdiäten (Niedrig- oder Hochsalzdiät) in Kombination mit ATII im Vergleich zur Verwendung von Basisdiät mit ATII zu einer vermehrten Migration von Immunzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, sowie zu einer erhöhten ROS Produktion des Gefäßsystems als Ursachen für die deutlich schlechtere endothelabhängige Vasodilatation in dieser Arbeit in Frage kommen. Vor Beginn der eigentlichen Messung wurden die Aortenringe mit 80 mM KCl inkubiert. Daraufhin konnte an dem nebenstehenden Bildschirm ein Spannungsaufbau verzeichnet werden. Die extrazelluläre Erhöhung der K^+ Konzentration verschiebt das Ruhemembranpotential der Kardiomyozyten zu positiveren Werten, wodurch spannungsaktive Na^+ Kanäle aktiviert werden, was zur Generierung eines Aktionspotentials führt. Dies diente den in der Phase zwischen Explantation und Einspannung in die Organbad-Apparatur erschlafften Aortenringen als „Vortraining“ vor der eigentlichen Kontraktion mit $PGF2\alpha$. Gleichzeitig galt die Inkubation mit KCl als Vitalitätsprüfung. Aorten, die keinen Kraftaufbau unter KCl zeigten, wurden von der Messung ausgeschlossen. Anders, als erwartet, zeigen die immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO Mäuse im Vergleich zu den immunkompetenten C57BL/6J WT Mäusen keine abgeschwächte Endotheldysfunktion im Organbad. Da pro Organbad-Versuch sowohl Rag-1 $-/-$ KO, als auch C57BL/6J WT Mäuse sowohl aus der Niedrig-, als auch der Kontroll- und Hochsalzdiätgruppe verwendet wurden und die Präparation stets durch mich erfolgte, ist davon auszugehen, dass in allen Gruppen beider Mauslinien das Endothel gleich gut bzw. gleich schlecht erhalten wurde. Der über die Anzahl der Organbad-Versuche eingetretene Übungseffekt mit schonenderer Präparation der Aortenringe und Einfädung der Drahttriangeln wirkte sich demnach auf die Gefäße beider Mauslinien gleich stark aus. Demzufolge können die Ergebnisse, auch bei möglicherweise schlechterem Endothelerhalt als in Vorarbeiten, dennoch als valide und aussagekräftig gewertet werden.

5.6. PSR Scoring zur Eruiierung des Ausmaßes der Herzfibrose

Bei dem PSR Score handelt es sich um ein in unserem Institut von Jonas Leonhard Thiele entwickeltes, subjektives Verfahren zur Quantifizierung von Herzfibrose. Hierbei bewerten verschiedene Gutachter verblindet pro Herz insgesamt zehn Gesichtsfelder, indem sie für das Ausmaß der Fibrose (Rotfärbung der Kollagenfasern in der PSR Färbung) pro Gesichtsfeld Punkte von 0 („keine Fibrose“), 1 („vermehrt Fibrose“) und 2 („sehr viel Fibrose“) vergaben. Daraus wurden schließlich pro Herz Summen gebildet. Je höher die Summe, desto höher das Ausmaß der Herzfibrose. In dieser Arbeit wurden die histologischen Herzschnitte insgesamt vier Mal an verschiedenen Tagen jeweils zwei Mal durch mich und zwei Mal durch einen weiteren Mitarbeiter der Arbeitsgruppe⁹⁰ bewertet, sodass sich für

⁹⁰ Herr cand. med. Claudius Steffen.

jedes Herz ein durchschnittlicher Fibrosewert aus insgesamt vier Summen (arithmetisches Mittel) ergab. In Vortestungen zeigte dieses Verfahren eine sehr gute Retest-Reliabilität unter verschiedenen Mitarbeitern des Instituts.

5.7. Quotient aus Herzgewicht zu Tibialänge als Surrogat für Herzhypertrophie

Das Ausmaß der Herzhypertrophie kann auch mithilfe des Quotienten aus Herzgewicht [g] / Mausgewicht [g] bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde der Grad der Herzhypertrophie allerdings mit dem Quotienten aus Herzgewicht [g] / Tibialänge [cm] ermittelt. Mithilfe der Tibialänge kann die kardiale Endorganschädigung akkurater bestimmt werden, als mit dem Mausgewicht, da letzteres in Abhängigkeit vom Alter oder verschiedenen Interventionen fluktuieren kann. Der Gebrauch des Quotienten aus Herzgewicht / Mausgewicht setzt voraus, dass entweder das Mausgewicht konstant bleibt oder, dass sich das Herzgewicht unter normalen Bedingungen parallel zum Mausgewicht verändert. Ein unter ATII typischerweise auftretender Gewichtsverlust würde folglich die Werte des Quotienten aus Herzgewicht / Mausgewicht falsch erhöhen. Die Tibialängen-Wachstums-Kurve hingegen bleibt nach der Ausreifung der Tiere relativ konstant und ist *unabhängig* vom Körpergewicht (Yin & Lakatta 1982).

5.8. Mediafläche als Surrogat für ATII induzierte, vaskuläre Endorganschädigung

Die Gefäße des Widerstandssystems zeigen einen dreischichtigen Wandaufbau. Nach luminal wird das Gefäß von der *Tunica intima* und dem ihr aufsitzenden Endothel begrenzt. Nach abluminal folgen die *Tunica media* mit einer dicken Schicht aus glatter Muskulatur und vielen zwischengelagerten, elastischen Lamellen, sowie schließlich die *Tunica externa* (Adventitia) mit dem perivaskulären Bindegewebe und Fett. In dieser Arbeit wurde das Ausmaß der ATII induzierten, vaskulären Endorganschädigung histopathologisch mithilfe der Mediafläche [cm²] bestimmt. Hierfür wurden mit der Image J 1.47f Fiji Software⁹¹ die innerste (nach luminal) und die äußerste (nach abluminal) Media-Lamelle manuell mit der Computermaus umrundet. Aus diesen beiden Umfängen errechnete das Fiji Programm schließlich die zwischen der innersten und äußersten Lamelle liegende Mediafläche. Andere Möglichkeiten zur Eruiierung der vaskulären Endorganschädigung sind neben der Mediafläche auch die Bestimmung der radialen Wanddicke (Liu et al. 2003, Guzik et al. 2007) oder die Messung der vaskulären DNA Synthesezunahme mithilfe des **Bromdesoxy-Uridin (BrdU) Index**, einem Quotient aus zuvor mit BrdU angefärbten und immunhistochemisch mit anti-BrdU Antikörpern nachgewiesenen Zellen zu der Gesamtzahl der in der Media vorhandenen, mit Hämatoxylin-Eosin Färbung sichtbar gemachten Zellen (Morishita et al. 1994). Da diese Methoden ähnliche Ergebnisse hervorbringen, haben wir uns für die Messung des Mediaumfangs entschieden und auf weitere Methoden verzichtet.

⁹¹ Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA.

5.9. Erfassung des Salz- und Wasserhaushaltes mittels Stoffwechselkäfigen

Die Stoffwechselkäfige werden weltweit vor allem für pharmakokinetische und pharmakodynamische Studien verwendet. Sie bieten den Vorteil, spezielle biologische Vorgänge und deren Veränderung bei Intervention genau erfassen zu können (Kalliokoski et al. 2013). Dementsprechend ist die Verwendung der metabolischen Käfige ein international etabliertes Verfahren bei verschiedensten Fragestellungen, wie z.B. zu metabolischen Prozessen (Maciel et al. 2016) oder zur Darm (Domènech et al. 2011)- und schließlich auch zur Nierenfunktion (Baracho et al. 2015, Sampaio et al. 2016). Allerdings ist auch bekannt, dass die Haltung von Versuchstieren (hier Mäusen) in metabolischen Käfigen aufgrund der blanken Umgebung ohne *cage-enrichment* zu einer starken Stressreaktion führt. Kalliokoski et al. zeigt, dass die mit dem Urin ausgeschiedene Menge von Kortikosteroiden bei Mäusen, die in metabolischen Käfigen gehalten wurden, im Vergleich zu Kontrollgruppen zehnfach erhöht ist (Kalliokoski et al. 2013). In derselben Studie konnte nachgewiesen werden, dass Mäuse in den Stoffwechselkäfigen an erhöhtem oxidativen Stress und vermehrtem Muskel-Katabolismus, gemessen an der erhöhten Kreatinin-Ausscheidung im Urin, litten. Es wurde demonstriert, dass zu Beginn der Stoffwechselkäfig-Haltung die Futter- und Wasseraufnahme, sowie auch das Körpergewicht und die Urinausscheidung als Surrogate für das Wohlbefinden der Maus grundsätzlich abnehmen, wobei ebenfalls ein Anstieg der Körperkerntemperatur zu beobachten ist (Kalliokoski et al. 2013). Die Studie verweist darauf, dass erst ab dem 14. Tag im Stoffwechselkäfig kein signifikanter Unterschied mehr zwischen Mäusen, die in den metabolischen Käfigen gehalten wurden, und der Kontrollgruppe hinsichtlich der genannten Parameter besteht. Nach EU Richtlinien ist die Haltung von Versuchstieren in metabolischen Käfigen von mehr als 24 h als schwerwiegende Prozedur für das Tier einzustufen⁹². Andererseits hat sich die gängige Praxis, die Versuchstiere aus Gründen der Akklimatisierung länger als 24 h in einer neuen Umgebung zu halten, in Hinblick auf die Aussagekraft der Ergebnisse als beste Vorgehensweise herausgestellt (Tuli et al. 1995, Kalliokoski et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die Equilibrierung der Parameter (Gewichtsverlauf, Futter- und Wasseraufnahme, Urinausscheidung) erst nach drei bis vier Tagen erfolgt (Stechman et al. 2010). Grundsätzlich wird empfohlen, die Verweildauer der Mäuse im Stoffwechselkäfig so kurz wie möglich zu halten. Demzufolge wurden die Mäuse in dieser Arbeit für insgesamt vier Tage (montag Morgen – freitag Morgen) am Ende der 28 tägigen Diät in den Stoffwechselkäfigen gehalten (kurz genug, um den Stress so gering wie möglich zu halten, lang genug, um reliable Ergebnisse zu erhalten). Parameter wie Nierenfunktion, Futter- und Wasseraufnahme, sowie Elektrolytkonzentrationen im Urin und Plasma wurden erst für 24 h am letzten Tag im Metabolischen Käfig gemessen und für die Auswertungen verwertet. Sollten die Parameter wie die Salz- und Wasseraufnahme, sowie die Kreatininkonzentration im Urin (mit

⁹² Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes.

Beeinflussung der GFR-Berechnung) von diesem Stress beeinflusst worden sein und sich von Werten unter physiologischen Messungen unterscheiden, so ist davon auszugehen, dass sich dieser Effekt gleichermaßen auf beide Genotypen ausgewirkt hat, da die Mäuse beider Mauslinien zur selben Zeit unter denselben Standardbedingungen in den metabolischen Käfigen gehalten wurden. Unter dieser Voraussetzung stellten wir keinen Unterschied hinsichtlich der Nierenfunktion, Salzausscheidung, Durst oder bezüglich des Elektrolythaushaltes fest. Die Abwesenheit des erworbenen Immunsystems beeinflusst diese Faktoren anscheinend nicht. Da weder *in vivo*, noch *in vitro* bis auf wenige Ausnahmen⁹³ Unterschiede zwischen den Mauslinien hinsichtlich der Blutdruckdaten und der Ergebnisse zu den kardiovaskulären Endorganschädigung weder unter Hoch-, noch unter Niedrigsalzdiät mit ATII beobachten konnten, haben wir darauf verzichtet, die Experimente im metabolischen Käfig unter ATII zu wiederholen. Vorausgesetzt, die Rag-1 ^{-/-} KO Mäuse hätten allein aufgrund ihrer Immundefizienz eine vermehrte Salzausscheidung oder eine bessere Nierenfunktion unter ATII Behandlung, so hätte dies hier offenbar keinen Einfluss auf die Blutdruckantwort auf ATII.

5.10. Diskussion der Blutdruckparameter

Verschiedene Studien mit adoptiven Transfer- und Knock-out- Mausmodellen zeigen, dass die Abwesenheit von T-Lymphozyten und proinflammatorischen Zytokinen wie IFN γ , IL-6 und IL-17 vor ATII induzierter Hypertonie und reno-kardiovaskulären Endorganschäden schützt. So zeigt Guzik et al., dass der immundefiziente Rag-1 ^{-/-} KO im Gegensatz zum immunkompetenten C57BL/6J WT unter Infusion von 490 ng*kg⁻¹*min⁻¹ ATII über 14 Tage mit einem signifikant geringeren Blutdruckanstieg reagiert (Guzik et al. 2007).

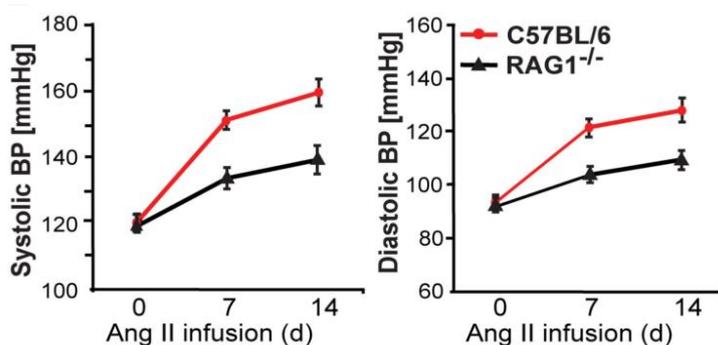


Abbildung 5-1: Aus „Role of the T cell in the genesis of angiotensin II – induced hypertension and vascular dysfunction“ von Tomasz J. Guzik et al., *The Journal of experimental Medicine* 2007 (Guzik et al. 2007). Während der 14tägigen ATII Infusion mit einer Dosis von 490 ng*kg⁻¹*min⁻¹ über eine subkutan implantierte osmotische Minipumpe steigen der systolische und diastolische Blutdruck des Rag-1 ^{-/-} KO signifikant geringer an, als beim C57BL/6J WT.

In dieser Arbeit konnten diese Blutdruckunterschiede leider nicht reproduziert werden. Hier unterscheiden sich die immundefiziente Rag-1 ^{-/-} KO- und die immunkompetente C57BL/6J

⁹³ C57BL/6J WT hat unter Niedrigsalzdiät mit ATII eine signifikant stärker ausgeprägte Herzhypertrophie und unter Hochsalzdiät mit ATII eine signifikant stärker ausgeprägte Mediahypertrophie.

WT Mauslinie weder unter der Hoch-, noch unter der Nidrigsalzdiät mit oder *ohne* ATII Behandlung ($490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) signifikant voneinander.

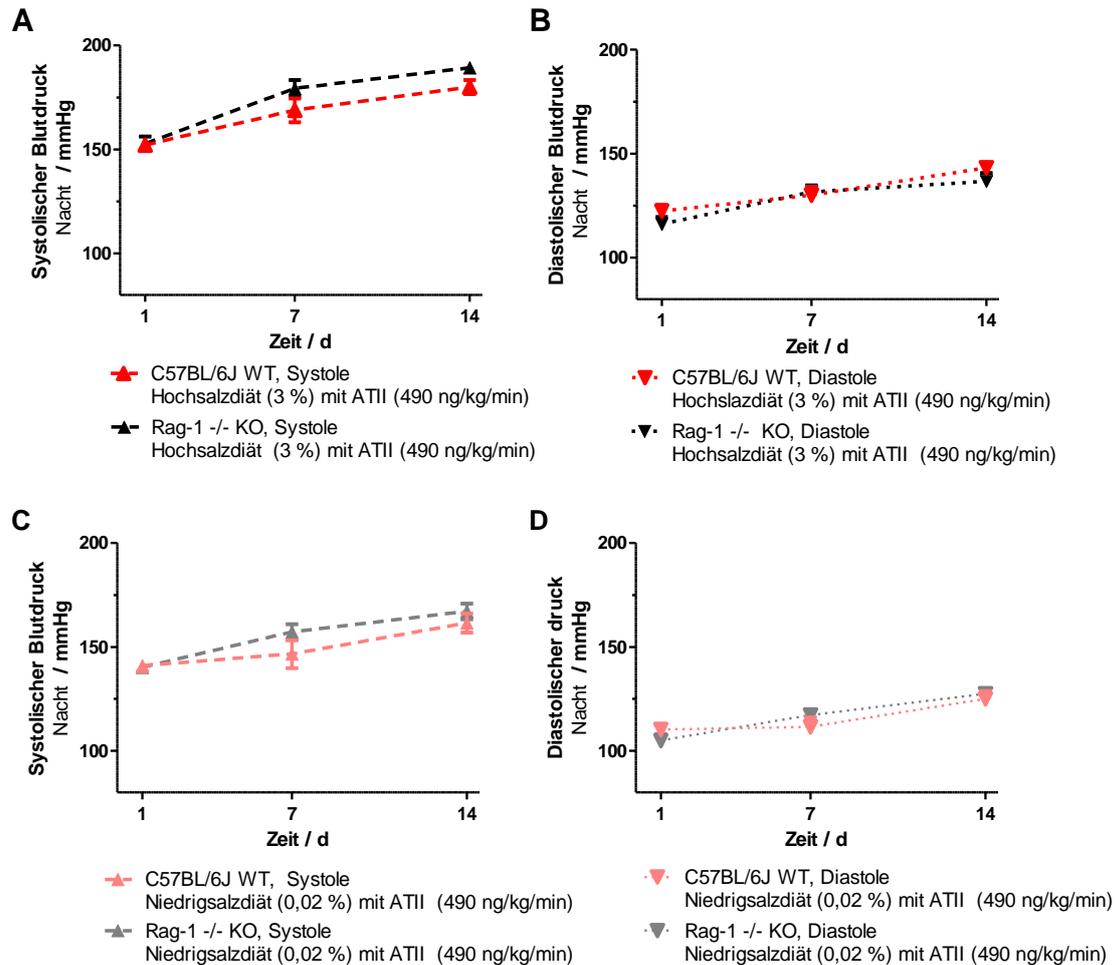


Abbildung 5-2: Vergleichsabbildung aus dieser Arbeit zu "Role of the T cell in the genesis of angiotensin II – induced hypertension and vascular dysfunction" (Guzik et al. 2007), Veränderung des systolischen und diastolischen Blutdrucks von Rag-1 -/- KO und C57BL/6J WT unter Behandlung von $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ATII via subkutan implantierter, osmotischer Minipumpe über 14 Tage zusätzlich zur Speziessalzdiät. A) Systolischer Druck unter Hochsalzdiät (3 % Na⁺) mit ATII, B) Diastolischer Druck unter Hochsalzdiät (3 % Na⁺) mit ATII, C) Systolischer Druck unter Niedrigsalzdiät (0,02 % Na⁺) mit ATII, D) Diastolischer Druck unter Niedrigsalzdiät (0,02 % Na⁺) mit ATII. Nacht. Verlauf der Parameter während des Tages sind ähnlich (nicht dargestellt).

