

**Die Rolle der IFN- γ Signalübertragung und
von MyD88 in der Angiotensin II-induzierten
vaskulären Dysfunktion, Inflammation und
arteriellen Hypertonie**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sabine Kossmann
geb. am 01.08.1985 in Köln

Mainz, April 2014

Aus der
II. Medizinischen Klinik und Poliklinik
und dem
Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH)
der Universitätsmedizin Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2014



INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-----------|---|----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN | 1 |
| 1.2 | ATHEROSKLEROSE - EINE INFLAMMATORISCHE KRANKHEIT | 1 |
| 1.3 | ARTERIELLE HYPERTONIE | 3 |
| 1.4 | DIE REGULATION DES BLUTDRUCKS | 4 |
| 1.4.1 | <i>Das Renin-Angiotensin-System (RAS)</i> | 4 |
| 1.4.1.1 | Klassisches RAS | 4 |
| 1.4.1.2 | Lokales RAS | 6 |
| 1.4.2 | <i>Angiotensin II – das zentrale blutdruckregulierende Hormon</i> | 7 |
| 1.4.2.1 | Angiotensin II-Rezeptoren | 7 |
| 1.4.2.2 | Signaltransduktion über den Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT ₁ R) | 8 |
| 1.5 | REGULATION DER GEFÄßFUNKTION | 9 |
| 1.5.1 | <i>Aufbau des Gefäßes</i> | 9 |
| 1.5.2 | <i>Das Endothel und die Rolle von Stickstoffmonoxid als zentraler Regulator der Endothelfunktion</i> | 10 |
| 1.5.2.1 | Stickstoffmonoxid- Synthasen (NOS) | 11 |
| 1.5.2.1.1 | Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) | 11 |
| 1.5.3 | <i>NO/sGC/cGMP-Signalweg</i> | 12 |
| 1.5.4 | <i>Endotheliale Dysfunktion und die „oxidative Stress Hypothese“</i> | 13 |
| 1.5.4.1 | Die NADPH Oxidase als wichtigste Quelle für reaktive Sauerstoffspezies im Gefäß | 16 |
| 1.6 | DIE SCHLÜSSELKOMPONENTEN DES IMMUNSYSTEMS | 18 |
| 1.6.1 | <i>Die Rolle von Mustererkennungsrezeptoren in der angeborenen Immunität</i> | 18 |
| 1.6.1.1 | Der MyD88-abhängige Signaltransduktionsweg | 22 |
| 1.7 | DIE ROLLE DER INFLAMMATION IN DER ARTERIELLEN HYPERTONIE | 22 |
| 1.7.1 | <i>Mechanismen der Angiotensin II-induzierten Inflammation und Hypertonie</i> | 24 |
| 1.7.1.1 | Modulatorische Effekte von Angiotensin II auf Inflammationszellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems | 27 |
| 1.7.2 | <i>Signaltransduktion über das Adapterprotein MyD88 und Toll-like Rezeptoren im Zusammenhang mit inflammationsgetriebenen kardiovaskulären Erkrankungen</i> | 29 |
| 1.7.3 | <i>Projektrelevante Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe</i> | 31 |
| 1.7.3.1 | Monozyten treiben die Angiotensin II-induzierte vaskuläre Dysfunktion an | 31 |
| 1.7.3.2 | Defizienz des Transkriptionsfaktors <i>T-box expressed in T-cells</i> (T-bet) schützt partiell vor der Angiotensin II-getriebenen vaskulären Dysfunktion | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 1.8 ZIELSETZUNG | 36 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 37 |
| 2.1 MATERIAL | 37 |
| 2.1.1 <i>Chemikalien und Reagenzien</i> | 37 |
| 2.1.2 <i>Kits und Assay Solutions</i> | 38 |
| 2.1.3 <i>Verbrauchsmaterialien</i> | 39 |
| 2.1.4 <i>Antikörper</i> | 40 |
| 2.1.4.1 Durchflusszytometrie..... | 40 |
| 2.1.4.2 Immunhistochemie | 41 |
| 2.1.4.3 Western Blot..... | 41 |
| 2.1.4.3.1 Primärantikörper..... | 41 |
| 2.1.4.3.2 Sekundärantikörper | 42 |
| 2.1.4.4 Polymerase-Kettenreaktion: Primer und Sonden | 42 |
| 2.1.4.4.1 Primer Genotypisierung..... | 42 |
| 2.1.4.4.2 qRT-PCR Primer | 43 |
| 2.1.5 <i>Geräte</i> | 43 |
| 2.1.6 <i>Software</i> | 45 |
| 2.1.7 <i>Allgemeine Puffer und Lösungen</i> | 46 |
| 2.2 METHODEN | 50 |
| 2.2.1 <i>Rechtliche Voraussetzungen</i> | 50 |
| 2.2.2 <i>Tierzucht/ Behandlung</i> | 50 |
| 2.2.3 <i>Tierexperimentelle Methoden</i> | 52 |
| 2.2.3.1 <i>In vivo</i> Depletion von LysM ⁺ myelomonozytären Zellen | 52 |
| 2.2.3.2 <i>In vivo</i> Depletion von NK-Zellen | 53 |
| 2.2.3.3 Applikation von Angiotensin II mittels subkutaner Implantation osmotischer Minipumpen 54 | |
| 2.2.3.4 Implantation von Telemetrikathetern | 55 |
| 2.2.3.5 Herstellung von Knochenmark-chimären Mäusen..... | 56 |
| 2.2.3.5.1 Isolation von Knochenmark | 57 |
| 2.2.3.5.2 Letale Bestrahlung von Mäusen mit einer Cäsium-Quelle..... | 57 |
| 2.2.3.6 Isolation von Monozyten aus Mausblut zur Rekonstitution von LysM ^{iDTR} Mäusen | 58 |
| 2.2.3.7 Isolation von NK1.1 positiven Zellen aus Mausmilzen zur Rekonstitution von Tbx21 ^{-/-} Mäusen 60 | |
| 2.2.4 <i>Tötung der Maus und Organentnahme</i> | 61 |
| 2.2.5 <i>Molekularbiologische und Immunologische Methoden</i> | 62 |
| 2.2.5.1 Genotypisierung der LysM/ LysM ^{iDTR} Parenteralgeneration | 62 |
| 2.2.5.2 Analyse der Gefäßfunktion in isometrischen Tonusstudien..... | 65 |
| 2.2.5.3 Detektion von Superoxid-Radikalen in Aortensegmenten | 68 |
| 2.2.5.4 Detektion von ROS in Vollblut | 69 |
| 2.2.5.5 Proteinexpressionsanalyse | 70 |
| 2.2.5.5.1 Proteinisolation..... | 70 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.2.5.5.2 | Proteinbestimmung nach Bradford | 70 |
| 2.2.5.5.3 | SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) | 71 |
| 2.2.5.5.4 | Western Blot (Immunoblot)..... | 72 |
| 2.2.5.5.5 | Ponceau-Färbung..... | 73 |
| 2.2.5.6 | mRNA Expressionsanalyse..... | 73 |
| 2.2.5.6.1 | RNA-Isolation aus Aortengewebe oder peripheren mononukleären Zellen..... | 73 |
| 2.2.5.6.2 | Bestimmung der RNA-Konzentration | 75 |
| 2.2.5.6.3 | PCR basierte Analyse der mRNA-Expression von IL-12p40 | 75 |
| 2.2.5.6.4 | Real-Time PCR (qRT-PCR) | 75 |
| 2.2.5.7 | Durchflusszytometrie..... | 77 |
| 2.2.5.7.1 | Durchflusszytometrische Analyse von Blut, Milz und Knochenmark | 78 |
| 2.2.5.7.2 | Durchflusszytometrische Analyse von Aortengewebe..... | 79 |
| 2.2.5.7.3 | Ex vivo Stimulation von Blut und Aortenlysaten zur Detektion von Interleukin-12 und Interferon- γ | 80 |
| 2.2.5.8 | Immunhistochemie | 80 |
| 2.2.6 | <i>Statistische Analyse</i> | 81 |
| 3 | ERGEBNISSE | 82 |
| 3.1 | DIE ROLLE VON NOX2 UND DEN ANGIOTENSIN II-REZEPTOR TYP 1 EXPRIMIERENDEN MONOZYTEN IN DER ANGIOTENSIN II-INDUZIERTEN VASKULÄREN DYSFUNKTION UND DER ARTERIELLEN HYPERTONIE | 82 |
| 3.1.1 | <i>Die Expression von Nox2 und AT₁R auf Monozyten ist essentiell für die blutdrucksteigernden Effekte von Monozyten in Antwort auf Angiotensin II.....</i> | 82 |
| 3.1.2 | <i>Einfluss des Knockout-Monozytentransfers auf die vaskuläre Funktion von Angiotensin II-infundierten LysM⁺ Zell-depletierten Mäusen</i> | 84 |
| 3.1.3 | <i>Die Nox2 und AT₁R Expression auf Monozyten beeinflusst die Angiotensin II-induzierte ROS-Bildung in Blut und Aorta.....</i> | 85 |
| 3.2 | DIE ROLLE VON IFN- γ IN DER ANGIOTENSIN II-INDUZIERTEN VASKULÄREN DYSFUNKTION UND INFLAMMATION | 86 |
| 3.2.1 | <i>IFN-γ fördert die Angiotensin II-induzierte vaskuläre Dysfunktion, reaktive Sauerstoffspezies-Produktion und Inflammation.....</i> | 87 |
| 3.2.2 | <i>IFN-γ abhängige Angiotensin II-induzierte Infiltration von Leukozyten in die Gefäßwand.....</i> | 89 |
| 3.2.3 | <i>Die Depletion von NK-Zellen schützt vor der Angiotensin II-induzierten vaskulären Dysfunktion</i> | 91 |
| 3.2.4 | <i>Wechselseitige Aktivierung von NK1.1⁺ NK-Zellen und Monozyten/Makrophagen</i> | 93 |
| 3.2.5 | <i>T-bet abhängige Aktivität von Monozyten/Makrophagen</i> | 95 |
| 3.3 | DIE AUSWIRKUNGEN DER DEFIZIENZ VON MYD88 AUF DIE ANGIOTENSIN II-INDUZIERTEN VASKULÄREN DYSFUNKTION, ARTERIELLE HYPERTONIE UND INFLAMMATION..... | 99 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.3.1 | <i>Protektiver Effekt der MyD88 Defizienz auf die Angiotensin II-getriebene vaskuläre Dysfunktion und arteriellen Hypertonie</i> | 99 |
| 3.3.2 | <i>Die Angiotensin II-abhängige Inflammation des Gefäßes ist abhängig von MyD88</i> | 101 |
| 3.3.3 | <i>TLR2, TLR7 oder TLR9 Defizienz hat keinen Schutz vor der Angiotensin II-induzierten vaskulären Dysfunktion zur Folge</i> | 111 |
| 3.3.4 | <i>Funktion MyD88 positiver inflammatorischer versus residenter Zellen in der Angiotensin II-induzierten vaskulären Dysfunktion und Inflammation</i> | 114 |
| 3.4 | ZUSAMMENFASSUNG ERGEBNISTEIL | 118 |
| 4 | DISKUSSION | 119 |
| 4.1 | SUPEROXID-PRODUZIERENDE GEFÄß-INFILTRIERENDE MONOZYTEN MEDIIEREN DIE VASKULÄRE DYSFUNKTION | 119 |
| 4.1.1 | <i>Nox2 und den AT₁R exprimierende Monozyten sind Mediatoren des Angiotensin II-induzierten Hypertonus und der vaskulären Dysfunktion</i> | 120 |
| 4.2 | IFN- γ ALS TREIBENDE KRAFT IN DER ANGIOTENSIN II-INDUZierten VASKULÄREN INFLAMMATION UND DYSFUNKTION | 123 |
| 4.2.1 | <i>Die Angiotensin II-induzierte vaskuläre Dysfunktion ist abhängig von der IFN-γ-getriebenen Immunzellrekrutierung</i> | 123 |
| 4.2.2 | <i>IFN-γ produzierende Gefäß-infiltrierende NK-Zellen wechselwirken lokal mit Monozyten und sind Mediatoren der Angiotensin II-induzierten vaskulären Dysfunktion und Inflammation</i> | 125 |
| 4.2.3 | <i>Die T-bet Expression in Monozyten/Makrophagen ist essentiell für die NK-Zell-Rekrutierung ins Gefäß</i> | 125 |
| 4.3 | ESSENTIELLE ROLLE VON MYD88 IN DER ANGIOTENSIN II-INDUZierten VASKULÄREN DYSFUNKTION, ARTERIELLEN HYPERTONIE UND INFLAMMATION | 128 |
| 4.3.1 | <i>MyD88 Defizienz wirkt protektiv in der Angiotensin II-induzierten endothelialen Dysfunktion, ROS Produktion, Inflammation und arteriellen Hypertonie</i> | 128 |
| 4.3.2 | <i>MyD88 scheint in die Reifung von Monozyten in einen proinflammatorischen Phänotyp involviert zu sein</i> | 131 |
| 4.3.3 | <i>TLR2, TLR7 oder TLR9 Defizienz hat keinen protektiven Effekt auf die vaskuläre Dysfunktion</i> | 132 |
| 4.3.4 | <i>Defizienz in MyD88 in hematopoetischen Zellen mildert die Angiotensin II-induzierte vaskuläre Dysfunktion und Inflammation</i> | 133 |
| 4.4 | AUSBLICK AUF WEITERFÜHRENDE FRAGESTELLUNGEN UND LIMITATIONEN DER STUDIE | 134 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.5 | SCHLUSSFOLGERUNG UND KLINISCHE BEDEUTUNG | 137 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 140 |
| | SUMMARY | 142 |
| 6 | LITERATUR | 144 |
| 7 | VERZEICHNISSE | 165 |
| 7.1 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 165 |
| 7.2 | TABELLENVERZEICHNIS | 176 |
| | ANHANG | I |
| | EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG | IX |
| | DANKSAGUNG..... | X |
| | CURRICULUM VITAE | XI |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| Abk. | Abkürzung |
| ACE | engl. <i>Angiotensin-converting enzyme</i> |
| ACh | Acetylcholin |
| ACK | Ammonium-Chlorid-Kalium |
| ADH | Antidiuretisches Hormon |
| Agtr1a | Gen codierend für den Angiotensin II-Typ 1a Rezeptor |
| ANP | Atriales natriuretisches Peptid |
| ApoE | Apolipoprotein E |
| AT ₁ R | Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 |
| AT ₂ R | Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 |
| ATII | Angiotensin II |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bFGF | engl. <i>basic fibroblast growth factor</i> |
| BH ₂ | Dihydrobiopterin |
| BH ₃ | Trihydrobiopterin |
| BH ₄ | Tetrahydrobiopterin |
| BNP | engl. <i>brain natriuretic peptide</i> |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CD | engl. <i>cluster of differentiation</i> |
| cGK | cGMP-abhängige Proteinkinase |
| cGMP | zyklisches Guanosinmonophosphat |
| CNP | engl. <i>C-type natriuretic peptide</i> |
| CO | Kohlenstoffmonoxid (engl. <i>carbon monoxide</i>) |
| Col II | Collagenase II |
| COX | Zyklooxygenase (engl. <i>cyclooxygenase</i>) |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CT | engl. <i>threshold cycle</i> |
| d | Tag |
| DAG | Diacylglycerol |
| DALY | engl. <i>disability-adjusted life year</i> |
| DAMP | Damage-associated molecular pattern |
| DC | engl. <i>Dendritic cell</i> |
| dd | doppelt destilliert |
| DHE | Dihydroxyethidium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| DOCA | Desoxycorticosteronacetat |
| DTX | Diphtheria toxin |
| EDRF | engl. <i>endothelium derived relaxing factor</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| eNOS | Endotheliale NO-Synthase |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERK | engl. <i>extracellular-signal regulated kinases</i> |
| ET-1 | Endothelin-1 |
| FACS | Fluorescence activated cell sorting |
| FAD, FADH ₂ | Flavin-Adenin-Dinukleotid |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FMN | Flavinmononukleotid |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer |
| FSC | Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i>) |

| | |
|-------------------------------|--|
| g | Gramm, Beschleunigung |
| G-Protein | GTP-bindendes Protein |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| G _i -Protein | Inhibitorisches GTP-bindendes Protein |
| gp91 ^{phox} | engl. <i>glucoprotein 91 phagocytic NADPH oxidase</i> |
| Gpx | Glutathionperoxidase |
| G _q -Protein | Rezeptor gekoppeltes GTP-bindendes Protein |
| GTN | Glyceroltrinitrati |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunden |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HBSS | eng. <i>Hepes buffered physiological salt solution</i> |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HO-1 | Hämoxygenase 1 |
| HRP | Meerrettichperoxidase (engl. <i>horse raddish peroxidase</i>) |
| HSP | Heatshock protein |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenös |
| ICAM | Interzelluläres Adhäsionsmolekül (engl. <i>intercellular adhesion molecule</i>) |
| IFN- γ | Interferon-gamma |
| IKKI | Inhibitor des NF- κ B Kinase Komplex |
| IL-x | Interleukin-x |
| iNOS | Induzierbare NO-Synthase |
| IP ₃ | Inositoltrisphosphat |
| IRAG | IP ₃ -Rezeptor-assoziiertes cGMP-Kinase Substrat |
| IRAK | IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase |
| IRFs | engl. <i>interferon-regulatory factors</i> |
| JAK | Januskinase |
| JNK | engl. <i>JUN N-terminal kinase</i> |
| Kap. | Kapitel |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KH | Kreps Hepes |
| KM | Knochenmark |
| L-NAME | L-Nitro-Arginin-Methylester |
| Ldlr | low density lipoprotein receptor |
| LysM | Lysozym M |
| MAL | engl. <i>MyD88-adaptor like</i> |
| MAPK | engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> |
| max. | Maximale |
| MCP-1 | engl. <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> |
| MHC | engl. <i>major histocompatibility complex</i> |
| min | Minute |
| mind. | mindestens |
| MIP-1 α | Makrophagen-inflammatorisches Protein-1 α |
| mRNA | engl. <i>messenger RNA</i> |
| MyD88 | engl. <i>myeloid differentiation factor 88</i> |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADPH | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase |
| NF- κ B | engl. <i>nuclear factor kappaB</i> |
| NK-Zelle | Natürliche Killerzelle |
| nNOS | Neuronale NO-Synthase |
| NO | Stickstoffmonoxid (engl. <i>nitric oxide</i>) |

| | |
|------------------------------|---|
| NO [•] | Stickstoffmonoxid-Radikal |
| Nox | NADPH Oxidase |
| O ₂ | Sauerstoff |
| O ₂ ^{•-} | Superoxidradikal |
| OH [•] | Hydroxylradikal |
| ONOO ⁻ | Peroxynitrit |
| PAMP | engl. <i>pathogen-associated patterns</i> |
| pAVK | Periphere arterielle Verschlusskrankheit |
| PBS | engl. <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCAM | engl. <i>platelet cell adhesion molecule</i> |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>) |
| PDBu | Phorbol-12,13-dibutyrat |
| PDGF | engl. <i>platelet derived growth factor</i> |
| pGC | Partikuläre Guanylatzyklase |
| PGI ₂ | Prostaglandin I ₂ (Prostazyklin) |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLC | Phospholipase C |
| PRR | engl. <i>Pattern-Recognition receptors</i> |
| RA(A)S | Renin-Angiotensin-(Aldosteron-)System |
| Relax. | Relaxation |
| RNA | Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>) |
| RNS | Reaktive Stickstoffspezies (engl. <i>reactive nitrogen species</i>) |
| RONS | Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen and nitrogen species</i>) |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>) |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| s.c. | subkutan |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| SEM | engl. <i>standard error of the mean</i> |
| sGC | Lösliche Guanylatzyklase (engl. <i>soluble guanylyl cyclase</i>) |
| SHR | engl. <i>spontaneously hypertensive rat</i> |
| sog. | sogennate |
| SSC | Seitwärtsstreulicht (engl. <i>side scatter</i>) |
| STAT | engl. <i>signal transducers and activators of transcription</i> |
| T-bet | engl. <i>T-box expressed in T cells</i> |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TCR | T-Zellrezeptor |
| TGF-β | engl. <i>transforming growth factor β</i> |
| Th | T-Helferzelle |
| TIRAP | engl. <i>TIR domain-containing adapter protein</i> |
| TLR | engl. <i>Toll-like receptor</i> |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor-α |
| TRAF | engl. <i>TNF receptor associated factor</i> |
| TRAM | engl. <i>TRIF-related adapter molecule</i> |
| T _{reg} -Zelle | Regulatorische T-Zelle |
| TRIF | engl. <i>TIR-domain-containing adaptor inducing IFN-β</i> |
| üN | über Nacht |
| v/v% | Volumenprozent |
| VASP | engl. <i>vasodilator stimulated phosphoprotein</i> |
| VCAM | engl. <i>vascular cell adhesion molecule</i> |
| VEGF | engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> |

| | |
|------|--|
| VSMC | engl. <i>vascular smooth muscle cell</i> |
| w/v% | Massenprozent |
| WB | engl. <i>Western Blot</i> |
| WHO | engl. <i>World Health Organization</i> |
| WKY | Wistar Kyoto Ratte |
| wt | Wildtyp |

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

In Deutschland gehen etwa 40% aller Todesfälle auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurück.

Eine aktuelle 2013 von Murray et al. in „The Lancet“ veröffentlichte Studie zu den *Global Burden of Disease 2010* [1] zeigt, dass kardiovaskuläre Erkrankungen nicht nur in den Industrienationen sondern zunehmend weltweit ein enormes Gesundheitsproblem darstellen, während Infektionen und Mangelernährung einen rückläufigen Trend zeigen. Die ischämische Herzerkrankung war 2010 an Platz eins des DALY (*disability-adjusted life years*) Indexes, der nicht nur die Sterblichkeit, sondern auch die Beeinträchtigung des normalen beschwerdefreien Lebens durch eine Krankheit versucht zu erfassen. Als bedeutendster Risikofaktor wiederum wurde der arterielle Hypertonus identifiziert [1].

Den kardiovaskulären Todesfällen liegt in überwiegenden Fällen die Atherosklerose mit ihren Folgen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall, Gefäßerkrankungen von Extremitäten und der Niere zugrunde.

Um dem Gesundheitsproblem gerecht zu werden ist die Erforschung der Entstehungsmechanismen aus medizinischer und volkswirtschaftlicher Sicht von enormer Bedeutung, um letztendlich bessere Präventions- und Behandlungskonzepte entwickeln zu können.

1.2 Atherosklerose - eine inflammatorische Krankheit

Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine systemische Erkrankung der arteriellen Blutgefäße, die mit Verhärtung, Verdickung und Elastizitätsverlust einhergeht.

Im Detail definiert die *World Health Organisation* (WHO) die Atherosklerose als eine „variable Kombination von Intimaveränderungen der Arterien, bestehend aus einer herdförmigen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und molekularen Blutbestandteilen, begleitet von Veränderungen in der Media. Zu einer Intima- und Mediaverdickung, verknüpft mit der vermehrten Einlagerung von Matrixsubstanzen, kommt es im Verlaufe des Alterns, und es resultiert eine verminderte *Compliance* der Gefäße. Der Gefäßdurchmesser nimmt stetig ab [2].“

In der frühen Phase der Atherosklerose-Entwicklung beobachtet man die Rekrutierung

und die Transmigration von Monozyten in die subendothelialen Schichten der Arterienwand und eine zunehmende Akkumulation von Lipiden mit daraus resultierendem morphologischem Wandel der eingewanderten Monozyten zu lipidgefüllten Makrophagen, sog. Schaumzellen. Während der sog. *fatty streak*, streifenförmige Fetteinlagerung in der Gefäßwand, als morphologisches Substrat der frühen Atherosklerose klinisch nicht in Erscheinung tritt, folgt die Entwicklung komplexer Läsionen durch weiteres Einwandern von Immunzellen, Proliferation und Migration glatter Muskelzellen, exzessiver Produktion von extrazellulärer Matrix und schließlich als schwerwiegende Komplikation in der Spätphase die Plaqueruptur mit folgender Thrombusbildung und damit Okklusion des Gefäßes.

Die klinisch bedeutendsten und häufigsten Manifestationsformen der Atherosklerose sind die koronaren Herzkrankheiten (KHK), wie der Herzinfarkt oder der akute Herztod, der Schlaganfall und die periphere Verschlusskrankheit (PAVK).

Während die Atherosklerose noch vor einigen Jahren als degenerative Alterserkrankung mit führender Verfettung der Gefäße und daraus resultierender Gefäßverkalkung verstanden wurde, definiert man nunmehr die Krankheit auch als eine chronisch entzündliche degenerative Erkrankung der Gefäße, deren pathologische Morphe aus endothelialer Dysfunktion resultiert. Das Konzept, dass Inflammation in die Pathogenese der Atherosklerose involviert ist existiert jedoch prinzipiell seit dem 19. Jahrhundert, herrührend von aufmerksamen pathologischen Funden von Rudolf Virchow, Karl Rokitansky und anderen [3, 4].

Diese damals aufgestellten Hypothesen fokussierten sich auf Fibrin-Depositionen, Lipidakkumulation und Bildung extrazellulärer Matrix. Virchow verwandte in seiner „Lipidhypothese“ zum ersten Mal auch die Bezeichnung „*endarteritis deformans*“ [5-7]. Er schaffte so eine Verbindung zu inflammatorischen Geschehnissen und legte die Basis für die „*response-to-injury*“-Hypothese von Russell Ross, die mehr als ein Jahrhundert später entstand [6, 7]. Diese Hypothese besagt, dass der erste Schritt der Atherogenese, die der Entstehung atherosklerotischer Läsionen vorausgeht, die Verletzung des Endothels ist [8]. Ein moderner modifizierter Ansatz spricht von einer Fehlfunktion des Endothels, der sog. „endothelialen Dysfunktion“, einer Veränderung der Vasoreaktivität des Gefäßes, beruhend auf einem Mangel an bioaktivem Stickstoffmonoxid (NO) und wird im Kap. 1.5.4 genauer beschrieben.

Klinische Studien zeigen heute die Bedeutung der Endothelfunktion als Surrogatparameter für die Prädisposition zur Entwicklung einer systemischen Atherosklerose.

1.3 Arterielle Hypertonie

Arterieller Hypertonus, Bluthochdruck, ist ein wichtiges öffentliches Gesundheitsproblem aufgrund seiner hohen Prävalenz, die Studien nach in 2000 26,4% in der erwachsenen Bevölkerung betrug und eine steigende Tendenz hat [9]. Es scheint der meist veränderbare Risikofaktor für kardiovaskuläre, zerebral vaskuläre und renale Erkrankungen zu sein, beitragend zur Morbidität und Mortalität weltweit. In der letzten Dekade sind immer mehr Indizien zusammengekommen, dass Hypertonie prädisponierend und beschleunigend wirkt auf die Atherosklerose, zum Teil weil es aktivierend auf inflammatorische Mechanismen wirkt und außerdem vasoaktive Peptide wie Angiotensin II und Endothelin-I eine entscheidende Rolle spielen.

Die Arterielle Hypertonie ist definiert als eine Erkrankung des arteriellen Gefäßsystems. Nach Richtlinien der Deutschen Hochdruckliga (Deutsche Hypertonie Gesellschaft) (Tabelle 1-1) gilt ein systolischer Blutdruck über 140 mmHg oder ein diastolischer Blutdruck über 90 mmHg als Hypertonie. Ausgenommen sind Schwangere und Kinder.

Tabelle 1-1: Einteilung der Blutdruck-Werte nach den Leitlinien der Deutschen Hochdruckliga (2005) [10].

| Klassifikation | Systolisch [mmHg] | Diastolisch [mmHg] |
|----------------------------------|-------------------|--------------------|
| Normalbereich | | |
| Optimal | <120 | <80 |
| Normal | 120-129 | 80-84 |
| Hochnormal | 130-139 | 85-89 |
| Hypertoniebereich | | |
| Stufe 1 (leicht) | 140-159 | 90-99 |
| Stufe 2 (mittel) | 160-179 | 100-109 |
| Stufe 3 (schwer) | ≥180 | ≥110 |
| Isolierte systolische Hypertonie | ≥140 | <90 |

Eine Hypertonie ist die Folge eines erhöhten Herzzeitvolumens („Volumenhochdruck“), eines erhöhten peripheren Widerstandes („Widerstandshochdruck“) oder beider Faktoren. In Ableitung vom Ohmschen-Gesetz gilt:

$$\text{Blutdruck} = \text{Herzzeitvolumen} \times \text{Gefäßwiderstand}$$

Erhöhung des Herzzeitvolumens und Erhöhung des peripheren Widerstandes, welche sowohl über eine funktionelle Vasokonstriktion mit gesteigerter Sympathikusaktivität als auch über strukturelle Gefäßwandveränderungen (Gefäßremodeling) vermittelt werden, begünstigen sich wechselseitig.

Man unterscheidet zwei Arten der Hypertonie, die primäre oder essentielle Hypertonie und die sekundäre Hypertonie. Die primäre Hypertonie ist multifaktoriell bedingt und trifft auf 90-95% aller Fälle zu; es kann keine bestimmte Ursache ausgemacht werden. Ein primärer Hypertonus wird in der Regel erst jenseits des 30. Lebensjahres apparent und stellt eine multifaktorielle, polygene Erkrankung dar. Ernährungsfaktoren (Übergewicht, Insulinresistenz, erhöhter Alkoholkonsum, vermehrte Kochsalzaufnahme), Stressfaktoren, Rauchen, zunehmendes Alter, Immobilität, niedriger sozioökonomischer Status sowie erniedrigte Kalium- und Kalziumaufnahme [11] sind als Risikofaktoren bekannt.

Eine sekundäre Hypertonie liegt vor, wenn der Bluthochdruck die Folge einer anderen Erkrankung darstellt. Dies ist bei etwa 5-10% aller Hypertonieformen der Fall.

Die Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Es ist bekannt, dass vor allem der Sympathikotonus erhöht ist und das Renin-Angiotensin-(Aldosteron-)System aktiviert wird [12].

1.4 Die Regulation des Blutdrucks

1.4.1 Das Renin-Angiotensin-System (RAS)

Seit der Entdeckung des Renins durch Tigerstedt und Bergmann 1898 ist das Renin-Angiotensin-System (RAS), auch Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) genannt, als wichtiger Modulator von Blutdruck und Volumenhomöostase bekannt. Aufgrund dieser Wirkungen wurde dem RAS schon frühzeitig eine pathophysiologische Rolle bei Hypertonie und anderen kardiovaskulären Erkrankungen zugeschrieben, jedoch hat man in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse bezüglich des RAS gewonnen, welche helfen die Rolle des Systems in der Pathogenese der Hypertonie und Ihren Folgeerkrankungen besser zu verstehen.

1.4.1.1 Klassisches RAS

Klassischerweise wird das RAS als ein endokrines System angesehen, in dem Angiotensin II, das Produkt sequentieller enzymatischer Spaltung von Angiotensinogen, die Hauptkomponente darstellt. Ein schematischer Überblick ist in Abbildung 1-2 dargestellt.

Am Beginn der Kaskade ist Renin, welches den in der Leber synthetisierten

zirkulierenden Vorläufer Angiotensinogen (Ang) spaltet. Die Protease Renin wird in juxtaglomerulären Apparat der Niere hergestellt, gespeichert und in die renale arterielle Zirkulation freigesetzt, reguliert über verschiedene Mechanismen wie über Agonisten der β 1-Rezeptoren, einen Abfall der Natriumkonzentration sowie einen Abfall des renalen Perfusionsdruckes.

Das aus Ang gebildete Decapeptid Angiotensin I (ATI) wiederum wird durch das *angiotensin-converting enzyme* (ACE), eine membranständige Dipeptidylcarboxypeptidase, weiter zu dem Oktapeptid Angiotensin II (ATII) gespalten [13]. ACE ist hauptsächlich auf der Oberfläche der Endothelzellen lokalisiert, die dem Lumen der Blutgefäße zugewandt ist.

Das gebildete ATII, welches über die systemische Zirkulation zum peripheren Gewebe transportiert wird, kann seine diversen biologischen Aktivitäten über zwei bekannte G-Protein gekoppelte Rezeptoren, AT₁ und AT₂, ausüben, wobei die Konsequenzen der Bindung sehr unterschiedlich sind [14]. Der AT₁-Rezeptor ruft die überwältigende Mehrzahl der ATII Effekte hervor, einschließlich Vasokonstriktion und Proliferationsförderung [15].

Durch eine ATII-vermittelte Aktivierung des AT₁-Rezeptors kann in den Blutgefäßen eine Vasokonstriktion, in der Nebenniere eine Stimulation der Aldosteron- und Adrenalinfreisetzung und in der Hypophyse eine Freisetzung von Vasopressin beobachtet werden [16]. Dies führt wiederum in der Niere zu einer Natrium- und Wasserretention.

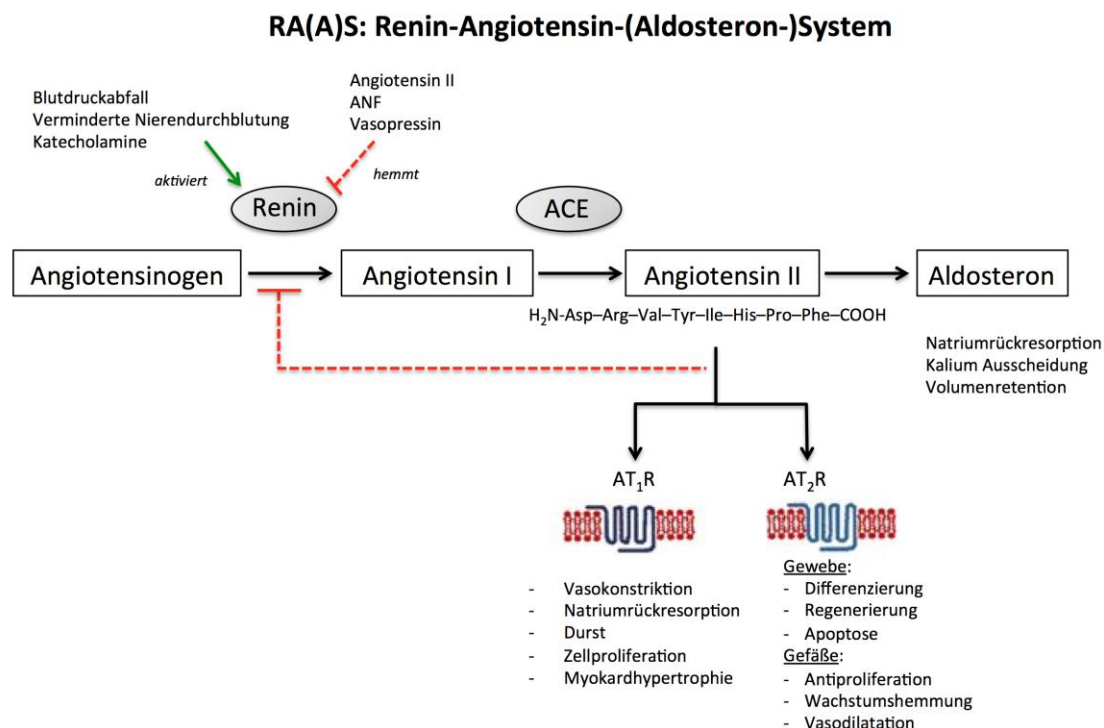


Abbildung 1-1: Das Renin-Angiotensin-(Aldosteron-)System (RA(A)S). Abk.: AT₁R, Angiotensin II-Rezeptor Typ 1; AT₂R, Angiotensin II-Rezeptor Typ 2; ACE, *angiotensin-converting enzyme*.

1.4.1.2 Lokales RAS

Dieses Konzept eines zirkulierenden RAS, welches lediglich endokrin über die Blutbahn agiert, reicht heute nicht mehr aus, um alle physiologischen und pathophysiologischen Effekte zu erklären.

Neuste Forschungen haben nachgewiesen, dass es ein dynamisches Gewebe-RAS gibt. Komponenten des RAS, einschließlich der Enzyme und der ATII-Rezeptoren, wurden in vielen Geweben identifiziert wie dem Gehirn, der Niere, dem Auge, dem Herz, dem vaskulären System und Reproduktionsorganen [17-20].

Auch inflammatorische Zellen wie Monozyten [21], dendritische Zellen [21-23], polymorphkernige Leukozyten (PMN), B-Zellen, T-Zellen [22, 24] und NK-Zellen [22] exprimieren Angiotensin II-Rezeptoren und verfügen über Komponenten des RAS wie das *angiotensin-converting enzyme*, Renin, den Renin-Rezeptor sowie Angiotensinogen [22, 24, 25] und zeigen signifikante Level von ATII [24].

Lokal synthetisiertes ATII übt parakrine und autokrine Wirkungen aus. Das lokal gebildete ATII könnten dabei eine bedeutende physiologische Rolle bei der Erhaltung der Homöostase innerhalb eines Gewebes spielen. Des Weiteren gib es Annahmen von intrazellulären oder intrakrinen RAS Wirkungen, welche über eine Bindung von

ATII an Rezeptoren des Zellkerns vermittelt werden [26, 27].

Somit scheint das zirkulierende RAS vor allem eine Bedeutung für die akute hämodynamische Stabilität zu haben, wohingegen das lokale RAS kritischer für die subakute und chronische Modulation der Hämodynamik zu sein scheint [28].

1.4.2 Angiotensin II –das zentrale blutdruckregulierende Hormon

ATII ist neben Endothelin-1 der stärkste bekannte Vasokonstriktor und verengt die peripheren und renalen Arteriolen (besonders der *Vasa efferentia*) 40fach stärker als Noradrenalin.

1.4.2.1 Angiotensin II-Rezeptoren

Angiotensin II mediert seine biologischen Effekte über zwei Rezeptoren: Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT₁R) und Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 (AT₂R) [29, 30].

Der AT₁R spielt im kardiovaskulären System die Hauptrolle; über ihn werden die weithin bekannten Angiotensin II-Wirkungen wie Vasokonstriktion [31], Produktion von Wachstumsfaktoren, Hypertrophie der glatten Muskulatur und der Kardiomyozyten sowie Proliferationsreize vermittelt [32].

Der AT₂R hingegen scheint eine große Bedeutung während der fetalen Entwicklung zu besitzen, wobei er möglicherweise entscheidend an Gewebedifferenzierungen beteiligt ist [33]. Unter pathophysiologischen Bedingungen wie Herzinsuffizienz und Gefäßverletzungen sowie nach Herzinfarkten sind modulierende Wirkungen beschrieben bis hin zur Auslösung der Apoptose [34].

In Nagetieren, jedoch nicht beim Menschen, existiert der AT₁R in zwei Isoformen, dem AT_{1a}R und dem AT_{1b}R [35, 36]. Diese Isoformen zeigen die gleichen pharmakologischen und funktionellen Eigenschaften und stimmen in 90% ihrer cDNA Sequenz überein. Dennoch sind sie Produkte von verschiedenen Genen (Agtr1a und Agtr1b), welche unterschiedlich exprimiert und reguliert werden [37]. In den meisten Organen wie der Niere, dem Herzen, *vascular smooth muscle cells (VSMC)*, Leber u.a. ist AT_{1a}R die vorherrschende Isoform, während AT_{1b}R vor allem in der Nebenniere und der Hypophyse zu finden ist [38]. Im kardiovaskulären System ist der AT_{1a}R hauptsächlich an der Regulation des Blutdrucks sowie als potenter Wachstumsstimulator beteiligt, wohingegen der AT_{1b}R den Gefäßtonus in Abwesenheit des AT_{1a}R beeinflusst [38].

1.4.2.2 Signaltransduktion über den Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT₁R)

Die Angiotensin II-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen [39, 40],

Die Bindung von Angiotensin II löst ein weites Spektrum an Signalantworten aus, die G-Protein abhängig und unabhängig vermittelt werden können.

Abbildung 1-3 gibt einen schematischen Überblick über die Signaltransduktion an AT₁R wieder.

