

Untersuchungen der Aktivierungs- und Effektorwege von T-Helferzellen in der Pathogenese vaskulärer inflammatorischer Prozesse

Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

im Promotionsfach Chemie
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Melanie Brähler
geb. in Wiesbaden

Mainz, den 20.01.2014



Aus der
Hautklinik und Poliklinik
und dem
Zentrum für Thrombose und Hämostase (CTH)
der Universitätsmedizin Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2014

D77 (Dissertation Johannes Gutenberg-Universität Mainz)

Eidstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich gemäß § 10 Abs. 3d der Promotionsordnung vom 24.07.2007, dass ich die als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel in der Arbeit angegeben habe. Weiterhin habe oder hatte ich die als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ich hatte weder die als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Melanie Brähler

Für Manuel und meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Angeborenes und adaptives Immunsystem	1
1.2	T-Zell-Immunität	2
1.3	Anatomie und Physiologie der Blutgefäße	4
1.4	Mittelfristige Blutdruckregulation	5
1.5	Arterielle Hypertonie	6
1.6	Bluthochdruckmodelle in der Maus	6
1.7	Arterielle Entzündung und oxidativer Stress	7
1.8	Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der Entstehung von Bluthochdruck	8
1.9	Die Rolle von T-Zellen in der Entstehung von Bluthochdruck	9
1.10	Venöse Durchblutungsstörungen und Thrombose	10
1.11	Mausmodelle der venösen Thrombose	11
1.12	Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der Entstehung venöser Thrombosen	12
1.13	Die Rolle von T-Zellen in der Entstehung venöser Thrombosen	12
1.14	Ziel der Dissertation	12
2	Material	13
2.1	Laborgeräte und technisches Zubehör	13
2.2	Chirurgische Instrumente	13
2.3	Verbrauchsmaterialien	14
2.4	Chemikalien, Reagenzien und gebrauchsfertige Lösungen	15
2.5	Kits und Reagenzien zur DNA- und RNA-Analyse	17
2.6	Antikörper	17
2.7	Primer	18
2.8	Puffer	18
2.9	Medien für die Zellkultur	19
2.10	Zytokine und Chemokine	19
2.11	Microbeads für die Anreicherung von Zellen	19
2.12	Versuchstiere	20
2.13	Spezielle Software	20
3	Methoden	21
3.1	Behandlung der Versuchstiere	21
3.1.1	Verwendete Mausstämme	21
3.1.2	<i>In vivo</i> Depletion von CD4 ⁺ T-Zellen	22
3.1.3	<i>In vivo</i> Depletion von Granulozyten	22

3.1.4	Depletion von Zellen der myelomonozytären Entwicklungsreihe mittels Diphtheriatoxin in LysM ^{iDTR} Mäusen	23
3.1.5	Aktivierung muriner T-Zellen <i>in vivo</i>	23
3.2	Operative Methoden und <i>ex vivo</i> Analysen	23
3.2.1	Subkutane Implantation miniosmotischer ATII-beladener Pumpen	23
3.2.2	Ligation der Vena Cava Inferior	23
3.2.3	Organentnahme.....	24
3.2.4	Messung der Gefäßfunktion (Organbad).....	25
3.3	Zellbiologische Methoden	26
3.3.1	Zellkultur.....	26
3.3.2	Generierung Antikörper-haltiger Überstände von Hybridomzelllinien	26
3.3.3	Kryokonservierung von Hybridomzellen.....	27
3.3.4	Auftauen von Hybridomzellen	27
3.3.5	Ermittlung der Lebendzellzahl.....	27
3.4	Molekularbiologische Methoden.....	27
3.4.1	Gewinnung von RNA aus Gewebe	27
3.4.2	RNA-Konzentrationsbestimmungen.....	28
3.4.3	DNA-Sequenzierung (engl. New Gene Sequencing, NGS)	28
3.4.4	Real-Time PCR	30
3.5	Immunologische Methoden.....	31
3.5.1	Herstellung von Einzelzellsuspensionen	31
3.5.2	Erythrozytenlyse	31
3.5.3	Isolierung muriner CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	32
3.5.4	Stimulation isolierter T-Zellen mit rekombinanten Zytokinen	32
3.5.5	Durchflusszytometrie	33
3.6	Statistische Auswertungen.....	35
4	Ergebnisse.....	36
4.1	Ergebnisse zur Rolle von T-Zellen in der Entstehung der Gefäßentzündung und -dysfunktion bei arteriellem Bluthochdruck	36
4.1.1	Die Induktion von arteriellem Bluthochdruck durch Angiotensin II ruft eine verstärkte Einwanderung von T-Zellen in die entzündeten Aortenwände hervor	36
4.1.2	Bei arteriellem Bluthochdruck in die Aortenwand einwandernde T-Zellen weisen vorwiegend einen Effektor-Gedächtniszell-Phänotyp auf	38
4.1.3	Bei arteriellem Bluthochdruck in die Aortenwand einwandernde CD4 ⁺ T-Zellen mobilisieren CD40L, exprimieren T-bet und können IFN- γ bilden	39
4.1.4	In Interferon- γ - und T-bet-defizienten Mäusen ist die durch ATII hervorgerufene Einwanderung von T-Zellen in die Aortenwand verringert	43
4.1.5	Die Depletion von Monozyten in LysM ^{iDTR} Mäusen verringert die durch ATII hervorruhbare Einwanderung von IFN- γ ⁺ T-Zellen in die Aorta	45
4.1.6	Die Depletion von CD4 ⁺ T-Zellen hat keinen Einfluss auf die durch ATII induzierbare Gefäßdysfunktion	46

4.1.7	Die polyklonale Aktivierung von T-Zellen <i>in vivo</i> verstärkt vermutlich die durch ATII hervorgerufene Gefäßdysfunktion	49
4.1.8	Die Induktion von arteriellem Bluthochdruck durch Angiotensin II ruft eine verstärkte mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine in den entzündeten Aortenwänden hervor	51
4.2	Ergebnisse zur Rolle von T-Zellen in der venösen Thrombose	53
4.2.1	Venöse Thrombose ruft eine verstärkte Einwanderung von T-Zellen in die Venenwand hervor.....	53
4.2.2	In die Venenwand thrombotischer Tiere eingewanderte T-Zellen weisen überwiegend einen Effektor-Gedächtniszell-Phänotyp auf	55
4.2.3	In die Venenwand thrombotischer Tiere eingewanderte CD8 ⁺ T-Zellen weisen eine erhöhte Expression des Integrins α5 auf	58
4.2.4	Die Depletion von Granulozyten und Monozyten beeinflusst die Infiltration von T-Zellen in die Vena Cava ligierter Tiere nur geringfügig.....	59
4.2.5	T-Zellen in der Vena Cava thrombotischer Nur77-GFP-BAC-transgener Reportermause zeigen kein T-Zell-Rezeptor-vermitteltes Aktivierungssignal	61
4.2.6	Die Induktion venöser Thrombose erhöht die mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in der Venenwand	65
4.3	In thrombotischen Venen lösen verstärkt exprimierte Zytokine und Chemokine eine T-Zell-Rezeptor-unabhängige IFN-γ-Bildung in Effektor-T-Gedächtniszellen aus..	67
5	Diskussion	71
6	Zusammenfassung	77
7	Literaturverzeichnis	78
8	Anhang	88
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	88
8.2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	90
8.2.1	Abbildungsverzeichnis	90
8.2.2	Tabellenverzeichnis	91
8.3	Publikationen und Präsentationen	92
8.3.1	Publikationen.....	92
8.3.2	Präsentationen	92
8.4	Lebenslauf	93
8.5	Danksagung	94

1 Einleitung

1.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Das Immunsystem der Vertebraten kann grundsätzlich in Zellen und Mechanismen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr unterteilt werden. Beide Systeme übernehmen in der Bekämpfung von Infektionen unterschiedliche Aufgaben: Das angeborene System erkennt Pathogene anhand Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (engl. pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Durch PAMP-Rezeptoren können Zellen des angeborenen Systems unmittelbar mit einem Erreger interagieren und stellen daher in den ersten Tagen nach einer Infektion die erste Verteidigung des Organismus dar [1–3]. Auf Grund ihrer unmittelbaren Wirksamkeit kann die angeborene Immunität die Ausbreitung eingedrungener Keime eine Zeit lang kontrollieren, eliminiert insbesondere eingedrungene Viren jedoch nicht [4,5]. Bleibt die Aktivität der angeborenen Abwehr unwirksam, kommt es nach einem Zeitraum von vier bis sieben Tagen zur Aktivierung adaptiver Immunzellen durch Zellen des angeborenen Immunsystems. Im Gegensatz zum eingeschränkten Zielrepertoire angeborener Antworten kann sich die Aktivität der Zellen des adaptiven Immunsystems gegen nahezu jedes denkbare Molekül richten [6,7]. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass sich adaptive Immunzellen zu langlebigen Gedächtniszellen entwickeln können, die bei erneutem Kontakt mit einem bereits einmal bekämpften Pathogen eine schnellere und effektivere Antwort sicherstellen und lebenslangen Schutz vor einem Erreger vermitteln können [8–10].

Entzündungen werden immer durch eine Aktivierung des Immunsystems hervorgerufen. Neben einer PAMP-Aktivierung durch mikrobielle und virale molekulare Signaturen können Entzündungsreaktionen unter sogenannten sterilen Bedingungen, in Abwesenheit eines Pathogens, durch physikalische und chemische Reize hervorgerufen werden. In allen Fällen werden Zellen bzw. Gewebe geschädigt, was zu einer Freisetzung sogenannter „damage-associated molecular patterns“ (DAMPs oder „Alarmine“) führt [11,12]. Hierbei handelt es sich um intrazelluläre oder nukleäre Proteine, sowie nicht-proteinbasierte Komponenten wie Purin-Metaboliten oder Nucleinsäuren [13,14]. Ziel der Entzündungsreaktion ist die Entfernung des geschädigten Gewebes bzw. der betroffenen Zellen. Die Bedeutung steriler Entzündungsreaktionen für die Entstehung von Erkrankungen ist bislang nur rudimentär verstanden. Während eine Beteiligung von Zellen und Faktoren des angeborenen Immunsystems unverzichtbar erscheint, ist die mögliche Beteiligung und Rolle adaptiver Immunzellen bislang weitgehend ungeklärt [11,15]. Auf Grund der

Fähigkeit, langlebige Gedächtniszellen bilden zu können und damit die Erkrankung langfristig zu manifestieren, kommt der möglichen Beteiligung adaptiver Immunzellen jedoch eine besondere Bedeutung zu.

1.2 T-Zell-Immunität

Antworten des adaptiven Immunsystems sind immer spezifisch gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet. Dies beruht darauf, dass T-Zellen und B-Zellen, die beiden Zellpopulationen des adaptiven Immunsystems, Rezeptoren mit variablen Erkennungsregionen besitzen, welche die Bindung unterschiedlicher Moleküle erlauben [6,16–19].

Fast alle Wirbeltierzellen präsentieren eine Zusammenstellung von Peptiden auf ihrer Oberfläche, die aus dem Abbau von Proteinen im Zytoplasma stammen. Diese Peptide werden von integralen Membranproteinen präsentiert, die von dem Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex, MHC) kodiert werden. Hierbei unterscheidet man zwischen MHC-Molekülen der Klasse I (MHC I) und der Klasse II (MHC II) [20].

T-Zellen exprimieren einen spezifischen Rezeptor (engl. T cell receptor, TCR), der vor allem Peptide (seltener auch Zuckermoleküle oder Fettsäuren) erkennt, die durch MHC-Moleküle auf Zelloberflächen präsentiert werden. T-Zellen, die neben dem TCR-Komplex das Oberflächenmolekül CD4 exprimieren, erkennen bevorzugt Antigene im Kontext von MHC II-Molekülen, CD8-exprimierende T-Zellen dagegen überwiegend Antigene im Kontext von MHC I-Molekülen [21].

T-Zell-Rezeptoren bestehen jeweils aus zwei Molekülketten, einer α - und einer β -Kette, oder, im Fall einer kleineren Gruppe von etwa 0,5-10% der T-Zellen, aus einer γ - und einer δ -Kette [22]. Beide Ketten des TCR-Heterodimers sind an der Erkennung des MHC-Moleküls und des daran gebundenen Peptids beteiligt. Hierbei bindet jede TCR-Kette eine bis drei Aminosäuren des im MHC-Molekül präsentierten Peptids [23]. Jede T-Zelle bildet TCR mit einem einzigartig definierten variablen Bereich der Peptidbindung, so dass dieser sich von den T-Zell-Rezeptoren aller anderen T-Zellen unterscheidet. Jedoch ist der TCR allein nicht zur Signalvermittlung und damit zur Aktivierung der T-Zelle fähig, sondern benötigt die Verbindung mit mehreren CD3-Molekülen, darunter einer signalgebenden ζ -Kette. Erst dieser gebildete multimere TCR-Komplex kann eine Antigen-abhängige Aktivierung der T-Zelle vermitteln [24].

T-Zellen werden ausgehend von Vorläuferzellen gebildet, welche im Knochenmark unter dem Einfluss bestimmter Differenzierungsfaktoren heranreifen. Im Anschluss daran wandern T-Vorläuferzellen in den Thymus ein. Durch somatische Rekombination verschiedener Gen-Segmente können dort ca. 10^{18} verschiedene T-Zell-Rezeptoren

generiert werden. Auf diese Weise wird ein individuelles T-Zell-Rezeptor-Repertoire gebildet [6]. Im nächsten Schritt erfolgt im Thymus eine Art Qualitätskontrolle. So gelangen nur T-Zellen in die Peripherie, die über einen funktionellen Rezeptor verfügen, also in der Lage sind, Peptide auf körpereigenen MHC-Komplexen zu detektieren. Dazu werden den T-Zellen im Thymus durch medulläre Thymusepithelzellen (mTECs) körpereigene Peptide präsentiert. T-Zellen, die durch die körpereigenen MHC-Peptid-Komplexe im Thymus aktiviert werden, entwickeln sich weiter (Positivselektion). In einem zweiten Schritt werden positiv selektionierte T-Zellen, deren Rezeptor eine sehr hohe Affinität für körpereigene MHC/Peptid-Komplexe aufweisen, deletiert (Negativselektion), da solche T-Zellen auf Grund der zur Selektion verwendeten körpereigenen MHC-Peptid-Komplexe autoreaktiv sind und damit die Entstehung einer Autoimmunität begründen könnten [25,26].

Schließlich gelangen selektierte reife, naive T-Zellen in die Peripherie. Treffen sie dort auf eine Antigen-präsentierende Zelle (engl. antigen-presenting cell, APC), deren exprimierter MHC-Peptid-Komplex eine hohe Affinität für den TCR-Komplex der T-Zelle aufweist, kann die T-Zelle im Zusammenspiel mit weiteren sogenannten kostimulatorischen Molekülen der APC aktiviert werden [27]. Der Aktivierung über ihren Rezeptor folgt eine klonale Expansion und Differenzierung in kurzlebige Effektorzellen sowie in langlebige Gedächtniszellen, welche alle die gleiche Antigenspezifität aufweisen [28].

Langlebige Gedächtnis-T-Zellen können mindestens in zwei Gruppen, zentrale T-Gedächtniszellen (T_{CM}) und Effektor-T-Gedächtniszellen (T_{EM}) unterteilt werden, die sich unter anderem anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD62L und CD44 [8] sowie der Chemokinrezeptoren CCR7 (T_{CM}) und CCR5 (T_{EM}) unterscheiden lassen [10]. Während T_{CM} überwiegend in lymphatischen Organen und im Blut zu finden sind, können T_{EM} in entzündete Gewebe einwandern und dort nach erneuter Stimulation als Effektorzellen an Immunantworten beteiligt sein.

Die Entwicklung von Effektor- und Gedächtniszellen wird durch zahlreiche endogene und exogene Faktoren beeinflusst. Dazu zählen insbesondere Zytokine, die über die Regulation von Transkriptionsfaktoren zur T-Zell-Differenzierung beitragen. Dabei entstehende Subpopulationen können anhand ihrer Funktionen unterschieden werden. So entwickeln sich aus naiven $CD4^+$ T-Zellen Subpopulationen von T-Helfer-Zellen, die ihrerseits durch die Bildung bestimmter Zytokine gekennzeichnet sind und verschiedene zelluläre und humorale Immunreaktionen steigern oder hemmen. Die Differenzierung $IFN-\gamma$ -bildender Th1-Zellen wird beispielsweise durch die von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen gebildeten Interleukine IL-12, IL-15 und IL-18 stimuliert [29,30]. Hierbei kommt es durch die Bindung von $IFN-\gamma$ an seinen,

auf T-Zellen exprimierten, Rezeptor zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1, der wiederum die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet (engl. T-box transcription factor) induziert [31–33]. T-bet bewirkt seinerseits eine Chromatin-Öffnung des IFN- γ -Lokus und ermöglicht dadurch die Bildung von IFN- γ durch die T-Zelle [34]. Zugleich bewirkt T-bet die Expression der β 2-Kette des IL-12-Rezeptors [35,36]. Eine Bindung von IL-12 an seinen Rezeptor induziert im weiteren Verlauf die Expression des ebenfalls Th1-assoziierten IL-18-Rezeptors. Reziprok wird die IL-12R β 2-Kettenexpression durch IL-18-Signale verstärkt [37–40]. In ausdifferenzierten Th1-Zellen kann nun die Bildung von IFN- γ einerseits durch eine Stimulation über den TCR hervorgerufen werden. Andererseits wird nach Stimulation durch IL-12 und IL-18 TCR-unabhängig ebenfalls IFN- γ gebildet [41]. Aktuelle Befunde deuten daraufhin, dass neben IL-12 und IL-18 weitere Zytokine eine IFN- γ -Bildung hervorrufen können [30,42–44]. Neben ihrer Rolle als adaptive Immunzellen erlangen aktivierte T-Zellen also TCR-unabhängige Funktionen, die denjenigen der Zellen des angeborenen Immunsystems ähneln.

Analog zur beschriebenen Differenzierung von Th1-Zellen wurde eine Zytokin-induzierte Zytokinbildung auch in weiteren T-Helfer-Subpopulationen beobachtet. So kann etwa die IL-5- und IL-13-Bildung in Th2-Zellen durch IL-33 ausgelöst werden [45]. Bislang haben nur wenige Arbeitsgruppen die Wirkung von Zytokinen auf die Zytokinbildung unterschiedlich differenzierter Effektor-T-Zellen untersucht [42,46]. Es ist daher zu vermuten, dass die Signalwege einer TCR-unabhängigen Aktivierung von Effektorfunktionen nicht vollständig bekannt sind. Beobachtungen zur Zytokin-induzierten Zytokinbildung wurden überwiegend *in vitro* getätigt. Ob die bei Entzündungen auftretenden komplexen Zytokin-Kombinationen eine TCR-unabhängige Zytokinbildung *in vivo* auslösen, ist bislang ungeklärt.

1.3 Anatomie und Physiologie der Blutgefäße

Im Blutgefäßsystem der Vertebraten können anhand von Funktion und Aufbau grundsätzlich zwei Arten von Gefäßen unterschieden werden: Während Arterien sauerstoffreiches Blut ausgehend vom Herzen im gesamten Organismus verteilen, besteht die Hauptaufgabe der Venen im Rücktransport sauerstoffarmen Blutes aus den Organen zum Herzen. Die Wände beider Gefäßtypen bestehen aus drei Schichten: Tunica interna (Intima), Tunica media (Media) und Tunica externa (Adventitia) (siehe Abbildung 1.1) [47]. Die Intima besteht vor allem aus Endothelzellen und lockerem Bindegewebe. Die Media zeichnet sich bei arteriellen Gefäßwänden durch eine dicke Schicht glatter Muskelzellen und elastischer Fasern aus, während venöse Gefäße eine deutlich dünnere Media besitzen [48]. Dies ist vor allem auf die unterschiedlichen

Drücke zurückzuführen, die in den Gefäßen herrschen. Blut wird aktiv vom Herzen in die Aorta und nachfolgenden kleineren Arterien gepumpt, wobei diese hohen Drücken (normaler systolischer Blutdruck: 120 mm Hg, normaler diastolischer Blutdruck: 80 mm Hg) standhalten müssen. Dagegen sind Venen viel geringeren Druckbelastungen ausgesetzt (zentraler Venendruck im Liegen: ca. 4 mm Hg), zudem wird in den Venen das Blut auf dem Weg zurück zum Herzen durch Venenklappen am Rückfluss gehindert. Die Adventitia beider Gefäßtypen besteht hauptsächlich aus kollagenreichem Bindegewebe und Fibroblasten [49].

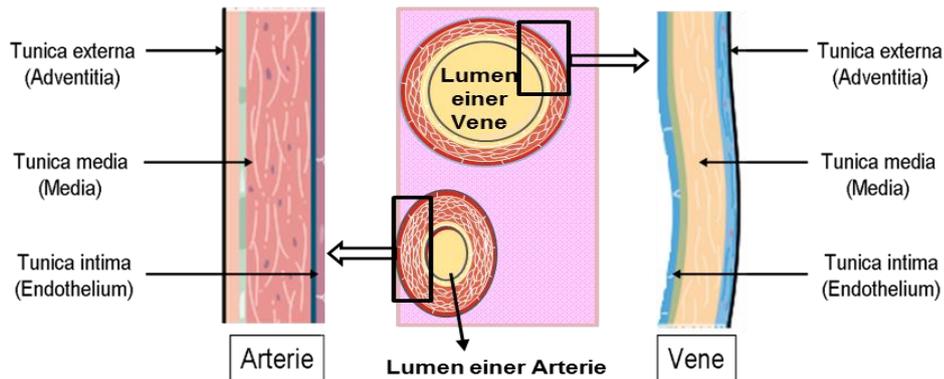


Abbildung 1.1: Aufbau von arteriellen und venösen Gefäßen

Dargestellt ist ein Schnitt durch ein venöses und arterielles Blutgefäß sowie der schematische Aufbau der jeweiligen Gefäßwände. Adaptiert nach [50] unter Verwendung von Servier Medical Art.

Zur Gewährleistung der Blutdruckregulation und der Transportfunktion der Gefäße ist die Unversehrtheit der arteriellen und venösen Gefäßwände essentiell.

1.4 Mittelfristige Blutdruckregulation

Es gibt grundsätzlich drei Mechanismen der Blutdruckregulation, bei denen man zwischen kurz-, mittel- und langfristiger Regulation unterscheidet: Mittelfristig erfolgt eine Regulation hauptsächlich durch das Renin-Angiotensin-System (RAS). Die in der Niere gebildete Protease Renin spaltet Angiotensinogen, wodurch das Dekapeptid Angiotensin I entsteht [51]. Auf der Oberfläche vaskulärer Endothelzellen des arteriellen Systems erfolgt eine Abspaltung des C-terminalen Dipeptides des Angiotensin I durch das Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE), wodurch Angiotensin II (ATII) entsteht [52]. Dieses Oktapeptid bindet an die Angiotensin II-Rezeptoren vom Typ 1 (AT1-Rezeptor) der Endothel- und glatten Muskelzellen, was in diesen zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt und die Bildung von Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) auslöst [53]. Gleichzeitig kommt es zu einer intrazellulären Freisetzung von Calcium und zur Aktivierung der Proteinkinase C. Außerdem erhöht ATII die Sensitivität von spannungs-abhängigen Ca^{2+} -Kanälen vom

Typ T, was ebenfalls zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumlevels beiträgt [54,55]. Durch die genannten und weitere Aktivierungsprozesse werden Myosine phosphoryliert und aktiviert, deren Kontraktion eine Verringerung des Gefäßvolumens und damit eine Erhöhung des Blutdrucks einleitet [56]. Neben den genannten Mechanismen existieren weitere alternative Signalwege [57].

Die verstärkte Bildung von Angiotensin II steht im direkten Zusammenhang mit der Entwicklung einer Hypertonie [58]. So hat sich gezeigt, dass die durch AT1-Rezeptoren vermittelte Vasokonstriktion zu einer dauerhaften Erhöhung des Blutdrucks führen kann, wenn die regulativen Mechanismen nicht mehr ausreichend funktionieren und die ATII-Konzentration erhöht bleibt [59]. Des Weiteren führt die Aktivierung von AT1-Rezeptoren in der Niere zu einer renalen Vasokonstriktion und Anti-Natriurese¹ [60,61]. Durch die Beteiligung von ATII an der Ausschüttung von Aldosteron im Kortex der Nebenniere wird die Natriumresorption in der Niere gesteigert [62]. Dies hat eine gesteigerte Wasserrückresorption und damit einen weiteren Blutdruckanstieg zur Folge.

1.5 Arterielle Hypertonie

Kardiovaskuläre Erkrankungen bilden nach aktuellen statistischen Erhebungen die wichtigste Todesursache in Europa [63]. Unter den kardiovaskulären Erkrankungen stellt arterieller chronischer Bluthochdruck die am häufigsten auftretende Erkrankung dar und ist mit einem deutlich erhöhten Risiko verbunden, eine koronare Herzkrankheit (KHK) mit folgendem Herzinfarkt oder Schlaganfall zu entwickeln [64]. Von Bluthochdruck (Hypertonie) spricht man beim Menschen bei einem systolischen arteriellen Druck oberhalb von 140 mm Hg und einem diastolischen arteriellen Druck oberhalb von 90 mm Hg [48].

1.6 Bluthochdruckmodelle in der Maus

Zur Untersuchung der Pathogenese des Bluthochdrucks werden verschiedene Mausmodelle verwendet. Häufig kommt in diesem Rahmen das Desoxycorticosteronacetat (DOCA)-Salz Modell zum Einsatz. In diesem wird durch subkutane Implantation eines DOCA-Salz-Pellets, Erhöhung des Salzgehalts der Nahrung und operative Entfernung einer Niere eine verstärkte Reabsorption von Natriumionen und Wasser im distalen Nephronbereich der Niere bei gleichzeitig eingeschränkter Nierenfunktion hervorgerufen. Die Erhöhung des Blutvolumens führt zu einer Blutdrucksteigerung [65,66].

¹ verminderte Natriumausscheidung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Angiotensin II-Bluthochdruckmodell verwendet. In diesem Modell werden miniosmotische Pumpen unter die Haut am Rücken der Versuchstiere implantiert, die über einen Zeitraum von mehreren Tagen Angiotensin II abgeben. Durch die Porengröße und Beladung der Pumpen kann die freigesetzte ATII-Menge reguliert werden. In diesem Modell führt eine Behandlung der Tiere mit 1 mg/kg/Tag ATII über einen Zeitraum von sieben Tagen zu einem mittleren systolischen und diastolischen Blutdruckanstieg auf 165 mm Hg bzw. 135 mm Hg (Normdruck bei C57BL/6 Mäusen: ca. 120 mm Hg bzw. ca. 90 mm Hg, siehe Abbildung 1.2).

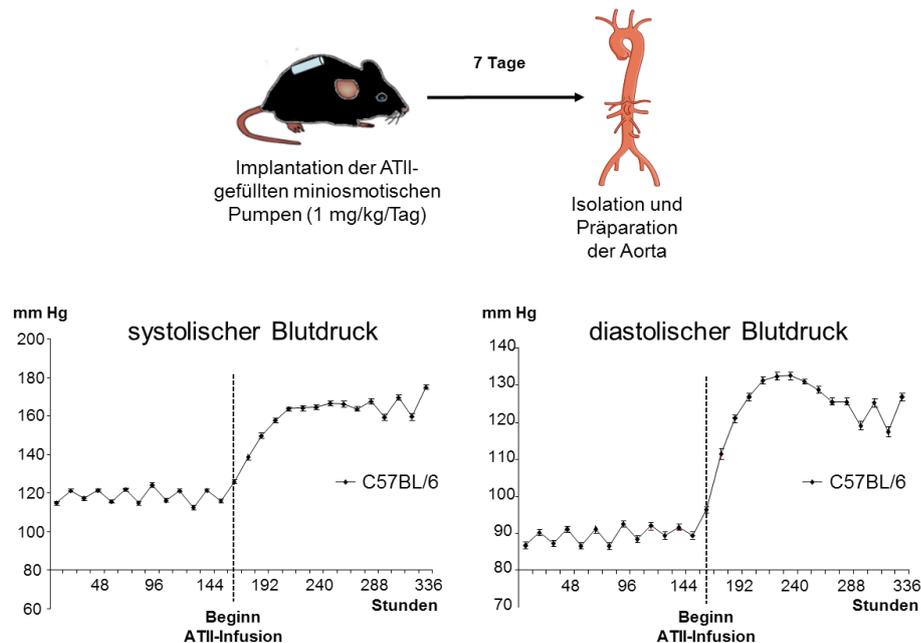


Abbildung 1.2: Die Implantation ATII-beladener miniosmotischer Pumpen führt zu einem Blutdruckanstieg

Die Darstellung zeigt den Versuchsablauf zur Induktion einer ATII-vermittelten arteriellen Hypertonie sowie repräsentative telemetrische Daten zum Verlauf des Blutdrucks in C57BL/6 Mäusen. Adaptiert nach Kossmann, Schwenk, Hausding et al, ATVB 2013.

1.7 Arterielle Entzündung und oxidativer Stress

Eine bedeutsame Folge der Angiotensin II-vermittelten Hypertonie ist die endotheliale Dysfunktion. Dabei führt die Bindung von Angiotensin II an AT1-Rezeptoren der Endothel- und glatten Muskelzellen der Gefäße zur Aktivierung intrazellulärer NADPH-Oxidasen [67–69]. In vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) konnte gezeigt werden, dass ATII die PKC-abhängige NADPH-Oxidase über drei verschiedene Phospholipasen stimulieren kann [70]. In Neutrophilen konnte durch ATII eine Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK1/2 detektiert werden, welche bei Zugabe von Inhibitoren der NADPH-Oxidase nicht auftrat [71]. Eine bedeutende Quelle für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies durch intrazelluläre NADPH-Oxidasen stellen monozytäre Zellen dar [72,73]. Durch Katalyse von

Sauerstoffmolekülen (O_2) kommt es zur Entstehung von Superoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) [74]. Diese führen ausgehend von Stickstoffmonoxid (NO) zu einer verstärkten Bildung von Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot-}$) [75,76].

Die gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) können durch Modifikationen von Proteinen und DNA (z.B. Nitrierung) zu weitreichenden Zellschäden führen und gleichzeitig gefäßschützendes Stickstoffmonoxid (NO) inaktivieren. NO wird enzymatisch ausgehend von Arginin und Sauerstoff durch NO-Synthasen (NOS) gebildet [53]. Es gibt drei Hauptformen dieser Synthasen: Die Calcium-abhängigen neuronalen (nNOS) und endothelialen (eNOS) Synthasen sowie die Calcium-unabhängigen induzierbaren Synthasen (iNOS) [77]. Als „second messenger“- Molekül reguliert NO die lösliche Guanylatzyklase, welche die Bildung von cGMP ausgehend von GTP katalysiert [78]. Durch Bindung an cGMP-abhängige Proteinkinasen wird eine Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen bewirkt [79]. Das Zusammenspiel aus Angiotensin II und Stickstoffmonoxid bildet daher einen wichtigen Mechanismus der Regulation der Gefäßelastizität. Durch eine dauerhaft gesteigerte ATII-Produktion mit nachfolgender Bildung reaktiver Sauerstoffspezies entsteht eine arterielle Entzündung, die zunächst eine Reduktion der Gefäßelastizität zur Folge hat, langfristig aber Umbauprozesse in der Gefäßwand auslöst und dann zu einer dauerhaften, irreversiblen Gefäßschädigung führen kann.

1.8 Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der Entstehung von Bluthochdruck

Die große Bedeutung des Renin-Angiotensin II-Systems (RAS) im Rahmen der Entstehung von Bluthochdruck hat viele Wissenschaftler veranlasst, sich auf der Suche nach neuen therapeutischen Ansätzen mit den beteiligten Zelltypen und Signalwegen des RAS auseinanderzusetzen. Dabei wurde überraschenderweise festgestellt, dass auch die Zellen des Immunsystems AT1-Rezeptoren exprimieren und somit auf Angiotensin II reagieren können [80,81]. Außerdem verfügen Immunzellen über funktionelle NADPH-Oxidase und tragen damit durch Produktion reaktiver Sauerstoffspezies im Endothel zur Ausbildung einer Gefäßdysfunktion und nachfolgender Hypertonie bei [73]. Für die Beteiligung von Immunzellen an der Entstehung arteriellen Bluthochdrucks gibt es zahlreiche Hinweise. So wurden in Patienten mit essentieller Hypertonie eine erhöhte Anzahl aktivierter Monozyten im Blut gefunden [82]. Bei der Verwendung verschiedener Maus-Modelle zur Untersuchung von Hypertonie zeigte sich, dass verschiedene Populationen des Immunsystems einen wichtigen Beitrag zur Entstehung von Bluthochdruck und der Gefäßinflammation leisten. Es konnte nachgewiesen werden, dass Monozyten essentiell an der

Entstehung einer ATII-induzierten Hypertonie beteiligt sind. Durch Depletion dieser Population im Rahmen eines konditionalen Knockout-Modells (LysM^{DTR} Mäuse) war es nicht mehr möglich, eine durch ATII-induzierte Hypertonie und vaskuläre Dysfunktion hervorzurufen. Eine entscheidende Rolle spielen dabei endogene NADPH-Oxidasen, da ein adoptiver Transfer von Monozyten aus Nox2-defizienten Tieren (Untereinheit der NADPH-Oxidase) im Gegensatz zum Transfer von Zellen aus Wildtyp-Tieren nicht zu einer Wiederherstellung der vaskulären Entzündung führte [72].

Verschiedene Immunzell-Subpopulationen produzieren Zytokine, welche ihrerseits die Entzündung der Gefäßwand verstärken. So führt die Administration von ATII vermutlich unter dem Einfluss des von aktivierten Monozyten gebildeten IL-12 zu einer verstärkten Bildung von IFN- γ durch NK-Zellen in der Arterienwand [83].

1.9 Die Rolle von T-Zellen in der Entstehung von Bluthochdruck

T-Zellen exprimieren AT1-Rezeptoren und eine funktionelle NADPH-Oxidase [84]. Darüber hinaus scheinen sie nach Aktivierung ebenfalls Angiotensin II zu bilden [85]. Einige grundlegende Beobachtungen zeigen ihre Beteiligung an der Entstehung von Bluthochdruck. Beispielsweise führt eine operative Entfernung des Thymus bei Ratten zu einer verringerten experimentellen Blutdrucksteigerung [86]. Immundefiziente Mäuse ohne funktionierende T- und B-Zellen zeigen eine verbesserte Gefäßfunktion im Vergleich zu Wildtyp-Tieren [87,88]. Analog verhindern immunsuppressive Therapien ATII-induzierte Nierenschäden und die Ausbildung hoher arterieller Blutdruckwerte [86,89,90]. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Bildung der auch von T-Zellen gebildeten Zytokine IFN- γ und Interleukin 17 in der Arterienwand hypertensiver Tiere erhöht ist [91–93].

Unklar ist bislang die Art der Aktivierung der T-Zellen in der Arterienwand. T-Zellen verfügen zwar über AT1-Rezeptoren, können über diese allein jedoch nicht aktiviert werden. Allerdings scheint eine Stimulation bereits aktivierter T-Zellen durch Angiotensin II die Proliferation der Zellen zu steigern [94]. Vielfach wurde daher vermutet, dass T-Zellen in der Gefäßwand durch spezifische „vaskuläre Antigene“ aktiviert werden. Tatsächlich konnte in Arteriosklerosemodellen die Existenz von T-Zellen nachgewiesen werden, die gegen das im Verlauf der Entzündung entstehende oxidierte LDL (engl. low density lipoprotein) reagieren [95,96]. Im Gegensatz zur Arteriosklerose fehlen beim Bluthochdruck bislang Belege für die Stimulation von T-Zellen durch arterielle Antigene. Alternativ zu einer Antigen-vermittelten Stimulation der Gefäßwände ist eine Rekrutierung autoreaktiver T-Zellen bei einer bereits bestehenden Gefäßentzündung oder Entzündung der Nieren denkbar [97].