In dieser Arbeit zeigen die Tiere der immunkompetenten C57BL/6J WT Mauslinie in der Basisdiätgruppe, die später auch Hochsalzdiät mit und *ohne* ATII erhielt, und schließlich in der Hochsalzdiätgruppe mit ATII einen signifikant höheren diastolischen Blutdruck als die Tiere der immundefizienten Rag-1 -/- KO Mauslinie. Insgesamt kann der signifikant höhere MAP der C57BL/6J WT Mäuse unter Basisdiät zu Beginn des Versuchs genau auf diesen signifikant höheren DBP der C57BL/6J WT Mauslinie unter Basisdiät zurückgeführt werden. Bei den C57BL/6J WT Mäusen in der Basisdiätgruppe, die später Niedrigsalzdiät mit und *ohne* ATII erhielt, zeigt sich dieser signifikant höhere MAP bzw. DBP im Vergleich zu den Rag-1 -/- KO Mäusen in derselben Basisdiätgruppe *nicht*. Die C57BL/6J WT Mäuse der beiden Basisdiätgruppen, die später in die Hoch- und Niedrigsalzdiätgruppen randomisiert worden sind, wurden zur selben Zeit bestellt, geliefert und abgeholt; entstammen also einer

„Charge“. Daher ist es möglich, dass durch die Randomisierung der C57BL/6J WT Mäuse zufällig die Mäuse der C57BL/6J WT Population, die einen höheren Blutdruck als ihre Wurfgeschwister haben, in eine Gruppe, also in die Basisdiätgruppe, die später Hochsalzdiät mit und *ohne* ATII erhielt, eingeteilt worden sind. Unter Immunstimulation mit 1. Hochsalzdiät und 2. ATII gibt es hinsichtlich des MAP keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen den Genotypen. Betrachtet man den 14 tägigen Verlauf des diastolischen Blutdrucks unter Hochsalzdiät mit ATII so unterscheiden sich die beiden Mauslinien den zweifaktoriellen Varianzanalysen zufolge hinsichtlich des diastolischen Blutdruckverlaufs nicht signifikant voneinander. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die diastolischen Blutdrücke beider Genotypen unter Hochsalzdiät mit ATII während der ersten zehn Tage insgesamt auf dem gleichen Blutdruckniveau verlaufen. Erst während der letzten vier Nächte und Tage übersteigt der DBP des C57BL/6J WT das Blutdruckniveau des DBP der Rag-1 *-/-* KO Mauslinie (s. Ergebnisse Abbildung 4-6 A und B, Statistik Diastole, Faktor „Genotyp“). Analysiert man schließlich die jeweils aus den letzten drei Nächten und Tagen gemittelten absoluten Werte des diastolischen Blutdrucks, unterscheiden sich die beiden Genotypen den 2-way ANOVAs zufolge hinsichtlich der absoluten Blutdruckhöhe unter Hochsalzdiät mit ATII signifikant voneinander. Es ist möglich, dass dieser signifikante Unterschied zwischen den Mauslinien hinsichtlich des DBP während der letzten drei Nächte und Tage Zufall ist und dieser bei Beobachtung bzw. ATII Behandlung über einen längeren Zeitraum wieder verschwunden wäre. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist folglich von einem tendenziell höheren diastolischen Blutdruck der immunkompetenten C57BL/6J WT Mauslinie unter Hochsalzdiät mit ATII auszugehen. Ähnlich verhält es sich mit dem systolischen Blutdruck. Analysiert man den 14 tägigen Verlauf unter Hochsalzdiät mit ATII, so ist wiederum der SBP der immundefizienten Rag-1 *-/-* KO Mauslinie signifikant höher als der SBP des immunkompetenten C57BL/6J WT. Allerdings sinkt der systolische Blutdruck im Verlauf bei dem Rag-1 *-/-* KO während der letzten drei bis vier Tage wieder auf das Niveau des SBP des C57BL/6J WT ab (s. Ergebnisse Abbildung 4-6 A und B). Aufgrund dieses Verlaufs mit dem insgesamt über zehn Tage höheren SBP der immundefizienten Rag-1 *-/-* KO Mauslinie und dem während der letzten drei Nächte und Tage gleich hohen SBP der Genotypen, fallen die 2-way ANOVAs unter Hochsalzdiät mit ATII signifikant hinsichtlich des systolischen Blutdruckverlaufs aus (s. Ergebnisse Abbildung 4-6 A und B, Statistik Systole, Faktor „Genotyp“). Analysiert man schließlich die zu einem Wert pro Nacht und Tag gemittelten, absoluten Werte des systolischen Blutdrucks aus den letzten drei Nächten und Tagen während derer sich der SBP des Rag-1 *-/-* KO wieder an den SBP des C57BL/6J WT angleicht, fällt dieser Unterschied in der zweifaktoriellen Varianzanalyse nicht mehr signifikant zwischen den Mauslinien aus. Auch hier ist dieser nicht signifikante Unterschied zwischen den Mauslinien hinsichtlich des SBP während der letzten drei Nächte und Tage unter Hochsalzdiät mit ATII als zufällig aufgetretener Verlauf, der bei einer Beobachtung

bzw. ATII Behandlung über einen längeren Zeitraum wieder verschwunden wäre, denkbar. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist folglich von einem tendenziell höheren systolischen Blutdruck der immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO Mauslinie unter Hochsalzdiät mit ATII auszugehen. Der Anstieg des SBP von der Basisdiät bis zur Hochsalzdiät mit ATII beträgt hier bei dem Rag-1 $-/-$ KO 66,5 mmHg (Vgl.: C57BL/6J WT: 49,7 mmHg). Die Differenz zwischen dem SBP unter Basisdiät und unter Nidrigsalzdiät mit ATII fällt hingegen bei dem Rag-1 $-/-$ KO mit 48,2 mmHg etwas geringer aus (Vgl.: C57BL/6J WT: 41,5 mmHg)⁹⁴. Der Anstieg des systolischen Blutdrucks unter ATII ist bei dem immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO in dieser Arbeit im Vergleich zu internationalen Arbeiten, die zur Blutdruckmessung unter anderem zwar die *tail-cuff* Methode, aber dieselbe ATII Dosierung von $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ verwendet haben, höher. In diesen Studien fällt der Anstieg des systolischen Blutdrucks bei den Rag-1 $-/-$ KO Mäusen mit 21 mmHg (Guzik et al. 2007), 11 mmHg (Ji et al. 2014), 16 mmHg (Wu et al. 2014) und 22 mmHg (Pollow et al. 2014) deutlich geringer aus. Selbst in der Studie von Mian et. al, in der die immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO Mäuse durch Vehikel die T-Lymphozyten der immunkompetenten C57BL/6J WT Mäuse und der Treg-defizienten *Scurfy* Mäuse erhielten, fiel der Anstieg des systolischen Blutdrucks unter ATII mit 35 mmHg ebenfalls etwas geringer aus (Mian et al. 2016), als in dieser Arbeit, in der die Rag-1 $-/-$ KO Mäuse nicht durch den adoptiven Transfer von T-Lymphozyten „immunkompetent“ gemacht wurden. Auch in den Arbeiten, die mit höheren ATII Dosierungen von 1.000 bis $2.000 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ gearbeitet haben, fällt der Anstieg des SBP unter ATII bei der immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO Mauslinie dort mit 31 mmHg (Uchida et al. 2010) und 34 mmHg (Ji et al. 2014) geringer aus, als in dieser Arbeit.

Abschließend ist also festzuhalten, dass der C57BL/6J WT unter Hochsalzdiät mit ATII einen tendenziell höheren diastolischen Blutdruck und der Rag-1 $-/-$ KO unter Hochsalzdiät mit ATII einen tendenziell höheren systolischen Blutdruck hat. Dies könnte schließlich Ursache dafür sein, dass sich die beiden Genotypen hinsichtlich des MAP unter Hochsalzdiät mit ATII nicht signifikant voneinander unterscheiden. Unter Basisdiät bei der Gruppe, die später Nidrigsalzdiät mit und *ohne* ATII erhielt, sowie schließlich unter Nidrigsalzdiät mit und *ohne* ATII gibt es diese Unterschiede hinsichtlich des diastolischen und systolischen Blutdrucks nicht. Hier sind die drei Blutdruckparameter (MAP, SBP, DBP) sowohl im Verlauf, als auch im Hinblick auf die aus den letzten drei Nächten und Tagen gemittelten, absoluten Blutdruckwerte bei beiden Mauslinien gleich. Zusammenfassend zeigt die immundefiziente Rag-1 $-/-$ KO Mauslinie bei ATII Behandlung weder unter Nidrigsalz-, noch unter Hochsalzdiät eine abgemilderte Blutdruckreaktion, im Gegenteil: als Antwort auf die ATII

⁹⁴ Diese Differenzen wurden mit den absoluten Blutdruckwerten, die aus den letzten drei Nächten und Tagen unter Speziatsalzdiät mit ATII zu einem Wert pro Nacht/Tag gemittelt wurden, berechnet und gelten für die nächtliche Aktivitätsphase der Mäuse (s. Tabelle 4-1, absolute Blutdruckwerte, Nacht). Die Blutdruckanstiege unter ATII während der täglichen Ruhephase sind vergleichbar.

Behandlung kommt es bei dem Rag-1 $-/-$ KO zu demselben signifikanten und massiven Anstieg der Blutdruckparameter wie auch beim C57BL/6J WT. Die Abwesenheit des adaptiven Immunsystems schützt die Rag-1 $-/-$ KO Mäuse folglich nicht vor ATII induzierter Hypertonie.

5.11. Diskussion der Herzfrequenz und Aktivität

Weder die Speziessalzdiäten, noch die ATII Behandlung haben einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität. Zu Beginn der ATII Behandlung fällt bei beiden Mauslinien in beiden Diätgruppen die Aktivität signifikant ab, um im weiteren Verlauf der ATII Messungen wieder auf das präoperative Ausgangsniveau anzusteigen (nicht dargestellt). Die Verlaufsschwankung ist auf die Erschöpfung der Tiere nach der ATII Implantation mit anschließender Rekonvaleszenz und Adaptation an die ATII Pumpen zurückzuführen. Dabei unterscheiden sich die beiden Mauslinien hinsichtlich ihrer Aktivität nicht signifikant voneinander. Der Blutdruckanstieg unter den beiden Speziessalzdiäten mit ATII, sowie die Gleichheit beider Genotypen hinsichtlich des MAP sind demnach *unabhängig* von der Aktivität. Anders verhält es sich mit der Herzfrequenz. Sie verändert sich bei beiden Genotypen signifikant über die Diäten und Interventionen hinweg (Beginn Niedrig-/Hochsalzdiät → Beginn zusätzliche ATII Behandlung). Bis auf die Hochsalzdiätgruppe, in der die Tiere der C57BL/6J WT Mauslinie vor allem durch die Hochsalzdiät (+46,15 bpm) und weniger durch die ATII Behandlung (+6,4 bpm) den stärksten Herzfrequenzanstieg zeigen, erfolgt der stärkste Anstieg der Herzfrequenz bei beiden Genotypen, analog zu den Blutdruckdaten, vor allem durch die zusätzliche ATII Zufuhr. Dieser Effekt von ATII auf die Herzfrequenz wurde in internationalen Laboren mit vergleichbarem Versuchsprotokoll hinsichtlich der ATII Dosierung und Behandlungsdauer im Unterschied zu dieser Arbeit nicht beobachtet. Hier führte die ATII Dosis von $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ zu keiner Veränderung der Herzfrequenz (Pollow et al. 2014, Ji et al. 2017). Allerdings hat ATII, wie in der Einleitung beschrieben, einen zentralen Einfluss auf die circumventrikulären Organe und führt durch die vermehrte neuronale ROS Produktion zu einem erhöhten Sympathikotonus mit konsekutiver Erhöhung des Blutdrucks und der Herzfrequenz (Potter EK 1985, Matsukawa & Reid 1990, Harrison et al. 2010). Dementsprechend erscheint der signifikante Herzfrequenzanstieg durch ATII sowohl unter Niedrig-, als auch unter Hochsalzdiät bei beiden Genotypen in dieser Arbeit plausibel. Die Höhe der mittels Radiotelemetrie gemessenen Herzfrequenz beider Genotypen ist unter ATII mit einer Höhe von maximal 580 bpm insgesamt mit den Ergebnissen aus anderen Arbeiten vergleichbar (Ji et al. 2014, Ji et al. 2017). In der Hochsalzdiätgruppe mit exogener ATII Infusion ist die Ruhfrequenz (Herzfrequenz bei AK = 0) bei dem immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO während der nächtlichen Aktivphase signifikant höher, als bei dem immunkompetenten C57BL/6J WT. Dies gilt jedoch nicht für die Ruhfrequenz während des Tages oder für die Herzfrequenz bei einer Aktivität > 0 unter

Hochsalzdiät mit ATII und generell auch nicht für die Herzfrequenz unter Nidrigsalzdiät mit/*ohne* ATII. Da sich dieser Befund der höheren Ruhefrequenz des Rag-1 $-/-$ KO unter Hochsalzdiät mit ATII während der Nacht jedoch weder in der absoluten Höhe der Blutdruckparameter bei einer Aktivität = 0, noch im Ausmaß der kardiovaskulären Endorganschädigungen niederschlägt, ist dieser signifikante Unterschied hier als klinisch nicht relevant mit fraglicher Reproduzierbarkeit zu bewerten. Dass aufgrund der Immundefizienz der Rag-1 $-/-$ KO Mäuse ein Unterschied zu den C57BL/6J WT Mäusen hinsichtlich der Herzfrequenz oder Aktivität zu erwarten wäre, ist bislang nicht bekannt.

5.12. kardiovaskuläre Endorganschädigungen

Ähnliches wie auch für die Blutdruckdaten gilt auch für das Ausmaß der hier untersuchten, ATII induzierten, kardiovaskulären Endorganschädigungen (Mediahypertrophie der Aorta, *in vitro* gemessene Endotheldysfunktion Aorta, Herzhypertrophie und Herzfibrose). Grundsätzlich zeigen sich in dieser Arbeit im Vergleich zu dem C57BL/6J WT bei der immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO Mauslinie durch die Abwesenheit der T-Lymphozyten, anders als von Guzik et. al publiziert (Guzik et al. 2007), keine abgemilderten, kardiovaskulären Folgeschäden nach ATII induzierter Hypertonie. Zwar sind die Mediahypertrophie der Aorta unter Hochsalzdiät mit ATII und die Herzhypertrophie unter Nidrigsalzdiät mit ATII bei dem immunkompetenten C57BL/6J WT jeweils signifikant stärker ausgeprägt, als bei dem immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO, dennoch fallen die ATII induzierten, kardiovaskulären Folgeschäden bei dem Rag-1 $-/-$ KO unter ATII im Vergleich zu den Diäten *ohne* ATII, ebenso wie bei dem C57BL/6J WT signifikant stärker aus. Zudem gibt es unter beiden Spezialsalzdiäten mit ATII hinsichtlich der anderen Parameter für kardiovaskuläre Endorganschädigung wie der funktionellen Gefäßreagibilität der Aorta (endothelabhängige Relaxation unter Acetylcholin), sowie dem Ausmaß der Herzfibrose keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen.

Festzuhalten ist, dass der C57BL/6J WT in Ausnahmen tendenziell stärker von den kardiovaskulären Endorganschädigungen betroffen ist, dies aber nicht grundsätzlich gilt. Die unter Hochsalzdiät mit ATII signifikant stärker ausgeprägte Mediahypertrophie könnte mit dem signifikant höheren diastolischen Blutdruck der immunkompetenten C57BL/6J WT Mauslinie unter Hochsalzdiät mit ATII erklärt werden. Ebenfalls ist es denkbar, dass der Rag-1 $-/-$ KO unter Nidrigsalzdiät mit ATII deswegen eine signifikant weniger stark ausgeprägte Herzhypertrophie hat, weil die Mäuse hier eine signifikant niedrigere Aldosteronkonzentration im Plasma unter Hochregulierung des systemischen RAAS bei Nidrigsalzdiät aufweisen und sich dies nach exogener ATII Zufuhr schützend auf die kardiale Endorganschädigung auswirkt. Dennoch spiegelt sich dies nicht konsistent in allen Parametern hinsichtlich der ATII induzierten Folgeschäden wieder. Demnach müsste der C57BL/6J WT aufgrund des signifikant höheren diastolischen Blutdrucks unter Hochsalzdiät

mit ATII bzw. aufgrund der signifikant höheren Aldosteron-Konzentration unter Nidrigsalzdiät jeweils auch eine signifikant stärker ausgeprägte Endothelschädigung in den *in vitro* Messungen im Organbad oder auch eine signifikant stärker ausgeprägte Herzfibrose unter ATII zeigen. Dies ist allerdings nicht der Fall.

5.13. Angiotensin-II Dosierung im Modell der experimentellen Hypertonie

Die in dieser Arbeit verwendete ATII Dosis von $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ist eine international weit verbreitete Dosierung, die für viele Hypertonie-Modelle verwendet wird. Es ist möglich, dass die protektive Wirkung der Immundefizienz der Rag-1 $-/-$ KO Mäuse abhängig von der ATII Dosis ist. Unter der Annahme, dass jeder (immundefiziente) Genotyp bei ausreichend hoher ATII Dosierung eine Hypertonie entwickelt, führten wir die gleichen Blutdruckuntersuchungen mit einer im Vergleich zu $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ um 30 % niedrigeren ATII Dosis ($163,3 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) in unserem Institut durch. Die Dauer der ATII Zufuhr betrug auch hier insgesamt 14 Tage. In diesen bislang unveröffentlichten Daten zeigte sich, dass beide Genotypen im Vergleich zu $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ATII zwar mit einem moderaterem, aber dennoch signifikanten Anstieg des Blutdrucks auf $163,3 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ATII reagieren. Allerdings wurde auch bei dieser geringen Dosierung kein signifikanter Unterschied in der Stärke und absoluten Höhe der Blutdruckantwort zwischen den Genotypen festgestellt. Dass die protektive Wirkung der Immundefizienz bei dem Rag-1 $-/-$ KO folglich erst bei sehr hohen ATII Dosierungen wirksam wird, ist vorstellbar. Allerdings wurde in der vorangegangenen Doktorarbeit aus unserem Institut von Philipp Oser gezeigt, dass auch bei relativ hohen ATII Dosierungen von $1,5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($=1.500 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)⁹⁵ kein Unterschied hinsichtlich des Blutdruckverhaltens zwischen den Genotypen vorhanden ist. Auch hier zeigte die immundefiziente Rag-1 $-/-$ KO Mauslinie keine Resistenz gegenüber einer ATII induzierten Hypertonie bzw. gegenüber ATII induzierten, kardiovaskulären Folgeschäden⁹⁶. Es wäre dabei zu erwarten gewesen, dass das insgesamt erreichte Blutdruckniveau unter einer höheren ATII Dosierung höher ist, als unter einer niedrigeren ATII Dosierung. Zumindest lassen bisher unveröffentlichte Versuche aus unseren Laboren diesen Schluss zu. Sie haben gezeigt, dass die Tiere beider Mauslinien unter einer sehr geringen ATII Dosierung von $160 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ mit einem generell geringeren Blutdruckanstieg auf ein insgesamt moderateres Niveau im Vergleich zu einer ATII Dosierung von $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ reagieren. Auch andere Labore zeigen, dass die Höhe des erreichten Blutdrucks abhängig von der ATII Dosierung ist (Ji et al. 2017). Bei dem Vergleich des Blutdruckniveaus unter einer hohen ATII Dosierung

⁹⁵ Dies entspricht einer 3 fach höheren ATII Dosierung im Vergleich zur verwendeten ATII Dosis in dieser Arbeit ($490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

⁹⁶ Dissertation Philipp Oser: „MPO-T-Lymphozyten-Interaktion im Rahmen der Angiotensin-II-induzierten Hypertonie“, Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, Prof. Dr. med. Heimo Ehmke, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 2016.

von $1.500 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ in der vorangegangenen Arbeit⁹⁷ und einer ATII Dosierung von $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ in dieser Arbeit zeigt sich allerdings, dass die Tiere beider Mauslinien in beiden Arbeiten trotz unterschiedlich hoher ATII Dosierung etwa eine vergleichbare Höhe des Blutdrucks (MAP) erreicht haben. So wird in der Hochsalzdiätgruppe mit ATII in dieser Arbeit bei beiden Genotypen ein maximaler Blutdruck (MAP) von durchschnittlich (Rag-1^{-/-} KO und C57BL/6J WT) 158 mmHg durch die Behandlung mit $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ATII erreicht. In der vorangegangenen Arbeit mit einer Dosierung von $1.500 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ fällt dieses Blutdruckniveau mit durchschnittlich $149,8 \text{ mmHg}$ sogar geringfügig niedriger aus⁹⁸. Für die Hochsalzdiätgruppen mit ATII könnte die Erklärung hierfür sein, dass in dieser Arbeit zwei hypertensive Stimuli (Hochsalzdiät und ATII) eingesetzt wurden und die Tiere beider Mauslinien deswegen einen gleich hohen Blutdruck unter ATII entwickeln, wie die Mäuse aus der vorangegangenen Arbeit mit einer zwar höheren ATII Dosierung aber ohne Kombination mit Hochsalzdiät. Für die Niedrigsalzdiätgruppen mit ATII kann diese Erklärung jedoch nicht gelten, da hier nur ein hypertensiver Stimulus (ATII) zum Einsatz kam. Dennoch ist der maximale Blutdruck (MAP) beider Mauslinien unter Niedrigsalzdiät mit $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ATII mit durchschnittlich (Rag-1^{-/-} KO und C57BL/6J WT) 143 mmHg in dieser Arbeit nur um $6,8 \text{ mmHg}$ niedriger, als der maximale Blutdruck (MAP) beider Genotypen in der vorangegangenen Arbeit unter Basisdiät mit $1.500 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ATII, wo er durchschnittlich (Rag-1^{-/-} KO und C57BL/6J WT) $149,8 \text{ mmHg}$ erreicht⁹⁹.

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob das hier verwendete Hypertoniemodell, in welchem eine Hypertonie allein durch ATII Infusion erreicht wird, für die Untersuchung der Rolle des Immunsystems in der Genese der (experimentellen) Hypertonie geeignet ist. So ist bekannt, dass Wildtyp-Mäuse relativ resistent gegenüber ATII induzierten Nierenschädigungen sind (Wesseling et al. 2005). Da Rag-1^{-/-} KO Mäuse genetisch einen C57BL/67 WT Hintergrund besitzen, gilt die Resistenz gegenüber ATII induzierten Nierenschädigungen auch für die KO Mauslinie. Wenn man 1. davon ausgeht, dass die protektive Wirkung der Immundefizienz hinsichtlich der Blutdruckhöhe und der kardiovaskulären Endorganschädigungen möglicherweise erst bei maligner Hypertonie relevant wird und man 2. berücksichtigt, dass die Niere eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des Bluthochdrucks einnimmt (Goldblatt et al. 1934), könnten die Experimente in nachfolgenden Arbeiten mit ATII in Kombination mit Hoch- und/oder DOCA-

⁹⁷ Unter $1,5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ erreicht der über drei Nächte/Tage unter ATII Behandlung gemittelte Blutdruck während der nächtlichen Aktivphase in der Arbeit von Philipp Oser ein Niveau von ca. 160 mmHg (MPO⁺-T⁻ Phänotyp). Unter $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ erreicht der MAP beider Genotypen während der Nacht in dieser Arbeit in der Hochsalzdiät-Gruppe ein Niveau von 160 mmHg und in der Niedrigsalzdiät-Gruppe von $130\text{-}150 \text{ mmHg}$. Tageswerte beider Arbeiten sind ebenfalls vergleichbar hoch.

⁹⁸ Vgl. Tabelle 22 „mittlerer arterieller Druck“, S. 72 in der Dissertation von Philipp Oser: „MPO-T-Lymphozyten-Interaktion im Rahmen der Angiotensin-II-induzierten Hypertonie“, Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, Prof. Dr. med. Heimo Ehmke, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 2016.

⁹⁹ Es werden die MAP-Werte während der nächtlichen Aktivität zwischen den Arbeiten verglichen. Für den Vergleich Tageswerte gilt das gleiche.