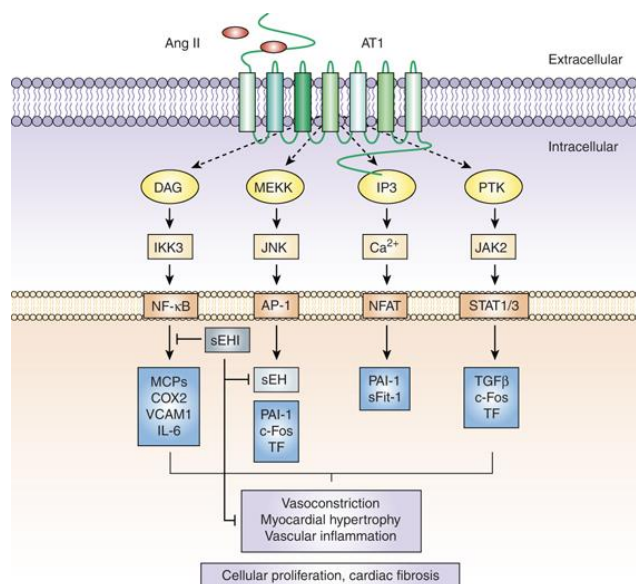


Abbildung 1-2: Überblick über die ATII-induzierten Signaltransduktionswege im kardiovaskulären System. Die Angiotensin II (ATII) Bindung an AT₁R führt zur consequenten Hochregulation von *downstream* Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor* (NF)-κB, *activating protein 1* (AP-1), *nuclear factor of activated T-cell* (NFAT) und *signal transducers and activators of transcription* (STATs). Alle dadurch aktivierten Gene tragen zu den Angiotensin II Effekten bei, einschließlich Vasokonstriktion, vaskuläre Entzündung, Zellproliferation, myokardiale Hypertrophie, Fibrose und Nierenschädigung. Die Effekte können durch sEH Inhibitoren (sEH, *soluble epoxide hydrolase*) vermindert werden [41].

Die Vasokonstriktion wird vor allem durch G_{q11} vermittelt. Die Bindung von ATII an den AT₁R führt zu einer Konformationsänderung, was eine Entkopplung des G_q Proteins nach sich zieht [42]. Dies aktiviert Phospholipase C (PLC), was wiederum zur Generierung von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) führt. DAG erhöht die intrazelluläre Ca²⁺ Konzentration durch Proteinkinase C (PKC) Aktivierung, was zum Ca²⁺ Einstrom aus dem Extrazellulärraum führt. IP₃ steigert die intrazelluläre Ca²⁺ Konzentration durch Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern. Dadurch wiederum kommt es zur Aktivierung Calmodulin-abhängigen Enzyme. Diese lösen durch Anregung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLKK) eine Phosphorylierung der leichten Myosinketten aus,

die die Interaktion von Myosin mit Aktin verstärkt. Es kommt zu einer Vasokonstriktion der Gefäßmuskelzellen.

Durch die Aktivierung eines weiteren G-Proteins ($G_{i\alpha}$) wird die Adenylzyklase gehemmt, die die Bildung des für die Vasodilatation wichtigen *second messenger* cAMP katalysiert. Die Fähigkeit zur Gefäßerweiterung wird in Folge dessen gestört, sodass sich der Grad der Konstriktion erhöht [43].

Die Aktivierung von AT_1R reguliert daneben auch Tyrosinkinase. Diese bewirken eine Tyrosinhyperphosphorylierung, was die Aktivierung der MAP Kinasenkaskade zur Folge hat. MAP Kinasen und PKC führen zur Induktion von Transkriptionsfaktoren, die Zellwachstum und Proliferation bewirken [44]. In einem dritten Signalweg aktivieren JAK (*Januskinasen*) und STAT (*signal transducers and activators of transcription*) über Protein-Tyrosin-Kinasen NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) [45, 46]. NF- κ B Aktivierung führt zu inflammatorischen und proliferativen Prozessen [47, 48].

Schließlich führt die Bindung von ATII an AT_1R auch zur Stimulation von membrangebundenen NADPH Oxydasen, was zur Bildung reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt [49]. Die Reduktion von Stickstoffmonoxid (NO') durch ROS resultiert in einer Vasokonstriktion.

Auf den Zusammenhang zwischen Angiotensin II, Inflammation und oxidativem Stress wird noch intensiver eingegangen (Kap. 1.7.1).

1.5 Regulation der Gefäßfunktion

1.5.1 Aufbau des Gefäßes

Die Modulation der Gefäßfunktion unterliegt einem komplexen Netzwerk von mehreren Signalwegen. Eine entscheidende Rolle bei der Regulation der vaskulären Funktion nimmt das Endothel ein. Die Gefäßwand größerer Blutgefäße setzt sich von innen nach außen aus drei Schichten zusammen: Die *Tunica intima*, *Tunica Media* und *Tunica Adventitia* (oder *Tunica externa*). Die Adventitia besteht aus lockerem Bindegewebe und dient zur Verankerung und Einbettung des Blutgefäßes in seiner Umgebung, während die Media aus glatten Muskelzellen und elastischen Fasern aufgebaut ist. Die Tunica intima besteht aus polygonalen Endothelzellen abgeflachter Form, deren Zellkerne sich in das Lumen vorwölben, einer Basalmembran und subendothelialen Bindegewebe.

1.5.2 Das Endothel und die Rolle von Stickstoffmonoxid als zentraler Regulator der Endothelfunktion

Das Endothel ist eine Zellschicht an der Innenwand der Gefäße und trennt das Blut vom interstitiellen Kompartiment. Aufgrund der enormen Zellzahl (6×10^{13}), der Masse (1,5 kg) und Oberfläche, wird es als eigenständiges Organ angesehen [50]. Die Zellen des Endothels produzieren Gefäß aktive und Wachstum modulierende Substanzen. Zu diesen zählen Vasodilatoren (Stickstoffmonoxid (NO^*), Prostacyclin, EDHF (*Endothel-derived hyperpolarisation factor*), Bradykinin, Adrenomedullin, C-Typ natriuretisches Peptid (CNP)) und Vasokonstriktoren (Endothelin-1, Angiotensin II, Thromboxan A₂, Prostaglandine, Wasserstoffperoxid (H_2O_2), freie Radikale). Somit nimmt das Endothel nicht nur eine Barrierefunktion zwischen Gefäßlumen und Gefäßwand ein, sondern wird heute als ein hochdifferenzierter, stoffwechselaktiver Regulator verschiedener Funktionen.

Dieses wurde erstmals 1980 von Furchgott und Zawadski [51] postuliert. Sie zeigten, dass an isolierten Gefäßpräparaten zahlreiche vasodilatierende Substanzen ihre Wirkung verlieren, wenn das Endothel der untersuchten Gefäßpräparate entfernt wurde und schlossen daraus, dass das Endothel selbst eine gefäßdilatorische Substanz freisetzt. Der für die Dilatation des Gefäßes maßgeblich verantwortliche Faktor wurde ursprünglich EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*) genannt und erst später als Stickstoffmonoxid (NO^*) identifiziert. 1998 erhielten die Wissenschaftler Furchgott, Ignarro und Murad den Nobelpreis für diese Entdeckungen.

Neben der direkten Relaxation der glatten Gefäßmuskeln [52] limitiert NO^* die Proliferation dieser Zellen [53]. NO^* inhibiert die entzündungsinduzierte Aktivierung der Endothelzellen und reduziert die Expression von Adhäsionsmolekülen für Lymphozyten und Monozyten (*vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1) und für neutrophile Granulozyten (*intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1) [54]. NO^* senkt die Aggregationsneigung und die Adhäsion der Plättchen [55-57], und verhindert die Chemotaxis von Monozyten [58]. Im gesunden Endothel sind alle diese Prozesse im Gleichgewicht und die Gefäßspannung passt sich den verschiedenen Gegebenheiten an. Bei einer Störung dieses Gleichgewichtes kann es zu einer sog. Endotheldysfunktion kommen.

1.5.2.1 Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS)

Der Katalysator der NO[•]-Produktion ist die sogenannte *nitric oxide synthase* (NO-Synthase, NOS). Es existieren drei Isoenzyme (NOS I (nNOS) [59]; II (iNOS) [60], III (eNOS)), die sich durch ihre Lokalisation und Regulation unterscheiden, aber strukturelle Homologien aufweisen.

Die NOS I, die neuronale Isoform (nNOS), liegt konstitutiv in hohen Konzentrationen in neuronalem und Skelettmuskelgewebe vor und ist im Zytosol lokalisiert. Ihre Aktivität ist abhängig von der Anwesenheit von Kalzium und Calmodulin. Die NO-Synthese, katalysiert durch die nNOS, erfolgt u.a. nach Stimulation durch Glutamat [61].

Die iNOS (NOS-II) wird in der Regel unter pathologischen Bedingungen induziert, wenn Immunzellen, insbesondere Monozyten/ Makrophagen und Endothelzellen als Reaktion auf Cytokine (IFN- γ , TNF- α , Interleukin-1 β) und bakterielle Endotoxine zytotoxische Effekte ausüben [62, 63]. Ihre Aktivität ist im Gegensatz zur nNOS und eNOS Kalzium und Calmodulin unabhängig und das Enzym liegt im Cytosol der entsprechenden Zellen vor.

Nach ihrer Expression kommt es zu einer schnellen, starken und langanhaltenden Wirkung, wobei die produzierte NO[•]-Menge 1000fach höher sein kann als nach Stimulation der konstitutiven eNOS. Bei Patienten mit einem septischen Schock führt die in den glatten Muskelzellen und Makrophagen der Gefäßwand lokalisierte iNOS zu einer generalisierten Vasodilatation und einem therapeutisch nur schwer beherrschbaren Blutdruckabfall.

1.5.2.1.1 *Die endotheliale NO-Synthase (eNOS)*

Die NOSIII ist die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und wird konstitutiv im Endothelzellen, Kardiomyozyten und Thrombozyten exprimiert. Als predominate Isoform im Gefäß ist sie maßgeblich an der Gefäßtonusmodulation beteiligt.

Die Aktivierung der eNOS erfolgt als Reaktion auf mechanische Stimuli (Scherkräfte, pulsatile Dehnung) oder Aktivierung durch Östrogene, Cytokine oder freigesetzte Zellinhaltsstoffe (nukleotide Wachstumsfaktoren).

Die Aktivität der eNOS ist streng durch den intrazellularen Ca²⁺-Spiegel kontrolliert. Agonist-hervorgerufene Erhöhung der Konzentration von intrazellularem Ca²⁺ steuert die Bindung des Ca²⁺/ Calmodulin-Komplex an die eNOS und erzeugt eine Konformationsänderung, die das Enzym in seine aktive Form überführt [64].

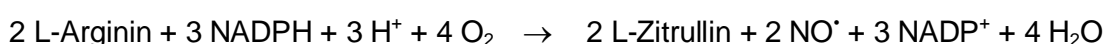
Bei der von der eNOS katalysierten Reaktion wird die Guanidin-Gruppe der Aminosäure L-Arginin in Gegenwart von molekularem Sauerstoff unter der Bindung essentieller Kofaktoren oxidiert. Als Produkte entstehen dabei Stickstoffmonoxid (NO[•]) sowie L-Citrullin in gleichen Mengen.

Die eNOS ist ein aus zwei identischen Monomeren aufgebautes Homodimer. Jedes Monomer besitzt eine amino-terminale Oxygenasedomäne und eine carboxy-terminale Reduktasedomäne. Die Bindungsstelle für Calmodulin, das der Regulation der Enzymaktivität dient, liegt zwischen der Reduktase- und Oxygenasedomäne.

An der N-terminalen Oxygenasedomäne befinden sich außerdem Bindungsstellen für die Kofaktoren Häm und Tetrahydropterin (BH₄) sowie für L-Arginin und an der C-terminalen Reduktase-domäne Bindungsstellen für die Kofaktoren FAD, FMN und NADPH. Der Kofaktor BH₄ stabilisiert die eNOS in Ihrer Dimerform [65].

Sowohl die Reduktase- als auch die Oxygenasedomäne verfügen über Phosphorylierungsstellen, Serin- und Theronin-Aminosäurereste, deren Phosphorylierungsstatus entscheidend für den Aktivitätszustand der eNOS ist.

Im ersten Reaktionsschritt der NO[•]-Synthese wird an der Reduktasedomäne ein Elektron von NADPH abgespalten und mit Hilfe der Kofaktoren FAD, FMN und Calmodulin zur Oxygenasedomäne weitergeleitet. Im katalytischen Zentrum der eNOS steht molekularer Sauerstoff durch die Bindung an das Eisenatom der Hämgruppe als Elektronenempfänger zur Verfügung. Der so reduzierte Sauerstoff kann dann mit der Guanidin-Gruppe des Substrats L-Arginin reagieren und über ein Zwischenprodukt wird letztendlich L-Zitrullin gebildet und NO[•] freigesetzt [66].



1.5.3 NO[•]/sGC/cGMP-Signalweg

Die dilatierende Wirkung von vaskulären NO[•] wird über den NO[•]/sGC/cGMP-Signalweg vermittelt. NO[•] diffundiert aus den Endothelzellen zu den angrenzenden glatten Gefäßmuskelzellen und aktiviert dort die lösliche Guanylatcyclase (sGC), die als intrazellulärer Rezeptor für NO[•] fungiert. Voraussetzung für die Aktivierung dieses Enzyms ist die Bindung von NO[•] an das Häm der sGC, wodurch das Nitrosyl-Häm-Addukt der sGC entsteht. In der Folge wird das Häm-Eisen aus der Ebene des Porphyrinrings herausgehoben, sodass die Bindung von GTP (Guanosintriphosphat) und die folgende Umwandlung zu cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat)

ermöglicht werden. Die Wirkung des cGMPs wird über zwei cGMP-abhängige Proteinkinase (PKGI und II) vermittelt. [67-69].

Durch die PKG I werden zelluläre Proteine (u.a. Phospholamban, IRAG, Kaliumkanäle) phosphoryliert, was letztlich zu einer Senkung der intrazellulären Kalziumkonzentration in der glatten Muskelzelle und dadurch zu einer Relaxation führt. NO^{*} kann außerdem kalziumabhängige Kaliumkanäle aktivieren und die Zellmembran hyperpolarisieren [70, 71]. Die Wirkung von cGMP wird durch seine schnelle Umsetzung zu GMP (Guanosinmonophosphat) beendet, die durch verschiedene Phosphodiesterasen (PDE) katalysiert wird [72].

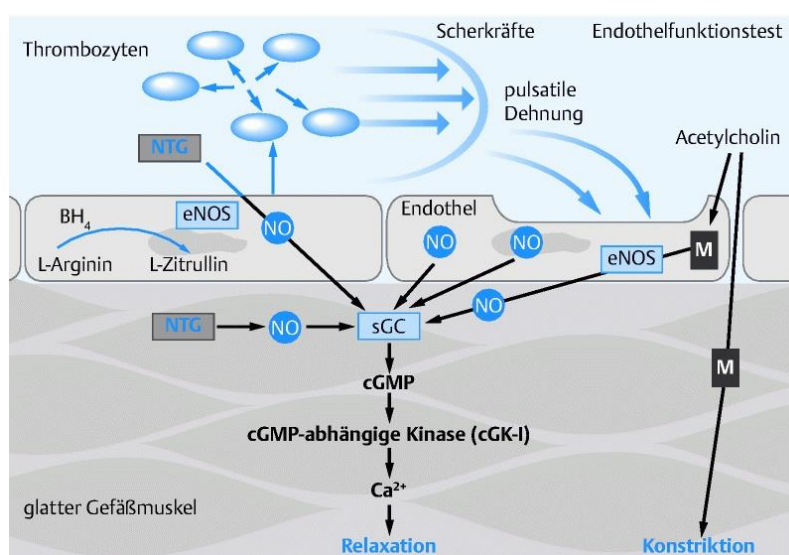


Abbildung 1-3: Der über die eNOS vermittelte NO^{*}/sGC/cGMP Signalweg. Dargestellt ist der Mechanismus der endothelabhängigen Relaxation von Gefäßen durch Stickstoffmonoxid (NO^{*}). NO^{*} wird durch die endotheliale NO-Synthase gebildet. Die Aktivierung erfolgt entweder Rezeptor-vermittelt oder durch pulsatile Dehnung bzw. Scherkräfte. NO^{*} diffundiert dann in den glatten Gefäßmuskel, wo es die lösliche Guanylatzyklase (sGc) aktiviert, was wiederum zur Aktivierung der cGMP abhängigen Kinase (cGK-I) und letztlich zur Relaxation des glatten Muskels durch Ca²⁺-Influx führt. Abk.: NTG, Glyceroltrinitrat (\triangleq GTN); BH₄, Tetrahydrobiopterin; M, Muskarinerges Rezeptor; eNOS, endotheliale NO-Synthase“ [73].

1.5.4 Endotheliale Dysfunktion und die „oxidative Stress Hypothese“

Unter einer endotheliale Dysfunktion versteht man den Verlust der Integrität des Endothels und der Fähigkeit bedeutsame physiologische Funktionen, wie die Regulation des Gefäßradius, der Blutgerinnung, der Produktion antiinflammatorischer Cytokine oder die morphologische Regulation der Gefäße, zu leisten [74]. Hämodynamisch äußert sich die endotheliale Dysfunktion durch die Abschwächung der endothelabhängigen Relaxation. Das Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion ist per se bereits mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert [75].

Zahlreiche Studien zeigen, dass die bei Erkrankungen wie Atherosklerose, Hypertonie oder Herzinsuffizienz auftretende endotheliale Dysfunktion mit einer signifikanten Steigerung der vaskulären Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen, vor allem an Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), einhergeht [76-78].

Freie Radikale sind hochreaktive, kurzlebige Moleküle mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen, die ständig im Organismus entstehen und schnell und aggressiv mit anderen Molekülstrukturen reagieren können. Die im Körper entstehenden freien Radikale sind zum größten Teil toxische Sauerstoffderivate (ROS = *reactive oxygen species*) wie Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikale (OH^{\cdot}), Peroxylradikale (RO_2^{\cdot}), Alkoxyradikale (RO^{\cdot}) oder Hydroperoxyradikale (HO_2^{\cdot}). Physiologischerweise entstehen sie bei enzymatischen Reaktionen des Atmungskettenkomplexes in der inneren Mitochondrienmembran, bei Lipooxygenase- und Cyclooxygenasereaktionen im Rahmen des Arachidonsäuremetabolismus oder bei Cytochrom p450-Reaktionen sowie einer Reihe weiterer Enzymreaktionen. Für Endothelzellen sind im besonderen drei weitere Enzymsysteme bekannt, die als Quellen einer erhöhten Produktion toxischer Sauerstoffderivate (ROS) beschrieben werden: Die Xanthinoxidase, die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und die NADPH Oxidase [79]. ROS haben in geringen Konzentrationen gut beschriebene Funktionen als Signalmoleküle, indem sie Zellaktivitäten wie die Cytokinausschüttung und die Zellproliferation steuern. In höheren Konzentrationen wirken sie dagegen toxisch auf Zellfunktionen, da durch oxidative Veränderungen von Proteinen, Lipidperoxidation und DNA-Abbrüchen die normalen Zellaktivitäten gestört werden [80].

Physiologischerweise stehen den im Körper entstehenden freien Radikalen eine Reihe antioxidativer Schutzmechanismen gegenüber, um Schäden der Zellintegrität zu verhindern oder zu reparieren. Hierzu zählen als antioxidative Enzyme die Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase. Vitamin C, α -Tocopherol, γ -Tocopherol, Coenzym Q10 (Ubichinol-10) und Sulfhydrylgruppen zählen zu den wichtigsten nicht-enzymatischen Antioxidantien. Wenn allerdings eine chronisch erhöhte Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies oder andere pathophysiologische Veränderungen die Balance stören und dieses durch die vielfältigen Regulationsmechanismen nicht ausreichend kompensiert werden kann, kommt es zu einem Überwiegen der schädigend wirkenden freien Radikale. Dieser Zustand wird als oxidativer Stress bezeichnet.

Bei Erwachsenen mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Rauchen, Adipositas, Diabetes mellitus und Hypertonus konnte ein Zusammenhang zwischen diesen Risikofaktoren und einer prävalenten Verschlechterung der endothelabhängigen Vasodilatation in vielen Studien belegt werden [81-83]. Auch bei den folgenden

Erkrankungen mit bekanntem erhöhten Atheroskleroserisiko wurde bereits im Kindesalter eine endotheliale Dysfunktion nachgewiesen: Familiäre Hypercholesterinämie [84], Diabetes mellitus Typ I [85], positive familiäre Anamnese für eine vorzeitige koronare Herzkrankheit [86], Homocystinurie [87] und chronische Niereninsuffizienz [88].

Verschiedene Enzyme wie die durch Tetrahydrobiopterin (BH₄) Oxidation bzw. L-Arginin Defizienz entkoppelte NO-Synthase, die Xanthin Oxidase, die mitochondriale Atmungskette, die über Oxidation der Eisen-Schwefel-Proteine entkoppelt werden kann, und die Myeloperoxidase können freie Radikale bilden. Im Gefäß aber scheint das wichtigste Superoxid generierende Enzym die NADPH Oxidase (Nox) zu sein [89].

Das durch diese Enzyme gebildete Superoxid (O₂^{•-}) reagiert in einer sehr schnelle Reaktion mit NO[•] zu Peroxynitrit (OONO[•]) [90] (Geschwindigkeitskonstante: 6,7x 10⁹ M⁻¹s⁻¹) [91]. Dabei wird endogenes NO[•] abgefangen, wodurch dessen vasoprotektive Funktionen in der Gefäßwand gehemmt werden.

Peroxynitrit selber hat ebenfalls negative Konsequenzen für die Gefäßfunktion, u.a. da es die eNOS entkoppeln kann [92]. Entkopplung bedeutet, dass die NO-Synthase bei vermindertem Tetrahydrobiopterin Level oder L-Arginin Mangel eine bedeutende Anzahl von Superoxidanionen bildet. Beim NO[•]-Synthesevorgang kommt es dann zum Abbruch der Elektronenkette in der endothelialen NOS. Die Reduktion von Sauerstoff wird unterbrochen, der Synthesevorgang von NO[•] kann nicht vollendet werden und es entsteht O₂^{•-}. Daraus resultiert ein *Circulus vitiosus* [93]. Durch Nitrierung von Tyrosinresten von Proteinen interferiert Peroxynitrit auch mit Tyrosinkinase- und G-Protein-abhängigen Signaltransduktionswegen und oxidiert eine Vielzahl Thiol-abhängiger Proteinen. Peroxynitrit hemmt so die Guanylatzyklase und Prostazyklinsynthase, die für die Vasodilatation verantwortlich sind [94].

Gestützt wird diese „oxidative Stresshypothese“ dadurch, dass sich nahezu alle Endotheldysfunktionszustände bei Patienten mit Diabetes mellitus, der arteriellen Hypertonie, der KHK und auch bei chronischen Rauchern durch die Akutgabe von hoch dosiertem Vitamin C (intraarteriell und oral) drastisch verbessern lassen [95-98].

Durch die verminderte vaskuläre NO[•]-Bioverfügbarkeit aggregieren mehr Blutplättchen, proliferieren mehr glatte Muskelzellen, werden mehr vasokonstriktorisches wirkende Substanzen wie Thromboxan und Serotin freigesetzt und mehr Adhäsionsmoleküle in

Endothelzellen exprimiert. Damit wird der atherosklerotische Prozess initiiert und beschleunigt [94].

1.5.4.1 Die NADPH Oxidase als wichtigste Quelle für reaktive Sauerstoffspezies im Gefäß

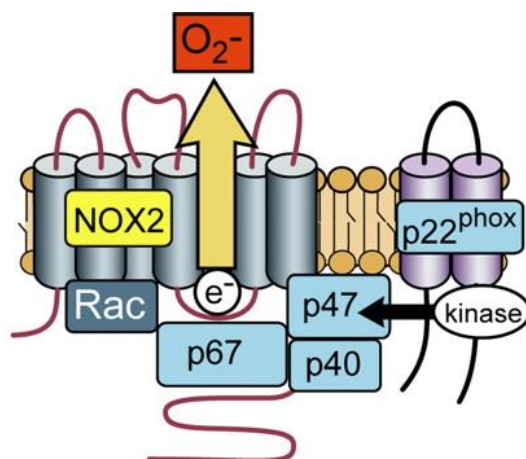


Abbildung 1-4: Aufbau der NADPH Oxidase am Beispiel der phagozytären Isoform Nox2. Nox2, die katalytische Untereinheit, benötigt die regulatorischen Untereinheiten $p22^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ und Rac zur Aktivierung und Superoxid-Bildung. In diesem Aktivierungsprozess muss $p47^{\text{phox}}$ phosphoryliert werden. Die $p40^{\text{phox}}$ Assoziation mit dem Komplex trägt vermutlich ebenfalls zur Aktivierung bei, ist allerdings nicht essenziell [99].

Die Familie der NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) Oxidasen ist eine Gruppe von Proteinen, die Elektronen durch biologische Membranen transportieren und dadurch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produzieren kann.

Ursprünglich wurde die NADPH Oxidase in Phagozyten identifiziert, wo diese den respiratorischen Burst mediiert [100].

Bis heute sind in Säugern sieben Mitglieder der Nox Familie identifiziert worden, die alle strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen: Nox1-Nox5 und Duox1 und 2. Alle Nox Isoformen enthalten eine Bindungsstelle für FAD und NADPH, haben eine konservierte sechs Transmembrandomäne sowie vier hochkonservierte Häm-bindene Histidine [99]. Die meisten Daten zeigen, dass die Mitglieder der Nox Familie selektiv für NADPH gegenüber NADH zu sein scheinen, jedoch halten dies einige Forscher für nicht ausreichend bewiesen und bevorzugen daher die Bezeichnung NAD(P)H Oxidase.

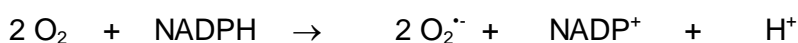
Obwohl alle Isoformen die Fähigkeit besitzen intrazelluläre ROS Level zu erhöhen, unterscheiden sie sich in Ihrer Aktivierung, Lokalisation, Untereinheiten-Zusammensetzung und Expression.

Im Gefäß sind drei Nox Mitglieder identifiziert worden. Nox1 wird von glatten Muskelzellen [101] und zu einem geringeren Ausmaß von Endothelzellen [102] [103] exprimiert. Nox2 wurde in Endothelzellen und adventitialen Fibroblasten [104] detektiert. Nox4 wird ubiquitär exprimiert und wurde in adventitialen Fibroblasten [104], glatten Muskelzellen [105] und im Endothelzellen [106] gefunden.

Bei den NADPH Oxidasen handelt sich um Enzymkomplexe, die sich aus membrangebundenen und zytosolischen Untereinheiten zusammensetzen. Abbildung 1-5 stellt den Aufbau des Enzymkomplexes dar. Das Glykoprotein Nox2 benötigt für die Assemblierung mindestens fünf zusätzliche Komponenten. Dazu zählt die membrangebundene Untereinheit p22^{phox}, die die Nox Proteine stabilisiert und als Andockstation für cytosolische Faktoren dient. Die Abkürzung phox steht dabei für *phagocyte oxidase*. Zusammen bilden Nox2 und p22^{phox} den sogenannten heterodimeren Flavocytochrom-b₅₅₈-Komplex [107]. Gemeinsam mit den zytosolischen Proteine p47^{phox}, p67^{phox}, der *small*GTPase Rac und der modulatorischen p40^{phox} Untereinheit, trägt p22^{phox} zur Aktivierung des Nox Enzyms bei.

Stimulierung der Zelle führt zur PKC-abhängigen Phosphorylierung und anschließender Translokation von p47^{phox} an die Membran. An p47^{phox} ist p67^{phox} gebunden, wodurch auch dieses Protein an die Membran transloziert wird, dort direkt mit Nox2 interagieren kann und zur Aktivierung führt [108, 109]. Ebenso wird die *small*GTPase Rac nach Zellaktivierung zur Membran rekrutiert und ist ebenso in die Aktivierung des Zellkomplexes involviert [110]. p40^{phox} dagegen scheint eher modulatorische Effekte auszuüben [111].

Das Substrat NADPH bindet auf der zytoplasmatischen Membranseite an die Nox2 (gp91^{phox}) Untereinheit und setzt zwei Elektronen frei. Die Elektronen werden durch FAD und die beiden Hämgruppen auf die gegenüberliegende Membranseite übertragen, wo sie Sauerstoffmoleküle zu Superoxidanionen reduzieren.



Verschiedene Faktoren, wie durch gesteigerten Blutfluss erhöhte Schubspannung am Endothel und vasoaktive Substanzen wie Angiotensin II, TNF- α und PDGF, regulieren die NADPH Oxidase Aktivität [112-116].

Angiotensin II wurde mit Nox1 [101, 117, 118] und Nox2 [119, 120] in Verbindung gebracht, während der Link zu Nox4 unter Diskussion steht [121].

1.6 Die Schlüsselkomponenten des Immunsystems

Das Immunsystem hat die Aufgabe den Organismus vor Infektionen durch Pathogene wie Bakterien, Viren oder Pilze zu schützen. In Säugetieren lässt es sich nach evolutionären und funktionellen Gesichtspunkten in zwei Bereiche unterteilen: Die angeborene (primäre) und die adaptive (erworbene/ sekundäre) Immunantwort. Die angeborene Immunantwort funktioniert schnell und unspezifisch und stellt die erste Verteidigungslinie gegen alle Pathogene dar. Sie beinhaltet verschiedene Immunzellen, darunter Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DCs), Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Granulozyten und zirkulierende Proteine (Komplementsystem), aber auch anatomische Barrieren wie die Haut, die Muskosa oder die Darmflora.

Die adaptive Immunität wiederum beruht auf zwei Armen: Der zellulären Antwort, welche vor allem T-Zellen involviert, und der humoralen Antwort, die Antikörpermediierten B-Zellantwort.

1.6.1 Die Rolle von Mustererkennungsrezeptoren in der angeborenen Immunität

Ein wichtiges System der angeborenen Immunantwort stellen Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptor*, PRRs) dar, welche konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) erkennen können, die normalerweise im Wirt selbst nicht vorhanden sind [122].

Zur Familie der PRRs gehören neben der Klasse der RIG-I-like Rezeptoren (RLRs), Scavenger-Rezeptoren (SRs), *C-type-lectin*-Rezeptoren, NOD-like Rezeptoren (NLRs) und Toll-like Rezeptoren (TLRs). TLRs sind als Teil des angeborenen Immunsystems für die Aktivierung von Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten beim ersten Kontakt mit Bakterien, Pilzen und Viren verantwortlich.

Der Name der TLRs leitet sich von Ihrer Homologie zu dem Protein aus *Drosophila melanogaster* Toll ab, das dort die Produktion antimikrobieller Substanzen reguliert [123, 124].

Die Interaktion von TLR und Pathogen führt über evolutionär konservierte Signalkaskaden zu einer schnellen Immunantwort mit der Induktion proinflammatorischer Cytokine und costimulatorischer Moleküle, der Reifung dendritischer Zellen sowie der Modulation der später einsetzenden adaptiven Immunantwort.

TLRs stellen einen Typ I Transmembran-Rezeptor dar und setzen sich in der Maus

aus 12 (TLR1-9, -11, -12 und -13) und im Menschen aus 10 (TLR1-10) verschiedenen Familienmitgliedern zusammen. Der bei Mäusen charakterisierte TLR11 wird beim Menschen aufgrund eines Stopp-Codons im TLR11-Locus nicht gebildet [122, 125].

Exprimiert werden die TLRs von zahlreichen Leukozyten, die jeweils charakteristische TLR-Expressionsmuster aufweisen wie Monozyten/ Makrophagen, dendritische Zellen, NK-Zellen, Neutrophile, Mastzellen, B-Zellen und T-Zellen. Die Expression von TLRs ist jedoch nicht auf Immunzellen beschränkt. Auch Gewebszellen wie Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen [126], glatte Muskelzellen [127] und Kardiomyozyten [128] exprimieren TLRs. Während TLR1, -2, -4, -5, -6 und -10 auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, befinden sich TLR3, -7, -8 und 9 an den Membranen intrazelluläre Kompartimente, den Lysosomen und Endosomen [129]. Die zelluläre wie auch subzelluläre Verteilung kann gewissen Modulationen unterliegen.

TLRs erkennen spezifisch PAMPs, die von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen stammen. Beispielsweise erkennt TLR4 LPS, TLR2 Lipopeptide, Lipoproteine oder Porine, TLR3 dsRNA und TLR7 ssRNA [130].

Strukturell sind TLRs charakterisiert durch eine extrazelluläre Domäne, die sich auszeichnet durch ein leucinreiches Wiederholungsmotiv (*leucine-rich repeat/ LRR*), das für die Bindung der Pathogene bedeutend ist. Der intrazelluläre Teil besitzt eine große Ähnlichkeit mit der intrazellulären Domäne der IL-1 Rezeptor Familie. Diese sog. TIR-Domäne (*Toll/IL-1 receptor homology domain*) ist essentiell für die Interaktion mit dem jeweiligen Adaptermolekül und somit für die Signaltransduktion [131]. Die Ligandenbindung führt zu Dimerisierung der Rezeptoren, wobei die meisten TLRs Homodimere bilden. TLR2 kann jedoch mit TLR1 oder TLR6 Heterodimere bilden [123, 132, 133].

Die Dimerisierung nach Ligandenbindung führt eine Konformationsänderung herbei, die die Rekrutierung von ebenfalls TIR-Domänen enthaltenen Adaptermolekülen bewirkt. Durch die TIR-TIR-Interaktionen wird die TLR-Signalkaskade initiiert, und weitere Proteine werden zum Proteinkomplex rekrutiert.

Es wurden bisher fünf verschiedene TIR-Domänen enthaltene Adapterproteine identifiziert: *Myloid differentiation factor 88* (MyD88), *MyD88-adapter like* (MAL), *TIR domain-containing adapter inducing interferon- β* (TRIF), *TRIF-related adapter molecule* (TRAM), *sterile α and HEAT-Armadillo motifs* (SARM).

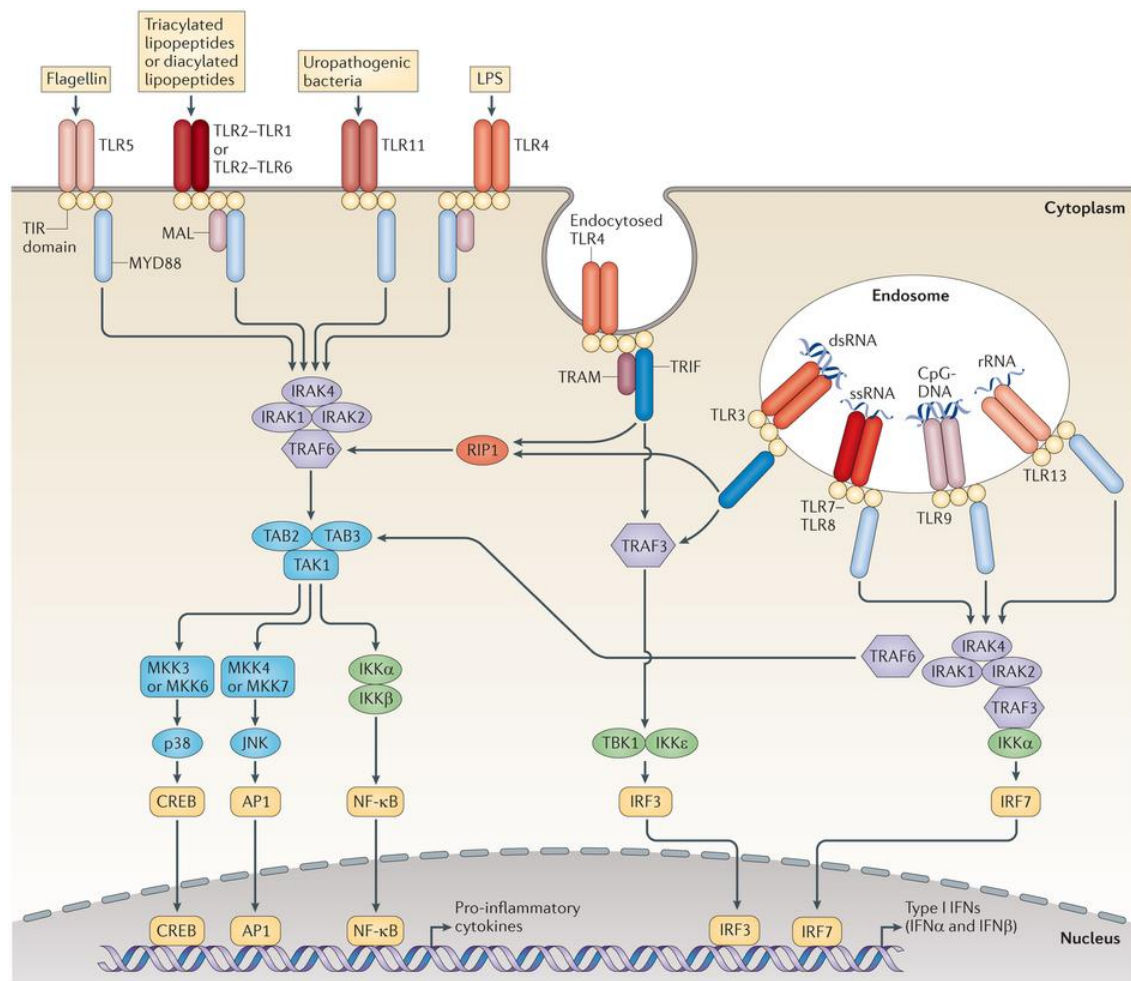
Das meist verbreitete Adaptermolekül, MyD88, ist an der Signalfortleitung aller TLRs außer TLR3 beteiligt [134, 135] und auch in die Signaltransduktion über IL-1R und IL-18R involviert [136].

MyD88 initiiert den sogenannten „MyD88-abhängigen Signalweg“, der über eine

mehrschrittige Signalkaskade und die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, p38, JNK und IRF zur Induktion von Genen für die proinflammatorische Immunantwort führt.

Untersuchungen von MyD88 Knockout Mäusen wiesen auf die Existenz eines weiteren Signalweges hin. Als Mediator dieses sogenannten „MyD88-unabhängigen Signalwegs“ wurde das Adapterprotein TRIF identifiziert, welches Signale von TLR3 und TLR4 übermittelt.

Ein Überblick über die Signaltransduktion über TLRs ist in Abbildung 1-5 dargestellt.



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 1-5: Der Toll-like Rezeptor Signalweg. TLR5, TLR11, TLR4 und die Heterodimere von TLR2–TLR1 oder TLR2–TLR6 binden ihre respektiven Liganden an der Zelloberfläche, während TLR3, TLR7–TLR8, TLR9 und TLR13 an den Endosomen lokalisiert sind, wo sie mikrobielle und fremde Nucleinsäuren erkennen. TLR4 ist sowohl an der Plasmamembran als auch an Endosomen lokalisiert. Der TLR Signalweg wird initiiert durch die Ligand-induzierte Dimerisierung des Rezeptors. Davon gefolgt rekrutieren die Toll/IL-1 *receptor homology* (TIR) Domänen der TLRs *TIR domain-containing adaptor Proteine* (entweder *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) und *MyD88-adaptor-like protein* (MAL), oder *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN-β* (TRIF) und *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM)). TLR4 bewegt sich von der Plasmamembran zu den Endosomen, um von der Signalgebung über MyD88 zu Trif zu wechseln. Durch die Einbeziehung der Signaladapterproteine folgt die Initiierung von *downstream* Signaltransduktionswegen unter Involvement der Interaktion zwischen IL-1R-associated kinases (IRAKs) und dem *adaptor molecules TNF receptor-associated factors* (TRAFs), und führen zur Aktivierung der *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), *JUN N-terminal kinase* (JNK) und p38, und schließlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Zwei wichtige Familien von Transkriptionsfaktoren, die durch TLR Signaltransduktion aktiviert werden, sind *nuclear factor-κB* (NF-κB) und der *interferon-regulatory factors* (IRFs), so wie andere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. *cyclic AMP-responsive element-binding protein* (CREB) und *activator protein 1* (AP1). Als Konsequenz kommt es zur Aktivierung proinflammatorischer Cytokine und bei endosomalen TLRs zur Induktion von *type I interferon* (IFN). Abk: dsRNA, *double-stranded RNA*; IKK, *inhibitor of NF-κB kinase*; LPS, *lipopolysaccharide*; MKK, MAP kinase kinase; RIP1, *receptor-interacting protein 1*; rRNA, *ribosomal RNA*; ssRNA, *single-*

stranded RNA; TAB, *TAK1-binding protein*; TAK, *TGF β -activated kinase*; TBK1, *TANK-binding kinase 1* [137].

1.6.1.1 Der MyD88-abhängige Signaltransduktionsweg

Die TLR-abhängige Signaltransduktion wurde in zahlreichen Publikationen zusammenfassend dargestellt [129, 138].