1.10 Venöse Durchblutungsstörungen und Thrombose

Neben den Erkrankungen des arteriellen Gefäßsystems treten ebenfalls häufig Störungen der Venenfunktion auf. So bildet die venöse Thromboembolie (VTE) die dritthäufigste Todesursache unter den kardiovaskulären Erkrankungen [98]. Rudolf Virchow hat die Ursachen der Thrombusbildung als sogenanntes Virchow-Trias bereits 1855 beschrieben. Hierin führt er Veränderungen der Gefäßwand (Endothelschaden), der Zusammensetzung des Blutes (Hyperkoagulabilität) und der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes (Stase) als Auslöser der Thrombusbildung an [99]. Verletzungen der Gefäßintima, wie etwa durch Unfälle, können durch Freisetzung der subendothelialen Matrix eine Thrombusbildung auslösen. Allerdings kann bei der Mehrzahl der venösen Thrombosen eine direkte Gefäßwandschädigung ausgeschlossen werden. Vermutlich geht der Thrombusbildung eine Aktivierung des Gefäßendothels wie beispielsweise durch eine Gefäßverengung voraus [100].

Veränderung in der Blutgerinnung, insbesondere in der Antikoagulation (zum Beispiel bei genetischem oder erworbenem Mangel an Antithrombin III und Protein C) führen zu einer stärkeren Aktivität der Koagulationsfaktoren [101]. Diese sammeln sich besonders an Stellen mit reduziertem Blutfluss. Gesteigerte Koaguabilität, aber auch die Freisetzung von Gewebefaktor durch geschädigte Gewebe oder Tumore, erhöhen das Risiko einer venösen Thrombose [102].

Eine Verlangsamung des Blutflusses durch Bettlägerigkeit oder mangelnde Bewegung (z.B. Langstreckenflüge) erhöht die Wahrscheinlichkeit für eine Thrombusbildung. Als Ursache wird hier Hypoxie angenommen, die zu einer Endothelaktivierung führt [103]. Die Aktivierung der Endothelzellen der Gefäßwand löst die verstärkte Bildung von von-Willebrand-Faktor (vWF) und eine erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls P-Selektin aus, welche wiederum eine verstärkte Aktivierung von Leukozyten und Plättchen auslösen [104]. Sowohl die Endothelzellen als auch angelagerte Leukozyten produzieren im Folgenden Gewebefaktor (engl. tissue factor), welcher zusammen mit vWF die Gerinnungskaskade und Ablagerung von Fibrin einleitet [102]. Es entsteht ein Thrombus, z.B. in den tiefen Beinvenen (engl. deep vein thrombosis, DVT).

Die mögliche Ablösung und Abschwemmung der gebildeten Thromben kann schwerwiegende Folgen haben und kommt in 50-60% aller DVT-Patienten vor. Gelangen Thromben über das Herz in die Arterien der Lunge können diese durch Verstopfung eine pulmonale Embolie auslösen. Hierbei kommt es durch den Blutstau im Gefäß zu einer Druckerhöhung im Lungenkreislauf, wodurch die Sauerstoffversorgung eingeschränkt und der rechte Teil des Herzens stark belastet wird [105–107]. Ebenso schwerwiegend kann als zweite Komplikation einer Embolie ein Schlaganfall auftreten. 80% aller Hirninfarkte sind auf zerebrale Ischämien, d.h. auf

arterielle oder venöse Gefäßverschlüsse zurückzuführen. Ohne schnelle Antikoagulations-Therapien können Embolien tödlich verlaufen [108–110].

1.11 Mausmodelle der venösen Thrombose

Modelle der venösen Thrombose in der Maus basieren überwiegend auf kompletter venöser Stase oder Gefäßwandschädigung [111,112]. Im Gegensatz dazu wird im Modell der Vena Cava Ligatur durch eine stenosierende Ligatur der venöse Blutfluss stetig verlangsamt ohne offenkundige Endothelschäden zu erzeugen. Dieses Modell entspricht damit den physiologischen Zuständen einer Thrombose vermutlich besser. Im Rahmen des Modells wird die Vena Cava kaudal der Nierenabgänge unter Verwendung eines Platzhalters mit Hilfe eines chirurgischen Fadens verengt. Die Ligation führt zu einer Reduktion des Blutflusses und Bildung eines Thrombus kaudal der Ligation. Abbildung 1.3 zeigt schematisch das operative Vorgehen und die Ausbildung eines Thrombus in der ligierten Vena Cava.

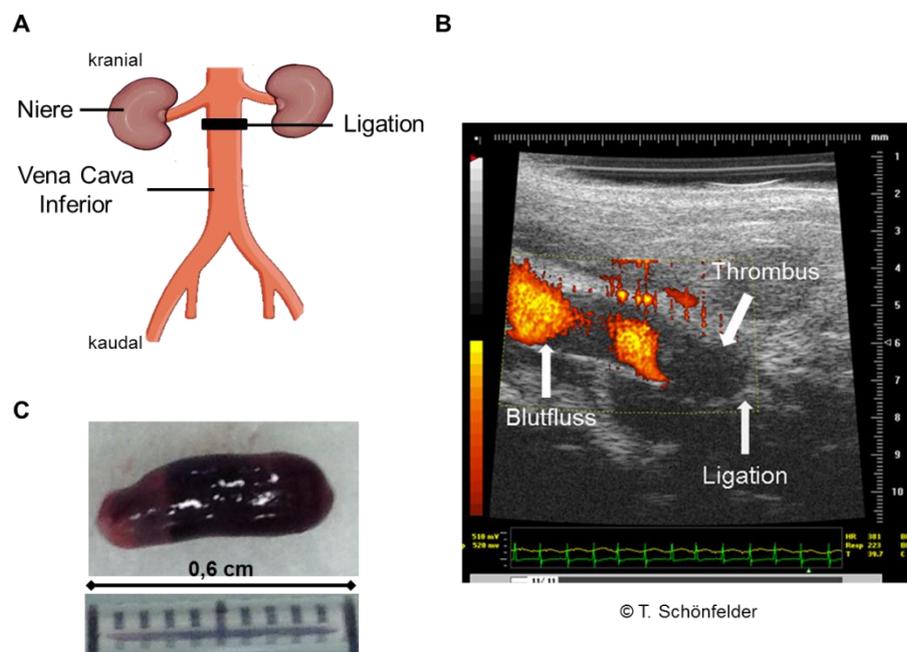


Abbildung 1.3: Modell der Vena Cava Inferior Ligation

A: Schematische Darstellung der Ligation der Vena Cava Inferior. Die Vena Cava wurde knapp unterhalb der Nierenabgänge mit Hilfe eines Fadens verengt, so dass es zu einem Blutstau kam. Für die weiteren Untersuchungen wurde die Vena Cava nach 24 oder 48 Stunden im Bereich zwischen der Ligation und der Aufspaltung im kaudalen Bereich herausgetrennt und die enthaltenen Zellen der Venenwand isoliert. B: Darstellung des Blutflusses und der Ausbildung eines Thrombus in der ligierten Vena Cava mittels Doppler-Sonographie (© T. Schönfelder). C: Isolierter venöser Thrombus. Man erkennt den helleren fibrinreichen Anteil und den dunkleren erythrozytenreichen Bereich.

1.12 Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der Entstehung venöser Thrombosen

Welche Rolle Immunzellen bei der Entstehung der venösen Thrombose spielen, ist vermutlich nicht vollständig bekannt. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass die initiale Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und eine sekundäre Aktivierung von Monozyten die venöse Thrombose auslösen. So kann bei Depletion von neutrophilen Granulozyten und Monozyten keine Thrombose mehr ausgelöst werden. Ursächlich scheint die Aktivierung der Koagulationskaskade insbesondere durch Gewebefaktor, welcher unter anderen von myeloiden Zellen gebildet wird. Weiterhin ist die Rekrutierung von Immunzellen über das Zelladhäsionsmolekül P-Selektin maßgeblich an der Thrombusbildung und der damit einhergehenden Gefäßentzündung beteiligt. Daher wird auch durch selektive Inhibition der Immunzell-Rekrutierung eine Thrombusbildung verhindert. Neben aktivierten Plättchen scheinen die durch aktivierte neutrophile Granulozyten ausgeschütteten Nucleosomen unmittelbar an der Blutkoagulation beteiligt zu sein [113–115].

1.13 Die Rolle von T-Zellen in der Entstehung venöser Thrombosen

Art und Ausmaß einer möglichen Beteiligung von T-Zellen an der venösen Thrombose ist nicht bekannt. Allerdings besteht durch Mechanismen der wechselseitigen Aktivierung zwischen der Blutgerinnungskaskade und Entzündungen ein genereller Zusammenhang zwischen inflammatorischen Reaktionen und Thromboseneigung [113,116].

Die Beteiligung von T-Zellen an der durch Angiotensin II induzierten mikrovaskulären Thrombose [117], die verstärkte Neigung zu thrombotischen Ereignissen bei Patienten mit chronisch lymphozytärer Leukämie [118] sowie die Steigerung des Thromboserisikos durch Immunmodulatoren wie Lenalidomid [119] weisen auf einen möglichen Zusammenhang hin.

1.14 Ziel der Dissertation

Zahlreiche Beobachtungen weisen darauf hin, dass T-Zellen eine wichtige Rolle im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen spielen könnten. Allerdings sind sowohl die Mechanismen ihrer Rekrutierung in Gefäßwände als auch die Mechanismen ihrer möglichen lokalen Aktivierung und ihr Beitrag zur Gefäßentzündung weitgehend unbekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher die Beteiligung von T-Zellen an der Entstehung von Gefäßentzündungen im Modell der Angiotensin II-induzierten Hypertonie und im Modell der venösen Thrombose genauer untersucht werden.

2 Material

2.1 Laborgeräte und technisches Zubehör

Tabelle 2.1: verwendete Laborgeräte und technisches Zubehör

Gerät	Bezeichnung und Hersteller
Durchflusszytometer	FACSCalibur, FACScan, BD™ LSR II, BD FACSCanto II (alle: Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)
DNA-Sequenzierer	MiSeq Benchtop Sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA)
Fluorometer	Qubit® 2.0 Fluorometer (Life technologies, Carlsbad, CA, USA)
Mikroskope	Labormikroskop Nikon Eclipse TS100 und E100 (beide: Nikon, Chiyoda, Tokio, Japan) MSZ5000-IL-TL Stereomikroskop mit Zoom (Krüss Optronik GmbH, Hamburg, Deutschland) Leica M50 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)
Organbad-Anlage	Radnoti 16 Chamber Tissue-Organ Bath System (ADInstruments, Dunedin, New Zealand)
Real-Time PCR Cycler	CFX96™ Real-Time PCR Detection System mit C1000™ Thermal Cycler (Biorad, Hercules, CA, USA)
RNA-Analysegerät	2100 Bioanalyzer (Agilent Technolgies, Santa Clara, CA, USA)
Tissue Lyser	TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Deutschland)
UV-Vis Spektrophotometer	NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
Zentrifugen	Multifuge 3L-R, Heraeus Biofuge Prima R (alle: Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

2.2 Chirurgische Instrumente

Tabelle 2.2: verwendete chirurgische Instrumente

Instrument	Bezeichnung und Hersteller
Pinzetten	Dumont #5 INOX, 11cm, Student Dumont #7 Inox (beide: Fine Science Tools, San Mateo, CA, USA) 0,2 mm medicon® Mikro-Pinzetten (gerade/gebogen) (Medicon, Tuttlingen, Deutschland)
Scheren	Vannas Spring Scissors – 3 mm Spring Scissors – stark gebogen, 10 mm Schere gerade – spitz/spitz Surgical Scissors, gerade, spitz/stumpf, 14cm (alle: Fine Science Tools, San Mateo, CA, USA)

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3: verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Bezeichnung und Hersteller
FACS-Röhrchen	5 ml Rundboden Zentrifugenröhrchen, (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)
Kanülen	Braun Sterican ^R 0,6 mm x 30 mm, 0,45 mm x 13 mm Braun Microlance TM 0,9 mm x 40 mm (alle: B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
Kryoröhrchen	Nunc TM CryoTube TM Vials, 1,8ml (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
Laborröhrchen	15 ml und 50 ml Falcon-Röhrchen (alle: Greiner, Nürtingen, Deutschland)
Miniosmotische Pumpen	Micro-osmotic pump, Modell: 1007D (ALZET osmotic pumps, Cupertino, CA, USA)
Nahtmaterial	Ethicon® Prolene 7-0 und 6-0 (Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, USA)
PCR-Platten und Zubehör	Low Profile 96-well unskirted PCR Plate, natural, Microseal "B" Adhesive Seals (Biorad, Hercules, CA, USA)
Petrischalen	Petrischalen, 94x16mm (Greiner, Nürtingen, Deutschland)
Rasierklingen	Rasierklingen, 37mm/0,12mm (Plano, Wetzlar, Deutschland)
Reagiergefäße	0,5 ml und 1,5 ml Safe Seal Reagiergefäße (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) 0,5 ml Qubit Assay tubes (Life technologies, Carlsbad, CA, USA)
Skalpell	Feather Disposable Scalpel (Feather Safety Razor Co., LTD., Osaka, Japan)
Spritzen	Omnican 0,01-1ml Spritze, 1 ml Spritze Injekt [®] -F (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) 5 ml und 10 ml Spritze BD Discardit TM (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)
Trennsäulen	MACS Separation Columns (Milteny Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland)
Wundklammern	Wundklammern nach Michel, 7,5 x 1,75 mm (Stoss-Medica Medizintechnik GmbH, Friedrichsthal, Deutschland)
Zellkulturflaschen	Zellkulturflasche 75cm ² (TPP AG, Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturplatten	6-Well, 24-Well, 96-Well Flachboden, 96-Well Rundb. (alle: Costar, Cambridge, MA, USA)
Zellsiebe	40 µm und 70 µm Nylon Zellsieb BD Falcon (alle: Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)

2.4 Chemikalien, Reagenzien und gebrauchsfertige Lösungen

Tabelle 2.4: verwendete Chemikalien, Reagenzien und gebrauchsfertige Lösungen

Reagenzien	Hersteller
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Angiotensin II	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Atipamezol-Hydrochlorid	Pfizer, New York, NY, USA
BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/ Permeabilization Solution Kit with BD GolgiStop™	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
BD FACS™ Lysing Solution	Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Braunol	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Brefeldin A	eBioscience, San Diego, CA, USA
Buprenorphin Hydrochloridlösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Collagenase Typ II	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
D-Glucose 5%	B. Braun. Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybri-Max®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Diphtheriatoxin	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNase I	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Ethanol, absolut	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Fentanyl-Dihydrogencitrat	Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, USA
Fixable Viability Dye eFluor 506	eBioscience, San Diego, CA, USA
Flumazenil	B. Braun. Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Glutamin (GlutaMax™ Supplement)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Guanidiniumisothiocyanat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Hank's BSS(1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
HumanAlbumin 20%, salzarm	CSC Behring GmbH, Marburg, Deutschland

Indometacin 99%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ionomycin	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
Isofluran	Abbott, Green Oaks, IL, USA
Isopropanol, 70% rein	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isotonische Kochsalzlösung 0,9%	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat (K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Medetomidin-Hydrochlorid	Pfizer, New York, NY, USA
Midazolam-Hydrochlorid	Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln, Deutschland
N-2-Hydroxyethylpiperazin -N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Naloxon-Hydrochlorid	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Citrat Dihydrat pH 7,0	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
N-Laurylsarkosin Natriumsalz	Merck, Darmstadt, Deutschland
normales Immunglobulin vom Menschen (IVIg)	CSL Behring, Marburg, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin (Pen/Strep)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Phenylephrin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Physiologische Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Prostaglandin F2 α	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Roti®-Aqua-Phenol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Chloroform-Isoamylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Transcription Factor Buffer Set	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
β -Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.5 Kits und Reagenzien zur DNA- und RNA-Analyse

Tabelle 2.5: verwendete Kits und Reagenzien zur DNA- und RNA-Analyse

Kit	Hersteller
Agencourt AMPure XP Kit	Beckman Coulter, Brea, CA USA
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Sta. Clara, CA, USA
MiSeq® Reagent Kit v2 (50 Zyklen)	Illumina, San Diego, CA, USA
QuantiTect Probe RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qubit® RNA BR Assay Kit	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
SuperScript II Reverse Transcriptase	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

2.6 Antikörper

Tabelle 2.6: verwendete Antikörper

spezifischer Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller
anti-Maus CD115 APC	AFS98	Ratte IgG2a, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus CD11b PE	M1/70	Ratte IgG2b, κ	Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA
anti-Maus CD154 PE	MR1	armenischer Hamster IgG	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus CD18 APC	C71/16	Ratte IgG2a, κ	Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA
anti-Maus CD25 AlexaFluor 488	eBio7D4	Ratte IgM,κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus CD28 unkonjugiert	37.51	syrischer Hamster IgG	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus CD3e unkonjugiert	145-2C11	armenischer Hamster IgG	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus CD4 Biotin	H129.19	Ratte IgG2a, κ	eigene Herstellung (AG Schmitt)
anti-Maus CD4 eFluor 450	GK1.5	Ratte IgG2b, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus CD4 FITC	GK1.5	Ratte IgG2b, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus CD45 APC-eFluor 780	30-F11	Ratte IgG2b, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus CD62L APC	MEL-14	Ratte IgG2a, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus CD69 PE-Cy7	H1.2F3	armenischer Hamster IgG	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus CD8a APC	53-6.7	Ratte IgG2a, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus F4/80 PE	BM8	Ratte IgG2a, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus Gr-1 FITC	RB6-8C5	Ratte IgG2b, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus Gr-1 unkonjugiert	RB6-8C5	Ratte IgG2b	eigene Herstellung (AG Radzak)

anti-Maus IFN- γ PE/ FITC	XMG1.2	Ratte IgG1, κ	Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA/ eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus TCR β PE-Cy5	H57-597	armenischer Hamster IgG2, λ 1	Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA/ eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus/ human CD44 PE	IM7	Ratte IgG2b, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus/ human T-bet PE	eBio 4B10	Maus IgG1, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus/ Ratte CD29 FITC	eBio HMb1-1	armenischer Hamster IgG	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus/ Ratte CD49e PE	eBio HMa5-1	armenischer Hamster IgG	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus/ Ratte FoxP3 PE	FJK-16s	Ratte IgG2a, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA

2.7 Primer

Tabelle 2.7: verwendete Primer/Probe-Sets für die real-time PCR (FAM-gekoppelt)

Zielgen	Spezies	Nummer	Hersteller
IL-6	Maus	Mm00446190_m1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
IL-33	Maus	Mm00505403_m1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
IL-1 β	Maus	Mm00434228_m1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
IL-18	Maus	Mm00434225_m1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
IL-27	Maus	Mm00461162_m1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
IL-12p40	Maus	Mm00434174_m1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
CCL8	Maus	Mm0129783_m1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
CCL3	Maus	Mm00441259_m1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
CXCL12	Maus	Mm00445553_m1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
CCL5	Maus	Mm01302427_m1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
TATA-Box binding protein	Maus	Mm01229177_m1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

2.8 Puffer

Tabelle 2.8: Zusammensetzung der Puffer

Puffer	Zusammensetzung
10x PBS	Ansatz für 1 Liter, 10x Stammlösung 80,4 g NaCl, 15,6 g NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O, pH 6,6
ACK-Puffer	0,15 M NH ₄ Cl, 1 mM KHCO ₃ , 0,5 mM EDTA, pH 7,2
EDTA-Puffer	Ansatz für 1 Liter 186,1 g EDTAx2H ₂ O, destilliertes Wasser, pH 8,0
FACS-Puffer	1xPBS, 0,5% HumanAlbumin, 1mM EDTA, 10 μ g/ml IVIg
GIT-Puffer	4 M Guanidiniumisothiocyanat, 25 mM Natrium-Citrat pH 7,0, 0,5% N-Laurylsarkosin
Krebs-Henseleit-Puffer	118,3 mM NaCl, 4,69 mM KCl, 1,87 mM CaCl ₂ , 1,2 mM MgSO ₄ , 1,03 mM K ₂ HPO ₄ , 11,1 mM D-Glucose, 25 mM NaHCO ₃ , 10 μ M Indometacin, pH 7,35

Krebs-Hepes-Puffer	99,01 mM NaCl, 4,69 mM KCl, 2,5 mM CaCl ₂ , 1,2 mM MgSO ₄ , 25 mM NaHCO ₃ , 1,03 mM K ₂ HPO ₄ , 20 mM HEPES, 11,1 mM D-Glucose, pH 7,35
MACS-Puffer	1x PBS, 5mM EDTA, 0,5% BSA

2.9 Medien für die Zellkultur

Tabelle 2.9: verwendete Medien für die Zellkultur

Medium	Hersteller
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
MEM	MEM with earle's salts (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
RPMI mit Glutamin	RPMI 1640 + L-Glutamin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
RPMI ohne Glutamin	RPMI -640 w/o Glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

2.10 Zytokine und Chemokine

Tabelle 2.10: verwendete Zytokine und Chemokine

Zytokine	verwendete Endkonzentration	Hersteller
rekombinantes humanes CCL2	20 ng/ml	R&D, Minneapolis, MN, USA
rekombinantes humanes CCL3	20 ng/ml	R&D, Minneapolis, MN, USA
rekombinantes humanes CCL8	20 ng/ml	R&D, Minneapolis, MN, USA
rekombinantes humanes IL-8	20 ng/ml	R&D, Minneapolis, MN, USA
rekombinantes murines IFN- β	500 U/ml	R&D, Minneapolis, MN, USA
rekombinantes murines IL-1 β	20 ng/ml	R&D, Minneapolis, MN, USA
rekombinantes murines IL-12	20 ng/ml	R&D, Minneapolis, MN, USA
rekombinantes murines IL-18	20 ng/ml	R&D, Minneapolis, MN, USA
rekombinantes murines IL-1 β	20 ng/ml	R&D, Minneapolis, MN, USA
rekombinantes murines IL-23	20 ng/ml	R&D, Minneapolis, MN, USA
rekombinantes murines IL-27	20 ng/ml	R&D, Minneapolis, MN, USA
rekombinantes murines IL-6	20 ng/ml	R&D, Minneapolis, MN, USA
rekombinantes murines TNF- α	20 ng/ml	R&D, Minneapolis, MN, USA

2.11 Microbeads für die Anreicherung von Zellen

Tabelle 2.11: Microbeads für die Anreicherung von Zellen

Antikörper	Hersteller
anti-Streptavidin	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
anti-Maus CD8a	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.12 Versuchstiere

Tabelle 2.12: verwendete Mausstämme

Stamm	Zucht	Bezug	offizielle Stammbezeichnung	Eigenschaften
C57BL/6	ZVTE, eigene Zucht	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA	C57BL/6J	-Wildtyp
IFN-γ^{-/-}	AG Wenzel	mit freundlicher Genehmigung der AG Steinbrink	B6.129S7- <i>Irfng</i> ^{tm1Ts/J}	-C57BL/6 Hintergrund -keine IFN- γ Produktion in allen Zelltypen -gestörte Makrophagenfunktion bei Infektionen
LysM^{Cre} (LysM)	AG Wenzel	mit freundlicher Genehmigung der AG Waismann	B6.129P2- <i>Lyz</i> ^{2rm1(cre)lfo/J}	-C57BL/6 Hintergrund -Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Lysozym M 2 Promotors -Verwendung für konditionales "Gene Targeting"
LysM^{iDTR}	AG Wenzel	mit freundlicher Genehmigung der AG Waismann	C57BL/6-Gt(ROSA)26 Sor ^{tm1(HBEGF)} Awai	-C57BL/6 Hintergrund -Kreuzung aus LysM ^{Cre} mit ROSA26 ^{iDTR} Mäusen -Diphtheriatoxin sensitive Lysozym M positive Zellen
Nur77	eigene Zucht, AG Steinbrink	mit freundlicher Genehmigung der AG Steinbrink	Nur77-EGFP-Cre(Tg(Nr4a1-EGFP/cre)820Khog)	-C57BL/6 Hintergrund -hohe GFP-Expression myeloider Zellen in der Milz -niedrige Basal-GFP-Level in Lymphozyten -GFP-Expression bei Aktivierung korreliert mit der Stärke der T-Zellrezeptor-spezifischen Stimulation
Tbx21^{-/-}	AG Wenzel	mit freundlicher Genehmigung von Laurie Glimcher, Boston, MA, USA	B6.129S6- <i>Tbx21</i> ^{tm1Glm/J}	-C57BL/6 Hintergrund -stark verringerte IFN- γ Produktion in CD4 ⁺ T-Zellen und NK-Zellen -kein Einfluss auf IFN- γ Produktion in CD8 ⁺ T-Zellen

2.13 Spezielle Software

Tabelle 2.13: verwendete spezielle Software

Software	Hersteller
BD FACSDiva Software	Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA
FlowJo Version 7	Tree Star, Inc, Ashland, OR, USA
GraphPad Prism 6	Graphpad Software, Inc., La Jolla, Ca, USA
Summit Software V4.0	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark

3 Methoden

3.1 Behandlung der Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden in den keimarmen Räumen der zentralen Tierhaltung der Universitätsmedizin Mainz (ZVTE) gehalten.

Sämtliche tierexperimentellen Versuche wurden im Rahmen eines genehmigten Tierversuchsantrages (Tierversuchsnummer: G12-1-087) durchgeführt.

3.1.1 Verwendete Mausstämme

C57BL/6J: Als Kontrolltiere wurden Wildtyp-Tiere des Stammes C57BL/6J genutzt, die einen normalen Phänotyp aufweisen.

Tbx21^{-/-}: Beim Tbx21 (T-bet) Knockout-Stamm ist das „T-box expressed in T cells“ Gen inaktiviert. Der genetische Hintergrund ist C57BL/6. Diese Mäuse besitzen in Bezug auf ihre IFN- γ Produktion funktionsgestörte CD4⁺ T- und NK-Zellen, wodurch ihre Proliferation und proinflammatorische Wirkung reduziert wird. Durch den Knockout des Transkriptionsfaktors T-bet können CD4-positive T-Zellen nicht mehr in Th1-Zellen differenzieren und die Synthese des Zytokins IFN- γ ist stark verringert [31].

IFN- γ ^{-/-}: Durch Ausschalten des entsprechenden Gens wird die IFN- γ Produktion in allen Zelltypen der IFN- γ ^{-/-} Maus verhindert. Auch hier sind die Funktionen von T-Zellen, NK-Zellen und myeloiden Zellen beeinträchtigt [120].

LysM^{Cre}: Mäuse dieses Knock-in Stammes exprimieren das Cre-Rekombinasegen unter Kontrolle vom Promotor des Lysozym M Locus des murinen Chromosom 10. Dadurch wird eine Makrophagen-spezifische Cre-Expression erreicht. Der genetische Hintergrund ist C57BL/6 [121].

LysM^{iDTR}: Zunächst erfolgte ein Knock-in des Rezeptors für Diphtheriatoxin (DTR) in die Rosa26 Genpromotor-Region des murinen Chromosoms 6. Die Rosa26 Genfunktion wird dabei zerstört. Die DTR-Expression erfolgt in allen Geweben, da der Promotor des Rosa26 Gens ubiquitär vorliegt. Zwischen Promotor und DTR-Leserahmen wurde zusätzlich ein von loxP Erkennungsstellen flankiertes Stopp-Signal eingebracht. Durch Kreuzung von LysM^{Cre} mit ROSA26^{iDTR} Mäusen wurde durch Ausnutzung des Cre/loxP-Systems das Stopp-Signal auf LysM-positiven Zellen spezifisch deletiert, so dass in den generierten LysM^{iDTR} Tieren der DTR ausschließlich auf Lysozym M-positiven Zellen (Monozyten, Granulozyten) exprimiert wird. Dies ermöglicht die Depletion Lysozym M-positiver Zellen durch Gabe von DTX, während

alle anderen Zelltypen nicht-sensitiv reagieren. Der genetische Hintergrund ist C57BL/6 [121–123].

Nur77: Diese Mäuse wurden durch den Einbau einer eGFP-hCre cDNA-Sequenz in den Nr4a1 (Nur77) Locus eines bakteriellen, künstlichen Chromosoms (BAC) generiert [124]. Dieses Chromosom wurde zuvor durch Mikroinjektion von BAC-DNA in den Pronukleus befruchteter, muriner C57BL/6 Eizellen eingebracht [125]. Der Locus kodiert für einen nuklären Rezeptor, der vermutlich unter anderem eine Rolle bei der klonalen Deletion im Thymus spielt [126]. Es ist bekannt, dass das Nur77-Gen in T-Zellen und Thymozyten nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors sofort hochreguliert wird [127]. Somit exprimieren T-Zellen dieser Mäuse GFP nach Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor und können durchflusszytometrisch identifiziert werden.

Alle Tiere wurden mit autoklaviertem Wasser und Trockenpellets nach den Richtlinien der Tierversuchsvorschrift versorgt. Für die Versuche wurden adulte Tiere im Alter von 6-12 Wochen verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass alle verwendeten Tiere einer Versuchsreihe ein ähnliches Alter aufwiesen. Experimente, bei denen eine Behandlung mit Angiotensin II erfolgte, wurden ausschließlich an männlichen Tieren durchgeführt, da weibliche Hormone die ATII-induzierte Hypertension protektiv beeinflussen können [128]. Sämtliche Tiere wurden von der ZVTE der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bezogen oder von Kooperationspartnern freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.1.2 *In vivo* Depletion von CD4⁺ T-Zellen

Adulten Mäusen des Stammes C57BL/6 wurden jeweils 135 µg des CD4-depletierenden Antikörpers GK1.5 in Form des Hybridomüberstandes intraperitoneal in den unteren Teil des Abdomens und subkutan unter Verwendung von Sterican-Kanülen (0,6 mm x 30 mm) bzw. Microlance-3 Kanülen (0,3 mm x 30 mm) appliziert. Zur Aufrechterhaltung der Depletion wurde die Antikörpergabe an Tag 1,2,3 und 8 (nur intraperitoneal, 50% der Dosis) wiederholt. Der Erfolg der CD4⁺ T-Zell-Depletion wurde durchflusszytometrisch im Blut und in der Milz überprüft (siehe 3.5.5).

3.1.3 *In vivo* Depletion von Granulozyten

Adulten C57BL/6 Mäusen wurden 150 µg/ Tier anti-Gr-1 Antikörper (Klon: RB6-8C5, freundlicherweise von der AG Radzak zur Verfügung gestellt) intraperitoneal appliziert. Die Depletion wurde durchflusszytometrisch im Blut kontrolliert.

3.1.4 Depletion von Zellen der myelomonozytären Entwicklungsreihe mittels Diphtheriatoxin in LysM^{IDTR} Mäusen

LysM wird sowohl auf Monozyten als auch auf neutrophilen Granulozyten exprimiert. Zunächst wurden deshalb durch die folgende Vorgehensweise beide Zellpopulationen depletiert. In unserem Versuchsaufbau führt dies jedoch auf Grund der unterschiedlichen Geschwindigkeit der Neubildung zu einer effektiven Depletion der Monozyten, während die Population der kurzlebigen Neutrophilen wegen der schnellen Neubildung weitestgehend unbeeinträchtigt bleibt. Zur Depletion myelomonozytärer Zellen wurde LysM^{IDTR} Mäusen und LysM Kontrolltieren für insgesamt 10 Tage Diphtheriatoxin (DTX, in PBS gelöst) täglich intraperitoneal appliziert (Tag 1-3: 25 ng/g, Tag 4-10: 5 ng/g).

3.1.5 Aktivierung muriner T-Zellen *in vivo*

Durch intravenöse Injektion von 30 µg/ Maus anti-CD3 (Klon: 145-2C11) mit Hilfe einer Omnican 0,01-1ml Spritze wurden die T-Zellen von Nur77 Tieren *in vivo* aktiviert. Nach 24 Stunden wurden die Tiere abgetötet und die GFP-Expression der Milzzellen durchflusszytometrisch analysiert.

3.2 Operative Methoden und *ex vivo* Analysen

3.2.1 Subkutane Implantation miniosmotischer ATII-beladener Pumpen

C57BL/6 Mäuse wurden mit 300 µl (i.p.) eines Gemisches aus Medetomidin (0,5 mg/kg), Midazolam (5 mg/kg) und Fentanyl (0,05 mg/kg) narkotisiert. Das Eintreten des chirurgischen Toleranzstadiums (Stadium III) wurde durch das Fehlen des Zwischenzehreflexes überprüft. Es folgten Rasur und Desinfektion des Rückens mit Braunol. Anschließend wurde ein kleiner Einschnitt am Rücken der Tiere gesetzt, mit einer stumpfen Schere eine Tasche geformt und die miniosmotische Pumpe eingesetzt. Diese enthielt die berechnete Menge an Angiotensin II, so dass eine tägliche Abgabe von 1 mg/ kg Körpergewicht für sieben Tage gewährleistet wurde. Die Wundränder wurden mit Wundklammern nach Michel verschlossen und nochmals desinfiziert. Durch subkutane Gabe von 250 µl des Antagonisten-Gemisches (Atipamezol (2,5 mg/kg), Flumazenil (0,5 mg/kg), Naloxon (1,2 mg/kg)) wurden die Tiere aus der Narkose aufgeweckt. Teilweise wurde die Operation ohne Implantation von Pumpen als weitere Kontrolle durchgeführt.

3.2.2 Ligation der Vena Cava Inferior

Die Vena Cava Inferior ist die untere Hohlvene, welche entlang der Wirbelsäule verlaufend im rechten Vorhof des Herzens mündet. Durch Einengung des Lumens

kaudal der Nierenabgänge auf ca. 20% wurde eine Stauung des Blutes und damit eine Thrombenbildung initiiert. Vor Beginn der Operation wurden die Versuchstiere mit Hilfe der Dreifach-Narkose (siehe 3.2.1) in das chirurgische Toleranzstadium gebracht. Es folgte eine Enthaarung am Bauch und die Fixierung auf einer Wärmeplatte unter einem Mikroskop. Mit Hilfe einer feinen gebogenen anatomischen Pinzette und einer feinen Präparierschere wurde ein möglichst kleiner medianer Hautschnitt gesetzt und die Bauchhöhle entlang der senkrecht verlaufenden Bindegewebsnaht vorsichtig eröffnet. Nach Vorlagerung des Darmkonvoluts, welches mittels NaCl-Lösung (0,9%) feucht gehalten wurde, erfolgte die vorsichtige Präparation der Vena Cava Inferior mit spitzen Mikro-Pinzetten unterhalb der Abgänge der Nierenvenen. Mit Ethicon® Prolene 7-0 Nahtmaterial wurde eine doppelte Ligatur der Vena Cava durchgeführt. Ein während der Ligatur dazwischengelegter Draht fungierte hierbei als Platzhalter. Nach Ligation wurde der Draht entfernt. Nach anschließender vorsichtiger Rückverlagerung des Darmkonvolutes in die Bauchhöhle wurde die Bauchhöhle mittels überwendlicher Naht der Muskulatur und im Anschluss per Einzelknopfnahnt die Haut verschlossen. Durch Gabe des Antagonisten-Gemisches (siehe 3.2.1) wurde das Tier wieder aufgeweckt. Zur Schmerztherapie wurde direkt nach der Operation und 24 Stunden später Buprenorphin (0,075mg/kg) subkutan appliziert. Vena Cava Ligationen wurden von Dr. Christian Stanger (Hautklinik) und Tanja Schönfelder (CTH) durchgeführt.

3.2.3 Organentnahme

Zur Entnahme der Milz wurden die Mäuse mit Hilfe einer CO₂-Begasungsanlage getötet. Für die Präparation wurde das Tier auf dem Rücken fixiert. Die Haut der Bauchseite wurde von der Körpermitte ausgehend durch einen medianen Schnitt nach vorn bis zum Unterkiefer und nach hinten bis zum Becken aufgeschnitten. Die Milz wurde vorsichtig entfernt und in MEM + 2% FCS bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Zur Gewinnung von Zellen aus Blut, Aorta und Vena Cava Inferior wurden die Versuchstiere durch eine Dauerinhalation von Isofluran getötet. Nach Injektion von 100 µl Heparin-Natrium-Gemisch (1:6 in NaCl verdünnt) wurde zunächst Blut aus dem Herzen durch Punktion des rechten Ventrikels gewonnen. Um möglichst viel Blut aus den Gefäßen zu entfernen, wurden 15 ml 1x PBS in den linken Ventrikel gespritzt, welches Blut durch einen Schnitt im rechten Ventrikel herauspülte. Die Vena Cava Inferior wurde im Anschluss freigelegt und anhaftendes Gewebe sowie Lymphknoten möglichst vollständig entfernt. Die Vena Cava Inferior wurde im Bereich zwischen den Nierenabgängen bzw. der Ligation und der unteren Aufzweigung herauspräpariert und bis zur Weiterverarbeitung in Krebs-Hepes (KH)-Puffer gelagert.