Salzdiät und in Kombination mit einem reno-vaskulären Hypertoniemodell wie dem Renin-abhängigen *2 kidney-1 clip* oder dem Renin-unabhängigen und Volumen-abhängigen *1 kidney-1 clip Modell* wiederholt werden (Wiesel et al. 1997). Auf diese Weise könnte überprüft werden, ob die protektive Wirkung einer Immundefizienz hinsichtlich des absoluten Blutdruckniveaus und bezüglich des Ausmaßes der kardiovaskulären Folgeschäden erst wirksam wird, wenn bereits eine Hypertonie(prädisposition) durch uni- oder bilaterale Nephrektomie vorliegt. In den immundefizienten Mäusen, in denen noch keine Hypertonie vorbesteht, schützt die Abwesenheit der T-Lymphozyten jedenfalls nicht vor ATII induzierter Hypertonie. Unter Verwendung von unterschiedlich hohen ATII-Dosierungen allein konnten wir in den *nicht-nephrektomierten* Mäusen in dem von Guzik beschriebenen Ausmaß bislang leider keinen Unterschied zwischen den immundefizienten Rag-1 *-/-* KO und den immunkompetenten C57BL/6J WT Mäusen beobachten. Zwar ist es in internationalen und auch in unseren Arbeiten mithilfe von *in vitro* Verfahren erwiesen, dass ATII eine stimulierende Wirkung auf T-Lymphozyten hat¹⁰⁰, dennoch wirkt sich die ATII induzierte Aktivierung und Migration der T-Lymphozyten in blutdruckrelevante Organsysteme offenbar nicht in jedem Fall derart klinisch relevant auf die Blutdruckantwort aus, wie es von Guzik gezeigt (Guzik et al. 2007) wurde. Daraus folgt, dass es weitere, bisher unbekannte Faktoren gibt, die zwischen dem Immunsystem und dessen Einfluss auf die Blutdruckregulierung medieren. Auf Letztgenanntes wird nachfolgend eingegangen.

5.14. Dauer der Angiotensin-II Zufuhr

Es gilt zudem zu diskutieren, ob die Dauer der ATII Behandlung von insgesamt 14 Tagen optimal ist. Möglicherweise wird die protektive Wirkung einer T-Lymphozytendefizienz bei dem Rag-1 *-/-* KO erst nach längerer ATII Behandlung wirksam. So wurde in einer Studie mit IL17 defizienten KO Mäusen gezeigt, dass sich erst ab dem 21. Tag nach Beginn der ATII Gabe ein Unterschied zur C57BL/6J WT Kontrolle hinsichtlich der ATII induzierten Blutdruckveränderung zeigte. Demnach führte die ATII Behandlung bei der immundefizienten IL17 *-/-* KO Mauslinie zu Beginn zwar, analog zu den Daten in dieser Arbeit, zu einem signifikanten Blutdruckanstieg, allerdings fielen der SBP, MAP und DBP ab dem siebten Tag der ATII Behandlung beim KO kontinuierlich wieder ab, sodass erst ab Tag 21 ein signifikant niedrigerer Blutdruck als beim WT vorlag (Madhur et al. 2010). Dennoch ist zu berücksichtigen, dass es sich bei der in der beschriebenen Studie von Madhur et al. verwendeten immundefizienten Mauslinie um eine andere, als den Rag-1 *-/-* KO handelt. Auf der anderen Seite ist die 14 tägige ATII Infusion zur Detektion von Blutdruckunterschieden zwischen diversen Genotypen bei verschiedenen Fragestellungen in vielen internationalen Arbeiten gebräuchlich und häufig anzutreffen (Mirabito et al. 2014, Yu et al. 2015, Young et

¹⁰⁰ Philipp Oser zeigt in seiner Arbeit „MPO-T-Lymphozyten-Interaktion im Rahmen der Angiotensin-II-induzierten Hypertonie“, dass die ATII Infusion über 14 Tage zu einer erhöhten Sekretion von IL-2 (Ausdruck vermehrter T-Zellaktivität) führt.

al. 2015 , Mian et al. 2016). Auch Guzik, dessen Versuchsprotokoll den Versuchsbedingungen (Dauer und Dosis der ATII Behandlung, verwendete Mauslinien) dieser Arbeit gleicht, konnte bereits ab dem 1. Tag nach Beginn der ATII Infusion einen deutlichen Unterschied zwischen dem Rag-1 $-/-$ KO und dem C57BL/6J WT beobachten (Guzik et al. 2007). Daher ist davon auszugehen, dass eine 14 tägige ATII Behandlung grundsätzlich ausreichend ist, um bei hinreichender Relevanz des jeweiligen Einflussfaktors auf die Hypertonusgenese (hier: Immunsystem) klinisch bedeutsame Unterschiede zwischen geno- und phänotypisch verschiedenen Organismen zu detektieren. Die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen Guzik und dieser Arbeit könnte darauf hindeuten, dass der Einfluss des Immunsystems auf die Blutdruckregulation über weitere Faktoren mediiert wird. Im Zusammenspiel mit diesen weiteren Faktoren könnte die protektive Wirkung der Immundefizienz eventuell aufgehoben werden. Einer dieser „Mediatorfaktoren“ könnte die mikrobielle Besiedlung im Darm der Versuchstiere sein. So ist eine gesunde Darmflora wichtig für ein starkes Immunsystem. Seit neuestem wird ein Zusammenhang zwischen dem intestinalen Mikrobiom und der essentiellen Hypertonie vermutet. So ergab eine Meta-Analyse, dass der regelmäßige Konsum (> 8 Wochen) von mehreren Probiotika zu einer moderaten Senkung des systolischen und diastolischen Blutdrucks führt (Khalesi et al. 2014). Salz-sensitive (S) Dahl-Ratten entwickeln im Gegensatz zu salz-resistenten (R) Dahl-Ratten durch eine 8 %ige Hochsalzdiät eine Hypertonie. Die Analyse ihres Mikrobioms zeigte, dass sich die Darmfloren der S und R Ratten derart voneinander unterscheiden, dass man den Bakterienstamm *Bacteroides* und Bakterien der Familie *Veillonellaceae* im Darm der S Ratten vermehrt vorfindet (Mell et al. 2015). In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass SH-Ratten unter chronischer ATII Infusion im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Zusammensetzung ihrer Darmflora eine geringere Mikrobenvielfalt und einen erhöhten *Firmicutes/Bacteroides* Quotienten besitzen. Eine mehrwöchige, antimikrobielle Therapie mit Minocyclin senkte den *Firmicutes/Bacteroides* Quotienten und führte zu einer Erniedrigung des MAP (Yang et al. 2015). Demzufolge ist es denkbar, dass sich die intestinale Keimzusammensetzung der Rag-1 $-/-$ KO Mäuse aufgrund der Immundefizienz von der bakteriellen Darmbesiedlung des immunkompetenten C57BL/6J WT grundsätzlich unterscheidet, was wiederum zu Unterschieden in der Blutdruckregulierung führt. Da sich die Ernährungs- und Haltungsbedingungen in unserer eigenen Tierhaltung von denen in Guziks Laboren zwangsläufig unterscheiden (z.B. Verwendung verschiedener Salzdiäten, andere Trinkwasserquelle aus den hiesigen Wasserwerken), ist nicht auszuschließen, dass die Rag-1 $-/-$ KO Mäuse in unserem Labor ein, im Vergleich zu den Versuchstieren in Guziks Arbeit, anderes, eventuell stärker „hypertensiogenes“ Mikrobiom aufweisen, welches die protektive Wirkung der Immundefizienz bezüglich einer ATII provozierten Hypertonie *unwirksam* macht. Nachfolgende Versuche mit entsprechenden Darmflora-Untersuchungen unter Basis-, Hoch- und Niedrigsalz mit und *ohne* ATII könnten diese Hypothese weiter untersuchen.

5.15. Pleiotrope, Immunsystem-*unabhängige* Angiotensin-II Effekte

Der aktuellen Theorie zur Rolle des Immunsystems in der Genese des Hypertonus zufolge, handelt es sich bei der essentiellen Hypertonie um eine chronisch entzündliche Systemerkrankung, bei der hypertensive Stimuli wie ATII und Hochsalzdiät über indirekte Mechanismen, wie die Sauerstoffradikalproduktion im ZNS (Harrison et al. 2010, Lob et al. 2010, Blaustein et al. 2012) und über direkte Mechanismen zu einer Aktivierung von T-Zellen führen (Ganta et al. 2005, Harrison et al. 2010, Harrison et al. 2011). Proinflammatorische T-Lymphozyten, die durch Neoantigene (=oxidativ veränderte, körpereigene Proteine) aktiviert werden, und ihre Zytokine (IFN γ , IL-6, IL-17, TNF α) fördern die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie bzw. führen zu einer Aggravierung einer bereits bestehenden Hypertonie (Harrison et al. 2010). Einer besonderen Bedeutung werden in diesem Pathomechanismus vor allem der ATII/Hochsalz induzierten Migration von T-Lymphozyten in blutdruckregulierende Organsysteme (Gefäße, Herz, Nieren), sowie der ATII/Hochsalz induzierten Sauerstoffradikal-Produktion durch T-Lymphozyten beigemessen (De Keulenaer et al. 1998, Guzik et al. 2007, Hoch et al. 2009, Mattson 2014, McMaster et al. 2015). Dabei sind vor allem die oxidativen Prozesse von maßgeblicher Bedeutung für die Vermittlung der schädlichen Wirkungen von ATII auf das Kreislaufsystem (Rajagopalan et al. 1996, Garrido & Griendling 2009, Landmesser et al. 2002 Yao et al. 2010, Lai et al. 2012, Montezano & Touyz 2014). Hier ist zu betonen, dass ATII-Rezeptoren nicht nur auf T-Lymphozyten, sondern ubiquitär in allen blutdruckregulierenden Organsystemen, also auch auf Endothel- und Tubuluszellen, sowie auf Kardiozyten vorkommen (Campbell 1987, van Kats et al. 1997 Garrido & Griendling 2009, te Riet et al. 2015). Demnach induziert ATII über das ATII / AT $_1$ -Rezeptor *Signaling* viele, T-Lymphozyten *unabhängige*, genomische Prozesse, deren pathophysiologische Effekte wie Proliferation, Hypertrophie, reno-kardio-vaskuläre Inflammation, *Remodeling* und vermehrte Salzretention letztendlich zu Bluthochdruck und kardiovaskulären Endorganschädigungen führen (Fukui et al. 1997, de Gasparo et al. 2000, Ma & Pei 2007, J. Rassow et al. 2008, Aplin et al. 2009, Kim et al. 2015, te Riet et al. 2015). Auch die synergistisch zu ATII hypertensiv wirksame ROS Produktion wird nicht allein durch Immunzellen geleistet, sondern letztendlich auch durch ubiquitär vorhandene, membrangebundene NAD(P)H Oxidasen auf den Zellen der reno-kardiovaskulären Organe (Hannken et al. 1998, Wolf & Wenzel 2004). Weitere Immunsystem-*unabhängige* ATII Wirkungen, die die Entwicklung eines Hypertonus fördern, sind neben den ATII / AT $_1$ -Rezeptor vermittelten, genomischen Effekten auch die ATII / AT $_1$ -Rezeptor vermittelten, endokrinen Wirkweisen. Dazu zählen zum einen die ATII induzierte Freisetzung von Noradrenalin und Adrenalin und die damit einhergehende Steigerung der Herzfrequenz und Vasokonstriktion, sowie zum anderen die ATII induzierte Freisetzung von Aldosteron mit konsekutiv vermehrter Salzretention, die eine volumenbedingte Blutdrucksteigerung zur Konsequenz hat. Die hypertensive Wirkung von Aldosteron wiederum basiert nicht

ausschließlich auf der vermehrten renalen Salzretention, sondern zusätzlich auch auf der direkten Einwirkung auf den Gefäßtonus über Mineralokortikoid-Rezeptoren (MR), die sich auf den Endothelzellen (engl. *endothelial cells*, EC), auf den glatten Muskelzellen der Gefäße (engl. *vascular smooth muscle cells*, VSMC) und auch im Herzen befinden (Funder et al. 1989, Lombès et al. 1992, Kornel 1994, Jaffe 2005). Mäuse ohne diese Mineralokortikoid-Rezeptoren auf den Endothel- und Gefäßmuskelzellen haben unter ATII Zufuhr einen milderen Blutdruckanstieg, sowie einen geringeren Gefäßtonus und zeigen auch eine geringere ROS Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (McCurley et al. 2012). Die alternativen Signalwege, die durch die Interaktion von EC-MR oder VSMC-MR mit Aldosteron aktiviert werden, fördern zudem, ebenso wie das ATII / AT₁R *Signaling*, vaskuläre Inflammation (Rocha et al. 2002), vaskuläres *Remodeling* bzw. Fibrose (Pruthi et al. 2014) und Zellproliferation, sowie VSMC-Hypertrophie. Das Aldosteron / MR *Signaling* begünstigt dementsprechend ebenfalls die Entwicklung einer arteriellen Versteifung (Rosa et al. 2012, Lin et al. 2012, Galmiche et al. 2014, te Riet et al. 2015). Aldosteron und ATII wirken dabei synergistisch auf die Aktivierung von proinflammatorischen, wachstums- und proliferationsfördernden Signalkaskaden (Montezano et al. 2008, Touyz 2008). Experimentelle Studien zeigen, dass Aldosteron die Expression von AT₁-Rezeptoren und somit die Reaktivität der Gefäße auf ATII insofern steigert (Ullian et al. 1992, Ullian et al. 1996), als die vasokonstriktorische Antwort auf ATII in menschlichen Koronararterien durch Aldosteron zunimmt (Chai et al. 2005). Bei der Frage, warum der immundefiziente Rag-1 ^{-/-} KO die gleiche Blutdruckreaktion auf exogene ATII Zufuhr wie der immunkompetente C57BL/6J WT zeigt, ist es zudem wichtig, auf die Bedeutung des lokalen, gewebsspezifischen RAAS hinzuweisen. Das gewebsspezifische RAAS kommt, *unabhängig* vom systemischen RAAS, in den blutdruckregulatorisch wichtigen, extrarenalen Organsystemen, wie dem Herz, Gehirn und Gefäßsystem vor. Die genannten Organe sind in der Lage, *unabhängig* von der Konzentration der Komponenten des systemischen RAAS, aufgrund des ubiquitär vorkommenden, membrangebundenen *Angiotensin-Converting-Enzymes* 1 aus Angiotensinogen aus der Leber und Renin aus der Niere gewebsspezifisches, lokales ATII zu produzieren (Campbell 1987, te Riet et al. 2015). Das auf diese Weise gebildete ATII bindet schnell an lokale AT₁-Rezeptoren (te Riet et al. 2015), wodurch die in der Einleitung beschriebenen G-Protein abhängigen und G-Protein *unabhängigen* Signalkaskaden ausgelöst werden, an deren Ende *Remodeling* (Fibrose), vaskuläre/kardiale Inflammation, ROS Produktion, vermehrte Salzretention und Bluthochdruck stehen. All diese blutdrucksteigernden, ATII- und Aldosteron medierten endokrinen und genomischen Mechanismen im Herz, Gefäßsystem und in den Nieren sind bei den Rag-1 ^{-/-} KO Mäusen trotz Abwesenheit der T-Lymphozyten nicht ausgeschaltet und könnten Ursache dafür sein, dass es unter ATII zu diesem signifikanten Blutdruckanstieg kommt, sodass letztendlich kein Unterschied zwischen der immundefizienten Rag-1 ^{-/-} KO

und der immunkompetenten C57BL/6J WT Mauslinie hinsichtlich der ATII induzierten Blutdruckantwort zu beobachten ist.

5.16. Weiterführende Untersuchungen

Da sich die seit vielen Jahrzehnten demonstrierte Resistenz des Rag-1 *-/-* KO gegenüber der ATII/Hochsalz induzierten Hypertonie und ihrer kardiovaskulären Folgeschäden in dieser Arbeit nicht in dem bislang publizierten Ausmaß reproduzieren ließen, sollen im Folgenden Vorschläge für weiterführende Untersuchungen unterbreitet werden. Diese Untersuchungen sollen sich auf die pleiotropen, T-Lymphozyten-*unabhängigen*, hypertensiven Effekte von ATII und Aldosteron beziehen, denn diese sind bei dem immundefizienten Rag-1 *-/-* KO intakt und könnten, je nach Befund im Vergleich zu dem immunkompetenten C57BL/6J WT, Erklärungen für die Gleichheit beider Genotypen hinsichtlich der ATII induzierten Blutdruckantwort und Endorganschädigungen liefern.

ATII / AT₁R Signaling

Mithilfe von molekulargenetischen und zytogenetischen Untersuchungsmethoden könnte in weiterführenden Arbeiten untersucht werden, ob sich die beiden Genotypen hinsichtlich der ATII (und Aldosteron-) induzierten Signalkaskaden unter den beiden Spezialsalzdiäten (Hoch- und Niedrigsalzdiät) mit und *ohne* ATII voneinander unterscheiden. So könnte z.B. eruiert werden, ob bei dem Rag-1 *-/-* KO unter Hoch- und Niedrigsalzdiät nach ATII Infusion genauso viele hypertensiogene ATII- und ROS-induzierte Genkopien von proapoptotischen Transkriptionsfaktoren (Matrix-Metalloproteinasen, TGF β , CTGF) oder proinflammatorischen Zytokinen (TNF α , IL-6, IFN γ) in den Kardiozyten, Endothel- oder Tubuluszellen vorhanden sind wie bei dem C57BL/6J WT.

Aldosteron / MR Signaling

Tatsächlich wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass der immundefiziente Rag-1 *-/-* KO unter Niedrigsalzdiät (hochreguliertes systemisches RAAS) eine signifikant geringere Plasma-Aldosteronkonzentration als der immunkompetente C57BL/6J WT aufweist. Analog dazu ist die Herzhypertrophie bei dem Rag-1 *-/-* KO unter Niedrigsalzdiät mit ATII auch signifikant geringer ausgeprägt als bei dem C57BL/6J WT. Als Ursache für die signifikant unterschiedliche Aldosteronkonzentration im Plasma könnte hier die Immundefizienz des Rag-1 *-/-* KO angenommen werden. Zudem kommt es durch die ATII Behandlung zusätzlich zur Niedrigsalzdiät bei den Rag-1 *-/-* KO Mäusen zu keiner signifikant stärker ausgeprägten Herzhypertrophie im Vergleich zum Ausmaß der Herzhypertrophie unter Basis- und Niedrigsalzdiät *ohne* ATII. Eine protektive Wirkung der Immundefizienz auf ATII induzierte Herzhypertrophie könnte demnach in der Niedrigsalzdiätgruppe angenommen werden. Allerdings ist das Ausmaß der Herzfibrose bei dem immundefizienten Rag-1 *-/-* KO unter Niedrigsalzdiät mit ATII trotzdem signifikant höher, als unter Basis- bzw. Niedrigsalzdiät *ohne*

ATII. Dies gilt ebenso für die anderen kardiovaskulären Parameter (endothelabhängige und – endothelunabhängige Vasodilatation, Mediahypertrophie der Aorta), sodass eine umfassende, allgemeingültige Resistenz der Rag-1 $-/-$ KO Mauslinie gegen ATII induzierte kardiovaskuläre Endorganschädigungen bei signifikant niedrigerer Aldosteron-Konzentration im Plasma aufgrund der Immundefizienz zweifelhaft ist. Über Mineralokortikoid Rezeptoren auf den Gefäß-, Herz- und Nierenzellen entfaltet Aldosteron, wie beschrieben, ähnliche Effekte wie ATII (Fibrose, VSMC Hypertrophie, Endotheldysfunktion, Inflammation). Demnach könnte in folgenden Arbeiten eruiert werden, ob die ATII Behandlung bei beiden Genotypen unter Niedrig- und Hochsalzdiät gleichermaßen zu einer Hochregulierung von Aldosteron-sensitiven Mineralokortikoid-Rezeptoren an den Zellen des renokardiovaskulären Systems führt. Auf diese Weise könnten Erklärungen für die gleichen Blutdruckreaktionen auf ATII zwischen den beiden Mauslinien und auch für die ATII induzierten, im Vergleich zur Basis- und Spezialsalzdiät *ohne* ATII, signifikant stärker ausgeprägten Endorganschäden trotz Immundefizienz bei dem Rag-1 $-/-$ KO gefunden werden.

Salzretention unter Hoch- und Niedrigsalzdiät mit ATII

In dieser Arbeit wurde zwar gezeigt, dass sich die beiden Genotypen hinsichtlich der Salz- und Wasserretention, sowie der Salzexkretion nicht signifikant voneinander unterscheiden, allerdings wurden diese Versuche ohne exogene ATII Zufuhr durchgeführt, da wir bereits bei den Blutdruckdaten unter ATII keine relevanten Unterschiede sahen. Dennoch könnte in weiterführenden Arbeiten untersucht werden, ob sich die beiden Genotypen hinsichtlich der Salzretention unter Hoch- und Niedrigsalzdiät mit ATII über den in der Einleitung beschriebenen Mechanismus, wonach ATII zu einer vermehrten ROS Produktion und zur Hochregulierung der Expression von proinflammatorischen Zytokinen (IL-6, TNF α , IFN γ) in den Tubuluszellen führt (McMaster et al. 2015), voneinander unterscheiden. Möglichkeiten, die Sauerstoffradikale quantitativ im Nierengewebe nachzuweisen bzw. die NADPH Oxidase Aktivität in den Tubuluszellen bei beiden Genotypen in einer entsprechenden Versuchsreihe zu messen, wären zum einen die Oxidative Fluoreszenzmikrotopographie (Miller et al. 1998) und zum anderen die Lucigenin-Chemilumineszenz (Minkenberg & Ferber 1984). Sollten sich die beiden Genotypen hinsichtlich der Salzretention unter Hoch- und Niedrigsalzdiät mit ATII tatsächlich nicht unterscheiden, könnten, entgegen dem internationalen Konsens, gleiche Sauerstoffradikal-Konzentrationen im Nierengewebe eine Begründung hierfür sein und dies die gleichen Blutdruckreaktionen auf exogen zugeführtes ATII erklären. Viele Studien belegen zwar, dass die Immundefizienz den Rag-1 $-/-$ KO vor derartigen Prozessen schützt, allerdings lässt sich dies nicht konsistent in den Blutdruckdaten und in den Ergebnissen der kardiovaskulären Endorganschäden reproduzieren. Demzufolge würde eine entsprechende Versuchsreihe die Forschung zum Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und der Hypertoniegenese um eine wichtige Information ergänzen.