Beim MyD88-abhängigen Weg löst die Assoziation der TLRs mit MyD88- direkt oder indirekt über das Adapterprotein TIRAP (TLRs 2 und 4)- die Rekrutierung der Serin/Threoninkinasen der IRAK-Familie (*IL-1R-associated kinase*) aus. Die Rekrutierung erfolgt über die homophile Interaktion der Todesdomänen (*death domain*, DD), die sowohl MyD88 als auch IRAK4 und IRAK1 enthalten. IRAK1 wird hyperphosphoryliert und induziert die Interaktion mit der Ubiquitin-Ligase TRAF6 (*tumour-necrosis-factor-receptor-associated factor 6*). Der Komplex aus MyD88, IRAK4, IRAK1 und TRAF6 führt zur Aktivierung der MAP-Kinasen (p38 und JNK) Interferon-aktivierenden Faktoren (*Interferon regulator factor*, IRF3, IRF5 und IRF7) und zu einer Aktivierung des IKK-(NF- κ B Kinase) Komplexes. Durch IKK-induzierte Phosphorylierung und Degradierung von I κ B wird NF- κ B freigesetzt. NF- κ B-Dimere und MAP-Kinasen abhängige Transkriptionsfaktoren (AP-1) translozieren in den Nukleus und bewirken dort die Transkription von Genen, die in die Entzündungsreaktion involviert sind.

Beim MyD88-unabhängigen Weg wird anstelle des Adapterproteins MyD88 das Adapterprotein TRIF rekrutiert. Beim TRIF-abhängigen TLR4-Signalweg wird zusätzlich das Adapterprotein TRAM benötigt. Die Aktivierung von TRIF führt zur Rekrutierung der Kinase TBK1, die wiederum IRF3 induziert. Die Assoziation von TRAF6 mit dem Adapterprotein TRIF - bei TLR3 in Verbindung mit RIP1 - führt zur Aktivierung von NF- κ B. Dabei kommt es zur Bildung von Typ I-IFN [122].

1.7 Die Rolle der Inflammation in der arteriellen Hypertonie

Erste Experimente zu der Rolle des Immunsystems in der Entstehung des arteriellen Hypertonus wurden bereits in den 1960er, 70er und 80er Jahren durchgeführt. Diese tierexperimentellen Studien fokussierten sich auf die Suppression der Inflammation im Hypertonusmodell und zeigten erste Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Inflammation und der Blutdruckkontrolle. Vermutlich in der limitierten Verfügbarkeit von genetischen und immunmodulatorischen Werkzeugen begründet, wurden die Ergebnisse lange Zeit nicht eingehend verfolgt. Erst in der letzten Dekade

haben Forscher verstärkt versucht herauszufinden wie Hypertonie und Inflammation zusammenhängen.

Eine der ersten Studien, die das Immunsystem mit der Hypertonie kausal verknüpft, stammt aus dem Jahre 1964 von White und Grollmann [139]. Diese Forscher zeigten, dass Immunsuppression die Hypertonie in Ratten mit partiellem renalen Infarkt reduzierte. Die Forscher identifizierten Antikörper gegen renales Gewebe der Tiere und zeigten, dass der Transfer von Lymphknotenzellen dieser Ratten mit renalem Infarkt eine Hypertonie in normalen Empfängerratten zur Folge hatte. In den 70er Jahren wurde das Konzept vor allem durch Arbeiten von Svendsen und Kollegen weiter vorangetrieben unter Nutzung eines Salz-induzierten (DOCA-salt) Hypertonus Mausmodells [140]. Im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen führte die DOCA-salt Behandlung in atymischen Mäusen nicht zu einer Erhöhung des Blutdrucks, der Anstieg konnte durch Transfer von Lymphozyten jedoch wieder herbeigeführt werden. Diese Studien implizieren, dass die Immunzellaktivierung kritisch für die Aufrechterhaltung des Hypertonus ist. In den 1980 Jahren wurde das Konzept von verschiedenen Arbeitsgruppen weiter vorangetrieben. Es konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass der Transfer von Milzzellen hypertensiver Ratten in normaltensive Ratten ausreichend ist eine Blutdruckerhöhung auszulösen [141].

Heute häufen sich die Evidenzen, dass die lokale Inflammation der Gefäßwand eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von vaskulären Erkrankungen und dem atherosklerotischen Prozess darstellt. Während diese kurz beschriebenen frühen Studien sich sehr auf die Rolle von Lymphozyten und auf die Idee, dass Autoimmunität zum Hypertonus beiträgt, konzentrierten, wird heutzutage auch der adaptiven Immunität eine entscheidende Bedeutung zugeschrieben.

In einer Vielzahl von prospektiven Studien konnte ein starker Zusammenhang zwischen systemisch messbaren Inflammationsmarkern, wie Cytokinen (IL-6, TNF- α), Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin) und verschiedenen Akute-Phase-Proteinen, wie zum Beispiel dem C-reaktiven Protein (CRP), und konsekutiven kardiovaskulären Endpunkten gezeigt werden.

Die inflammatorischen Reaktionen involvieren komplexe Interaktionen von Immunzellen, wie Monozyten, Makrophagen, Neutrophile oder Lymphozyten, mit vaskulären Zellen, ausgelöst durch die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen, Cytokinen, Chemokinen, Matrixmetalloproteinasen und Wachstumsfaktoren [8, 142].

Die Identifikation der Mechanismen, die zur Aktivierung der Inflammation führen, soll dazu beitragen spezifische therapeutische Ansätze in der Hypertonie-Therapie und deren Komplikationen zu entwickeln.

Im Folgenden soll insbesondere auf ATII-getriebene inflammatorischen Ereignisse eingegangen werden, da dem RAS eine entscheidende Bedeutung zugeschrieben wird und zudem die Infusion des blutdruckregulierenden Hormons in der vorliegenden Arbeit als Modellsystem für die Hypertonieentwicklung eingesetzt wurde.

1.7.1 Mechanismen der Angiotensin II-induzierten Inflammation und Hypertonie

Angiotensin II ist der Schlüsselmediator des Renin–Angiotensin-Systems und spielt nicht nur eine Rolle in der Blutdruckkontrolle und Elektrolyt-Hämostase, sondern induziert auch inflammatorische Antworten in der Gefäßwand und ist ein wichtiger Mediator von oxidativem Stress. Die Signaltransduktion über den AT₁-Rezeptor führt zur Aktivierung der Superoxid produzierenden NADPH Oxidase. Intrazelluläre Signaltransduktionswege, wie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und redoxsensitiven inflammatorischen Antworten scheinen eng verbunden zu sein mit der vaskulären Inflammation in der arteriellen Hypertonie. Diese Prozesse sind mediiert durch viele intrazelluläre Proteine und Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), AP-1 (*activator protein-1*), STAT (*signal transducers and activators of transcription*) und HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*).

Insbesondere der Transkriptionsfaktor NF- κ B scheint wichtig zu sein in der vaskulären Inflammation, da dieser Transkriptionslevel von verschiedenen proinflammatorischen Genen reguliert [143]. Die Wichtigkeit von NF- κ B in der vaskulären Inflammation wurde durch verschiedene experimentelle Modelle der Atherosklerose und Hypertonie vorgeschlagen, demonstrierend, dass die Inhibition von NF- κ B die ATII-induzierte Expression von IL-6, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) und die Gefäßschädigung senkt .

Über die teils ROS abhängige Aktivierung bestimmte Signalkaskaden moduliert Angiotensin II alle drei Schritte einer inflammatorischen Antwort: Es erhöht die vaskuläre Permeabilität durch Prostaglandine (PGs) und den *vascular endothelial growth factor* (VEGF), fördert die Infiltration von Leukozyten durch Selectine, Integrine, Cytokine und Chemokine sowie den Gewebeumbau durch Mediatoren von Wachstum und Fibrose [144]. Die proinflammatorischen Eigenschaften von Angiotensin II scheinen alle über AT₁-Rezeptoren vermittelt zu werden. Auf die einzelnen Stadien und den Einfluss von ATII soll kurz eingegangen werden.

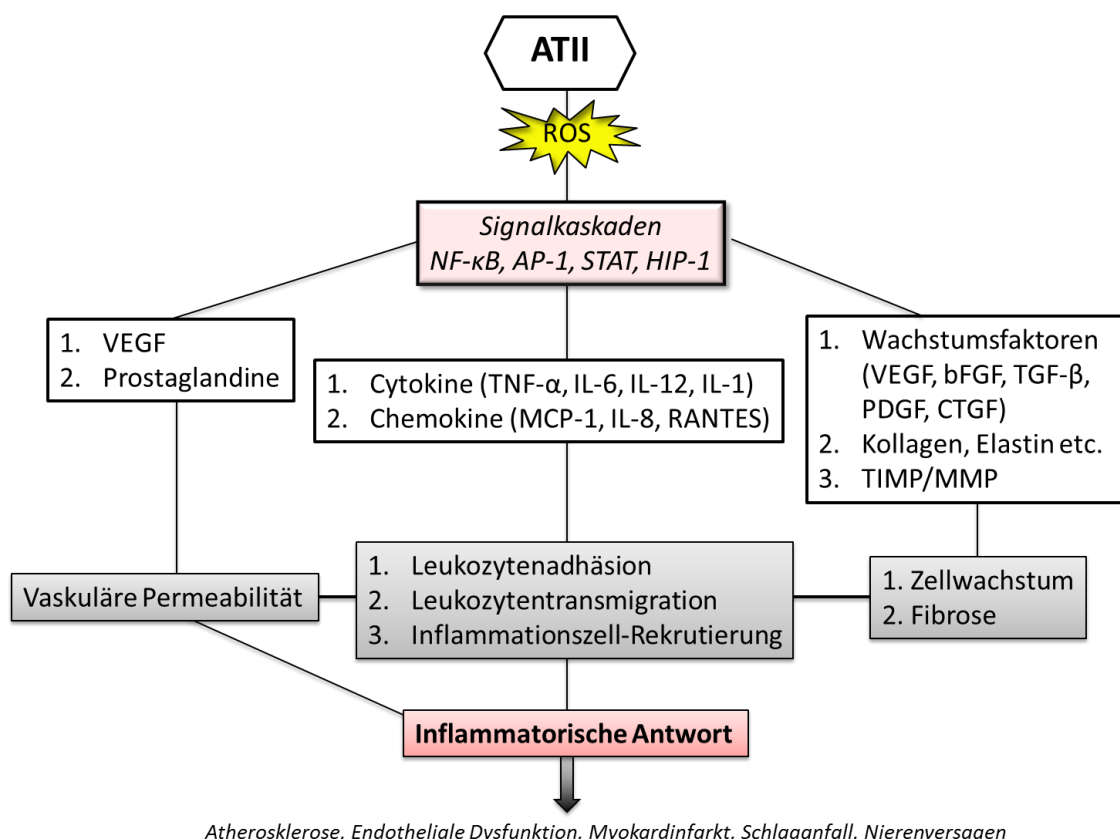


Abbildung 1-6: Die Angiotensin II-induzierte inflammatorische Antwort. Eine kurze Darstellung potenzieller Verbindung zwischen Hypertonie und inflammatorischen Prozessen. Abkürzungen: ATII, Angiotensin II; *bFGF*, *basic fibroblast growth factor*; ET-1, *endothelin-1*; ROS, *reactive oxygen species*; NF-κB, *nuclear factor-kappaB*; AP-1, *activator protein-1*; HIF-1, *hypoxia-inducible factor-1*; VEGF, *vascular endothelial cell growth factor*; MCP-1, *monocyte chemoattractant protein 1*; MMP, *matrix metalloproteinase*; TIMP, *tissue inhibitor of MMP*; VEGF, *vascular endothelium growth factor*; TGF-β *transforming growth factor-beta*; TNF-α, *tumor necrosis factor-alpha*; STAT, *signal transducers and activators of transcription*. Verändert nach [145].

Angiotensin II und vaskuläre Permeabilität

ATII erhöht die vaskuläre Permeabilität zum Teil durch die druckabhängige mechanische Verletzung des Endothels. Außerdem sind vermutlich andere Mediatoren beteiligt wie Eicosanoide z.B. Leukotrien C4, Prostaglandin E2 und I2 und der *vascular permeability factor*. Auch die ATII-medierte Phosphorylierung von Proteinen an Zell-Zellverbindungen wird in Betracht gezogen in die Permeabilitätserhöhung involviert zu sein [146, 147].

Angiotensin II und Leukozyteninfiltration

Es wird angenommen, dass ATII ein Schlüsselmolekül in der Regulation der Leukozytenadhäsion an die Arterienwand bei kardiovaskulären Erkrankungen darstellt. *In vitro* und *in vivo* wurde nachgewiesen, dass ATII die Adhäsion von Monozyten und

Neutrophilen an Endothelzellen durch die Hochregulation von proinflammatorischen Mediatoren fördert.

Die Infiltration von Leukozyten von der Zirkulation ins Gefäß umfasst drei Schritte: Das Rollen entlang des Gefäßes (*Rolling*), die Adhäsion und die Transmigration. Verschiedene proinflammatorische Mediatoren wie Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Cytokine sind involviert in diesen Prozess.

Zwei Klassen von Adhäsionsmoleküle sind insbesondere an der Adhäsion von Leukozyten beteiligt: Selectine und Integrine.

Selectine sind *lectin-like* Moleküle und exprimiert auf Leukozyten (L-Selectin), Endothelzellen (E-Selectin und P-Selectin) und Plättchen (P-Selectin). Sie vermitteln das „*Rolling*“ der Leukozyten am Gefäßendothel [148-150].

Integrine wiederum sind Zelloberflächen-Rezeptoren die aktivierten Leukozyten erlauben fest an Adhäsionsmoleküle von residenten vaskulären Zellen zu binden. Bei diesen Adhäsionsmolekülen handelt es sich z.B. um *intercellular cell adhesion molecules* (ICAM)-1, *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM)-1 und *vascular cell adhesion molecules* (VCAM)-1. In Endothelzellen reguliert ATII über ROS-abhängige Signalwege die Expression von E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 [151-153].

Diese Moleküle zur Leukozytenmigration funktionieren außerdem zusammen mit Chemoattractant-Molekülen aus Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) und Monozyten und vermitteln zusammen mit ihnen die transendotheliale Diapedese von Leukozyten. Auch die anschließende Chemotaxis im Interstitium der Gefäßwand wird vom Konzentrationsgradienten eines Chemoattractants gesteuert.

In VSMCs induziert Angiotensin II beispielsweise das Chemokine „*monocyte chemoattractant protein 1*“ (MCP-1), ein wichtiger proinflammatorischer Faktor in der Gefäßwand [154].

Angiotensin II und Gewebeumbau („*Remodelling*“)

Angiotensin II ist ebenfalls an der Zell-Hypertrophie/ Proliferation und Fibrose beteiligt. Autokrine und parakrine Wachstumsfaktoren wie bFGF (*basic fibroblast growth factor*), VEGF (*vascular endothelium growth factor*) sowie TGF- β (*transforming growth factor*) sind Regulatoren dieser Vorgänge.

TGF- β stellt den wichtigsten profibrotischen Faktor im Gefäß dar. Ein neutralisierender anti-TGF- β Antikörper verhinderte die ATII-induzierte Hypertrophie von proximalen tubulären Zellen [155]. In Carotiden von Ratten und in mesenterischen Arterien induziert ATII die Expression des potenten angiogenen und Endothelzell-mitogenen Faktor bFGF [156].

Angiotensin II stimuliert auch die Sekretion von VEGF, einem Schlüsselregulator für die Angiogenese in Rahmen der vaskulären Inflammation, aus VSMCs und Endothelzellen [147].

In VSMCs der Aorta beeinflusst ATII den Kollagen Metabolismus und konsequent damit die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM) durch Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMP9) und führt zu Verstärkung von deren Inhibitoren (TIMP-1, *tissue inhibitor of metalloproteinases*) [157].

1.7.1.1 Modulatorische Effekte von Angiotensin II auf Inflammationszellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems

Angiotensin II stellt einen (Co-)Aktivator für inflammatorische Zellen dar. In der Hypertonie ist die Anzahl zirkulierender Monozyten erhöht [158]. Dieser Zelltyp ist an jeder Phase der Atherogenese beteiligt [159].

Bataillard et al. demonstrierten, dass die Administration eines selektiven Toxin für Monozyten den Grad der Hypertonie in hypertensiven Ratten sowie die Hypertrophie des linken Ventrikels der Ratten verminderte, hinweisend auf eine essentielle Rolle dieser Zellpopulation in der Hypertonie [160].

Angiotensin II scheint einen Einfluss auf den Aktivierungszustand von Monozyten zu haben. Es wurde gezeigt, dass in Monozyten die Abgabe proinflammatorischer Cytokine wie das *monocyte chemoattractant protein* MCP-1 [161] Interleukin-1 β und *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) durch ATII stimuliert wird [162, 163].

In Aorten von spontan hypertensiven (SHR) Ratten, welche stark erhöhte ATII Level aufweisen, geht die massive Infiltration mit Makrophagen mit der Erhöhung von MCP-1 Leveln und seines Rezeptors. *C-C chemokine receptor* (CCR) 2, einher [161]. Außerdem ist die Angiotensin II-getriebene Makrophagen Infiltration in die Arterienwand so gut wie abwesend in CCR2-defizienten Mäusen [164].

Auf der Basis von der Expression von Chemokinrezeptoren und dem Vorhandensein von Oberflächenmarkern, lassen sich Monozyten in verschiedene Subspezies einteilen.

Bei der Maus unterscheidet man inflammatorische (oder auch als klassische) Ly6C^{high} Monozyten sowie patrollierende, reparative, nicht-klassische Ly6C^{low} Monozyten [165-167]. Tabelle 1-2 gibt einen Überblick über das murine und humane Expressionsprofil von Markern der Monozytensubklassen. CCR2 Defizienz reduziert die Rekrutierung von Ly6C^{high} Monozyten zu Inflammationsherden. Die protektiven Effekte der Defizienz von CCR2 in der Hypertonie deuten daher auf eine Rolle von inflammatorischen Monozyten in der Hypertonie hin, ähnlich wie in Atherosklerosemausmodellen, wo

eine massive Infiltration mit Ly6C^{high} Monozyten ins Gefäß im Rahmen der Plaque Entwicklung bereits gezeigt wurde [168].

Tabelle 1-2: Einteilung von humanen und murinen Monozyten in verschiedene Klassen anhand Ihrer Funktion und Oberflächenmarker. Abk.: Ly6C, *lymphocyte antigen C*; CCR2, C-C chemokine receptor type 2; CX₃CR1, CX3C chemokine receptor 1 oder fractalkine receptor; CD62L, L-Selectin; CD11b, Mac-1 α, integrin αM chain, CD115, *cluster of differentiation 115* (verändert nach [166])

| | Marker | Chemokin Rezeptoren | Funktionen |
|---------------------------------------|--|---|--|
| Maus | | | |
| <i>Ly6C^{high}</i> | CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly6C ^{high} CD62L ⁺ | CCR2 ^{high} CX ₃ CR1 ^{low} | Proinflammatorische und antimikrobielle Rolle |
| <i>Ly6C^{low}</i> | CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly6C ^{low} CD62L ⁻ | CX ₃ CR1 ^{high} CCR2 ^{low} | Patrollierend, frühe Antworten, Gewebereparatur |
| Human | | | |
| <i>Klassische</i> | CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ | CCR2 ^{high} CX ₃ CR1 ^{low} | Entsprechen Ly6C ^{high} Monozyten (basierend auf Gen- Expressionsanalysen) |
| <i>Intermediäre</i> | CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ | CX ₃ CR1 ^{high} CCR2 ^{low} | Proinflammatorische Rolle |
| <i>Patrollieren und antiviral</i> | CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺ | CX ₃ CR1 ^{high} CCR2 ^{low} | Patrollierend, anti-viral |

Die proinflammatorische Aktivität von Angiotensin II wird auch durch dendritische Zellen (DCs) vermittelt. Kultivierte DCs exprimieren AT₁R [169] und ATII führt zur erhöhten Migration, Reifung und Antigenpräsentationsfähigkeit von DCs [23, 169, 170].

Die protektive Effekte von AT₁R-Blockern beruhen vermutlich auch auf der Fähigkeit von ATII die Toll-like Rezeptor Aktivierung zu medieren. In kultivierten Mesengial-Zellen und VSMCs stimuliert ATII die TLR4 Expression, fördert zelluläre ROS bedingte Schädigung, Apoptose und Inflammation [171, 172].

Diese *in vivo* Studien gehen einher mit *in vivo* Versuchen, die einen protektiven Effekt der AT₁-Rezeptor Blockade vor der myokardialer Ischämie/Reperfusion Schädigung mit reduzierter TLR4 Expression und reduzierte Cytokine Freisetzung zeigen [173].

Die proinflammatorischen Effekte können auch T-Zellen involvieren, deren endogenes RAS die T-Zell Proliferation und Migration [22] zu modulieren scheint sowie die NADPH Aktivität und ROS Produktion [24]. ATII agiert über AT₁-Rezeptoren in T-Zellen in der Umverteilung des Zytoskeletts und fördert so spezifische Cytokine und Chemokine [22, 174, 175].

Die Infiltration von T-Zellen ins Gewebe wurde gezeigt in die Entwicklung der Hypertonie involviert zu sein, nachgewiesen durch einen abgeschwächten Blutdruck von ATII-infundierten oder DOCA-salt behandelten Rag1^{-/-} Mäuse, denen T- und B-Zellen fehlen. Adoptiver Transfer von T-Zellen und nicht von B-Zellen stellte hypertensive Antworten wieder her [176].

Auch IL-17 produzierende T-Zellen scheinen kritisch für die Aufrechterhaltung des Hypertonus zu sein [177].

(vgl. gesamten Abschnitt mit [178])

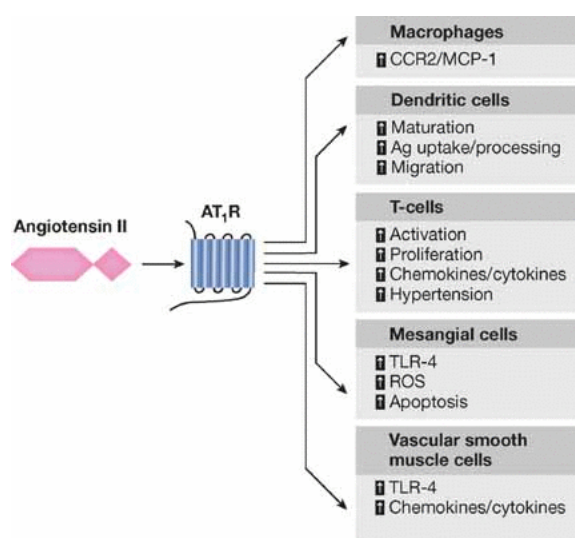


Abbildung 1-7: Die Rolle von Angiotensin II in der Gewebeeinflammation. Angiotensin II trägt durch Signaltransduktion über den ATII-Rezeptor Typ 1 (AT₁R) in Immunzellen sowie Mesangial-Zellen und vaskulären glatten Muskelzellen zur lokalen Aktivierung des Immunsystems bei [178]. Abk.: MCP-1, *monocyte chemoattractant protein*; CCR2, *C-C chemokine receptor type 2*; TLR-4, *Toll-like receptor 4*; ROS, *reactive oxygen species*.

1.7.2 Signaltransduktion über das Adapterprotein MyD88 und Toll-like Rezeptoren im Zusammenhang mit inflammationsgetriebenen kardiovaskulären Erkrankungen

Die Signaltransduktion über das Adapterprotein MyD88 wurde in Verbindung mit der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen gebracht und auch die erhöhte Expression von Toll-like Rezeptoren ist in diesem Zusammenhang bekannt.

Einen Hinweis auf die Bedeutung von MyD88 bei den Initialmechanismen von entzündlichen Prozessen von kardiovaskulären Erkrankungen, gibt eine Studie zur humanen Atherosklerose. Der seltene Asp299Gly TLR4 Polymorphismus, der die Rezeptor-Signalgebung vermindert, ist der Studie nach mit einem geringeren Atheroskleroserisiko assoziiert [179, 180]. Im Vergleich zu Probanden mit einem Wildtyp TLR4, zeigen Probanden mit dem Polymorphismus geringere Level an

proinflammatorischen Cytokinen, Akute-Phase-Proteinen und Adhäsionsmolekülen sowie eine geringere Intima-Media Verdickung von Halsschlagaderarterien. Eine weitere Studie zeigt eine Assoziation des Polymorphismus mit dem akuten Koronarsyndrom [181, 182].

„Auch TLR2 scheint an der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt zu sein. In humanen atherosklerotischen Plaques wurde eine erhöhte Expression von TLR2 und seinem Co-Rezeptor TLR1 nachgewiesen. Experimente an Mäusen und an Humangefäßen zeigen, dass eine TLR2-Aktivierung zur Induktion inflammatorischer Cytokine und zur Ausbildung einer atherosklerotischen Plaque führen kann. Tiere, denen das Gen für TLR2 fehlt, haben deutlich weniger arteriosklerotische Läsionen als Kontrolltiere. Zudem ist TLR2 für die Neointima-Bildung nach Gefäßschädigung nötig [183] und wesentlich an der Ausbildung post-ischämischer Schäden im Gehirn [184] und in den Koronargefäßen [185] beteiligt. Experimente an Mäusen und an humanen Gefäßen zeigen dagegen, dass TLR2-Aktivierung zur Produktion von entzündungsfördernden Botenstoffen und zur Ausbildung eines atherosklerotischen Plaque führen kann [186]“ [187].

Ebenso wurde nachgewiesen, dass MyD88 in die Myokardinfarktbildung involviert ist, insbesondere durch die Expression in Knochenmark-abstammenden Zellen. So zeigen chimäre Wildtyp Mäuse transplantiert mit MyD88 defizienten Knochenmarkzellen verminderte Myokardinfarktgrößen [188-190].

Die Gruppe von Alan Daugherty demonstrierte 2011 [191], dass MyD88 Defizienz in Leukozyten zu einer reduzierten ATII-induzierten Bildung von abdominellen Aortenaneurysmen in einem TLR2 und 4 unabhängigen Mechanismus führt, was darauf schließen lässt, dass Angiotensin II zur Auslösung von MyD88 abhängige Signalkaskaden führt.

Zusammenfassend deuten viele *In-vivo*-Untersuchungen auf eine klinisch relevante Beteiligung von MyD88 und TLRs an der Entstehung und Progression der Hypertonie und anderen kardiovaskulärer Erkrankungen hin. Forscher haben daher großes Interesse, Antagonisten der TLR-Aktivierung oder Signaltransduktion zu finden und als antiatherosklerotische Pharmaka einzusetzen [192].

Bisher ist jedoch kaum bekannt, wie die TLR-Expression in den Gefäßen reguliert wird und wie dieser Prozess beeinflusst werden könnte. Grundlegende Erkenntnisse zur Biologie und Pathobiologie der TLRs könnten möglicherweise zusätzliche innovative therapeutische Ansatzpunkte bieten [193, 194].

1.7.3 Projektrelevante Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe

1.7.3.1 Monozyten treiben die Angiotensin II-induzierte vaskuläre Dysfunktion an

Um den Einfluss inflammatorischer Zellen in der Entwicklung der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion genauer zu verstehen und zwischen den Effekten von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen auf ATII zu differenzieren, bediente meine Arbeitsgruppe sich eines Mausmodells, dass die selektive Ablation Lysozym M (LysM) positiver myelomonozytärer Zellen durch niedrig dosierte Diphtheriatoxin-Applikation erlaubt (Abbildung 1-8, A).

Mittels des verwendeten Depletionsegimes wurden zirkulierende Monozyten ablatiert, während die Zahl an Neutrophilen im Blut nicht reduziert wurde.

Depletierte LysM^{ΔTR} Mäuse reagierten mit einem abgeschwächten Blutdruckanstieg auf ATII Infusion *in vivo* (Abbildung 1-8, D), gleichzeitig waren ATII-induzierte vaskuläre Dysfunktion (Abbildung 1-8, C), oxidativer Stress, Inflammation und die Gefäßinfiltration von Nox2⁺F4/80⁺CD68⁺CD11b⁺GR-1⁺ Makrophagen sowie die Zahl zirkulierender CD11b⁺GR-1⁺CD115⁺ Monozyten im Vergleich zu nicht depletierten Kontrollmäusen vermindert.

Adoptiver Transfer von CD11b⁺GR-1⁺ Monozyten versus CD11b⁺GR-1⁺ neutrophiler Granulozyten aus Wildtyp Kontrollmäusen in depletierte LysM^{ΔTR} Mäuse zeigte, dass die Monozyten, nicht aber die Neutrophilen in der Lage waren, den Phänotyp der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion und Hypertonie wiederherzustellen (E und F).

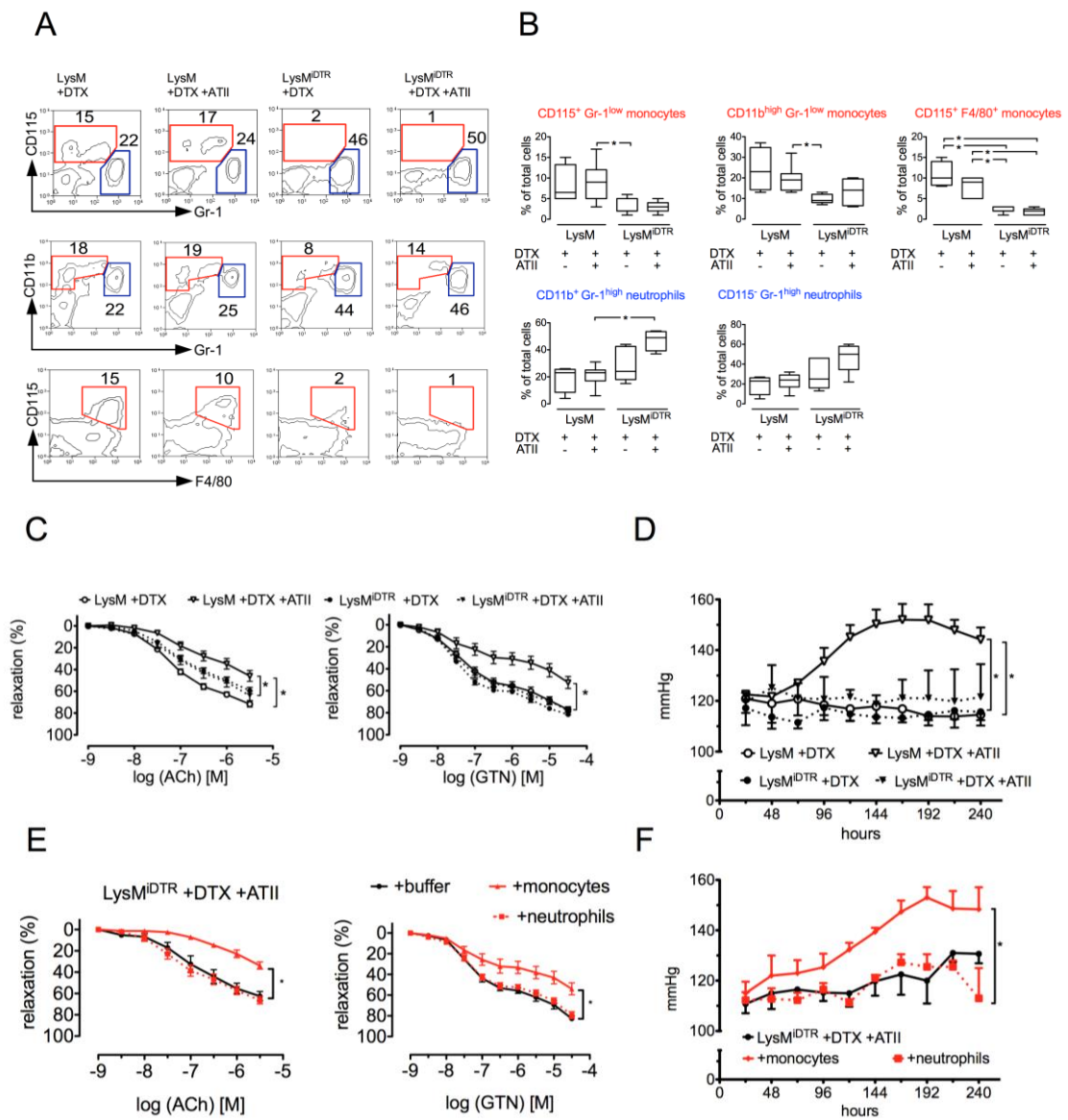


Abbildung 1-8: LysM⁺ Monozyten medieren die ATII-induzierte vaskuläre Dysfunktion und arterielle Hypertonie. A-B: Selektive Ablation LysM⁺ myelomonozytärer Zellen durch i.p. Gabe von niedrigdosiertem Diphtheriatoxin (DTX, 25 ng/g d1 bis d3 ng/g d4 bis d10) führte zur Depletion von Monozyten (CD115⁺Gr-1^{low}, CD11b⁺Gr-1^{low} CD115⁺F4/80⁺) nicht aber zur Depletion von CD11b⁺Gr-1^{high} oder CD115⁻Gr-1^{high} neutrophilen Granulozyten im Blut gemessen durch Durchflusszytometrie. Repräsentative Konturdiagramme (A); links statistische Auswertung (B). C-D: Die Monozyten Ablation in LysM^{ΔDTR} Mäusen führt zur Abschwächung des ATII (1mg/kg/d, 7d s.c.)-induzierten arteriellen Hypertonus (telemetrisch aufgezeichnet, D.S.I *carotid implants*) und der vaskulären Dysfunktion (endothelabhängige (ACh, Acetylcholin) und endothelunabhängige (GTN, Glyceroltrinitrat) Relaxation). Als Kontrollmäuse dienten LysM Mäuse ohne Cre-induzierbaren Diphteriotoxin-Rezeptor, die mit DTX kontrollinjiziert wurden. E-F: Beide Phänomene können durch Rekonstitution der Tiere mit CD11b⁺GR-1⁺ Monozyten wiederhergestellt werden, nicht jedoch mit CD11b⁺GR-1⁺ Neutrophilen (aus [195]).

1.7.3.2 Defizienz des Transkriptionsfaktors *T-box expressed in T-cells* (T-bet) schützt partiell vor der Angiotensin II-getriebenen vaskulären Dysfunktion

IFN- γ , ein pleiotropes Cytokin, ist dafür bekannt inflammatorische Reaktionen wie die Aktivierung von Makrophagen, die Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen und die Rekrutierung von Immunzellen zu Inflammationsherden zu fördern [196].

Neben Th₁-Zellen kommen auch andere Leukozyten als Quelle von IFN- γ in Betracht. So wurden vor allem Natürliche Killer (NK)-Zellen zusätzlich zu Th₁-Zellen als wichtige Quelle von IFN- γ beschrieben [196, 197].

Die Fähigkeit von Monozyten, antigenpräsentierenden Zellen (M ϕ , dendritische Zellen) [198], B-Zellen [198-201] und NKT-Zellen [202], zur IFN- γ Produktion ist ebenfalls publiziert und spielt vor allem in autokrinen Regulationsvorgängen dieser Zellpopulationen eine Rolle [203]. Für die Regulation übergeordneter proinflammatorischer Prozesse ist die IFN- γ -Produktion aus diesen Zelltypen am ehesten zweitrangig bzw. noch unzureichend bekannt; als dominante Quelle wird in diesem Falle die Produktion von IFN- γ aus T-Lymphozyten angesehen.

Der wichtigste Regulator der IFN- γ Produktion in CD4⁺ T-Zellen, NK-Zellen, Effektor CD8⁺ T-Zellen und NKT-Zellen ist der Transkriptionsfaktor T-bet (*T-box expressed in T cells*) [204]. T-bet ist involviert in die Reifung von CD4⁺ T-Zellen in einen Th₁ Phänotyp [205] und deren *Homing* zu Inflammationsherden [206]. Ebenso scheint T-bet in dendritischen Zellen benötigt zu werden zum *Priming* von Antigenen-spezifischen T-Zellen und in B-Zellen existiert ein Zusammenhang mit der Expression von T-bet und der IgG2a Produktion [204]. In NK-Zellen ist T-bet essentiell für die Reifung und Homeostase [207].

Experimente mit Tbx21^{-/-} Mäusen, in denen das Tbx21 Gen, welches für T-bet codiert, fehlt, zeigen die Wichtigkeit von T-bet in der Kontrolle von inflammatorischen und Autoimmunerkrankungen wie Typ I Diabetes [208, 209], Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) [210, 211], Lupus erythematoses [212], chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (*inflammatory bowel disease*) [213] und Arthritis [214] auf.

Während IFN- γ in der Atheroskleroseentwicklung eine überwiegend proatherogene Rolle zugeschrieben wird [215, 216], ist die Funktion des Cytokins im Zusammenhang

mit der endothelialen Dysfunktion und arteriellen Hypertonie noch nicht untersucht worden.

IFN- γ ist hochreguliert in der Milz von hypertensiven Ratten [217] und in der Niere von ATII-infundierten Mäusen [218]. Ferner wurde kürzlich gezeigt, dass die kardiale IFN- γ Expression mit der ATII-getriebenen Fibrose und damit Endorganschädigung im Herzen in Verbindung steht. Mäuse defizient für den IFN- γ -Rezeptor sind partiell geschützt vor diesem kardialen und renalen Schaden [219].

Die Beobachtungen sowie die Funktion von IFN- γ legen eine Rolle des Cytokins in der ATII-getriebenen Pathophysiologie der endothelialen Dysfunktion nahe, jedoch wurde die zelluläre Quelle und die Mechanismen des Einflusses auf die vaskuläre Funktion bisher nicht komplett verstanden.

Durch Vordaten zu dieser Arbeit aus der eigenen Gruppe, die einen Teil der Dissertation von Dr. med. Maria Isabel Schmidgen (Labor für Molekulare Kardiologie, II. Med., Unimedizin Mainz, 2013) darstellen, wurde gezeigt, dass in dem experimentellen Szenario des arteriellen Hypertonus mit ATII die Defizienz des Transkriptionsfaktors T-bet einen protektiven Effekt auf die Entstehung der vaskulärer Inflammation, des vaskulären oxidativen Stresses und der Gefäßdysfunktion ausübt. Demgegenüber wurde kein Einfluss der T-bet Defizienz auf die Entwicklung der arteriellen Hypertonie nachgewiesen (Abbildung 1-9).

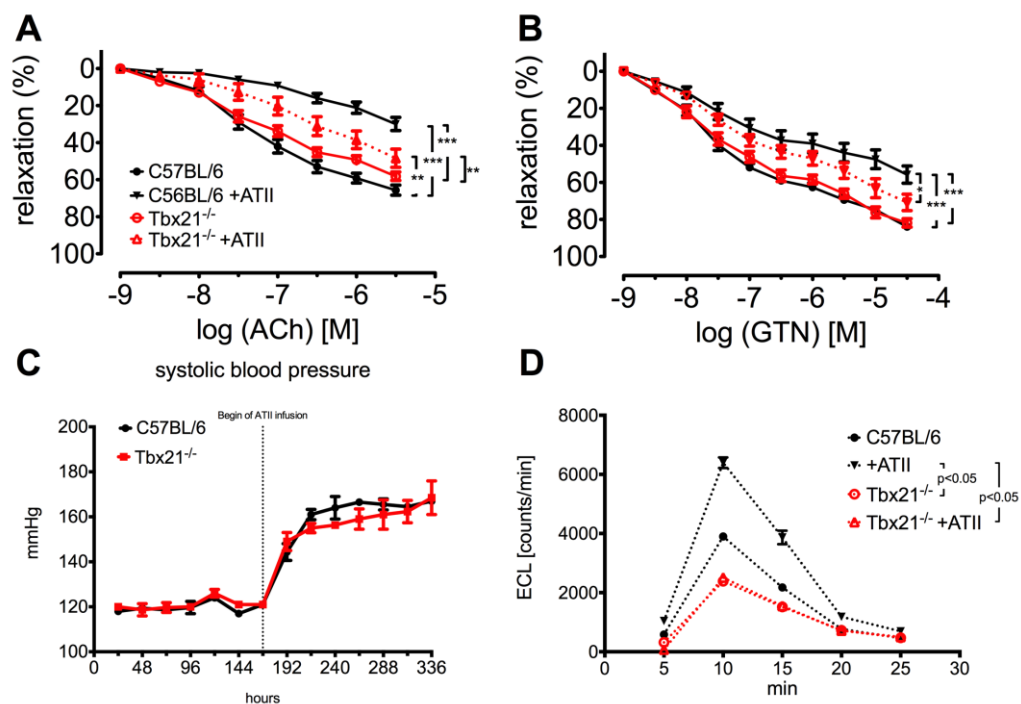


Abbildung 1-9: Tbx21^{-/-} Mäuse sind partiell geschützt vor der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion und oxidativen Stress. T-bet defiziente Tbx21^{-/-} und C57BL/6 Mäuse wurden über eine Woche mit Angiotensin II (1 mg/kg/d, s.c.) behandelt und anschließend die endotheliale (A, Acetylcholin, ACh) und glattmuskuläre Funktion (B, Glyceroltrinitrat, GTN) mittels isometrischer Spannungsstudien an isolierten Aortenringen und der oxidative Burst im Vollblut mittels L-012-verstärkter Chemilumineszenz (D) untersucht. Der arterielle systolische Blutdruck wurde telemetrisch mittels Carotis-Katheter eine Woche vor und während der ATII Behandlung gemessen (C) [220, 221].