Zur Präparation von Aorten wurden zunächst die inneren Organe entfernt und anschließend die Aorta inklusive des Aortenbogens und des anhaftenden Fettgewebes herauspräpariert. Anhaftendes Fettgewebe wurde zusätzlich mit Hilfe feiner Pinzetten (Dumont #5 INOX, 11cm) und Federscheren (Vannas Spring Scissors, 3mm) entfernt.

3.2.4 Messung der Gefäßfunktion (Organbad)

Prinzip:

Die Verwendung einer Organbad-Anlage erlaubte die Messung der Relaxationfähigkeit isolierter Aortenringe nach Zugabe verschiedener Stimuli. Dazu wurden die Gefäßsegmente zwischen einem fixierten Ende und einem isometrischen Kraftaufnehmer gespannt. Die vom Gefäßring registrierten Tonusänderungen wurden in digitale Signale unter Angabe von Gewichten in Gramm umgewandelt. Durch Zugabe des Neurotransmitters Acetylcholin kommt es über die Bindung an M3-Rezeptoren der Endothelzellen zur Synthese von Stickstoffmonoxid. Dies führt zur Vasodilatation [129]. Für die Messung der endothelunabhängigen Relaxation wurde der exogene NO-Donor Glyceroltrinitrat in steigenden Konzentrationen zugegeben. Durch enzymatische Freisetzung von Stickstoffmonoxid in glatten Muskelzellen kommt es zur Vasodilatation [130].

Durchführung:

Sieben Tage nach Beginn der Implantation der ATII-beladenen Pumpen wurden die Tiere durch eine Dauerinhalation von Isofluran getötet, das Blut durch Herzpunktion gewonnen und die Aorta herauspräpariert. Nach vollständigem Entfernen von anhaftendem Binde- und Fettgewebe wurden die thorakalen Bereiche der isolierten Aorten in 4 mm große Segmente geschnitten. Diese wurden auf Triangeln aufgezogen, welche dann auf der einen Seite fixiert und auf der anderen Seite mit einem isometrischen Kraftübersetzer verbunden waren (siehe Abbildung 3.1) und in die Organbadkammern eingebracht wurden. Diese Gefäße waren mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllt (37°C, pH 7,35) und mit einem Gasgemisch umspült (95% O₂, 5% CO₂). Der Puffer enthielt 10 µM Indomethacin zur Vermeidung einer endogenen Prostaglandin-Synthese. Im weiteren Verlauf wurden die isolierten Aortenringe graduell über eine Dauer von ca. einer Stunde auf eine Ruhespannung von 1 g eingestellt. Dann erfolgte zunächst ein Funktionstest durch Zugabe von 1 M Kaliumchlorid-Lösung, was zu einer maximalen Konstriktion der Aortenringe führte. Zwischen den einzelnen Versuchsabschnitten wurde stets zweimal mit Puffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurde durch Zugabe von steigenden Phenylephrin-Konzentrationen (10⁻⁸ M - 10^{-5,5} M) zunächst eine Vorkonstriktion von ca. 50-80% der maximalen KCl-Konstriktion erreicht.

Nach dem Erreichen der Plateauphase fand die Aufnahme der Konzentrations-Relaxations-Kurven von Acetylcholin (endothelabhängige Relaxation) statt. Es folgte eine erneute Vorkonstriktion mit Prostaglandin F₂α (PGF₂α, 3 nM) und anschließender Konzentrations-Relaxations-Kurve mit Nitroglycerin (endothelunabhängige Relaxation). Eine 100%ige Relaxation des Gefäßringes entsprach dem Tonusniveau vor Konstriktion durch Phenylephrin (bzw. PGF₂α) und 0% Relaxation der maximalen Phenylephrin (bzw. PGF₂α) -induzierten Konstriktion. Dementsprechend erfolgte die Berechnung der Relaxation prozentual bezogen auf die Phenylephrin (bzw. PGF₂α) - Antwort. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der mitgelieferten Hersteller-Software LabChart (Version 7) und Microsoft Excel (2010). Die Untersuchungen im Organbad wurden in Zusammenarbeit mit Sabine Kossmann, Michael Molitor und Katharina Perius (AG Wenzel, CTH) durchgeführt.

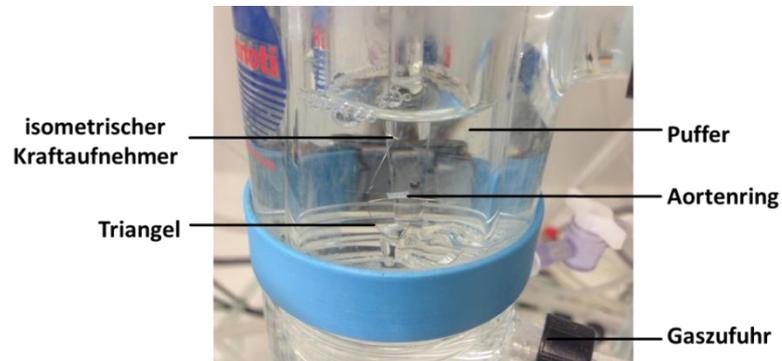


Abbildung 3.1: Isolierter Aortenring in einer Organbadkammer

Die Darstellung zeigt einen 4 mm isolierten Aortenring, aufgespannt auf zwei Draht-Triangeln, welche an der oberen Seite mit dem isometrischen Kraftaufnehmer verbunden sind.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Zellkultur

Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen HeraSafe KS Werkbank (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) unter Verwendung steriler Materialien durchgeführt. Die Kultivierung von Zellen erfolgte in einem mit 5% CO₂ begasten Hera Cell 150i Brutschrank (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bei 37°C in CO₂/ Bicarbonat-gepufferten Medien.

3.3.2 Generierung Antikörper-haltiger Überstände von Hybridomzelllinien

Zur Gewinnung monoklonaler Antikörper wurden Antikörper-produzierende Zellen der Hybridomzelllinie GK1.5 (ATCC® TIB-207™, Isotyp: Ratte IgG2b, Manassas, VA, USA) für sieben Tage in RPMI + 1% FCS bei hoher Zelldichte kultiviert. Im Abstand von 7 Tagen wurden die Antikörper-haltigen Überstände gegen das Oberflächenmolekül CD4 abgenommen, durch Zentrifugation (600 x g, 6 min., 4 °C) verbliebene Zellen und Zellreste entfernt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung weggefroren. Auf eine

zusätzliche Anreicherung der enthaltenen Antikörper wurde aufgrund der effektiven depletierenden Wirkung der Überstände (siehe Ergebnisteil Abschnitt 4.1.6 Seite 48) verzichtet. Zur Abschätzung der Konzentration der in den Überständen enthaltenen Antikörper wurden jeweils murine Milzzellen mit verschiedenen Verdünnungen des Überstandes oder mit bekannten Konzentrationen des anti-CD4 Antikörpers inkubiert und gebundene Antikörper durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sekundärantikörper gefärbt. Der anschließende durchflusszytometrische Vergleich der Fluoreszenzintensitäten (engl.: Mean Fluorescence Intensity, MFI) erlaubte die näherungsweise Bestimmung der Antikörper-Konzentration der Überstände.

3.3.3 Kryokonservierung von Hybridomzellen

Zur Kryokonservierung wurden Hybridomzellen in 900 µl Einfriermedium (FCS + 20% DMSO) in 1,5 ml Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert. Nach 24 Stunden erfolgte die dauerhafte Konservierung in flüssigem Stickstoff bei -160 °C.

3.3.4 Auftauen von Hybridomzellen

Kryokonservierte Hybridomzellen wurden nach kurzzeitigem Antauen der Einfrieröhrchen im Wasserbad bei 37 °C aus den Röhrchen in 50 ml Zentrifugationsröhrchen zusammen mit 5 ml FCS überführt. Nach Auffüllen mit 20°C warmem RPMI-Medium wurden die enthaltenen Zellen bei 330 x g und 4 °C für sechs Minuten zentrifugiert. Sedimentierte Zellen wurden anschließend in RPMI mit 5% FCS resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt.

3.3.5 Ermittlung der Lebendzellzahl

Die Anzahl lebender Zellen in Zellproben wurde durch Anfärbung einer Referenzprobe mit 4%iger Trypanblau-Lösung durch Auszählung der Anzahl lebender, Trypanblau-negativer Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim, Deutschland) ermittelt. Ausgezählt wurden jeweils ein Großquadrat mit 16 Einzelquadraten und die Anzahl vitaler Zellen anhand folgender Formel errechnet:

Zellzahl pro Großquadrat x Verdünnungsfaktor x Volumen x 10⁴ (Kammerkonstante) = Zellzahl

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Gewinnung von RNA aus Gewebe

Für die Isolation von mRNA aus dem Endothel der Vena Cava Inferior oder Aorten wurden die isolierten Gefäße in flüssigem Stickstoff für mindestens 15 min. eingefroren und anschließend mit Hilfe eines Mörsers bzw. eines Tissue Lysers zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde anschließend in 300 µl (bzw. 500 µl bei Aorten) GIT-Puffer (inklusive β-Mercaptoethanol, 1:139) aufgenommen und für 60 min. bei -20 °C wieder

eingefroren. Nach Zugabe von 30 μ l (50 μ l) Natriumacetat (2 M) und 300 μ l (500 μ l) H₂O-gesättigtem Phenol, vortexen und 15 min. Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 20 min. bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Durch Separation der oberen wässrigen Phase, Zugabe von 300 μ l (500 μ l) eisgekühltem Isopropanol und einer weiteren Inkubation für 60 min. bei -20 °C wurde die RNA gefällt. Anschließend wurde das Pellet nach erneuter Zentrifugation (20 min., 4 °C, 13000 rpm) mit 80%igem Ethanol gewaschen, 5 min. an der Luft getrocknet und schließlich in 10-20 μ l sterilem, RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde im Anschluss spektralphotometrisch bestimmt.

3.4.2 RNA-Konzentrationsbestimmungen

Die RNA-Konzentration wurde zumeist spektralphotometrisch mit Hilfe eines UV-Vis-Spektrophotometers (NanoDrop 2000) analysiert. Es genügte 1 μ l der RNA für die Messung. Für die genaue Konzentrationsbestimmung wurde die isolierte mRNA im Qbit2.0 Fluorometer analysiert. Dazu wurden 199 μ l Arbeitslösung pro Probe laut Herstellerangaben angesetzt und 1 μ l der zu bestimmenden mRNA dazu gegeben. Nach zweiminütiger Inkubation erfolgte die fluorometrische Analyse im kalibrierten Gerät unter sofortiger Anzeige der Konzentration.

3.4.3 DNA-Sequenzierung (engl. New Gene Sequencing, NGS)

Mit Hilfe der Methode der DNA-Sequenzierung können unbekannte DNA-Sequenzen entschlüsselt und somit die Expression von Genen in unterschiedlichen Ansätzen analysiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde mit dieser Methode die durch Ligation und Ausbildung von Thromben veränderte Gen-Expression in der Wand der Vena Cava Inferior untersucht.

Prinzip der Sequenzierung:

Es wurde ein HiSeq-System der Firma Illumina verwendet. Dabei wird aus Gewebe isolierte mRNA zunächst in Fragmente aufgespalten und darauf basierend kurze cDNA-Abschnitte synthetisiert. An die jeweiligen Enden der cDNA-Abschnitte der beiden zu analysierenden Proben erfolgt die Ligation spezifischer Adapter. Diese binden in der „Flow Cell“ an komplementäre Oligonukleotide, so dass die zuvor denaturierten einzelsträngigen cDNA-Fragmente immobilisiert werden. Der folgende Prozess wird „Bridge Amplification“ genannt. Dabei folgt auf die Synthese der Zweitstranges ein Denaturierungsschritt, wobei der neue Strang ebenfalls an der Oberfläche gebunden wird. Dadurch entstehen Cluster mit einer hohen Anzahl an Kopien. Die neu synthetisierten Stränge werden durch den Einbau Fluoreszenzfarbstoff-markierter Nukleotide gebildet, wobei jede Base durch einen

spezifischen Farbstoff codiert ist. Dies erlaubt im nächsten Schritt die Identifizierung der Basensequenzen mit Hilfe einer CCD Kamera.

Reinheitsbestimmung der verwendeten mRNA:

Für die Herstellung einer cDNA-Bibliothek ist eine hohe Reinheit der verwendeten RNA als Ausgangsmaterial erforderlich. Deshalb wurde zunächst die sogenannte „RNA integrity number“ (RIN-Wert) bestimmt. Dazu wurde das Agilent RNA 6000 Nano Kit verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Diese Technik basiert auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese, wobei die Proben entsprechend ihrer Fragmentgröße durch ein Molekularsieb mit Hilfe eines Polymer-Gels aufgetrennt und durch Interkalation von Farbstoffmolekülen markiert werden. Ein Fluoreszenzdetektor ermittelt die entsprechenden Laufzeiten und generiert Elektropherogramme der einzelnen Proben. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des 2100 Bioanalyzers und der 2100 Expert Software des Herstellers (Agilent Technologies, Santa Clara, Ca, USA) unter Angabe der RIN-Werte. Dabei entspricht eine Proben-Integrität von 1 einer vollständig degradierten Probe, während der Maximalwert 10 eine vollkommen intakte Probe anzeigt. Für die Generierung der Gen-Datenbank mussten die verwendeten Edukte RIN-Werte >7 besitzen.

Herstellung der cDNA-Bibliothek und Durchführung der Sequenzierung:

Die Generierung der Proben für die DNA-Sequenzierung wurde nach dem „Low Sample“ (LS) Protokoll des „TruSeq® RNA Sample Preparation v2 Guides“ von Illumina (San Diego, Ca, USA) durchgeführt. Zunächst wurden 600 ng/ Probe isolierte mRNA durch Inkubation mit poly-T-Oligo-gekoppelten magnetischen „Beads“ aufgereinigt, welche an die entsprechenden poly-A-Sequenzen der mRNA binden und somit über einen Magneten abgetrennt werden konnten. Danach erfolgte eine Fragmentierung mit Hilfe divalenter Kationen bei 94 °C. Nacheinander wurden die beiden Stränge der cDNA der RNA-Fragmente synthetisiert. Im Anschluss wurde eine Reparatur der Enden durchgeführt sowie die 3'-Enden adenyliert. Durch Ligation mit speziellen Y-Adaptoren (RNA Adapter Index tubes mit den Sequenzen GCCAAT(A) und CTTGTA(A) wurde gewährleistet, dass die cDNA-Stücke später an der Oberfläche der „Flow Cell“ gebunden werden konnten. Es folgte ein weiterer Aufreinigungsschritt mit anschließender Anreicherung per PCR zur Generierung der fertigen cDNA-Bibliothek. Nach einer erneuten Reinheitskontrolle wurde die cDNA auf 15 pM verdünnt, 600 µl in die „Flow Cell“ pipettiert und die Sequenzierung gestartet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der zugehörigen Software durch Vergleiche mit bekannten Sequenzen.

3.4.4 Real-Time PCR

Prinzip:

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine sensitive Methode um DNA-Sequenzen zu analysieren. Dabei binden Primer an spezifische Bereiche der DNA, die zuvor in Einzelstränge gespalten wurde. Es folgt eine Anlagerung komplementärer Nukleotide, so dass letztendlich eine enzymatische *in vitro* Amplifizierung der gewünschten Zielsequenz erreicht wird. Durch sich wiederholende Zyklen wird eine nahezu exponentielle Replikation erreicht. Für die quantitative Analyse der PCR-Produkte wurde das Verfahren der Reversen Transkriptase real-time PCR unter Verwendung des QuantiTect™ Probe RT-PCR Kit von Qiagen und von TaqMan® Gene Expression Assays von Applied Biosystems durchgeführt. In diesen Assays sind neben den jeweiligen Primern spezielle Sonden enthalten, die aus Oligonukleotiden bestehen, deren 5'-Ende mit einem Reporter-Fluorochrom (6-Carboxy-Fluorescein, FAM) und deren 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin, TAMRA) ausgestattet sind. Durch Ausnutzung der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA Polymerase erfolgt mit fortschreitender Anlagerung komplementärer Nukleotide an die Primer die Abspaltung des gebundenen Reporterfarbstoffes an der innerhalb der Zielsequenz gebundenen Sonde. Während die Fluoreszenz der intakten Sonde bei einer Wellenlänge von 488 nm durch die räumliche Nähe des Quencher zum Reporter-Farbstoff unterdrückt wird, ist dies bei der Abspaltung durch die Taq Polymerase nicht mehr gegeben. Diese Fluoreszenz kann detektiert werden und ist ein Maß für das Ausmaß der Amplifizierung, die in Abhängigkeit der ursprünglich vorhandenen DNA-Menge erfolgte.

Durchführung der real-time PCR:

1 µg (2 µl mit einer Konzentration von 0,05 µg/µl) isolierte RNA aus der Wand der Vena Cava Inferior oder Aorten wurde pro Ansatz für die Durchführung der real-time PCR eingesetzt. Jeder 10 µl Ansatz enthielt 5 µl 2x QuantiTect™ Probe RT-PCR Master Mix, 2,4 µl RNase-freies Wasser 0,5 µl Primer-Mix (inklusive Sonde, bei TBP teilweise auch VIC statt FAM gekoppelt verwendet), 0,1 µl QuantiTect Probe™ RT Mix und 2 µl RNA. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen angesetzt. Die verwendete PCR-Platte wurde versiegelt und im Cyclo analysiert:

50 °C → 30 min.

95 °C → 15 min.

94 °C → 15 sec.

60 °C → 1 min.

 55 Zyklen

Als Referenzgen für die spätere Normalisierung diente TBP (TATA-box binding protein). Verwendung fanden folgende TaqMan® Gene Expression Assays: IL-6, IL12p40, IL-18, IL-1 β , IL-33, IL-27, CCL8, CCL3, CXCL12, CCL5. Die relative mRNA Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta\text{Ct}$ (cycle threshold)- Methode nach Livak und Schmittgen [131]. Dabei werden die ermittelten Ct-Werte der Zielgen-Proben ins Verhältnis zu den Ct-Werten des Referenzgens gesetzt:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct (Zielgen)} - \text{Ct (Referenzgen)}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (Zielgen)} - \Delta\text{Ct (Referenzgen)}$$

$$\text{Relative Expression} = 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$$

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Für die durchflusszytometrische Analyse von Immunzellen in der Aorten- bzw. Venenwand wurde diese zunächst mechanisch zerkleinert und im Anschluss für 20 min. (Venen: 14 min.) in einer Lösung aus Collagenase (1 mg/ml) und DNase (50 $\mu\text{g/ml}$) bei 37 °C verdaut. Nach Zerkleinerung und Verdau wurden mit Hilfe von Nylonsieben (40 μm) Einzelzellsuspensionen der Gewebe hergestellt.

Alternativ wurde die Vena Cava Inferior oder die Aorta vollständig für die Isolation von mRNA verwendet (siehe 3.4.1) oder funktionelle Untersuchungen an Aortensegmenten im Organbad (siehe 3.2.4) sowie durchflusszytometrische Analysen (hierbei jeweils zwei Aorten zu einer Probe vereinigt) durchgeführt. Einzelzellsuspensionen der Milz wurden mit Hilfe eines Nylonsiebes (Porengröße: 70 μm) gewonnen.

3.5.2 Erythrozytenlyse

Zur Entfernung von Erythrozyten aus Zellsuspensionen wurde das durch Zentrifugation gewonnene Zellpellet mit 1-3 ml ACK-Puffer (je nach Pelletgröße) versetzt und für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur resuspendiert. Sofern nach der Zentrifugation (330xg, 4°C, 6min.) noch Erythrozyten in der Probe sichtbar waren, wurde der Lyseschritt wiederholt. Der verwendete ACK-Puffer ist stark hypotonisch und hat zur Folge, dass durch das osmotische Gefälle große Mengen an Wasser in die Zellen eindringen und die Erythrozyten bei steigendem Innendruck aufplatzen. Erythrozyten sind im Vergleich zu anderen Zellen besonders empfindlich für Änderungen des osmotischen Gefälles und können somit aus der Probe entfernt werden, ohne die restlichen Zellen zu zerstören.

3.5.3 Isolierung muriner CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Prinzip:

CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen konnten mit Hilfe von Streptavidin- und CD8 α -Microbeads positiv angereichert werden. Sogenannte Microbeads sind ca. 50 nm große, uniforme, superparamagnetische Polysterol-überzogene Eisenpartikel, an deren Oberfläche Antikörper gebunden sind. Durch Inkubation mit den Microbeads binden diese über ihre gekoppelten Antikörper spezifisch an Zellen, welche das entsprechende Antigen auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die anschließende Separation erfolgt mit Hilfe von Zell-Separations-Säulen, welche mit Eisenpartikeln gefüllt und von einem starken Magnetfeld umgeben sind. Während unmarkierte und daher nicht magnetische Zellen passieren, bleiben die magnetischen Microbeads zusammen mit den daran gebundenen Zellen in der Säule hängen. Ungebundene Zellen werden durch Waschschriffe entfernt und die Positivfraktion durch Spülen unter Druck außerhalb des Magnetfeldes isoliert.

Durchführung:

1x10⁷/ 90 μ l lysierte Milzzellen wurden in MACS-Puffer (murin) aufgenommen und CD8 α Microbeads (10 μ l pro 1x10⁷ Zellen) dazu pipettiert. Nach 10 min. Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen mit MACS-Puffer (murin) gewaschen und auf eine Trennsäule (MidiMACS-Seperator, Milteny Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland) aufgegeben. Es wurde dreimal mit je 3 ml Puffer gewaschen und im Anschluss die Positivfraktion, welche CD8-positive T-Zellen enthielt, isoliert.

Die Zellen der Negativfraktion wurden in frischem MACS-Puffer (murin) aufgenommen (1x10⁸/ ml) und biotinylierter anti-CD4 Antikörper zugegeben (0,5 μ g/ml). Nach 10 Minuten wurde überschüssiger Antikörper durch Waschen entfernt und anti-Streptavidin Microbeads (1 μ l/ 4x10⁶ Zellen) dazugegeben. Nach weiteren 10 min. Inkubationszeit bei 4 °C wurden die Zellen direkt auf frische Trennsäulen gegeben und die Positivfraktion nach drei Waschschriffen isoliert. Zur Steigerung der Reinheit wurde die Zielfraktion über eine zweite Säule gegeben. Im Anschluss wurden die Reinheiten der CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

3.5.4 Stimulation isolierter T-Zellen mit rekombinanten Zytokinen

10x10⁶/ml murine Milzzellen wurden nach erfolgter Erythrozytenlyse in Kulturmedium für murine Zellen (IMDM, 1% Natriumpyruvat, 1% Glutamin, 1% Pen/Strep, 5% FCS) aufgenommen und je 100 μ l der Zellsuspension in Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Kombination rekombinanter Zytokine und Chemokine (siehe Abschnitt 4.3 im Ergebnisteil) wurden in einem Volumen von 50 μ l im gleichen Kulturmedium

dazugegeben und die Zellen für unterschiedliche Inkubationszeiten im Brutschrank kultiviert. Es folgte die Zugabe von 10 µg/ml Brefeldin A jeweils eine Stunde vor dem Ende der Inkubation und eine anschließende durchflusszytometrische Analyse der Zytokinproduktion wie unter 3.5.5 beschrieben.

3.5.5 Durchflusszytometrie

Prinzip:

Das Prinzip der Durchflusszytometrie als wichtige Methode der Immunologie beruht auf der Analyse einzelner Zellen, die in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl wandern. Trifft der Laserstrahl im Durchflusszytometer auf eine Zelle, so wird das Licht in verschiedene Richtungen gestreut. Photodetektoren messen die Lichtstreuung oder -emission, durch welche die Größe und die Granularität der Zelle abgeleitet werden können. Das Vorwärtsstreulicht FSC (Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts und stellt den Zusammenhang mit der Zellgröße her. Dagegen ist das Seitwärtsstreulicht SSC (Sidewards Scatter) ein Maß für die Granularität der Zellen und wird durch die Lichtbrechung/Reflexion bestimmt. Mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen kann man sowohl Zellzahlen als auch Zell-Subpopulationen anhand der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle eindeutig identifizieren.

Dazu werden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen die jeweiligen spezifischen Antigene inkubiert, die durch den Laserstrahl mit der entsprechenden Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden.

Durch Passieren des Laserstrahls der spezifischen Absorptionswellenlänge gelangen die Elektronen der Fluorochrome in energetisch höhere, instabile Energieniveaus. Die Fluoreszenz entsteht bei der Rückkehr der Elektronen in Zustände niedriger Energie, wobei die Fluorochrome sich in der jeweiligen Emissionswellenlänge unterscheiden.

Tabelle 3.1: verwendete Fluorochrome

Fluorochrom		Absorptionswellenlänge	Emissionswellenlänge
APC	Allophycocyanin	633 nm	660 nm
GFP	Green Fluorescent Protein	488 nm	508 nm
eFluor 450	eFluor® 450	405 nm	450 nm
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	488 nm	519 nm
PE	Phycoerythrin	488 nm	578 nm
eFluor 506	eFluor® 506	405 nm	506 nm
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7	488 nm	785 nm
APC-eFluor 780	Allophycocyanin-eFluor® 780	633 nm	780 nm
PE-Cy5.5	Phycoerythrin-Cy5.5	488 nm	695 nm
Alexa Fluor 488	Alexa Fluor® 488	488 nm	519 nm
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cy5	488 nm	667 nm

Färbungen von Oberflächenmolekülen:

0,5-1x10⁶ Zellen wurden in einer 96-Well Rundbodenplatte bei 350 x g (4 °C, 4 min.) zentrifugiert und das Zellpellet einmal mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die murinen Zellen für 10 min. mit 15µl/Well CD16/ CD32 (Fc-Block) bei 4 °C inkubiert und anschließend erneut mit FACS-Puffer gewaschen. Die jeweiligen Endkonzentrationen der verwendeten Antikörper wurden in Vorversuchen individuell ermittelt und in FACS-Puffer angesetzt. Nach 20-minütiger Inkubation mit 15-20 µl der Antikörperlösung bei 4 °C erfolgte ein weiterer Waschschrift des Zellsediments mit kaltem FACS-Puffer, um die Probe von überschüssigen, ungebundenen Antikörpern zu befreien. Für die durchflusszytometrische Untersuchung der Oberflächenmoleküle wurde die Probe in 100 µl kaltem FACS-Puffer aufgenommen, in ein Rundboden-FACS-Röhrchen überführt und im Durchflusszytometer analysiert. Zur genauen Einstellung der Laserverstärkung und der Kompensation der Emissionswellenlängen wurden zusätzlich ungefärbte Zellen und Einzel- bzw. mit einem Antikörper derselben Immunglobulinklasse und derselben Fluoreszenzfarbstoff-Markierung gegen ein unrelevantes Antigen gefärbt (Isotyp-Färbung). Die Anfärbung mit CD45 APC-eFluor780 und Fixable Viability Dye eFluor506 erlaubte die Identifizierung von viablen (eFluor506-negativen) CD45-positiven Immunzellen, auf deren Grundlage alle weiteren murinen Zellpopulationen identifiziert wurden.

Färbungen von nukleären Molekülen:

Für die Detektion nukleärer Moleküle, wie zum Beispiel der Transkriptionsfaktoren T-bet und FoxP3, wurden die Zellen im Anschluss an die Oberflächenfärbung für mindestens 30 min. bei 4 °C mit der Fixierungs-/ Permeabilisierungslösung von eBioscience fixiert. Es folgte ein Waschschrift mit Perm/ Wash Puffer und die Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen die entsprechenden intrazellulären Moleküle (in Perm/ Wash) für 20 min. bei 4 °C. Nach einem erneuten Waschschrift zur Entfernung überschüssiger Antikörper wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären Zytokinproduktion:

Murine Zellen aus verschiedenen Organen wurden *in vitro* mit 10 ng/ml Phorbol 12-Myristat-13-Acetat (PMA) und 1 µg/ml Ionomycin für 4-5 Stunden inkubiert. Nach 30 min. wurden 1,4 µl/ 200 µl Probenvolumen BD GolgiStop (Monensin) oder alternativ Brefeldin A (10 µg/ml) zugegeben. Durch Monensin bzw. Brefeldin wird der Trans-Golgi Transport und damit die Ausschleusung der gebildeten Zytokine gehemmt, so dass diese sich in der Zelle ansammeln und dadurch in einer für die durchflusszytometrische

Analyse hinreichenden Menge intrazellulär durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden können. Nach der Stimulation wurden die Oberflächenmoleküle der Zellen wie oben beschrieben gefärbt, im Anschluss für mindestens 30 min. bei 4 °C fixiert (BD Cytotfix/ Cytoperm Kit) und mit Perm/Wash gewaschen. Es folgte die Inkubation (25 min., 4 °C) mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern (in Perm/ Wash), deren optimale Konzentration jeweils in Vorversuchen ermittelt wurde. Nach einem weiteren Waschschrift mit Perm/ Wash wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

3.6 Statistische Auswertungen

Zur statistischen Auswertung und grafischen Darstellung von Daten wurde GraphPad Prism 6 verwendet. Als statistischer Test wurde je nach Versuch (Vergleich von zwei oder vier Gruppen) der t-Test bzw. One-way ANOVA angewendet. Signifikanzen wurden durch Sternchen (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) markiert (ns: nicht signifikant).

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse zur Rolle von T-Zellen in der Entstehung der Gefäßentzündung und -dysfunktion bei arteriellem Bluthochdruck

4.1.1 Die Induktion von arteriellem Bluthochdruck durch Angiotensin II ruft eine verstärkte Einwanderung von T-Zellen in die entzündeten Aortenwände hervor

Zur Induktion von Bluthochdruck wurden C57BL/6 Mäusen Angiotensin II (ATII)-beladene miniosmotische Pumpen subkutan implantiert. Nach sieben Tagen wurden die Aorten behandelter Tiere und unbehandelter Kontrolltiere isoliert und daraus generierte Einzelzellsuspensionen durchflusszytometrisch auf die Anwesenheit von Immunzellen untersucht. Die Behandlung mit ATII (1 mg/kg/Tag) führte zu einer signifikanten Einwanderung CD45-exprimierender Immunzellen in die Aortenwand. Im Gegensatz dazu konnten in den Aorten unbehandelter Mäuse nur eine geringe Zahl an Immunzellen gefunden werden (Abbildung 4.1).

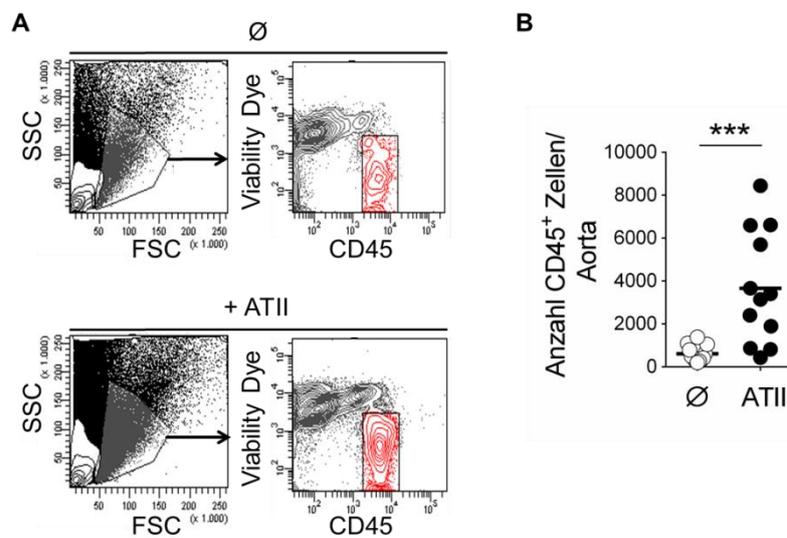


Abbildung 4.1: Immunzellen wandern bei arteriellem Bluthochdruck verstärkt in die Aortenwand ein

Einzelzellsuspensionen der Aorten Angiotensin II-behandelter (ATII) und unbehandelter (Ø) C57BL/6 Mäuse wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD45 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Tote Zellen wurden durch zusätzliche Anfärbung mit dem Vitalfarbstoff „Viability Dye“ von der weiteren Analyse ausgeschlossen. A: Repräsentative Konturplots der Analyse. B: Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung (t-Test). Die Symbole (Kreise) repräsentieren jeweils einzelne Versuchstiere.

Während in unbehandelten C57BL/6 Mäusen nur wenige T-Zellen in der Aortenwand nachweisbar waren, konnten nach Induktion von arteriellem Bluthochdruck durch ATII

deutlich erhöhte Zahlen CD4- und CD8-exprimierender T-Zellen gefunden werden (Abbildung 4.2). Operierte Tiere, denen jedoch keine ATII-beladenen Pumpen implantiert wurden (Scheinbehandlung), wiesen keinerlei Unterschiede gegenüber gänzlich unbehandelten Tieren auf. Auf die Darstellung der Ergebnisse scheinbehandelter Tiere wurde daher verzichtet.

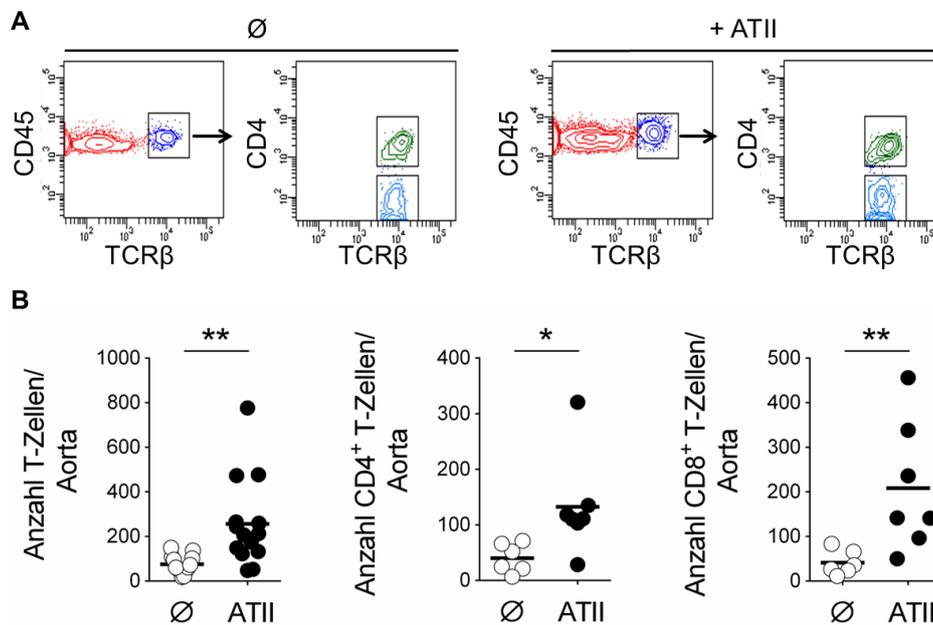


Abbildung 4.2: Die Induktion von arteriellem Bluthochdruck führt zu einer verstärkten Einwanderung von T-Zellen in die Aortenwand

Einzellzellsuspensionen der Aorten ATII-behandelter und unbehandelter C57BL/6 Mäuse wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen die β -Kette des α/β T-Zell-Rezeptors (TCR β), sowie die Moleküle CD45, CD4 und CD8 gefärbt und anschließend die Anzahl an CD4⁺ T-Zellen (CD45⁺TCR β ⁺CD4⁺) und CD8⁺ T-Zellen (CD45⁺TCR β ⁺CD8⁺) durchflusszytometrisch bestimmt. Tote Zellen wurden durch Anfärbung mit dem Vitalfarbstoff „Viability Dye“ von der Analyse ausgeschlossen. A: Repräsentative Konturplots der durchflusszytometrischen Analyse. B: Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung (t-Test). Die Symbole repräsentieren jeweils einzelne Versuchstiere.