Sauerstoffradikale im Herz-, Gefäß- und Nierengewebe

Durch die internationalen Arbeiten der letzten Jahrzehnte besteht zwar eine deutliche Evidenz dafür, dass die Rag-1 $-/-$ KO Mäuse aufgrund ihrer Immundefizienz weniger ATII induzierte ROS Produktion im Vergleich zu den immunkompetenten C57BL/6J WT Mäusen aufweisen (Guzik et al. 2007), dennoch spiegelt sich dies nicht in den Blutdruckdaten und in den Ergebnissen zu den kardiovaskulären Endorganschädigungen in dieser Arbeit wieder. Daher wäre es sinnvoll, zu überprüfen, ob unter den beiden Speziessalzdieten mit ATII beide Mauslinien nicht doch das gleiche Ausmaß an Sauerstoffradikal-Produktion in den renokardio-vaskulären Organsystemen zeigen. Immerhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Gefäßreagibilität nach ATII Behandlung bei beiden Genotypen unter beiden Salzdiäten gleich schlecht ist. Da die ATII induzierte ROS Produktion, wie in der Einleitung beschrieben, nicht nur durch die T-Lymphozyten, die dem Rag-1 $-/-$ KO fehlen, erfolgt, sondern auch in Gefäß- und Tubuluszellen, sowie Kardiozyten stattfindet, könnte der Verlust der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit unter kumulativer Acetylcholin-Konzentration im Organbad bei den immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO Mäusen ebenso gut auch auf eine gleich stark wie bei dem C57BL/6J WT ausgeprägte ATII induzierte, vaskuläre ROS Produktion mit konsekutiver Endotheldysfunktion zurückzuführen sein. Eine vermehrte ATII induzierte ROS Produktion führt zu einer verminderten Synthese des vasodilatatorisch wirksamen Stickstoffmonoxids (Mollnau 2002). Daher könnte ergänzend zu den quantitativen Messungen der Sauerstoffradikale in der Aorta (s. oben genannte Methoden) ebenfalls die Aktivität der NO-Synthase und/oder der löslichen Guanylatzyklase nach Gabe von ATII bei beiden Genotypen vergleichend bestimmt werden.

Migration von Immunzellen in kardiovaskuläre Endorgane

Grundsätzlich gibt es hinsichtlich der kardiovaskulären Endorganschädigung zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen dem immunkompetenten C57BL/6J WT und der immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO Mauslinie, dennoch gibt es in dieser Arbeit hiervon wenige Ausnahmen. So ist die Mediahypertrophie der Aorta unter Hochsalzdiät mit ATII und auch die Herzhypertrophie unter Niedrigsalzdiät mit ATII bei dem C57BL/6J WT jeweils signifikant stärker ausgeprägt, als bei dem Rag-1 $-/-$ KO. Hier stellt sich die Frage, warum sich die beiden Genotypen in einigen Parametern voneinander unterscheiden und, unter denselben Diätbedingungen, in anderen Parametern wiederum nicht. So ist die Mediahypertrophie unter Niedrigsalzdiät mit ATII und die Herzhypertrophie unter Hochsalzdiät mit ATII bei dem C57BL/6J WT z.B. nicht mehr signifikant stärker ausgeprägt als bei dem Rag-1 $-/-$ KO. Ebenso gibt es unter Hoch- und Niedrigsalzdiät mit ATII z.B. keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen bezüglich der Herzfibrose und der mittels Myographen im Organbad *in vitro* gemessenen Gefäßreagibilität. FACS-Analysen könnten dabei helfen, zu untersuchen, welche Immunzellen (angeborenes vs. erworbenes Immunsystem) und wie viele unter welcher Bedingung/Diät (Hoch- und Niedrigsalz mit und *ohne* ATII) in die

kardiovaskulären Endorgane migrieren. Zumindest im Hinblick auf die Milzgewichte in den Hochsalzdiätgruppen mit und *ohne* ATII hat es in dieser Arbeit den Anschein, als würde auch bei der immundefizienten Rag-1^{-/-} KO Mauslinie, die letztendlich dennoch über das angeborene Immunsystem verfügt, eine Immunreaktion stattfinden. Hier kommt es bei dem Rag-1^{-/-} KO unter Gabe von zwei hypertensiven Stimuli (Hochsalzdiät mit ATII) zu einem signifikanten Anstieg des Milzgewichts. Sollte sich bei dieser weiterführenden FACS-Untersuchung z.B. zeigen, dass unter Hochsalzdiät mit ATII tatsächlich viele T-Lymphozyten in der Media der Aorta bzw. unter Niedrigsalzdiät mit ATII tatsächlich T-Lymphozyten in den Kardiozyten des C57BL/6J WT migrieren, wohingegen bei dem Rag-1^{-/-} KO in den entsprechenden Diätgruppen keine Immunzellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, Granulozyten) in der Aorta bzw. im Herz zu finden wären, könnte dies den signifikanten Unterschied hinsichtlich der Mediahypertrophie der Aorta unter Hochsalzdiät mit ATII bzw. hinsichtlich der Herzhypertrophie unter Niedrigsalzdiät mit ATII erklären. Zumindest für die Niedrigsalzdiätgruppe könnte man dann das Ausbleiben der Migration von Makrophagen oder Granulozyten in das Herz der Rag-1^{-/-} KO Mäuse aufgrund der im Vergleich zum C57BL/6J WT signifikant niedrigeren Plasma-Aldosteron im Sinne einer durch Aldosteron / AT₁R / MR *Signaling* medierten Chemotaxis an den Kardiozyten diskutieren. Dann stellt sich allerdings die Frage, warum die kardiovaskulären Organe unter derselben Diät und Intervention einmal vor der Migration von Immunzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems mit konsekutiver Inflammation, Fibrose und Zellproliferation geschützt sind und wiederum ein anderes Mal nicht, warum es unter Hochsalzdiät mit ATII z.B. nur hinsichtlich der Mediahypertrophie einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen, aber nicht hinsichtlich der Herzfibrose oder Herzhypertrophie gibt. Eine einfache, analoge Beziehung zwischen Abwesenheit des Immunsystems einerseits und abgemilderten Blutdruckantworten bzw. kardiovaskulären Folgeschäden nach ATII Behandlung andererseits besteht jedenfalls nicht.

Untersuchungen zum gewebsspezifischen, lokalen RAAS des Herz-, Gefäß- und Nierengewebes

Eine aktuelle Studie von Kathryn Sandberg zeigt mit unseren Daten übereinstimmende Beobachtungen. Sie proklamiert, dass die von fünf voneinander *unabhängigen* Laboren, darunter auch ihrem Labor, vor 2015 veröffentlichten Ergebnisse, die eine Resistenz der immundefizienten Rag-1^{-/-} KO Mauslinie gegenüber ATII Infusion¹⁰¹ zeigten (Guzik et al. 2007, Uchida et al. 2010, Vital et al. 2010, Pollow et al. 2014, Ji et al. 2014), in Versuchen nach 2015 nun jedoch nicht mehr beobachtet werden können (Ji et al. 2017). Als Ursache für dieses Phänomen wird in der Arbeit die grundsätzlich zufällig auftretende Gen-Drift, die zu bedeutsamen, funktionellen Veränderungen des Phänotyps führen kann, aufgeführt. Die

¹⁰¹ hier in derselben Dosierung wie in dieser Arbeit.

genetische Kontamination als weitere Ursache für den Verlust der protektiven Wirkung der Immundefizienz bei dem Rag-1 $-/-$ KO wird ebenfalls in der Studie erwähnt¹⁰², jedoch als unwahrscheinlich eingestuft, da *The Jackson Laboratory* der weltweite Hauptlieferant für Inzucht-Mauslinien ist und über ein genetisches Qualitätskontrollprogramm, das auf Grundlage von Erfahrungswerten aus 85 Jahren entwickelt wurde, besitzt¹⁰³ (Ji et al. 2017).

Eine weitere Beobachtung von Sandberg ist, dass die nun nicht mehr gegen die ATII Infusion resistenten Rag-1 $-/-$ KO Mäuse neben dem Verlust der protektiven Wirkung ihrer Immundefizienz nun auch im Vergleich zu vor 2015 um ein 1,4 Faches mehr ATII Bindungen an AT₁-Rezeptoren in den Glomeruli der Nieren aufweisen. Demnach, so schlussfolgert Sandberg, könnte es zu Mutationen gekommen sein, die bestimmte Mechanismen hinsichtlich der AT₁-Rezeptoren in den Nieren beeinflussen, wodurch ATII den Blutdruck nun auch in den Rag-1 $-/-$ KO Mäusen erhöht und damit die protektiven Mechanismen der Immundefizienz verschleiert (Ji et al. 2017). Dies stützt meine These, dass die Mehrheit der in der Einleitung beschriebenen ATII induzierten Wirkungen *unabhängig* von den T-Lymphozyten und ihrer Rolle in der Hypertonusgenese sind und diese Wirkmechanismen an Herz, Gefäßen und Nieren bei dem Rag-1 $-/-$ KO nicht abgeschaltet sind, wodurch gleiche Blutdruckreaktionen, die auch der C57BL/6J WT bei ATII Gabe zeigt, durchaus plausibel sind. Auch Sandberg steht nach diesen Erkenntnissen der Verwendung der Rag-1 $-/-$ KO Mauslinie für die Erforschung der blutdruckmodulatorischen Funktion des Immunsystems mit dem ATII induzierten Hypertoniemodell kritisch gegenüber. Zum einen aufgrund der genannten Beobachtungen und zum anderen aufgrund der Tatsache, dass ein anderes Labor, welches in der gleichen Zeitperiode (2015 bis 2016) ebenfalls Versuche mit denselben Mauslinien aus *The Jackson Laboratory* durchführte, dennoch eine Resistenz des immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO gegenüber einer DOCA-Salz induzierten Hypertonie feststellen konnte (Batchu et al. 2016). Sandberg äußert daher die These, dass die T-Zell abhängige Blutdruckregulierung eher von der Salzdiät, als von der ATII Behandlung abhängt (Ji et al. 2017). Konsistent mit diesen Daten ist auch eine andere Studie, die zeigt, dass der Blutdruckanstieg bei dem immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO als Reaktion auf Hochsalzdiät im Vergleich zu dem Blutdruck des C57BL/6J WT abgemildert ist (Mattson 2014). Wir haben diese Resistenz der Rag-1 $-/-$ KO gegen Hochsalzdiät induzierte Hypertonie allerdings nicht beobachtet. Die Hochsalzdiät führte bei dem Rag-1 $-/-$ KO in dieser Arbeit zu einem signifikanten Anstieg des MAP und SBP im Vergleich zur Basisdiät. Beide Genotypen erreichten unter Hochsalzdiät dasselbe Blutdruckniveau. Analog zu dem Verlust der Resistenz gegen eine ATII induzierte Hypertonie beobachtet Sandberg bei dem Rag-1 $-/-$ KO

¹⁰² Akzidentielle Verpaarung zweier Genotypen aufgrund von Tierhaltungsfehlern.

¹⁰³ The Jackson Laboratory, ©2017, Mäuse suchen und bestellen → Warum Jax™ Mäuse, JAX- Programm zur genetischen Qualitätskontrolle (Genetic Quality Control – GQC) USA. [Online im Internet] URL: <https://www.jax.org/de/find-and-order-jax-mice/why-jax-mice/genetic-quality-control-program#> [Stand: 07.07.2017].

auch eine 1,4 Fach höhere Anzahl an Bindungen zwischen ATII und AT₁-Rezeptoren in der Niere. Sandberg geht als Ursache hierfür von Mutationen, die AT₁-Rezeptoren im Nierengewebe betreffen, aus (Ji et al. 2017). Daher ist es durchaus denkbar, dass auch weitere oder andersgeartete Mutationen in dem gewebsspezifischen, lokalen RAAS der verschiedenen Organsysteme (Herz, Gefäße, Nieren) stattgefunden haben, wodurch die protektive Wirkung der Immundefizienz beim Rag-1 ^{-/-} KO insgesamt *unwirksam* wird. Ähnlich wie bei der Transformation von Protoonkogenen zu Onkogenen kann es sich dabei um Mutationen handeln, die zu Veränderungen in den Genexpressions-regulierenden Promotorregionen geführt haben, wodurch es bei dem Rag-1 ^{-/-} KO insgesamt zu einer vermehrten Transkription der Komponenten des gewebsspezifischen RAAS gekommen ist. Dementsprechend könnte das lokale, gewebsspezifische RAAS bei beiden Genotypen genauer auf Unterschiede hin untersucht werden. Wie in der Einleitung beschrieben, ist hinlänglich bekannt, dass z.B. das lokale, intrarenale Angiotensinogen eine wichtige Rolle in der Hypertoniegenese und den kardiovaskulären Folgeschäden spielt. So wird in Studien darauf hingewiesen, dass der systemische Blutdruck um ca. 8 mmHg pro funktioneller DNA-Kopie des lokalen Angiotensinogen ansteigt (Kim et al. 1995). Polymorphismen des Angiotensinogen-Gens scheinen dabei generell im Zusammenhang mit dem Risiko für die Entstehung einer essentiellen Hypertonie und einer Verschlechterung von chronischen Nierenerkrankungen zu stehen (Gnanasambandan et al. 2015, Li et al. 2015). Man könnte daher das Ausmaß der lokalen, intrarenalen Angiotensinogen Genexpression bei dem Rag-1 ^{-/-} KO untersuchen und mit der Anzahl der entsprechenden Genkopien des C57BL/6J WT vergleichen. Ebenfalls könnte das gewebsspezifische, intrarenale Angiotensinogen Gen beider Genotypen durch DNA-Sequenzierung grundsätzlich auf Unterschiede hin untersucht werden. Das „Gen-Muster“ des lokalen Angiotensinogens könnte schließlich jeweils für beide Genotypen mit dem „Gen-Muster“ von nachweislich hypertensiven Mauslinien bzw. von nachweislich hypertonieresistenten, immundefizienten Mauslinien (IL-17 ^{-/-} KO Mäuse), zu denen bislang keine widersprüchlichen Daten vorliegen, abgeglichen werden. Da die Expression des Angiotensinogens unter anderem auch durch Glukokortikoide (Chang & Perlman 1987, Kalinyak & Perlman 1987, Hackenthal & Klett 1993) und Schilddrüsenhormone (Dzau & Herrmann 1982, Chang & Perlman 1987) hochreguliert wird, könnten die Nebennierenrindenfunktion durch Bestimmung der Cortisol-Spiegel unter Basis-, Speziessalzdiät mit und *ohne* ATII Behandlung einerseits, sowie auch die Schilddrüsenfunktion durch die Bestimmung von TSH (Thyreoidea stimulierendes Hormon) und von den Schilddrüsenhormonen fT3 und fT4 unter Basis-, Speziessalzdiät mit und *ohne* ATII andererseits bei beiden Genotypen auf Unterschiede hin untersucht werden. Auch das proinflammatorische Zytokin IL-6, ein wichtiger Stimulator der meisten Akute-Phase-Proteine der Leber (Sherman & Brasier 2001) führt ebenfalls zu einer vermehrten Expression von Angiotensinogen (Morgan et al. 1996, Atlas 2007). Die Konzentration von IL-6 im Plasma

könnte daher ergänzend bei dem immunkompetenten C57BL/6J WT und dem immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO unter Basis-, Hoch- und Niedrigsalzdiät mit und *ohne* ATII gemessen werden. Geht man davon aus, dass der Rag-1 $-/-$ KO aufgrund seiner Immu*n*kompetenz eventuell eher mit opportunistischen Erregern konfrontiert ist, könnte eine im Vergleich zum C57BL/6J WT höhere IL-6 Konzentration im Plasma mit konsekutiver Erhöhung der intrarenalen, lokalen Angiotensinogen Genexpression die im Vergleich zum C57BL/6J WT gleichstarke Blutdruckreaktion bei exogener ATII Zufuhr erklären. In der Einleitung wurde zudem die Bedeutung des lokalen, vaskulären *Angiotensin-Converting-Enzyme 1* bezüglich der Gefäßfunktion erläutert. Eine gesteigerte ACE Genexpression, sowie ACE Aktivität in den Gefäßwänden führt zu einer vermehrten Produktion von lokalem, vaskulärem ATII (Müller et al. 1997). Ein Anstieg des lokalen, vaskulären ACE Levels ist dementsprechend mit einer endothelialen Dysfunktion assoziiert. Da in dieser Arbeit die immundefiziente Rag-1 $-/-$ KO Mauslinie, anders als erwartet, eine ebenso schlechte endothelabhängige Vasodilatation unter den beiden Spezialsalzdieten mit zusätzlicher ATII Behandlung zeigt, wie auch der immunkompetente C57BL/6J WT, könnte daher ebenfalls die Transkriptionsrate von dem lokalen *Angiotensin-Converting-Enzyme 1* in der Aorta von beiden Genotypen unter Basis- Hoch- und Niedrigsalzdiät mit und *ohne* ATII mittels PCR und FISH vergleichend untersucht werden.

5.17. Die Relevanz unspezifischer Immunreize

Zytokine, die im Rahmen einer Entzündung durch Makrophagen, dendritische Zellen oder andere Immunzellen freigesetzt werden, beeinflussen die Polarisierung von naiven T_H -Vorläuferzellen (Harrison et al. 2011). Vorläuferzellen können dementsprechend, in Abhängigkeit davon, welches Antigen ihnen von welcher antigenpräsentierenden Zelle präsentiert wird, in unterschiedliche Effektorzellen bzw. Subtypen differenzieren. Bekannt sind u.a. T_H1 , T_H2 , T_H17 und Treg (engl. *regulatory*) Effektorzellen (Medzhitov 2007). Zwischen den einzelnen T_H Subtypen gibt es hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion und dementsprechend bezüglich der Abwehr einer Erregerkategorie (Helminth, Virus, intrazelluläre, extrazelluläre Bakterien) funktionelle Unterschiede. Signaturzytokine sind Zytokine, die charakteristisch für einen T_H -Subtyp sind. Sie haben die Aufgabe, eine positive Rückkopplungsschleife zu etablieren und damit die weitere Aktivierung, sowie Proliferation ihrer T_H -Effektorzelle zu fördern. Während die Differenzierung einer reifen, naiven T -Vorläuferzelle aufgrund eines bestimmten Zytokinmusters zu einem bestimmten Subtyp erfolgt, werden alternative Differenzierungswege unterdrückt (Szabo et al. 2000, Medzhitov 2007). Auf diese Weise erfolgt die Polarisierung entweder zu T_H1 oder zu T_H2 , aber niemals zu beiden Subtypen (Ivanova & Orekhov 2015). T_H1 -Zellen sind vor allem für die Abwehr von intrazellulären Erregern, Viren und Pilzen via Makrophagenaktivierung vonnöten. Zudem sind sie für die verzögerten Überempfindlichkeitsreaktionen Typ II-IV verantwortlich. T_H2 -Zellen

dienen hingegen der Abwehr von Helminthen. Hierfür rekrutieren sie eosinophile Granulozyten und Mastzellen, wobei sie gleichzeitig die IFN γ abhängige Makrophagenaktivierung, die durch T_{H1} Zellen getriggert wird, hemmen (Sher & Coffman 1992). T_{H2} werden überdies mit der Entstehung von Überempfindlichkeitsreaktionen vom Typ I bzw. IgE vermittelten Allergie- und Atopiereaktionen in Zusammenhang gebracht (Ivanova & Orekhov 2015). Sie aktivieren Antikörper-produzierende B-Lymphozyten effektiver, als T_{H1}-Zellen. Im Gegensatz zu 1. T_{H1} und 2. T_{H2}, für deren Differenzierung ihre jeweiligen Signaturzytokine notwendig sind (1. IFN γ , 2. IL-4), ist für die Differenzierung einer naiven CD4⁺ Vorläuferzelle zu T_{H17}-Lymphozyten deren Signaturzytokin, das IL-17, *nicht* wichtig. Stattdessen induzieren vor allem die Zytokine TGF β und IL-6 die T_{H17} Differenzierung (Mangan et al. 2006, Bettelli et al. 2006). Dies ist vor allem insofern interessant, als die Zytokine TGF β und IL-6 im Grunde antagonistische Immunantworten vermitteln. TGF β ist sowohl für die Entwicklung von immunsuppressiven Treg Lymphozyten, als auch für die Aktivierung von T_{H17} wichtig. Ob eine naive Vorläuferzelle folglich zu T_{H17} oder zu Treg differenziert, wird durch die An- oder Abwesenheit von IL-6, dass die Polarisierung zu Treg komplett inhibiert, entschieden (Bettelli et al. 2006). Die für T_{H17} charakteristischen Zytokine IL-17A und IL-17F induzieren die Synthese von Chemokinen und weiteren proinflammatorischen Zytokinen wie TGF α , IL-6 und IL-1 β . Ein weiteres typisches T_{H17} Zytokin ist GM-CSF (engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), wodurch u.a. neutrophile Granulozyten rekrutiert werden (Bettelli et al. 2008, Ivanova & Orekhov 2015). T_{H17}-Lymphozyten sind wichtig für die Abwehr von extrazellulären Erregern und werden ebenfalls mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen assoziiert (Bettelli et al. 2008). Regulatorische T-Lymphozyten (CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺) sind hingegen eine wichtige Komponente der immunologischen Selbst-Toleranz, da sie durch die Expression von immunsupprimierenden Zytokinen Autoimmunreaktionen verhindern (Sakaguchi et al. 1995). Vor diesem Hintergrund ist als Ursache für die Gleichheit beider Mauslinien hinsichtlich der ATII induzierten Blutdruckreaktionen und kardiovaskulären Folgeschäden zu diskutieren, ob für die Immunsystem-abhängige Hypertoniegenese der Kontakt mit bestimmten Antigenen notwendig ist. So könnten bestimmte Antigene für die Differenzierung der Immunzellen sowohl des angeborenen, als auch des erworbenen Immunsystems entweder in einen proinflammatorischen, hypertensiogenen oder in einen entzündungshemmenden, blutdrucksenkenden Phänotyp verantwortlich sein. Es wäre möglich, dass die immunkompetenten C57BL/6J WT Mäuse in Guziks Laboren mit bestimmten Antigenen Kontakt hatten, die aufgrund der Induktion eines bestimmten Zytokinmusters den proinflammatorischen, „hypertensiogenen“ Arm des Immunsystems im Rahmen der ATII induzierten Hypertonie durch eine Reihe von Immunzellstimulation und –suppression, ähnlich wie ein Code, aktiviert haben oder andersherum wäre es möglich, dass den immundefizienten Rag-1 ^{-/-} KO Mäusen in Guziks Laboren ein Immunreiz fehlte, sodass der

zelluläre (Monozyten, Granulozyten) und humorale (Komplementsystem) Arm des angeborenen Immunsystems inaktiv blieb und dadurch die protektive Wirkung der Immundefizienz im Rahmen der ATII induzierten Hypertonie wirksam werden konnte. In unseren Laboren waren die Mäuse beider Genotypen zwangsläufig trotz semi-steriler Haltungsbedingungen anderen Immunreizen ausgesetzt. Die Möglichkeit, dass Phänotypen¹⁰⁴ aufgrund von latenten Infektionen mit opportunistischen Erregern beeinflusst bzw. so verändert werden können, dass es zur Fehlinterpretation von Daten kommt, ist allgemein bekannt (*The Jackson Laboratory* ©2017, „*Maybe It's Not You, Maybe It's Your Mice!*“, Blog Post von Peter Kelmenson, [Online im Internet] URL: <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2016/august/maybe-its-not-you> [Stand: 10.07.2017]). Da wir in unseren Laboren sehr auf Reinheit geachtet haben, fehlt unseren Mäusen möglicherweise dieser unspezifische Immunreiz, der die ATII induzierte Blutdruckantwort in beiden Mauslinien derart beeinflussen würde, dass sich eine Hypertonieresistenz gegenüber der ATII durch die Abwesenheit reifer T- und B-Lymphozyten in Rag-1 -/- KO Mäusen beobachten ließe.