1.8 Zielsetzung

Im ersten Teil der Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, ob die Aktivierung von Monozyten von der Expression des Angiotensin II-Rezeptor Typ1 (AT₁R) und der Expression der phagozytären NADPH Oxidase (Nox2) auf LysM⁺ Monozyten abhängig ist. Es soll die Hypothese getestet werden, dass

Inflammatorische Monozyten die Angiotensin II-induzierte vaskuläre Dysfunktion und arterielle Hypertonie durch ihre NADPH Oxidase Aktivität medieren (Hypothese 1).

Das Hauptziel des zweiten Teils der Arbeit ist es, die Hypothese zu testen, dass die ATII-induzierte vaskuläre Dysfunktion und Inflammation maßgeblich durch IFN- γ getrieben wird, welches die Aktivierung und vaskuläre Infiltration proinflammatorischer Monozyten/Makrophagen fördert. Im einzelnen sollen dabei die Hypothesen getestet werden, dass

IFN- γ und der Transkriptionsfaktor T-bet die Angiotensin II-induzierte vaskuläre Dysfunktion und oxidativen Stress medieren (Hypothese 2),

IFN- γ kostimulatorisch mit Angiotensin II Monozyten aktiviert und die Bildung von proinflammatorischen Monozyten sowie die Differenzierung zu proinflammatorischen Monozyten/ Makrophagen fördert (Hypothese 3) und

NK-Zellen mit Monozyten in der Ausprägung der IFN- γ -getriebenen vaskulären Dysfunktion kooperieren (Hypothese 4).

Das Ziel des dritten Teils der Arbeit stellt die Testung der Hypothese dar, dass der

Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) wichtig für die terminale Differenzierung von Monozyten und essentiell für die Angiotensin II-induzierte vaskuläre Inflammation ist (Hypothese 5).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Applichem (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

| Produkt | Hersteller | Firmensitz |
|---|----------------------------|--------------------------|
| 1 kb DNA Ladder | Invitrogen Life Tech. | Breda, Niederlande |
| 1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether (Isofluran) | Abbott Laboratories | Abbott Park, IL, USA |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) | Sigma-Aldrich | St. Louis, MO, USA |
| 2-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich | St. Louis, MO, USA |
| 8-Amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazin-1,4-(2H,3H)dion (L-012) | Wako Chemicals | Neuss, Deutschland |
| Acrylamid/bis (40% Lösung) | Bio-Rad | München, Deutschland |
| Alzane | Pfizer | Berlin, Deutschland |
| Angiotensin II, human | Sigma-Aldrich | St. Louis, MO, USA |
| Bepanthen® Augen und Nasensalbe | Bayer | Leverkusen, Deutschland |
| Collagenase Typ 2 | Gibco/ Lifetechnologies | Carlsbad, CA, USA |
| Dako REAL™ Hematoxylin | Dako | Hamburg, Deutschland |
| DHE (Dihydroxyethidium) | Sigma-Aldrich | St. Louis, MO, USA |
| Diphtheria Toxin from Corynebacterium diphtheriae | Sigma-Aldrich | St. Louis, MO USA |
| Direct PCR Lysis Reagent (Mouse Tail) | Viagen | Los Angeles, CA, , USA |
| DNA Molecular Weight Marker VIII | Roche Diagnostics | Mannheim, Deutschland |
| DNase I grade II | Roche | Mannheim, Deutschland |
| Dorbene | Pfizer | Berlin, Deutschland |
| DTT (Dithiothreitol) | Amersham Life Science | Glattbrugg, Schweiz |
| ECL™ Western Blotting Detecting Reagent | Amersham Biosciences | Piscataway, NJ, USA, USA |
| Expand Long Range dNTPack | Roche Diagnostics | Mannheim, Deutschland |
| Fentanyl y-Janssen 0,5 mg | Janssen-Cilag | Neuss, Deutschland |
| Flumazenil-hameln 0,1 mg/ml | Hameln pharma plus | Hameln, Deutschland |
| Forene (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether) – Isofluran | ABBOTT | Wiesbaden, Deutschland |
| Heparin-Natrium-25000-ratiopharm® | Ratiopharm | Ulm, Deutschland |
| Histowax | Leica Microsystems | Wetzlar, Deutschland |
| Ketamin HCl/ Xylazin HCl Lösung | Sigma-Aldrich | St. Louis, MO, USA |
| Liberase™ | Roche Diagnostics | Mannheim, Deutschland |

| | | |
|--|-----------------------------|----------------------------------|
| Microscopy Entellan® | Merck | Darmstadt, Deutschland |
| Midazolam-hameln | Hameln pharma plus | Hameln, Deutschland |
| Naloxon-ratiopharm 0,4 mg/ml | ratiopharm | Ulm, Deutschland |
| Nitroglycerin (Nitrolingual Infusionslösung) | G. Pohl-Boskamp | Hohenlockstedt, Deutschland |
| Peroxidase from horseradish Type VI | Sigma-Aldrich | St. Louis, MO |
| Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) | Sigma-Aldrich | St. Louis, MO, USA |
| Phorbol-12,13-Dibutyrate, PDBu | Sigma-Aldrich | Hamburg, Deutschland |
| Phosphate Buffered Saline (PBS) | Life Technologies Gibco BRL | New York, N.Y., USA |
| Pierce ECL Western Blotting Substrate (Peroxide Solution, Luminol Enhancer Solution) | Perbio Science | Bonn, Deutschland |
| Ponceau S Lösung | Sigma-Aldrich | St. Louis, MO, USA |
| Povidon-Iod (Braunol®) | B. Braun Melsungen AG | Melsungen, Deutschland |
| Pre-stained Protein (BenchMark™) | BioRad | München, Deutschland |
| Protein Ladder (BenchMark™) | Invitrogen Life Tech. | Breda, Niederlande |
| Temgesic 0,3 mg/ml | Reckitt Benckiser | Koblenz, Deutschland |
| TissueTek® O.C.T.™ Compound | Sakura Finetek | Alphen aan den Rijn, Niederlande |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich | St. Louis, MO, USA |

2.1.2 Kits und Assay Solutions

| Kit/ Assay | Hersteller (Firmensitz) |
|--|---|
| DAB Peroxidase Substrate Kit | VECTOR LABORATORIES, INC. (Burlingame, CA, USA) |
| QuantiTect Probe RT-PCR Kit | Qiagen (Hilden, Deutschland) |
| REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix | Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) |
| RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kits | Qiagen (Hilden, Deutschland) |
| Substrat Detection Reagent Kit | R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) |
| TaqMan® Gene Expression Assay | Applied Biosystems Life Tech. (Carlsbad, CA, USA) |
| VECTASTAIN ABC Kit PK-4002 (Mouse IgG) | VECTOR LABORATORIES, INC. (Burlingame, CA, USA) |

MACS® Cell Separation Reagenzien

(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)

| Name | Bestellnummer |
|-------------------------------|---------------|
| CD11b-Microbeads (auch human) | 130-049-601 |
| Ter119-Microbeads | 130-049-901 |
| CD90.1-Microbeads | 130-094-523 |
| CD45R-Microbeads | 130-049-501 |
| CD49b (DX5) MicroBeads | 130-052-501 |

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

| Produkt | Hersteller (Firmensitz) |
|---|--|
| 1 ml Spritze Omnifix-F Luer, klar | Braun B. Melsungen (Melsungen, Deutschland) |
| 1 ml-Spritze, Tuberkulinspritze, grün | Braun B. Melsungen (Melsungen, Deutschland) |
| 10, 20, 200, 1000 µl Filterspitzen, steril, Rack | StarLab (Hamburg, Deutschland) |
| 2 ml-Spritze, Injekt Luer | Braun B. Melsungen (Melsungen, Deutschland) |
| 24-well Platten, Platte für Suspensionskultur, steril | Greiner (Frickenhausen, Deutschland) |
| 5 ml-Spritze, BD Discardit II | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| 50 ml-Perfusorspritze, latexfrei | Braun B. Melsungen (Melsungen, Deutschland) |
| 6-well Platten, Flachboden mit Deckel | Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) |
| 96-well Platten, PS, steril, F-Boden | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Abdeckfolie viewseal | Greiner (Frickenhausen, Deutschland) |
| ALZET Osmotic Pump 1077 D (0,5 µl/h für 7 Tage) | ALZET (Cupertino, CA, USA) |
| C-Chip Neubauer Improved | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Cell Strainer 40 µm, steril, Nylon | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Cell Strainer 70 µm, steril, Nylon | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Eppendorf® Pipettenspitzen 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Falcon® Gefäß 15 ml und 50 ml | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Gel Blotting Papier GB 002 | Whatman (Dassel, Deutschland) |
| ImmunoPlatten MaxiSorp F96 (NUNC) | VWR (Darmstadt, Deutschland) |
| Kanüle 26G; 0,45x13mm | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Kanüle 30G; 0,30x13mm | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Latexhandschuh, Größe S | Lohmann & Rauscher (Neuwied, Deutschland) |
| Low Profile 96-well unskirted PCR Plate, natural | Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland) |
| MACS MS-Säule, steril | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) |
| Micro Amp Optical Well Reaction Plate | Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) |
| Microseal "B" Adhesive Seals | Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland) |
| Microtiterplatte, PP, 96-well, m.halb.Rand | Greiner (Frickenhausen, Deutschland) |
| Mini-Trans-Blot Filterpapier | Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland) |
| Objekträger | Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland) |
| Pasteurpipetten, unsteril | VWR (Darmstadt, Deutschland) |
| PCR-Gefäße, 8er-Strips, PP, anh.Deckel, 0,2 ml | Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) |
| Perma Handseide 768G 7/0 2xG6, 1x45m | Johnson & Johnson (Neuss, Deutschland) |
| Petrischale, 94x16mm, ohne Nocken, PS | Greiner (Frickenhausen, Deutschland) |
| Prolene 8648H 7/0 P6, 1x45m | Johnson & Johnson (Neuss, Deutschland) |
| Prolene 8706H 6/0 C1+C1, 1x 75cm | Johnson & Johnson (Neuss, Deutschland) |
| Prolene 8889H 6/0 C1, 1x75cm | Johnson & Johnson (Neuss, Deutschland) |
| Prolene EH7469LG 8/0 2xBV 130-5, 1x 75cm | Johnson & Johnson (Neuss, Deutschland) |
| Protran Nitrozellulose Transfer | Whatman (Dassel, Deutschland) |

| | |
|--|---|
| Membran | |
| Röhrchen mit Rundboden, PS, 6 ml, unsteril | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| serologische Pipette, 5, 10, 25, 50 ml | Greiner (Frickenhausen, Deutschland) |
| Skalpell Feather Fig 11 | PFM medical AG (Köln, Deutschland) |
| Skalpell Feather Fig 21 | PFM medical AG (Köln, Deutschland) |
| stainless steel beads | Qiagen (Hilden, Deutschland) |
| Vasofix safety Braunüle 22G blau | Braun B. Melsungen (Melsungen, Deutschland) |
| Vicryl Rapide V4930H, 45 cm | Johnson & Johnson (Neuss, Deutschland) |
| Wundklammern nach Michel, 7,5x1,75mm | Stoss-Medica (Wiesbaden, Deutschland) |

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Durchflusszytometrie

| Name (anti-mouse): | Konjugat | Klon | Firma |
|----------------------------------|----------------|------------|--|
| CD11b (Mac-1) | PE | M1/70 | BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) |
| CD11b (Mac-1) | PE-Cy7 | M1/70 | eBioscience (San Diego, CA, USA) |
| CD16/CD32 (FC Receptor Block) | | 93 | eBioscience (San Diego, CA, USA) |
| CD45 | APC-eFluor 780 | 30-F11 | eBioscience (San Diego, CA, USA) |
| CD45.1 | PE | A20 | BD Pharmingen™ (Heidelberg, Deutschland) |
| CD45.2 | FITC | 104 | eBioscience (San Diego, CA, USA) |
| F4/80 | APC | BM8 | eBioscience (San Diego, CA, USA) |
| Fixable viability Dye eFluor 506 | eFluor 506 | | eBioscience (San Diego, CA, USA) |
| IFN-γ | PE oder FITC | XMG1.1 | eBioscience (San Diego, CA, USA) |
| IgG1K Isotype Control | PE | P3.6.2.8.1 | eBioscience (San Diego, CA, USA) |
| IgG2alpha, K Isotype Control | FITC | R35-95 | BD Pharmingen™ (Heidelberg, Deutschland) |
| IL-12/IL-23 p40 | PE | C17.8 | eBioscience (San Diego, CA, USA) |
| Ly6C | Per-Cp5.5 | AL-21 | BD Pharmingen™ (Heidelberg, Deutschland) |
| Ly6G (Gr-1) | FITC | 1A8 | BD Pharmingen™ (Heidelberg, Deutschland) |
| Ly6G und Ly6C (Gr1) | FITC | RB6-8C5 | BD Pharmingen™ (Heidelberg, Deutschland) |
| Ly6G und Ly6C (Gr1) | V450 | RB6-8C5 | BD Pharmingen™ |

| | | | |
|-------------|--------|---------|-------------------------------------|
| | | | (Heidelberg, Deutschland) |
| NK1.1 | PE-Cy7 | PK136 | eBioscience (San Diego, CA, USA) |
| NK1.1 | FITC | PK136 | eBioscience (San Diego, CA, USA) |
| TCR β | PE-Cy5 | H57-597 | eBioscience (San Diego, CA, USA) |

2.1.4.2 Immunhistochemie

Primärantikörper

| Antikörper | Hersteller (Firmensitz) | Bestellnummer |
|-----------------------|--|----------------------|
| anti-mouse F4/80 | eBioscience (San Diego, CA, USA) | 14-4801-82 |
| anti-gp91phox | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) | 611415 |
| mouse anti-human CD68 | Dako (Hamburg, Deutschland) | M087629 |

2.1.4.3 Western Blot

2.1.4.3.1 Primärantikörper

| Reaktivität | Host | Klon | Hersteller (Firmensitz) | Bestellnummer |
|--------------------|-------------|-------------------------------|---|----------------------|
| anti-alpha-Actinin | mouse | monoclonal, BM-75.2 | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) | A5044-.2ML |
| gp91-Phox, mAb | mouse | monoclonal, 53/gp91 [phox] | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) | 611414 |
| Hemeoygenase 1 | rabbit | monoclonal | Epitomics/Biomol (Hamburg, Deutschland) | 2322-1 |
| Nox1(MOX-1 (H-15)) | goat | polyclonal | Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, CA, USA) | sc-5821 |

2.1.4.3.2 Sekundärantikörper

| Reaktivität | Hersteller (Firmensitz) | Bestellnummer |
|---|--|---------------|
| Anti- <i>mouse</i> -IgG, Peroxidase labeled | Vector Labs. (Burlingame, CA, USA) | PI-2000 |
| Anti- <i>rabbit</i> -IgG, Peroxidase labeled | Vector Labs. (Burlingame, CA, USA) | PI-1000 |
| rabbit-anti- <i>goat</i> -IgG, HRP-conjugated | Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, CA, USA) | sc-2768 |

2.1.4.4 Polymerase-Kettenreaktion: Primer und Sonden

2.1.4.4.1 Primer Genotypisierung

Alle Primer zur Genotypisierung sowie für die Expressionsanalyse von IL-12 wurden von Invitrogen (Kalsruhe, Deutschland) bezogen.

| Name | Sequenz 5' to 3' |
|-------------------------------|------------------------------------|
| Genotypisierung Cre allgemein | |
| Cre FA | GGA CAT GTT CAG GGA TCG CCA GGC G |
| Cre RE | GCA TAA CCA GTG AAA CAG CAT TGC TG |
| MLys 1 | CTT GGG CTG CAA GAA TTT CTC |
| Mlys 2 | TTA CAG TCG GCC AGG CTG AC |
| Invitrogen | CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG |
| Genotypisierung LysM iDTR | |
| RosaFA | AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT |
| RosaRE | GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG |
| SpliAcB | CAT CAA GGA AAC CCT GGA CTA CTG |
| Genotypisierung IL-12 | |
| IL-12p40 AS | TCC GGA GTA ATT GGT GGT TCA CAC |
| IL-12p40 AS | CAG AAG GTA ACC ATC TCC TGG TTT G |
| Genotypisierung L-32 | |
| L-32 for | CCTCTGGTGAAGCCCAAGATC |
| L-32 rev | TCTGGGTTTTCCGCCAGTTT |

2.1.4.4.2 qRT-PCR Primer

Aus dem TaqMan® Gene Expression Assay Sortiment von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) wurden folgende Primer und Sonden verwendet:

| Name Primer | Alias | Genname | Bestellnummer |
|-----------------------------------|---|--|---------------|
| CD68 | Scard1, gp110 | CD68 antigen | Mm03047340_m1 |
| CX3CR1 | CX3CR1 | chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 | Mm02620111_s1 |
| Ifng | IFN-g, Ifg | interferon gamma | Mm99999071_m1 |
| Ifng | IFN-g, Ifg | interferon gamma | Mm01168134_m1 |
| Il12b | Il-12b, Il-12p40, Il12p40, RP23-388G23.1, p40 | interleukin 12b | Mm00434174_m1 |
| Il1b | IL-1beta, Il-1b, RP23-384K11.2 | interleukin 1 beta | Mm00434228_m1 |
| Nos2 | NOS-II, Nos-2, Nos2a, RP23-NOS-II, Nos-2 | nitric oxide synthase nitric oxide synthase 2, inducible | Mm00440485_m1 |
| Nos3 | 2310065A03Rik, Nos-3, eNOS, ecNOS | nitric oxide synthase 3, endothelial cell | Mm00435204_m1 |
| Sel-L | AI528707, CD62L, L-selectin, LECAM-1, Lnh, Ly-22, Ly-m22, Lyam-1, Lyam1 | selectin, lymphocyte | Mm00441291_m1 |
| TBP FAM markiert | GTF2D1, Gtf2d, SCA17, TFIID | TATA box binding protein | Mm00446973_m1 |
| TBP VIC markiert (Primer limited) | GTF2D1, Gtf2d, SCA17, TFIID | TATA box binding protein | Mm00446973_m1 |
| Tnf | DIF, TNF-alpha, TNFSF2, TNFalpha, Tnfa, Tnfsf1a | tumor necrosis factor | Mm00443258_m1 |
| Vcam1 | CD106, Vcam-1 | vascular cell adhesion molecule 1 | Mm00449197_m1 |

2.1.5 Geräte

| Bezeichnung Gerät | Hersteller | Firmensitz |
|--|----------------------|----------------------|
| BD FACSCanto II | BD Biosciences | San Jose, CA, USA |
| Castroviejo Federschere, stark gebogen, 10mm | F.S.T. | Berlin, Deutschland |
| Centrifuge 5424 R | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Centrifuge 5702 R-Bundle A-4-38 | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Centrifuge 5810 R-Bundle A-4-81 | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| CFX96 Real-Time PCR Detection System | Bio-Rad Laboratories | München, Deutschland |
| Cryostat Leica | Leica | Wetzlar, Deutschland |
| Dumont #5 INOX, 11cm | F.S.T. | Berlin, Deutschland |
| Durchlichtmikroskop, Axio Lab. A1 | Carl Zeiss | Jena, Deutschland |

| | | |
|---|--------------------------------------|------------------------------|
| Eppendorf Research® plus Pipetten 10, 20, 100, 200, 1000 µL | Microlmaging Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| eXcellence Imaging System Forschungsmikroskop | Olympus Deutschland | Hamburg, Deutschland |
| GelDoc™ EZ imager | Bio Rad Laboratories | München, Deutschland |
| Heraeus Fresco 21 Zentrifuge | Thermo Scientific | Rockford, IL, USA |
| Hofer Power Supply PS2A200 | SERVA Electrophoresis | Heidelberg, Deutschland |
| INTAS ChemoCam ECL Imager HR 16 | Intas Science Imaging Instruments | Göttingen, Deutschland |
| Intas Gel iX | Intas Science Imaging Instruments | Göttingen, Deutschland |
| Kamera (Axiovert 40 CFL) | Carl Zeiss | Aalen, Deutschland |
| KS 260 basic Kreisschüttler | IKA-Werke | Staufen, Deutschland |
| Labor-pH-Meter mit mDa-Schnittstelle | Deutsche METROHM | Filderstadt, Deutschland |
| Leica M50 Mikroskop | Leica Mikrosysteme | Wetzlar, Deutschland |
| Lumat LB 9507 | Berthold Technologies | Sprendlingen, Deutschland |
| Lumat LB 9507-2 "Reportergeren" | Berthold Technologies | Sprendlingen, Deutschland |
| Mastercycler pro S | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Mayo Scissors, gebogen, stumpf/stumpf, 15cm | F.S.T. | Berlin, Deutschland |
| Microtim RM2125 RTS | Leica | Wetzlar, Deutschland |
| Mikrotiterplattenrotor M-20 | Thermo Electron LED | Niederelbert, Deutschland |
| Mini-PROTEAN Tetra Cell, Mini Trans- Blot | Bio-Rad Laboratories | München, Deutschland |
| NanoDrop ND-2000C UV/Vis- Spektralphotometer | PEQLAB Biotechnologies | Erlangen, Deutschland |
| Opsys MR Microplate Reader | Dynex Technologies | Denkendorf, Deutschland |
| Paraffin Dispenser (EG1120) | Leica | Wetzlar, Deutschland |
| Power Pac HC Power Supply | Bio-Rad Laboratories | München, Deutschland |
| Radnoti 8 Chamber Tissue-Organ Bath System | ADInstruments | Spechbach, Deutschland |
| Radnoti 8 Chamber Tissue-Organ Bath System | ADInstruments | Spechbach, Deutschland |
| RW 16 basic Rührwerk | IKA-Werke | Staufen, Deutschland |
| Schere gerade, spitz/spitz | F.S.T. | Berlin, Deutschland |
| StepOnePlus Real-Time PCR System | Life Technologies | Carlsbad, CA, USA |
| Student Dumont #7 Inox | F.S.T. | Berlin, Deutschland |
| Surgical Scissors, gerade, spitz/stumpf, 14cm | F.S.T. | Berlin, Deutschland |
| T 10 basic ULTRA-TURRAX | IKA-Werke | Staufen, Deutschland |
| TE 62 Transfer Cooled Unit | VWR International | Darmstadt, Deutschland |
| Telemetriekatheter TA-PA11C10 und Receiver-Plattformen | Data Science International (DSI) | St. Paul, MN , USA |
| Thermomix Comfort | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Thermomixer compact | VWR International | Darmstadt, Deutschland |
| Tiefkühlschrank -86° | VWR International | Darmstadt, Deutschland |
| Tisch-Rundschüttler mit Magnetantrieb | Sartorius Stedim | Göttingen, Deutschland |

| | | |
|---|----------------------------|---------------------------------|
| Ultraschallgerät Vivid E9 BT11 | GE Healthcare | Solingen, Deutschland |
| Vannas Spring Scissor, Federschere 3 mm Schneide | F.S.T. | Berlin, Deutschland |
| Ventilated Cabinet | Techniplast Deutschland | Hohenpeißenberg, Deutschland |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries | Bohemia, NY, USA |

2.1.6 Software

| Program | Hersteller |
|---|--|
| Adope Photoshop CS2 Version 0.0.2 | Adope Systems (München, Deutschland) |
| Axiovision Rel 4.3 | Carl Zeiss (Aalen, Deutschland) |
| CFX Manager™ Software Version 2.1 | Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland) |
| Chart 5 (Organbad) | ADInstruments (Spechbach, Deutschland) |
| DataQuestSystems | Data Science International (St. Paul, MN, USA) |
| Endnote X6 | Thomson reuters (New York City, NY, USA) |
| FACS Diva 6.0 | BD Biosciences (San Jose, CA USA) |
| Gel-Pro Analyzer 6.0 | Media Cybernetics (Rockville, MD, USA) |
| Powerlab amplifier (Mac-Lab/8e) (Organbad) | ADInstruments (Spechbach, Deutschland) |
| Powerlab force transducer (Organbad) | ADInstruments (Spechbach, Deutschland) |
| Primsn 6 for Mac QS X | GraphPad Software Inc (La Jolla, CA, USA) |
| Revelation 4.25 | Dynex Magellan Bioscinces (Denkendorf, Deutschland) |
| Word Mac 2011 | Redmond (WA, USA) |

2.1.7 Allgemeine Puffer und Lösungen

Alle folgenden Puffer und Lösungen wurden mit *Aqua bidest.* (ddH₂O) angesetzt.

Gewebepräparation und Organbad

Krebs-Hepes (KH) Puffer:

| | |
|---------------------------------|----------|
| NaCl | 99,01 mM |
| KCl | 2,69 mM |
| CaCl ₂ | 2,5 mM |
| MgSO ₄ | 1,2 mM |
| NaHCO ₃ | 25 mM |
| K ₂ HPO ₄ | 1,03 mM |
| Na-HEPES | 20 mM |
| D-Glucose | 11,1 mM |
| pH 7,35 | |

Krebs–Hepes–Puffer mit Inhibitoren (KH-I)

| | |
|-----------------------|--------|
| Aprotinin (1,2 mg/ml) | 100 µl |
| Pepstatin (2,5 mg/ml) | 40 µl |
| Leupeptin (5 mg/ml) | 10 µl |
| Ad 10ml KH –Puffer. | |

Organbadpuffer

| | |
|---------------------------------|----------|
| NaCl | 118,3 mM |
| KCl | 4,69 mM |
| CaCl ₂ | 1,87 mM |
| MgSO ₄ | 1,2 mM |
| NaHCO ₃ | 25,0 mM |
| K ₂ HPO ₄ | 1,03 mM |
| Glukose | 11,1 mM |
| pH 7.4 | |

SDS PAGE und Western Blot

Homogenisierungs-Puffer (Hg-Puffer)

| | |
|------------|--------|
| Tris-HCl | 20 mM |
| Saccharose | 250 mM |
| EGTA | 3 mM |
| EDTA | 20 mM |
| pH 7,5 | |

Homogenisierungs-Lösung

| | |
|---|--------|
| Protease Inhibitor Cocktail | 100 µl |
| Phosphatase Inhibitor Cocktail | 100 µl |
| PMSF (0,1 M in Methanol, final 0,5 mM) | 50 µl |
| Triton-X-100 | 100 µl |
| Na-Vandat (0,1 M in H ₂ O, final 0,5 mM) | 100 µl |
| Ad 10 ml Homogenisierungs-Puffer. | |

Laemmli-Puffer (3X)

| | |
|-------------------|---------------|
| Tris-HCl (pH 6,8) | 187,5 mM |
| Glyzerin | 30% (v/v) |
| SDS | 6% (w/v) |
| β-Mercaptoethanol | 15 % (v/v) |
| Bromphenolblau | 0,003 % (w/v) |

Natriumdodecylsulfat (10%)

| | |
|----------------------------|------------|
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | 10 % (w/v) |
| Ad 100 ml Aqua dest. | |

Ammoniumpersulfat (10%)

| | |
|-------------------------|------------|
| Ammoniumpersulfat (APS) | 10 % (w/v) |
| Ad 100 ml Aqua dest. | |

Laufpuffer

| | |
|-----------|--------|
| Tris-base | 25 mM |
| Glycin | 92 mM |
| SDS | 3,5 mM |

Trenngel-Puffer

| | |
|----------|-------|
| Tris-HCl | 1,5 M |
| pH 8,8 | |

Sammelgel-Puffer

| | |
|----------|-------|
| Tris-HCl | 0,5 M |
| pH 6,8 | |

Transferpuffer

| | |
|--|--------|
| Tris-base | 25 mM |
| Glycin | 192 mM |
| Ad 800 ml Aqua dest + 200 ml Methanol. | |

TBS (*tris buffered saline*) (10X)

| | |
|-----------|--------|
| Tris base | 200 mM |
| NaCl | 1,4 M |
| pH 7,6 | |

Waschlösung WB: TBS (*tris buffered saline*) (10X)

| | |
|-----------|--------|
| Tris base | 200 mM |
| NaCl | 1,4 M |
| pH 7,6 | |

Waschlösung WB: TBS/T (Tween-20) (10X)

Tween-20 in Waschlösung WB: TBS 1% (w/v)

Waschlösung WB: PBS (*phosphate buffered saline*) (10X)

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 1,5 M |
| Na ₂ HPO ₄ | 200 mM |
| NaH ₂ PO ₄ | 40 mM |

Waschlösung WB: PBS/T (Tween-20) (10X)

Tween-20 in Waschlösung WB: PBS 1%(v/v)

Blockmedium WB: MLK (Milchpulver)

Milchpulver in TBS/T 5% (w/v)

Blockmedium WB: BSA (Bovin Serum Albumin)

BSA in TBS/T 5% (w/v)

Isolation Monozyten**MACS Puffer:**

| | |
|---------|------------|
| BSA | 0,1% (w/v) |
| EDTA | 0,5 mM |
| In PBS. | |

RNA Isolation**Git-Puffer**

| | |
|--------------------------|------------|
| Guanidiniumisothiocyanat | 5 M |
| Na-Citrat (pH7) | 0,25 M |
| N-Laurylsarcosin | 0,5% (w/w) |

Durchflusszytometrie**FACS1**

| | |
|-------------|-------------|
| BSA | 1,0 % (w/v) |
| Natriumazid | 0,1 % (w/v) |
| In PBS. | |

FACS2

| | |
|-------------|-------------|
| BSA | 1,0 % (w/v) |
| Natriumazid | 0,1 % (w/v) |
| EDTA | 20 mM |
| In PBS. | |

PBS/FCS

| | |
|-----------------------------|-----------|
| FCS Gold (hitzeinaktiviert) | 5 % (v/v) |
| In PBS. | |

ACK-Lyse Puffer

| | |
|-----------------------------------|--------|
| NH ₄ Cl | 150 mM |
| KHCO ₃ | 1,0 mM |
| Na ₂ EDTA | 0,1 mM |
| pH 7,2-7,4 in ddH ₂ O. | |

Anästhesie**Narkose** (*pro Maus (30 g); i.p.*)

| | |
|---------------------------------|-------|
| Medetomidin (1 mg/ml) | 15 µl |
| Midazolamhydrochlorid (5 mg/ml) | 30 µl |
| Fentanyl (0,05 mg/ml) | 30 µl |
| Ad 200 µl NaCl. | |

Antisedan (*pro Maus (30 g), s.c.*)

| | |
|------------------------|--------|
| Antipamezol (5 mg/ml) | 15 µl |
| Flumazenil (0,1 mg/ml) | 150 µl |
| Naloxon (0,4 mg/ml) | 90 µl |

2.2 Methoden

2.2.1 Rechtliche Voraussetzungen

Die tierexperimentellen Versuche wurden durch das Landesuntersuchungsamt Mainz genehmigt und von dem Ethikkomitee der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zugelassen.

2.2.2 Tierzucht/ Behandlung

Die C57BL/6-Mäuse wurden von *Charles River* bezogen. Die $Tbx21^{-/-}$ Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund waren ein Geschenk von Frau Professor Laurie Glimcher, Harvard Medical School, Cambridge, USA. Knockoutstämme von MyD88, TLR2, TLR7 und TLR9 wurden von der Arbeitsgruppe Schild/Radsak aus der Immunologie der Unimedizin Mainz zur Verfügung gestellt. $LysM^{Cre}$ Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund waren ein Geschenk von Frau Professor Irmgard Förster und wurden vom Paul-Ehrlich-Institut (Langen, Deutschland) bezogen. Die Ly5.1 sowie iDTR Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund waren ein Geschenk von Professor Ari Waisman, Molekulare Medizin der Unimedizin Mainz. $Agtr1^{-/-}$ sowie $gp91^{phox^{-/-}}$ Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund wurden von *The Jackson Laboratory* erworben.

In allen Experimenten wurden männliche Mäuse im Alter von 6-12 Wochen verwenden. Die Administration von Angiotensin II erfolgte über die subkutane Implantation osmotischer Minipumpen. Die Mäusen wurde entweder sham behandelt (NaCl infundiert) oder mit Angiotensin II (ATII, 1mg/kg/d, 7d).

In ausgewählten Experimenten wurde den Mäusen außerdem zur Aufzeichnung des Blutdrucks vor ATII Behandlung ein Telemetriekatheter implantiert (Kap. 2.2.3.4).

Die Depletion von LysM positiven Zellen erfolgte durch Injektion von DTX wie in Kap. 2.2.2.1 beschrieben.

Die NK-Zelldepletion in C57BL/6 Mäusen wurde wie in Abschnitt 2.2.3.2 geschildert durchgeführt.

In selektiven Experimenten wurden Mäusen Monozyten oder NK-Zellen transferiert. Monozyten wurden dafür aus dem Blut von C57BL/6, $Tbx21^{-/-}$, $Agtr1^{-/-}$ Mäusen bzw. $gp91^{phox^{-/-}}$ Mäusen durch Negativ oder Positivselektion gewonnen (siehe Abschnitt 2.2.3.6) und den Mäusen i.v. $1,5 \times 10^6$ Zellen in die Schwanzvene appliziert. Isolation von NK-Zellen erfolgte aus $Rag1^{-/-}$ Mäusen wie unter 2.2.3.7 erläutert. Der Transfer erfolgte zeitgleich mit der Implantation der osmotischen Minipumpen.

Alle folgenden aufgeführten Mausstämme sind genetisch auf einen C57BL/6J Hintergrund.

Tabelle 2-1: Verwendete Mausstämme

| Mausstamm (offizielle Bezeichnung) | Beschreibung | Verwendete Abkürzung |
|---|--|---------------------------------|
| Agtr1a ^{-/-} (B6.129P2- Agtr1atm1Unc/J)[222] | Defizient in Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 a | Agtr1 ^{-/-} |
| C57BL/6J | Wildtyp (wt)- Kontrollmäuse | C57BL/6 |
| C57BL/6J Ly5.1 (B6.SJLPtprca Pepcb/BoyJ) | Wildtyp (wt)- Kontrollmäuse, CD45.1 ⁺ | Ly5.1 |
| C57BL/6 x LysM Cre [223] | C57BL/6 gekreuzt mit LysM Cre Mäusen, die die Cre Rekombinase unter dem Lysozym M (LysM) Promotor exprimieren; Nutzung als Kontrolle gegenüber LysM ^{iDTR} | LysM |
| C57BL/6 x LysM Cre iDTR [223] | C57BL/6 gekreuzt mit LysM Cre iDTR Mäusen, die den Diphtheratoxin-Rezeptor durch Ausschneiden der transkriptionalen STOP Kasette durch die Cre Rekombinase in LysM ⁺ Zellen exprimieren | LysM ^{iDTR} |
| gp91phox ^{-/-y} (B6.129S6- Cybbtm1Din/J) [224] | Mäuse defizient in gp91phox (Nox2) | gp91 ^{phox -/y} |
| IFN-γ ^{-/-} (B6.129S7-lfngtm1Ts) [225] | Mäuse defizient für Interferon-gamma (IFN-γ) | IFN-γ ^{-/-} |
| MyD88 ^{-/-} [136] | Mäuse defizient für <i>myeloid differentiation factor 88</i> | MyD88 ^{-/-} |
| Tbx21 ^{-/-} [226] | Mäuse defizient für den die IFN-gamma Expression regulierender Transkriptionsfaktor <i>T box-expressed in T cells</i> (T-bet) | Tbx21 ^{-/-} |
| TLR2 ^{-/-} (B6.129- Tlr2tm1Kir/J) [227] | Mäuse defizient für TLR2 | TLR2 ^{-/-} |
| TLR7 ^{-/-} [228] | Mäuse defizient für TLR7 | TLR7 ^{-/-} |
| TLR9 ^{-/-} [229] | Mäuse defizient für TLR9 | TLR9 ^{-/-} |

2.2.3 Tierexperimentelle Methoden

2.2.3.1 In vivo Depletion von LysM⁺ myelomonozytären Zellen

Zur zellspezifischen Ablation wurden LysM^{Cre/Cre} [230] und ROSA26^{iDTR/iDTR} [223] (auf C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt) verwendet und diese mit C57BL/6 Mäusen gekreuzt um LysM^{Cre/wt} und LysM^{Cre/wt} /ROSA26^{iDTR/wt} (abgekürzt LysM und LysM^{iDTR}) Mäuse als Versuchstiere zu erhalten. Die Mäuse erhielten intraperitoneale (i.p.) Injektionen mit Diphteriatoxin DTX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) einmal täglich (gelöst in PBS; 25 ng/g an Tag 1-3, 5 ng/g anschließend) [223, 231]. Die Gabe von ATII (1 mg/kg/d/ für 7 d) oder sham (NaCl 0.9%) erfolgte an Tag 4-10. Zelltransferexperimente wurden in einigen ausgewählten Experimenten an Tag 4 durchgeführt. Die Implantation von Telemetrikathetern erfolgte in ausgewählten Versuchen mindestens zwei Wochen vor Behandlungsbeginn der Mäuse.

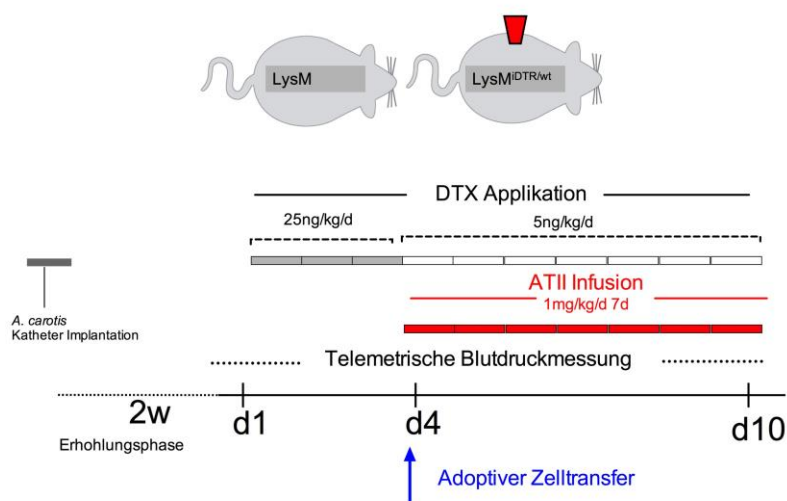


Abbildung 2-1: Behandlungsregime LysM und LysM^{iDTR} Mäuse.

Die Depletion der LysM⁺ Zellen wurde durch durchflusszytometrische Analyse von Blut überprüft (siehe 2.2.5.7.1 und 2.2.6). Mittels des Depletionsregimes wurden ausschließlich die Zahl der im Blut zirkulierenden Monozyten (CD45⁺Ly6G⁻CD11b⁺) und nicht der Neutrophilen (CD45⁺Ly6G⁺CD11b⁺) gesenkt. Die Depletionseffizienz lag bei mindestens 50%. Repräsentative *dot plots* sind in Abbildung 2-2 dargestellt. Vergleiche auch mit 1.7.3.1.