Unter physiologischen Bedingungen beträgt das Verhältnis von CD4-positiven zu CD8-positiven T-Zellen in etwa 2:1 [6,132]. Diese Beziehung konnte bei der Betrachtung der relativen Anteile CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen an der Gesamt-T-Zellpopulation im Blut gefunden werden (Abbildung 4.3). Bei der Analyse der Aorten-infiltrierten T-Zellen zeigte sich jedoch, dass das physiologische Verhältnis dort nicht mehr gegeben war. Das Verhältnis betrug dort in etwa 1:1. Es wanderten dementsprechend mehr CD8- als CD4-positiv T-Zellen ein.

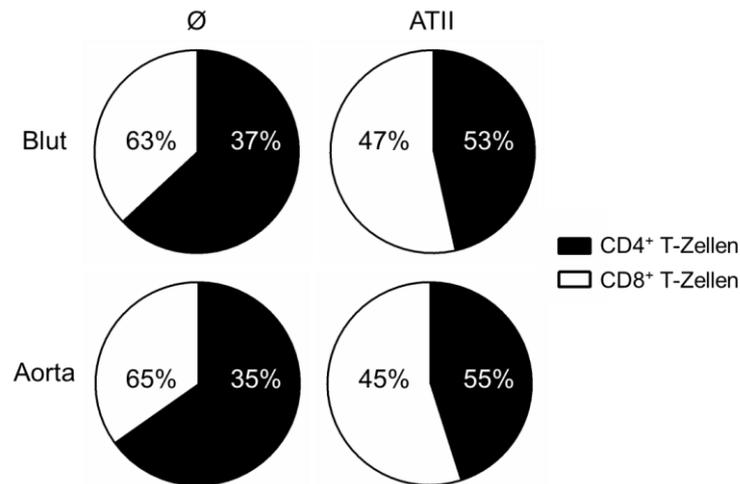


Abbildung 4.3: CD8-positive T-Zellen wandern verstärkt in die Aortenwand ein

Einzellsuspensionen von ATII-behandelten und unbehandelten C57BL/6 Mäusen aus Blut und Aorta wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen die β -Kette des α/β T-Zell-Rezeptors (TCR β), sowie die Moleküle CD45 und CD4 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. CD8-positive Zellen entsprachen dabei CD4-negativen T-Zellen. Tote Zellen wurden durch Anfärbung mit dem Vitalfarbstoff „Viability Dye“ von der Analyse ausgeschlossen. Die zusammenfassende grafische Darstellung zeigt die prozentualen Anteile an CD4- und CD8-positiven T-Zellen innerhalb der Gesamt-T-Zellpopulation in Blut und Aorta, n=7-9.

Die verstärkte Einwanderung von T-Zellen in Aortenwände von Tieren mit Bluthochdruck lässt vermuten, dass diese Zellen an der für den Bluthochdruck ursächlichen Gefäßentzündung und -dysfunktion beteiligt sind.

4.1.2 Bei arteriellem Bluthochdruck in die Aortenwand einwandernde T-Zellen weisen vorwiegend einen Effektor-Gedächtniszell-Phänotyp auf

Eine Beteiligung von T-Zellen an arteriellen Entzündungsprozessen wurde von mehreren Arbeitsgruppen diskutiert [90,91]. Möglicherweise könnten insbesondere aktivierte T-Zellen an der Entstehung von arteriellem Bluthochdruck beteiligt sein [87]. Im Folgenden wurde deshalb der Phänotyp Aorten-infiltrierender T-Zellen genauer untersucht. Anhand der Oberflächenmarker CD62L und CD44 können naive T-Zellen (CD62L^{high}CD44^{low}, engl. naive T cells, T_{naive}), Effektor-T-Gedächtniszellen (CD62L^{low}CD44^{high}, engl. effector memory T cells, T_{EM}) und zentrale Gedächtnis-T-Zellen (CD62L^{high}CD44^{high}, engl. central memory T cells, T_{CM}) voneinander unterschieden werden. Wie in Abbildung 4.4 dargestellt, wandern bei arteriellem Bluthochdruck nahezu ausschließlich Effektor-T-Gedächtniszellen in die Aortenwand ein. Im Gegensatz dazu weisen die Aortenwände unbehandelter oder scheinimplantierter Tiere nur eine geringe Zahl an T_{EM} auf. Entsprechend der bevorzugten Einwanderung an T_{EM} nahm der relative Anteil an T_{naive} und T_{CM} in den Aortenwänden ab.

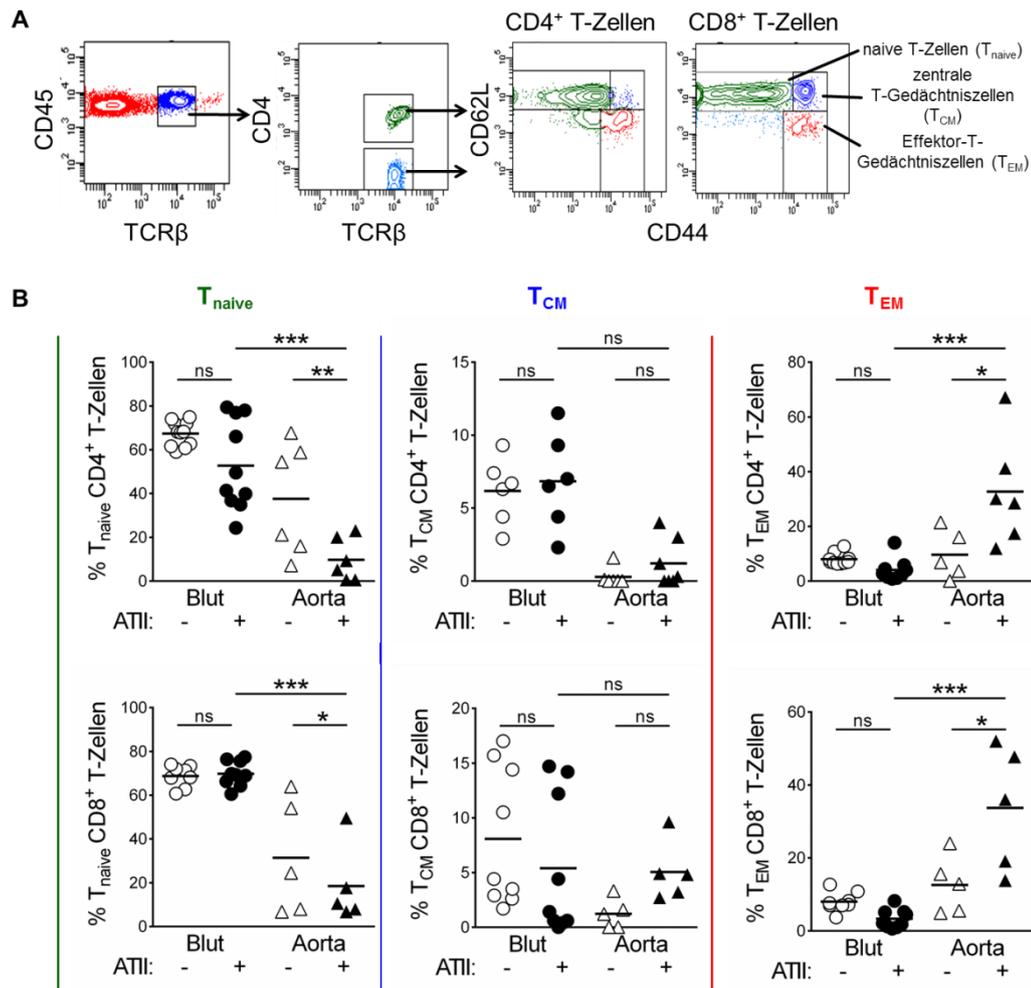


Abbildung 4.4: Unter dem Einfluss von ATII wandern bevorzugt Effektor-T-Gedächtniszellen in die Aortenwand ein

Der Differenzierungszustand von T-Zellen in der Aortenwand wurde durch die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD44 und CD62L durchflusszytometrisch analysiert. A: Repräsentative Konturplots der durchflusszytometrischen Analyse. Dargestellt sind viable CD45-positive T-Zellen im Blut. B: Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung (One-way ANOVA, ns: nicht signifikant). Die Symbole repräsentieren einzelne Versuchstiere.

Zusammenfassend zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass die Steigerung des arteriellen Bluthochdrucks durch Bepumpung mit ATII zur Einwanderung einer größeren Zahl an Effektor-T-Gedächtniszellen in die Aortenwand führt.

4.1.3 Bei arteriellem Bluthochdruck in die Aortenwand einwandernde CD4⁺ T-Zellen mobilisieren CD40L, exprimieren T-bet und können IFN- γ bilden

T-Zellen regulieren die Oberflächenexpression des kostimulatorischen Moleküls CD40L (CD154) in Abhängigkeit von ihrem Aktivierungszustand. Während CD40L von allen T-Zellen gebildet und intrazellulär gespeichert wird, erfolgt in CD4⁺ Effektor-T-Zellen nach Aktivierung vorübergehend eine verstärkte Expression auf der Zelloberfläche. Durch Messung der auf der Zelloberfläche vorhandenen CD40L Moleküle im sogenannten

CD40L-Mobilisationstest können $CD4^+$ Effektor-T-Zellen von naiven $CD4^+$ T-Zellen zuverlässig unterschieden werden [133]. Hierbei werden T-Zellen durch PMA und Ionomycin in Anwesenheit eines Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpers gegen CD40L aktiviert [134]. Dieser bindet effektiv an das Zielmolekül auf der Zelloberfläche und erlaubt somit die Anfärbung CD40L-mobilisierender Zellen. Wie in Abbildung 4.5 dargestellt, zeigten Aorten-infiltrierende T-Zellen in ATII-behandelten Tieren eine erhöhte CD40L-Mobilisierung im Vergleich zu den T-Zellen des Blutes. Dies konnte in geringerem Umfang auch in unbehandelten Tieren beobachtet werden. Innerhalb der $CD8^+$ T-Zell-Subpopulation waren dagegen sowohl im Blut als auch in der Aorta kaum CD40L-positive Zellen detektierbar. Als Kontrolle diente die Inkubation mit einem Antikörper des gleichen Isotyps, der gegen ein irrelevantes Antigen gerichtet war (Isotypkontrolle).

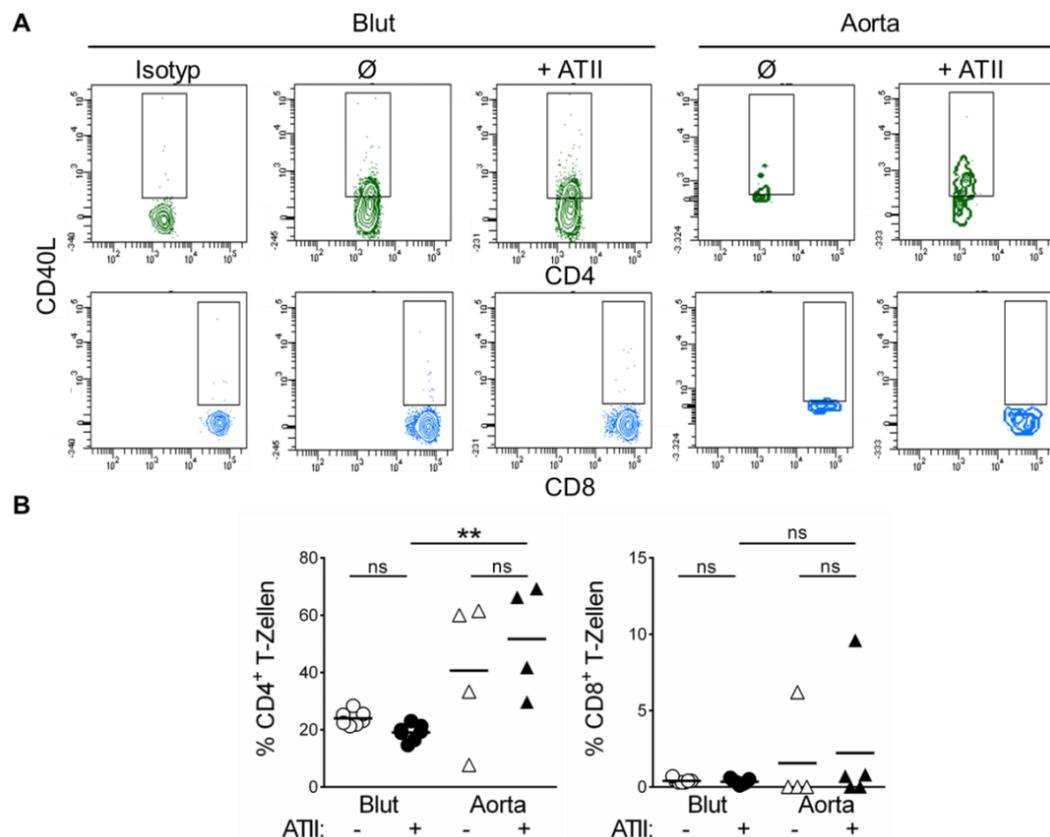


Abbildung 4.5: Zunahme der CD40L-Expression auf der Zelloberfläche von Aorten-infiltrierenden $CD4^+$ T-Zellen im Vergleich zu $CD4^+$ T-Zellen des Blutes

T-Zellen aus den Aortenwänden und aus dem Blut ATII-behandelter und unbehandelter C57BL/6 Mäuse wurden *ex vivo* mit PMA (10 ng/ml) und Ionomycin (1 μ g/ml) in Anwesenheit von anti-CD154 PE (5 μ g/ml) oder des entsprechenden Isotyp-Antikörpers für 30 min. stimuliert. Im Anschluss erfolgte eine Färbung mit weiteren Fluoreszenzmarkierten-Antikörpern. A: Repräsentative Histogramme der Analyse CD40L-positiver T-Zellen. Dargestellt sind viable CD45-positive $CD4^+$ (grün) und $CD8^+$ T-Zellen (blau) in Blut und Aorta von unbehandelten und ATII-behandelten Mäusen sowie die zugehörigen Isotypkontrollen. B: Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung (One-way ANOVA). Die Symbole repräsentieren einzelne Versuchstiere.

Übereinstimmend mit der beobachteten Ansammlung von Effektor-T-Gedächtniszellen weist die erhöhte CD40L-Mobilisierung Aorten-infiltrierender T-Zellen in ATII-behandelten Tieren darauf hin, dass bei arteriellem Bluthochdruck entweder bevorzugt Effektor-T-Gedächtniszellen in die Aorta einwandern oder eingewanderte T-Zellen in der Aorta Effektorfunktionen ausbilden. Möglicherweise ist die CD40L-Mobilisierung eine generelle Eigenschaft Aorten-infiltrierender T-Zellen.

Anhand der von ihnen produzierten Zytokine können CD4⁺ Effektor-T-Zellen in mehrere Gruppen unterteilt werden. Hierbei sind T-Helfer-1-Zellen (Th1-Zellen) durch die Bildung von Interferon-gamma (IFN- γ) gekennzeichnet. Analog werden IFN- γ -bildende CD8⁺ Effektor-T-Zellen häufig als T_C1-Zellen bezeichnet, obwohl die Regulation der IFN- γ -Bildung in CD8⁺ T-Zellen Unterschiede gegenüber CD4⁺ T-Zellen aufweist [135–137].

In aktivierten CD4⁺ T-Zellen ist der Transkriptionsfaktor T-bet essentiell an der Entwicklung der Fähigkeit beteiligt, IFN- γ bilden zu können [138]. Entsprechend ist die Fähigkeit von CD4⁺ T-Zellen in T-bet defizienten Tieren IFN- γ zu bilden dramatisch reduziert [31].

Da wir in einer vorausgegangenen Arbeit bereits zeigen konnten, dass von NK Zellen gebildetes IFN- γ beim ATII-induzierten Bluthochdruck wesentlich an der Entzündung und Dysfunktion der Aorta beteiligt ist [83], wurde in dieser Arbeit die T-bet Expression und IFN- γ Bildung Aorten-infiltrierender T-Zellen – als mögliche weitere Quelle des Zytokins – untersucht. Dazu wurden zunächst T-Zellen aus den Aorten ATII-behandelter und unbehandelter C57BL/6 Mäuse auf die nukleäre Expression von T-bet untersucht. Zum Vergleich wurden jeweils T-Zellen aus dem Blut und der Milz präpariert. Abbildung 4.6 zeigt, dass sowohl Aorten-infiltrierende CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu T-Zellen der Milz und des Blutes in erhöhter Zahl T-bet exprimierten. Die Induktion arteriellen Bluthochdrucks führte zu einem selektiven weiteren Anstieg der T-bet Expression in T-Zellen der Aorta, nicht jedoch in Blut und Milz. Eine Zunahme der Anzahl T-bet-exprimierender Zellen wurde sowohl in der Population der CD4⁺ T-Zellen als auch in CD8⁺ T-Zellen beobachtet.

Die dargestellten Beobachtungen unterstützen ebenfalls die Annahme einer vermehrten Rekrutierung oder lokalen Aktivierung von T-Zellen in den Gefäßwänden.

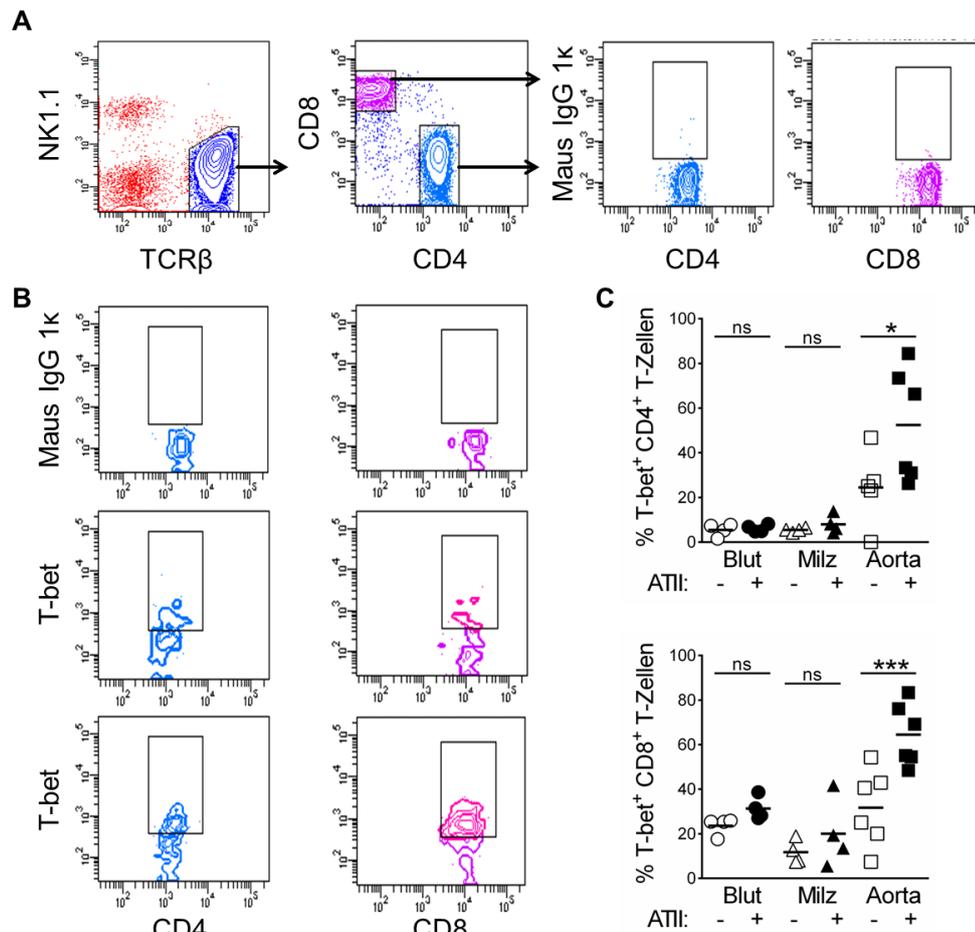


Abbildung 4.6: Arterieller Bluthochdruck erhöht die Zahl T-bet-exprimierender T-Zellen in der Aorta

Zellsuspensionen aus isolierten Aorten, Milzen und dem Blut ATII-behandelter und un behandelter C57BL/6 Mäuse wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen die dargestellten Oberflächenmoleküle sowie zusätzlich intranukleär mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper gegen den Transkriptionsfaktor T-bet gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. A: Repräsentative Konturplots der durchflusszytometrischen Analyse B: Repräsentative Konturplots von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen Obere Reihe: Isotypkontrollen, mittlere Reihe: T-bet-Färbung in un behandelten Tieren, untere Reihe: T-bet-Färbung in ATII-behandelten Tieren. C: Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung (One-way ANOVA). Die Symbole repräsentieren einzelne Versuchstiere.

Zur Bestimmung der Fähigkeit zur Bildung von IFN- γ in T-Zellen der Aortenwand, wurden isolierte T-Zellen *ex vivo* für fünf Stunden mit PMA/ Ionomycin in Gegenwart von Monensin stimuliert und anschließend intrazellulär akkumuliertes IFN- γ gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Diese Vorgehensweise erlaubt es, den Anteil IFN- γ kompetenter T-Zellen unabhängig von ihrer Reaktivität zu bestimmen. Als Kontrollen dienten unstimulierte T-Zellen aus der Aortenwand. Wie in Abbildung 4.7 B dargestellt, konnte in den Aorten ATII-behandelter Tiere eine erhöhte Anzahl IFN- γ -bildender T-Zellen nachgewiesen werden. Bezogen auf die Gesamtpopulation der T-Zellen nahm

der Anteil IFN- γ bildender T-Zellen in Aorten von Tieren mit arteriellem Bluthochdruck jedoch nicht zu (Abbildung 4.7 C). Dies lässt darauf schließen, dass die Einwanderung von T-Zellen in die Aortenwand unabhängig von ihrer Fähigkeit erfolgt, IFN- γ produzieren zu können. Die verwendete Methodik lässt auf die grundsätzliche Befähigung der Aorten-infiltrierenden T-Zellen zur IFN- γ Produktion schließen. Darüber hinaus kann jedoch keine Aussage über die tatsächliche Bildung dieses Zytokins von T-Zellen in der Aorta getroffen werden.

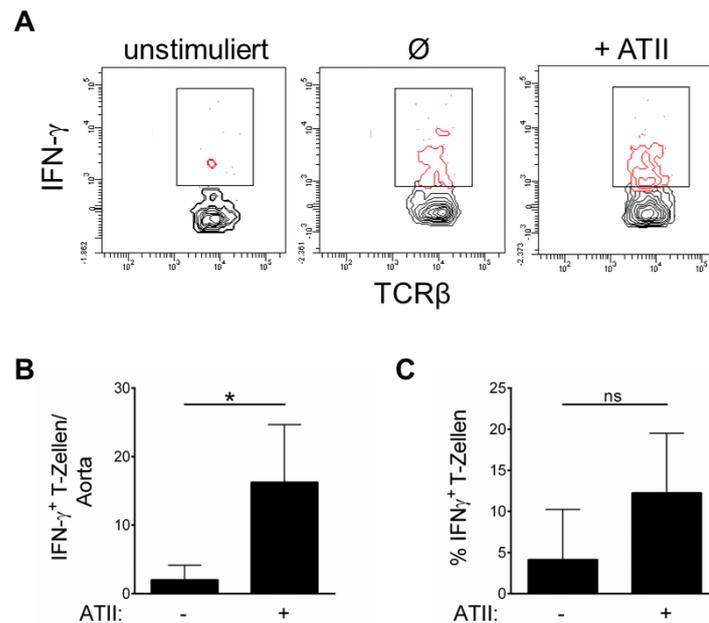


Abbildung 4.7: Zunahme der Zahl Interferon- γ -kompetenter T-Zellen in den Aorten von Tieren mit arteriellem Bluthochdruck

T-Zellen aus der Aortenwand unbehalteter und ATII-behandelter C57BL/6 Mäuse wurden *ex vivo* für 4-5 Stunden mit PMA (10 ng/ml)/ Ionomycin (1 μ g/ml) in Anwesenheit von Monensin stimuliert. Unstimulierte Zellen dienen als Kontrolle. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem entsprechenden markierten Antikörper angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. A: Repräsentative Konturplots von T-Zellen aus der Aortenwand. B und C: Zusammenfassende grafische Darstellung der IFN- γ -kompetenten T-Zellen pro Aorta (B) und des prozentualen Anteils IFN- γ -kompetenter T-Zellen in der Gesamtpopulation der untersuchten T-Zellen (C), sowie statistische Auswertung der Ergebnisse (t-test), n=4.

4.1.4 In Interferon- γ - und T-bet-defizienten Mäusen ist die durch ATII hervorgerufene Einwanderung von T-Zellen in die Aortenwand verringert

Die Migration der T-Zellen ist von der Expression mehrerer Phänotyp-spezifischer Oberflächenmoleküle und Transkriptionsfaktoren abhängig [139,140]. Unter anderem wurde gezeigt, dass das Fehlen des IFN- γ Gens oder des zum Erwerb der IFN- γ -Bildung erforderlichen Transkriptionsfaktors T-bet zu einem veränderten Wanderungsverhalten von T-Zellen führt [141]. Zur Überprüfung der Bedeutung beider Gene für die Einwanderung von T-Zellen in entzündete Aortenwände wurden durchflusszytometrische Analysen der Aortenwände T-bet defizienter (Tbx21 $^{-/-}$) sowie

IFN- γ defizienter Mäuse (IFN- $\gamma^{-/-}$) durchgeführt. Abbildung 4.8 zeigt, dass die Einwanderung CD45-positiver Immunzellen in die Aorta in Abwesenheit von T-bet und in Abwesenheit von IFN- γ verringert ist. Bezüglich der T-Zell-Infiltration konnte nur in IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen eine signifikante Reduktion der Infiltration detektiert werden. Eine T-bet-Defizienz scheint dagegen geringe Auswirkungen auf die Einwanderung von T-Zellen in Aortenwände unter Bluthochdruck zu haben.

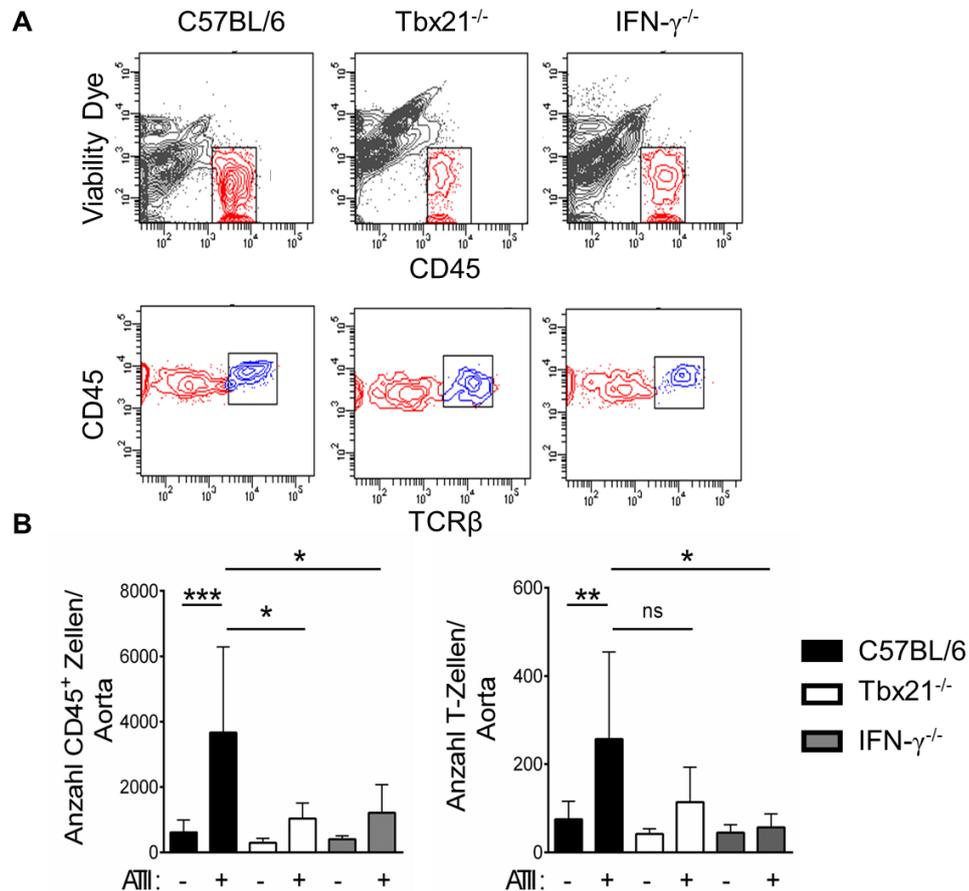


Abbildung 4.8: Die Abwesenheit von T-bet und Interferon- γ führt zu einer reduzierten Infiltration von Immunzellen in die Aortenwände ATII-behandelter Mäuse

Mäuse der Stämme C57BL/6, Tbx21^{-/-} und IFN- $\gamma^{-/-}$ wurden für sieben Tage mit Angiotensin II behandelt. Durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD45 und TCR β konnten infiltrierte Immunzellen und T-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie detektiert werden. A: Repräsentative Konturplots der durchflusszytometrischen Analyse. B: Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung (One-way ANOVA), n=4-7.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Behandlung mit Angiotensin II zu einer verstärkten Infiltration von T-Zellen in die Aortenwand führt, welche von der Expression von IFN- γ und zum geringeren Teil von T-bet abhängt.

4.1.5 Die Depletion von Monozyten in LysM^{iDTR} Mäusen verringert die durch ATII hervorrufbare Einwanderung von IFN- γ ⁺ T-Zellen in die Aorta

LysM^{iDTR} Mäuse exprimieren den humanen Diphtheriatoxin-Rezeptor (DTR) unter der Kontrolle des Promotors des Myelomonocyten-spezifischen Lysozym M (LysM). Dies führt zur Expression des Rezeptors auf allen LysM-exprimierenden myelomonocytyären Zellen, insbesondere Granulozyten und Monozyten. Durch Injektion von Diphtheriatoxin (DTX) werden Zellen, die den Rezeptor exprimieren, abgetötet [122]. Auf Grund der unterschiedlichen Lebensdauer und Erneuerungsrate sowie Unterschieden in der Expression des Diphtheriatoxin-Rezeptors zwischen Granulozyten und Monozyten führt die Behandlung von LysM^{iDTR} Mäusen mit DTX zu einer effektiven Entfernung der Monozyten, während die Population der Granulozyten durch einer schnellere Neubildungsrate dieser Zellen als Population erhalten bleibt. LysM^{iDTR} Mäuse sind deshalb geeignet, die Rolle von Monozyten in der Entstehung und im Verlauf von Erkrankungen zu untersuchen.

Wir konnten in einer vorausgehenden Arbeit bereits zeigen, dass Monozyten in der durch ATII-vermittelten vaskulären Dysfunktion und Inflammation eine wichtige Rolle für die Einwanderung von NK-Zellen in die Aorta spielen. So konnten nach Depletion der Monozyten in LysM^{iDTR} Mäusen deutlich weniger IFN- γ ⁺ NK-Zellen in der Aorta ATII-behandelter Tiere nachgewiesen werden [83]. Um den Einfluss von Monozyten auf die Einwanderung von IFN- γ ⁺ T-Zellen in die Aortenwände ATII-behandelter Tiere zu untersuchen, wurden die Monozyten in LysM^{iDTR} Mäusen durch Injektion von Diphtheriatoxin zerstört. Als Kontrolle dienten Diphtheriatoxin-behandelte LysM-Mäuse, in denen auf Grund des Fehlens des Diphtheriatoxin-Rezeptors durch Behandlung mit DTX keine Depletion erfolgt. Abbildung 4.9 A zeigt anhand der durchflusszytometrischen Analyse von Blutzellen am letzten Tag der Diphtheriatoxin-Behandlung (Tag 10) die erfolgreiche Depletion der Monozyten in Tieren des Stammes LysM^{iDTR}. Die Identifizierung der Monozyten erfolgte mit Hilfe der Oberflächenmoleküle CD11b, F4/80 und CD115.

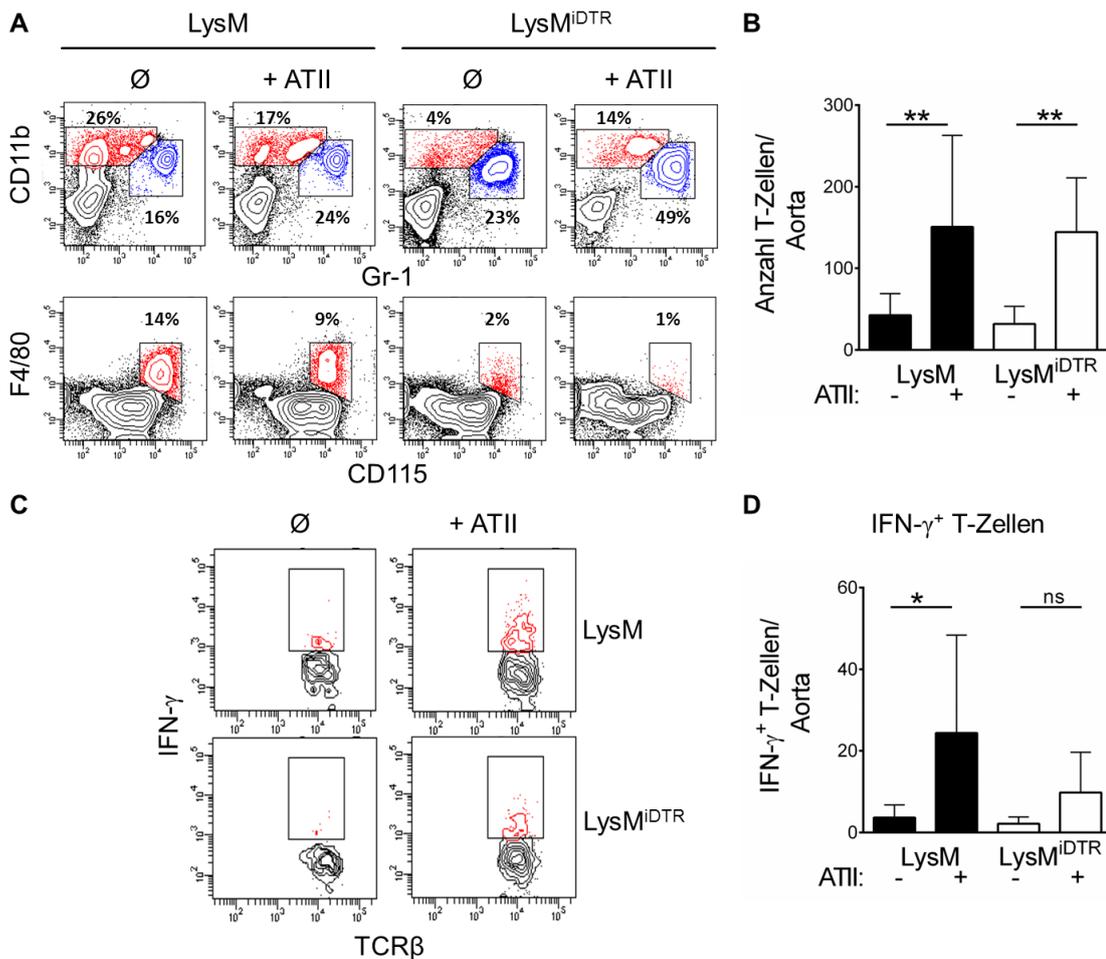


Abbildung 4.9: In Abwesenheit von Monozyten ist die durch ATII hervorgerufene Einwanderung IFN- γ -kompetenter T-Zellen in die Aorta nur leicht verringert

A: Repräsentative Konturplots der Blutzellen ATII-behandelter und unbehandelter Dipheriatoxin-behandelter LysM^{iDTR} und LysM Mäuse. Monozyten (rot) werden durch die Expression von CD11b, F4/80 und CD115 identifiziert. Dagegen exprimieren Granulozyten (blau) CD11b und Gr-1. B: Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse zur Anzahl der T-Zellen pro Aorta und statistische Auswertung (One-way ANOVA), n=8. C: Repräsentative Konturplots der IFN- γ Produktion von T-Zellen in der Aortenwand nach *ex vivo* Restimulation mit PMA (10ng/ml) und Ionomycin (1 μ g/ml) in Anwesenheit von Monensin für 4-5 Stunden. D: Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung (One-way ANOVA), n=5-8.