5.18. Die Rolle des adaptiven Immunsystems in der Genese des arteriellen Hypertonus

Bei der Frage, warum sich sowohl in dieser Arbeit, als auch in Vorarbeiten des IZIP kein Unterschied zwischen den Genotypen hinsichtlich ihres Blutdruckverhaltens und auch hinsichtlich des Ausmaßes der kardiovaskulären Endorganschädigung zeigt, ist zu berücksichtigen, dass die Rag-1 -/- KO Mäuse zwar immundefizient hinsichtlich des erworbenen Immunsystems sind, jedoch weiterhin über die zellulären (Monozyten, NK-Zellen, Granulozyten) und humoralen (Komplementsystem, Interferone) Bestandteile des angeborenen Immunsystems verfügen. Hierzu gibt es diverse Studien, die belegen, dass auch die Komponenten des angeborenen Immunsystems in die Pathogenese von arterieller Hypertonie, sowie von hypertensiv bedingten, kardiovaskulären Endorganschädigungen involviert sind. So zeigt eine longitudinale Kohortenstudie, dass ein erhöhtes Plasmalevel des Komplementfaktors C3 mit einem erhöhten Langzeit-Risiko für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie einhergeht (Engström et al. 2006). Makrophagen, ihre Produkte, die Metalloproteinasen, und die von ihnen sezernierten Zytokine sind für ihre Schlüsselrolle in der vaskulären Endorganschädigung durch die Induktion von oxidativem Stress mit konsekutiver Endotheldysfunktion, vaskulärer Inflammation, sowie Arteriosklerose und Gefäßversteifung hinlänglich bekannt (McMaster et al. 2015). Demnach sind sie maßgeblich an der Entstehung der arteriellen Hypertonie beteiligt. M-CSF (engl. *makrophage colony-stimulating factor*) ist ein Protein, welches aktivierend und chemotaktisch auf Makrophagen bzw. Monozyten wirkt und sie zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (TNF α , IFN γ) stimuliert (Wang et al. 1988, Warren & Ralph 1986). Es konnte gezeigt werden, dass

¹⁰⁴ Hier: Phänotyp = „Resistenz gegen ATII induzierte Hypertonie“ bei Genotyp = Rag-1 -/- KO.

Knock-out Mäuse¹⁰⁵, denen M-CSF und Makrophagen/Monozyten fehlen vor ATII- und DOCA-Salz induziertem Bluthochdruck, sowie vor oxidativem Stress geschützt sind (De Ciuceis et al. 2005, Ko et al. 2006). ATII erhöht die Anzahl der in die Gefäßwand der Aorta migrierenden Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Wenzel et al zeigt, dass die Entfernung von Lysozym-M positiven (Myelo)Monozyten¹⁰⁶ aus dem Blut der Mäuse zu einer Herabsetzung der ATII induzierten Migration der Makrophagen in die Aorta führt, wobei sich die Anzahl der Granulozyten nicht verändert. Die Deletion der Monozyten führte dabei auch während ATII Gabe zu einem verminderten Blutdruckanstieg und zu einer verminderten Gefäßdysfunktion. (Wenzel et al. 2011). Demnach spielen Makrophagen vom proinflammatorischen Typ eine entscheidende Rolle in der Genese der ATII induzierten Endotheldysfunktion und der essentiellen Hypertonie. Binger et al zeigt in ihren Studien, dass auch Hochsalzdiät (40 mM) in Kombination mit einem weiteren proinflammatorischen Stimulus¹⁰⁷ die Makrophagenaktivität und -migration von proinflammatorischen Makrophagen (M1) massiv verstärkt, wobei die Aktivierung des anti-inflammatorisch IL-4- und IL-13 synthetisierenden Makrophagen-Phänotyps (M2) unterdrückt wird (Binger et al. 2015). In einer anderen Studie konnte sogar gezeigt werden, dass die Hochsalzdiät (bis 51 mM) zu einem spezifischen, eigenen, Lipopolysaccharid (LPS)- und IL-4 bzw. IL-13 unabhängigen Makrophagen-Phänotyp (M(Na)) führt. Diese Hochsalz-aktivierten M(Na) Makrophagen unterscheiden sich von LPS aktivierten Makrophagen hinsichtlich des Signalkaskade- und Transkriptionsfaktor-Profiles, mit dem sie, ebenso wie die proinflammatorischen LPS Makrophagen, die Transkription proinflammatorischer Gene fördern (wenn auch in moderaterem Maße) und anti-inflammatorische Prozesse hemmen (Zhang et al. 2015). Die Salz-abhängige Aktivierung und Migration der Makrophagen ist dabei abhängig von der Salz-Dosis und am stärksten, je höher die NaCl-Konzentration ist (Müller et al. 2013). Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass die Versuchstiere beider Mauslinien unter Niedrigsalzdiät, zwar nicht generell signifikant, aber dennoch tendenziell im Vergleich zur Hochsalzdiät ein geringeres Ausmaß im ATII induzierten Blutdruckniveau und auch im Ausmaß der ATII induzierten Endorganschädigung aufweisen. Auf der anderen Seite fehlen den Rag-1 -/- KO Mäusen aufgrund der Abwesenheit reifer T- und B- Zellen regulatorische T-Zellen. Tregs haben immunsuppressive Effekte auf Zellen sowohl des angeborenen, als auch des erworbenen Immunsystems. Sie unterdrücken die Antigenpräsentation und Aktivität der Makrophagen und dendritischen Zellen und hemmen die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen. Der adoptive Transfer von anti-inflammatorisch wirksamen T regulatorischen Lymphozyten zeigt, dass Vorgänge wie ATII induzierte Hypertonie und

¹⁰⁵ *osteoporosis spontaneous mutation* Mäuse.

¹⁰⁶ Die Deletion der Lysozym-M positiven Myelo-Monozyten ((LysM (+)) erfolgt durch die niedrigdosierte Verabreichung des Diphterie-Toxins in Mäusen mit induzierbarem Diphterie-Toxin-Rezeptor ((LysM(iDTR)), (Wenzel et al. 2011).

¹⁰⁷ in Bingers Studien z.B. Lipopolysaccharide (LPS), in dieser Arbeit z.B. ATII.

Gefäßentzündungen mit konsekutiver Endotheldysfunktion, sowie ATII induziertem, oxidativem Stress abgeschwächt werden (Barhoumi et al. 2011). Eine weitere Studie zur Untersuchung der immunmodulatorischen Rolle der Tregs mit adoptivem T-Zelltransfer von 1. Treg defizienten KO Mäusen (*scurfy* Mäuse) und von 2. C57BL/6J WT Mäusen in T- und B-Zell-defiziente Rag-1 $-/-$ KO Mäuse, zeigt, dass ATII induzierte Endpunkte wie Arterienversteifung, oxidativer Stress im perivaskulären Fett, Makrophagen/Monozyten Polarisierung hin zum proinflammatorischen Phänotyp, sowie auch *Remodeling* Prozesse bei der Rag-1 $-/-$ KO Gruppe, die mit T-Zellen der Treg defizienten *scurfy* Mauslinie behandelt wurde, signifikant stärker ausgeprägt sind, als bei der mit T-Zellen vom Treg kompetenten C57BL/6J WT therapierten Rag-1 $-/-$ KO Gruppe. Der Transfer von Tregs schwächte bzw. stoppte die ATII induzierte Hypertonie in der *scurfy* T-Zell behandelten Rag-1 $-/-$ KO Gruppe. Dies belegt grundsätzlich, dass Tregs für die Begrenzung der ATII induzierten Hypertonie wichtig sind (Mian et al. 2016). Die mit T-Zellen des C57BL/6J WT und T-Zellen der Treg defizienten *scurfy* Linie behandelten Rag-1 $-/-$ KO Mäuse wurden mit einer weiteren Gruppe von Rag-1 $-/-$ KO Mäusen verglichen, die keinen T-Zelltransfer von einem der beiden anderen Genotyp erhielten; die also nicht „immunkompetent gemacht wurden“. Dabei zeigte sich, konsistent mit den Ergebnissen dieser Arbeit, dass es in der Gruppe der T-Zell defizienten Rag-1 $-/-$ KO Mäuse ohne vorangegangenen T-Zelltransfer zu einem gleich starken Anstieg des SBP kam, wie auch in der Rag-1 $-/-$ KO Gruppe, die mittels T-Zelltransfer die T-Zellen des C57BL/6J WT und die T-Zellen der *scurfy* Mäuse erhielt. Die ATII induzierte Erhöhung des diastolischen Blutdrucks fiel hingegen, ähnlich wie in dieser Arbeit auch, bei den *unbehandelten* Rag-1 $-/-$ KO Mäusen im Vergleich zu den mittels T-Zelltransfer von C57BL/6J WT- und *scurfy* Mäusen „immunkompetent gemachten“ Rag-1 $-/-$ KO Mäusen abgeschwächt aus (Mian et al. 2016). Eine weitere Beobachtung der Studie von Mian et al. ist, dass die Pulsamplitude der nicht mit T-Zelltransfer behandelten Rag-1 $-/-$ KO Mäuse höher war, als in den anderen Gruppen. Die Ergebnisse zeigen, dass die immunmodulatorische und anti-inflammatorische Wirkung der Tregs vor der Entwicklung einer ATII induzierten Hypertonie und mikrovaskulärer Schädigung schützt und dies sowohl vom erworbenen, als auch vom angeborenen Immunsystem durch die Polarisierung der Makrophagen/Monozyten zu proinflammatorischen M1 Phänotypen mediiert wird. Die Anwesenheit des ebenfalls mit Salz und ATII stimulierbaren, angeborenen Immunsystems bei den Rag-1 $-/-$ KO Mäusen einerseits, sowie die Abwesenheit der Inflammation-regulierenden Tregs bei den Rag-1 $-/-$ KO Mäusen andererseits könnten Ursache dafür sein, dass in dieser Arbeit kein Unterschied zwischen den immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO und den immunkompetenten C57BL/6J WT Mäusen reproduziert werden konnte. Grundsätzlich sollte die weitverbreitete Meinung über den schlechten Einfluss der proinflammatorischen Zytokine auf das reno-kardiovaskuläre System differenziert betrachtet werden. Garcia *et. al.* zeigt, dass IL-17 $-/-$ KO Mäuse in Reaktion auf eine chronische Aldosteroninfusion (in Kombination

mit unilateraler Nephrektomie und Hochsalzdiät) zwar einen milderen Blutdruckanstieg im Vergleich zum Wildtyp zeigen, dafür allerdings eine massivere linksventrikuläre Hypertrophie, sowie eine signifikant stärker ausgeprägte, diastolische Dysfunktion aufweisen (Garcia et al. 2012). Dementsprechend scheinen IL-17 und IFN γ unter bestimmten Rahmenbedingungen auch protektive Funktionen auszuüben. Dies ist auch mit den Daten einer Studie, deren Grundlage für eine experimentelle Hypertonie salzsensitive Dahl-Ratten sind, vergleichbar. Die Versuche dieser Studie zeigen, dass der Blutdruck und das Ausmaß der Albuminurie der Dahl-Ratten nach subkutaner IFN γ Applikation abnehmen. Zudem konnte durch die IFN γ Applikation auch die glomeruläre Filtrationsrate (Nierenfunktion) gesteigert werden. Weiterhin zeigte die Behandlung mit IFN γ eine Verbesserung der vaskulären (intimale und mediale Hyperplasie), sowie der renalen (glomeruläre Sklerose) Strukturveränderungen (Ishimitsu et al. 1992). Für die modulatorische Funktion des Immunsystems im Rahmen einer ATII induzierten Hypertonie durch Stimulation und Migration von T-Lymphozyten, sowie durch proinflammatorische Zytokine (TNF α , IL-6, IL-17) gibt es hinreichend Evidenz (Guzik et al. 2007, Sriramula et al. 2008, Marko et al. 2012, Kleinewietfeld et al. 2013, Kirabo et al. 2014). Allerdings lässt die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen internationalen Arbeiten und den Arbeiten aus unserem Labor hinsichtlich der Resistenz von Rag-1 $-/-$ KO Mäusen gegen ATII induzierte Hypertonie und kardiovaskuläre Folgeschäden schlussfolgern, dass der Einfluss der T-Lymphozyten und ihrer proinflammatorischen Zytokine nicht immer wirksam ist. Es gibt anscheinend zwischengeschaltete Faktoren, die den Einfluss des Immunsystems auf die Hypertoniegenese durch bisher *unbekannte* Mechanismen reguliert und daher nur unter bestimmten Umständen relevant wird. Denkbare Faktoren wären z.B. das Mikrobiom, die Höhe des Blutdrucks im Rahmen eines kombinierten ATII / 2 *kidney 1 clip* oder ATII / 1 *kindey 1 clip* Modells, die Rolle des angeborenen Immunsystems, sowie Wechselwirkungen zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem, durch genetische Drift verursachte Mutationen im lokalen, gewebspezifischen RAAS (s. oben), sowie auch die Keimzusammensetzung in der Umgebung der Versuchstiere unter semi-sterilen Bedingungen.

6. Zusammenfassung

T-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle in der Modulation des Blutdrucks. Durch Angiotensin II und Hochsalzdiät werden sie zur Proliferation und Migration in peripheres Gewebe, sowie zur Synthese von proinflammatorischen Zytokinen gebracht (Harrison et al. 2010). Bislang bestand deutliche Evidenz, dass der immundefiziente Rag-1 $-/-$ KO vor einer ATII induzierten Hypertonie und den kardiovaskulären Folgeschäden geschützt ist (Guzik et al. 2007). Dies konnten wir in vorangegangenen Studien unseres Instituts bislang nicht reproduzieren. Unter den Annahmen, dass 1. subkutan abgelagertes Salz durch die Gabe einer Hochsalzdiät T-Lymphozyten aktivieren kann (Kleinewietfeld et al. 2013) und dass 2. endogenes ATII bei hochreguliertem RAAS unter Nidrigsalzdiät T-Zellen über ihre AT₁-Rezeptoren stimuliert und somit 3. die protktive Wirkung der Immundefizienz der Rag-1 $-/-$ KO Mäuse abhängig von der zugeführten Salzkonzentration im Futter ist, erhielten die Mäuse in dieser Arbeit zusätzlich zu ATII (490 ng*kg⁻¹*min⁻¹) eine Hoch (3 %)- und Nidrigsalzdiät (0,02 %). Die Untersuchungen im Stoffwechsellkäfig ergaben, dass die verschiedenen Salzdiäten erfolgreich von den Mäusen aufgenommen wurden. Zwischen den Genotypen gab es hinsichtlich der Salzaufnahme und -exkretion, sowie der Kreatinin-Clearance keine Unterschiede. Die ATII induzierten Blutdruckreaktionen und die kardiovaskulären Endorganschäden waren bei dem Rag-1 $-/-$ KO ebenso signifikant und massiv ausgeprägt, wie bei dem C57BL/6J WT. Einen Schutz vor ATII induzierter Hypertonie und ihren kardiovaskulären Folgen sahen wir bei der immundefizienten Rag-1 $-/-$ KO Mauslinie, ebenso wie andere Labore (Ji et al. 2017) nicht. In dieser Arbeit steigt das Milzgewicht in den Rag-1 $-/-$ KO Mäusen bei Gabe von zwei hypertensiven Stimuli (Hochsalzdiät und ATII), als Hinweis auf stattgehabte Immunreaktionen, signifikant an. Studien zeigen hierzu, dass auch das angeborene Immunsystem, das bei den Rag-1 $-/-$ KO Mäusen nicht ausgeschaltet ist, durch Hochsalzdiät und ATII stimulierbar ist (Binger et al., 2015) und auch einen hypertensiven Einfluss hat (Zhang et al., 2015) und dass die Abwesenheit von Tregs, die den Rag-1 $-/-$ KO Mäusen fehlen, proinflammatorische Prozesse im reno-kardiovaskulären System aggravieren kann (Mian et al., 2016). Allgemein gibt es bei hinsichtlich des protektiven Effektes der Immundefizienz vor ATII induzierter Hypertonie bei Rag-1 $-/-$ KO Mäusen international widersprüchliche Daten. Die Ergebnisse dieser Arbeit und die anderer internationaler Labore deuten darauf hin, dass die Resistenz gegen ATII induzierte Hypertonie und kardiovaskuläre Folgeschäden beim Rag-1 $-/-$ KO nicht immer wirksam ist. Mediierende Faktoren wie das Mikrobiom (Yang et al. 2015), die genetische Drift mit Mutationen im gewebsspezifischen RAAS (Ji et al. 2017), das angeborene Immunsystem (De Ciuceis et al., 2005, Ko et al., 2006, Wenzel et al., 2011) und *unspezifische* Immunreize könnten sich auf den Phänotyp auswirken und die protektive Wirkung der Immundefizienz neutralisieren. Dies gilt es in Zukunft genauer zu untersuchen, um effektive Therapiemöglichkeiten für die therapieresistente Hypertonie und ihrer Endorganschädigungen entwickeln zu können.

6. Abstract

T-lymphocytes as components of the adaptive immune system play an important role in modulation of blood pressure. Angiotensine II and high salt diet induce the proliferation and migration of T-lymphocytes into peripheral tissue and stimulate the synthesis of pro-inflammatory cytokines (Harrison et al. 2010). There is great evidence that T-lymphocyte-deficient Rag-1 $-/-$ KO mice are protected from ATII induced hypertension, as well as from hypertensive, cardiovascular end-organ damage (Guzik et al. 2007). So far, we could not reproduce the protective effects of immunodeficiency in our institute. Assuming that 1. subcutaneously deposited salt can activate T-lymphocytes by the administration of high salt diet (Kleinwietfeld et al., 2013), that 2. endogenous ATII in a stimulated RAAS under low salt diet activates T-cells via their AT1 receptors and that therefore 3. the protective effects of immunodeficiency in Rag-1 $-/-$ KO mice depend on salt concentration in feed, we administered in addition to $490 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ATII a high salt diet (3 %) and a low salt diet (0,02 %) to mice. Our data of metabolic cages reveal that different salt diets were successfully absorbed by the mice. There were no differences concerning salt intake, salt excretion and creatinin-clearance between the genotypes. ATII induced blood pressure elevation and cardiovascular end-organ damage were as significant and massiv in Rag-1 $-/-$ KO as in C57BL/6J WT mice. Our results show that spleen weight of Rag-1 $-/-$ KO mice significantly increases under high salt diet and ATII treatment indicating some immunological processessing in Rag-1 $-/-$ KO mice. Therefore, studies show that the innate immune system, which is not switched off in Rag-1 $-/-$ KO mice, can also be activated by highsalt diet or ATII (Binger et al., 2015) and also has an influence on hypertension (Zhang et al., 2015) and that inflammatory processes in reno- cardiovascular system may be exacerbated by the absence of T-regulatory cells lacking in Rag-1 $-/-$ KO mice (Mian et al., 2016).