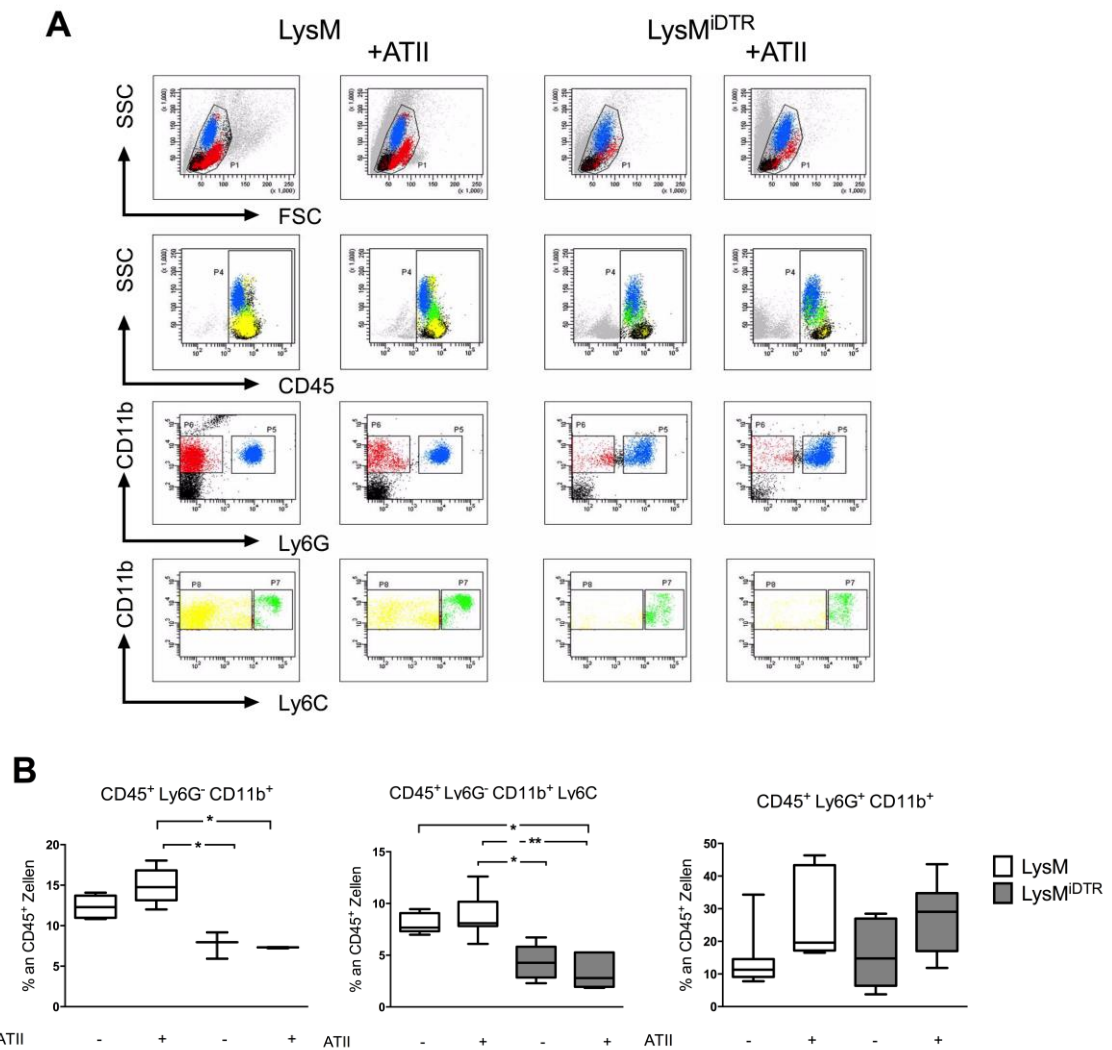


Abbildung 2-2: Depletionseffizienz LysM⁺ myelomonozytärer Zellen mittels Diptheriatoxin Applikation in LysM^{DTR} Mäuse. Durchflusszytometrische Analyse von Blut nach 10-tägiger Diptheriatoxin (DTX) Behandlung. Vergleich zwischen sham und ATII behandelten LysM Kontrollmäusen gegenüber Diptheriatoxin-Rezeptor exprimierenden LysM^{DTR} Mäusen. Färbung und *gating* auf CD45⁺ Leukozyten, CD45⁺Ly6G⁻CD11b⁺ Neutrophile, CD45⁺Ly6G⁺CD11b⁺ Monozyten, die Ly6C^{high} (inflammatorische Monozyten) oder Ly6C^{low} sein können (reparative Monozyten). A, Representative *dot plots* und B, graphische Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse (siehe 2.2.6); n=4-8; One-way ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison Test; ***, p<0,001, **, p<0,01, *, p<0,05.

2.2.3.2 *In vivo* Depletion von NK-Zellen

Zur Depletion von NK-Zellen wurden C57BL/6 Mäuse mit dem monoklonalen anti-NK1.1 Antikörper PK136 (Hybridom HB-191, ATCC, Manassas, VA, USA) behandelt. Drei Tage vor Beginn der Angiotensin II Infusion wurde die Depletion der NK1.1⁺ Zellen gestartet. Die Injektion mit 30 µg PK136/Maus erfolgte an Tag -3 bis 0 (Start ATII Infusion) intraperitoneal und subkutan sowie intraperitoneal (15 µg/Maus) an Tag 3 und 6. Die Angiotensin II Infusion wurde bei einigen Mäusen an Tag 0 gestartet.

Die NK-Zelldepletion wurde in Blut, Milz und Knochenmark über Durchflusszytometrie analysiert. Als Kontrolle wurde eine Isotypen IgG Kontrolle verwendet. Abbildung 2-4 zeigt repräsentative Ergebnisse für die Depletionseffizienz von CD45⁺NK1.1⁺ Zellen im Blut (siehe 2.2.5.7.1).

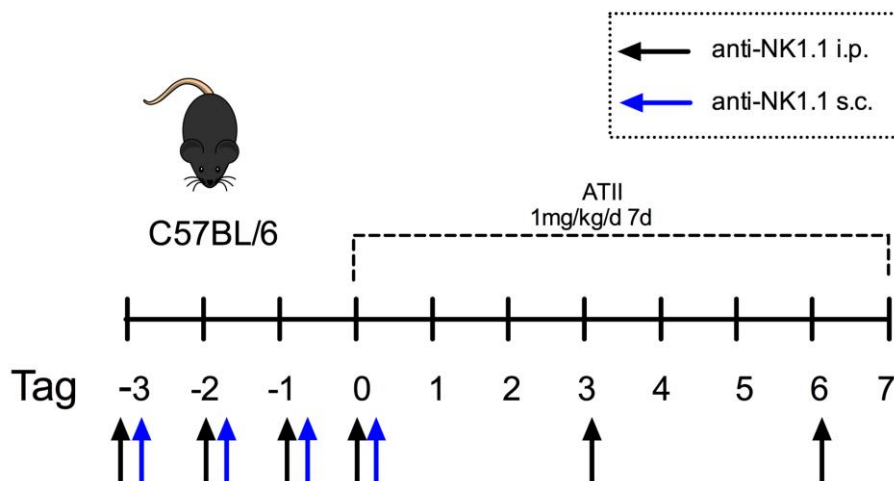


Abbildung 2-3: Behandlungsschema zur Depletion von NK-Zellen in C57BL/6 Mäusen.

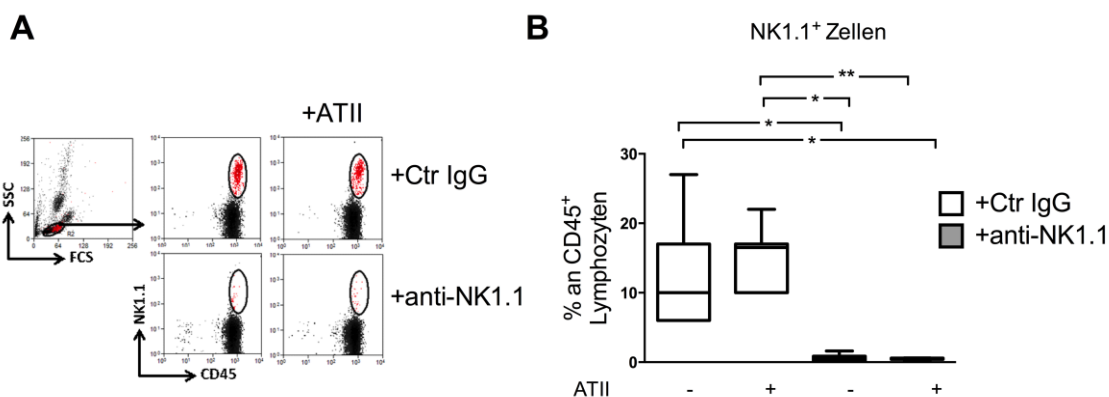


Abbildung 2-4: Repräsentative Effizienz der Depletion NK1.1 positiver Zellen im Blut. Durchflusszytometrische Analyse des Blutes nach 10-tägiger anti-NK1.1 bzw. Kontroll IgG (CTR IgG) Injektion von C57BL/6±ATII Mäusen. A, Repräsentative *dot plots*, Analyse auf NK1.1⁺CD45⁺ Zellen und B, graphische Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse (siehe 2.2.6) bezogen auf CD45⁺ Lymphozyten; n=5-7; One-way ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05.

2.2.3.3 Applikation von Angiotensin II mittels subkutaner Implantation osmotischer Minipumpen

Verwendete Lösungen/ Puffer (siehe 2.1.7): Narkose und Antisedan

Durch die Verwendung einer osmotischen Minipumpe kann gewährleistet werden, dass Tieren über einen gewissen Zeitraum kontinuierlich eine Substanz appliziert wird, in diesem Fall Angiotensin II, und dieses ohne die Tiere durch wiederholte Injektionen unter Stress zu setzen.

Das Funktionsprinzip der Pumpe beruht auf einem osmotischen Druckunterschied zwischen dem Kompartiment in der Pumpe, der sog. Salztasche, und der Gewebeumgebung, in die die Pumpe implantiert wird. Die Osmolarität innerhalb der Pumpe bewirkt das Einfließen von Wasser durch eine semipermeable Membran, welche die äußere Hülle der Pumpe formt. Die Wasserpermeabilität dieser Membran bestimmt die Flussrate und ist somit unabhängig von der Substanz, die appliziert werden soll. Wenn Wasser in die Salztasche eindringt, komprimiert es das flexible Reservoir und drückt die Testlösung aus der Pumpe durch den sogenannten Flussmodulator mit einer kontrollierten, vorbestimmten Flussrate [232, 233].

Die Verabreichung von Angiotensin II erfolgte durch subkutane Implantation einer osmotischen Minipumpe. Zur Befüllung der Pumpen mit Angiotensin II (1 mg/kg/d, 7 d, Modell Pumpe 1007D, Alzet, Cupertino, CA, USA) wurde dieses in sterilem NaCl 0,9% gelöst und mit Hilfe des Applikators in den Innenraum der Pumpe gefüllt. Bis zur Implantation der Pumpen wurden diese in NaCl 0,9% gelagert.

Nach Narkose (siehe 2.1.7) wurden die Mäuse am unteren Rücken rasiert, die Haut mit Braunol[®] desinfiziert und mit einer Schere das Fell ca. 0,5 cm oberhalb des Schwanzes eröffnet. Mit einer feinen Graefe-Pinzette wurde das Bindegewebe durchstoßen und eine Tasche für das Einführen der Minipumpe geformt. Mit dem Flussmodulator zuerst, um Interferenzen mit der Heilung des Einschnittes zu vermeiden, wurde die Pumpe in die Tasche eingeschoben. Anschließend wurden die Wundränder möglichst nahe aneinander gelegt und mit 2-3 Wundklammern verschlossen. Zur postoperativen Desinfektion und Wundversorgung wurde erneut Braunol[®] verwendet. Die Operation erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Nach erfolgreicher Implantation der Pumpen wurde mit Antisedan die Narkose antagonisiert.

2.2.3.4 Implantation von Telemetriekathetern

Verwendete Lösungen/ Puffer (siehe 2.1.7): Narkose und Antisedan

Die telemetrische Erfassung von bestimmten Versuchstierparametern hat den Vorteil,

dass die zu messenden Werte ohne Fixierung der Tiere oder sonstige Beeinflussung ermittelt werden und sie darüber hinaus sehr genau ist [234]. Indirekte Verfahren wie die Schwanzplethysmographie sind zwar ohne vorherige Operation durchführbar, aber weitaus ungenauer und erfordern eine Fixierung des Versuchstiers. Darüber hinaus misst die Schwanzplethysmographie lediglich den systolischen Blutdruck [234].

Zwecks Durchführung telemetrischer Blutdruckmessungen wurden Telemetriekatheter in die *A. carotis* von C57BL/6, MyD88^{-/-} sowie LysM^{iDTR} Mäusen implantiert (TA-PA11C10, Data Science International (DSI), Tilburg, Niederlande). Der chirurgische Eingriff wurde unter sterilen Bedingungen in Anästhesie und Analgesie (siehe Lsg. Narkose, i.p. Applikation) durchgeführt. Nach mindestens zweiwöchiger Erholung wurde durch magnetischer Aktivierung des Transmitters die Herzfrequenz, der mittlere arterielle Blutdruck (MAD), der systolische und der diastolische Blutdruck kontinuierlich alle fünfzehn Minuten eine Minute lang gemessen und radiotelemetrisch auf einen Receiver übertragen, der diese Informationen nach Umschreibung in eine kompatible Form an einen Computer weiterleitete, wo diese mit Hilfe der entsprechenden Software (Dataquest A.R.T. Data Aquisition, Data Science International (DSI), Tilburg, Niederlande) gespeichert und mit dem Computerprogramm Dataquest A.R.T. Data Analysis ausgewertet wurde. Die Messung erfolgte in den meisten Experimenten über einen Zeitraum von zwei Wochen, zu Beginn der zweiten Woche wurde die Angiotensin II Infusion gestartet.

2.2.3.5 Herstellung von Knochenmark-chimären Mäusen

Aufgrund der konstitutiv hohen Teilungsrate der meisten Knochenmarkzellen reagiert das hämatopoetische System besonders sensitiv auf Schädigungen der DNA und des Replikationsapparates. So kann durch radioaktive Bestrahlung nahezu das gesamte hämatopoetische System zerstört werden. Die Zerstörung des autologen Immunsystems ermöglicht die Rekonstituierung mit syngenen oder allogenen Knochenmark, wodurch ein letal bestrahltes Individuum überleben kann. Bei diesen Individuen handelt es sich nun um Knochenmark-chimäre Mäuse, da das bestrahlungssensitive Knochenmark des Spenders einen anderen Genotyp aufweist als die bestrahlungsresistenten Zellen des Empfängers. Auf diese Weise lassen sich am Tiermodell Wechselwirkungen zwischen Zellen unterschiedlicher Genotypen *in situ* untersuchen.

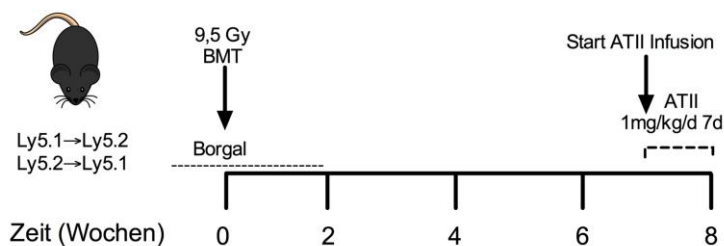


Abbildung 2-5: Behandlungsschema zur Herstellung von Knochenmark-chimären Mäusen.

2.2.3.5.1 Isolation von Knochenmark

Verwendete Lösungen/ Puffer (siehe 2.1.7): ACK-Lyse Puffer, PBS/FCS

Um eine Knochenmark-Einzelzellsuspension zu gewinnen wurde naiven Mäusen Femur und Tibia entnommen, die Knochen von Gewebe befreit, in Ethanol desinfiziert und die Epiphysen entfernt. Mit PBS/FCS wurde unter Verwendung einer Spritze das Mark aus den Knochen gespült. Durch Resuspendieren wurde nun aus dem so gewonnenen Knochenmark eine Zellsuspension hergestellt, welche zur Entfernung von Knochen- und Bindegewebsfragmenten über ein Zellsieb (40 μm) gegeben wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (300g, 5 min, 4°C) der Überstand abgesaugt und die im Pellet enthaltenen Erythrozyten durch Zugabe von 1 ml ACK-Lyse Puffer pro Maus lysiert. Abgestoppt wurde die Reaktion mit 8-10 ml PBS/FCS. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Trypanblau Färbung in einer Neubauerzählkammer gezählt. Trypanblau, ein polyanionischer Azofarbstoff, reichert sich in nicht-viable Zellen mit einer defekten Zellmembran an. Lebende Zellen schließen den sauren Azofarbstoff aus und erscheinen weiß vor einem blauen Hintergrund, während tote Zellen dunkelblau anfärbt werden. Nach erneuten Pelletieren der Zellen wurden diese mit 1xPBS auf eine Konzentration von 25×10^6 Zellen/ml eingestellt. Anschließend erfolgte die intravenöse (i.v.) Injektion von 5×10^6 Zellen in die Schwanzvenen der letal bestrahlten Mäuse.

2.2.3.5.2 Letale Bestrahlung von Mäusen mit einer Cäsium-Quelle

Für eine Rekonstitution von Mäusen mit einem veränderten Immunsystem muss das bestehende hämatopoetische System der Mäuse zunächst soweit geschädigt werden, dass eine Proliferation dieser Zellen nicht mehr möglich ist. Deshalb wurden durch radioaktive Bestrahlung der Mäuse DNA-Brüche in den hämatopoetischen Zellen induziert (letale Bestrahlung). Hierfür wurde eine Gamma-Bestrahlung mit Hilfe der

Cäsium-Bestrahlungsanlage des Instituts für Virologie der Universitätsmedizin Mainz verwendet. 6-8 Wochen alte Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund wurden mit einer Dosis von 9,5 Gy bestrahlt.

Die bestrahlten Mäuse wurden innerhalb von 24 h durch eine intravenöse Injektion von 5×10^6 Knochenmarkzellen des gewünschten Spender-Genotyps, aufgenommen in 200 μ l PBS, rekonstituiert. Eine Woche vor und zwei Wochen nach der Rekonstitution erhielten die Mäuse Borgal über das Trinkwasser. Das Anwachsen des transferierten Knochenmarks wurden mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Blutanalyse nach sechs Wochen kontrolliert.

Nach mind. 6 Wochen bis 8 Wochen Erholungszeit der Chimären erfolgte die osmotische Pumpenimplantation und die anschließende Präparation der Mäuse.

2.2.3.6 Isolation von Monozyten aus Mausblut zur Rekonstitution von LysM^{iDTR} Mäusen

Verwendete Lösungen/ Puffer (siehe 2.1.7): MACS Puffer

LysM⁺ myelomonozytäre Zell-depletierte LysM^{iDTR} Mäuse wurden mit Monozyten, isoliert aus verschiedenen Mausstämmen (gp91^{phox⁻/y}, Agtr1^{-/-}, Tbx21^{-/-}), rekonstituiert.

Die Isolation der Monozyten erfolgte in zwei Stufen. Zunächst wurden mononukleäre Zellen aus Mausblut über eine Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und diese dann zur MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*) Aufreinigung eingesetzt

Die Dichtegradientenzentrifugation wurde mittels Histopaque 1083, eine Lösung die aus Polysukrose und Natrium-Diatrizoat besteht, durchgeführt. Während der Dichtegradientenzentrifugation mit Histopaque 1083 aggregieren Erythrozyten mit der Sukrose und sedimentieren. Mononukleäre Zellen und Lymphozyten sammeln sich in der Interphase zwischen Plasma (enthält Plättchen) und dem Histopaque, während Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte zum Boden des Zentrifugationsgefäßes wandern [235-237].

Die Isolation der Monozyten erfolgte aus Mausblut. Dafür wurde mit Citrat antikoaguliertes venöses Blut den Mäusen entnommen, gepoolt und zur Reduktion des Hämatokrites im Verhältnis 1:6 mit 1xHBSS verdünnt. 6 ml des Blutgemisches wurden auf 3 ml Histopaque 1.083 geschichtet. Nach 30 min Zentrifugation bei Raumtemperatur und 300g ohne Bremse wurde der mononukleäre Zellring

abgenommen, die Zellen mit 1xHBSS gewaschen, mittels Trypanblau gezählt und schließlich in MACS Puffer aufgenommen.

Anschließend erfolgte die Isolation der Monozyten mittels *magnetic activated cell sorting* (MACS, Miltenyi Biotech., Bergisch Gladbach, Deutschland). Das Sorting System arbeitet mit submikroskopisch kleinen, super-paramagnetischen, antikörpergekoppelten Kügelchen, die keinen Einfluss auf die Funktionalität der Zellen haben [238]. Das Zelleluat wird über eine Säule geleitet, die in einem Magneten eingespannt ist. Zellen, die mit dem Antikörper markiert wurden, werden von dem Magneten in der Säule zurückgehalten, die anderen Zellen fließen durch die Säule durch. Sind die verwendeten Antikörper-gekoppelten Beads gegen die zu isolierende Zellspezies gerichtet, so spricht man von einer Positivselektion, wenn durch die Beads andere Zellspezies depletiert werden, bezeichnet man das Verfahren als Negativselektion.

Nach Durchlaufen der Zellsuspension durch die Säule und mehrmaligem Waschen wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die markierten Zellen mit einem Stempel und 1 ml Pufferlösung aus der Säule gedrückt.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Isolation der gp91^{phox^{-/-}} und Agtr1^{-/-} Monozyten durch Negativselektion (Monozyten im Durchfluss der Säule) mit folgenden Beads: Ter119 (Erythrozyten), CD90.1 (T-Zellen), NK/DX5 (NK-Zellen) und CD45R (B-Zellen). Bei der Isolation der Tbx21^{-/-} Monozyten wurden CD11b-Beads verwendet (Positivselektion, Monozyten im Säulen-Eluat).

Die Isolation der Monozyten erfolgte nach Herstellerprotokoll. Nach Isolation wurden die Monozyten gezählt und für den Rücktransfer $1,5 \times 10^6$ Zellen in 150 μ l PBS aufgenommen. Die Injektion erfolgte intravenös in die Schwanzvene der LysM^{iDTR} Mäuse an Tag 4 des Behandlungsprotokolls (2.2.3.6) gleichzeitig mit der ATII Pumpen Implantation.

Die Reinheit (mind. 80%) der Monozyten wurde mittels Durchflusszytometrie (Färbung: anti-Ly6G-FITC und anti-CD11b-PE und ggf anti-F4/80-APC) überprüft (Protokoll Durchflusszytometrie siehe 2.2.5.7.1).

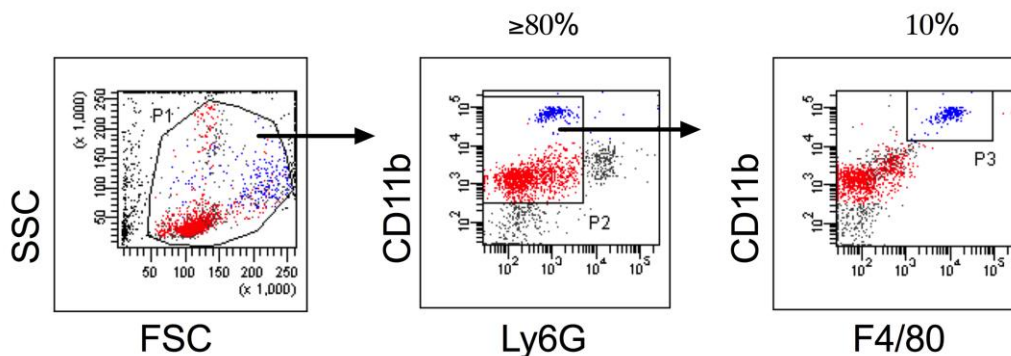


Abbildung 2-6: Beispiel für eine durchflusszytometrische Reinheitskontrolle von aus Mausblut isolierten Monozyten. Über Histopaque 1083 und MACS-Isolation aufgereinigte Monozyten wurden mit Antikörpern gegen CD11b, Ly6G und F4/80 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Die Reinheit der CD11b⁺Ly6G⁻ Monozyten lag bei mindestens 80%. Die Abb. zeigt repräsentative *dot plots*.

2.2.3.7 Isolation von NK1.1 positiven Zellen aus Mausmilzen zur Rekonstitution von Tbx21^{-/-} Mäusen

Verwendete Lösungen/ Puffer (siehe 2.1.7): ACK-Lyse Puffer

NK1.1 positive Zellen wurden aus den Milzen von Rag1^{-/-} Mäusen, defizient für B- und T-Zellen, isoliert. Aus 20 gepoolten Milzen wurde eine Einzellsuspension hergestellt durch Durchpressen der Milzen durch ein 40 µM Sieb. Die Erythrozyten wurden mittels ACK-Lyse Puffer lysiert. Nach Zellzählung mittels Trypanblau und einer Neubauerzählkammer wurde eine Positivselektion der Zellen mit DX5 Mikrobeads (Miltenyi Biotech., Bergisch Gladbach, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden erneut gezählt und die Zellen in Ex-Vivo Medium aufgenommen und die Tbx21^{-/-} Mäuse mit 10x10⁶ T-bet⁺NK1.1⁺ Zellen durch intravenöse Gabe in die Schwanzvene rekonstituiert. Die durchflusszytometrische Analyse der isolierten Zellen mit Färbung auf CD45 und NK1.1 zeigte eine Reinheit von 75%. Um zu kontrollieren, ob die Zellen 7 Tage nach Injektion in der Maus noch wiedergefunden werden konnten, wurden 5x10⁶ isolierte NK1.1⁺ Zellen mit 1 µM Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester (CFSE) gefärbt und einer Tbx21^{-/-} Maus intravenös injiziert. Nach sieben Tagen wurde eine durchflusszytometrische Analyse des Blutes der Maus durchgeführt und die Zellen mit anti-NK1.1 gefärbt und auf CFSE fluoreszierende NK1.1 positive Zellen untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass die injizierten Zellen auch nach 7 Tagen noch in der Maus nachgewiesen werden konnten (Abbildung 2.7, B).

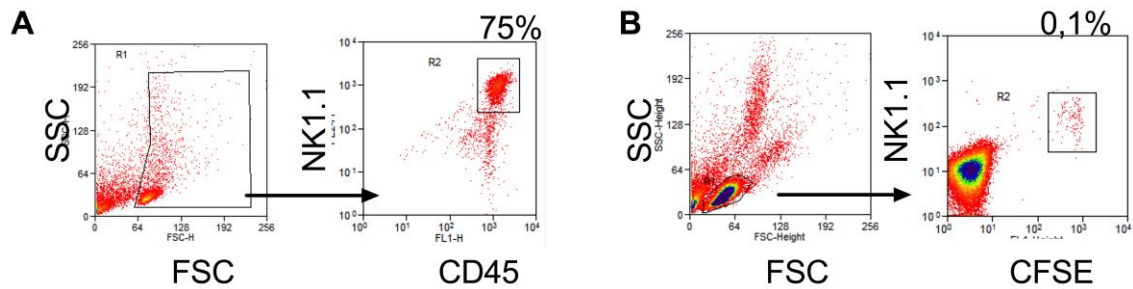


Abbildung 2-7: Durchflusszytometrische Analyse der NK-Zellreinheit und Erfolg des adoptiven Zelltransfers in *Tbx21*^{-/-} Mäuse. NK1.1 positive Zellen wurden mittels Positivselektion aus Milzen von *Rag1*^{-/-} Mäusen isoliert. A, Durchflusszytometrische Analyse der Reinheit mittels Färbung auf CD45 und NK1.1. B, Nachweis transferierter NK1.1⁺-Zellen 7 Tage nach adoptivem Zelltransfer durch Färbung mit CFSE vor Injektion der Zellen in die Maus.

2.2.4 Tötung der Maus und Organentnahme

Verwendete Puffer / Lösungen (siehe 2.1.7): KH-Puffer

Abbildung 2-8 visualisiert die einzelnen Schritte der Organentnahme. Mittels einer Inhalationsnarkose mit Isofluran wurde die Maus in eine tiefe Narkose versetzt und diese bis zum Tod durch Ausbluten aufrechterhalten. Das Fell im Brust- und Bauchbereich wurde mit Hilfe einer scharfen Schere entfernt und das Abdomen eröffnet (A,B). Das Sternum wurde angehoben und vorsichtig das Zwerchfell am gesamten Rippenbogen durchtrennt (C). Zur Verhinderung der stasebedingten Blutgerinnung wurde in den rechten Ventrikel des schlagenden Herzens 200 μ l verdünntes Heparin (1:6) injiziert und einige Herzschläge später das Blut durch die gleiche Punktionsstelle entnommen (0,5-1 ml Blut) (D). Für die Messung der L-012 induzierten Chemilumineszenz im Vollblut oder die Isolation von Monozyten wurde das Blut 1:10 mit 0,1 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Citrat) versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert. Nach der Blutentnahme wurde der gesamte Brustkorb durch dorsales Durchschneiden der Rippen eröffnet (E). Zur Entnahme der Aorta wurden die abdominellen Organe wie Leber und Darm auf eine Seite umgelagert (F), das dorsale Zwerchfell so eingeschnitten, dass der linke Lungenflügel angehoben und das Herz in einem Schnitt von den abgehenden Gefäßen getrennt werden konnte (G). Die Freilegung der Aorta im Gefäßbett erfolgte unter minimaler Zugspannung, um iatrogene Schäden am Gefäß zu vermeiden. Zunächst wurden die supraaortalen Gefäße (*Truncus brachiocephalicus*, *A. carotis communis sinistra*, *A. subclavia*) und nach Entfernung der inneren Organe auch die *A. renales* abgetrennt. Mit Hilfe eines Schnittes kaudal der *Bifurcatio aortae* wurde die Entnahme der Aorta begonnen (H, I, K).

Die Feinpräparation der Aorta auf Eis diente der Entfernung des perivaskulären Bindegewebes und erfolgte mithilfe eines binokularen Lichtmikroskops. Dabei wurde äußerst sorgfältig gearbeitet um das Endothel nicht zu beschädigen. Die im Gefäßlumen verbliebenen Blutbestandteile wurden durch Perfusion der Aorta mit KH-Pufferlösung aus einer Feinnadelkanüle ausgespült. Aus dem thorakalen Teil wurden für isometrische Spannungsstudien und DHE-Färbungen ggf. 3-4 mm lange Aortensegmente geschnitten und in entsprechenden Lösungen bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Aortenringe, aus denen Proteine in weiteren Experimenten extrahiert werden sollten, wurden in KH mit Inhibitoren (KH-I) 10 min bei 37°C inkubiert, während Aortenringe, deren RNA gewonnen werden sollte, direkt nach der Feinpräparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden.

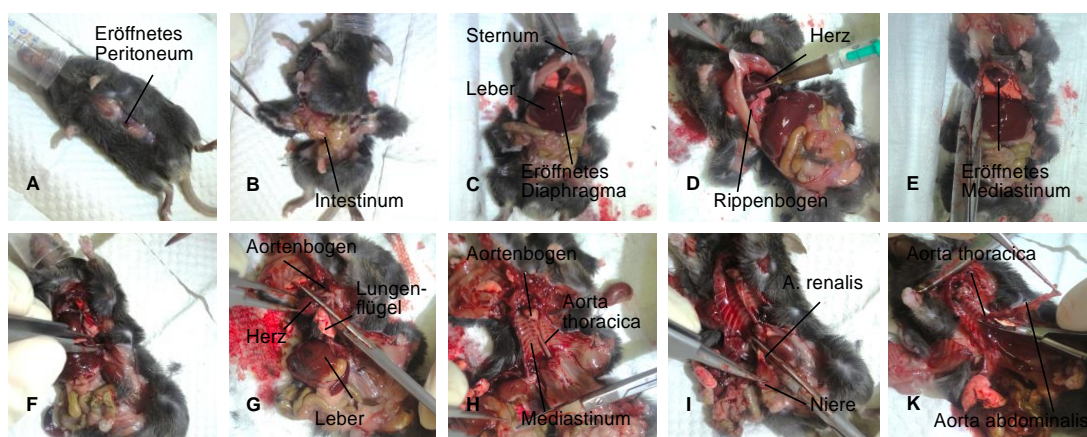


Abbildung 2-8: Übersicht der Organentnahme der Maus. „Fellschnitt und Eröffnung des Peritoneums (A,B), Anheben des Brustbeins (C), Heparininjektion in das noch schlagende Herz (D), dorsaler Rippenschnitt (E), Umlagerung der inneren Organe (F), Abtrennung des Herzens (G), Sicht auf die Aorta im Aortenbett (H), Abtrennung der Aortenabgänge und des Binde- und Fettgewebes (I) und Entnahme der Aorta (K)“ (Abbildung und Abbildungstext aus [221]).

2.2.5 Molekularbiologische und Immunologische Methoden

2.2.5.1 Genotypisierung der LysM/ LysM^{iDTR} Parenteralgeneration

Genotypisierungen sind molekulargenetische Untersuchungen, welche Aufschluss über den Genotyp eines Labortieres geben und nutzen die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR).

Die PCR ist ein Verfahren um Nukleinsäureabschnitte zu amplifizieren. Es wird ein kurzes Stück doppelsträngige DNA mit einem freien 3'OH-Ende benötigt, das durch

eine DNA-Polymerase entsprechend verlängert werden kann. Durch die Zugabe von zwei Oligonukleotiden, den Primern, die zu den Enden des entsprechenden DNA-Abschnitts komplementär sind, kann der Nukleinsäureabschnitt amplifiziert werden. Das Prinzip der PCR beruht darauf, dass ein zyklischer Prozess abläuft, bei dem die Temperatur variiert wird. Der Prozess besteht aus einem Denaturierungsschritt (Trennung der doppelsträngigen *Template*-DNA in Einzelstränge), der Primer-Hybridisierung (*Annealing*) und dem Elongationsschritt.

Das PCR-Protokoll zur Amplifizierung von DNA variiert je nach verwendeter DNA (*Taq*)-Polymerase und Ansatzgröße. Auch das Programm wird je nach Länge des Amplifikats und der verwendeten Primer verändert. Die optimale *Annealing*-Temperatur T_m kann näherungsweise durch die sog. „2+4-Regel“ aus dem GC-Gehalt der verwendeten Oligonukleotide berechnet werden.

$$T_m = 2^{\circ}\text{C} \cdot [\text{Anzahl}(A + T)] + 4^{\circ}\text{C} \cdot [\text{Anzahl}(G + C)] - 5^{\circ}\text{C}$$

Über einen Zeitraum von 16 h wurden die Schwanzspitzen der zu genotypisierenden Mäuse in 100 μl DirectPCR Lysis Reagent (Viagen, Cedar Park, TX, USA) und 1,5 μl Proteinase K (Qiagen, Hilden, Deutschland) bei 55°C unter 400 rpm verdaut. Im Anschluss wurden die Enzyme durch 45 min Inkubation bei 85°C inhibiert. Das Lysat wurde für die anschließende PCR benutzt.

Die Präsenz der verschiedenen Allele wurde durch die „Cre generale“ PCR (Gen Cre Rekombinase) und die „iDTR“ PCR (Diphtheriatoxin-Rezeptor Gen) überprüft:

Reaktionsansatz: PCR „Cre General“

Ansatz: 25 μl

| | |
|----------------------|--------------------|
| RedTaq PCR Ready Mix | 13,3 μl |
| Primer Cre for | 0,52 μl |
| Primer Cre rev | 0,52 μl |
| Aqua bidest | 9,16 μl |
| Probe | 1,5 μl |

PCR-Programm:

| Schritt | Temperatur [°C] | Zeit [min] | |
|---------|-----------------|------------|---------------------------------|
| 1 | 94 | 2 | |
| 2 | 94 | 0,5 | |
| 3 | 61 | 0,5 | |
| 4 | 72 | 1 | Schritt 2-4 34. Mal wiederholen |
| 5 | 72 | 5 | |
| 6 | 8 | ∞ | |

Zu erwartende Amplifikatlänge:

Wildtyp (wt) LysM (350 bp Amplifikat)

LysM-Cre (700 bp Amplifikat)

Reaktionsansatz: PCR „iDTR“**Ansatz: 25 µl**

| | |
|--------------------------------------|---------|
| 5x Expand Long Range Buffer | 5 µl |
| PCR Nucleotide Mix | 1,25 µl |
| RosaFA (10 pmol/µl) | 2 µl |
| RosaRA (10 pmol/µl) | 2 µl |
| SpliAcB (10 pmol/l) | 2 µl |
| DMSO | 1,5 µl |
| Expand Long Range Enzyme mix (5U/µl) | 0,35 µl |
| H ₂ O | 8,9 µl |
| Probe | 2 µl |

PCR-Programm:

| Schritt | Temperatur [°C] | Zeit [min] | |
|---------|-----------------|------------|---------------------------------|
| 1 | 94 | 5 | |
| 2 | 94 | 0,5 | |
| 3 | 60 | 1 | |
| 4 | 72 | 1 | Schritt 2-4 34. Mal wiederholen |
| 5 | 72 | 3 | |
| 6 | 8 | ∞ | |

Zu erwartende Amplifikatlänge:

Wildtyp (wt) ROSA26S (600 bp Amplifikat)

ROSA26S/DTR (242 bp Amplifikat)

Die Auftrennung der DNA-Amplifikate ihrer Größe nach erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Bei dieser Methode wandern die Moleküle durch eine Agarosegelmatrix in einem elektrischen Feld in Richtung des Pluspols durch die Gelmaschen. Die kleineren Moleküle werden weniger zurückgehalten und bewegen sich daher schneller durch das Gel, wodurch eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe ermöglicht wird.

Zur molekularen Auftrennung wurde ein 2%iges Agarosegel gegossen und die PCR Produkte bei 150 V ca. 2 h aufgetrennt. Durch Zugabe von GelRed Nucleic Acid Stain (BioTrend, Köln, Deutschland) in das Gel, einem Farbstoff, welcher mit Nukleinsäuren interkaliert, konnten die DNA Banden unter UV-Licht detektiert werden. Zur Ermittlung der Amplifikatlängen wurde neben den Proben ein Größenstandard (Marker) mit aufgetragen. Der Nachweis der Banden erfolgte mit Hilfe des Gel DocTM EZ Imagers (Bio-Rad, München, Deutschland).

2.2.5.2 Analyse der Gefäßfunktion in isometrischen Tonusstudien

Verwendete Lösungen/Puffer: Organbadpuffer (siehe 2.1.7)

Eine Möglichkeit, die Gefäßfunktion *ex vivo* in isolierten Aortensegmenten zu testen, ist die Durchführung von isometrischen Spannungsstudien im Organbad.

Infolge endogener oder exogener Veränderungen verliert das dysfunktionale Endothel die Fähigkeit, den Gefäßtonus adäquat zu regulieren. Dies äußert sich unter anderem in einer Abschwächung der endothelabhängigen Relaxation [239], was durch den Acetylcholin-Test gemessen werden kann.

In einem intakten Gefäß führt die Inkubation mit Acetylcholin zur Stimulation endothelialer muskarinerger M₃-Rezeptoren und durch einen Phospholipase C vermittelten Signalweg wird die endotheliale NO-Synthase aktiviert. Die glatten Muskelzellen der *Tunica muscularis* hingegen reagieren mit Vasokonstriktion [239, 240]. Damit ist die Reaktion der Aorta auf den Acetylcholin-Stimulus maßgeblich von der funktionellen Integrität des Endothels abhängig. Bei intakter Endothelfunktion kommt es infolge der NO-Bildung zu einer Vasodilatation. Bei endothelialer Dysfunktion sind es die glattmuskulären Effekte, die überwiegen, und es stellt sich eine sogenannte paradoxe Vasokonstriktion ein [241-243].

Messungen der vaskulären Reaktivität im Organbad

Unter physiologischen Bedingungen wurden Kontraktionen sowie Relaxationen der Gefäßringe auf pharmakologische Stimuli untersucht.

Abbildung 2-9 zeigt den prinzipiellen Aufbau einer Organbadanlage.

Die ein Volumen von 25 ml umfassenden Organbäder wurden mit Organbadpuffer befüllt. Um die Bildung von vasoaktiven Prostaglandinen zu unterdrücken, wurden die Experimente stets in Anwesenheit von Indomethacin ($10 \mu\text{M}$), einem nichtselektiven Hemmstoff der Cyclooxygenasen-1 und -2, durchgeführt. Die 3-4 mm langen Gefäßsegmente aus der *Aorta thoracalis* wurden auf zwei triangelförmige Drähte vorsichtig aufgefädelt, an einer Seite fixiert und an der anderen Seite mit einem isometrischen Kraftaufnehmer verbunden. Die Aortenringe wurden vollständig von der Pufferlösung und einem Carbogen-Gasgemisch (95% O_2 , 5% CO_2) umspült, um möglich physiologische Bedingungen zu gewährleisten. Eine konstante Temperierung der Organbäder auf 37°C wurde durch einen Wasserkreislauf inkl. Heizdraht und Pumpe erzielt, der die doppelwandigen Organbad-Behälter kontinuierlich umspülte. Die über den Kraftaufnehmer registrierten Kraftänderungen wurden über einen Verstärker zum aufzeichnenden Computer weitergeleitet und digitalisiert. Hier wurde mit dem Programm MS-Chart 5 (ADInstruments, Spechbach, Deutschland) eine Kurve erstellt, wodurch Kontraktion bzw. Relaxation des Gefäßes visualisiert werden konnte.