Wie in Abbildung 4.9 C und D dargestellt, wird die Einwanderung IFN- γ -kompetenter T-Zellen in die Aorta ATII-behandelter Tiere durch die Depletion von Monozyten nur in geringem Maße beeinträchtigt. Weiterhin konnte kein Einfluss der Monozyten in Bezug auf die Gesamtzahl einwandernder T-Zellen gefunden werden (Abbildung 4.9 B).

4.1.6 Die Depletion von CD4⁺ T-Zellen hat keinen Einfluss auf die durch ATII induzierbare Gefäßdysfunktion

Da die Zuwanderung von T-Zellen auf eine Beteiligung der Zellen an der Gefäßentzündung hinweist, wurde im Folgenden untersucht, ob die Gesamtheit CD4-positiver T-Zellen für die Entwicklung ATII-induzierter arterieller Gefäßdysfunktion

erforderlich ist. Dazu wurden in C57BL/6 Mäusen durch Injektion des CD4-depletierenden Antikörpers GK1.5 vor Behandlung der Tiere mit ATII alle CD4⁺ T-Zellen depletiert. Der Erfolg der Depletion wurde durchflusszytometrisch an Tag 4 der Behandlung und am letzten Versuchstag im Blut kontrolliert. Ein repräsentatives Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 4.10 B dargestellt. Eine Gruppe von Tieren wurde zusätzlich ab Tag 4 nach Beginn der T-Zell-Depletion mit ATII behandelt. Allen Tieren wurde an Tag 8 erneut Antikörper appliziert, um den CD4⁺ T-Zell-freien Zustand zu erhalten.

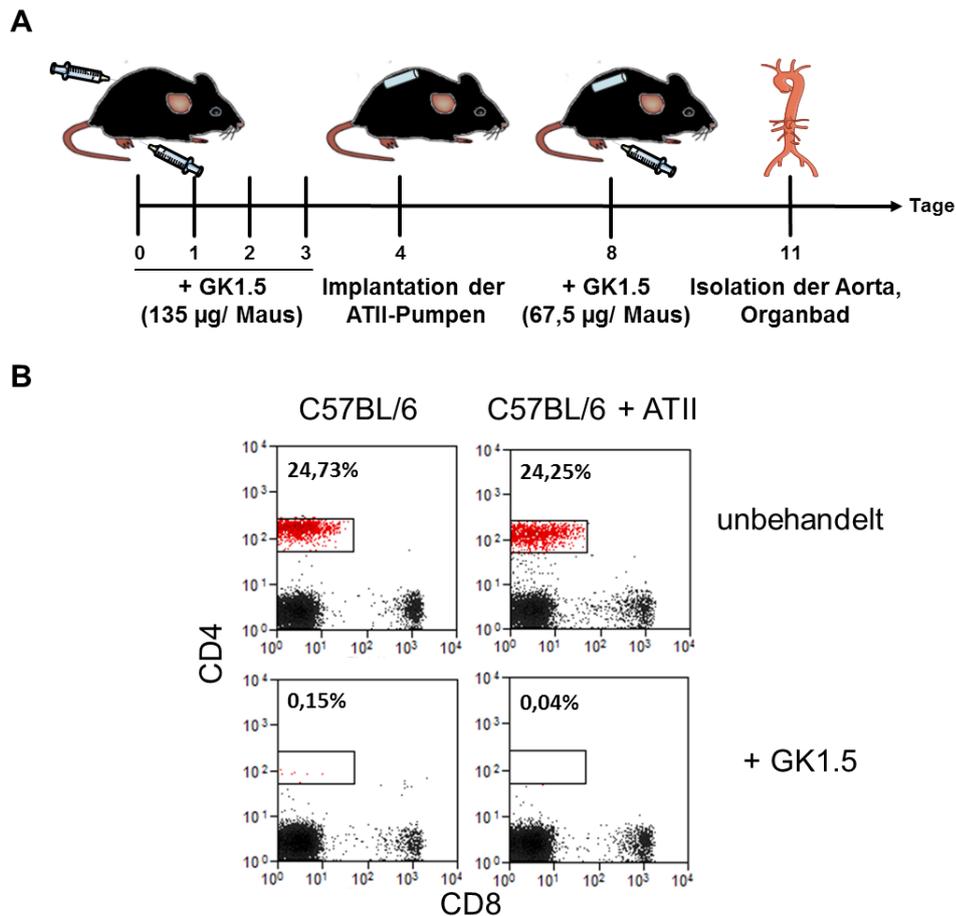


Abbildung 4.10: Die Injektion Antikörper-haltiger Überstände des Hybridoms GK1.5 führt zur Depletion CD4-positiver T-Zellen

C57BL/6 Mäusen wurden 135 µg des CD4-depletierenden Antikörpers in Form von Überständen der GK1.5 Hybridomkultur über vier Tage intraperitoneal und subkutan injiziert. A: Versuchsschema. B: Dargestellt sind repräsentative Plots der durchflusszytometrischen Analyse von Blutzellen der Tiere an Tag 4. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Die Depletion CD4-positiver T-Zellen wurde durch Doppelfärbungen mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen die Moleküle CD4 und CD8 detektiert.

An Tag 11 (7 Tage ATII-Behandlung) wurden die Aorten isoliert, vollständig von anhaftendem Fettgewebe befreit und in 4 mm große Segmente geschnitten. Diese Segmente wurden in Organbadkammern über Triangeln mit einem isometrischen

Kraftübersetzer verbunden. Es wurden im Folgenden Konzentrations-Relaxationskurven der Gefäßabschnitte nach Zugabe von Acetylcholin oder Glyceroltrinitrat aufgenommen. Die Relaxation der Gefäßsegmente stellt ein Maß für die Gefäßelastizität dar.

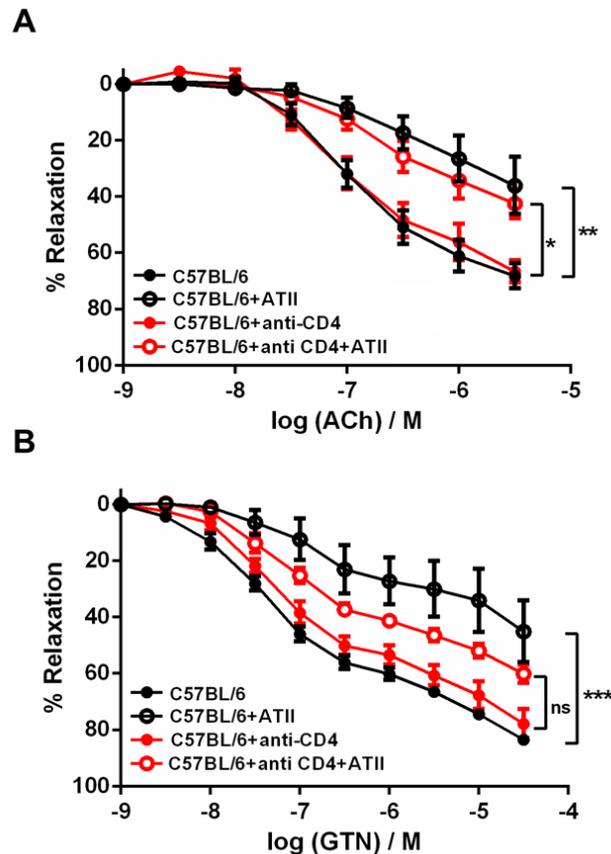


Abbildung 4.11: CD4-positive T-Zellen sind für die Entwicklung einer ATII-induzierten arteriellen Gefäßdysfunktion nicht erforderlich

Isolierte Aortensegmente wurden im Organbad auf ihre Elastizität hin untersucht. Abbildung A zeigt die endothelabhängige Relaxation als Reaktion auf steigende Konzentrationen von Acetylcholin (ACh). Abbildung B zeigt die endothelunabhängige Relaxation als Reaktion auf steigende Konzentrationen Glyceroltrinitrat (GTN). Untersucht wurden Aortenringe von C57BL/6 Mäusen (schwarze Kreise, geschlossen), C57BL/6 Mäusen nach ATII-Behandlung (schwarze Kreise, offen), CD4⁺ T-Zell-depletierte C57BL/6 Mäuse ohne (rote Kreise, geschlossen) und nach ATII-Behandlung (rote Kreise, offen). One-way ANOVA bei maximaler Relaxation (Vergleich der Relaxationen der einzelnen Gruppen bei der höchsten Konzentration an ACh bzw. GTN), n=5-7.

Abbildung 4.11 zeigt, dass eine Depletion der CD4⁺ T-Zellen vor ATII-Behandlung nur einen geringen, nicht signifikanten Einfluss auf die durch ATII induzierbare Gefäßdysfunktion hat. Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass CD4⁺ T-Zellen für die Entwicklung arterieller Dysfunktionen nicht erforderlich sind. Allerdings schließt dies die Beteiligung bereits existenter Effektor-T-Zellen an einer Gefäßentzündung nicht aus.

4.1.7 Die polyklonale Aktivierung von T-Zellen *in vivo* verstärkt vermutlich die durch ATII hervorgerufene Gefäßdysfunktion

Die Beobachtung, dass CD4⁺ T-Zellen für die Entwicklung arterieller Dysfunktionen nicht erforderlich sind, schließt ihre Beteiligung als Effektor-T-Gedächtniszellen an einer bestehenden Gefäßentzündung nicht aus. Insbesondere könnte die Frequenz an Effektor-T-Gedächtniszellen entscheidend für das Ausmaß ihres Beitrages zur Gefäßentzündung sein. Während unter weitgehend keimarmen Bedingungen gehaltene Mäuse nur eine geringe Zahl an Effektor-T-Gedächtniszellen aufweisen, ist die Population entsprechender Zellen beim Menschen deutlich größer. Um den möglicherweise bestehenden Zusammenhang zwischen der Frequenz an T_{EM} und ihrem Beitrag zur arteriellen Dysfunktion zu erfassen, wurden C57BL/6 Mäusen zu Beginn der ATII-Behandlung je 30 µg anti-CD3 Antikörper (Klon: 145-2C11) intravenös appliziert, um durch die hierdurch hervorgerufene polyklonale Aktivierung aller T-Zellen die Anzahl von T_{EM} zu erhöhen. In diesen Versuchen wurde abweichend vom bisherigen Vorgehen nur ein Zehntel der normalen ATII-Dosis verwendet um eine mögliche Verstärkung der Entzündungsreaktion durch Effektor-T-Zellen detektieren zu können. Nach sieben Tagen wurden die T-Zellen des Blutes durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 4.12 zeigt, dass der Anteil CD62L⁻CD44⁺ exprimierender Effektor-T-Zellen in anti-CD3 behandelten Tieren zugenommen hatte.

Konzentrations-Relaxations-Messungen an isolierten Aortenringen behandelter und unbehandelter Tiere zeigten in Mäusen mit erhöhtem Effektor-T-Zell-Anteil (13% Verschlechterung der Relaxation bei maximaler ACh-Konzentration) eine im Vergleich zu Kontrolltieren (10%) tendenziell leichte Verschlechterung der endothelabhängigen Gefäßfunktion, während die endothelunabhängige Gefäßfunktion unbeeinträchtigt blieb.

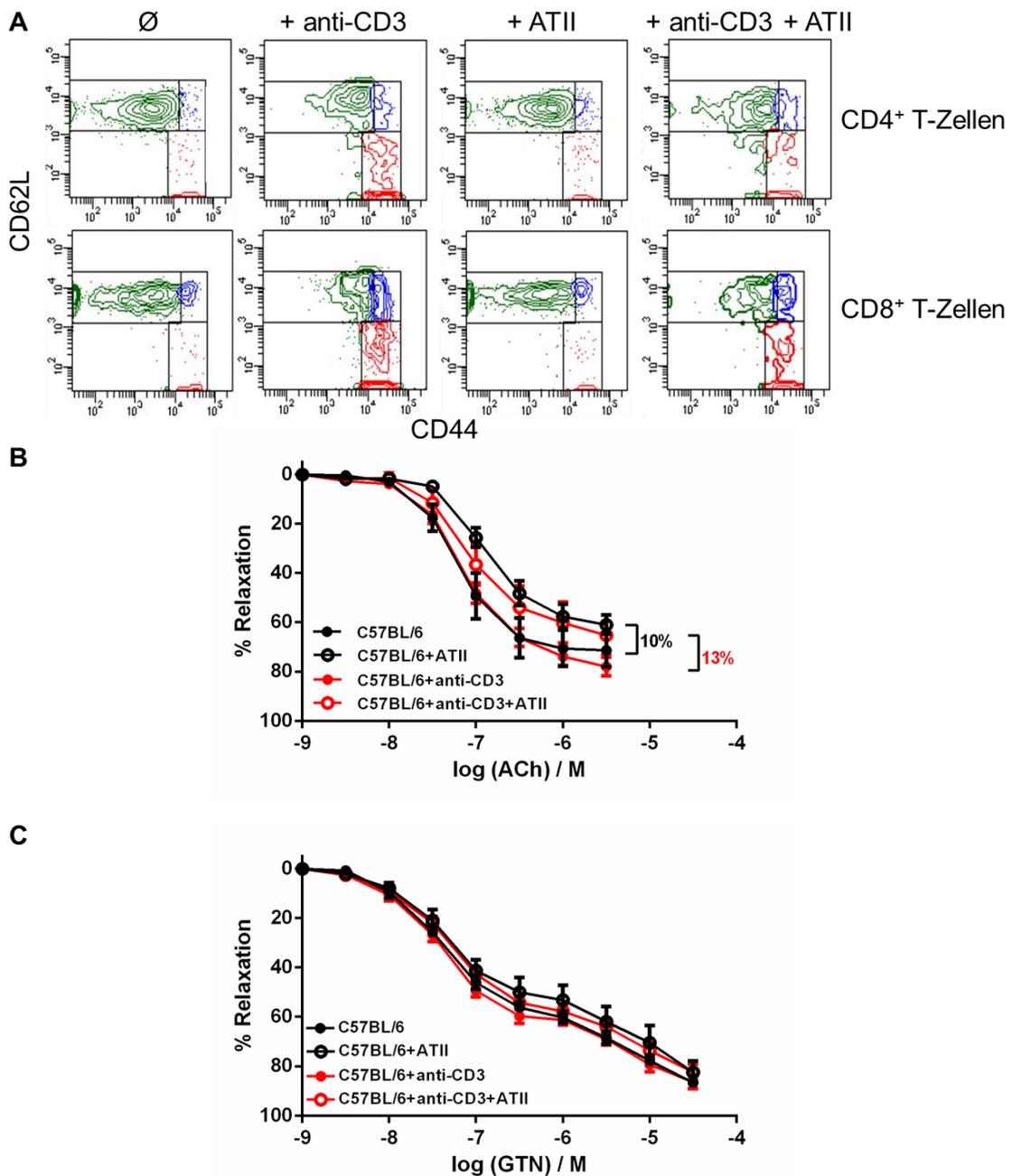


Abbildung 4.12: Die Erhöhung des Anteils an Effektor-T-Zellen führt tendenziell zu einer leichten Verschlechterung der Gefäßfunktion nach ATII-Behandlung

In C57BL/6 Mäuse wurden 30 µg des anti-CD3 Antikörpers 145-2C11 intravenös injiziert und direkt im Anschluss ATII-beladene miniosmotische Pumpen implantiert. Nach sieben Tagen wurden isolierte Aortensegmente im Organbad auf ihre Gefäßfunktion hin untersucht. Als Kontrollen dienten Tiere, die keinen Antikörper erhielten und/oder nicht ATII-behandelt wurden. A: Repräsentative Konturplots der Analyse der CD44 und CD62L Expression auf T-Zellen anti-CD3-behandelter und unbehandelter Tiere. B: Endothelabhängige Relaxation von Aortensegmenten mit steigender Konzentration an Acetylcholin (ACh). C: Endothelunabhängige Relaxation von Aortensegmenten mit steigender Glyceroltrinitrat (GTN)-Konzentration. C57BL/6 Mäuse (schwarze Kreise, geschlossen), C57BL/6 Mäusen nach ATII-Behandlung (schwarze Kreise, offen), anti-CD3-behandelte C57BL/6 Mäuse ohne (rote Kreise, geschlossen) und mit ATII-Behandlung (rote Kreise, offen). Die dargestellten Prozentwerte der ACh-Kurve geben die Relaxationsdifferenzen bei maximaler ACh-Konzentration zwischen unbehandelten und ATII-behandelten C57BL/6 (10%) und C57BL/6 + anti-CD3 (13%) an, n=6-7.

In Bezug auf die endothelunabhängige Gefäßfunktion konnten keinerlei Differenzen nachgewiesen werden. Durch die verwendete geringere ATII-Dosis ist zudem die Verschlechterung der Gefäßfunktion durch ATII auch in den Kontrolltieren nur sehr gering, so dass eine Wiederholung dieser Experimente mit einer höheren ATII Dosis zu bevorzugen ist. Außerdem wurde nicht näher untersucht, ob analog zum Blut eine erhöhte Anzahl Effektor-T-Gedächtniszellen in der Aortenwand vorhanden war. Dies stellt jedoch die Voraussetzung für die Beeinflussung der Gefäßfunktion dar.

4.1.8 Die Induktion von arteriellem Bluthochdruck durch Angiotensin II ruft eine verstärkte mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine in den entzündeten Aortenwänden hervor

Entzündungsreaktionen sind von einer verstärkten Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine begleitet. Diese können zum Teil die Migration und Funktion von T-Zellen regulieren [140,142]. Im Folgenden wurden deshalb Zytokine und Chemokine mit einem bekannten Effekt auf T-Zellen untersucht.

Zur Analyse der Expression von Zytokinen und Chemokinen in entzündeten Aorten ATII-behandelter Tiere wurde mRNA aus den Aorten ATII-behandelter und unbehandelter C57BL/6 Mäuse gewonnen. Die Isolation der mRNA wurde von Sabine Kossmann aus der AG Wenzel durchgeführt. Die Expression bekannter T-Zell-assoziiierter Zytokine und Chemokine wurden im Anschluss per real-time PCR untersucht. Der Vergleich behandelte und unbehandelte Tiere zeigte, dass die mRNA für IL-6, IL-1 β , IL-12p40 und CCL8 in der Aortenwand behandelte Tiere verstärkt exprimiert wurde (Abbildung 4.13). Alle weiteren untersuchten Zytokine und Chemokine waren dagegen nicht signifikant verändert oder leicht verringert (IL-18, IL-27).

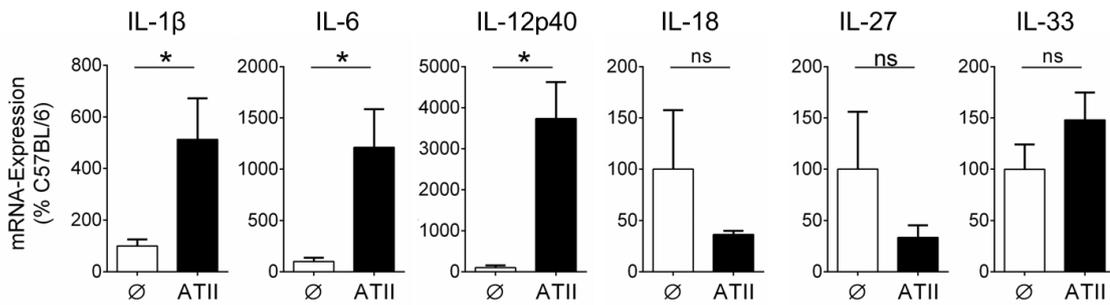
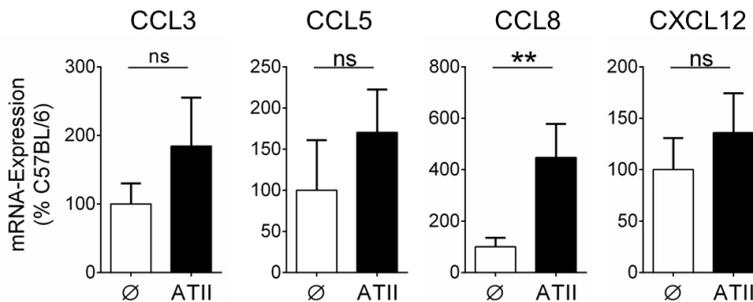
Zytokine**Chemokine**

Abbildung 4.13: Erhöhte mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in der Aorta nach ATII-Gabe

mRNA wurde aus der Aorta von unbehandelten C57BL/6 Tieren sowie ATII-behandelten Mäusen des gleichen Stammes isoliert. Die relative mRNA-Expression verschiedener Zytokine und Chemokine wurde mit Hilfe der real-time PCR-Methode untersucht. Als Haushaltsgen wurde das TATA-box bindende Protein (TBP) verwendet. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Expression in den unbehandelten Tieren wurde immer auf 100% gesetzt und die Expression in den ligierten Tieren dazu im Vergleich dargestellt. Students t-Test, n=3-6.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Induktion arteriellen Bluthochdrucks durch die systemische Gabe von ATII zu einer verstärkten Einwanderung T-bet-exprimierender, IFN- γ -kompetenter T-Zellen mit einem Effektor-Gedächtnis-Phänotyp in die Aortenwände führt. CD4⁺ T-Zellen sind für die Induktion einer arteriellen Dysfunktion nicht erforderlich, tragen als bereits gebildete Effektorzellen oder Effektor-Gedächtniszellen, möglicherweise durch die Bildung von IFN- γ , zur arteriellen Entzündung bei. Unklar ist hierbei, ob und wie T-Zellen in der Gefäßwand aktiviert werden. Nach Induktion arteriellen Bluthochdrucks werden in der Aortenwand verstärkt proinflammatorische Zytokine und Chemokine gebildet, die an Rezeptoren von eingewanderten Effektor-T-Gedächtniszellen binden und dadurch auf diese einwirken könnten.

4.2 Ergebnisse zur Rolle von T-Zellen in der venösen Thrombose

4.2.1 Venöse Thrombose ruft eine verstärkte Einwanderung von T-Zellen in die Venenwand hervor

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von T-Zellen in der venösen Thrombose im Modell der Vena Cava-Ligatur untersucht. Durch operative Restriktion des Blutflusses der Vena Cava Inferior bildet sich in ca. 60% der Mäuse innerhalb weniger Stunden ein Thrombus aus, der das Gefäß nach 24-48 Stunden vollständig verschließt und sonographisch detektiert werden kann [143]. Wie die in Abbildung 4.14 dargestellte durchflusszytometrische Analyse von Thromben zeigt, enthalten diese -neben den bekannten Bestandteilen wie Fibrin, Blutplättchen und Erythrozyten- vorwiegend Granulozyten. Weiterhin fand sich in den Thromben eine geringe Zahl an Monozyten, jedoch nur sehr wenige T-Zellen.

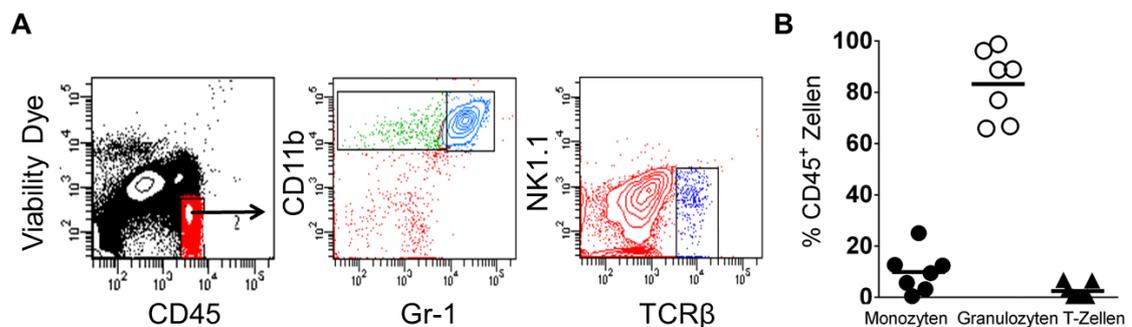


Abbildung 4.14: Venöse Thromben enthalten Granulozyten und Monozyten, aber nur wenige T-Zellen

Durch Ligation der Vena Cava gebildete Thromben wurden 48 Stunden nach der Ligation isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Tote Zellen wurden durch Anfärbung mit Viability Dye von der Analyse ausgeschlossen. A: Repräsentative Konturplots der durchflusszytometrischen Analyse. B: Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse. Die Symbole repräsentieren jeweils einzelne Versuchstiere.

Neben der Bildung von Thromben ruft die Induktion einer Venenthrombose eine verstärkte Einwanderung von Granulozyten und Monozyten, aber auch von T-Zellen in die Venenwand hervor (Abbildung 4.15). Im Gegensatz dazu weisen Venen operierter, aber nicht ligierter Mäuse sowie unbehandelter Tiere nur eine geringe Zahl an Immunzellen auf.

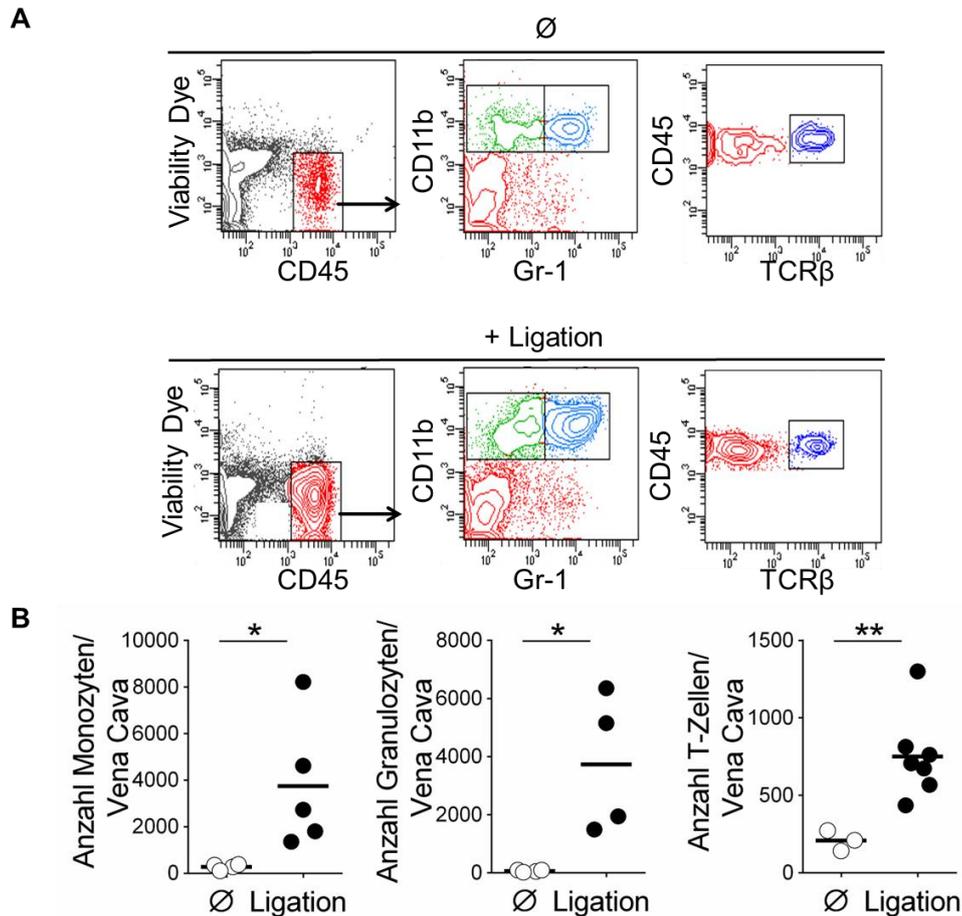


Abbildung 4.15: Venöse Thrombose ruft eine verstärkte Einwanderung von Monozyten, Granulozyten und T-Zellen in die Venenwand hervor

48 Stunden nach Ligation der Vena Cava Inferior wurden Einzelzellsuspension der Venen thrombotischer und nicht-thrombotischer C57BL/6 Mäuse mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gegen die Moleküle CD45, Gr-1, CD11b und die α/β T Zell-Rezeptors (TCR β) markiert und im Durchflusszytometer untersucht. Tote Zellen wurden durch Anfärbung mit Viability Dye von der Analyse ausgeschlossen. A: Repräsentative Konturplots der durchflusszytometrischen Identifizierung von Monozyten (CD45⁺CD11b⁺Gr-1⁺), Granulozyten (CD45⁺CD11b⁺Gr-1⁺) und T-Zellen (CD45⁺TCR β ⁺). B: Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung (t-Test). Die Symbole repräsentieren jeweils einzelne Versuchstiere.

Wie in Abbildung 4.16 dargestellt, wandern sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen zu etwa gleichen Teilen in die Venenwand thrombotischer Tiere ein. Dadurch verschiebt sich das im Blut und in den lymphatischen Organen vorliegende Verhältnis dieser Populationen in der Venenwand zugunsten der CD8⁺ T-Zellen.

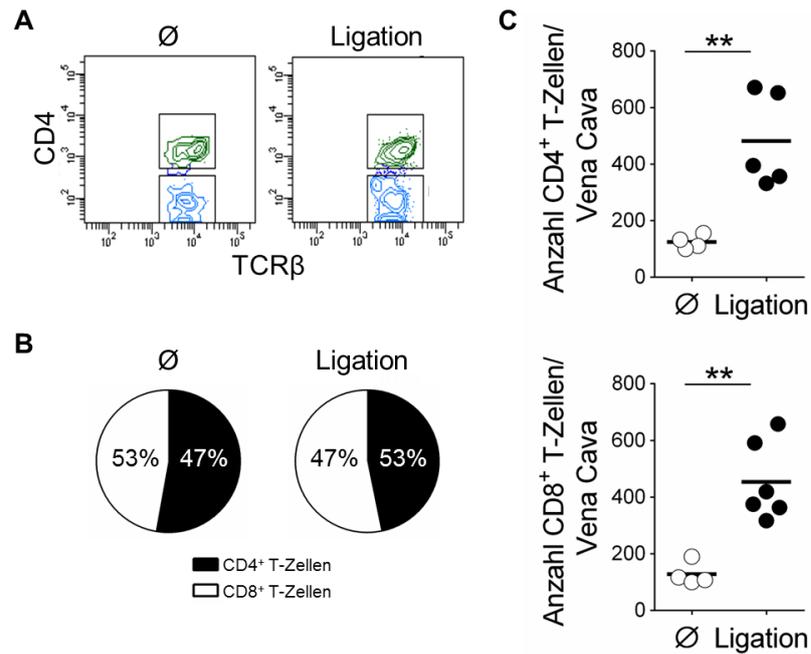


Abbildung 4.16: Einwanderung von CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen in die Venenwand thrombotischer Tiere

Analyse der Zusammensetzung des T-Zell-Infiltrats der Venenwand thrombotischer und nicht thrombotischer C57BL/6 Mäuse 48 Stunden nach Ligation. A: Repräsentative Konturplots der durchflusszytometrischen Analyse anhand der Färbung mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gegen die β -Kette des α/β T-Zell-Rezeptors, CD45 und CD4. B: Zusammenfassende grafische Darstellung der prozentualen Anteile an CD4- und CD8-exprimierenden T-Zellen in der Venenwand, n=9-12. C: Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung (t-Test). Die Symbole repräsentieren jeweils einzelne Versuchstiere.

4.2.2 In die Venenwand thrombotischer Tiere eingewanderte T-Zellen weisen überwiegend einen Effektor-Gedächtniszell-Phänotyp auf

Analog zur Zusammensetzung der T-Zell-Population in entzündeten Aortenwänden von Tieren mit Bluthochdruck (Abschnitt 4.1.2) besitzen sowohl CD4⁺ T-Zellen als auch CD8⁺ T-Zellen in der Venenwand thrombotischer Tiere vorzugsweise einen Effektor-Gedächtniszell-Phänotyp. Während zusätzlich einige wenige Zellen einen naiven Phänotyp aufwiesen, konnten fast keine Zellen mit dem Phänotyp zentraler Gedächtnis-Zellen in den Venenwänden gefunden werden (Abbildung 4.17).

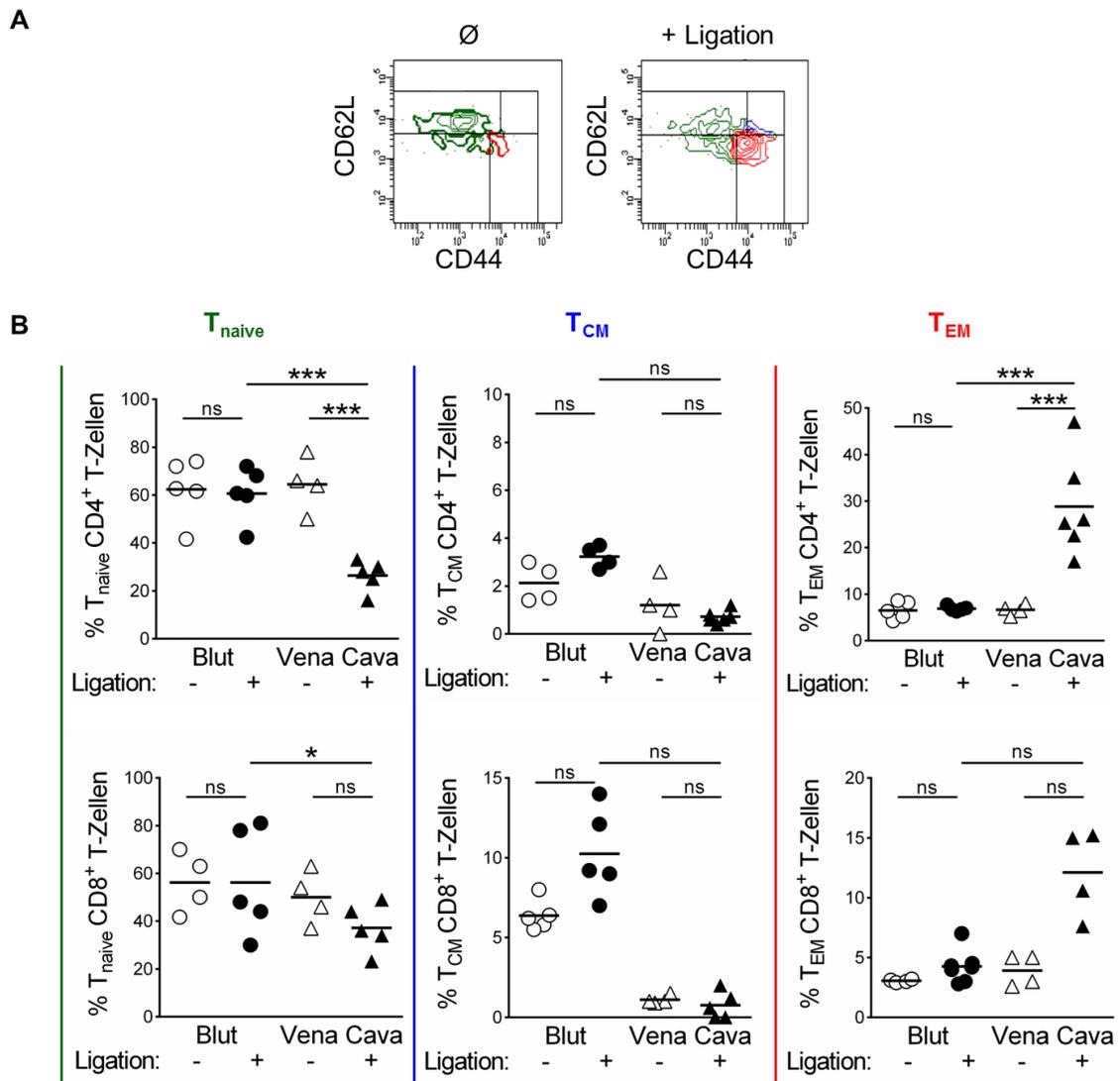


Abbildung 4.17: In die Venenwand thrombotischer Tiere wandern bevorzugt Effektor-T-Gedächtniszellen ein

Einzelzellsuspensionen des Blutes und der Venenwand wurden mit Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern gegen die Moleküle CD45, CD4, TCR β , CD44 und CD62L gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD44 und CD62L wurden naive T-Zellen (T_{naive} , CD44^{low}CD62L^{high}), zentrale Gedächtnis T-Zellen (T_{CM} , CD44^{high}CD62L^{high}) und Effektor-T-Gedächtniszellen (T_{EM} , CD44^{high}CD62L^{low}) unterschieden. A: Repräsentative Konturplots der CD44 und CD62L Expression auf T-Zellen in der Venenwand thrombotischer Tiere (+ Ligation) und nicht ligierter Kontrolltiere (\emptyset). B: Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung (One-way ANOVA). Die Symbole repräsentieren jeweils einzelne Versuchstiere.