In general there are conflicting data concerning the protective effects of immunodeficiency against ATII-induced Hypertension in Rag-1 $-/-$ KO mice. The results of this study and of other international laboratories show that the resistance to ATII-induced hypertension and cardiovascular end organ damage of Rag-1 $-/-$ KO mice is not always present. Mediating factors such as the microbiome (Yang et al 2015), genetic drift with mutations in the tissue-specific RAAS (Ji et al., 2017), the innate immune system (De Ciuceis et al., 2005, Ko et al., 2006, Wenzel et al., 2011) and nonspecific immune stimuli may be able to affect the phenotype and neutralize the protective effect of immunodeficiency. These factors must be explored in detail in the future in order to find new, effective therapeutic options for therapy-resistant hypertension and its end-organ damage.

7. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------------|---|
| ACE-1 / 2 | engl.: Angiotensin Converting Enzyme-1/-2 |
| Ach | Acetylcholin, Vasodilatator |
| Ang-(1-10) / (1-8) / (1-7) | Angiotensin Dekaa-, Okta- und Heptapeptid |
| ANOVA | engl.: Analysis of Variance |
| APC | engl.: Antigen-presenting Cells |
| ARR | Aldosteron/Renin Ratio |
| AT ₁₋₄ R | Angiotensin-Rezeptoren, Subtypen 1-4 |
| ATII | Angiotensin II |
| CaMKII | engl.: Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II |
| cART | engl.: Combined Antiretroviral Therapy |
| CD | engl.: Cluster of Differentiation |
| cGMP | engl.: cyclic Guanosine-Mono-Phosphate |
| CM | Calmodulin |
| COX-1/-2 | Cyclo-Oxygenase-1/-2 |
| CTGF | engl.: Connective-Tissue-Growth Factor |
| DAG | Di-Acyl-Glycerin |
| DALY | engl.: Disability-Adjusted Life Years |
| DBP | engl.: Diastolic Blood Pressure |
| DC | engl.: Dendritic Cells |
| DOCA-Salz | engl.: Desoxy-Corticosteron-Acetat |
| EC | engl.: Endothelial Cells |
| EDRF | engl.: Endothelium-Dependent Relaxing Factor |
| ENaC | engl.: Epithelial Natrium Channel |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ESC | engl.: European Society of Cardiology |
| ESH | engl. European Society of Hypertension |
| GM-CSF | engl.: Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor |
| GPR | G Protein gekoppelter Rezeptor |
| IFN γ | Interferon γ |
| IL | Interleukin |
| IP ₃ | Inositol-(1,4,5)-Tri-Phosphat |
| KO | engl.: Knock Out |
| LDL | engl.: Low Density Lipoprotein |
| M _{3/5} R | Muscarinerner Rezeptor |
| MAP | engl.: Mean Arterial Pressure |
| MAPK | engl.: Mitogen-Activated Protein Kinasen |
| MHC I/II | engl.: Major Histocompatibility Complexes I/II |
| MLCK | engl.: Myosin Light Chain Kinase |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| MR | Mineralkortikoid-Rezeptoren |
| NaCl | Natrium-Chlorid, Kochsalz |
| NO | engl.: Nitric Oxide, Stickstoffmonoxid |
| NOS | NO-Synthase |

| | |
|-----------------------|--|
| eNOS | endotheliale NO Synthase |
| NOX | NAD(P)H Oxidase |
| NTG | Nitroglycerin |
| PAI-1 | Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 |
| PGF-2 α | Prostaglandin F-2 α |
| PGI-2 | Prostaglandin I-2, auch Prostacyclin |
| PKC | Protein-Kinase C |
| PKG | Protein-Kinase G |
| PLC | Phospho-Lipase C |
| RAAS | Renin Angiotensin Aldosteron Systems |
| RAG1/2 | engl.: Recombination-activating Gene 1/2 |
| Ras | engl.: Rat Sarcoma |
| ROS | engl.: Reactive Oxygen Species, Sauerstoffradikale |
| SBP | engl.: Systolic Blood Pressure, |
| SCID | engl.: Severe Combined Immuno-Deficiency |
| sGC | engl.: soluble Guanylate Cyclase |
| TGF α/β | engl.: Transforming Growth Factor α/β |
| T _H 1,2,17 | T-Helferzelle, Subtyp 1,2,17 |
| T _H P | engl.: T Helpercell Precursor, |
| Treg | engl.: regulatory T Cell |
| VSMC | engl.: Vascular Smooth Muscle Cells |
| WT | Wildtyp |

8. Literaturverzeichnis

- Adams, D.J. et al., 1989. Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *Faseb J.*, 3, pp.2389–2400.
- Adams, J.W. et al., 1998. Enhanced G α q signaling : A common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(August), pp.10140–10145.
- Altromin, Spezialfutter
- ALZET, Osmotische Pumpen, Modell 1002
- Anon, 2014. The Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases Collaboration. Cardiovascular disease, chronic kidney disease, and diabetes mortality burden of cardio-metabolic risk factors between 1980 and 2010: comparative risk assessment. *The Lancet, Diabetes & Endocrinology*, 2(8), pp.634–647.
- Anon, 2002. *The World Health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2002, Available at: <http://www.who.int/whr/2002/en/>.
- Aplin, Bonde, M. & Hansen, J., 2009. Molecular determinants of angiotensin II type 1 receptor functional selectivity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46(1), pp.15–24. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=18848837%5Cnpapers://6ef7d602-1904-44f2-bd27-ffa0776e3fdb/Paper/p372.
- Atlas, S.A., 2007. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 13(8 Supp B), pp.9–20. Available at: <http://www.jmcp.org/doi/10.18553/jmcp.2007.13.s8-b.9>.
- Bakris, G.L. et al., 2003. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention , Detection , Evaluation , and Treatment. *JAMA*, 289(19), pp.2560–2572.
- Baracho, N.C. do V. et al., 2015. Study of renal and hepatic toxicity in rats supplemented with creatine. *Acta cirúrgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia*, 30(5), pp.313–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26016930>.
- Barhoumi, T. et al., 2011. T Regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension*, 57(3), pp.469–476.
- Bartter, C. & Branch, H., 1979. The Effect of High-Sodium and Low-Sodium Intakes on Blood Pressure and Other Related Variables in Human Subjects with Idiopathic Hypertension. *American Journal of Medicine*, 64(2), pp.193–198.
- Batchu, S.N. et al., 2016. Role of Axl in T-Lymphocyte Survival in Salt-Dependent Hypertension. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(8), pp.1638–1646.
- Bendich, A., Belisle, E. & Strausser, H., 1981. Immune system modulation and its effect on the blood pressure of the spontaneously hypertensive male and female rat. *Biochemical and biophysical research communications*, 99(2), pp.600–607.
- Betelli, E. et al., 2008. Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature*, 453(7198), pp.1051–1057. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07036>.
- Betelli, E. et al., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T H 17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090), pp.235–238.
- Bigazzi, R. et al., 1994. Microalbuminuria in Salt-Sensitive Patients. *Hypertension*, 23(2), pp.195–200.

- Binger, K.J. & Gebhardt M, Heinig M, Rintisch C, Schroeder A, Neuhofer W, Hilgers K, Manzel A, Schwartz C, Kleinewietfeld M, Voelkl J, Schatz V, Linker RA, Lang F, Voehringer D, Wright MD, Hubner N, Dechend R, Jantsch J, Titze J, M.D., 2015. High salt reduces the activation of IL-4 and IL-13 stimulated macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 125(26), pp.1–3. Available at: <https://www.jci.org/articles/view/84690>.
- Blaustein, M.P. et al., 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), pp.H1031-1049.
- Boldyreff, B. & Wehling, M., 2003. Non-genomic actions of aldosterone: Mechanisms and consequences in kidney cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 18(9), pp.1693–1695.
- Caldwell, P. et al., 1976. Angiotensin-Converting Enzyme: Vascular Endothelial Localization. *Science (New York, N.Y.)*, 191(4231), pp.1050–1051.
- Calhoun, D. a. et al., 2002. Hyperaldosteronism among black and white subjects with resistant hypertension. *Hypertension*, 40, pp.892–896.
- Campbell, D.J. et al., 2009. Activity assays and immunoassays for plasma renin and prorenin: Information provided and precautions necessary for accurate measurement. *Clinical Chemistry*, 55(5), pp.867–877.
- Campbell, D.J., 1987. Circulating and tissue angiotensin systems. *Journal of Clinical Investigation*, 79(1), pp.1–6.
- Campbell, D.J. & Habener, J.F., 1986. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *The Journal of clinical investigation*, 78(1), pp.31–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=329527&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Campbell, J.J. et al., 1998. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*, 279(5349), pp.381–384.
- Carey, R.M. & Siragy, H.M., 2003. Newly Recognized Components of the Renin-Angiotensin System: Potential Roles in Cardiovascular and Renal Regulation. *Endocrine Reviews*, 24(3), pp.261–271. Available at: <http://dx.doi.org/10.1210/er.2003-0001>.
- Carlos, B.T.M. & Harlan, J.M., 1994. Leukocyte-Endothelial Adhesion Molecules. *Blood*, 84(7), pp.2068–2101.
- Chai, W. et al., 2005. Nongenomic effects of aldosterone in the human heart: interaction with angiotensin II. *Hypertension*, 46(4), pp.701–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16144984>.
- Chang, E. & Perlman, A.J., 1987. Multiple Hormones Regulate Angiotensinogen Messenger Ribonucleic Acid Levels in a Rat Hepatoma Cell Line. *Endocrinology*, 121(2), pp.513–519. Available at: <http://dx.doi.org/10.1210/endo-121-2-513>.
- Chapman, N. et al., 2007. Effect of spironolactone on blood pressure in subjects with resistant hypertension. *Hypertension*, 49(4), pp.839–45. Available at: <http://hyper.ahajournals.org/content/49/4/839.full>.
- Cheng, J. et al., 2009. Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure. *PLoS Pathogens*, 5(5).
- Cherry, P.D. et al., 1982. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(6), pp.2106–2110.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-. *Anal Biochem*, 162(1), pp.156–159.

- De Ciuceis, C. et al., 2005. Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: Evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(10), pp.2106–2113.
- Coffman, T.M., 2011. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nature Medicine*, 17(11), pp.1402–1409. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.2541>.
- Crowley, S.D. et al., 2010. Lymphocyte responses exacerbate angiotensin II-dependent hypertension. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 298(4), pp.R1089–R1097.
- Danaei, G. et al., 2011. National, regional, and global trends in systolic blood pressure since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 786 country-years and 5.4 million participants. *The Lancet*, 377(9765), pp.568–577. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62036-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62036-3).
- Data Science International (DSI), Implantable Telemetry Hardware, [Online im Internet] URL: <https://www.datasci.com/products/implantable-telemetry/telemetry-hardware> [Stand: 24.09.2016].
- Data Science International (USA) ©2017, Miniature Mouse Telemetry, [Online im Internet] URL: [https://www.datasci.com/products/implantable-telemetry/mouse-\(miniature\)](https://www.datasci.com/products/implantable-telemetry/mouse-(miniature)) [Stand: 09.07.2017]
- Data Science International (USA), Computerprogramm Dataquest A.R.T.™ Analysis, Version 4.0
- Data Science International (USA), Computerprogramm Dataquest A.R.T.™ Gold Acquisition, Version 4.31
- Davisson, R.L. et al., 1999. Novel mechanism of hypertension revealed by cell-specific targeting of human angiotensinogen in transgenic mice. *Physiological genomics*, 1(1), pp.3–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11015555>.
- Derfoul, A. et al., 1998. Regulation of the human Na/K-ATPase beta1 gene promoter by mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *The Journal of biological chemistry*, 273(33), pp.20702–20711.
- Desvarieux, M. et al., 2010. Periodontal bacteria and hypertension: the oral infections and vascular disease epidemiology study (INVEST). *Journal of Hypertension*, 28(7), pp.1413–1421. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00004872-201007000-00013>.
- Dickson, M.E. & Sigmund, C.D., 2006. Genetic Basis of Hypertension: Revisiting Angiotensinogen. *Hypertension*, 48(1), pp.14–20. Available at: <http://hyper.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.HYP.0000227932.13687.60>.
- Domènech, A. et al., 2011. Morphofunctional changes underlying intestinal dysmotility in diabetic RIP-1/hIFN γ transgenic mice. *International Journal of Experimental Pathology*, 92(6), pp.400–412.
- Dzau, V. & Herrmann, H., 1982. Hormonal Control of Angiotensinogen Production. *Life Sciences*, 30(7–8), pp.577–584.
- Eiam-Ong, S. et al., 1993. Stimulation of basolateral Na(+)-HCO $_3^-$ cotransporter by angiotensin II in rabbit renal cortex. *The American journal of physiology*, 265(2 Pt 2), pp.F195-203. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8396341>.
- England, T.N., 2001. Impact of High-Normal Blood Pressure on the Risk of Cardiovascular Disease. *The New England Journal of Medicine*, 345(18), pp.1291–1297.

- Engström, G. et al., 2006. Plasma levels of complement C3 is associated with development of hypertension: a longitudinal cohort study. *Journal of Human Hypertension*, 21(4), pp.276–282. Available at: <http://www.nature.com/jhh/journal/v21/n4/full/1002129a.html%255Cnhttp://www.nature.com/jhh/journal/v21/n4/pdf/1002129a.pdf>.
- Fagard, R.H., 2012. Resistant hypertension. *Heart (British Cardiac Society)*, 98(3), pp.254–261.
- Franklin, S.S. et al., 1997. Hemodynamic Patterns of Age-Related Changes in Blood Pressure: The Framingham Heart Study. *Circulation*, 96(1), pp.308–315. Available at: <http://circ.ahajournals.org/content/96/1/308.abstract>.
- Franklin, S.S. et al., 1999. Is pulse pressure useful in predicting risk for coronary heart Disease? The Framingham heart study. *Circulation*, 100(4), pp.354–360.
- Fukui, T. et al., 1997. p22phox mRNA Expression and NADPH Oxidase Activity Are Increased in Aortas From Hypertensive Rats. *Circulation Research*, 80(1), pp.45–51. Available at: <http://circres.ahajournals.org/content/80/1/45.abstract>.
- Funder, J. V et al., 1989. Vascular Type 1 Aldosterone Binding Sites Are Physiological Mineralcorticoid Receptors. *Endocrinology*, 125(4), pp.2224–2226. Available at: <http://dx.doi.org/10.1210/endo-125-4-2224>.
- Funder, J.W. et al., 2008. Case Detection, Diagnosis, and Treatment of Patients with Primary Aldosteronism: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(9), pp.3266–3281. Available at: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/jc.2008-0104>.
- Furchgott, R.F., 1983. Role of Endothelium in Responses of Vascular Smooth Muscle. *Circulation research*, 53(5), pp.557–573.
- Furchgott, R.F. & Bhadrakom, S., 1953. Reactions of Strips of Rabbit Aorta To Epinephrine, Isopropylarterenol, Sodium Nitrite and Other Drugs. *J Pharmacol Exp Ther.*, 108(2), pp.129–143. Available at: <https://access.uke.de/+CSCO+0h756767633A2F2F776372672E6E6663726777626865616E79662E626574++/content/108/2/129.long>.
- Furchgott, R.F. & Zawadzki, J. V., 1980. The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature*, 288, pp.373–376.
- Galmiche, G. et al., 2014. Smooth Muscle Cell Mineralocorticoid Receptors Are Mandatory for Aldosterone-Salt to Induce Vascular Stiffness. *Hypertension*, 63(3), pp.520–526. Available at: <http://hyper.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01967>.
- Ganta, C.K. et al., 2005. Central angiotensin II-enhanced splenic cytokine gene expression is mediated by the sympathetic nervous system. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 289(4), pp.H1683–H1691.
- Gao, J. et al., 2014. Autocrine A2 in the T-system of ventricular myocytes creates transmural gradients in ion transport: A mechanism to match contraction with load? *Biophysical Journal*, 106(11), pp.2364–2374. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.04.042>.
- Garcia, A.G. et al., 2012. Interferon- γ ablation exacerbates myocardial hypertrophy in diastolic heart failure. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 303(5), pp.H587–H596. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3468473/>.
- Garrido, A.M. & Griendling, K.K., 2009. NADPH Oxidases and Angiotensin II Receptor Signaling. *Mol Cell Endocrinol*, 302(2), pp.148–158.
- Garvin, J.L., Herrera, M. & Ortiz, P. a, 2011. Regulation of renal NaCl transport by nitric oxide, endothelin, and ATP: clinical implications. *Annual review of physiology*, 73, pp.359–376.

- Garvin, L. & Ph, D., 1991. Angiotensin stimulates bicarbonate transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat proximal straight tubules. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 1(10), pp.1146–1152.
- de Gasparo, M. et al., 2000. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews*, 52(3), pp.415–472.
- Gnanasambandan, R. et al., 2015. Angiotensinogen gene polymorphisms and progression of chronic kidney disease in ADPKD patients. *Clinical and Experimental Nephrology*, pp.1–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10157-015-1183-2>.
- Goldblatt, B.Y.H. et al., 1934. Studies on Experimental Hypertension. The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia. *Journal of Experimental Medicine*, 59(3), pp.347–349.
- Graphpad Prism Software Version 5.02, USA, Statistik und graphische Darstellung dieser Arbeit
- Graphpad Prism Statistics Guide, [Online im Internet]:
http://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm?stat_relationship_between_overall_a.htm [Stand: 11.11.2017]
- Gutcher, I. & Becher, B., 2007. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), pp.1119–1127.
- Guzik, T.J. et al., 2007. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *The Journal of experimental medicine*, 204(10), pp.2449–2460.
- Hackenthal, E. & Klett, C., 1993. Angiotensin II and dexamethasone regulate angiotensinogen mRNA by different mechanisms. *Journal of steroid Biochemistry and molecular biology*, 45(1–3), pp.33–40.
- Hannken, T. et al., 1998. Angiotensin II-mediated expression of p27(Kip1) and induction of cellular hypertrophy in renal tubular cells depend on the generation of oxygen radicals. *Kidney International*, 54(6), pp.1923–1933.
- Harrison, D.G. et al., 2011. Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension*, 57(2), pp.132–140.
- Harrison, D.G., 2014. Oxidative Stres. *Journal of the American Society of Hypertension*, 8(8), pp.601–603.
- Harrison, D.G. et al., 2010. Role of the adaptive immune system in hypertension. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(2), pp.203–207. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2010.01.006>.
- Harvey, R.D., 2012. Muscarinic Receptor Agonists and Antagonists: Effects on Cardiovascular Function. , 208, pp.451–468. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-23274-9>.
- Hein, L. et al., 1997. Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), pp.6391–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21060&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Heitzer, T. et al., 1999. Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: Evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney International*, 55(1), pp.252–260. Available at: <http://www.nature.com/ki/journal/v55/n1/abs/4490580a.html%5Cnhttp://www.nature.com/ki/journal/v55/n1/pdf/4490580a.pdf>.
- Hermann, È., Grote, L. & Hedner, J., 2000. Sleep-related breathing disorder is an independent risk factor for uncontrolled hypertension. *Journal of Hypertension*, 18(6), pp.679–685.

- Hoch, N.E. et al., 2009. Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 296(2), pp.R208–R216.
- Hsu, C.M. et al., 2015. Elevated Blood Pressure and Risk of End-stage Renal Disease in Subjects Without Baseline Kidney Disease. *Arch Intern Med.*, 165(8), pp.923–928.
- Huang, P. et al., 1995. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase.pdf. *Nature*, 377(6546), pp.239–242.
- Huang, Y. et al., 2013. Prehypertension and incidence of cardiovascular disease : a meta-analysis. *BMC Medicine*, 11(177), pp.1–9. Available at: BMC Medicine.
- Ignarro, L.J. et al., 1988. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 244(1), pp.181–189.
- Ishimitsu, T. et al., 1992. Interferon gamma attenuates hypertensive renal injury in salt-sensitive Dahl rats. *Hypertension*, 19(6 Pt 2), pp.804–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1592485>.
- Ivanova, E.A. & Orekhov, A.N., 2015. T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer : An Overview. *BioMed Research international.*, 2015(327470).
- Jaffe, I.Z., 2005. Angiotensin II and Aldosterone Regulate Gene Transcription Via Functional Mineralocorticoid Receptors in Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*, 96(6), pp.643–650. Available at: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.0000159937.05502.d1>.
- Jansen, P.M. et al., 2014. Test characteristics of the aldosterone-to-renin ratio as a screening test for primary aldosteronism. *Journal of hypertension*, 32(1), pp.115–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24018605>.
- Jansen, P.M., Boomsma, F. & Meiracker, A.H. Van Den, 2008. Aldosterone-to-renin ratio as a screening test for primary aldosteronism – The Dutch ARRAT Study. *The Netherlands Journal of Medicine*, 66(5), pp.220–228.
- Ji, H. et al., 2017. Loss of Resistance to Angiotensin II–Induced Hypertension in the Jackson Laboratory Recombination-Activating Gene Null Mouse on the C57BL/6J Background. *Hypertension*, 69(6), p.1121. Available at: <http://hyper.ahajournals.org/content/69/6/1121.abstract>.
- Ji, H. et al., 2014. Sex-specific T-cell regulation of angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension*, 64(3), pp.573–582.
- Kalinyak, J.E. & Perlman, a J., 1987. Tissue-specific regulation of angiotensinogen mRNA accumulation by dexamethasone. *The Journal of biological chemistry*, 262(1), pp.460–464. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3793733>.
- Kalliokoski, O. et al., 2013. Mice Do Not Habituate to Metabolism Cage Housing-A Three Week Study of Male BALB/c Mice. *PLoS ONE*, 8(3), pp.1–11.
- Kannel, W., Dawber, T. & McGee, D., 1980. Perspectives on systolic hypertension. The Framingham study. *Circulation*, 61(6), pp.1179–1182.
- van Kats, J.P. et al., 1997. Angiotensin II Type 1 (AT1) Receptor–Mediated Accumulation of Angiotensin II in Tissues and Its Intracellular Half-life In Vivo. *Hypertension*, 30(1), pp.42–49. Available at: <http://hyper.ahajournals.org/content/30/1/42.abstract>.
- Kearney, P.M. et al., 2005. Global Burden of Hypertension--Analysis of Worldwide Data. *The Lancet*, 365(9455), pp.217–223. Available at: ??????
- Kearney, P.M. et al., 2004. Worldwide Prevalence of Hypertension : A Systematic Review. *Journal of Hypertension*, 22(1), pp.11–19.