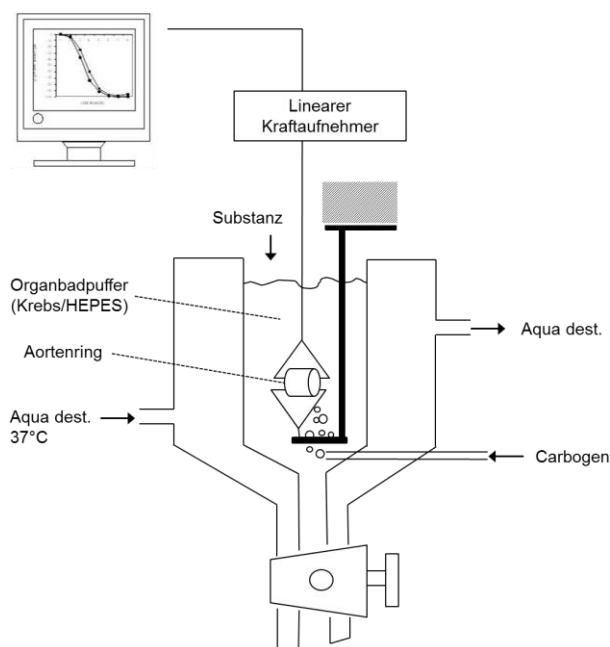


Abbildung 2-9: Schematische Darstellung einer Organbadanlage (verändert nach [244]).

Die Kalibrierung des Messsystems erfolgte nach dem Spannungsabgleich (NullwertEinstellung) der vier Messzellen durch eine Belastung der Kraftaufnehmer mit geeichten Gewichten.

Die initiale Spannung der Aortenringe wurde auf 0,2 g eingestellt und in 0,2 g Schritten in der folgenden Stunde auf eine optimale Spannung von 1,1 g erhöht (Äquilibrierungsphase). Die Funktionsfähigkeit des Gefäßsegmentes wurde durch die Gabe von 80 mM KCl überprüft, bis die maximale Kontraktion konstant isometrisch aufgezeichnet werden konnte. Die Kaliumionen fördern den Transport von Kalziumionen in den Intrazellularraum der glatten Muskelzelle, wo sie im sarkoplasmatischen Retikulum gespeichert werden und für die Muskelkontraktion zur Verfügung stehen. Anschließend wurde entweder eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit ansteigenden KCl-Konzentrationen (5, 10, 20, 40, 80 mM) erstellt oder es wurde eine zweite KCl-Bolusgabe (80 mM) durchgeführt.

Nach zweimaligem Waschen der Aortensegmente wurden diese entweder mittels Prostaglandintitration (PGF2 α) oder durch Phenylephrin vorkontrahiert.

Der Ruhetonus vor Phenylephrin bzw. PGF2 α -Gabe entsprach der vollständigen Relaxation (100%) und der Tonus nach Phenylephrin (bzw. PGF2 α) -Gabe 0% Relaxation. Die Vorkontraktion mit PGF2 α erfolgte als Bolusgabe (3 nM final), sodass eine Vorkontraktion auf einen Tonus von 50 bis 80% des KCl-Maximaltonus erreicht wurde. Phenylephrin wurde den Organbädern in sechs Schritten in kumulierender Konzentration zugesetzt. Die Phenylephrin-Endkonzentration im Organbad nach jeweiligen Zugaben betrug (10^{-8} – $10^{-5,5}$ M). Die Zugabe der Folgekonzentration fand statt, sobald die Konzentration auf die vorige Konzentration in ein Plateau überging.

Durch kumulative Applikation von Acetylcholin (10^{-9} – $10^{-5,5}$ M) und Glyceroltrinitrat (10^{-9} – $10^{-4,5}$ M) in halblogarithmischen Schritten wurde die endothelabhängige und die endothelunabhängige Vasorelaxation untersucht und als prozentualer Anteil der maximalen Prostaglandin/Phenylephrin-Konstriktion dargestellt [245, 246].

Die Vasorelaxation wird zum einen durch die *efficacy*, d.h. maximale Relaxation, die mit der höchsten verwendeten Vasodilatator-Konzentration erreicht wird, und zum anderen durch die *potency* beschrieben. Die *potency* entspricht dem $-\log(EC_{50})$. Der EC_{50} -Wert gibt die mittlere effektive Konzentration an, bei der der halbmaximale Effekt, d.h. die halbmaximale Dilatation, beobachtet werden kann. Die Desensibilisierung des Gefäßes wird durch die Rechtsverschiebung der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) dargestellt [247-249].

Die Tabellen zu den *efficiency* und *potency* Befunden der einzelnen Organbadversuche befinden sich jeweils im Anhang. Die Signifikanzwerte in den Abbildungen der Arbeit entsprechen der maximalen Relaxation.

2.2.5.3 Detektion von Superoxid-Radikalen in Aortensegmenten

Verwendete Lösungen/ Puffer (siehe 2.1.7): KH-I

Hydroethidine (HE), oder Dihydroethidium (DHE), ist ein weitverbreiteter DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der für die Detektion von intrazellulärem Superoxid genutzt wird [250]. Die rote Fluoreszenz entsteht durch die Zweielektronen Oxidation zu Ethidium (E^+) und wird normalerweise gleichgesetzt mit der intrazellulären Superoxid-Produktion. Neueste Studien geben allerdings Hinweise darauf, dass E^+ nicht durch die direkte Oxidation von HE durch $O_2^{\cdot-}$ gebildet wird [251, 252], sondern stattdessen ein anderes Produkt 2-Hydroxyethidium ($2-OH-E^+$) mit ähnlichen Fluoreszenzcharakteristiken durch die HE/ $O_2^{\cdot-}$ Reaktion gebildet wird [253, 254].

Zum Nachweis von Superoxid in Aortensegmenten wurden zunächst Kryoschnitte angefertigt. Nach Entnahme der Aorten und Freipräparation von Fett und Bindegewebe wurde ein 3-4 mm langer Ring aus dem thorakalen Teil der Aorta geschnitten und dieser für 10 min bei 37°C und 300 rpm in Inhibitorenpufer inkubiert. Die Ringe wurden anschließend mit offenen Lumen in Tissue Teck eingebettet und langsam in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit Hilfe eines Cryostats wurden 8 μ m lange Querschnitte angefertigt. Die Objektträger wurden bis zur weiteren Bearbeitung auf Trockeneis transportiert bzw. bei -80°C gelagert.

Zur Inkubation mit dem DHE-Farbstoff wurden die Objektträger direkt auf einen 37°C warmen Heizblock überführt, die Gewebeschnitte mit der DHE-Lösung (1 μ M DHE, 0,5% DMSO in PBS) benetzt und 30 min inkubiert. Anschließend wurde ein Großteil der Lösung von den Objektträgern entfernt, die Schnitte mit einem Deckglas abgedeckt und die Seiten eingefettet, um die Aortensegmente vor dem Austrocknen zu schützen. Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung und Aufnahme der grünen Autofluoreszenz der Laminae und roten Ethidiumfluoreszenz mittels der Kamera Axiovert 40 CFL (Zeiss, Jena, Deutschland). Alle Schnitte einer Versuchsreihe wurden dabei mit identischen Bildparametern parallel analysiert.

2.2.5.4 Detektion von ROS in Vollblut

Das Verfahren zur Messung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) im Vollblut beruht auf der Messung der Chemilumineszenz. Dabei handelt es sich um die Emission von Energie in Form elektromagnetischer Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichtes, die infolge einer chemischen Reaktion freigesetzt wird, wenn ein Elektron aus einem angeregten in einen energetisch tiefer liegenden Zustand zurückfällt.

Zur Messung des oxidativen Bursts wurde in der vorliegenden Arbeit L-012 (8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazine-1,4-(2H,3H)) verwendet. L-012 ist ein Analogon zu Luminol, das durch Reaktion mit ROS wie Superoxid, Peroxynitrit oder Wasserstoffperoxid Chemilumineszenz entwickelt [255]. Hohe Sensitivität besteht gegenüber Peroxynitrit und Superoxid; zudem erlaubt die bis zu 100fach stärkere Lumineszenz als Luminol eine Messung bei geringen Probenkonzentrationen [256-258].

Die Bestimmung der L-012 verstärkten Chemilumineszenz erfolgte entweder mit Hilfe des Twinkle LB970 Microplate Readers oder mittels des LB9507 Single Photon Counters (Berthold Technologies, Bad Wildbach, Deutschland).

Zur Bestimmung der Chemilumineszenz mit Hilfe des Twinkle LB970 Microplate Readers wurden 30 µl des im Verhältnis 1:10 mit Citrat versetzten Vollblutes jeder Versuchsgruppe mit 1,5 ml 100 µM L-012 inkubiert. Jeweils 200 µl des Reaktionsvolumens wurden pro Well auf Chemilumineszenz in 6fach Bestimmung gemessen. Zur Stimulation wurden 1,5 µl PDBu (Phorbol-12,13-Dibutyrate) (final 10 µM) zugegeben. Dieses ist in der Lage durch Strukturähnlichkeit mit dem natürlichen Protein Kinase C Aktivator Diazylglyzerin rezeptorvermittelt die PKC abhängige NADPH Oxidase zu stimulieren [259, 260]. Mit Zugabe des Phorbolesters lässt sich demnach die Kapazität des Vollblutes zum „*respiratory burst*“ ermitteln [261]. Die Messung in Counts/Minute erfolgte über ein Intervall von 30 s über einen 10 minütigen Zeitraum. Die ECL wurde ausgedrückt in Counts pro Minute nach Inkubation von 10 min.

Zur Messung von ROS im Vollblut mittels des LB9507 Single Photon Counters („Röhrchen-Luminometer“) wurden 10 µl des im Verhältnis von 1:10 mit Citrat versetzten Vollblutes pro Versuchstier 1:50 mit PBS verdünnt und mit 10 µM PDBu versetzt. Die Chemilumineszenzsignalintensität pro min konnte nach 5, 10, 15 und 20 Minuten detektiert werden. Die Messung mittels des Single Photon Counters ist sensitiver, allerdings mit einem erhöhten Arbeitsaufwand verbunden.

2.2.5.5 Proteinexpressionsanalyse

2.2.5.5.1 *Proteinisolation*

Verwendete Puffer/ Lösungen (siehe 2.1.7): Homogenisierungs-Puffer (Hg-Puffer), Homogenisierungs-Lösung und 3xLämmli

Die schockgefrorenen Aorten wurden in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser und Pastill zerkleinert und in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von eiskalter Homogenisierungslösung (300 µl pro 100 mg Gewebe) wurde das Gewebe bei gleichzeitiger starker Durchmischung aufgetaut. Das Gemisch wurde für eine Stunde auf Eis inkubiert und alle 15 min kurz kräftig durchmischt. Das im Puffer enthaltene Detergenz Triton X-100 lysiert in diesem Zeitraum die Zellen und die Proteine werden aus Membranen gelöst. Das Zellpellet wurde durch Zentrifugation bei 10.000g, 15 min, 4°C abgetrennt und der die solubilisierten Proteine enthaltene Überstand abgenommen und für die anschließende Proteinbestimmung bei 4°C aufbewahrt. Die längerfristige Lagerung des nativen Proteins erfolgte bei -80°C. Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden die Proben im Verhältnis 2:1 mit 3xLämmli (+β-Mercaptoethanol) versetzt.

2.2.5.5.2 *Proteinbestimmung nach Bradford*

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau-G250 an Proteine. Bei der Bindung geht der Farbstoff vom kationischen in den anionischen Zustand über und dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm, was die photometrische Bestimmung ermöglicht. Diese Absorptionsänderung ist über weite Bereiche zur Proteinkonzentration proportional und erlaubt so deren photometrische Messung bei 595 nm [262, 263].

Dadurch, dass Coomassie Brilliant Blau-G250 hauptsächlich an basische Aminosäuren [264] bindet, ist auch die Absorption unterschiedlich bei verschiedenen Proteinen. Daher bezieht man die Absorptionsmessung auf eine Eichgerade mit BSA.

Als Reagenz wurde Roti[®]-Quant (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben im Mikrotitermaßstab verwendet. Die Konzentration aller Proben wurde in 4fach Bestimmung gemessen.

Dazu wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt und die Proteinkonzentration mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet. Die Auswertung erfolgt mit dem Programm Revelation (Dynex Magellan Biosciences, Denkendorf, Deutschland).

2.2.5.5.3 SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Verwendete Puffer/ Lösungen (siehe 2.1.7): SDS 10%, APS 10% (Ammoniumpersulfat), Laufpuffer, Trenngel-Puffer, Sammelgel-Puffer

Die SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine häufig angewendete Methode zur Trennung von Proteingemischen.

Unter einer Gelelektrophorese versteht man die Wanderung von positiv oder negativ geladenen Molekülen im elektrischen Feld in einem Gel als Trägermatrix. Die Gelelektrophorese dient vor allem der Analyse von Proteinmischungen und ermöglicht schnelle Molekulargewicht-Bestimmungen. Durch die Ladung Ihrer Aminosäuren haben Proteine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten und -richtungen im elektrischen Feld. Durch die Zugabe des anionischen Tensids SDS (Sodiumdodecylsulfat) wird die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur zerstört, indem sich das Protein in seine Untereinheiten aufspaltet und entfaltet. Die Ausbildung von lang gestreckten Protein-SDS-Komplexen führt dazu, dass bei allen Proteinen das gleiche Ladung/Masse-Verhältnis vorliegt und die Wanderung im elektrischen Feld nicht mehr von der Ladung der Proteinuntereinheit abhängt, sondern nur noch von der Proteingröße. Durch die negative Ladung wandern die Proteine außerdem alle zur Kathode. Arbeitet man unter reduzierenden Bedingungen (Erhitzen, Zugabe von Dithiothreitol oder β -Mercaptoethanol), werden die Disulfidbrücken der Proteine gespalten [265].

In der vorliegenden Arbeit wurden 10%ige SDS-Gele verwendet. Die Elektrophorese wurde mit einem Mini-Protean-III-System von Biorad (München, Deutschland) durchgeführt. Unter einer Spannung von 60 V traten die Proben aus dem Sammelgel in das Trenngel über. Danach erfolgte die Auftrennung bei 120–140 V für mindestens zwei bis drei Stunden. Während der gesamten Zeit wurde die Apparatur in einem Eisbad gekühlt.

Tabelle 2-2: Zusammensetzung diskontinuierliches SDS-PAGE Gel.

| | Trenngel (10%) | Sammelgel (4%) |
|--------------------------------------|----------------|----------------|
| H ₂ O | 4,8 ml | 3,2 ml |
| Trenngel-Puffer (1,5 M Tris, pH 8,8) | 2,5 ml | |
| Sammel-Puffer (1 M Tris, pH 6,8) | | 1,2 ml |
| Acrylamide/Bis | 1,88 ml | 0,5 ml |
| 10% SDS | 100 µl | 50 µl |
| 10% APS | 100 µl | 50 µl |
| TEMED | 10 µl | 5 µl |

2.2.5.5.4 Western Blot (Immunoblot)

Verwendete Puffer/ Lösungen (siehe 2.1.7): Transferpuffer, Waschlösungen WB (Western Blot), Blockmedien WB

Der Western Blot ist ein Verfahren um Proteine nach ihrer Separation in einem SDS-Gel spezifisch nachzuweisen. Der Nachweis beruht auf der spezifischen Bindung eines Antikörpers an ein oder mehrere Epitope des entsprechenden Proteins. Der Transfer der Proteine auf einen Träger (z.B. Nitrocellulose) geschieht beim hier verwendeten Elektroblothing durch Anlegen einer Spannung [266, 267]. Der Transfer der Proteine von dem SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran erfolgte mit der *wet*-Methode mit dem Mini Trans-Blot Elektrophorese Transfer Zellen von Bio-Rad (München, Deutschland) für 3-4 h bei 250 mA unter permanenter Kühlung in einem Eisbad.

Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung gefärbt, die Proteinbanden des Markers markiert und die Membran in Waschpuffer entfärbt (siehe Abschnitt 2.2.5.5.5). Um unspezifische Bindestellen zu blockieren, wurde die Membran 1 h in einer Blockinglösung bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.

Zur Behandlung der separierten und transferierten Proteine mit dem Primärantikörper wurde dieser in entsprechender Verdünnung in 5 ml Blockinglösung angesetzt, auf die Membran gegeben und 1 h bei 4°C inkubiert. Nach der Antikörperinkubation wurde die Membran einmal kurz und viermal 5 min lang mit 1x Waschpuffer (TBST/PBST oder PBSTT) gewaschen (Raumtemperatur, Schüttler).

Der HRP-konjugierte Sekundärantikörper wurde in entsprechender Verdünnung angesetzt (in Blockinglösung) und die Membran mit der Lösung 1,5-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen (viermal 5 min mit 1x Waschpuffer, TBST/TBST oder PBSTT) bei Raumtemperatur erfolgte die Detektion.

Als Chemilumineszenzsubstrat wurde Pierce ECL Western Blotting Substrat (Pierce Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) oder bei schwächer exprimierten Proteinen mit dem Amersham ECL Plus Western Blot Detection Reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) verwendet. Die Chemilumineszenz-Signale wurden mittels des INTAS ChemoCam ECL Imager (INTAS, Göttingen, Deutschland) detektiert.

Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm Gel-Pro Analyzer 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, USA).

2.2.5.5.5 Ponceau-Färbung

Bei Ponceau S handelt es sich um einen Azofarbstoff, der sich zum unspezifischen Nachweis von Proteinen auf einer Nitrocellulosemembran eignet. Diese Färbung dient vor allem dazu, den Transfer der Proteine beim Western Blot nachzuweisen.

Bei der Färbung wird die Membran für etwa 2 min mit der Ponceau S-Lösung inkubiert und dann solange mit ddH₂O gewaschen, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abheben. Für eine anschließende Immundetektion der Proteine muss die Membran nach erfolgter Dokumentation vollständig durch Waschen mit Waschpuffer entfärbt werden [268-270].

2.2.5.6 mRNA Expressionsanalyse

2.2.5.6.1 *RNA-Isolation aus Aortengewebe oder peripheren mononukleären Zellen*

Verwendete Lösungen/ Puffer (siehe 2.1.7): Git-Puffer

Zur Isolation von RNA aus Aortengewebe wurden zwei verschiedene Methoden im Verlauf dieser Arbeit angewendet.

Zum einen wurde RNA mit Hilfe des *RNeasy[®] Fibrous Tissue Mini Kits* (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Bei diesem Verfahren wird ausgenutzt, dass RNA bei hohen Ethanolkonzentrationen an eine Silica-Membran bindet und bei niedrigen Konzentrationen wieder abgelöst werden kann. Die Isolation erfolgte nach Herstellerangaben. Das schockgefrorene Aortengewebe wurde in RLT Puffer mit Hilfe eines Tissue Lyser II (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder eines Ultrathoraxes (IKA-Werke, Staufen, Deutschland) zerkleinert. Die Elution von der Säule erfolgte mit 30 µl DETC H₂O.

Die zweite Methode, die verwendet wurde zur Isolation von RNA aus Aorten und für die RNA-Isolation aus Zellen, ist die modifizierte Guanidiniumisothiocyanat Methode nach Chomczynski and Sacchi [271-273]. Dabei handelt es sich um eine Phenol-Chloroform-Extraktion bei dem das chaotrope Denaturierungsreagenz Guanidiniumisothiocyanat eingesetzt wird. Dieses denaturiert und inaktiviert sehr effektiv Proteine, einschließlich RNasen. Das Verfahren beruht auf den unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften von Proteinen, RNA und DNA. In der Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol-Emulsion lösen sich die Proteine in der organischen Phase, während die RNA in der wässrigen Phase verbleibt und sich DNA an der Phasengrenze sammelt. Dieses wird durch das Absenken des pH-Wertes unterstützt.

Die RNA kann nach erfolgter Phasentrennung aus der wässrigen Phase gefällt werden.

Zur Isolation von RNA aus schockgefrorenen Aorten wurde das Gewebe zunächst mit Hilfe des Tissue Lysers II (Qiagen, Hilden, Deutschland) in 600 µl Git-Puffer zerkleinert und für mindestens eine Stunde bei -20°C lysiert.

Zur Isolation von RNA aus mononukleären Zellen des Blutes wurden die Zellen über einen Histopaque 1.119/1.077 Gradienten isoliert. Auf eine Schicht von 1 ml Histopaque 1.119 und 1 ml Histopaque 1.077 wurde 1 ml Heparin-anticoaguliertes venöses Blut geschichtet, 30 min bei 700g bei Raumtemperatur zentrifugiert und der mononukleäre Zellring zwischen der Plasma-Histopaque 1.077-Interphase abgenommen. Nach zweimaligem Waschen der mononukleären Zellen mit PBS (300g, 4°C, 5 min) konnten diese für die RNA-Isolation eingesetzt werden. Dafür wurden die frisch isolierten Zellen mit 600 µl Git-Puffer versetzt und für mindestens eine Stunde bei -20°C lysiert.

Nach Ansäuerung der Aorten- oder Zellproben durch Zugabe von 2 M Natriumacetat (pH 4,0) im Anschluss an die Lyse wurde die Proben mit 1 ml Phenol (wassergesättigt) versetzt, die Proben stark durchmischt, 300 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, erneut kräftig durchmischt und die Proben dann für 15 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (20 min, 16.000g, 4°C) erfolgte die Phasentrennung. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 1,0 Volumen eiskaltem Isopropanol die RNA bei -20°C für mind. 60 min gefällt. Die RNA wurde dann durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand vorsichtig abgekippt, das Pellet mit 80%igem Ethanol gewaschen (300 µl, 5 min, 16.000g, 4°C) und 5 min über Kopf getrocknet. Die RNA wurde in DEPC H₂O aufgenommen und die Konzentration bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.5.6.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration und die Reinheit der isolierten RNA wurden spektralphotometrisch (Nanodrop, PEQLAB, Erlangen, Deutschland) anhand der optischen Dichte (OD) bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen und Phenolen) bestimmt. Dabei kann der Grad der Reinheit mittels des Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ berechnet werden. Lag dieser zwischen 1,8 und 2 wird die RNA-Konzentration der Probe wie folgt berechnet:

Konzentration der RNA [ng/μl] = OD₂₆₀ x Verdünnung x 40

2.2.5.6.3 PCR basierte Analyse der mRNA-Expression von IL-12p40

Für die Expressionsanalyse von IL-12 wurde RNA von schock-gefrorenen Aorten nach dem Git-Puffer Protokoll isoliert. Nach Bestimmung der Qualität und Reinheit der RNA wurde cDNA aus 1 μg totaler RNA durch reverse Transkription mit dem high-capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) synthetisiert. Folgende Primer wurden zur Analyse eingesetzt:

Für IL-12p40 5'-CAGAAGCTAACCATCTCCTGGTTTG-3' (sense) und 5'-TCCGGAGTAATTTGGTGTTCACAC-3' (antisense) und L-32 als Haushaltsgen 5'-CCTCTGGTGAAGCCCAAGATC-3' (sense) and 5'-TCTGGGTTTCCGCCAGTTT-3' (antisense).

Alle PCR Amplifikationen wurden in einem 25 μl Ansatz durchgeführt mit dem REDTaq Ready PCR Reaction Mix von Sigma-Aldrich (Seelze, Germany). Die 30 Zyklen lange Reaktion wurde in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) durchgeführt: Denaturierung 94°C 1 min, Annealing 55°C 2 min and Extension 72°C 3 min. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5%igen Agarosegel mit GelRed Nucleic Acid Stain (Biotrend, Köln, Deutschland) Ihrer Größe nach aufgetrennt und die DNA-Banden mit dem GeldOC EZ Imager (BioRad, Hercules, USA) detektiert. Die Intensität der Banden wurden densitometrisch mit der Gel-Pro Analyzer Software (Media Cybernetics, Bethesda, USA) analysiert.

2.2.5.6.4 Real-Time PCR (qRT-PCR)

Prinzip

Die Real-Time PCR (qRT-PCR) Methode erlaubt die direkte Detektion der PCR-Produkt-Akkumulation über Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden. Das Signal der durch eine Lichtquelle angeregten Fluoreszenzfarbstoffe

korreliert dabei quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt und kann in Echtzeit (Real-time) dargestellt werden. Hierbei können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe und Sonden zum Einsatz kommen: SYBR Green ist ein nicht-gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff und bindet generell an jede doppelsträngige DNA. Bei den sog. TaqMan-Sonden, die in dieser Arbeit verwendet wurden, handelt es sich hingegen um für die Ziel-DNA-Sequenz spezifische Oligonukleotide, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Diese TaqMan-Sonden sind mit zwei Farbstoffen markiert, einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (z.B: FAM) und einem "Quencher" (z.B. TAMRA). Sobald die Sonde an die Zielsequenz bindet, wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase die Sonde hydrolysiert und somit eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen. Je mehr Amplifikate entstehen, umso stärker wird das Signal des fluoreszierenden Reporterfarbstoffs [274-276].

Versuchsauswertung

Die Ergebnisse jeder quantitativen qRT-PCR Methode, so auch der Real-time PCR, werden durch qRT-PCR spezifische Störfaktoren beeinflusst und führen zu einer Missinterpretation der ermittelten Expressionsprofile. Für eine Quantifizierung ist daher eine Korrektur dieser Faktoren notwendig. Die derzeit am besten akzeptierte Methode ist dabei die Normalisierung der Expression des Zielgens auf die Expression eines Referenzgens. Das heißt, in derselben Probe wird die Expression des Zielgens und des Referenzgens parallel erfasst und die ermittelten Werte des Zielgens relativ zu dieser internen Kontrolle angegeben.

Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgte über die sog. DDC_T -Methode [277]. Für jede untersuchte Probe wird der C_T -Wert des Referenzgens vom C_T -Wert des Zielgens abgezogen. Anschließend wird das „ DDC_T “-Berechnungsmodell durchgeführt, indem vom DC_T -Wert der behandelten Proben der DC_T -Wert der Kontrolle abgezogen wird. Aus der arithmetischen Formel 2^{DDC_T} ergibt sich der relative Expressionsunterschied der Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert auf das Referenzgen und auf eine Standardprobe bezogen. Als Referenzgen wurde in dieser Arbeit das *TATA box binding protein* (TBP) verwendet.

Zur Durchführung der qRT-PCR wurde das QuantiTect™ Probe RT-PCR Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet.

Bei diesem Kit erfolgt die Transkription, die Umwandlung von RNA zu cDNA [278], sowie die eigentliche qRT-PCR in einem Ansatz.

Die Primer und Sonden für die qRT-PCR wurden als „TaqMan® Gene Expression Assays“ von der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) bezogen (siehe Kap. 2.1.4.4.2). Als Ansatzvolumen wurde ein Volumen von 10 µl gewählt und 2 µl der aufgereinigten DNA (0,05 µg/ml) pro well eingesetzt. Die qRT-PCR Bedingungen wurden den Herstellerangaben entsprechend gewählt.

Die qRT-PCR wurde mit dem CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad, München, Deutschland) durchgeführt.

2.2.5.7 Durchflusszytometrie

Verwendete Lösungen/Puffer: ACK-Lyse Puffer, FACS1, FACS2, PBS/FCS (siehe Lösungen und Puffer 2.1.7 und Antikörper 2.1.4.1)

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Mit Hilfe von mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörpern können bestimmte Eigenschaften von Zellpopulationen auf Einzelzellebene dokumentiert werden.

Zur Analyse werden die Zellen in einer Einzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung (wie an einer Perlenkette) an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes werden dabei durch den monochromatisierten Laserstrahl auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Zurückfallen in das Ursprungsniveau nach Beendigung des Impulses werden Photonen emittiert und diese über einen Photodetektor registriert. Die Stärke ist dabei proportional zur gebundenen Antikörpermenge und damit zu den Zellen. Zusätzlich werden auch physikalische Eigenschaften der Zellen detektiert, die die Identifizierung der Zellen unterstützen; diese können in Form eines *forward scatter/sideward scatter* (FSC/SSC) dargestellt werden. Das FSC gibt via Lichtbeugung Auskunft über die Zellgröße und das SSC via Lichtstreuung über die Granularität des Zytoplasmas und Größe des Zellkerns.

Eine gleichzeitige durchflusszytometrische Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emmissionsspektren verfügen.

2.2.5.7.1 Durchflusszytometrische Analyse von Blut, Milz und Knochenmark

Milz und Knochenmark

Um eine Einzelzellsuspension der Milz zu erhalten wurden diese durch ein 40 µm Zellsieb gepresst und anschließend die Erythrozyten mit 5 ml ACK-Lyse Puffer lysiert. Die Reaktion wurde mit PBS/FCS abgestoppt und die Zellen gewaschen (300g, 5 min, 4°C).

Die Isolation des Knochenmarks erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3.5.1 beschrieben, analog der Isolation zur Herstellung von Chimären. Zur anschließenden Färbung wurden jeweils 1×10^6 Milz- oder Knochenmarkzellen verwendet.

Zur Detektion der Monozyten- oder der NK-Zelldepletion bzw. der Chimärismuskontrolle wurden 1×10^6 Milz- oder Knochenmarkzellen verwendet. Zunächst wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 20 µl Fc-block für 10 min bei 4°C abgeblockt. Die Reaktion wurde mit 100 µl PBS/FCS abgestoppt, die Zellen pelletiert (300g, 4°C, 5 min) und anschließend erfolgte die Färbung für 20 min bei 4°C im Dunkeln. Die Zellen wurden erneut mit 100 µl PBS/FCS gewaschen und in 250 µl PBS/FCS aufgenommen.

Blut

Zur Färbung von Blut wurde das BD Lysis Reagent verwendet. Zu 50 µl mit Heparin anticoagulierte Blut wurden zunächst 0,5 µl Fc-block (eBioscience, San Diego, CA, USA) gegeben und anschließend erfolgte die Zugabe der Antikörper (Inkubation 20 min, 4°C). Die Erythrozytenlyse erfolgte für 20-30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit BD Lysis Reagent. Nach Lyse wurde die Zellen mit 1 ml PBS/FCS gewaschen und in 250 µl PBS/FCS aufgenommen.

Es wurden mindestens 30.000 Blutzellen bzw. 50.000 Knochenmarkzellen mittels des BD FACS Canto II und der Diva 6 Software analysiert.

Die NK-Zelldepletion wurde mittels Färbung von CD45-APCefluor780 (Leukozyten, 1:40) sowie NK1.1-FITC (NK-Zellen, 1:40) durchgeführt. Zur Depletionskontrolle von Monozyten wurde CD11b-PE (1:50) und Ly6G-FITC (1:50), Ly6C-PerCPCy5.5 (1:50), CD115-PECy7 (1:50) und F4/80-APC (1:30) verwendet.

Die Chimärismuskontrolle erfolgte durch Färbung von CD45.1-PE (1:50) und CD45.2-FITC (1:50).

2.2.5.7.2 Durchflusszytometrische Analyse von Aortengewebe

Die von Fett und Bindegewebe freipräparierten Aorten wurden zunächst mechanisch mit Hilfe einer Schere und einer Rasierklinge zerkleinert und anschließend in 1 ml 1 mg/ml Collagenase II (1 mg/ml, Gibco, Carlsbad, CA, USA) und 50 µg/ml DNase I (Roche, Mannheim, Deutschland) in HBSS⁺⁺ für 20 min bei 37°C und 500 rpm verdaut. In einigen Versuchen wurde auch mit Liberase (Roche, Mannheim, Deutschland) in HBSS⁺⁺ unter den gleichen Bedingungen enzymatisch verdaut (stock 25 U/ml 1: mit HBSS⁺⁺ verdünnen).

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 500 µl PBS/FCS abgestoppt und die Proben auf Eis gestellt. Die Aortenlysate wurden über ein 70 µm Zellsieb gegeben, mit PBS/FCS nachgespült, die Lösung in einem 15 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen 5 min bei 300g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in eine 96well Rundbodenplatte überführt und mit 100 µl PBS/FCS gewaschen.

Im Anschluss folgte die Färbung. Um unspezifische Fc-Rezeptor-medierte Bindungen abzublocken, wurden die Zellen mit ungelabelten Antikörper gegen CD16/CD32 (eBioscience, San Diego, CA, USA 1:100) inkubiert. Pro Aorta wurden 20 µl der jeweiligen Antikörper gelöst in FACS1 zugegeben, für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert, anschließend mit 100 µl PBS/FCS gewaschen und die Zellen in 250 µl FACS2 resuspendiert.

Zur Analyse wurde die komplette Probe mittels des BD Canto II aufgenommen und mit der FACS Diva 6 Software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) analysiert.

Verwendete Antikörperkombinationen:

- (1) Färbung nach Collagenase II/DNase I Verdau: Viability Dye 506, CD45-APC-efluor780, TCRβ-PE-Cy5, NK1.1-PECy7, CD11b-PE, GR-1-FITC, F4/80-APC
- (2) Färbung nach Liberase-Verdau: Viability Dye 506, CD45-APC-efluor780, Ly6C-PerCP-Cy5, NK1.1-PECy7, CD11b-PE, Ly6G-FITC, F4/80-APC
- (3) Färbung chimäre Mäuse: CD45.1-PE CD45.2-FITC, Viability Dye 506, CD45-APC-efluor780, TCRβ-PE-Cy5, CD11b-PE-Cy7, GR-1-V450
- (4) IL-12 Färbung: Viability Dye 506, CD45-APC-efluor780, CD11b-PECy7, GR-1-FITC, IL-12-PE
- (5) IFN-γ Färbung: Viability Dye 506, CD45-APC-efluor780, TCRβ-PE-Cy5, NK1.1-FITC, CD11b-PECy7, IFN-γ-PE

2.2.5.7.3 *Ex vivo Stimulation von Blut und Aortenlysaten zur Detektion von Interleukin-12 und Interferon- γ*

Zur Detektion von Interferon-gamma (IFN- γ) wurden isolierte Zellen der Aorta *in vitro* mit 20 ng/ml IL-12 (R&D, Minneapolis, MN, USA) oder 20 ng/ml IL-18 (MLB, Aichi, Japan) für 4-5 h stimuliert. Nach 30 min wurden 1,4 μ l/ 200 μ l Probenvolumen BD GolgiStop (Monensin) (1:10) zugegeben.

Zur Analyse der Interleukin-12 (IL-12) Expression wurden Erythrozyten-depletierte Blutzellen oder isolierte Aortenzellen \bar{u} N mit 10 ng/ml IFN- γ inkubiert, gefolgt von einer 5-stündigen Stimulation mit 1 μ g/ml LPS (Sima-Aldrich, Seelze, Deutschland) in Gegenwart von 10 μ g/ml Brefeldin A (eBioscience, San Diego, CA, USA). Durch die Zugabe von Monensin bzw. Brefeldin wird der Trans-Golgi Transport und damit die Ausschleusung der gebildeten Cytokine gehemmt, so dass diese sich in der Zelle ansammeln und dadurch in einer für die durchflusszytometrische Methoden Analyse hinreichenden Menge intrazellulär durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden können.

Nach der Stimulation und Oberflächenfärbung, wurden die Zellen fixiert und intrazellulär für 30 min bei 4°C mit IFN- γ -FITC oder -PE bzw IL-12-PE (eBiosciences, San Diego, CA, USA) mit Hilfe des BD Cytofix/Cytoperm Kit nach Herstellerangaben gefärbt. Nach einem abschließenden Waschschrift mit Perm/Wash wurden die Zellen in FACS2-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.5.8 Immunhistochemie

Verwendete Antikörper und Kits: siehe 2.1.2 und 2.1.4.2

In der Immunhistochemie nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Antigenen an histologischen Schnitten sichtbar zu machen. In dieser Arbeit wurden die Expression von Makrophagenmarkern sowie oxidativen Stressmarkern in Paraffinschnitten von Aortensegmenten detektiert. Nach Aortenentnahme wurden die Aortenbögen unpräpariert in Roti-Histofix (4% PFA; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) überführt und darin für mindestens 24 Stunden gelagert. Anschließend erfolgte über Nacht eine Auswaschung des PFA durch Einlegen in Leitungswasser. Mit Hilfe des Einbettautomaten Leica TP 1020 wurden die in Tissue TEK Mesh Biopsy (Sakura, Japan) Kassetten fixierten Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%) entwässert und nach

vierstündiger Xyloolbehandlung mit dem Einbettautomaten Leica EG1120 (Wetzlar, Deutschland) in Paraffin eingebettet. Mithilfe eines Mikrotoms (RM 2125, Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden Schnitte einer Dicke von 5 μm angefertigt, auf einen Objektträger überführt und 2 bis 3 Tage bei 37°C getrocknet. Nach der Entparaffinierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) und Waschen in Wasser erfolgt der immunhistochemische Nachweis mit ABC Reagenz (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) oder DAB (Peroxidase Substrate Kit, Vector).

Die Schnitte wurden mit Primärantikörpern gefärbt (1:100 CD68, F4/80, Nox2) und gemäß ihrer Spezies biotinylierte Sekundärantikörper entsprechend der Herstelleranweisung verwendet. Mittels des „Vectastain Elite ABC Kit“ (Vector Labs, Burlingame, CA, USA), einem auf *horse-raddish-peroxidase* basierendem ABC Systems, erfolgte die Anregung zur Signalemission. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in einem Dampfgarer mit *Target-Retrieval-Solution* (pH 9) vorbehandelt. Zwei Negativkontrollen (PBS bzw. IgG1 Negativ-Kontrolle anstatt des Primärantikörpers) dienen dem Ausschluss falsch positiver Ergebnisse. Die Gegenfärbung mit Hämatoxylin im Anschluss an die Antikörperbehandlung zeigte die blau gefärbten Nukleinsäuren. Nach der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte abschließend mit Entellan® eingedeckt.

2.2.6 Statistische Analyse

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Die statistischen Kalkulationen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA) erstellt. Der D'Agostino- und -Pearson Normalitätstest wurde zunächst durchgeführt, um zu Prüfen, ob es sich um eine Normalverteilung der Daten handelt. Bei einer Normalverteilung wurde bei zwei Gruppen ein t-Test zur Analyse benutzt und bei mehr als zwei Gruppen eine ordinäre One-way ANOVA mit anschließendem Bonferoni's multiple comparison Test durchgeführt. Lag keine Gauss'sche Verteilung vor, wurde bei zwei Gruppen ein t-Test mit anschließendem Mann-Whitney U-Test durchgeführt; bei drei oder mehr Gruppen eine One-way ANOVA mit Kruskal-Wallis Test und anschließendem Dunn's multiple comparison Test.

Ein Stern * kennzeichnet einen P-Wert von $<0,05$, zwei Sterne ** von $p<0,01$ und drei Sterne *** von $p<0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle von Nox2 und den Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 exprimierenden Monozyten in der Angiotensin II-induzierten vaskulären Dysfunktion und der arteriellen Hypertonie

Wie in Vorarbeiten zu dieser Studie [195] gezeigt wurde, schützt die Depletion von LysM⁺ myelomonozytären Zellen vor der Angiotensin II-induzierten vaskulären Inflammation und Dysfunktion sowie der Ausbildung eines arteriellen Hypertonus.

Im Rahmen des ersten Teils dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob der protektive Effekt einer Monozytendepletion abhängig von der Monozyten spezifischen Expression des AT₁-Rezeptors sowie der NADPH Oxidase ist.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde das bereits etablierte LysM^{iDTR} Mausmodell zur Hilfe genommen. In den nachfolgenden Experimenten wurden Monozyten-depletierte LysM^{iDTR} Mäuse zu Beginn der siebentägigen ATII Infusion mit gp91^{phox -/y} oder Agtr1^{-/-} Monozyten (LysM^{iDTR}+DTX+ATII +gp91^{phox -/y} oder +Agtr1^{-/-} Monozyten) rekonstituiert.

Als Kontrollgruppe dienten Monozyten-depletierte LysM^{iDTR} Mäuse, die mit NaCl sham behandelt wurden (LysM^{iDTR}+DTX+ATII+Puffer). Der Blutdruckverlauf sowie die vaskuläre Funktion und oxidative Stressparameter wurden in nachfolgenden Experimenten bestimmt.

3.1.1 Die Expression von Nox2 und AT₁R auf Monozyten ist essentiell für die blutdrucksteigernden Effekte von Monozyten in Antwort auf Angiotensin II

Der arterielle Blutdruck wurde über den gesamten 10-tägigen Behandlungszeitraum (240 h) mittels Arteria-Carotis-Katheter telemetrisch aufgezeichnet. Abbildung 3-1 zeigt den Verlauf des systolischen Blutdrucks während des Versuchs.

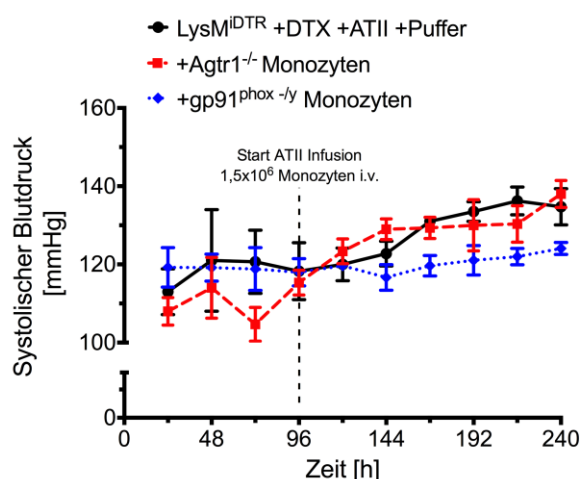


Abbildung 3-1: ATII Infusion führt weder in Monozyten-depletierten LysM^{iDTR}+DTX+ATII Mäusen noch in mit gp91^{phox}-/- oder Agtr1^{-/-} Monozyten rekonstituierten Mäusen zu der Entwicklung eines arteriellen Hypertonus. Telemetrische Erfassung des arteriellen systolischen Blutdrucks von Diptheriatoxin (DTX) behandelten LysM^{iDTR}+DTX+ATII Mäusen über einen Zeitraum von 240 h. Nach ca. 96 h erfolgten der adoptive Monozytentransfer und der Start der ATII Infusion. Mittelung der Einzelwerte über 24 h. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM; n=3-4 Tiere; Two-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test.