Die Expression der α -Kette des Interleukin 2 (IL-2)-Rezeptors ist ein Merkmal aktivierter T-Zellen. Neben aktivierten T-Zellen wird CD25 konstitutiv von regulatorischen T-Zellen (Treg) exprimiert [144,145]. Diese können in der Maus anhand der zusätzlichen Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 unterschieden werden [146]. Während im Blut ligierter, thrombotischer Tiere und im Blut nicht ligierter Tiere nur wenige CD25-exprimierende, FoxP3-negative T-Zellen gefunden wurden,

wiesen durchschnittlich bis zu 60% aller T-Zellen in der Wand der Vena Cava thrombotischer Tiere diesen Phänotyp auf (Abbildung 4.18). In den Venenwänden gesunder, nicht ligierter Tiere wurden überraschenderweise ähnliche Anteile an CD25⁺FoxP3⁻ T-Zellen detektiert. Im Gegensatz dazu konnte keine Zunahme an CD25⁺FoxP3⁺ Treg in der Venenwand thrombotischer Tiere beobachtet werden (Abbildung 4.18).

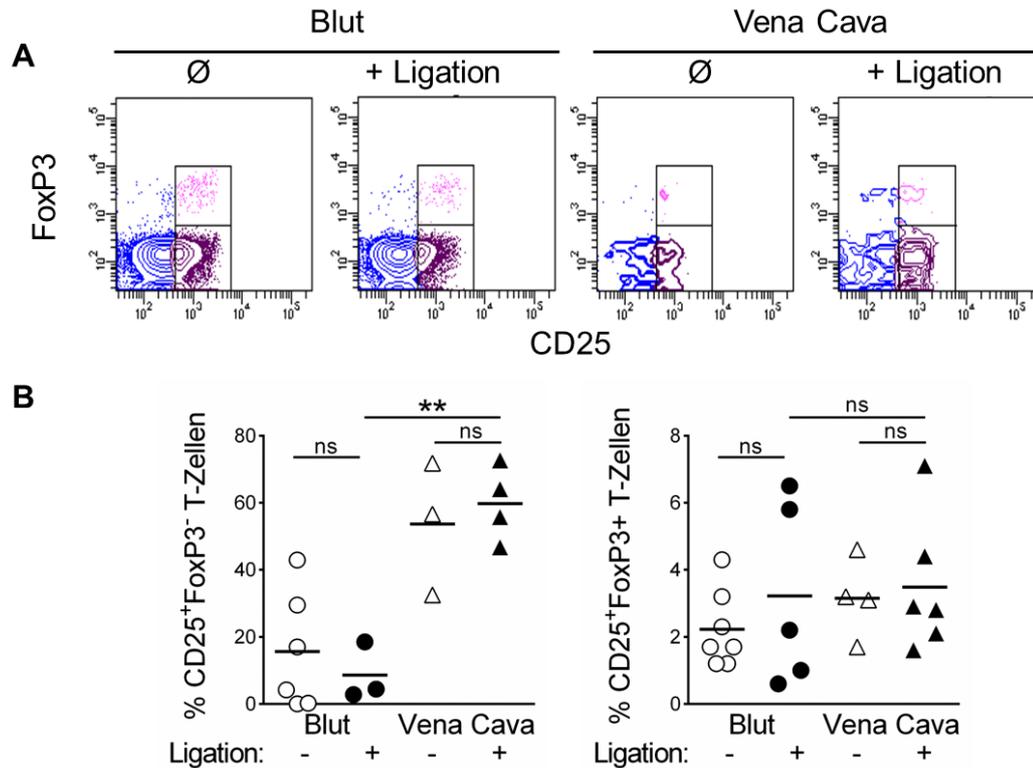


Abbildung 4.18: T-Zellen in der Venenwand thrombotischer als auch gesunder Tiere exprimieren vermehrt den Aktivierungsmarker CD25

Blutzellen und Zellen isolierter Venen wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD45, CD4, TCR β , und -nach Fixierung- gegen den Transkriptionsfaktor FoxP3 angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. A: Repräsentative Konturplots der CD25 und FoxP3-Expression der T-Zellen im Blut und in der Venenwand thrombotischer Tiere (+Ligation) und nicht ligierter Kontrolltiere (Ø). B: Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung (One-way ANOVA). Die Symbole repräsentieren jeweils einzelne Versuchstiere.

Zusammenfassend zeigen die dargestellten Ergebnisse eine präferentielle Einwanderung von Effektor-T-Gedächtniszellen in die Venenwand thrombotischer und nicht-thrombotischer Tiere. Obwohl regulatorische T-Zellen konstitutiv einen Effektor-Gedächtniszell-Phänotyp aufweisen [147], wandern diese Zellen überraschenderweise nicht vermehrt in die Venenwand ein.

4.2.3 In die Venenwand thrombotischer Tiere eingewanderte CD8⁺ T-Zellen weisen eine erhöhte Expression des Integrins $\alpha 5$ auf

Die Migration von Lymphozyten aus dem Blutstrom in Gefäßwände wird durch Adhäsionsmoleküle unterstützt. Integrine, eine Gruppe von Heterodimeren aus je einer α - und einer β -Kette, stellt eine wichtige Gruppe dieser Adhäsionsmoleküle dar. Sie besitzen zugleich signalgebende Funktionen und werden in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand der Zelle exprimiert. Um erste Hinweise auf die Beteiligung von Integrinen an der Zuwanderung von T-Zellen in die Venenwand thrombotischer Tiere zu erhalten, wurde die Expression der Integrine CD49e (Integrin alpha 5), CD18 (Integrin beta 2) und CD29 (Integrin beta 1) im Blut und der Vena Cava ligierter und nicht ligierter Kontrolltiere durchflusszytometrisch verglichen. Wie in Abbildung 4.19 schematisch dargestellt, bilden die untersuchten Integrine jeweils einen zentralen Bestandteil unterschiedlicher, gegeneinander abgegrenzter Heterodimer-Cluster.

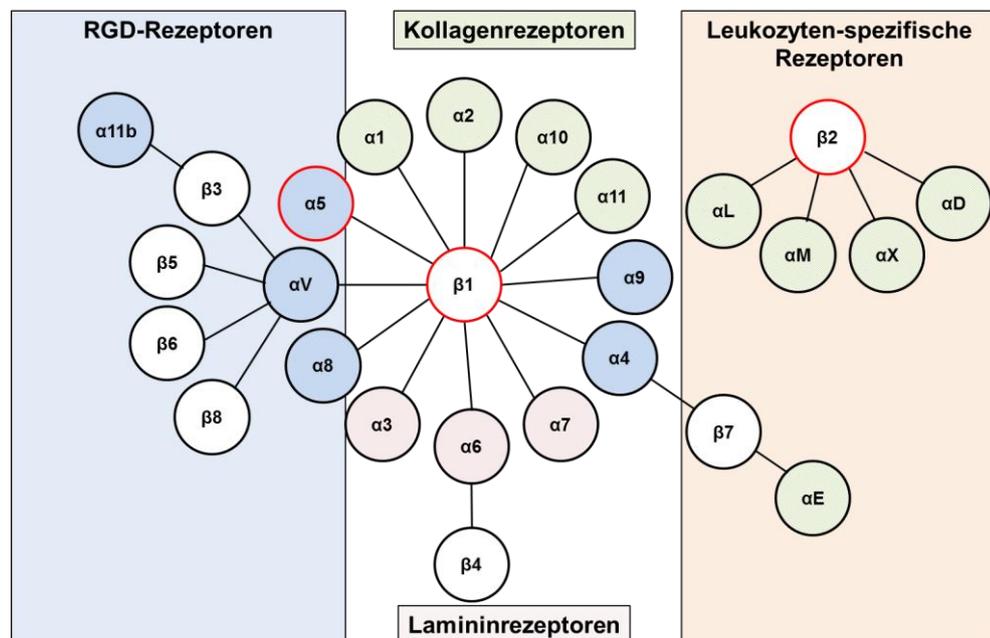


Abbildung 4.19: Schematische Darstellung der Heterodimercluster der Integrinfamilie

Die schematische Darstellung wurde adaptiert nach Hynes et al.

Der Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten (engl. Mean Fluorescence Intensity, MFI) zeigt, dass sowohl CD4- als auch CD8-exprimierende T-Zellen in der Vene im Vergleich zu Zellen des Blutes eine verringerte Expression von CD18, unabhängig von der Induktion einer Venenthrombose aufwiesen (Abbildung 4.20). Venöse CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimierten CD29 geringfügig stärker als im Blut, wobei CD4-positive T-Zellen in thrombotischen Venen keinen Unterschied zeigten. Bezüglich der Expression von CD49e konnte bei CD4-exprimierenden T-Zellen keine Differenzen festgestellt werden. Jedoch wiesen CD8-exprimierende T-Zellen eine

signifikant erhöhte Expression in der Vena Cava auf. Dieses Ergebnis war unabhängig von der Induktion einer venösen Thrombose der Fall.

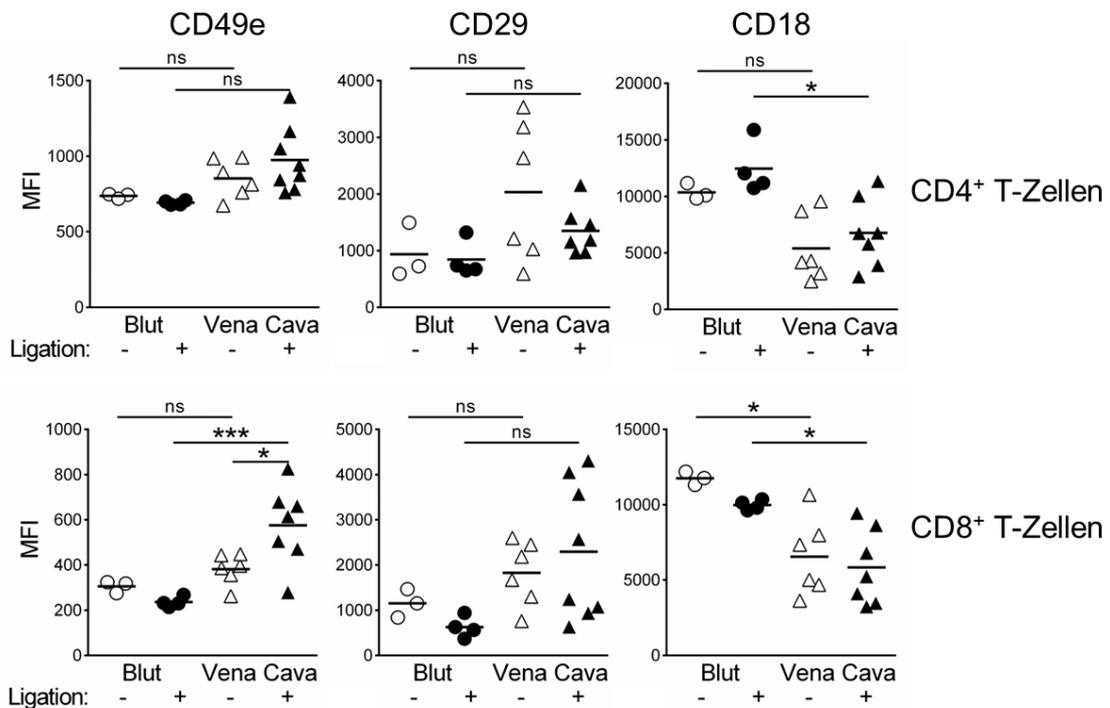


Abbildung 4.20: T-Zellen in der Venenwand weisen eine erhöhte CD49e und CD29-Expression und eine verringerte CD18-Expression auf

Durchflusszytometrische Analyse der Integrine CD49e, CD18 und CD29 auf T-Zellen im Blut und in den Venenwänden thrombotischer Mäuse und nicht ligierter Kontrolltiere. Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung (One-way ANOVA). Die Symbole repräsentieren jeweils einzelne Versuchstiere.

4.2.4 Die Depletion von Granulozyten und Monozyten beeinflusst die Infiltration von T-Zellen in die Vena Cava ligierter Tiere nur geringfügig

Die induzierten Thromben nach Vena Cava Ligation enthalten, wie bereits dargestellt, sehr viele Granulozyten. Entsprechend führt eine Depletion neutrophiler Granulozyten zu einer stark verringerten Thrombusbildung [143]. Daneben wandern Granulozyten in thrombotischen Tieren verstärkt in die Venenwand ein. Es wurde deshalb untersucht, ob die Infiltration von T-Zellen in die Venenwand die Einwanderung neutrophiler Granulozyten erfordert. Abbildung 4.21 A zeigt die erfolgreiche Depletion von Granulozyten im Blut von Mäusen denen der anti-Gr-1 Antikörper RB6-8C5 einen Tag vor Vena Cava-Ligation injiziert wurde. Wie in Abbildung 4.21 B dargestellt, verändert die Depletion der Granulozyten vor Ligation nicht die Einwanderung von T-Zellen in die Venenwand. Da die Entfernung der Granulozyten die Thrombusbildung verhindert, zeigt dieses Ergebnis zugleich, dass die Infiltration von T-Zellen in die Venenwand nicht durch die Ausbildung eines Thrombus ausgelöst wird.

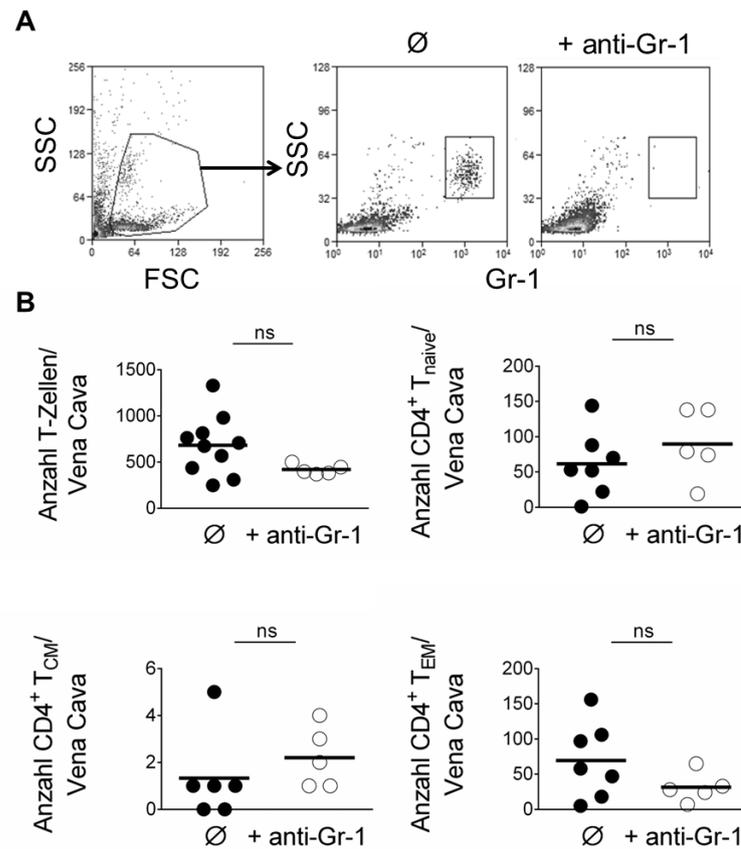


Abbildung 4.21: Die Abwesenheit neutrophiler Granulozyten beeinflusst die Einwanderung von T-Zellen in die Venenwand ligierter Tiere nicht

In C57BL/6 Mäusen wurden die neutrophilen Granulozyten durch Injektion von jeweils 150 µg/ Maus des monoklonalen anti-Gr-1 Antikörpers RB6-8C5 depletiert und die Vena Cava der Tiere einen Tag später ligiert. Isolierte Zellen der Vena Cava depletierter und nicht depletierter Tiere wurden 48 Stunden nach Ligation durchflusszytometrisch analysiert. A: Repräsentative Darstellung der Depletion neutrophiler Granulozyten im Blut anti-Gr-1-behandelter Tiere. B: Zusammenfassende grafische Darstellung der Zuwanderung von T-Zellen in die Vena Cava und statistische Auswertung (t-Test). Die Symbole repräsentieren jeweils einzelne Versuchstiere.

Als zweite Hauptpopulation innerhalb der Thromben und auch in der Vena Cava wurden Monozyten identifiziert. Um den möglichen Einfluss von Monozyten auf die Einwanderung von T-Zellen in die Wand der Vena Cava thrombotischer Tiere zu untersuchen, wurden Monozyten vor der Ligation der Vena Cava durch die Gabe von Diphtheriatoxin (DTX) in LysM^{iDTR} Tieren depletiert. Als Vergleichsgruppe dienten LysM Tiere in denen DTX keine Depletion auslöst (siehe Abschnitt 4.1.5). Während durch Ligation der Kontrolltiere die Infiltration der T-Zellen zunahm, war die Zuwanderung von T-Zellen in die Wand der Vena Cava in zuvor Monozyten-depletierten LysM^{iDTR} Tieren verringert (Abbildung 4.22).

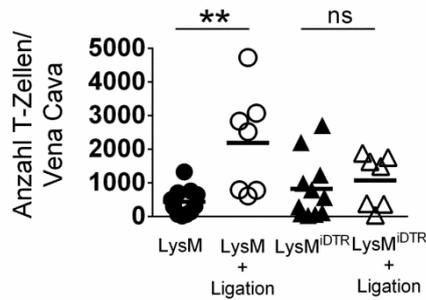


Abbildung 4.22: Die Ablation monozytärer Zellen führt zu einer leicht verringerten T-Zell-Infiltration in die Vena Cava-Wand ligierter Tiere

Durch tägliche Gabe von Diphtheriatoxin (DTX) über einen Zeitraum von 10 Tagen wurden Monozyten in LysM^{IDTR}-Tieren ablatiert (T. Schönfelder). LysM Mäuse wurden zur Kontrolle ebenfalls mit DTX behandelt. 3 Tage nach der ersten DTX-Gabe wurde die Vena Cava der Tiere ligiert und die infiltrierten T-Zellen 48 Stunden später durchflusszytometrisch analysiert. Zusammenfassende grafische Darstellung der Zuwanderung von T-Zellen in die Vena Cava mit statistischer Auswertung (One-way ANOVA). Die Symbole repräsentieren jeweils einzelne Versuchstiere.

4.2.5 T-Zellen in der Vena Cava thrombotischer Nur77-GFP-BAC-transgener

Reporter-mäuse zeigen kein T-Zell-Rezeptor-vermitteltes Aktivierungssignal

Die Antigen-abhängige Aktivierung von T-Zellen wird durch den T-Zell-Rezeptorkomplex vermittelt, dessen Stimulation ein komplexes Netzwerk von Signaltransduktionsprozessen im Zellinneren auslöst. Die Zellkerne Nur77-GFP-BAC-transgener Mäuse enthalten ein bakterielles, künstliches Chromosom (BAC) mit einer eGFP-hCre cDNA-Sequenz im Nr4a1 (Nur77) Locus [124,125][124]. Dieses Gen kodiert für einen nukleären Rezeptor, der vermutlich unter anderem eine Rolle bei der klonalen Deletion von T-Zellen im Thymus spielt [126]. Die T-Zellen Nur77-GFP-BAC-transgener Mäuse exprimieren nach Aktivierung über den T-Zell-Rezeptorkomplex vorübergehend verstärkt GFP, anhand dessen die T-Zell-Rezeptor-Stimulation qualitativ und quantitativ verfolgt werden kann. Nur77-GFP-BAC-transgene Mäuse erscheinen daher geeignet, eine T-Zell-Rezeptor-vermittelte Aktivierung von T-Zellen in der Venenwand thrombotischer Tiere nachzuweisen. Um die Verwendbarkeit des Modells für diese Fragestellung zu überprüfen, wurde zunächst eine Reihe grundlegender Versuche an den T-Zellen dieser Mäuse durchgeführt.

Nur77-GFP-BAC-transgene T-Zellen wurden *in vitro* mit einem monoklonalen, immobilisierten (an das Plastik der Zellkulturschale gebundenen) anti-CD3 Antikörper und einem anti-CD28 Antikörper stimuliert und anschließend ihre GFP Expression durchflusszytometrisch im zeitlichen Verlauf bestimmt. Wie in Abbildung 4.23 gezeigt, weisen Nur77-GFP-BAC-transgene T-Zellen nach Stimulation über den T-Zell-Rezeptorkomplex eine transient erhöhte Expression von GFP auf, deren Maximum bei 23 Stunden nach Stimulationsbeginn liegt.

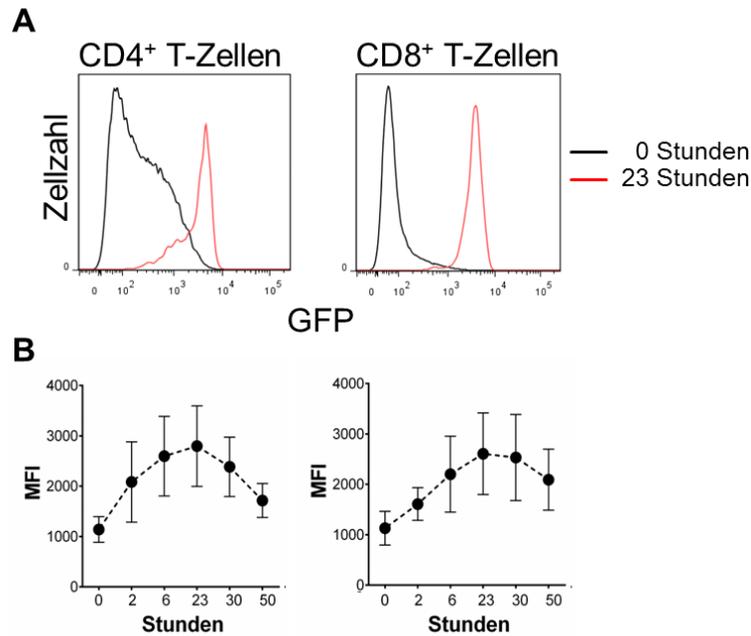


Abbildung 4.23: Kinetik der GFP-Expression Nur77-GFP-BAC-transgener T-Zellen nach Stimulation über den T-Zell-Rezeptor *in vitro*

Milzzellen von Nur77 Mäusen wurden *in vitro* mit einem immobilisierten monoklonalen anti-CD3 Antikörper (5 µg/ml anti-CD3) und einem anti-CD28 Antikörper (1 µg/ml) über den dargestellten Zeitraum stimuliert und die GFP-Expression im Durchflusszytometer analysiert. A: Die Histogramm-Darstellung zeigt vergleichend ein repräsentatives Beispiel für die erhöhte GFP-Expression 23 Stunden nach Beginn der Stimulation. B: Zusammenfassende grafische Darstellung der durchflusszytometrischen Ergebnisse. n=3.

Zur Überprüfung der Reaktivität *in vivo* wurden Nur77-GFP-BAC-transgenen Mäusen 30 µg des monoklonalen anti-CD3 Antikörpers 145-2C11 intravenös injiziert und 36 sowie 240 Stunden später die Milzzellen isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Wie in Abbildung 4.24 dargestellt, führt die polyklonale T-Zell-Rezeptor-vermittelte Aktivierung aller T-Zellen zu einer transient erhöhten Expression von GFP, die nach einigen Tagen zum Ausgangswert zurückkehrt.

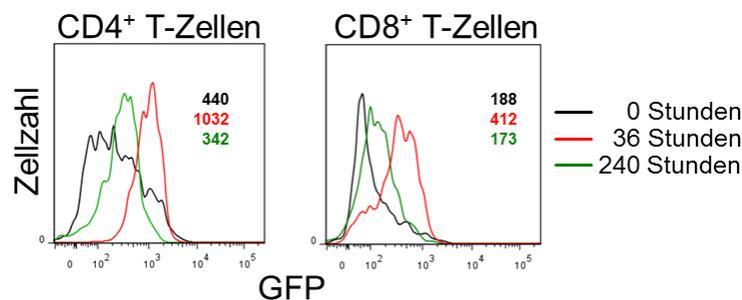


Abbildung 4.24: GFP-Expression Nur77-GFP-BAC-transgener T-Zellen 36 Stunden und 240 Stunden nach Injektion eines monoklonalen anti-CD3 Antikörpers

Nur77-GFP-BAC-transgenen Mäusen wurden je 30 µg des monoklonalen anti-CD3 Antikörpers 145-2C11 intravenös injiziert und die GFP-Expression CD4- und CD8-exprimierender T-Zellen aus der Milz nach 36 und 240 Stunden durchflusszytometrisch untersucht.

Um eine T-Zell-Rezeptor-vermittelte Aktivierung von T-Zellen in der Venenwand thrombotischer Nur77-GFP-BAC-transgener Mäuse zuverlässig nachweisen zu können, ist es notwendig, die anhand erhöhter GFP-Expression identifizierbaren Frequenzen aktivierter Zellen zu ermitteln. Dazu wurden unterschiedliche Anzahlen T-Zell-Rezeptor-stimulierter Nur77-GFP-BAC-transgener T-Zellen 24 Stunden nach ihrer Aktivierung mit steigenden Zellzahlen unstimulierter Milzzellen kokultiviert und durchflusszytometrisch analysiert. Neben der Messung der GFP Expression wurden die Zellen zusätzlich mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper gegen den frühen Aktivierungsmarker CD69 gefärbt. In diesen Versuchen konnten aktivierte CD4⁺ T-Zellen bis zu einer Frequenz von 1 Zelle in 10000 Zellen (0,01%), aktivierte CD8⁺ T-Zellen bis zu einer Frequenz von 1 Zelle in 100 Zellen (1%) eindeutig vor dem Hintergrund unstimulierter Zellen detektiert werden (Abbildung 4.25).

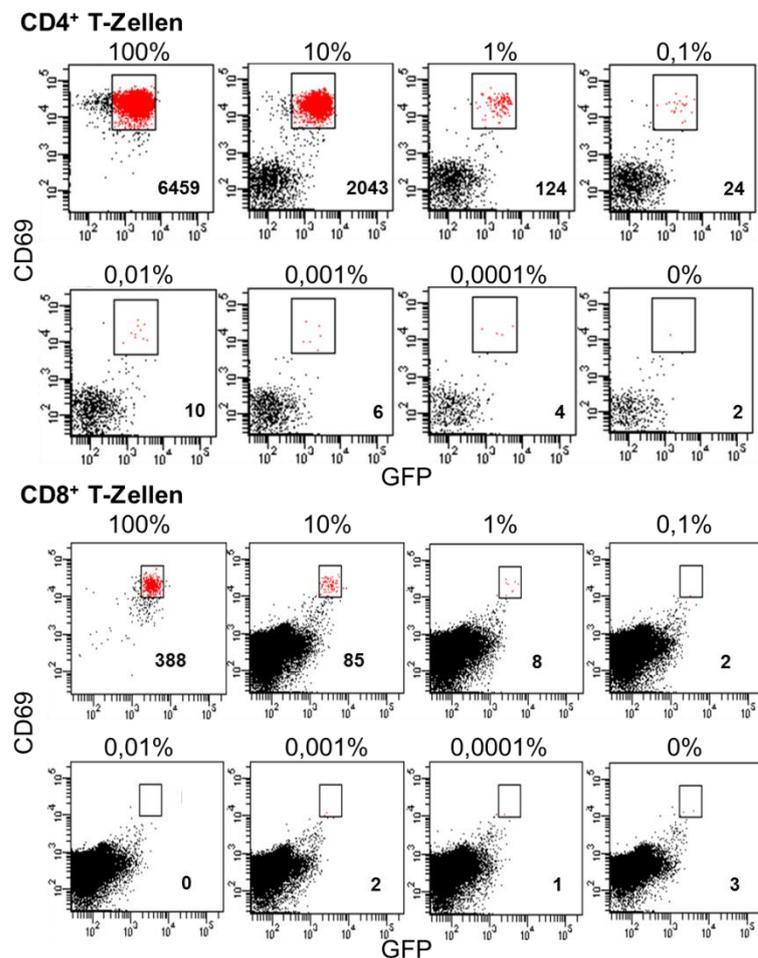


Abbildung 4.25: Bestimmung der nachweisbaren Frequenz aktivierter Nur77-GFP-BAC-transgener T-Zellen

Polyklonal stimulierte Nur77-GFP-BAC-transgene T-Zellen wurden 24 Stunden nach Beginn der Stimulation in den angegebenen Verhältnissen mit ruhenden Milzzellen gemischt und anhand der GFP-Expression und CD69-Expression (siehe erstes Gate) detektiert. Tote Zellen wurden durch Anfärbung mit Viability Dye von der Analyse ausgeschlossen.

Nachfolgend wurde untersucht, ob die Induktion venöser Thrombose in Nur77-GFP-BAC-transgenen Mäusen zu einer erhöhten GFP-Expression von T-Zellen in der Venenwand führt. Dies würde implizieren, dass infiltrierte T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor aktiviert wurden. Dazu wurden die Venen von unligierten, ligierten und anti-CD3-behandelten Nur77 Mäusen 24 Stunden nach Ligation bzw Injektion des Antikörpers entnommen und die GFP- und CD69-Expression der T-Zellen in der Gefäßwand durchflusszytometrisch analysiert.

Im Gegensatz zu Mäusen, in denen durch Injektion des anti-CD3 Antikörpers alle T-Zellen stimuliert wurden, konnten in der Venenwand thrombotischer Mäuse 24 Stunden nach Ligation keine T-Zellen mit erhöhter GFP-Expression gefunden werden (hier nicht dargestellt). Überraschenderweise zeigte ein Teil der CD4⁺ T-Zellen sowie der CD8⁺ T-Zellen in der Venenwand thrombotischer Tiere im Vergleich zu nicht ligierten Tieren eine erhöhte CD69-Expression (Abbildung 4.26). Um den Anteil an Zellen mit erhöhter CD69 Expression zu bestimmen, wurde im Vergleich der CD69-Expression un behandelter Tiere ein Grenzwert der Fluoreszenz bestimmt und auf diesem basierend eine prozentuale Auswertung vorgenommen. Zusätzlich wurden die MFI-Werte der jeweiligen Gesamtpopulation verglichen.

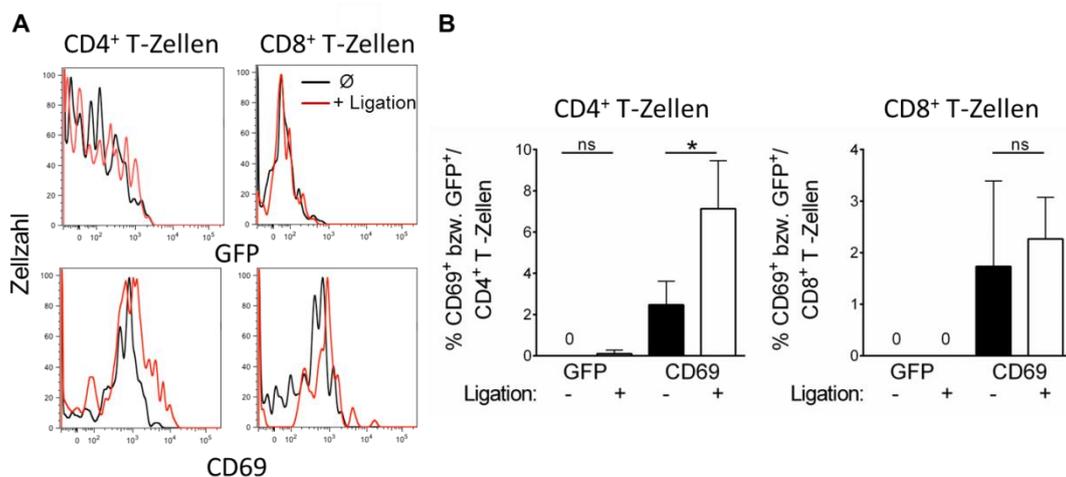


Abbildung 4.26: T-Zellen von Nur77 Mäusen in der Vena Cava zeigen keine GFP-Expression nach Ligation

24 Stunden nach Ligation der Vena Cava wurden T-Zellen der Venenwand durchflusszytometrisch auf die Expression von GFP und CD69 untersucht. Unbehandelte Tiere dienten als Negativkontrollen (∅). A: Repräsentative Konturplots. B: Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung (t-Test), n=3.

Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass die Induktion einer venösen Thrombose innerhalb des Untersuchungszeitraumes nicht zu einer Antigen-vermittelten Aktivierung von T-Zellen in der Venenwand führt. Allerdings weist eine Zunahme des

Anteils CD69-exprimierender T-Zellen in der Vena Cava thrombotischer Mäuse zugleich darauf hin, dass T-Zellen in der Vene aktiviert werden.

4.2.6 Die Induktion venöser Thrombose erhöht die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine in der Venenwand

Neben einer Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor kann die Funktion von T-Zellen, insbesondere nach einer bereits erfolgten Aktivierung, über Zytokine und Chemokine moduliert werden. Um die Modalitäten einer möglichen Aktivierung von T-Zellen in den Venen thrombotischer Tiere zu entschlüsseln, wurde die Genexpression thrombotischer und unbehandelter Venen verglichen.

Dazu wurde mRNA aus der Vena Cava von Kontrolltieren und thrombotischen Tieren 48 Stunden nach Induktion der Thrombose isoliert. Um eine hohe Reinheit der RNA sicherzustellen, wurde eine Probe der RNA per Kapillarelektrophorese entsprechend der Fragmentgröße aufgetrennt und anhand des Elektropherogramms der sogenannte RIN-Wert (RNA integrity number) bestimmt (Abbildung 4.27 A). RNA mit einem Wert größer acht wurde mittels „TruSeq® RNA Sample Preparation v2“ von Illumina in eine cDNA-Bibliothek umgeschrieben und DNA-Abschnitte durch Gen-Sequenzierung (engl. New gene sequencing, NGS) bestimmt. Aus der Liste der regulierten Gene wurde eine Liste der Zytokine und Chemokine erstellt, die eine positive Veränderungsrate (fold change) größer oder gleich zwei aufwiesen (Abbildung 4.27 B).