- Kennel, W., 2009. Hypertension: reflections on risks and prognostication. *The Medical clinics of North America*, 93(3), pp.541–558.
- Kent, W.J. et al., 2005. Exploring relationships and mining data with the UCSC Gene Sorter. *Genome Research*, 15(5), pp.737–741.
- De Keulenaer, G. et al., 1998. Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *The Biochemical journal.*, 329(Pt3), pp.653–657.
- Kfutwah, A.K.W. et al., 2017. Cytomegalovirus infection in HIV-infected versus non-infected infants and HIV disease progression in Cytomegalovirus infected versus non infected infants early treated with cART in the ANRS 12140—Pediacam study in Cameroon. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), p.224. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28335737><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5364639><http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2308-x>.
- Khalesi, S. et al., 2014. Effect of probiotics on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension*, 64(4), pp.897–903.
- Kim, H.S. et al., 1995. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), pp.2735–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42293&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kim, J. et al., 2015. Angiotensin II Type 1 Receptor-Mediated Electrical Remodeling in Mouse Cardiac Myocytes. *Plos One*, 10(10), p.e0138711. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0138711>.
- Kirabo, A. et al., 2014. DC isoketal-modified proteins activate T cells and promote hypertension. *Journal of Clinical Investigation*, 124(10), pp.4642–4656.
- Kleinewietfeld, M. et al., 2013. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*, 496(7446), pp.518–522. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11868>.
- Ko, E.A. et al., 2006. Resistance artery remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is dependent on vascular inflammation, evidence from m-CSF-deficient mice. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 292(4), pp.H1789–H1795. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17142347>.
- Kornel, L., 1994. Colocalization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and mineralocorticoid receptors in cultured vascular smooth muscle cells. *American journal of hypertension*, 7(1), pp.100–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8136102>.
- Kuoppala, A. et al., 2000. Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 278(4), pp.H1069–H1074. Available at: <http://ajpheart.physiology.org/content/278/4/H1069.abstract>.
- Lacolley, P., 2002. Increased Carotid Wall Elastic Modulus and Fibronectin in Aldosterone-Salt-Treated Rats: Effects of Eplerenone. *Circulation*, 106(22), pp.2848–2853. Available at: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.0000039328.33137.6C>.
- Lacolley, P. et al., 2001. Prevention of aortic and cardiac fibrosis by spironolactone in old normotensive rats. *Journal of the American College of Cardiology*, 37(2), pp.662–667.
- Lai, E. et al., 2012. P47phox is Required for Afferent Arteriolar Contractile Responses to Angiotensin II and Perfusion Pressure in Mice. *Hypertension*, 59(2), pp.415–420.
- Landmesser, U. et al., 2002. Role of p47phox in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension*, 40(4), pp.511–515.

- LASvendi, Rod16 R Alleinfutter für Zucht und Haltung von Maus & Ratte gammabestrahlt für Barrierehaltungen und Isolatoren
- Laurent, S. et al., 2001. Aortic stiffness is an independent predictor of all cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension*, 37, pp.1236–1241. Available at: <http://dx.doi.org/10.1161/01.HYP.37.5.1236>.
- Lawes, C.M.M. et al., 2008. Global Burden of Blood-Pressure-Related Disease , 2001. *The Lancet*, 371(9623), pp.1513–1518.
- Lee, D.L. et al., 2006. Angiotensin II hypertension is attenuated in interleukin-6 knockout mice. *American Journal of Physiology*, 290(3), pp.H935–H940.
- Lewington, S. et al., 2002. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: A meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *The Lancet*, 360(9349), pp.1903–1913.
- Li, K. et al., 2010. Interleukin-6 stimulates epithelial sodium channels in mouse cortical collecting duct cells. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 299(2), pp.R590–R595.
- Li, Q. et al., 2015. Risk given by AGT polymorphisms in inducing susceptibility to essential hypertension among isolated populations from a remote region of China: A case-control study among the isolated populations. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. Available at: <http://jra.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1470320315606315>.
- Lin, Y.H. et al., 2012. Adrenalectomy improves increased carotid intima-media thickness and arterial stiffness in patients with aldosterone producing adenoma. *Atherosclerosis*, 221(1), pp.154–159. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.003>.
- Linder, L. et al., 1990. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. *Circulation*, 81(6), pp.1762–1767.
- Liu, J. et al., 2003. NAD(P)H oxidase mediates angiotensin II-induced vascular macrophage infiltration and medial hypertrophy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(5), pp.776–782.
- Liu, L.H. et al., 1997. Defective endothelium-dependent relaxation of vascular smooth muscle and endothelial cell Ca²⁺ signaling in mice lacking sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 3. *J.Biol.Chem.*, 272(48), pp.30538–30545.
- Lob, H.E. et al., 2010. Induction of Hypertension and Peripheral Inflammation by Reduction of Extracellular Superoxide Dismutase in the Central Nervous System. *Hypertension*, 55(2), pp.277–283.
- Lombès, M. et al., 1992. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circulation research*, 71, pp.503–510.
- Lübkemeier, I. et al., 2011. The connexin 40 A96S mutation causes renin-dependent hypertension. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 22(6), pp.1031–1040.
- Ma, L. & Pei, G., 2007. Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *Journal of Cell Sciences*, 120(Pt 2), pp.213–218.
- Maciel, F.R. et al., 2016. Immunomodulation and nitric oxide restoration by a probiotic and its activity in gut and peritoneal macrophages in diabetic rats. *Clinical Nutrition*, 35(5), pp.1066–1072. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2015.07.018>.
- Madhur, M.S. et al., 2010. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension*, 55(2), pp.500–507.

- Mancia, G. et al., 2013. ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 34(28), pp.2159–2219.
- Mangan, P.R. et al., 2006. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nature*, 441(7090), pp.231–234.
- Manuscript, A., 2011. Genetic Variants in Novel Pathways Influence Blood Pressure and Cardiovascular Disease Risk. *Nature*, 478(7367), pp.103–109.
- Marko, L. et al., 2012. Interferon- γ Signaling Inhibition Ameliorates Angiotensin II-Induced Cardiac Damage. *Hypertension*, 60(6), pp.1430–1436. Available at: <http://hyper.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.199265>.
- Matsukawa, S. & Reid, I.A., 1990. Role of the area postrema in the modulation of the baroreflex control of heart rate by angiotensin II. *Circulation research*, 67(6), pp.1462–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2245506>.
- Mattson, D.L., 2014. Infiltrating immune cells in the kidney in salt-sensitive hypertension and renal injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 307(5), pp.F499-508.
- McCurley, A. et al., 2012. Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Nature Medicine*, 18(9), pp.1429–1433. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2891>.
- McMaster, W.G. et al., 2015. Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. *Circulation Research*, 116(6), pp.1022–1033.
- Medzhitov, R., 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), pp.819–826.
- Mell, B. et al., 2015. Evidence for a link between gut microbiota and hypertension in the Dahl rat. *Physiological Genomics*, 47(6), pp.187–197. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25829393><http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physiolgenomics.00136.2014>.
- Mian, M.O.R. et al., 2016. Deficiency of T-regulatory cells exaggerates angiotensin II-induced microvascular injury by enhancing immune responses. *Journal of Hypertension*, 34(1), pp.97–108. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26630215><http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00004872-201601000-00015>.
- Mick, V.E. et al., 2001. The α -subunit of the epithelial sodium channel is an aldosterone-induced transcript in mammalian collecting ducts, and this transcriptional response is mediated via distinct cis-elements in the 5'-flanking region of the gene. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 15(4), pp.575–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11266509>.
- Miller, F.J. et al., 1998. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circulation research*, 82(12), pp.1298–1305.
- Mills, P.A. et al., 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), pp.1537–1544.
- Minkenberg, I. & Ferber, E., 1984. Lucigenin-dependent chemiluminescence as a new assay for NAD(P)H-oxidase activity in particulate fractions of human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of immunological methods*, 71(1), pp.61–67.
- Mirabito, K.M. et al., 2014. Pressor responsiveness to angiotensin II in female mice is enhanced with age: role of the angiotensin type 2 receptor. *Biology of Sex Differences*, 5(1), p.13. Available at: <http://www.bsd-journal.com/content/5/1/13>.

- Mollnau, H., 2002. Effects of Angiotensin II Infusion on the Expression and Function of NAD(P)H Oxidase and Components of Nitric Oxide/cGMP Signaling. *Circulation Research*, 90(4), p.58e–65. Available at: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.0000012569.55432.02>.
- Mombaerts, P. et al., 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, 68(5), pp.869–877.
- Montezano, A.C. & Touyz, R.M., 2014. Reactive Oxygen Species, Vascular Nox, and Hypertension: Focus on Translational and Clinical Research. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(1), pp.164–182. Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2013.5302>.
- Montezano, a. C. et al., 2008. Aldosterone and angiotensin II synergistically stimulate migration in vascular smooth muscle cells through c-Src-regulated Redox-sensitive RhoA pathways. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(8), pp.1511–1518.
- Morgan, L., Broughton Pipkin, F. & Kalsheker, N., 1996. Angiotensinogen: Molecular biology, biochemistry and physiology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28(11), pp.1211–1222. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272596000866>.
- Morishita, R. et al., 1994. Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy: In vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. *Journal of Clinical Investigation*, 94(3), pp.978–984.
- Mosso, L. et al., 2003. Primary aldosteronism and hypertensive disease. *Hypertension*, 42, pp.161–165.
- Mozaffarian, D. et al., 2015. AHA Statistical Update Heart Disease and Stroke Statistics — 2015 Update A Report From the American Heart Association WRITING GROUP MEMBERS. *Circulation*, 131(4), pp.e29-322.
- Müller, D.N. et al., 1997. Vascular Angiotensin-Converting Enzyme Expression Regulates Local Angiotensin II. *Hypertension*, 29(1), pp.98–104. Available at: <http://hyper.ahajournals.org/content/29/1/98.abstract>.
- Müller, S. et al., 2013. Salt-Dependent Chemotaxis of Macrophages. *PLoS ONE*, 8(9), pp.2–10.
- Murray, C.J.L. et al., 2012. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions , 1990 – 2010 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380(9859), pp.2197–2223.
- Nguyen, H. et al., 2013. Interleukin-17 causes Rho-kinase-mediated endothelial dysfunction and hypertension. *Cardiovascular research*, 97(4), pp.696–704. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3583258&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nguyen Dinh Cat, A. et al., 2010. The endothelial mineralocorticoid receptor regulates vasoconstrictor tone and blood pressure. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24, pp.2454–2463.
- Nikolaeva, S. et al., 2012. The Circadian Clock Modulates Renal Sodium Handling. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(6), pp.1019–1026.
- Nishiyama, A., 2007. The Intrarenal Renin-Angiotensin System : From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and. *Pharmacological reviews*, 59(3), pp.251–287.
- Nowbar, A.N. et al., 2014. 2014 Global geographic analysis of mortality from ischaemic heart disease by country , age and income : Statistics from World Health Organisation and United Nations. *International Journal of Cardiology*, 174(2), pp.293–298. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.04.096>.
- Okuda, T. & Grollman, A., 1967. Passive transfer of autoimmune induced hypertension in the rat by lymph node cells. *Texas Reports on Biology and Medicine*, 25(2), pp.257–264.

- Olsen, F., 1972. Inflammatory cellular reaction in hypertensive vascular disease in man. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, Section A Pathology*, 80(2), pp.253–256.
- Olsen, F., 1980. Transfer of arterial hypertension by splenic cells from DOCA-salt hypertensive and renal hypertensive rats to normotensive recipients. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, Section A Pathology*, 88(1), pp.1–5.
- Olson, T.S. & Ley, K., 2002. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 283(1), pp.R7–R28.
- Oser, Philipp, 2016. MPO-T-Lymphozyten-Interaktion im Rahmen der Angiotensin-II-induzierten Hypertonie, Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, Prof. Dr. med. Heimo Ehmke, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.
- Ouzan, J. et al., 2002. The role of spironolactone in the treatment of patients with refractory hypertension. *American journal of hypertension*, 15(4 Pt 1), pp.333–9.
- Palmer, R.M. & Moncada, S., 1989. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 158(1), pp.348–352.
- Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. & Moncada, S.*, 1987. Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Nature*, 327, pp.524–526.
- Panza, Julio A, M. et al., 1995. Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation in Patients With Essential Hypertension: Evidence That Nitric Oxide Abnormality Is Not Localized to a Single Signal Transduction Pathway. *Circulation*, 91(6), pp.1732–1738. Available at: <http://circ.ahajournals.org/content/91/6/1732.abstract>.
- Panza, Julio A, M.D. et al., 1990. Abnormal Endothelium-Dependent Vascular Relaxation in Patients with Essential Hypertension. *The New England Journal of Medicine*, 323(1), pp.22–27.
- Paradis, P. et al., 2000. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), pp.931–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15433&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Paul, M., Wagner, J. & Dzau, V.J., 1993. Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. *The Journal of clinical investigation; The Journal of clinical investigation*, 91(5), pp.2058–2064.
- Pereira, M. et al., 2009. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. *Journal of Hypertension*, 27(5), pp.963–75.
- Pfeifer, A. et al., 1998. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO Journal*, 17(11), pp.3045–3051.
- Pitt, B et al., 2003. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 348(14), pp.1309–1321.
- Pollow, D.P. et al., 2014. Sex differences in T-lymphocyte tissue infiltration and development of Angiotensin II Hypertension. *Hypertension*, 64(2), pp.384–390.
- Potter EK, R.I., 1985. Intravertebral angiotensin II inhibits cardiac vagal efferent activity in dogs. *Neuroendocrinology*, 40, pp.493–496.
- Pruthi, D. et al., 2014. Aldosterone promotes vascular remodeling by direct effects on smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(2), pp.355–364.

- Quaschnig, T. et al., 2007. Lack of Endothelial Nitric Oxide Synthase Promotes Endothelin-Induced Hypertension: Lessons from Endothelin-1 Transgenic/Endothelial Nitric Oxide Synthase Knockout Mice. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(3), pp.730–740. Available at: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2006050541>.
- Rajagopalan, S. et al., 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), pp.1916–1923.
- Ramseyer, V.D., Hong, N.J. & Garvin, J.L., 2012. Tumor necrosis factor α decreases nitric oxide synthase type 3 expression primarily via rho/rho kinase in the thick ascending limb. *Hypertension*, 59(48202), pp.1145–1150.
- Rassow, J. et al., 2008. Biochemie. *Duale Reihe Biochemie*, 2. Auflage, pp.492–493.
- te Riet, L. et al., 2015. Hypertension: Renin-Angiotensin-Aldosterone System Alterations. *Circulation Research*, 116(6), pp.960–975. Available at: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCRESAHA.116.303587>.
- Rivard, K. et al., 2008. Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization. *Cardiovascular research*, 78(1), pp.53–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18245065>.
- Rocha, R. et al., 2002. Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. *Endocrinology*, 143(12), pp.4828–4836. Available at: <http://endo.endojournals.org/cgi/doi/10.1210/en.2002-220120>.
- Roger, I.R., Jelliffe, A. & Western, R., 1962. Dilator and Constrictor Effects of Acetylcholine On Isolated Rabbit Aortic Chains. *J Pharmacol Exp Ther.*, 135, pp.349–353.
- Rosa, J. et al., 2012. Peripheral arterial stiffness in primary aldosteronism. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 61(5), pp.461–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22881232>.
- Rosenthal, J. & Kolloch, R., 2004. Arterielle Hypertonie. *Springer-Verlag*, 4. Auflage, pp.219–220.
- Russell, a & Watts, S., 2000. Vascular reactivity of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 294(2), pp.598–604. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10900237>.
- Sachetelli, S. et al., 2006. RAS blockade decreases blood pressure and proteinuria in transgenic mice overexpressing rat angiotensinogen gene in the kidney. *Kidney International*, 69(6), pp.1016–1023. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.ki.5000210>.
- Sadoshima, J. & Izumo, S., 1993. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circulation research*, 73(3), pp.413–423.
- Safar, M.E., 2000. Pulse pressure, arterial stiffness, and cardiovascular risk. *Current opinion in cardiology*, 15, pp.258–263.
- Sakaguchi, S. et al., 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology*, 155(3), pp.1151–1164.
- Saleh, M. a et al., 2015. Lymphocyte adaptor protein LNK deficiency exacerbates hypertension and end-organ inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 125(3), pp.1189–1202.
- Sampaio, T.L. et al., 2016. Nephroprotective effects of (???)-??-bisabolol against ischemic-reperfusion acute kidney injury. *Phytomedicine*, 23(14), pp.1843–1852. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2016.11.008>.

- Satou, R. et al., 2012. Interferon- γ biphasically regulates angiotensinogen expression via a JAK-STAT pathway and suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) in renal proximal tubular cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(5), pp.1821–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22302831>.
- Savoia, C. et al., 2008. Selective mineralocorticoid receptor blocker eplerenone reduces resistance artery stiffness in hypertensive patients. *Hypertension*, 51(12), pp.432–439.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A. & Schlissel, M.S., 1992. V(D)J Recombination: Molecular Biology and Regulation. *Annual Review of Immunology*, 10, pp.359–383.
- Schelling, J.R. et al., 1992. Cytoskeleton-dependent endocytosis is required for apical type 1 angiotensin II receptor-mediated phospholipase C activation in cultured rat proximal tubule cells. *J Clin Invest*, 90(6), pp.2472–2480. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1334976.
- Schmidt, B.M.W. et al., 1999. Short Term Cardiovascular Effects of Aldosterone in Healthy Male Volunteers. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(10), pp.3528–3533. Available at: <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.84.10.6020>.
- Schuh, K. et al., 2003. Regulation of Vascular Tone in Animals Overexpressing the Sarcolemmal Calcium Pump. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), pp.41246–41252.
- Seaberg, E.C. et al., 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), pp.953–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905677>.
- Sharabi, Y. et al., 2006. Efficacy of Add-On Aldosterone Receptor Blocker in Uncontrolled Hypertension. *American Journal of Hypertension*, 19(7), pp.750–755. Available at: <http://ajh.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/j.amjhyper.2005.11.016>.
- Sher, A. & Coffman, R.L., 1992. Regulation of Immunity To Parasites By T Cells and T Cell-Derived Cytokines. *Annual Review of Immunology*, 10, pp.385–409.
- Sherman, C.T. & Brasier, A.R., 2001. Role of Signal Transducers and Activators of Transcription 1 and -3 in Inducible Regulation of the Human Angiotensinogen Gene by Interleukin-6. *Molecular Endocrinology*, 15(3), pp.441–457. Available at: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/mend.15.3.0609>.
- Soubrier, F. et al., 1993. Molecular Biology of the Angiotensin I Converting Enzyme: II. Structure-function. Gene Polymorphism and Clinical Implications. *Journal of Hypertension*, 11(6), pp.599–604.
- Sriramula, S. et al., 2008. Involvement of tumor necrosis factor- α in angiotensin II-mediated effects on salt appetite, hypertension, and cardiac hypertrophy. *Hypertension*, 51(5), pp.1345–1351.
- Stec, D.E. et al., 1999. Efficient liver-specific deletion of a floxed human angiotensinogen transgene by adenoviral delivery of Cre recombinase in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 274(30), pp.21285–21290.
- Stechman, M.J. et al., 2010. Establishing normal plasma and 24-hour urinary biochemistry ranges in C3H, BALB/c and C57BL/6J mice following acclimatization in metabolic cages. *Laboratory Animals*, 44(3), pp.218–225.
- Stockand, J.D. et al., 1999. Regulation of Na⁺ reabsorption by the aldosterone-induced small G protein K-Ras2A. *J. Biol. Chem*, 274(50), p.35449±35455.
- Štrauch, B. et al., 2003. Prevalence of primary hyperaldosteronism in moderate to severe hypertension in the Central Europe region. *J Hum Hypertens* 17: 349-352.