Tabelle 3-1: Systolische Blutdruckwerte von LysM^{iDTR}+DTX+ATII Mäusen mit Puffer oder Agtr1^{-/-} oder gp91^{phox}-/- Monozyten behandelt.

| | Systolischer Blutdruck | |
|---|------------------------|------------------|
| | Tag 1 [mmHg] | Tag 10 [mmHg] |
| LysM ^{iDTR} +DTX+ATII +Puffer | 113,0 \pm 5,86 | 134,8 \pm 4,67 |
| +Agtr1 ^{-/-} Monozyten | 119,2 \pm 2,06 | 124,1 \pm 1,56 |
| +gp91 ^{phox} -/- Monozyten | 108,0 \pm 3,51 | 138,0 \pm 3,46 |

Die Applikation von ATII führte sowohl bei den mit Puffer behandelten (LysM^{iDTR}+DTX+ATII+Puffer) als auch bei den mit Agtr1^{-/-} oder gp91^{phox}-/- Monozyten rekonstituierten Mäusen nur zu einer geringen, nicht signifikanten Erhöhung des systolischen Blutdrucks im Vergleich zum Basallevel vor ATII Infusion (Tabelle 3-1).

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied des arteriellen systolischen Blutdrucks nach 7-tägiger ATII Infusion (240 h) zwischen den drei Gruppen, der auf einen Einfluss der Monozytenrekonstitution schließen lassen würde: LysM^{iDTR}+DTX+ATII+Puffer 134,8 \pm 4,67 mmHg; LysM^{iDTR}+DTX+ATII+Agtr1^{-/-} Monozyten 124,1 \pm 1,56 mmHg; LysM^{iDTR}+DTX+ATII+gp91^{phox}-/- Monozyten 138,0 \pm 3,46 mmHg.

3.1.2 Einfluss des Knockout-Monozytentransfers auf die vaskuläre Funktion von Angiotensin II-infundierten LysM⁺ Zell-depletierten Mäusen

Parallel zu der Bestimmung des telemetrischen Blutdrucks wurde auch die vaskuläre Funktion nach Knockout Monozytentransfer mittels isometrischer Spannungsstudien an isolierten Aortensegmenten im Vergleich zu Puffer behandelten LysM^{IDTR}+DTX +ATII Tieren analysiert. In Abbildung 3-2 ist die Relaxationsfähigkeit der Aortenringe der drei experimentellen Gruppen in Abhängigkeit von der kumulativen Gabe des endothelabhängigen Vasodilatators Acetylcholin (ACh, A) oder des endothelunabhängigen Vasodilatators Glyceroltrinitrat (GTN, B) dargestellt.

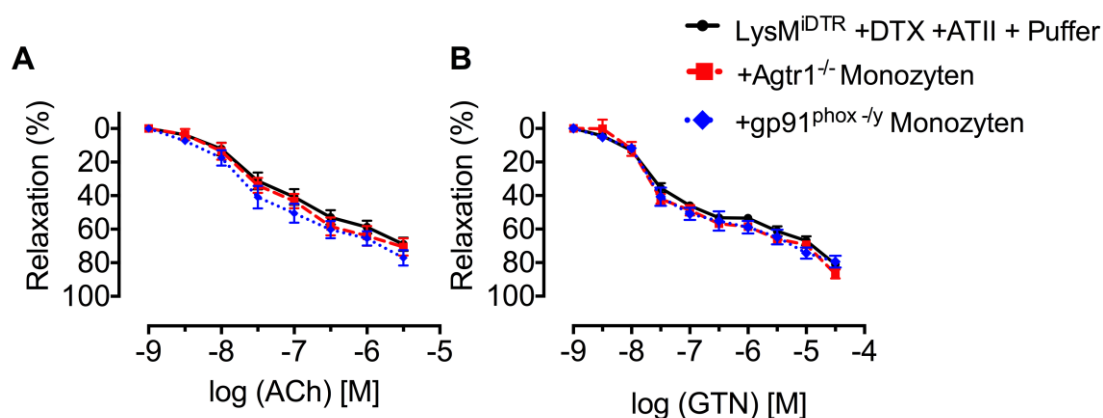


Abbildung 3-2: Die ATII-induzierte vaskuläre Dysfunktion ist abhängig von der Expression des AT₁-Rezeptors und Nox2 in Monozyten. Isometrische Tonusstudien mit isolierten Aortensegmenten von LysM^{IDTR}+DTX+ATII Mäusen, entweder mit Puffer (schwarze Kurven, n=17), Agtr1^{-/-} (rote Kurven, n=6) oder gp91^{phox^{-/-}} (blaue Kurven, n=7) Monozyten behandelt. Angegeben ist die prozentuale Relaxation nach Acetylcholin- (ACh, A) oder Glyceroltrinitrat- (GTN, B) Gabe. One-way ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison Test.

Weder die endothelabhängige (A) noch die endothelunabhängige (B) Relaxation unterschieden sich zwischen Kontrolltieren (maximale Relaxation ACh 69±3,88%; maximale Relaxation GTN 81±4,4%) und den Agtr1^{-/-} (maximale Relaxation ACh 77±4,4%; maximale Relaxation GTN 79±3,3%) bzw. den gp91^{phox^{-/-}} Monozytentransferierten (maximale Relaxation ACh 71±5,0%; maximale Relaxation GTN 87±2,6%) LysM^{IDTR}+DTX+ATII Mäusen.

3.1.3 Die Nox2 und AT₁R Expression auf Monozyten beeinflusst die Angiotensin II-induzierte ROS-Bildung in Blut und Aorta

Im venösen Vollblut konnte nach 7-tägiger Infusion mit ATII kein Unterschied im oxidative Burst, gemessen durch die L-012-verstärkte Chemilumineszenz in Gegenwart des Phorbolesters PDBu, detektiert werden (Abbildung 3-3, A).

Kongruent zu den Ergebnissen im Vollblut zeigte sich auch in der Gefäßwand keine veränderte Superoxidbildung nach Knockout-Monozytenrekonstitution im Vergleich zu den LysM⁺ Zell-depletierten LysM^{iDTR} Mäusen. Dies wurde mittels Färbung mit dem Superoxid (O₂⁻) sensitiven Farbstoff Dihydroethidium (DHE) und anschließender Fluoreszenzmikroskopie gemessen (Abbildung 3-3, B).

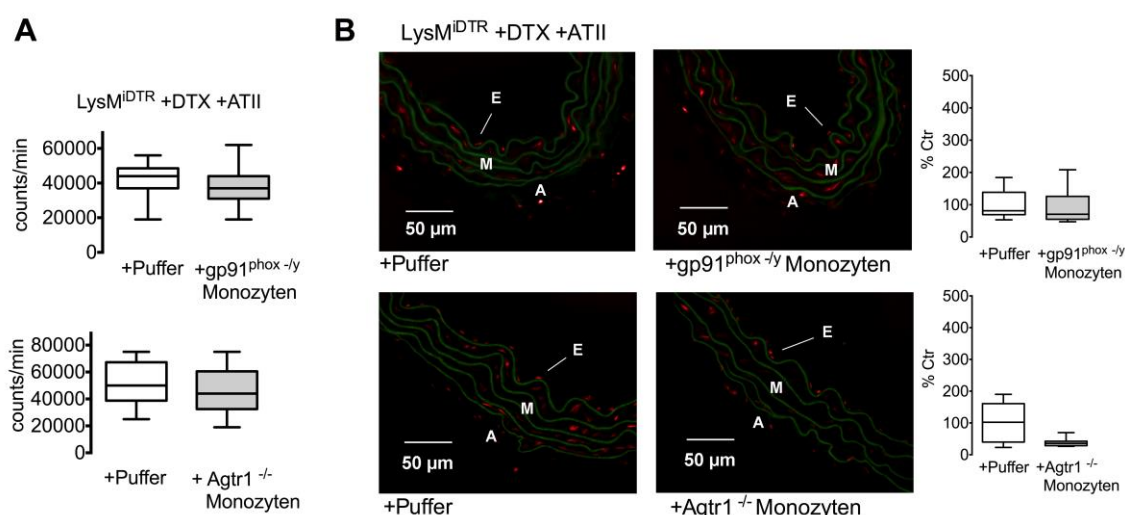


Abbildung 3-3: Rekonstitution von LysM⁺ Zell-depletierten LysM^{iDTR}+DTX+ATII Mäusen mit Nox2 oder AT₁R defizienten Monozyten führt zu keiner erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. Messung reaktiver Sauerstoffspezies im Vollblut (A) und Aortengewebe (B) von LysM^{iDTR}+DTX+ATII Mäusen transferiert mit Agtr1^{-/-} oder gp91^{phox -/y} Monozyten im Vergleich zu Puffer behandelten Kontrollen (Ctr). (A) Produktion reaktiver Sauerstoffspezies im venösen Vollblut, gemessen durch L-012-verstärkte Chemilumineszenz in Anwesenheit des Phorbolesters PDBu (10 μ M). (B) Dihydroethidium (DHE) Färbung von Aortenkryoschnitten. Links, Repräsentative Originalabbildungen. Rot: Durch Superoxid oxidiertes DHE, grün: Autofluoreszenz der *Lamina elastica*. E, Endothel, M, Media, A, Adventitia. Rechts, Densitometrische Analyse. One-way ANOVA Kruskal-Wallis, Bonferroni's multiple comparison Test.

Zusammenfassend hatte die Rekonstitution mit den Knockout Monozyten weder eine Wiederherstellung des arteriellen Bluthochdrucks, der vaskulären Dysfunktion noch der ROS-Produktion zur Folge. Dies deutet darauf hin, dass ATII seine Effekte über den AT₁-Rezeptor exprimiert auf Monozyten vermittelt und die vaskuläre Dysfunktion und

Hypertonie direkt von der Nox2 vermittelten Sauerstoffspezies-Produktion von Monozyten getrieben wird.

3.2 Die Rolle von IFN- γ in der Angiotensin II-induzierte vaskulären Dysfunktion und Inflammation

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit dem Cytokin IFN- γ und dessen Signalübertragungswegen in der ATII-induzierten Inflammationszellrekrutierung und Gefäßdysfunktion.

Um zu überprüfen, ob das Gefäß in Reaktion auf Angiotensin II mit einer proinflammatorischen Antwort über IFN- γ reagiert, wurden mRNA Expressionslevel in Aorten von über eine Woche mit ATII- oder sham-infundierten C57BL/6 Mäusen miteinander verglichen. Abbildung 3-4 zeigt einen Anstieg der mRNA Expressionslevel im Gefäß assoziiert mit der ATII Infusion.

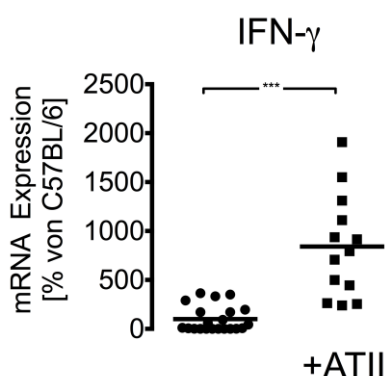


Abbildung 3-4: Angiotensin II Infusion führt zur mRNA Expressionserhöhung von IFN- γ in der Aorta. Analyse der IFN- γ mRNA Expression in Aortenlysaten von ATII oder sham infundierten C57BL/6 Mäusen. Der Mittelwerte ist angegeben als % der C57BL/6 Kontrolle; Kreise und Quadrate stellen einzelne Tiere dar; n =13-21; unpaired t-Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05.

Um daraufhin die Rolle von IFN- γ im ATII Hypertonusmodell weiter zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Mausstämme verwendet: IFN- $\gamma^{-/-}$ und Tbx21 $^{-/-}$ Mäuse, welche defizient für den Transkriptionsfaktor *T box expressed in T cells* (T-bet) sind, der die IFN- γ Expression in Immunzellen reguliert.

Vorstudien aus meiner Arbeitsgruppe legen die Bedeutung von IFN- γ in der Pathogenese der vaskulären Dysfunktion nahe. Diese Studien wiesen eine verbesserte vaskuläre Funktion sowie reduzierte ROS-Level im Gefäß in Antwort auf ATII von

Tbx21^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp Tieren nach und dies obwohl sich keine signifikante Änderung des systolischen Blutdruckanstiegs im Vergleich zu C57BL/6 Tieren zeigte. Die Charakterisierung der Tbx21^{-/-} Mäuse im ATII Modell ist Bestandteil der Dissertation von Dr. med. Maria Isabel Schmidgen (Labor für Molekulare Kardiologie, II. Med., Unimedizin Mainz, 2013) und in der Einleitung zusammengefasst (Kap 1.7.3.1).

Zur weiterführenden Untersuchung von IFN- γ und den zugrundeliegenden Signalwegen wurde folgender experimenteller Ansatz gewählt.

Zur Induktion der vaskulären Dysfunktion und arteriellen Hypertonie wurden IFN- γ bzw. Tbx21^{-/-} Mäuse mit ATII über eine Woche (1 mg/kg/d) in allen Experimenten behandelt und mit C57BL/6 Kontrollmäuse verglichen. Im Anschluss an die Behandlung erfolgten funktionelle Analysen der vaskulären Funktion, ROS-Bildung und Inflammation.

3.2.1 IFN- γ fördert die Angiotensin II-induzierte vaskuläre Dysfunktion, reaktive Sauerstoffspezies-Produktion und Inflammation

Um den Einfluss von IFN- γ auf die Gefäßfunktion zu untersuchen, wurden isometrische Spannungsstudien mit isolierten Aortenringen *ex vivo* durchgeführt. Wie in Abbildung 3-6 dargestellt, zeigten ATII-infundierte C57BL/6 Kontrollmäuse eine schlechtere endotheliale und glattmuskuläre Funktion gegenüber sham behandelten Mäusen, was die Rechtsverschiebungen der Dosis-Wirkungskurven in Antwort auf den endothelabhängigen Vasodilator Acetylcholin (ACh) und den endothelunabhängigen Vasodilator Glyceroltrinitrat (GTN) anzeigen.

Sowohl die Vasorelaxation in Antwort auf ACh als auch auf GTN war in IFN- γ ^{-/-} +ATII Mäusen maßgeblich verbessert gegenüber C57BL/6 +ATII Tieren. Während die endothelabhängige maximale Relaxation sich durch ATII Infusion in C57BL/6 Mäusen signifikant von 75 \pm 2,4% auf 36 \pm 5,0% reduzierte, verschlechterte sich die maximale Relaxation bei IFN- γ ^{-/-} Tieren nicht signifikant (IFN- γ ^{-/-} 62 \pm 4,8% und IFN- γ ^{-/-}+ATII 54 \pm 5,53%). Die maximale Relaxation der IFN- γ ^{-/-} Tiere unterschied sich wiederum nicht signifikant von der der Wildtyp Tiere.

Kongruent hierzu verschlechterte sich auch die endothelunabhängige Relaxation der Aortensegmente auf Glyceroltrinitrat im Wildtyp (C57BL/6 maximale Relaxation 89 \pm 1,9%) durch die chronische Angiotensin II Behandlung signifikant (C57BL/6+ATII maximale Relaxation 58 \pm 4,0%), während bei IFN- γ defizienten Tieren die endothelunabhängige Relaxation auch durch ATII Infusion nicht signifikant beeinflusst

wurde (IFN- $\gamma^{-/-}$ maximale Relaxation $82 \pm 1,4\%$ und IFN- $\gamma^{-/-}$ +ATII maximale Relaxation $72 \pm 2,4\%$).

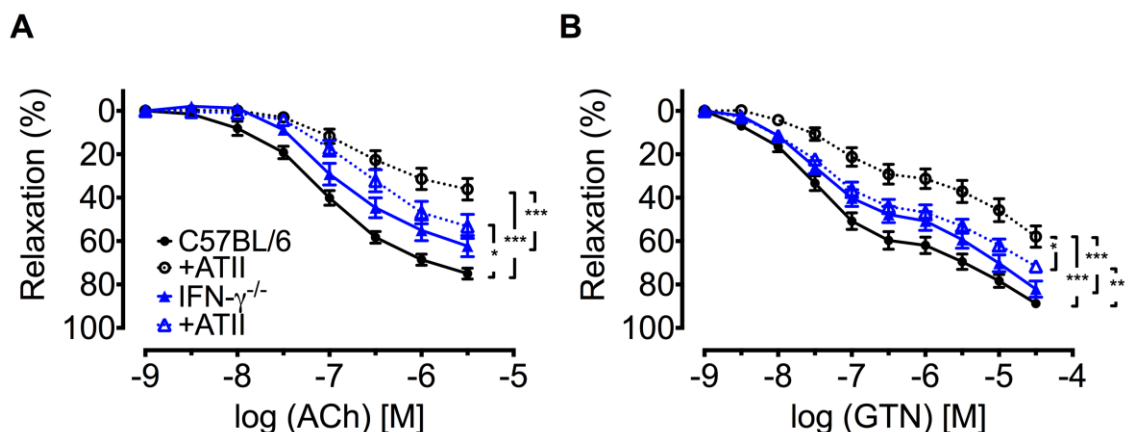


Abbildung 3-5: ATII-behandelte IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäuse sind partiell geschützt vor der endothelialen und glattmuskulären Dysfunktion im Vergleich zu Wildtyp Artgenossen. Mittels isometrischer Spannungsstudien wurde die Relaxationsfähigkeit von isolierten Aortensegmenten von IFN- γ (blaue Kurven) und C57BL/6 (schwarze Kurven) \pm ATII Mäusen in Antwort auf den endothelabhängigen Vasodilator Acetylcholin (ACh) und den endothelabhängigen Vasodilator Glyceroltrinitrat (GTN) getestet. Angegeben ist die prozentuale Relaxation \pm SEM; n=11-16; ordinäre One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05.

Da oxidativer Stress kausal mit der Entstehung der vaskulären Dysfunktion zusammenhängt, wurden reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-Level im Vollblut und im Gefäß untersucht (Abbildung 3-6).

Die ATII Infusion über sieben Tagen führte zu einem Anstieg des respiratorischen Bursts im Vollblut von C57BL/6 Mäusen detektiert durch L-012-verstärkte Chemilumineszenz in Gegenwart des Phorbolesters PDBu. Dieser Anstieg war signifikant reduziert in IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen.

Kryoschnitte von Aortengewebe gefärbt mit dem mit O $_2^{\cdot-}$ sensitiven Farbstoff DHE, zeigten einen substanziellen Abfall im ROS-Signal in der Gefäßwand von ATII-infundierten IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen verglichen mit C57BL/6 Kontrollen.

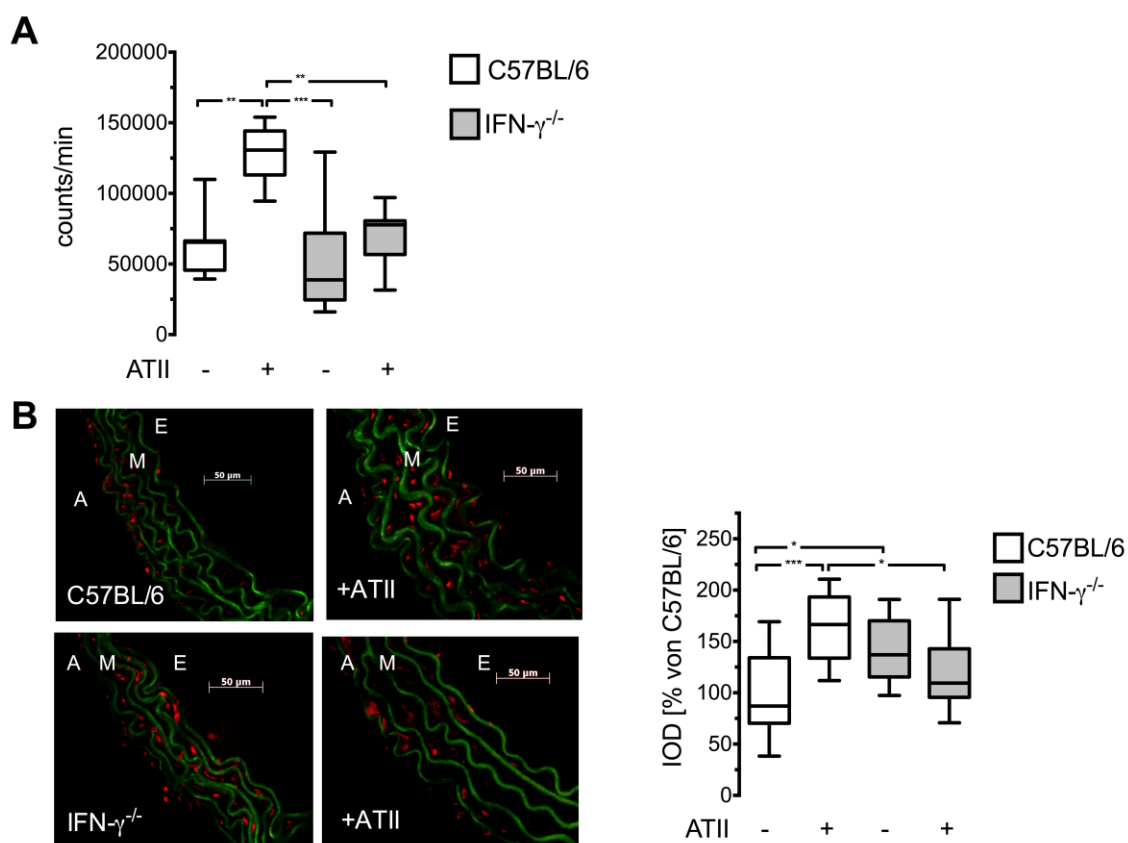


Abbildung 3-6: IFN- γ Defizienz führt zur Reduktion der ATII-induzierten ROS-Produktion im Vollblut und Aortengewebe. Reaktive Sauerstoffspezies Produktion in sham und ATII behandelten C57BL/6 und IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen. A, L-012 verstärkte Chemilumineszenz in Vollblut nach Phorboloster (PDBu) Inkubation; n=7-9. B, DHE Färbung von Aortenkryoschnitten. Links, Repräsentative Fluoreszenz-Mikrotopographie Aufnahmen. Superoxid erscheint in rot, Autofluoreszenz der Laminae in grün. A, Adventitia, E, Endothel und M, Media. Rechts, Quantifizierung; n=3 unabhängige Experimente; ordinäre One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05.

Somit geht das verbesserte Relaxationsverhalten der Gefäße von IFN- $\gamma^{-/-}$ Tieren insgesamt mit einer Abnahme der reaktiven Sauerstoffspezies-Produktion einher.

3.2.2 IFN- γ abhängige Angiotensin II-induzierte Infiltration von Leukozyten in die Gefäßwand

Um zu analysieren welchen Einfluss IFN- γ Defizienz auf die Infiltration von Immunzellen in die Aorta hat, wurde eine durchflusszytometrische Analyse von Aortenlysaten von Tbx21 $^{-/-}$ bzw. IFN- $\gamma^{-/-}$ im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen auf verschiedene Leukozytenpopulationen (TCR β^+ T-Zellen, NK1.1 $^+$ NK-Zellen, CD11b $^+$ GR-1 $^{\text{high}}$ Neutrophile sowie CD11b $^+$ GR-1 $^{\text{low}}$ Monozyten) durchgeführt (Abbildung 3-7).

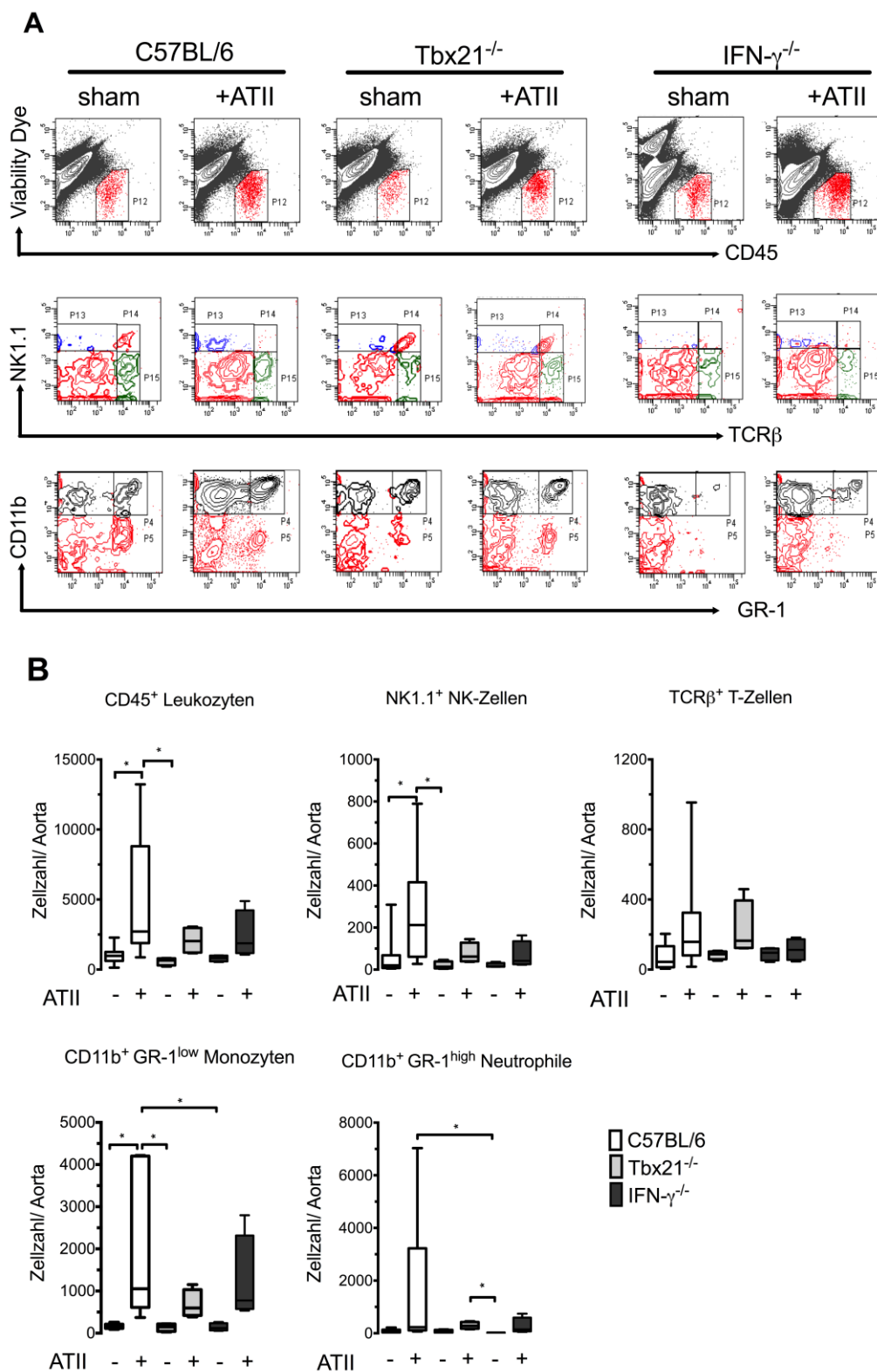


Abbildung 3-7: IFN- γ defiziente Mäuse weisen ein vermindertes Einwandern von Leukozyten, insbesondere NK-Zellen, in die Aortenwand auf. Durchflusszytometrische Analyse der Leukozyteninfiltration von IFN- γ ^{-/-} und Tbx21^{-/-} Mäusen in Vergleich zu C57BL/6 Kontrollen in Abhängigkeit von ATII. Einzelzellsuspensionen der Aorten, hergestellt durch Col II/DNase I Verdau wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen CD45, NK1.1, die β -Kette des α/β T-Zell-Rezeptors (TCR β) sowie gegen die Moleküle GR-1 und CD11b gefärbt und anschließend die Anzahl an NK1.1⁺ NK-Zellen (CD45⁺NK1.1⁺TCR β ⁻), TCR β ⁺ T-Zellen

(CD45⁺TCRβ⁺NK1.1⁻) sowie Monozyten (CD45⁺CD11b⁺GR-1^{low}) und Neutrophilen (CD45⁺CD11b⁺GR-1^{high}) durchflusszytometrisch bestimmt. Tote Zellen wurden durch Anfärbung mit *Viability Dye* von der Analyse ausgeschlossen. A, Repräsentative Konturdiagramme; B, Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung. Quantifizierung der Zellen pro Aorta; n=6-8; One-way ANOVA Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05.

Während die ATII Behandlung in C57BL/6 Mäusen zu einer Verfünffachung der CD45⁺ Leukozytenzahl in der Aortenwand führte, zeigten IFN-γ defiziente Tiere keine signifikante Zunahme nach ATII Infusion. Die Leukozytenzahl in der Aortenwand un behandelter IFN-γ defizienter Tiere unterschied sich wiederum nicht signifikant von der der Wildtyp Tiere.

Als Hauptproduzent von IFN-γ sind Natürliche Killer (NK)-Zellen und T-Zellen bekannt. Interessanterweise war insbesondere die Anzahl an NK-Zellen (CD45⁺NK1.1⁺TCRβ⁻) signifikant reduziert in Gefäßen von IFN-γ defizienten Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Tieren. Das Ausmaß der Reduktion in der Anzahl an T-Zellen (CD45⁺TCRβ⁺NK1.1⁻) war weiter weniger stark ausgeprägt.

Auch die Zahl an Monozyten (CD45⁺CD11b⁺GR-1^{low}) und Neutrophilen (CD45⁺CD11b⁺GR-1^{high}) war vermindert in IFN-γ defizienten ATII-infundierten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren.

3.2.3 Die Depletion von NK-Zellen schützt vor der Angiotensin II-induzierten vaskulären Dysfunktion

Ausgehend von den Ergebnissen der Durchflusszytometrie erschloss sich die Hypothese, dass NK-Zellen in die Entstehung der vaskulären Dysfunktion maßgeblich involviert sind. Zur weiteren Untersuchung dieser möglichen Funktion wurde ein NK-Zell-Depletionsansatz gewählt. C57BL/6 Mäuse wurden nach 3-tägiger Vorbehandlung mit einem depletierenden anti-NK1.1 Antikörper für eine Woche mit ATII infundiert. Die NK1.1⁺ Zell-Depletion wurde über den gesamten Behandlungszeitraum aufrechterhalten (siehe Behandlungsschema 2.2.3.2).

Die NK-Zell-Depletion nach anti-NK1.1 Antikörper Injektion wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse von Blut, Milz und Knochenmark verifiziert. Abbildung 3-8 zeigt, dass über den gesamten Behandlungszeitraum die NK-Zellen annähernd vollständig depletiert werden konnten. Der prozentuale Anteil von NK-Zellen im Blut bezogen auf alle CD45⁺ Lymphozyten nach Ende des

Behandlungszeitraums sank von $16,5 \pm 3,13\%$ auf $0,5 \pm 0,29\%$ unabhängig davon, ob die Tiere mit ATII infundiert wurden.

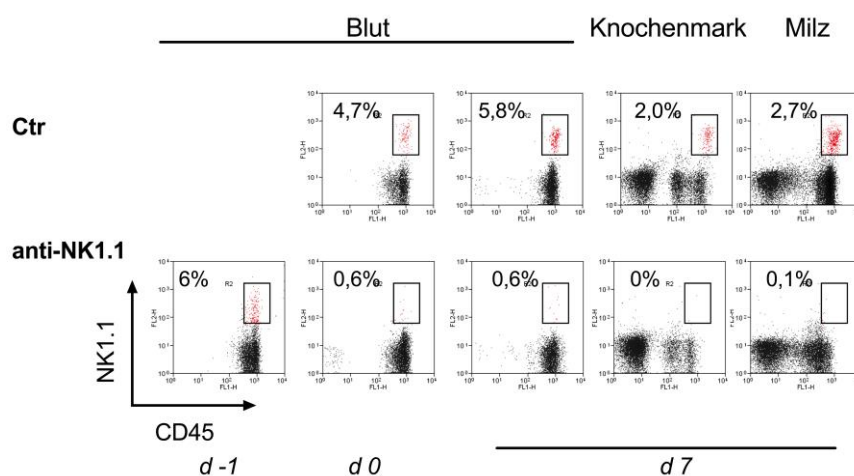


Abbildung 3-8: Durchflusszytometrische Kontrolle der NK-Zell-Depletion in Blut, Milz und Knochenmark. C57BL/6 Mäuse wurden über 10 Tage mit einem anti-NK1.1 Antikörper behandelt und die Depletion an verschiedenen Zeitpunkten in Blut, Milz und Knochenmark durchflusszytometrisch überprüft. Als Kontrolle (Ctr) diente ein Maus-IgG Antikörper. Angegeben sind der prozentuale Anteil NK1.1⁺CD45⁺ NK-Zellen bezogen auf alle CD45⁺ Zellen.

Nach Etablierung des Depletionsregimes wurden die Mäuse über eine Woche mit ATII behandelt und die Auswirkungen der NK1.1-Zelldepletion auf die Gefäßfunktion mittels isometrischen Spannungsstudien von Aortenringen im Organbad untersucht.

NK1.1⁺ Zell-depletierte Mäuse waren stark geschützt vor der Ausbildung einer vaskulären Dysfunktion. Die maximale Relaxation in Antwort auf ACh betrug für sham infundierte NK1.1⁺ Zell-depletierte Mäuse $73 \pm 1,7\%$ und mit ATII Behandlung $53 \pm 3,8\%$, während sich die Relaxation bei C57BL/6 Mäusen signifikant von $69 \pm 3,9\%$ auf $33 \pm 5,5\%$ durch ATII Behandlung verschlechterte (Abbildung 3-9, A).

Auch die Relaxation auf GTN (Abbildung 3-9, B) war signifikant verbessert von Aorten NK1.1⁺ Zell-depletierter Tiere:

C57BL/6 $87 \pm 1,8\%$; C57BL/6 +ATII $56 \pm 4,2\%$; C57BL/6 +anti-NK1.1 $89 \pm 1,4\%$ und C57BL/6 +anti-NK1.1 +ATII $69 \pm 3,8\%$.

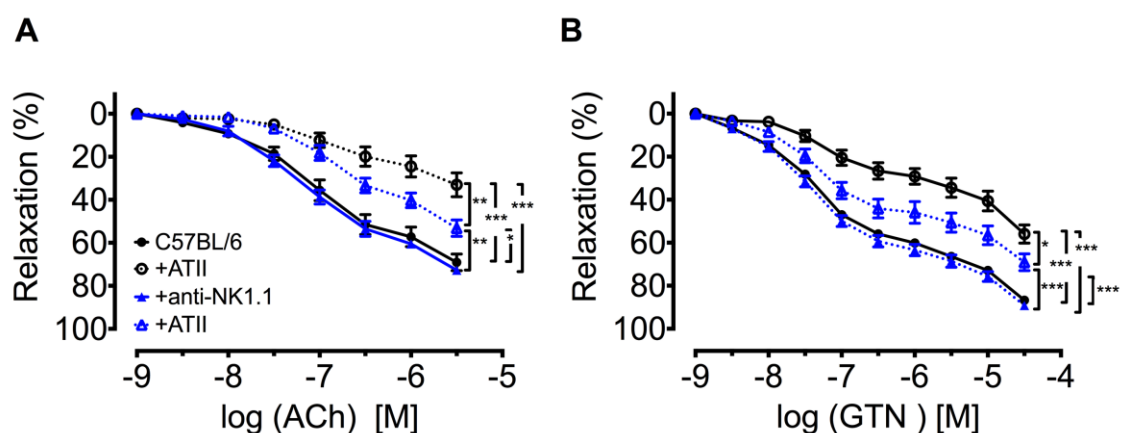


Abbildung 3-9: NK-Zell-depletierte Mäuse sind partiell geschützt vor der Entwicklung einer endothelialen und glattmuskulären Dysfunktion. Isometrische Spannungsstudien an isolierten Aortensegmenten von C57BL/6 (schwarze Kurven) \pm anti-NK1.1 (blaue Kurven) \pm ATII Mäusen. Dargestellt ist die prozentuale Relaxation isolierter Aortenringe auf Acetylcholin- (ACh, A) oder Glyceroltrinitratgabe (GTN, B). N=14-16; ordinäre One-way ANOVA der maximalen Relaxation, Bonferroni's multiple comparison Test; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig eine essentielle Rolle von NK-Zellen in der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion.

3.2.4 Wechselseitige Aktivierung von NK1.1⁺ NK-Zellen und Monozyten/Makrophagen

IFN- γ ist ein potenter Monozytenaktivator. Wie bereits durch die Untersuchungen an Monozyten-depletierten Mäusen festgestellt, spielen Monozyten in der Pathogenese der Angiotensin II-getriebenen vaskulären Dysfunktion eine wichtige Rolle. Aufgrund der bereits geschilderten Beobachtung, dass nach ATII Behandlung auch weniger Monozyten in Aorten IFN- γ defizienter Mäuse infiltrierten und den bekannten aktivierenden Eigenschaften von IFN- γ , erschloss sich die Hypothese, dass die beobachteten Effekte bei IFN- γ Defizienz mit der Monozytenrekrutierung in Zusammenhang stehen könnten. IL-12 ist als Aktivator von NK-Zellen beschrieben. Es wird der Literatur nach in einem T-bet abhängigen Mechanismus von Monozyten/Makrophagen produziert und führt so zu der Reifung von NK-Zellen in einen Effektorphänotyp [279].

Aufgrund dessen wurde die Expression des Cyokins in der Gefäßwand analysiert. Die Analyse von Aortenlysaten zeigte (Abbildung 3-10, A) eine signifikante Zunahme der IL-12p40 mRNA Expression in C57BL/6 Mäusen nach ATII Infusion, während keine signifikante ATII-induzierte Expressionserhöhung in IFN- γ defizienten Tbx21^{-/-} Mäusen detektiert werden konnte.

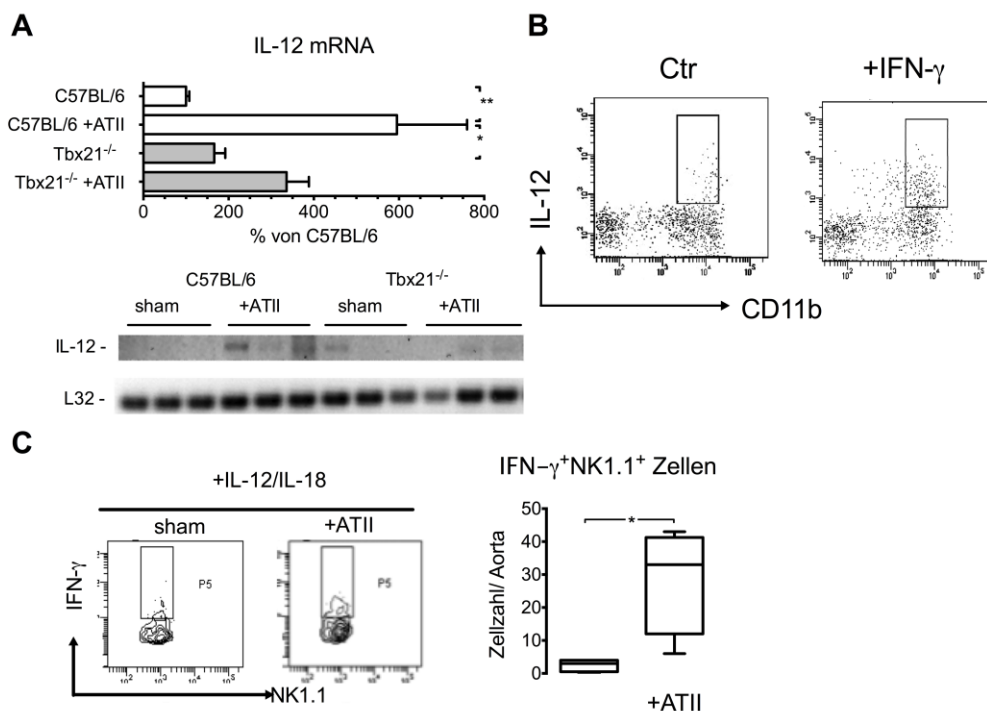


Abbildung 3-10: IFN- γ -abhängige IL-12 Produktion durch CD11b⁺ Zellen im Gefäß. mRNA Expressionsanalyse von IL-12 und IFN- γ ^{-/-} in Aortenlysaten von C57BL/6 und Tbx21^{-/-} Tieren \pm ATII. A, mRNA Expression von IL-12 in Aortenlysaten. Oben, densitometrische Auswertung mit Normalisierung der IL12-p40 Expression auf L32 (Haushaltsgen). Unten, Auftrennung IL-12p40 und L32 PCR-Produkte mittels eines Agarosegels; n=3-5; One-way ANOVA, Kruskal-Wallis, Bonferroni's multiple comparison Test. B, Durchflusszytometrische Analyse der IL-12 Formation von CD11b⁺ myelomonozytären Zellen in der Aorta von C57BL/6 Mäusen mit und ohne IFN- γ *in vitro* Stimulation. Repräsentative Punkt-Wolken-Diagramme. C, Durchflusszytometrische Analyse der IFN- γ Produktion NK1.1⁺ NK-Zellen in Aortengewebe von sham oder ATII-behandelten C57BL/6 Mäusen. Links, Repräsentative Konturdiagramme von IL-12/IL-18 stimulierten Aortenlysaten. Rechts, Quantifizierung; n=4-5; t-Test (Wilcoxon-matches pairs Test); ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05.