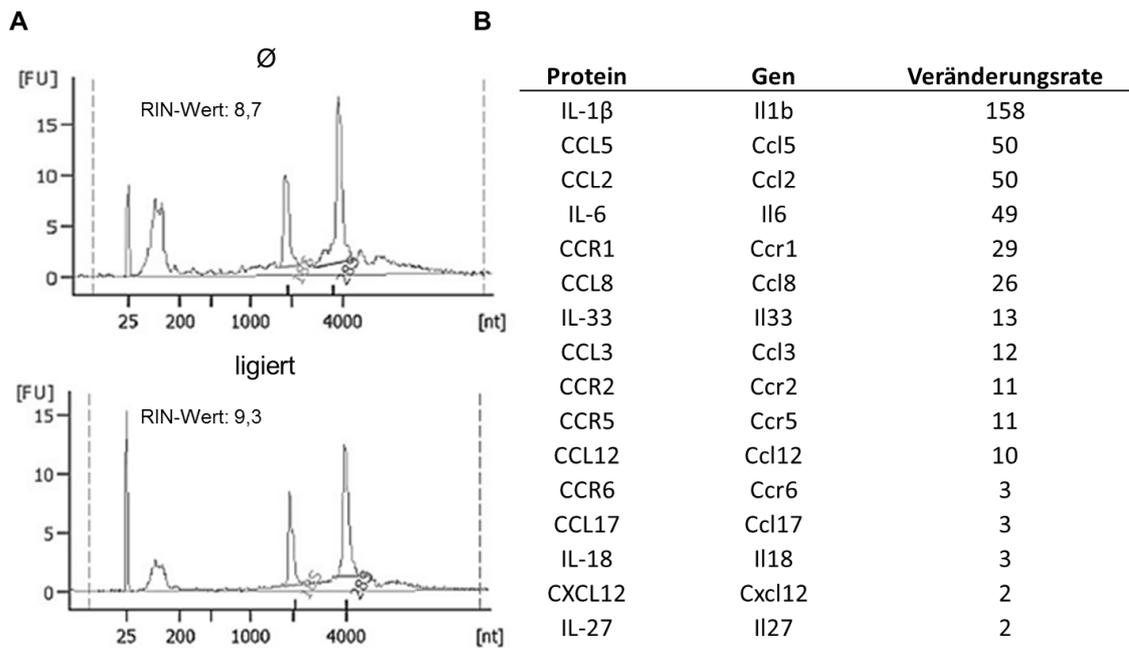
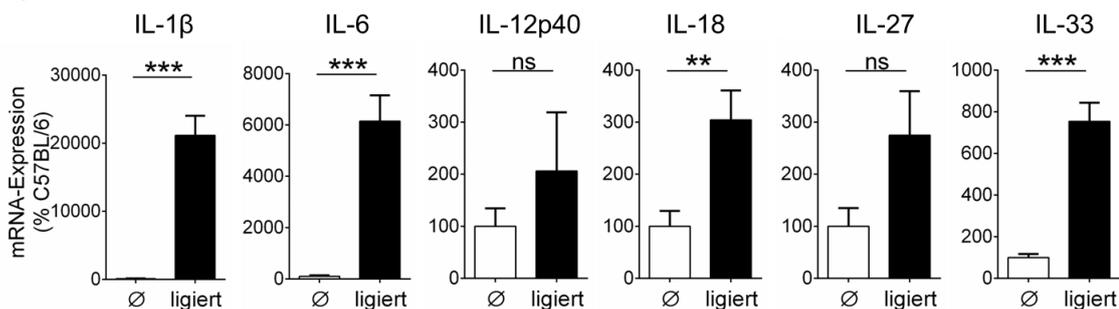
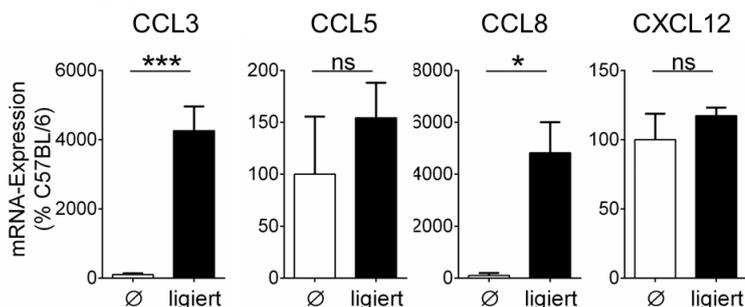


Abbildung 4.27: Die Induktion einer Thrombose führt zur verstärkten mRNA-Expression zahlreicher Zytokine und Chemokine in der Venenwand

A: Elektropherogramme und RIN-Werte der verwendeten mRNA aus je einem unbehandelten (oben) und einem ligierten Tier (unten). Abzisse: Nucleotide, Ordinate: Fluoreszenz der Fragmente. Peaks in der Reihenfolge von links nach rechts: Marker, 5s, 18s, 28s Fragmente. B: Veränderungsrate der Gen-Expression von Zytokinen und Chemokinen in thrombotischen gegenüber nicht-thrombotischen Venen. Eingeschlossen wurden alle Zytokine und Chemokine mit einer Veränderungsrate größer oder gleich 2.

Die Ergebnisse der NGS-Analyse wurden mittels real-time PCR überprüft. Dazu wurde erneut mRNA aus den Venen unbehalteter Kontrolltiere und thrombotischer C57BL/6 Mäuse generiert und die Expression der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-18, IL-33 und IL-27, sowie der Chemokine CCL3, CCL5, CCL8 und CXCL12 verglichen. Die Auswahl der Chemokine erfolgte anhand publizierter Daten zum Einfluss auf T-Zellen [142,148–152]. Chemokine ohne nachgewiesene Wirkung auf die Funktion von T-Zellen wurden nicht überprüft. Durch die real-time PCR konnten die Daten der Sequenzierung größtenteils bestätigt werden. Neben IL-1 β werden vor allem IL-6, IL-18 und IL-33 in thrombotischen Venen verstärkt gebildet. Bei den Chemokinen konnte eine signifikant höhere mRNA-Expression der Chemokine CCL3 und CCL8 in thrombotischen Venen gemessen werden (Abbildung 4.28).

Zytokine**Chemokine****Abbildung 4.28: Erhöhte mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in der Vena Cava Inferior thrombotischer Tiere**

Nachweis der Regulation der mRNA-Expression ausgewählter Zytokine und Chemokine in den Venen un behandelter und thrombotischer C57BL/6 Mäuse mittels real-time PCR. Als Haushaltsgen wurde das TATA-box bindende Protein (TBP) verwendet. Die Expression in den Venen un behandelter Tiere wurde jeweils auf 100% gesetzt. t-Test, n=3-6.

Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass die Ligation der Vena Cava eine lokal gesteigerte Bildung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine hervorruft.

4.3 In thrombotischen Venen lösen verstärkt exprimierte Zytokine und Chemokine eine T-Zell-Rezeptor-unabhängige IFN- γ -Bildung in Effektor-T-Gedächtniszellen aus

Um die Wirkung in thrombotischen Venen verstärkt exprimierter Zytokine und Chemokine auf T-Zellen zu untersuchen, wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus den Milzen von C57BL/6 Mäusen isoliert und *in vitro* mit den rekombinanten Zytokinen IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-18, IL-33 und IL-27, sowie den Chemokinen CCL2, CCL3 und CCL8 inkubiert. Diese Auswahl wurde durch die vor allem von aktivierten Monozyten gebildeten Zytokinen IFN- β , IL-23, IL-8 und TNF- α erweitert, für die eine Beteiligung an thrombotischen Ereignissen sowie der Regulation von Effektor-T-Zellen diskutiert wird [153–157]. Wie in Abbildung 4.29 dargestellt, induzieren die ausgewählten Zytokine und Chemokine die Bildung von IFN- γ in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, wobei eine maximale Produktion 24 Stunden nach Beginn der Stimulation beobachtet wurde.

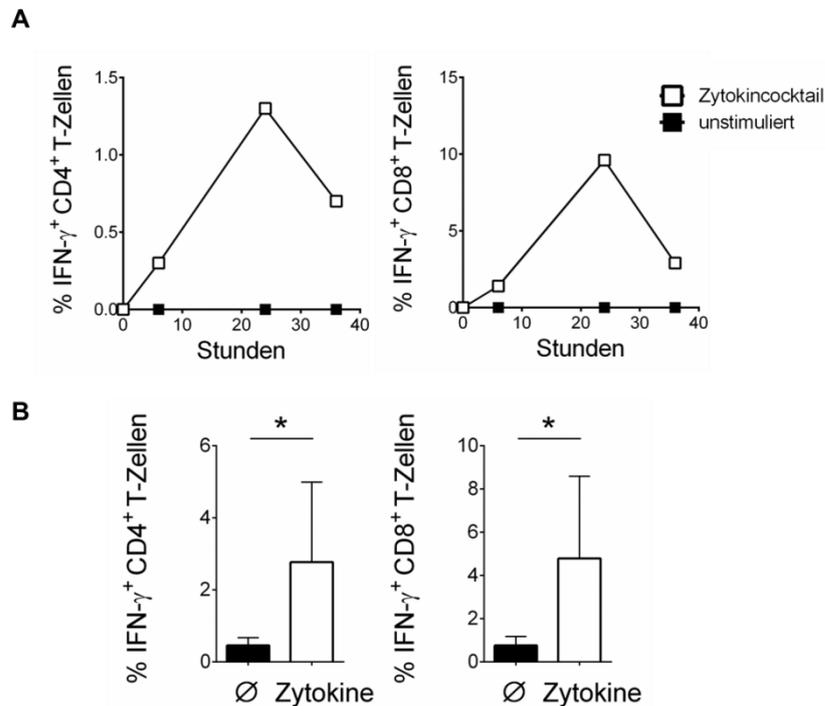


Abbildung 4.29: In thrombotischen Venen induzieren verstärkt exprimierte Zytokine und Chemokine die Bildung von IFN- γ in T-Zellen

Isolierte CD4- und CD8-exprimierende T-Zellen wurden *in vitro* für 24 Stunden (oder nach 6, 24 und 36 Stunden) mit rekombinanten murinen Zytokinen und Chemokinen (500 U/ml IFN β , 20 ng/ml IL-1 β , 20 ng/ml IL-6, 20 ng/ml IL-8, 20 ng/ml IL-12, 20 ng/ml IL-18, 20 ng/ml IL-23, 20 ng/ml IL-27, 20 ng/ml IL-33, 20 ng/ml TNF α , 20 ng/ml CCL2, 20 ng/ml CCL3 und 20 ng/ml CCL8) inkubiert. Jeweils eine Stunde vor den angegebenen Zeitpunkten wurde den Kulturen 10 μ g/ml Brefeldin zugegeben. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle (\emptyset). Anschließend wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen die Moleküle CD4 und die β -Kette des α/β -T-Zell-Rezeptors und nach Fixierung gegen IFN- γ gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Tote Zellen wurden durch Anfärbung mit Viability Dye von der Analyse ausgeschlossen. A: Repräsentative grafische Darstellung der Kinetik mit Milzzellen. B: Zusammenfassende grafische Darstellung des Anteils IFN- γ -bildender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation durch venös exprimierte Zytokine/Chemokine mit statistischer Auswertung (t-Test), n=6-8.

Eine Analyse des Phänotyps IFN- γ -bildender CD4⁺ T-Zellen ergab, dass diese ausschließlich einen Effektor-Gedächtniszell-Phänotyp aufweisen. Im Gegensatz dazu enthielt die Population IFN- γ -bildender CD8⁺ T-Zellen neben Zellen mit einem Effektor-Gedächtniszell-Phänotyp auch Zellen mit einem naiven Phänotyp (Abbildung 4.30).

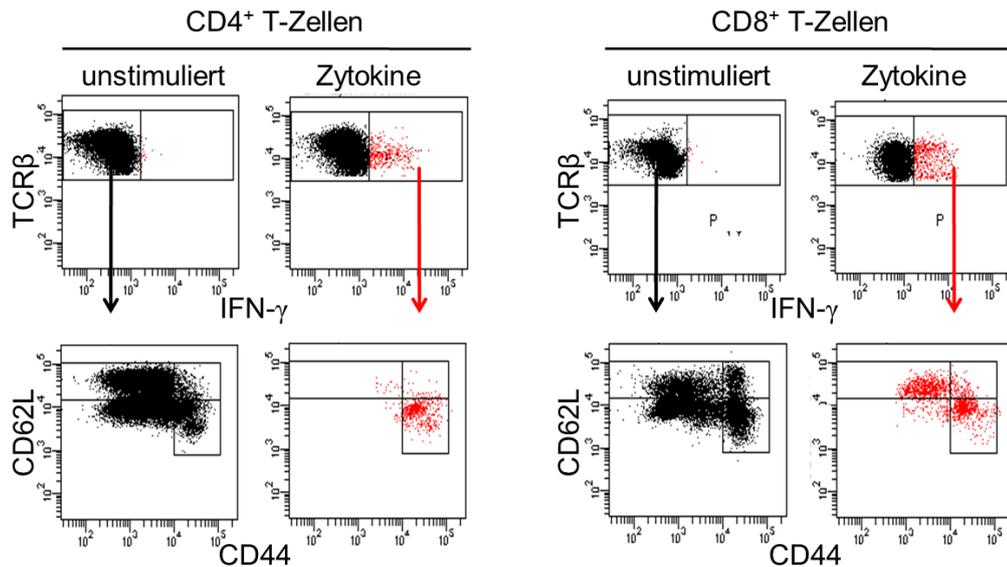


Abbildung 4.30: IFN- γ -exprimierende CD4⁺ T-Zellen weisen vorwiegend einen Effektor-T-Gedächtniszell-Phänotyp auf

Isolierte CD4- und CD8-exprimierende T-Zellen wurden wie in Abbildung 4.29 beschrieben *in vitro* für 48 Stunden mit rekombinanten murinen Zytokinen inkubiert. Jeweils eine Stunde vor den angegebenen Zeitpunkten wurde den Kulturen 10 μ g/ml Brefeldin zugegeben. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern gegen die Moleküle CD4, CD62L, CD44 und die β -Kette des α/β -T-Zellrezeptors und nach Fixierung gegen IFN- γ gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Tote Zellen wurden durch Anfärbung mit Viability Dye von der Analyse ausgeschlossen. Repräsentative Konturplots der durchflusszytometrischen Messungen von CD4- und CD8-exprimierenden T-Zellen.

Da in vorausgehenden Experimenten in Nur77-GFP-BAC-transgenen Mäusen eine erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf T-Zellen in den Venen thrombotischer Tiere beobachtet wurde, wurde zusätzlich überprüft, ob die Stimulation über Zytokine/Chemokine die GFP-Expression und/oder die CD69-Expression in Nur77-GFP-BAC-transgenen T-Zellen beeinflusst. Dazu wurden CD4- und CD8-exprimierende T-Zellen aus den Milzen von Nur77-GFP-BAC-transgenen Mäusen isoliert und unter den gleichen Bedingungen wie zuvor mit und ohne Zytokin-„Cocktail“ für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit monoklonalen anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern stimuliert wurden, sowie unstimulierte Zellen. Durch die Stimulation mit dem Zytokin-„Cocktail“ wurde sowohl in CD4- als auch in CD8-exprimierenden Nur77-GFP-BAC-transgenen T-Zellen die CD69-Expression gesteigert. Im Gegensatz dazu konnte keine Veränderung der GFP-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 4.31). Die durch den Zytokin-„Cocktail“ induzierte CD69-Expression war in CD4⁺ T-Zellen geringer als die durch eine Antikörper-Stimulation erzielte CD69-Expression.

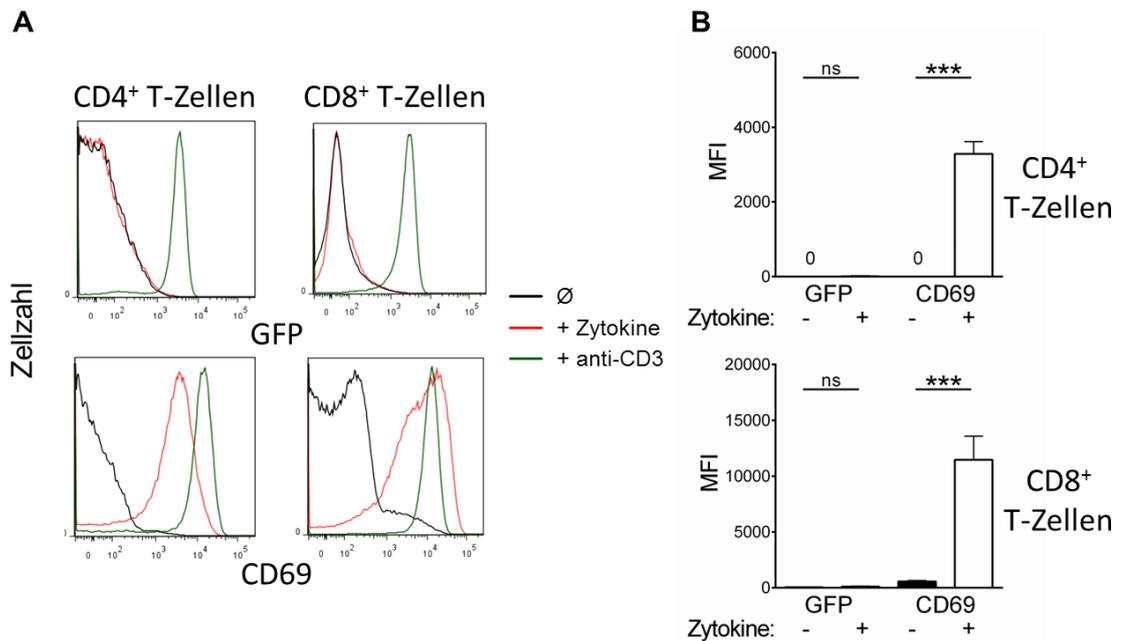


Abbildung 4.31: Die Stimulation von T-Zellen durch Zytokine verläuft unabhängig vom T-Zellrezeptor

Isolierte CD4- und CD8-positive T-Zellen von Nur77 Mäusen wurden *in vitro* in Kulturmedium für 24 Stunden mit einem Cocktail aus Zytokinen (500 U/ml IFN β , 20 ng/ml IL-1 β , 20 ng/ml IL-6, 20 ng/ml IL-8, 20 ng/ml IL-12, 20 ng/ml IL-18, 20 ng/ml IL-23, 20 ng/ml IL-27, 20 ng/ml IL-33, 20 ng/ml TNF α , 20 ng/ml CCL2, 20 ng/ml CCL3 und 20 ng/ml CCL8) stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Negativkontrolle (\emptyset) und anti-CD3 (5 μ g/ml, Platte gebunden)/ anti-CD28 (1 μ g/ml, löslich) Zellen wurden als Positivkontrolle (+) verwendet. Es folgte eine Markierung der Moleküle CD4, CD69 und der β -Kette des α/β -T-Zellrezeptors mit Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern. Tote Zellen wurden durch Anfärbung mit Viability Dye ausgeschlossen und viable Zellen durchflusszytometrisch analysiert. A: Repräsentative Konturplots. B Repräsentative Konturplots. C: Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung (t-Test), n=3 (Positivkontrolle: n=1).

Diese Beobachtung zeigt, dass die in den Venen thrombotischer Tiere verstärkt exprimierte Zytokine und Chemokine T-Zellen aktivieren können. An dieser Aktivierung scheint das Molekül Nur77 und damit vermutlich auch der T-Zell-Rezeptor nicht beteiligt zu sein.

Zusammenfassend führen die Beobachtungen in dieser Arbeit im Vena Cava Modell der venösen Thrombose zu der Vermutung, dass Effektor-T-Gedächtniszellen in thrombotische Venen einwandern und dort durch lokal produzierte Zytokine und Chemokine aktiviert werden. Ein Teil der eingewanderten T-Zellen beteiligt sich in Folge der Zytokin-vermittelten Aktivierung durch Bildung von IFN- γ an der lokalen Entzündung. Da in den durchgeführten Experimenten keine Hinweise auf eine substantielle Beteiligung einer Antigen-spezifischen Aktivierung venöser T-Zellen gefunden werden konnte, erscheint eine lokale Aktivierung eingewanderter T-Zellen durch vaskuläre Antigene in der Venenwand unwahrscheinlich.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von T-Zellen bei der Entstehung von arteriellem Bluthochdruck und venöser Thrombose untersucht.

Eine Beteiligung von T-Zellen an der Entstehung arteriellen Bluthochdrucks wurde bereits in Arbeiten aus der Gruppe von David Harrison postuliert [87,91]. Allerdings blieb in diesen Arbeiten der Mechanismus der Rekrutierung und lokalen Aktivierung von T-Zellen in der Aortenwand ungeklärt. In Übereinstimmung mit den genannten Veröffentlichungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass arterieller Bluthochdruck eine verstärkte Einwanderung konventioneller, α/β T-Zell-Rezeptor-exprimierender, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in die Aortenwand auslöst. Darüber hinaus konnte erstmals gezeigt werden, dass T-Zellen in der Aorta von Tieren mit arteriellem Bluthochdruck überwiegend einen Effektor-Gedächtnis-Phänotyp aufweisen und in einem aktivierten Zustand vorliegen. Diese Beobachtung entspricht der besonderen Fähigkeit dieser T-Zell-Population in entzündetes, nicht-lymphatisches Gewebe einzuwandern und dort bereits kurz nach Aktivierung Effektorzytokine zu bilden [8]. Obwohl die vielfach beobachtete Bindung von T-Zellen an das luminale Endothel eine Einwanderung aus dem Blut nahelegt [158–161], werden T-Zellen in isolierten Aortenringen überwiegend in der Adventitia, also der äußeren Schicht des Gefäßes, gefunden [72]. Untersuchungen an arteriosklerotischen Mäusen zeigen, dass perivaskuläres Fett, welches an der Gefäßwand haftet, insbesondere als Quelle inflammatorischer Zytokine, eine bedeutende Rolle in der Rekrutierung von Immunzellen in die Gefäßwand spielt [162–164]. In dieser Arbeit wurde bei der Präparation von Aorten anhaftendes Fettgewebe vollständig entfernt, um ausschließlich bereits in das Aortengewebe infiltrierte Zellen zu untersuchen.

Trotz der beobachteten Einwanderung von T-Zellen in die Aortenwand von Tieren mit Bluthochdruck zeigt eine Depletion aller CD4-exprimierenden T-Zellen (einschließlich regulatorischer T-Zellen) keinen Einfluss auf die durch Angiotensin II nachfolgend induzierte Gefäßdysfunktion. Dies lässt darauf schließen, dass die depletierte Population für die Entstehung ATII-induzierter Gefäßdysfunktion und Blutdruckerhöhung nicht erforderlich ist, schließt aber eine Rolle CD8-exprimierender T-Zellen nicht aus. Da der Versuch in immunologisch naiven Mäusen durchgeführt wurde, die nur eine geringe Zahl an Effektor-T-Zellen und Effektor-T-Gedächtniszellen aufweisen, kann ein Beitrag einer größeren Anzahl solcher Zellen ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu Tieren in der experimentellen Haltung

weisen Menschen eine größere Zahl an Effektor-T-Zellen und Effektor-T-Gedächtniszellen im Blut und in den lymphatischen Organen auf [165]. Hier liegt zugleich ein wichtiger Unterschied zu bisher publizierten Daten: In der bereits zitierten Arbeit von Guzik et al. wurden T-Zellen in T-Zell-defiziente Mäuse übertragen, die Empfängertiere aber erst mehrere Wochen später mit ATII behandelt. Dieses Vorgehen bewirkt eine (ATII-unabhängige) lymphopene Expansion der übertragenen T-Zellen, eine Differenzierung der expandierenden T-Zellen zu Th1-ähnlichen Effektor-Gedächtniszellen und eine Entwicklung von Autoimmunität [166,167]. Um eine mögliche Abhängigkeit zwischen beobachteten T-Zell-Effekten und Effektor-T-Zell-Frequenzen zu klären, wurde in dieser Arbeit durch Injektion eines T-Zell-stimulierenden anti-CD3 Antikörpers die Frequenz an Effektor-T-Zellen vor der ATII-Behandlung der Tiere erhöht. Durch Stimulation aller T-Zellen wurde jedoch nur eine geringe weitere Steigerung der Gefäßentzündung erreicht. Dieses Ergebnis kann so interpretiert werden, dass der wesentliche Beitrag zur Gefäßinflammation von angeborenen Immunzellen geleistet wird. Diese Interpretation stimmt mit unseren vorausgehenden Beobachtungen überein, dass insbesondere die Rekrutierung und wechselseitige Aktivierung von Monozyten und NK-Zellen zentrale Prozesse in der Entstehung arteriellen Bluthochdrucks darstellen [72,83,168]. Die wechselseitige Aktivierung von Monozyten und NK-Zellen in der Gefäßwand führt offenbar zu der hier ebenfalls erstmals dargestellten erhöhten Expression zahlreicher, vor allem von Monozyten gebildeter, inflammatorischer Zytokine und Chemokine. Gerade letztere könnten wiederum für die Rekrutierung von Effektor-T-Gedächtniszellen ursächlich sein. So wurde bereits gezeigt, dass die bei Bluthochdruck in die Aorta einwandernden T-Zellen vermehrt den Chemokinrezeptor CCR5 exprimieren [87]. CCR5-exprimierende T-Zellen wandern vor allem in Richtung der entsprechenden Liganden CCL5 (RANTES) und CCL3 (MIP-1 α), welche bevorzugt von Monozyten gebildet werden [169,170]. Die dargestellten Versuche in LysM^{IDTR} Mäusen zeigen eine Abhängigkeit der Infiltration IFN- γ -bildender T-Zellen von Monozyten, was ebenfalls für den postulierten Zusammenhang spricht. Umgekehrt konnten wir bereits zeigen, dass die in T-bet-defizienten Mäusen leicht verringerte Einwanderung von T-Zellen mit einer verminderten Einwanderung von Monozyten und einer geringeren lokalen Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine verbunden ist [83].

Sowohl unsere eigenen Arbeiten als auch Untersuchungen anderer Gruppen enthalten zahlreiche Hinweise, dass die Erhöhung des arteriellen Blutdrucks neben einer verstärkten Einwanderung von T-Zellen in die Aortenwand mit einer systemischen Aktivierung von T-Zellen verbunden ist. So nimmt beispielsweise bei Bluthochdruck die

Frequenz IFN- γ -bildender T-Zellen in den lymphatischen Organen zu [171,172]. Weiterhin wurde gezeigt, dass unter Bluthochdruck im Blut zirkulierende T-Zellen nach einer polyklonalen Stimulation *ex vivo* vermehrt die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-17 produzieren [87,91]. Die Aktivierung zahlreicher T-Zellen könnte damit zusammenhängen, dass der auf T-Zellen exprimierte AT1-Rezeptor in der Aktivierung von T-Zellen als Korezeptor fungiert und die Proliferation und Zytokinbildung aktivierter T-Zellen steigert [80,85,173,174]. Allerdings konnte kein Einfluss einer T-Zell-spezifischen AT1-Rezeptor-Defizienz auf die Entstehung von Bluthochdruck gefunden werden [175].

Zusammenfassend erscheinen Effektor-T-Gedächtniszellen einerseits befähigt, einen Beitrag zur Entzündung des Aortengewebes bei Bluthochdruck leisten zu können, andererseits scheint ihre Beteiligung, zumindest in der Entstehungsphase des Bluthochdrucks, nicht erforderlich zu sein.

Im Gegensatz zu experimentellen Systemen in denen bislang nahezu ausschließlich die Rolle von Immunzellen in der kurzzeitigen Induktion arteriellen Bluthochdrucks untersucht wurde, verläuft die Erkrankung in Patienten chronisch und möglicherweise unter Beteiligung autoimmuner Prozesse [97,176–178]. Im Gegensatz zur frühen Phase der Entstehung könnte deshalb die Beteiligung von T-Zellen, insbesondere auf Grund ihrer Fähigkeit Gedächtniszellen zu bilden, für die spätere Chronifizierung der Erkrankungen und die Entwicklung von Autoimmunität von entscheidender Bedeutung sein.

Zur Beteiligung von T-Zellen an der venösen Thrombose gibt es keine direkten Hinweise in der Literatur. Wie die geringe Anzahl von T-Zellen in venösen Thromben andeutet (Abbildung 4.14), spielen T-Zellen in der unmittelbaren Thrombenbildung vermutlich keine Rolle. Beobachtungen im Modell der Venenligation ergaben, dass vor allem Granulozyten durch die Ausbildung sogenannter „neutrophil extracellular traps“ (NET) die Thrombenbildung maßgeblich beeinflussen [143].

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass eine Verengung des Venenvolumens durch Ligatur eine Einwanderung von Immunzellen in die Venenwand auslöst, an der auch T-Zellen beteiligt sind. Analog zur Entzündung der Arterien beim Bluthochdruck wandern vor allem Monozyten und Granulozyten zu etwa gleichen Teilen in die Venenwand thrombotischer Tiere ein. Zugleich ruft die Ligation der Vene eine verstärkte Einwanderung von T-Zellen in die Venenwand hervor. Die Depletion von Granulozyten im Modell der venösen Thrombose zeigte keine Effekte auf die T-

Zell-Infiltration, so dass diese Zellen trotz ihrer wesentlichen Rolle in der Thrombusbildung vermutlich nicht in größerem Umfang an der Modulation der T-Zellen in der Gefäßwand beteiligt sind.

Wie bereits im Bluthochdruckmodell beobachtet, weisen in die Gefäßwand eingewanderte T-Zellen überwiegend einen Effektor-Gedächtniszell-Phänotyp auf. Zugleich zeigt die Mehrzahl der T-Zellen in der Venenwand thrombotischer Tiere einen aktivierten Zustand, gekennzeichnet unter anderem durch Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors, CD25. Überraschenderweise wandern regulatorische T-Zellen, obwohl diese ebenfalls überwiegend einen Effektor-Gedächtniszell-Phänotyp aufweisen [146], nicht vermehrt in die Venenwand ein, so dass weitere Rezeptoren an der Regulation der Einwanderung oder eine Differenz in der Reaktivität auf die in der entzündeten Venenwand gebildeten Chemokine beteiligt sein müssen.

Neben den Chemokinrezeptoren sind auch die Moleküle der Integrin-Familie wichtige Vermittler von Zell-Zell-Interaktionen, Adhäsion und Transmigration. Eine erhöhte Expression von CD49e/CD29 ist in der Literatur für Gedächtnis-T-Zellen im humanen System beschrieben und vermittelt die Bindung an Fibronectin, eine wichtige Komponente der extrazellulären Matrix [179,180]. Allerdings konnte in den dargestellten Versuchen kein Zusammenhang zwischen der Expression dieser Integrine und der Einwanderung in die Venenwand gefunden werden.

Von mehreren Arbeitsgruppen wurde die Existenz sogenannter vaskulärer T-Zell-Antigene postuliert [181–183]. Die Einwanderung von T-Zellen in die Venenwand ist daher mit der Frage verbunden, ob T-Zellen in der Venenwand über ihren T-Zell-Rezeptor aktiviert werden. Die hier vorgelegten Versuche in Nur77-GFP BAC-transgenen Mäusen konnten jedoch keinen Hinweis auf eine substantielle Population an T-Zellen erbringen, die innerhalb des Zeitraums der Untersuchung, 24-48 Stunden nach Ligation, über den T-Zell-Rezeptor aktiviert wird. Dies schließt eine entsprechende Aktivierung einzelner Zellen zum untersuchten oder einem späteren Zeitpunkt nicht aus. Allerdings zeigen vor allem CD4-exprimierende T-Zellen zum untersuchten Zeitpunkt durchaus Anzeichen einer aktuellen Aktivierung (CD69-Expression), so dass angenommen werden kann, dass die überwiegende Zahl eingewanderter T-Zellen T-Zell-Rezeptor-unabhängig aktiviert wird. Auf der Suche nach dem möglichen Aktivierungsmechanismus konnte gezeigt werden, dass die Induktion venöser Thrombose die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine in der Venenwand erhöht. Interessanterweise lösen diese Zytokine und Chemokine in Effektor-T-Gedächtniszellen eine T-Zell-Rezeptor-unabhängige IFN-

γ -Bildung aus. Diese Form der Aktivierung ist mit einer Hochregulation der CD69-Expression verbunden, welche ebenfalls in der Venenwand an eingewanderten T-Zellen beobachtet wird.

Zusammenfassend sprechen diese Beobachtungen für eine T-Zell-Rezeptor-unabhängige Aktivierung von Effektor-T-Zellen durch die in der entzündeten Venenwand gebildeten Zytokine und Chemokine.

Beide Erkrankungen, Bluthochdruck und venöse Thrombose, sind durch eine Einwanderung von T-Zellen in die Gefäßwände gekennzeichnet. In beiden Modellen wandern nahezu ausschließlich Effektor-T-Gedächtniszellen ein und werden in der jeweils betroffenen Gefäßwand aktiviert. Außerdem wird die Zuwanderung von T-Zellen in die Gefäßwände sowohl beim Bluthochdruck als auch im Rahmen der venösen Thrombose durch die Anwesenheit von Monozyten beeinflusst. Die zwei Erkrankungen führen zur verstärkten Expression eines ähnlichen Musters an Zytokinen und Chemokinen in der entzündeten Gefäßwand. Diese Zytokine und Chemokine können insbesondere von Monozyten gebildet werden. Das in den entzündeten Gefäßwänden gebildete Zytokin/Chemokin-Muster löst in rekombinanter Form in T-Zellen eine Bildung von IFN- γ aus und ist mit einer Hochregulation der CD69-Expression verbunden. Die Aktivierung durch vaskuläre Zytokine und Chemokine ist weitgehend auf Effektor-T-Gedächtniszellen beschränkt.

Die Ergebnisse deuten insgesamt, sowohl beim Bluthochdruck als auch bei venöser Thrombose, auf eine T-Zell-Rezeptor-unabhängige Aktivierung eingewanderter T-Zellen in den Gefäßwänden und eine Beteiligung der aktivierten T-Zellen an der Gefäßinflammation durch die Bildung unter anderem von IFN- γ hin.

Genauerer Untersuchung bedarf die Zusammensetzung des verwendeten Zytokin-„Cocktails“. So müssen mögliche Zytokin-Kombinationen in Hinblick auf ihre modulierende Wirkung auf T-Zellfunktionen im Detail analysiert werden, um relevante Kombinationen zu identifizieren, welche sich auf die Proliferation, Zytotoxizität oder Zytokinproduktion neben der IFN- γ -Expression von T-Zellen auswirken.

Im Verlauf von Entzündungsreaktionen werden T-Zellen normalerweise vielen verschiedenen Zytokinen ausgesetzt, die in ihrer Gesamtheit zur Modulation der T-Zellen beitragen und sich dabei gegenseitig verstärken oder abschwächen können. Weiterhin wurde gezeigt, dass Zytokin-Kombinationen zu einer Hochregulation von CD69 und damit einer T-Zell-Aktivierung unabhängig von der Zytokinproduktion führen

können [42]. Deshalb müssen verschiedene Kombinationen an Zytokinen und Chemokinen hinsichtlich ihrer Wirkung auf unterschiedliche T-Zellfunktionen untersucht werden.

Ergänzend muss die tatsächliche T-Zell-Expression an IFN- γ in der Venenwand nach Induktion einer venösen Thrombose *in vivo* detektiert werden. Dafür sollen IFN- γ Reporter-mäuse verwendet werden, deren IFN- γ -exprimierende T-Zellen gleichzeitig GFP exprimieren und somit eindeutig identifiziert werden können.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der T-Zellen in der Entstehung des arteriellen Bluthochdrucks und der venösen Thrombose in Mausmodellen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in beiden Erkrankungen, Effektor-T-Gedächtniszellen in die Gefäßwände einwandern. Sowohl die dem Bluthochdruck zugrundeliegende Entzündung der Arterienwände als auch die durch venöse Thrombose ausgelöste Entzündung der Venenwand ist mit der verstärkten Expression eines ähnlichen Musters an Zytokinen und Chemokinen verbunden. Diese Kombination kann in Effektor-T-Gedächtniszellen die Bildung von IFN- γ auslösen. Dagegen konnten keine Hinweise auf eine T-Zell-Rezeptor-vermittelte Aktivierung der infiltrierten T-Zellen in entzündeten Gefäßwänden gefunden werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse weisen erstmals eine Beteiligung von T-Zellen an der Entzündung der Venenwand im Rahmen einer venösen Thrombose nach. Des Weiteren konnten erstmals Hinweise darauf gefunden werden, dass T-Zellen Gefäßentzündungen durch eine Zytokin-induzierte IFN- γ -Bildung erhalten und verstärken.