- Sun, H.-X. et al., 2012. Essential Role of MicroRNA-155 in Regulating Endothelium-Dependent Vasorelaxation by Targeting Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Hypertension*, 60(6), pp.1407–1414. Available at: <http://hyper.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.197301>.
- Swanson, M.A., Lee, W.T. & Sanders, V., 2001. IFN- γ Production by Th1 Cells Generated from Naive CD4 + T Cells Exposed to Norepinephrine. *Journal of Immunology*, 166(1), pp.232–240.
- Szabo, S.J. et al., 2000. A Novel Transcription Factor , T-bet , Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell*, 100(1), pp.655–669.
- Tang, M. et al., 2003. Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nature Medicine*, 9(12), pp.1506–1512.
- Tecniplast®, metabolische Käfige, Deutschland
- Tecniplast®, Stoffwechsellkäfige für einzelne Mäuse [Online im Internet] URL: <http://www.tecniplast.it/de/product/metabolic-cage-for-single-mouse.html> [Stand: 18.09.2016].
- The Jackson Laboratory, C57BL/6J WT Mäuse, Mouse Strain Datasheet – 000664, [Online im Internet] URL: <https://www.jax.org/strain/000664> [Stand: 09.07.2017]
- The Jackson Laboratory ©2017, Rag-1 -/- KO Mäuse, Mouse Strain Datasheet – 002216, [Online im Internet] URL: <https://www.jax.org/strain/002216> [Stand: 09.07.2017]
- The Jackson Laboratory ©2017, „Maybe It’s Not You, Maybe It’s Your Mice!, Blog Post von Peter Kelmenson, [Online im Internet] URL: <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2016/august/maybe-its-not-you> [Stand: 10.07.2017]
- The Jackson Laboratory, ©2017, Mäuse suchen und bestellen, Warum Jax™ Mäuse, JAX-Programm zur genetischen Qualitätskontrolle (Genetic Quality Control – GQC) USA. [Online im Internet] URL: <https://www.jax.org/de/find-and-order-jax-mice/why-jax-mice/genetic-quality-control-program#> [Stand: 07.07.2017].
- Thellin, O. et al., 1999. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75(2–3), pp.291–295.
- Thiele, Jonas Leonhard 2015. Experimentelle Untersuchungen zur Hämodynamik & kardiovaskulären Schäden einer Angiotensin-II induzierten arteriellen Hypertonie in Rag-1-/- Mäusen, Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, Prof. Dr. med. Heimo Ehmke, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.
- Thomas, C.P. & Itani, O. a, 2004. New insights into epithelial sodium channel function in the kidney: site of action, regulation by ubiquitin ligases, serum- and glucocorticoid-inducible kinase and proteolysis. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 13(5), pp.541–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15300161>.
- Tocci, G., Sciarretta, S. & Volpe, M., 2008. Development of heart failure in recent hypertension trials. *Journal of hypertension*, 26(7), pp.1477–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18551026>.
- Touyz, R.M., 2008. Aldosterone and Angiotensin II Synergistically Stimulate Migration in Vascular Smooth Muscle Cells Through. *Heart*, (Ang II).
- Touyz, R.M., 2012. New insights into mechanisms of hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 21(2), pp.119–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257800>.
- Tuli, J., Smith, J. & Morton, D., 1995. Stress measurements in mice after transportation. *Laboratory Animals*, 29(2), pp.132–138.
- Uchida, H.A. et al., 2010. Total Lymphocyte Deficiency Attenuates AngII-induced Atherosclerosis in Males But Not Abdominal Aortic Aneurysms in ApoE Deficient Mice. *Atherosclerosis*, 211(2), pp.399–403.

- Ullian, M.E., Schelling, J.R. & Linas, S.L., 1992. Aldosterone enhances angiotensin II receptor binding and inositol phosphate responses. *Hypertension*, 20(1), pp.67–73.
- Ullian, M.E., Walsh, L.G. & Morinelli, T. a, 1996. Potentiation of angiotensin II action by corticosteroids in vascular tissue. *Cardiovascular research*, 32(2), pp.266–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8796113>.
- Vandeputte, C. & Docherty, J.R., 2002. Modulation of contraction by alpha(2A/D)-adrenoceptors in mouse aorta: evidence employing knockout technology. *Br.J.Pharmacol.*, 135(5), pp.1209–1212.
- Vital, S.A. et al., 2010. Mechanisms underlying the cerebral microvascular responses to angiotensin II-induced hypertension. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 17(8), pp.641–649. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3058857/>.
- Wade, B., Abais-battad, J.M. & Mattson, D.L., 2016. Role of immune cells in salt-sensitive hypertension and renal injury. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 25(1), pp.22–27.
- Wang, J.M. et al., 1988. Induction of monocyte migration by recombinant macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of Immunology*, 141, pp.575–579.
- Ward, B.P.E. et al., 1975. Isolation of Membrane-Bound Renal Kallikrein and Kininase. , 151(3), pp.755–758.
- Warren, M.K. & Ralph, P., 1986. Macrophage growth factor CSF-1 stimulates human monocyte production of interferon, tumor necrosis factor, and colony stimulating activity. *Journal of immunology*, 137(7), pp.2281–5. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/137/7/2281.short%255Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2428865>.
- Weber, D.S. et al., 2004. Angiotensin II-induced hypertrophy is potentiated in mice overexpressing p22phox in vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 288(1), pp.H37–H42. Available at: <http://ajpheart.physiology.org/content/288/1/H37.abstract>.
- Wei, H. et al., 2003. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19), pp.10782–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=196880&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wenzel, P. et al., 2011. Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin ii-induced arterial hypertension and vascular dysfunction. *Circulation*, 124(12), pp.1370–1381.
- Wesseling, S. et al., 2005. Resistance to oxidative stress by chronic infusion of angiotensin II in mouse kidney is not mediated by the AT 2 receptor. *American journal of physiology. Renal physiology.*, 288(6), pp.1191–1200.
- Whelton, P.K., Carey, R.M., Chair, V., et al., 2017. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults. *Journal of the American College of Cardiology*, (17), pp.735–1097. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.006>.
- Whelton, P.K., Carey, R.M., Aronow, W.S., et al., 2017. 2017 ACC / AHA / AAPA / ABC / ACPM / AGS / APhA / ASH / ASPC / NMA / PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation and Management of High Blood Pressure in Adults-A Report of the American College of Cardiology / American Heart Association,
- White, F. & Grollman, A., 1964. Autoimmune Factors Associated With Infarction of The Kidney. *Nephron*, 1, pp.93–102.

- Whorwood, C.B., Ricketts, M.L. & Stewart, P.M., 1994. Regulation of sodium-potassium adenosine triphosphate subunit gene expression by corticosteroids and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Endocrinology*, 135(3), pp.901–910. Available at: <http://dx.doi.org/10.1210/endo.135.3.8070385>.
- Wiesel, P. et al., 1997. Two-Kidney, One Clip and One-Kidney, One Clip Hypertension in Mice. *Hypertension*, 29(4), p.1025 LP-1030. Available at: <http://hyper.ahajournals.org/content/29/4/1025.abstract>.
- Wolf-Maier, K., Cooper, R.S. & Rodri, F., 2003. Hypertension Prevalence and Blood Pressure Levels in 6 European Countries, Canada, and the United States. *JAMA*, 289(18), pp.2363–2369.
- Wolf, G. & Wenzel, U.O., 2004. Angiotensin II and Cell Cycle Regulation. *Hypertension*, 43(4), pp.693–698.
- Wu, J. et al., 2014. Inflammation and mechanical stretch promote aortic stiffening in hypertension through activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Circulation Research*, 114(4), pp.616–625.
- Yalow, R.S. & Berson, S.A., 1960. Immunoassay of Endogenous Insulin Plasma in Man. , pp.11–13.
- Yang, T. et al., 2015. Gut Dysbiosis is Linked to Hypertension. *Hypertension*, 65(6), pp.1331–1340.
- Yao, L. et al., 2010. The role of RhoA/Rho kinase pathway in endothelial dysfunction. *Journal of cardiovascular disease research*, 1(4), pp.165–170.
- Yin, C.P. & Lakatta, G., 1982. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *American Journal of Physiology*, 243(6), pp.H941-947.
- Young, C.N. et al., 2015. Endoplasmic reticulum and oxidant stress mediate nuclear factor- κ B activation in the subfornical organ during angiotensin II hypertension. *American journal of physiology. Cell physiology*, 308(10), pp.C803-12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25980014>.
- Yu, X. et al., 2011. Signature microRNA Expression Profile of Essential Hypertension and Its Novel Link to Human. *Circulation*, 124(2), pp.175–184.
- Yu, Y. et al., 2015. Activation of Central PPAR- γ Attenuates Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertension*, 66(2), pp.403–411.
- Zhai, P. et al., 2005. Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking G alpha q/G alpha i coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice. *The Journal of clinical investigation*, 115(11), pp.3045–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1265872&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Zhang, W. et al., 2007. Aldosterone-induced Sgk1 relieves Dot1a-Af9 – mediated transcriptional repression of epithelial Na⁺ channel α . *The Journal of Clinical Investigation*, 117(3), pp.773–783.
- Zhang, W.-C. et al., 2015. High salt primes a specific activation state of macrophages, M(Na). *Cell research*, 25(8), pp.893–910. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4528058&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Zhu, J. et al., 2004. Antibodies to infectious pathogen are associated with hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(5), pp.A12–A13. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109704900496>.

9. Abbildungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| Abbildung 1-1 | Intrazelluläre Effekte von ATII |
| Abbildung 1-2: | Endothelabhängige Vasodilatation durch Bindung von Acetylcholin an muskarinerge Rezeptoren |
| Abbildung 1-3: | T-Zellaktivierung durch die Produktion von oxidativ modifizierten Proteinen (Isoketale) |
| Abbildung 3-1: | Zeitstrahl des Experiments. |
| Abbildung 3-2: | Telemetrisches Messinstrument PhysioTel® mit Sendereinheit |
| Abbildung 3-3: | Telemetrische Blutdruckmessung und –aufzeichnung durch die PhysioTel und Physio Tel HD Telemetrie-Plattform mit PhysioTel® Recievers |
| Abbildung 3-4: | Fünfminutenwerte aller Parameter, beispielhafter Auszug aus der MS Excel Tabelle 2013 |
| Abbildung 3-5: | Implantation Messkatheter. Sicht durch das Mikroskop |
| Abbildung 3-6: | Stoffwechselkäfig für einzelne Mäuse |
| Abbildung 3-7: | exemplarischer Vergleich zweier repräsentativer Aortenschnitte in E.V.G.-Färbung |
| Abbildung 3-8: | Exemplarischer Vergleich zweier repräsentativer Herzschnitte in <i>PicroSirius Red</i> Färbung |
| Abbildung 3-9: | Organbad-Apparatur |
| Abbildung 3-10: | Feinpräparation der <i>Aorta thoracica</i> in Krebs-Henseleit-Puffer auf Eis unterm Mikroskop (40 fache Vergrößerung) |
| Abbildung 3-11 | <i>in vitro</i> Messung Organbad, Dosis-Wirkungs-Kurve, Original-Screenshot während des Versuchs |
| Abbildung 4-1: | Einstundenwerte (Mittelwerte +/- SEM) des MAP über jeweils drei Nächte und Tage |
| Abbildung 4-2: | Veränderung des MAP bei Umstellung der Diät von Basis- auf Spezielsalzdiät (Hoch-/Niedrigsalzdiät) |
| Abbildung 4-3 | Veränderung des MAP durch exogene ATII Zufuhr zusätzlich zur Hochsalz- und Niedrigsalzdiät |
| Abbildung 4-4: | MAP unter Basis-, Hoch- und Niedrigsalzdiät mit und ohne ATII auf die Aktivität normiert |
| Abbildung 4-5: | Veränderung des SBP und DBP bei Umstellung der Diät von Basis- auf Hoch- bzw. Niedrigsalzdiät |

- Abbildung 4-6: Veränderung des SBP und DBP durch exogene Zufuhr von ATII zusätzlich zur Hoch- und Nidrigsalzdiät.
- Abbildung 4-7: SBP und DBP für alle Diät- (Basis-, Hoch, Nidrigsalz) und Interventionsgruppen (mit/ohne ATII) auf eine Aktivität = 0 normiert.
- Abbildung 4-8: SBP und DBP für alle Diät- (Basis-, Hoch- und Nidrigsalzdiät)- und Interventionsgruppen (mit/ohne ATII) auf eine Aktivität > 0 normiert
- Abbildung 4-9: Veränderung des MAP, SBP und DBP bei beiden Genotypen über die Spezialsalzdiäten (Basis-, Hoch- und Nidrigsalz) und Interventionen (mit/ohne ATII) hinweg
- Abbildung 4-10: Vergleich der absoluten Blutdruckwerte des MAP, SBP und DBP zwischen Basis-, Hoch- und Nidrigsalzdiät mit und ohne ATII, Nacht und Tag
- Abbildung 4-11: Herzfrequenz für alle Diät- und Interventionsgruppen auf eine Aktivität = 0 und > 0 normiert.
- Abbildung 4-12: Vergleich der absoluten Herzfrequenzen zwischen Basis-, Hoch- und Nidrigsalzdiät mit und ohne ATII, Nacht und Tag.
- Abbildung 4-13: Absolute Werte Aktivität unter allen Diät (Basis-, Hoch-, Nidrigsalz)- und Interventionsgruppen (mit/ohne ATII).
- Abbildung 4-14: Abbildung 4-14: Vergleich der Aktivitäten zwischen Basis-, Hoch- und Nidrigsalzdiät mit und ohne ATII
- Abbildung 4-15: Plasma-Aldosteronkonzentration für Basis-, Nidrig- und Hochsalzdiät ohne ATII
- Abbildung 4-16: Reninaktivität im Plasma und Quotient Renin/L32 mRNA unter Basis-, Nidrig- und Hochsalzdiät ohne ATII
- Abbildung 4-17: Kreatinin-Clearance [$\mu\text{l}/\text{min}$] auf 100 g Mausgewicht normiert als Surrogat für die Nierenfunktion unter Nidrig-, Basis- und Hochsalzdiät ohne ATII für C57BL/6J WT und Rag-1 $-/-$ KO im Vergleich

| | |
|-----------------|---|
| Abbildung 4-18: | Natrium Einfuhr in [mg] unter Niedrig-, Basis- und Hochsalzdiät ohne zusätzliche ATII Infusion |
| Abbildung 4-19: | Freie Natrium- und Chloridexkretion |
| Abbildung 4-20: | Trinkmenge in [g] unter Niedrig-, Basis- und Hochsalzdiät mit und ohne ATII Behandlung |
| Abbildung 4-21: | Mediafläche der Aorta in cm ² von mit Basis-, Niedrig- und Hochsalzdiät ohne und mit ATII vorbehandelten Versuchstieren |
| Abbildung 4-22: | Direkter Vergleich der Mediafläche (Faktor Diät) zwischen Basis-, Niedrig- und Hochsalzdiät mit und ohne zusätzliche ATII Infusion |
| Abbildung 4-23: | Herzhypertrophie als Quotient aus Ventrikelgewicht [g] / Tibiallänge [cm] unter allen Diäten und Interventionen |
| Abbildung 4-24 | Herzfibrose |
| Abbildung 4-25: | Herzhypertrophie und Herzfibrose, Direkter Vergleich zwischen (Basis-)Niedrig- und Hochsalzdiät mit/ohne ATII (Faktor Diät) |
| Abbildung 4-26: | Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Gefäßrelaxation in [%] und der aufsteigenden Konzentration des Vasodilatators in [M]. |
| Abbildung 4-27: | Maximale Vasodilatation in [%] unter maximaler Dosis von Acetylcholin bzw. von Nitroglycerin |
| Abbildung 4-28: | Direkter Vergleich der maximalen Gefäßdilataion zwischen Niedrig- und Hochsalzdiät mit und ohne ATII bei maximaler Acetylcholin- und Nitroglycerindosis |
| Abbildung 4-29: | Milzgewichte beider Mauslinien unter allen Diät- (Basis-, Niedrig- und Hochsalzdiät) und Interventionsgruppen (mit/ohne ATII) |
| Abbildung 4-30: | Vergleich der Milzgewichte zwischen (Basis-)Niedrig- und Hochsalzdiät mit und ohne ATII |
| Abbildung 5-1: | Verlauf des SBP und DBP von C57BL/6J WT und Rag-1 -/- KO unter 14 tägiger Zufuhr von 490 ng*kg ⁻¹ *min ⁻¹ ATII, aus „ <i>Role of the T cell in the genesis of angiotensin</i> “ |

II – induced hypertension and vascular dysfunction“ von Tomasz J. Guzik et al. (Guzik et al. 2007)

Abbildung 5-2:

Vergleichsabbildung aus dieser Arbeit zu “*Role of the T cell in the genesis of angiotensin II – induced hypertension and vascular dysfunction*” (Guzik et al. 2007)

10. Tabellenverzeichnis

| | |
|--------------|---|
| Tabelle 1-1: | Definition und Klassifizierung von Bluthochdruck |
| Tabelle 3-1: | Überblick über Endpunkte, Methoden und Gruppeneinteilung der tierexperimentellen Arbeit |
| Tabelle 3-2: | Elektrolytzusammensetzung der Spezial-Salzdiäten für Niedrigsalz-, Kontrollsalz- und Hochsalzdiät. |
| Tabelle 3-3: | postoperative Bewertungskriterien des Gesundheitszustandes der Versuchstiere |
| Tabelle 3-4: | <i>Sense</i> - und <i>Antisense</i> Codierung der Primer für die PCR zur quantitativen Bestimmung der renalen Renin mRNA |
| Tabelle 3-5: | Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers. |
| Tabelle 3-6: | PSR-Score |
| Tabelle 3-7: | Sequenzen der verwendeten Primasen für die PCR zur Genotypisierung. |
| Tabelle 4-1. | Absolute Blutdruckwerte (MAP, SBP und DBP) unter allen Diät (Basis-, Hoch-, Niedrigsalzdiät) und Interventionen (mit/ <i>ohne</i> ATII), Nacht und Tag |
| Tabelle 4-2: | Absolute Werte Herzfrequenz unter allen Diäten und Interventionen |
| Tabelle 4-3: | Absolute Werte Aktivität unter allen Diäten und Interventionen |
| Tabelle 4-4: | Elektrolytkonzentrationen (Na ⁺ , Cl ⁻ , K ⁺) im Plasma mit 1. Blutgasanalysen und 2. mit dem Spotchem EL SE 1520 Messgerät |
| Tabelle 4-5 | Urinkonzentration von Natriumchlorid unter allen Diäten |
| Tabelle 4-6 | Hill-Parameter (LOG EC ₅₀ und Steigung) |
| Tabelle 4-7: | Milzgewicht [mg], Mausgewicht [g], Tibialänge [cm] unter Basis-, Niedrig- und Hochsalzdiät mit und <i>ohne</i> ATII |
| Tabelle 5-1: | durchschnittliches Mausgewicht von C57BL/6J WT und Rag-1 ^{-/-} KO unter Niedrig- und Hochsalzdiät vor Implantation der ATII Pumpen |

11. Danksagung

Ich möchte dem Institutsdirektor und meinem Doktorvater *Prof. Dr. med. Heimo Ehmke* für die Stellung des Dissertationsthemas, sowie auch für die Möglichkeit zur Bearbeitung desselben und zur Durchführung der dafür nötigen Experimente in seinem Institut danken. Besonders hilf- und lehrreich waren das kritische Hinterfragen der Ergebnisse und der jederzeit mögliche Austausch über potentielle Fehlerquellen. *Prof. Dr. med. Ehmke* hat stets zu neuen Denkweisen angeregt und aus verschiedenen Perspektiven auf die Thematik blicken lassen. Wie auch mein Vorgänger *Jonas Leonhard Thiele* möchte ich mich bei *Prof. Dr. med. Ehmke* vor allem für die Ermutigung zur selbstbewussten Darstellung und Präsentation meiner Ergebnisse bedanken. Mein besonderer Dank gilt weiterhin meiner lieben Betreuerin *Frau Dr. med. Anika Seniuk* für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Versuche, für ihr Vertrauen, sowie für das Lektorat. Sie hatte immer ein offenes Ohr für meine Belange und stand mir mit ihrem Rat stets unterstützend zur Seite. Besonders positiv war Ihre optimistische und besonne Art, die fortwährend über den einen oder anderen Rückschlag hinweg half. Zudem möchte ich mich auch bei den wissenschaftlichen Kollegen aus anderen Arbeitsgruppen des Instituts wie *Frau Dr. rer.nat. Helga Vitzthum*, *Frau Dr. med. vet. Marisa Jelinek* und *PD Dr. med. Alexander Schwoerer*, sowie bei *Herrn Dipl.-Ing. Peter Bassalay* für das freundschaftliche Miteinander bedanken. In Vertretungsfällen zeigten sie allzeit allergrößte Bereitschaft zur praktischen, technischen und theoretischen Unterstützung meines Projekts. Durch die humorvolle, offene und familiäre Atmosphäre im Institut bereitete die Forschungstätigkeit im Institut generell viel Spass. Meinen großen Dank möchte ich auch den Medizinisch Technischen Assistentinnen *Frau Telse Kock* (†) und *Frau Margret Hölzel* für den Einsatz bei der Durchführung der vielen PCRs, Gelelektrophoresen und Radio-Immunoassays aussprechen. Dies gilt vor allem auch für *Herrn Hartwig Wiebold* aus dem *Cardiovascular Research Center* am Campus Forschung aus der Klinik für allgemeine und interventionelle Kardiologie des UKE und für *Herrn Claudius Steffen*, die mich in die Durchführung des Organbads eingearbeitet haben. Vor allem möchte ich *Herrn Claudius Steffen* auch dafür danken, dass er mir seine hilfreichen Erfahrungen, nicht nur bezüglich des Organbads, sondern auch bezüglich anderer Experimente, weitergegeben hat und ich mich bei Fragen jederzeit an ihn wenden konnte. Vielen Dank auch an weitere Mit-Doktoranden wie *Herrn Maik von der Forst* und *Herrn Torben Neuss* aus der AG *Seniuk* des Instituts für zelluläre und integrative Physiologie. Durch den Austausch über unsere unterschiedlichen Projekte konnte ich viele hilfreiche Perspektiven in Bezug auf meine Arbeit gewinnen. Zuletzt möchte ich auch *Frau Claudia Kollien* dafür danken, dass ich mich durch ihre herzliche und freundliche Art schnell im Institut aufgenommen gefühlt habe. In organisatorischen Fragen außerhalb der Doktorarbeit konnte ich mich jederzeit mit meinen Anliegen an sie wenden. Mein besonderer Dank gilt auch *Christoph Südhaus*, der mich durch die Irrungen und Wirrungen von Microsoft Word 10 geführt hat.

Ich bin sehr froh, dass ich meine Doktorarbeit am Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie unter *Herrn Prof. Dr. med. Heimo Ehmke* am UKE absolvieren durfte.

12. Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Andra Stubbe