Die vorliegende Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Rolle von T-Zellen in der Entstehung von Gefäßentzündungen. Die erzielten Ergebnisse helfen, neue Ansatzpunkte für eine Prävention eines – möglicherweise auf die Beteiligung von T-Zellen zurückzuführenden – chronischen Verlaufs kardiovaskulärer Erkrankungen zu entwickeln.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Medzhitov, R. and Janeway, C. a (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295–8
- 2 Janeway, C. a and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216
- 3 Akira, S. *et al.* (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801
- 4 Koyama, S. *et al.* (2008) Innate immune response to viral infection. *Cytokine* DOI: 10.1016/ARTICLE
- 5 Takeuchi, O. and Akira, S. (2009) Innate immunity to virus infection. *Immunol. Rev.* 227, 75–86
- 6 Murphy, K.M. *et al.* (2008) *Janeway's Immunobiology*, (7th edn)
- 7 Boehm, T. (2011) Design principles of adaptive immune systems. *Nat Rev Immunol* 11, 307–317
- 8 Lipp, M. *et al.* (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials. *Nature* 401, 708–712
- 9 Woodland, D.L. and Kohlmeier, J.E. (2009) Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 153–61
- 10 Mackay, C.R. (1999) Dual personality of memory T cells. *Nature* 401, 659–660
- 11 Chen, G.Y. and Nunez, G. (2010) Sterile inflammation : sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10, 826–837
- 12 Rock, K.L. *et al.* (2010) The Sterile Inflammatory Response. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 321–342
- 13 Bianchi, M.E. (2007) DAMPs , PAMPs and alarmins : all we need to know about danger Abstract : Multicellular animals detect pathogens. *J. Leu* 81, 1–5
- 14 Foell, D. *et al.* (2007) Mechanisms of Disease : a “ DAMP ” view of inflammatory arthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 3, 382–390
- 15 Vocanson, M. *et al.* (2009) Characterization of a CD44/CD122int memory CD8 T cell subset generated under sterile inflammatory conditions. *J. Immunol.* DOI: 10.4049/jimmunol.0802438
- 16 Schwartz, R.H. (1985) T -lymphocyte recognition of antigen in products of the major histocompatibility complex! *Annu. Rev. Immunol.* 3, 237–261
- 17 Davis, M.M. (1990) T cell receptor gene diversity and selection. *Annu. Rev. Biochem.*
- 18 Treanor, B. (2012) B-cell receptor : from resting state to activate. *Immunology* 136, 21–27
- 19 Brownlie, R.J. and Zamoyska, R. (2013) REVIEWS T cell receptor signalling networks : branched , diversified and bounded. *Nat. Publ. Gr.* 13, 257–269
- 20 Neefjes, J. *et al.* (2011) Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 823–836

- 21 Koretzky, G.A. (2010) Multiple Roles of CD4 and CD8 in T Cell Activation. *J Immunol* 185, 2643–2644
- 22 Wu, Y. *et al.* (2009) Human gd T Cells : A Lymphoid Lineage Cell Capable of. *J. Immunol.* DOI: 10.4049/jimmunol.0901772
- 23 Wucherpfennig, K.W. *et al.* (2010) Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a005140
- 24 Clevers, H. *et al.* (1988) The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu. Rev. Biochem.* 6, 629–662
- 25 Palmer, E. (2003) Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 383–391
- 26 Klein, L. *et al.* (2009) Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 833–844
- 27 Van Seventer, G. a *et al.* (1991) Roles of multiple accessory molecules in T-cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 3, 294–303
- 28 Broere, F. *et al.* (2011) *Principles of Immunopharmacology*, Birkhäuser Basel.
- 29 Tominaga, K. *et al.* (2000) IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1 β for IFN- γ production from human T cells. *Int. Immunol.* 12, 151–160
- 30 Strengell, M. *et al.* (2003) IL-21 in Synergy with IL-15 or IL-18 Enhances IFN- γ Production in Human NK and T Cells. *J Immunol* 170, 5464–5469
- 31 Szabo, S.J. *et al.* (2002) Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* (80-.). 295, 338–342
- 32 Lighvani, a a *et al.* (2001) T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 15137–42
- 33 Szabo, S.J. *et al.* (2000) A Novel Transcription Factor , T-bet , Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* 100, 655–669
- 34 Mullen, A.C. *et al.* (2001) Role of T-bet in Commitment of T H 1 Cells Before IL-12 – Dependent Selection. *Science* (80-.). 292, 1907–1910
- 35 Rogge, B.L. *et al.* (1997) Selective Expression of an Interleukin-12 Receptor Component by Human T Helper 1 Cells. *J Exp Med* 185, 825–831
- 36 Afkarian, M. *et al.* (2002) T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4 + T cells. *Nat. Immunol.* 3, 549–557
- 37 Xu, B.D. *et al.* (1998) Selective Expression and Functions of Interleukin 18 Receptor on T Helper (Th) Type 1 but not Th2 Cells. *J Exp Med* 188, 1485–1492
- 38 Ahn, H.-J. *et al.* (1997) A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-g-inducing Factor in enhanced production of IFN-g. *J. Immunol.*
- 39 Chang, J.T. *et al.* (2000) The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit. *Eur. J. Immunol.* 30, 1113–1119
- 40 Yoshimoto, T. *et al.* (1998) IL-12 Up-Regulates IL-18 Receptor Expression on T Cells, Th1 Cells, and B Cells: Synergism with IL-18 for IFN- γ Production. *J. Exp. Med.* 161, 3400–3407

- 41 Yang, J. *et al.* (2001) IL-18 – stimulated GADD45 β required in cytokine-induced , but not TCR-induced , IFN- γ production. *Nat. Immunol.* 2, 157–164
- 42 Freeman, B.E. *et al.* Regulation of innate CD8+ T-cell activation mediated by cytokines. , *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109. (2012) , 9971–9976
- 43 Monteleone, G. *et al.* (1998) Response of human intestinal lamina propria T lymphocytes to interleukin 12 : additive effects of interleukin 15 and 7. *Gut* 43, 620–628
- 44 Jennes, W. *et al.* (2002) Enhanced ELISPOT detection of antigen-specific T cell responses from cryopreserved specimens with addition of both IL-7 and IL-15 — the Amplispot assay. *J. Immunol. Methods* 270, 99–108
- 45 Guo, L. *et al.* (2009) IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2 , Th17 , and Th1 cells. *PNAS* 106, 13463–13468
- 46 Sattler, A. *et al.* (2009) Cytokine-induced human IFN-gamma-secreting effector-memory Th cells in chronic autoimmune inflammation. *Blood* 113, 1948–1956
- 47 Erbel, R. and Eggebrecht, H. (2006) Aortic dimensions and the risk of dissection. *Heart* 92, 137–42
- 48 Mutschler, E. *et al.* (2007) *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*,
- 49 Majesky, M.W. *et al.* (2011) The Adventitia: A Progenitor Cell Niche for the Vessel Wall. *Cells Tissues Organs* 195, 73–81
- 50 Marieb, E. (2004) *Human anatomy & physiology*, (6th edn) Pearson Benjamin Cummings.
- 51 Zhou, A. *et al.* (2010) A redox switch in angiotensinogen modulates angiotensin release. *Nature* 468, 1–4
- 52 Guang, C. *et al.* (2012) Three key proteases - angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin - within and beyond the renin-angiotensin system. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 105, 373–85
- 53 Krauss, G. (2008) *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 2
- 54 Lu, H.K. *et al.* (1996) Angiotensin II stimulates T-type Ca²⁺ channel currents via activation of a G protein, Gi. *Am. J. Physiol.* 271, C1340–9
- 55 Martini, a *et al.* (2010) Angiotensin II regulates endothelial cell migration through calcium influx via T-type calcium channel in human umbilical vein endothelial cells. *Acta Physiol. (Oxf)*. 198, 449–55
- 56 Wynne, B. *et al.* (2009) Vascular smooth muscle cell signaling mechanisms for contraction to angiotensin II and endothelin-1. *J. Am. Soc. ...* 3, 84–95
- 57 Arun, K.H.S. *et al.* (2005) AT1 receptors and L-type calcium channels: functional coupling in supersensitivity to angiotensin II in diabetic rats. *Cardiovasc. Res.* 65, 374–86
- 58 Kim, S. and Iwao, H. (2000) Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol. Rev.* 52, 11–34
- 59 Ito, M. *et al.* (1995) Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3521–3525

- 60 Ichikawa, I. and Brenner, B.M. (1980) Importance of efferent arteriolar vascular tone in regulation of proximal tubule fluid reabsorption and glomerulotubular balance in the rat. *J. Clin. Invest.* 65, 1192–1201
- 61 Crowley, S.D. *et al.* (2006) Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17985–17990
- 62 Aguilera, G. and Catt, K.J. (1978) Regulation of aldosterone secretion by the renin-angiotensin system during sodium restriction in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 4057–4061
- 63 (2012) *European Cardiovascular Disease Statistics*,
- 64 Chobanian, A. V *et al.* (2003) Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 42, 1206–52
- 65 Patarroyo Aponte, M.M. and Francis, G.S. (2012) Effect of Angiotensin-converting enzyme inhibitors and Angiotensin receptor antagonists in atherosclerosis prevention. *Curr. Cardiol. Rep.* 14, 433–42
- 66 Iyer, A. *et al.* (2010) The DOCA-Salt Hypertensive Rat as a Model of Cardiovascular Oxidative and Inflammatory Stress. *Curr. Cardiol. Rev.* 6, 291–297
- 67 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. *J. Clin. Invest.* 97, 1916–23
- 68 Cave, A.C. *et al.* (2006) NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxidants redox Signal.* 8, 691–728
- 69 Landmesser, U. (2002) Role of p47phox in Vascular Oxidative Stress and Hypertension Caused by Angiotensin II. *Hypertension* 40, 511–515
- 70 Garrido, A.M. and Griendling, K.K. (2009) NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 302, 148–158
- 71 El Bekay, R. *et al.* (2003) Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF-kappaB. *Blood* 102, 662–71
- 72 Wenzel, P. *et al.* (2011) Lysozyme M-Positive Monocytes Mediate Angiotensin II-Induced Arterial Hypertension and Vascular Dysfunction. *Circulation* 124, 1370–1381
- 73 Lim, H.S. *et al.* (2006) Reactive oxygen species production by circulating monocytes: insights from pathophysiology to clinical hypertension. *J. Hum. Hypertens.* 20, 307–9
- 74 Seifert, R. *et al.* (1989) Activation of NADPH oxidase by purine and pyrimidine nucleotides involves G proteins and is potentiated by chemotactic peptides. *Biochem. J.* 259, 813–9
- 75 Pacher, L. *et al.* (2011) Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424
- 76 Beckman, J.S. and Koppenol, W.H. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271, C1424–37

- 77 Andrew, P.J. and Mayer, B. (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* 43, 521–531
- 78 Schaap, P. (2005) Guanylyl cyclases across the tree of life. *Front. Biosci. a J. virtual Libr.* 10, 1485–1498
- 79 Schlossmann, J. and Hofmann, F. (2005) cGMP-dependent protein kinases in drug discovery. *Drug Discov. Today* 10, 627–634
- 80 Maeda, A. *et al.* (2009) Immunosuppressive effect of angiotensin receptor blocker on stimulation of mice CTLs by angiotensin II. *Int. Immunopharmacol.* 9, 1183–8
- 81 Kintscher, U. *et al.* (2001) Angiotensin II induces migration and Pyk2/paxillin phosphorylation of human monocytes. *Hypertension* 37, 587–593
- 82 Dörffel, Y. *et al.* (1999) Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. *Hypertension* 34, 113–117
- 83 Kossmann, S. *et al.* (2013) Angiotensin II-induced vascular dysfunction depends on interferon- γ -driven immune cell recruitment and mutual activation of monocytes and NK-cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1313–9
- 84 Jackson, S.H. *et al.* (2004) T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat. Immunol.* 5, 818–27
- 85 Hoch, N.E. *et al.* (2009) Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R208–16
- 86 Bataillard, A. *et al.* (1986) Antihypertensive effect of neonatal thymectomy in the genetically hypertensive LH rat. *Thymus* 8, 321–30
- 87 Guzik, T.J. *et al.* (2007) Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J. Exp. Med.* 204, 2449–60
- 88 Crowley, S.D. *et al.* (2010) Lymphocyte responses exacerbate angiotensin II-dependent hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298, R1089–R1097
- 89 Muller, D.N. *et al.* (2002) Immunosuppressive Treatment Protects Against Angiotensin II-Induced Renal Damage. *Am. J. Pathol.* 161, 1679–1693
- 90 Tian, N. *et al.* (2007) Immune suppression prevents renal damage and dysfunction and reduces arterial pressure in salt-sensitive hypertension Immune suppression prevents renal damage and dysfunction and reduces. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* 292, H1018–H1025
- 91 Madhur, M.S. *et al.* (2010) Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* 55, 500–7
- 92 Platten, M. *et al.* (2009) Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 14948–53
- 93 Shao, J. *et al.* (2003) Imbalance of T-cell subsets in angiotensin II-infused hypertensive rats with kidney injury. *Hypertension* 42, 31–38
- 94 Jurewicz, M. *et al.* (2007) Human T and natural killer cells possess a functional renin-angiotensin system: further mechanisms of angiotensin II-induced inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 1093–102

- 95 Stemme, S. *et al.* (1995) T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3893–3897
- 96 Maron, R. (2002) Mucosal Administration of Heat Shock Protein-65 Decreases Atherosclerosis and Inflammation in Aortic Arch of Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Circulation* 106, 1708–1715
- 97 Rodríguez-Iturbe, B. *et al.* (2013) Autoimmunity in the pathogenesis of hypertension. *Nat. Rev. Nephrol.*
- 98 Mackman, N. (2008) Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* 451, 914–918
- 99 Bagot, C.N. and Arya, R. (2008) Virchow and his triad: a question of attribution. *Br. J. Haematol.* 143, 180–90
- 100 Gresele, P. *et al.* (2010) Endothelium, venous thromboembolism and ischaemic cardiovascular events. *Thromb. Haemost.* 103, 56–61
- 101 Dahlbäck, B. (2005) Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J. Intern. Med.* 257, 209–23
- 102 Mackman, N. (2004) Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1015–1022
- 103 Mackman Nigel (2012) New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J. Clin. Invest.* 122, 2331–6
- 104 Wakefield, T.W. *et al.* (2008) Mechanisms of venous thrombosis and resolution. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 387–391
- 105 Field, T.S. and Hill, M.D. (2012) Prevention of deep vein thrombosis and pulmonary embolism in patients with stroke. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 18, 5–19
- 106 Stein, P.D. *et al.* (2010) Silent pulmonary embolism in patients with deep venous thrombosis: a systematic review. *Am. J. Med.* 123, 426–31
- 107 Kostadima, E. and Zakynthinos, E. (2007) Pulmonary embolism: pathophysiology, diagnosis, treatment. *Hellenic J. Cardiol.* 48, 94–107
- 108 Stoll, G. *et al.* (2008) Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. *Blood* 112, 3555–62
- 109 Saposnik, G. *et al.* (2011) Diagnosis and management of cerebral venous thrombosis: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 42, 1158–92
- 110 Worp, H.B. Van Der *et al.* (2007) Acute Ischemic Stroke. *N. Engl. J. Med.* 357, 572–579
- 111 Denis, C. V and Wagner, D.D. (2007) Platelet adhesion receptors and their ligands in mouse models of thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 728–739
- 112 Whinna, H.C. (2008) Overview of murine thrombosis models. *Thromb. Res.* 122 Suppl, S64–9
- 113 Schulz, C. *et al.* (2013) Crossroads of coagulation and innate immunity: the case of deep vein thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 11, 233–241

-
- 114 Massberg, S. *et al.* (2010) Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat. Med.* 16, 887–96
- 115 Brühl, M. Von *et al.* (2012) Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice *in vivo*. *J. Exp. Med.* 209, 819–835
- 116 Levi, M. *et al.* (2004) Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation* 109, 2698–2704
- 117 Senchenkova, E.Y. *et al.* Role of T Lymphocytes in Angiotensin II-Mediated Microvascular Thrombosis. , *Hypertension*, 58. (2011) , 959–965
- 118 Cucierman, T. *et al.* (2002) Chronic Lymphocytic Leukemia Presenting with Extreme Hyperleukocytosis and Thrombosis of the Common Femoral Vein. *Leuk. Lymphoma* 43, 1865–1868
- 119 Aue, G. *et al.* (2011) Inflammation, TNFa, and endothelial dysfunction link lenalidomide to venous thrombosis in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 86, 835–840
- 120 Dalton, D.K. *et al.* (1993) Multiple Defects of Immune Cell Function in Mice with Disrupted Interferon- γ Genes. *Science* (80-.). 259, 1739–1742
- 121 Clausen, B.E. *et al.* (1999) Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* 8, 265–277
- 122 Goren, I. *et al.* (2009) A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *Am. J. Pathol.* 175, 132–47
- 123 Buch, T. *et al.* (2005) A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat. Methods* 2, 419–426
- 124 Moran, A.E. *et al.* (2011) T cell receptor signal strength in T reg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* 208, 1279–1289
- 125 Keuren, M.L. Van *et al.* (2009) Generating Transgenic Mice from Bacterial Artificial Chromosomes: Transgenesis Efficiency, Integration and Expression Outcomes. *Transgen* 18, 769–785
- 126 Cho, H.J. *et al.* (2003) Cutting Edge : Identification of the Targets of Clonal. *J. Immunol.* 170, 10–13
- 127 Osborne, B. a *et al.* (1994) Identification of genes induced during apoptosis in T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 142, 301–20
- 128 Xue, B. *et al.* (2009) Protective actions of estrogen on angiotensin II-induced hypertension: role of central nitric oxide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H1638–46
- 129 Boulanger, C.M. *et al.* (1994) Mediation by M3-muscarinic receptors of both endothelium-dependent contraction and relaxation to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Br. J. Pharmacol.* 112, 519–24
- 130 Csont, T. and Ferdinandy, P. (2005) Cardioprotective effects of glyceryl trinitrate: beyond vascular nitrate tolerance. *Pharmacol. Ther.* 105, 57–68

- 131 Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–8
- 132 Chen, J. (2002) Quantitative trait loci regulating relative lymphocyte proportions in mouse peripheral blood. *Blood* 99, 561–566
- 133 Cohen, G.B. *et al.* (2005) Isolation of viable antigen-specific CD4 T cells by CD40L surface trapping. *J. Immunol. Methods* 302, 103–115
- 134 Koguchi, Y. *et al.* (2007) Preformed CD40 ligand exists in secretory lysosomes in effector and memory CD4+ T cells and is quickly expressed on the cell surface in an antigen-specific manner. *Blood* 110, 2520–2527
- 135 Intlekofer, A.M. *et al.* (2005) Effector and memory CD8 + T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol.* 6, 1236–1244
- 136 Sullivan, B.M. *et al.* (2003) Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. *PNAS* 100, 15818–15823
- 137 Teixeira, L.K. *et al.* (2005) IFN-g Production by CD8+ T Cells Depends on NFAT1 Transcription Factor and Regulates Th Differentiation. *J. Immunol.* 175, 5931–5939
- 138 Lazarevic, V. *et al.* (2013) T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 777–789
- 139 Sebzda, E. *et al.* (2008) Transcription factor KLF2 regulates the migration of naive T cells by restricting chemokine receptor expression patterns. *Nat. Immunol.* 9, 292–300
- 140 Mackay, I.R. and Rosen, F.S. (2000) T-cell Function and Migration. *N. Engl. J. Med.* 343, 1020–1034
- 141 Lord, G.M. *et al.* (2005) T-bet is required for optimal proinflammatory CD4 + T-cell trafficking. *Blood* DOI: 10.1182/blood-2005-04-1393
- 142 Akdis, M. *et al.* (2011) Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 701–21.e1–70
- 143 Von Brühl, M.-L. *et al.* Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. , *The Journal of experimental medicine*, 209. 09-Apr-(2012) , 819–35
- 144 Seddiki, N. *et al.* (2006) Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* 203, 1693–700
- 145 Kuniyasu, Y. *et al.* (2000) Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int. Immunol.* 12, 1145–55
- 146 Ziegler, S.F. (2006) FOXP3: of mice and men. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 209–26
- 147 Huehn, J. *et al.* (2004) Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 199, 303–13
- 148 Wong, M.M. and Fish, E.N. (2003) Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin. Immunol.* 15, 5–14
- 149 Luther, S.A. and Cyster, J.G. (2001) Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat. Immunol.* 2,

- 150 Matsushima, K. *et al.* (2011) Chemokines in inflammatory and immune diseases. *Inflamm. Regen.* 31, 11–22
- 151 Bromley, S.K. *et al.* (2008) Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat. Immunol.* 9,
- 152 Barrie, A.M. and Plevy, S.E. (2005) The interleukin-12 family of cytokines: Therapeutic targets for inflammatory disease mediation. *Clin. Appl. Immunol. Rev.* 5, 225–240
- 153 Olea, T. *et al.* (2012) Thrombotic microangiopathy associated with use of interferon-beta. *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.*
- 154 Moreau, A. *et al.* (2013) Renal thrombotic microangiopathy caused by interferon beta-1a treatment for multiple sclerosis. *Drug Des. Devel. Ther.* 7, 723–728
- 155 Pircher, J. *et al.* (2012) Prothrombotic effects of tumor necrosis factor alpha in vivo are amplified by the absence of TNF-alpha receptor subtype 1 and require TNF-alpha receptor subtype 2. *Arthritis Res. Ther.* 14, 1–13
- 156 Henke, P.K. *et al.* (2001) Interleukin-8 Administration Enhances Venous Thrombosis Resolution in a Rat Model 1. *J. Surg. Res.* 99, 84–91
- 157 Iwakura, Y. and Ishigame, H. (2006) The IL-23 / IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.* 116, 1218–1222
- 158 Papatriantafyllou, M. (2012) Trafficking: Effector T cells cross the line. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 74
- 159 Adams, D.H. and Shaw, S. (1994) ADLeucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet* 343, 831–836
- 160 Jones, T.R. *et al.* (2003) Intravital microscopy identifies selectins that regulate T cell traffic into allografts. *J Clin Invest* 112,
- 161 Woollard, K.J. *et al.* (2008) Pathophysiological levels of soluble P-selectin mediate adhesion of leukocytes to the endothelium through Mac-1 activation. *Circ. Res.* 103, 1128–38
- 162 Tilg, H. and Moschen, A.R. (2006) Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 772–83
- 163 Agrewala, J.N. *et al.* (2007) Unique Ability of Activated CD4+ T Cells but Not Rested Effectors to Migrate to Non-lymphoid Sites in the Absence of Inflammation. *J Biol Chem* 282, 106–6115
- 164 Li, M.W. *et al.* (2013) Endothelin-1 overexpression exacerbates atherosclerosis and induces aortic aneurysms in apolipoprotein e knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2306–15
- 165 Mestas, J. and Hughes, C.C.W. (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* 172, 2731–8
- 166 King, C. *et al.* (2004) Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell* 117, 265–77
- 167 Ablamunits, V. *et al.* (1999) Acceleration of autoimmune diabetes by cyclophosphamide is associated with an enhanced IFN-gamma secretion pathway. *J. Autoimmun.* 13, 383–392
- 168 Egashira, K. (2003) Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: special reference to monocyte chemoattractant protein-1. *Hypertension* 41, 834–41

- 169 Serody, J.S. *et al.* (2000) T-lymphocyte production of macrophage inflammatory protein-1alpha is critical to the recruitment of CD8+ T cells to the liver , lung , and spleen during graft-versus-host disease. *Blood* 96, 2973–2980
- 170 Desmetz, C. *et al.* (2006) The strength of the chemotactic response to a CCR 5 binding chemokine is determined by the level of cell surface CCR 5 density. *Immunology* 119, 551–561
- 171 Nataraj, C. *et al.* (1999) Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *J. Clin. Invest.* 104, 1693–1701
- 172 Michael, H. *et al.* (2013) CD40L contributes to angiotensin II-induced pro-thrombotic state , vascular inflammation , oxidative stress and endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol* 108,
- 173 Marvar, P.J. *et al.* (2010) Central and Peripheral Mechanisms of T lymphocyte Activation and Vascular Inflammation Produced by Angiotensin II-Induced Hypertension. *Circ Res* 107, 263–270
- 174 Silva-filho, J.L. *et al.* (2011) AT 1 receptor-mediated angiotensin II activation and chemotaxis of T lymphocytes. *Mol. Immunol.* 48, 1835–1843
- 175 Zhang, L. *et al.* (2012) A novel role of sphingosine 1-phosphate receptor S1pr1 in mouse thrombopoiesis. *J Exp Med* DOI: 10.1084/jem.20121090
- 176 Mouthon, L. *et al.* (2005) Pulmonary arterial hypertension: an autoimmune disease? *Eur. Respir. J.* 26, 986–8
- 177 Magliano, M. *et al.* (2002) Pulmonary hypertension in autoimmune rheumatic diseases: where are we now? *Arthritis Rheum.* 46, 1997–2009
- 178 Nicolls, M.R. *et al.* (2005) Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *Eur. Respir. J.* 26, 1110–8
- 179 To, W.S. and Midwood, K.S. (2011) Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 4, 21
- 180 Shimizu, Y. *et al.* (1990) Regulated expression and binding of three VLA (beta1) integrin receptors on T cells. *Nature* 345, 250–253
- 181 Ofosu-Appiah, W. *et al.* (1993) Isolation of T-cell clones with specificity for arterial antigen from spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 11, 1319–1328
- 182 Stemme, S. *et al.* (1995) T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3893–7.
- 183 Maron, R. *et al.* (2002) Mucosal Administration of Heat Shock Protein-65 Decreases Atherosclerosis and Inflammation in Aortic Arch of Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Circulation* 106, 1708–1715

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ACE	engl. angiotensin-converting enzyme
ACh	Acetylcholin
ACK	Ammoniumchlorid-Kalzium Puffer
APC	Allophycocyanin, Antigen-präsentierende Zelle (engl. antigen-presenting cell)
AT	Angiotensin
ATII	Angiotensin II
BAC	bakterielles künstliches Chromosom (engl. bacterial artificial chromosome)
BSA	bovines Serumalbumin
CCL	Chemokinligand
CCR	Chemokinrezeptor
CD	engl. cluster of differentiation
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CT	engl. cycle threshold
DAG	Diacylglycerol
DAMPs	Schaden-assoziierte molekulare Muster (engl. damage-associated molecular patterns)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DOCA	Desoxycorticosteronacetat
DTR	Diphtheriatoxin-Rezeptor
DTX	Diphtheriatoxin
DVT	tiefe Venenthrombose (engl. deep vein thrombosis)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (engl. fluorescence activated cell sorting)
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl. green fluorescent protein)
GIT	Guanidiniumisothiocyanat
GTN	Glyceroltrinitriat
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
iDTR	induzierbarer Diphtheriatoxin-Rezeptor
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	engl. iscove's modified dulbecco's medium
IP3	Inositoltrisphosphat
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	engl. low density lipoprotein

LPS	Lipopolysaccharid
LysM	Lysozym M
MACS	engl. magnetic activated cell sorting
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP	engl. monocyte chemoattractant protein
MFI	engl. Mean fluorescence intensity
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
mRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NGS	engl. new gene sequencing
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. pathogen-associated molecular patterns)
PBS	Phosphat-gepufferte Lösung (engl. phosphate buffered solution)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PG	Prostaglandin
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
STAT	engl. signal transducers and activators of transcription
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin
T-bet	engl. T-box transcription factor
TBP	engl. TATA-box binding protein
T _c	zytotoxische T-Zellen
T _{CM}	zentrale T-Gedächtniszelle
TCR	T-Zellrezeptor (engl. T cell receptor)
T _{EM}	Effektor-T-Gedächtniszelle
TF	Gewebefaktor (engl. tissue factor)
Th	T-Helferzelle
T _{naive}	naive T-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
VSMC	glatte Gefäßmuskelzellen (engl. vascular smooth muscle cells)
VTE	venöse Thromboembolie
vWF	von Willebrand-Faktor

8.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.2.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: Aufbau von arteriellen und venösen Gefäßen
- Abbildung 1.2: Die Implantation ATII-beladener miniosmotischer Pumpen führt zu einem Blutdruckanstieg
- Abbildung 1.3: Modell der Vena Cava Inferior Ligation
- Abbildung 3.1: Isolierter Aortenring in einer Organbadkammer
- Abbildung 4.1: Immunzellen wandern bei arteriellem Bluthochdruck verstärkt in die Aortenwand ein
- Abbildung 4.2: Die Induktion von arteriellem Bluthochdruck führt zu einer verstärkten Einwanderung von T-Zellen in die Aortenwand
- Abbildung 4.3: CD8-positive T-Zellen wandern verstärkt in die Aortenwand ein
- Abbildung 4.4: Unter dem Einfluss von ATII wandern bevorzugt Effektor-Gedächtnis-T-Zellen in die Aortenwand ein
- Abbildung 4.5: Zunahme der CD40L-Expression auf der Zelloberfläche von Aorten-infiltrierenden CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen des Blutes
- Abbildung 4.6: Arterieller Bluthochdruck erhöht die Zahl T-bet-exprimierender T-Zellen in der Aorta
- Abbildung 4.7: Zunahme der Zahl Interferon- γ -kompetenter T-Zellen in den Aorten von Tieren mit arteriellem Bluthochdruck
- Abbildung 4.8: Die Abwesenheit von T-bet und Interferon- γ führt zu einer reduzierten Infiltration von Immunzellen in die Aortenwände ATII-behandelter Mäuse
- Abbildung 4.9: In Abwesenheit von Monozyten ist die durch ATII hervorgerufene Einwanderung IFN- γ -kompetenter T-Zellen in die Aorta nur leicht verringert
- Abbildung 4.10: Die Injektion Antikörper-haltiger Überstände des Hybridoms GK1.5 führt zur Depletion CD4-positiver T-Zellen
- Abbildung 4.11: CD4-positive T-Zellen sind für die Entwicklung einer ATII-induzierten arteriellen Gefäßdysfunktion nicht erforderlich
- Abbildung 4.12: Die Erhöhung des Anteils an Effektor-T-Zellen führt tendenziell zu einer leichten Verschlechterung der Gefäßfunktion nach ATII-Behandlung
- Abbildung 4.13: Erhöhte mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in der Aorta nach ATII-Gabe
- Abbildung 4.14: Venöse Thromben enthalten Granulozyten und Monozyten, aber nur wenige T-Zellen
- Abbildung 4.15: Venöse Thrombose ruft eine verstärkte Einwanderung von Monozyten, Granulozyten und T-Zellen in die Venenwand hervor
- Abbildung 4.16: Einwanderung von CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen in die Venenwand thrombotischer Tiere
- Abbildung 4.17: In die Venenwand thrombotischer Tiere wandern bevorzugt Effektor-Gedächtnis T-Zellen ein
- Abbildung 4.18: T-Zellen in der Venenwand thrombotischer als auch gesunder Tiere exprimieren vermehrt den Aktivierungsmarker CD25

Abbildung 4.19:	Schematische Darstellung der Heterodimercluster der Integrinfamilie
Abbildung 4.20:	T-Zellen in der Venenwand weisen eine erhöhte CD49e und CD29-Expression und eine verringerte CD18-Expression auf
Abbildung 4.21:	Die Abwesenheit neutrophiler Granulozyten beeinflusst die Einwanderung von T-Zellen in die Venenwand ligierter Tiere nicht
Abbildung 4.22:	Die Ablation monozytärer Zellen führt zu einer leicht verringerten T-Zell-Infiltration in die Vena Cava-Wand ligierter Tiere
Abbildung 4.23:	Kinetik der GFP-Expression Nur77-GFP-BAC-transgener T-Zellen nach Stimulation über den T-Zellrezeptor <i>in vitro</i>
Abbildung 4.24:	GFP-Expression Nur77-GFP-BAC-transgener T-Zellen 36 Stunden und 240 Stunden nach Injektion eines monoklonalen anti-CD3 Antikörpers
Abbildung 4.25:	Bestimmung der nachweisbaren Frequenz aktivierter Nur77-GFP-BAC-transgener T-Zellen
Abbildung 4.26:	T-Zellen von Nur77 Mäusen in der Vena Cava zeigen keine GFP-Expression nach Ligation
Abbildung 4.27:	Die Induktion einer Thrombose führt zur verstärkten mRNA-Expression zahlreicher Zytokine und Chemokine in der Venenwand
Abbildung 4.28:	Erhöhte mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in der Vena Cava Inferior thrombotischer Tiere
Abbildung 4.29:	In thrombotischen Venen induzieren verstärkt exprimierte Zytokine und Chemokine die Bildung von IFN- γ in T-Zellen
Abbildung 4.30:	IFN- γ -exprimierende CD4 ⁺ T-Zellen weisen vorwiegend einen Effektor-T-Gedächtniszell-Phänotyp auf
Abbildung 4.31:	Die Stimulation von T-Zellen durch Zytokine verläuft unabhängig vom T-Zellrezeptor

8.2.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	verwendete Laborgeräte und technisches Zubehör
Tabelle 2.2:	verwendete chirurgische Instrumente
Tabelle 2.3:	verwendete Verbrauchsmaterialien
Tabelle 2.4:	verwendete Chemikalien, Reagenzien und gebrauchsfertige Lösungen
Tabelle 2.5:	verwendete Kits und Reagenzien zur DNA- und RNA-Analyse
Tabelle 2.6:	verwendete Antikörper
Tabelle 2.7:	verwendete Primer/Probe-Sets für die real-time PCR (FAM-gekoppelt)
Tabelle 2.8:	Zusammensetzung der Puffer
Tabelle 2.9:	verwendete Medien für die Zellkultur
Tabelle 2.10:	verwendete Zytokine und Chemokine
Tabelle 2.11:	Microbeads für die Anreicherung von Zellen
Tabelle 2.12:	verwendete Mausstämme
Tabelle 2.13:	verwendete spezielle Software
Tabelle 3.1:	verwendete Fluorochrome

8.3 Publikationen und Präsentationen

8.3.1 Publikationen

Publizierte Teile dieser Arbeit:

- 1.) Kossmann S*, **Schwenk M***, Hausding M*, Karbach SH, Schmidgen MI, Brandt M, Knorr M, Hu H, Kröller-Schön S, Schönfelder T, Grabbe S, Oelze M, Daiber A, Münzel T, Becker C, Wenzel P. (2013) Angiotensin II-induced vascular dysfunction depends on interferon- γ -driven immune cell recruitment and mutual activation of monocytes and NK-cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 1313-9 (***gleichberechtigte Autoren**)
- 2.) Hausding M, Jurk K, Daub S, Kröller-Schön S, Stein J, **Schwenk M**, Oelze M, Mikhed Y, Kerafirodi JG, Kossmann S, Jansen T, Schulz E, Wenzel P, Reske-Kunz AB, Becker C, Münzel T, Grabbe S, Daiber A. (2013) CD40L contributes to angiotensin II-induced pro-thrombotic state, vascular inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol* 108:386

Weitere Publikationen:

- 1.) Kossmann S, Hu H, Steven S, Fraccarollo D, Mikhed Y, **Schwenk M**, Knorr M, Karbach SH, Becker C, Oelze M, Bauersachs J, Widder J, Münzel T, Daiber A, Wenzel P. (2013) Inflammatory monocytes drive iNOS derived nitro-oxidative stress and eNOS uncoupling induced by angiotensin II. *submitted*
- 2.) Bacher N, Raker V, Hofmann C, Graulich E, **Schwenk M**, Baumgrass R, Bopp T, Zechner U, Merten L, Becker C, Steinbrink K. (2013) Interferon- α Suppresses cAMP to Disarm Human Regulatory T Cells. *Cancer Res* 73, 5647-56
- 3.) Brandt M, Schönfelder T, **Schwenk M**, Becker C, Jäckel S, Reinhardt C, Stark K, Massberg S, Münzel T, von Brühl ML, Wenzel P. (2013) Deep vein thrombus formation induced by flow reduction in mice is determined by venous side branches. *Clin Hemorheol Microcirc*
- 4.) Wenzel P, Knorr M, Kossmann S, Stratmann J, Hausding M, Schuhmacher S, Karbach SH, **Schwenk M**, Yogev N, Schulz E, Oelze M, Grabbe S, Jonuleit H, Becker C, Daiber A, Waisman A, Münzel T. (2011) Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular dysfunction. *Circulation* 124, 1370-81.

8.3.2 Präsentationen

- 1.) 43rd Annual Meeting of German Society for Immunology, Mainz (2013), Role of the NK cells in the genesis of angiotensin II-induced vascular dysfunction
- 2.) International Congress of Immunology (ICI), Mailand, Italien (2013), Interferon gamma production by aortic NK cells drives angiotensin II induced vascular dysfunction and inflammation (Posterpräsentation)
- 3.) European Congress of Immunology (ECI), Glasgow, Großbritannien (2012), Angiotensin II-induced arterial hypertension depends on vascular interferon gamma production by infiltrating innate and adaptive immune cells

8.4 Lebenslauf

8.5 Danksagung