Ferner bestätigte die durchflusszytometrische Analyse von Wildtyp Mausearten, dass die Expression von IL-12 auf CD11b⁺ myelomonozytäre Zellen beschränkt und zur Detektion die Stimulation durch IFN- γ *in vitro* unabdingbar war (Abbildung 3-10, B).

Ebenso war der Nachweis der IFN- γ -Produktion durch NK1.1⁺ NK-Zellen ausschließlich mittels *in vitro* Stimulation mit IL-12/IL-18 möglich und dies nur wenn die Tiere bereits *in vivo* mit ATII behandelt wurden (Abbildung 3-10, C).

Basierend auf diesen Daten könnte es zu einer gegenseitigen Aktivierung von NK-Zellen und Monozyten im Gefäß über IL-12 und IFN- γ kommen, was in der Folge zu einer ATII-bedingten steigenden Inflammation und Endorganschädigung führen könnte.

3.2.5 T-bet abhängige Aktivität von Monozyten/Makrophagen

In Transferexperimenten mit T-bet⁺ Monozyten oder T-bet⁺ NK-Zellen in Tbx21^{-/-} Mäuse konnte der Phänoyp der vaskulären Dysfunktion nicht wiederhergestellt werden (Abbildung 3-11). Es zeigte sich nach ATII Infusion keine Veränderung der vaskulären Relaxationsfähigkeit weder auf ACh (A, C) noch GTN (B, D) zwischen mit T-bet⁺ Monozyten oder mit T-bet⁺ NK-Zellen transferierten Tbx21^{-/-} Mäusen und sham behandelten Tbx21^{-/-} Kontrollen. Auch die reaktive Sauerstoffspezies-Produktion im Aortengewebe, gemessen durch DHE Färbung, war nicht signifikant verschieden zwischen den Gruppen (E,F).

Dies deutet darauf hin, dass die T-bet Expression in verschiedenen Leukozytenpopulationen mechanistisch wichtig ist.

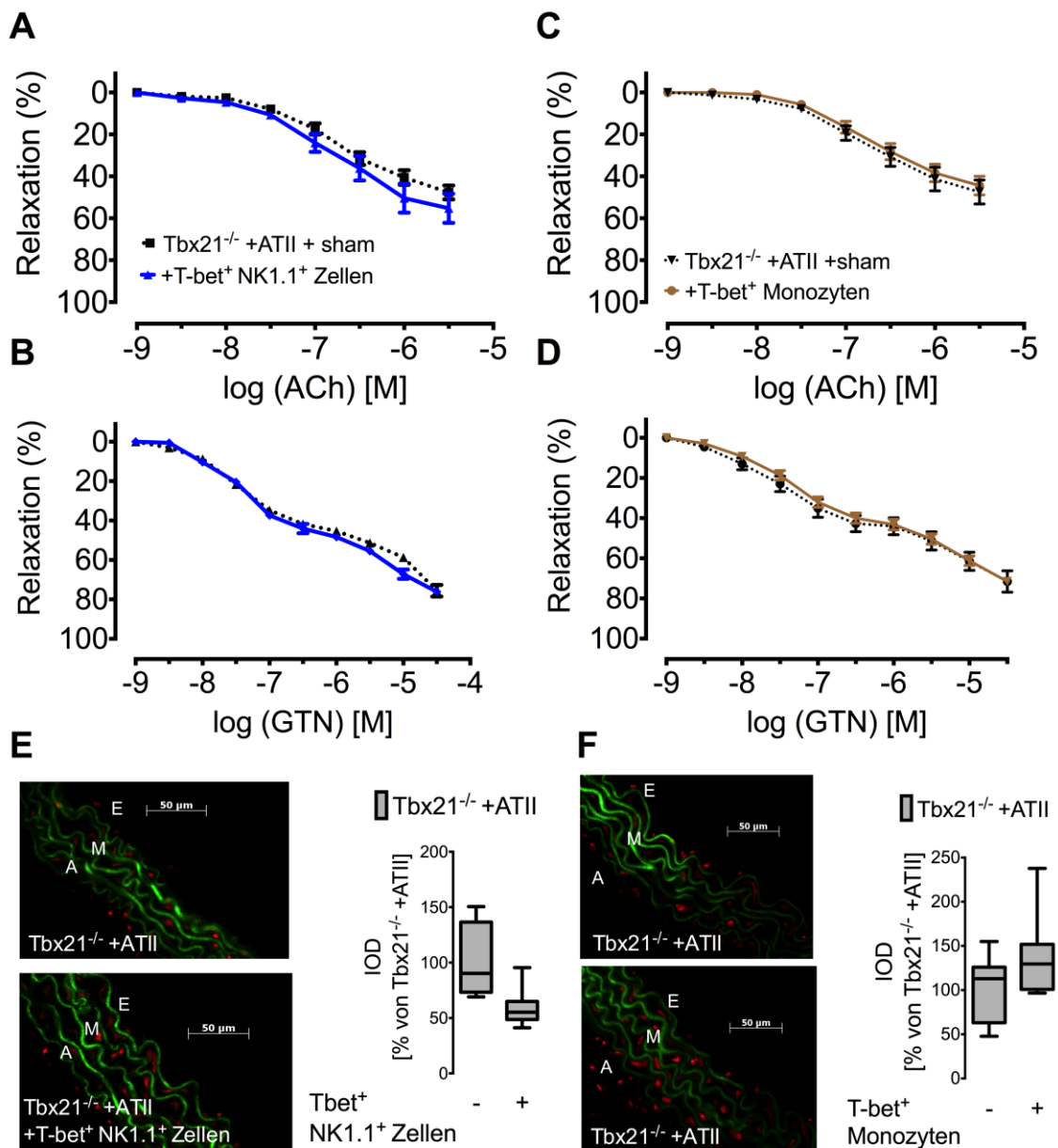


Abbildung 3-11: Weder die Rekonstitution von Angiotensin II-behandelten Tbx21^{-/-} Mäusen mit T-bet⁺NK1.1⁺ Zellen noch mit T-bet⁺ Monozyten führt zu einer Wiederverschlechterung der vaskulären Funktion oder der reaktiven Sauerstoffspezies-Level. Dargestellt sind Dosis-Wirkungskurven auf den endothelabhängigen Vasodilator Acetylcholin (ACh, A, C) und den endothelunabhängigen Vasodilator Glyceroltrinitrat (GTN, B, D) von isolierten Aortenringen von ATII-infundierten Tbx21^{-/-} Mäusen rekonstituiert mit T-bet positiven NK1.1⁺ Zellen (blaue Kurven, n=4-8) oder Monozyten (braune Kurven, n=9-12) bzw. sham (schwarze Kurven, 7-18) behandelt. E, F, DHE Färbung von Aortenkryoschnitten. Links, Repräsentative Fluoreszenz-Mikrotopographie Aufnahmen. Superoxid erscheint in rot, Autofluoreszenz der Laminae in grün. A, Adventitia, E, Endothel und M, Media. Rechts, Quantifizierung; n=3 unabhängige Experimente. Mann-Whitney U t-Test, Bonferroni's multiple comparison Test. ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05.

Um die Rolle von T-bet im Rahmen der vaskulären Dysfunktion in Monozyten genauer zu überprüfen, wurden erneut Monozyten-Rekonstitutionsversuche mit Monozyten-depletierten LysM^{DTR} +DTX+ATII Tieren durchgeführt.

Monozyten-depletierte und ATII-infundierte LysM^{DTR} Mäuse wurden entweder mit Monozyten aus Wildtyp oder $\text{Tbx21}^{-/-}$ Mäusen rekonstituiert und nach einwöchiger ATII Behandlung die vaskuläre Funktion sowie oxidative Stresslevel im Gefäß bestimmt.

Wie die Konzentrations-Relaxationskurven zeigen (Abbildung 3-12), führte die Rekonstitution von LysM^{DTR} Tieren mit T-bet⁺ Wildtyp Monozyten, nicht aber mit T-bet⁻ Monozyten zu einer signifikanten Verschlechterung der vaskulären Funktion. Die maximale Relaxation auf Acetylcholin (A) betrug für LysM^{DTR} +DTX+ATII+T-bet⁺ Monozyten Mäuse $34 \pm 3,3\%$, während Puffer behandelte Tiere eine maximale Relaxation von $55 \pm 4,1\%$ und mit T-bet⁻ Monozyten behandelte Tiere eine maximale Relaxation von $54 \pm 8,0\%$ aufwiesen. Ein ähnliches Relaxationsverhalten zeigte sich auch in Antwort auf Glyceroltrinitrat (B): LysM^{DTR} +DTX+ATII+T-bet⁺ Monozyten $54 \pm 5,6\%$; LysM^{DTR} +DTX+ATII+Puffer $76 \pm 3,6\%$; T-bet⁻ Monozyten $77 \pm 3,9\%$.

Die Daten der Rekonstitution mit T-bet⁺ Wildtyp Monozyten (blaue Kurve) sind Bestandteil der medizinischen Dissertation von Jan Stratmann (Labor für Molekulare Kardiologie, II. Med., Unimedizin Mainz, 2014) und nur zur Veranschaulichung des Effektes gezeigt.

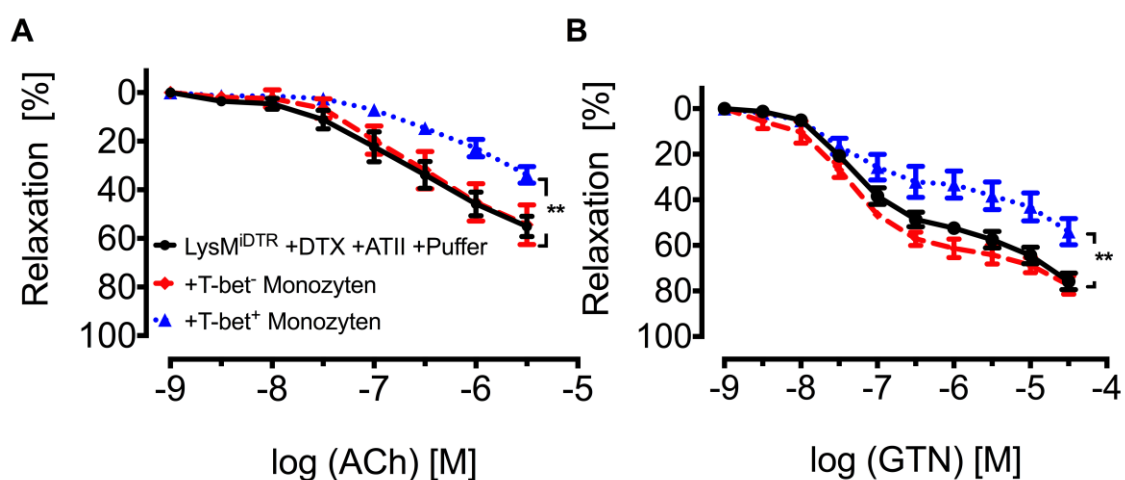


Abbildung 3-12: Adoptiver Transfer von T-bet⁻ Monozyten in Monozyten-depletierte LysM^{DTR} Mäuse kann die vaskuläre Dysfunktion nicht wiederherstellen. Isometrische Tonusstudien von LysM^{DTR} +DTX+ATII Tieren, die entweder mit T-bet⁺ (blaue Kurven, n=9), T-bet⁻ (rote Kurven, n=4) Monozyten oder Puffer (schwarze Kurven, n=13) behandelt wurden. Relaxation auf ACh (A, endothelabhängig) oder GTN (B, endothelunabhängig); n=4-14; One-way ANOVA der maximale Relaxation, Dunn's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05.

Die Daten legen nahe, dass T-bet auch in Monozyten eine regulatorische Rolle spielt und zur Kompetenz der Zellen beiträgt inflammatorische, oxidativen Stress involvierende, Kaskaden auszulösen, die die vaskuläre Funktion beeinflussen.

Einhergehend damit war die ATII-induzierte Infiltration in Aorten von Monozyten-depletierten $\text{LysM}^{\text{iDTR}}$ +DTX Tieren mit $\text{IFN-}\gamma$ produzierenden NK-Zellen beeinträchtigt im Vergleich zu LysM Kontrollen (Abbildung 3-13).

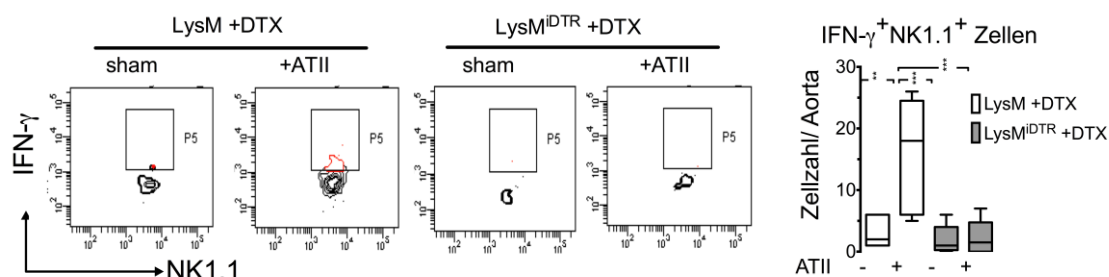


Abbildung 3-13 Die Abwesenheit von Monozyten führt zu einer reduzierten Infiltration $\text{IFN-}\gamma$ kompetenter NK1.1^+ Zellen in die Aortenwände ATII-behandelter Mäuse. C57BL/6, $\text{Tbx21}^{-/-}$ und $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Mäuse wurden für sieben Tage mit ATII behandelt. Durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD45 und NK1.1 konnten infiltrierte Immunzellen und NK-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie detektiert werden. A, Repräsentative Konturplots der $\text{IFN-}\gamma$ Produktion von NK-Zellen in der Aortenwand nach *ex vivo* Restimulation mit IL-12 (20 ng/ml) und IL-18 (20 ng/ml) für 4-5 Stunden. B, Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung; $n=5-8$; One-way ANOVA, Dunn's multiple comparison Test; ***, $p<0,001$; **, $p<0,01$; *, $p<0,05$.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Monozyten aktivierend auf NK-Zellen wirken und es nur durch das Zusammenspiel beider Population und wechselseitiger Aktivierung dieser -über IL-12 und $\text{IFN-}\gamma$ - zu einer ausgeprägten Gefäßinfiltration mit Leukozyten in Antwort auf ATII kommt.

3.3 Die Auswirkungen der Defizienz von MyD88 auf die Angiotensin II-induzierte vaskuläre Dysfunktion, arterielle Hypertonie und Inflammation

Der dritte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle von MyD88 in der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion und Hypertonie.

MyD88^{-/-} Mäuse wurden in allen folgenden Experimenten für sieben Tage mit 1 mg/kg/d ATII behandelt und im Anschluss die vaskuläre Funktion sowie Inflammations- und oxidative Stressparameter bestimmt.

3.3.1 Protektiver Effekt der MyD88 Defizienz auf die Angiotensin II-getriebene vaskuläre Dysfunktion und arteriellen Hypertonie

ATII führte in C57BL/6 Kontrollmäusen zur Entwicklung einer endothelialen und vaskulären Dysfunktion, ausgedrückt durch eine Abnahme der maximalen Relaxation auf ACh von 85±1,9% auf 72±2,8% und auf GTN von 66,24±1,5% auf 38,48±4,2%. Im Gegensatz dazu verschlechterte sich die Relaxationsfähigkeit nach *in vivo* ATII Behandlung in Aorten von MyD88^{-/-} Mäusen kaum (ACh: MyD88^{-/-} maximale Relaxation 82±1,4% und MyD88^{-/-} +ATII maximale Relaxation 72±2,4%; GTN: MyD88^{-/-} maximale Relaxation 74±3,5% und MyD88^{-/-} +ATII maximale Relaxation 63±4,5%).

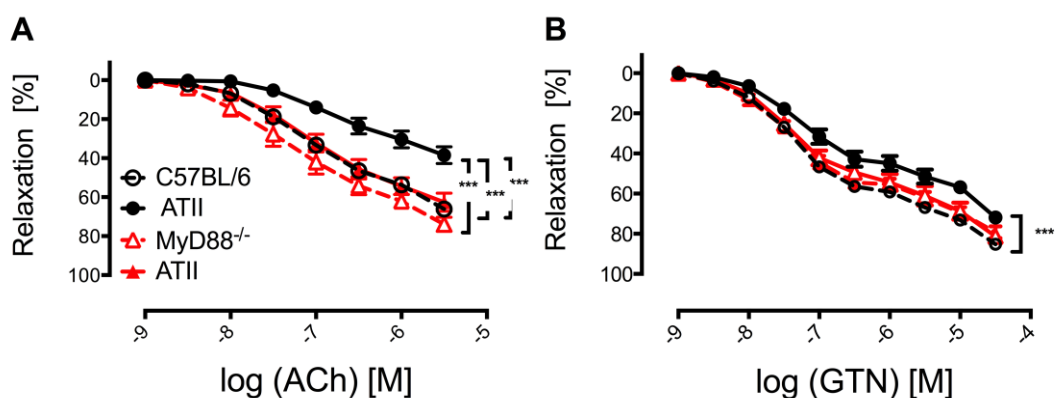


Abbildung 3-14: Protektion vor der Entwicklung einer endothelialen und glattmuskulären vaskulären Dysfunktion durch MyD88 Defizienz. A, Endothelabhängige Vasorelaxation auf Acetylcholin (ACh) und B, endothelunabhängige Vasorelaxation auf Glyceroltrinitrat (GTN) der Aorten von MyD88^{-/-} (rote Kurven) vs. C57BL/6 (schwarze Kurven) in Abhängigkeit von *in vivo* ATII Behandlung; n=11-16; ordinäre One-way ANOVA der maximale Relaxation, Bonferroni's multiple Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05.

Basierend auf diesem Befund wurde mittels telemetrischer Blutdruckmessung ebenso untersucht, ob der Knockout von MyD88 einen protektiven Einfluss auf die ATII-

induzierte Hypertonie hat. In Abbildung 3-15 ist der systolische Blutdruck über einen Zeitraum von zwei Wochen dargestellt. Nach einer Woche erfolgte der Start der ATII Infusion. Aufgrund von einer unvollständigen Datenlage in der C57BL/6 Kontrollgruppe (n=1) wurden bereits veröffentlichte Blutdruckverlaufsdatsätze von drei analog zu diesem Experiment behandelten C57BL/6 Kontrollmäusen mit in die dargestellte Auswertung einbezogen, um den gewöhnlichen Blutdruckanstieg von Wildtyp Tieren besser zu veranschaulichen. Die Originaldaten, die im Rahmen dieser Arbeit erfasst wurden (mit n=einem Tier in der Kontrollgruppe), sind im Anhang abgebildet (Anhang Abbildung 1 und Tabelle 13). Beim Vergleich des basalen Blutdrucks (nach 168 h) mit den Blutdruckwerten nach der anschließenden 7-tägigen ATII Infusion (nach 336 h) reagierten C57BL/6-Mäuse auf ATII mit einem Anstieg des systolischen Blutdrucks von basal $119,8 \pm 0,54$ mmHg auf $158,8 \pm 3,51$ mmHg (Mittelung Werte der letzten 72 h), während der Anstieg ausgehend vom einem ähnlichen, leicht niedrigerem basalen Blutdruck ($109,5 \pm 0,80$ mmHg) bei $MyD88^{-/-}$ signifikant auf nur $131,4 \pm 0,78$ mmHg reduziert war (Mittelung Werte der letzten 72 h). Der Blutdruckanstieg war demnach um ein Drittel geringer bei $MyD88^{-/-}$ Mäusen.

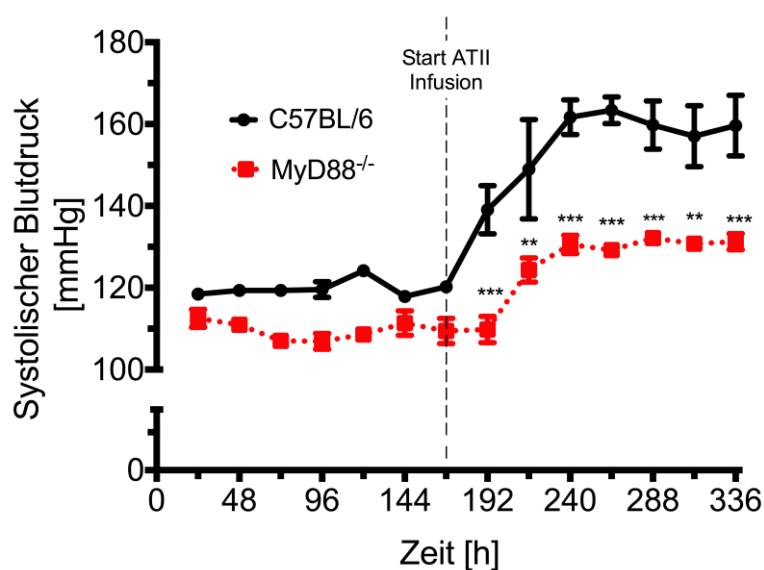


Abbildung 3-15: $MyD88^{-/-}$ Mäuse sind partiell vor der Ausbildung einer arteriellen Hypertonie geschützt. Der systolische arterielle Blutdruck von $MyD88^{-/-}$ Mäusen (rote Kurven) im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen (schwarze Kurven) wurde telemetrisch mit Hilfe von Carotis-Kathetern über einen Zeitraum von 336 h erfasst. Mittelung der Einzelwerte über $24h \pm SEM$; n=3-4; T-Test mit Mann-Whitney U-Test (Mittelung Einzelwerte der letzten 72 h) und Two-way ANOVA (Einzelwerte), Bonferroni's multiple comparison Test; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

Einhergehend mit der Reduktion im systolischen Blutdruck und der verbesserten Vasoreaktivität zeigten $MyD88^{-/-}$ Mäuse auch verminderte oxidative Stresslevel in

Antwort auf ATII. Die Dihydroethidium-Färbung von Aortenkyroschnitten zeigte in Kontrollmäusen eine annähernde Verdopplung der die Superoxidlevel widerspiegelnden Fluoreszenzintensität. Ausgehend von einem basal ähnlichen Level in den Aorten unbehandelter Mäuse führte ATII in Aorten von *MyD88*^{-/-} Mäusen zu keinem Anstieg der Superoxid-Spiegel.

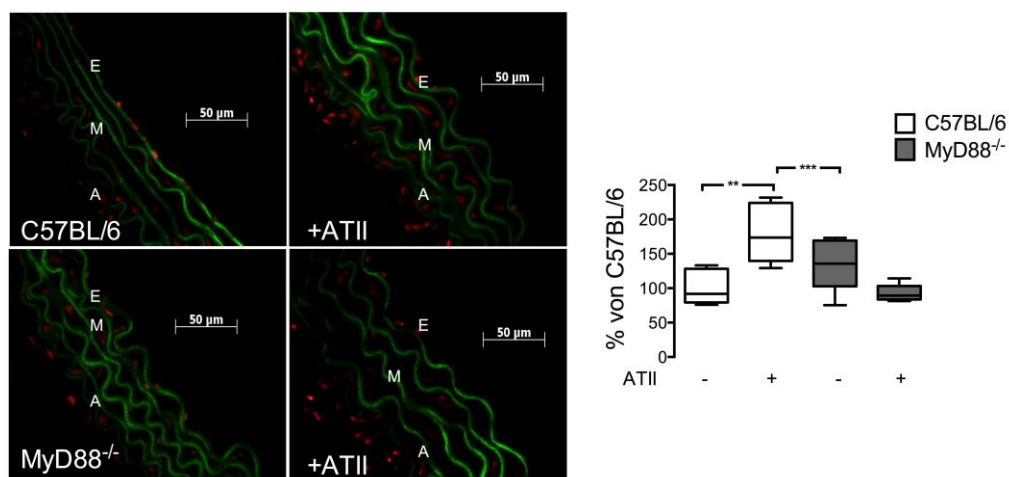


Abbildung 3-16. ATII-induzierte ROS-Bildung in der arteriellen Gefäßwand ist abhängig von MyD88. Aortenkyroschnitte von sham oder ATII-infundierten C57BL/6 oder *MyD88*^{-/-} Mäusen wurden mittels DHE gefärbt. Links, Repräsentative Originalabbildung von mit Dihydroxyethidium gefärbten Kryoschnitten der Aorta. Rot, Durch Superoxid oxidiertes DHE; grün, Autofluoreszenz der *Lamina elastica*. E, Endothel, M, Media, A, Adventitia. Rechts, Densitometrische Analyse. One-way ANOVA, Kruskal-Wallis Test, Bonferroni's multiple comparison Test; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

Zusammenfassend zeigten Mäuse defizient für MyD88 eine reduzierte Sauerstoffspezies-Produktion, korrespondierend zu einer verbesserten vaskulären Funktion und einem verminderten Blutdruckanstieg in Antwort auf ATII.

Im Folgenden wurden auch die Auswirkungen der Defizienz in MyD88 auf die Gefäßinflammation getestet.

3.3.2 Die Angiotensin II-abhängige Inflammation des Gefäßes ist abhängig von MyD88

Mittels qRT-PCR und Western Blot wurde die Expression von Inflammations- und oxidativen Stressmarkern im Gefäß auf mRNA und Proteinebene untersucht.

Dabei wurde die mRNA Expression von Nox2, als wichtigste Quelle für oxidativen Stress, der eNOS sowie des *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), involviert in die Leukozyteninfiltration, und die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS)

bestimmt. Außerdem wurde die mRNA Expression von proinflammatorischen Cytokinen, die vor allem mit Monozyten/Makrophagen assoziiert werden, wie IL-12, TNF- α , IL-1 β und CD68 als Makrophagenmarker analysiert. Abbildung 3-17 zeigt das Ergebniss der Expressionsanalysen.

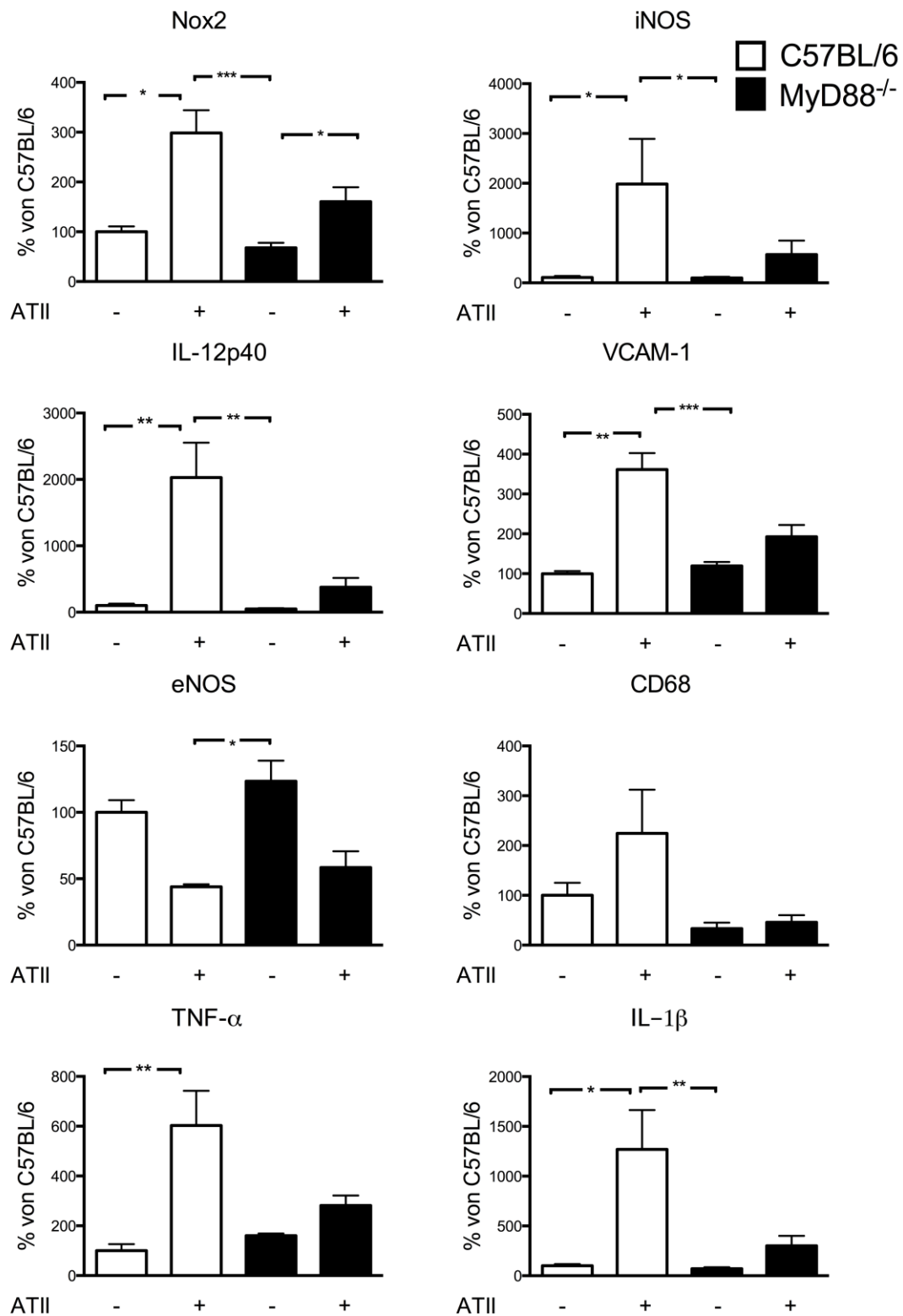


Abbildung 3-17: MyD88 Knockout Mäuse zeigen eine Reduktion in der mRNA Expression von Inflammations- und oxidativen Stress-Markern. Die Diagramme zeigen die qRT-PCR basierte Messung der mRNA Expression der Inflammationsmarker Nox2 (n=12), VCAM-1 (n=12), iNOS (n=10-12), IL-12p40 (n=5-6), eNOS (n=4), CD68 (n=11-12), TNF- α (n=5-6) und IL-1 β (n=5-6) in Aorten von MyD88^{-/-} \pm ATII und C57BL/6 \pm ATII Mäusen. Mittelwerte \pm SEM, angegeben als % der C57BL/6 Kontrolle; n=4-12; One-way ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05.

Während die ATII Behandlung in Wildtyp Aorten zu einem signifikanten Anstieg der mRNA Expression von VCAM-1, iNOS und IL-12p40 führte, zeigten MyD88^{-/-} Mäuse keinen signifikanten Anstieg der Expression dieser Marker nach ATII Infusion. Die Expression von Nox2 war zwar signifikant verdoppelt in MyD88^{-/-} Mäusen, doch der Anstieg im Vergleich zum Wildtyp, bei dem sich die Expression verdreifachte, deutlich geringer. Ebenso zeigten MyD88^{-/-} Mäuse keine gesteigerte mRNA Expression von TNF- α , IL-1 β sowie CD68 in Aortengewebe, während C57BL/6 Mäuse eine zunehmende mRNA Expression dieser Inflammationsmarker aufwiesen. Es zeigten sich keine Expressionsunterschiede der eNOS mRNA im Vergleich zur Kontrolle. ATII führte sowohl in Wildtyp als auch in Knockout Aorten zu einer Herunterregulation der eNOS mRNA Expression.

Diese Ergebnisse wurden durch Proteinexpressionsanalysen der oxidativen Stressmarker, Nox2 und Nox1 sowie HO-1 bestätigt (Abbildung 3-18). ATII führte in C57BL/6 Mäusen zur Hochregulation der Proteinexpression von Nox2 (A), Nox1 (B) sowie HO-1 (C) gemessen durch Immunoblot. Der Anstieg war in MyD88^{-/-} Tieren reduziert (Abbildung 3-18).

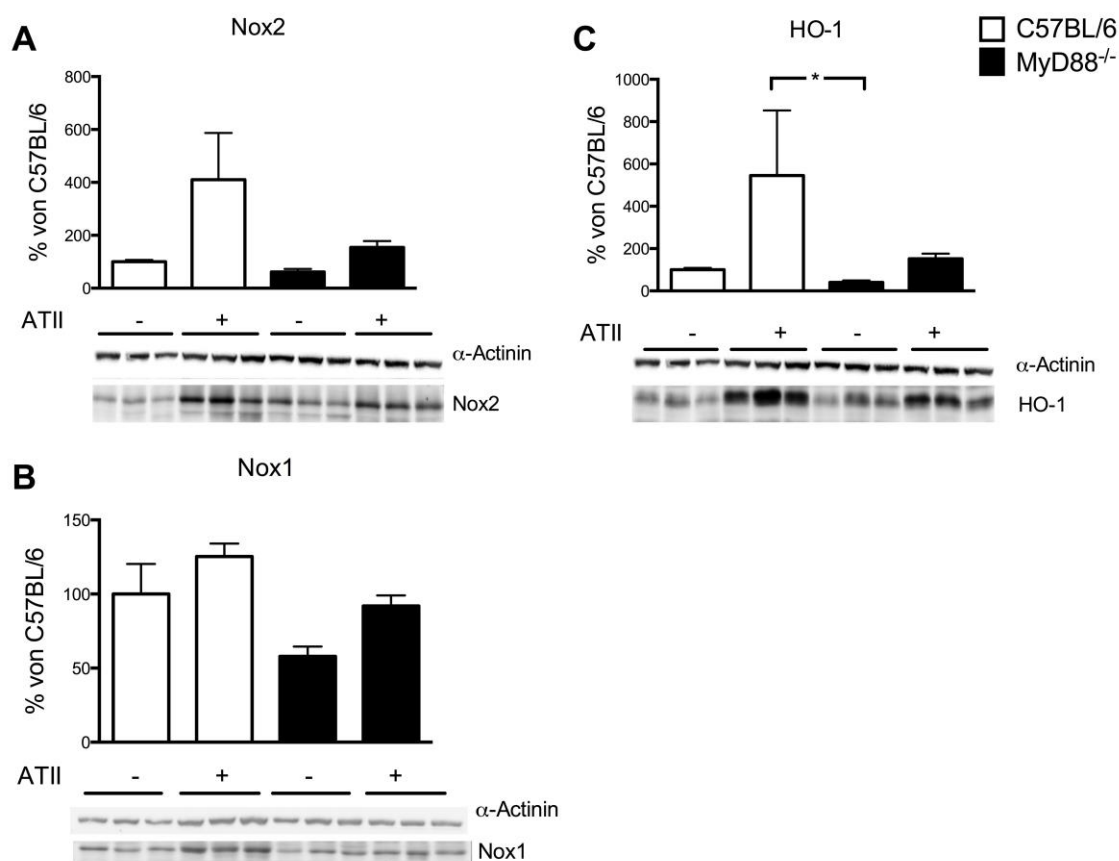


Abbildung 3-18: Reduktion des ATII-induzierten Anstiegs der Proteinexpression von oxidativen Stressmarkern durch MyD88 Knockout. Western Blot Analyse der Nox2 (A), Nox1 (B) und HO-1 (C) Expression in Aortenhomogenaten von MyD88^{-/-} und C57BL/6 Mäusen \pm ATII. Original Blots sind gezeigt unter der densitometrischen Quantifizierung von drei Tieren pro Gruppe. N=3, One-way ANOVA; Kruskal-Wallis Test, Dunn's multiple comparison Test; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

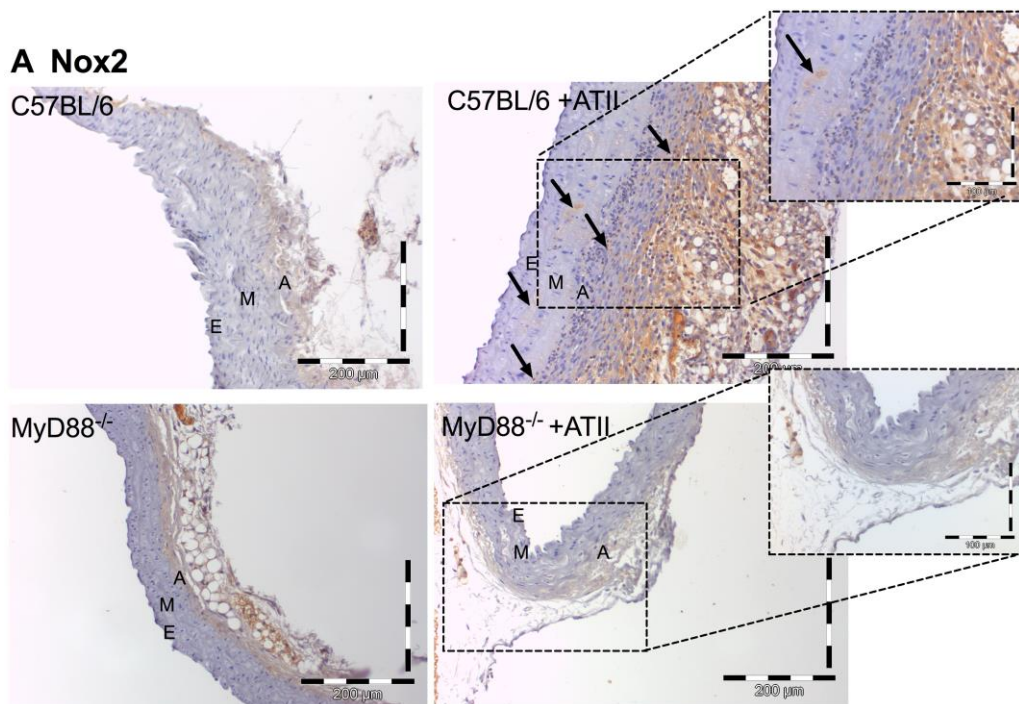
Aus den beschriebenen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass MyD88 essentiell in die ATII-induzierte Entstehung von oxidativen Stress und Inflammation involviert ist. Die Abnahme der CD68 Expression sowie von IL-12p40, das wie bereits in dieser Arbeit aufgezeigt, in die NK-Zellaktivierung involviert ist (Abbildung 3-10), lässt auf eine Beteiligung von MyD88 in der Aktivierung von Monozyten schließen.

Daher wurde die Makrophageninfiltration ins Gefäß mit Antikörpern gegen CD68 und F4/80 sowie Nox2 als Phagozyten- und oxidativer Stressmarker immunhistochemisch analysiert.

In Abbildung 3-19 ist die immunhistologische Färbung (IHC) von Paraffinschnitten der Aorten sham und ATII-infundierter C57BL/6 und MyD88^{-/-} Mäuse zu sehen. Die Hämatoxylin-Gegenfärbung zeigt die Zellkerne in blau und die braunen Verfärbungen zeigen eine positive Reaktion des jeweiligen spezifischen Antikörpers an.

In sham behandelten C57BL/6 und MyD88^{-/-} Mäusen waren Nox2⁺ (A) Phagozyten sowie CD68⁺ (B) oder F4/80⁺ (C) Makrophagen nur vereinzelt nachweisbar. Durch *in vivo* ATII Applikation zeigten C57BL/6 Wildtyp Mäuse jedoch eine gesteigerte Akkumulation von Nox2⁺, CD68⁺ sowie F4/80⁺ Zellen im Gefäß, insbesondere in der Adventitia Region, aber auch im Endothel, während MyD88^{-/-} Mäuse demgegenüber kaum ein gesteigertes Vorkommen von Nox2⁺, CD68⁺ sowie F4/80⁺ Zellen in der Aortenwand aufwiesen.

Die Ergebnisse korrespondieren demnach mit denen der qRT-PCRs und der Western Blots.



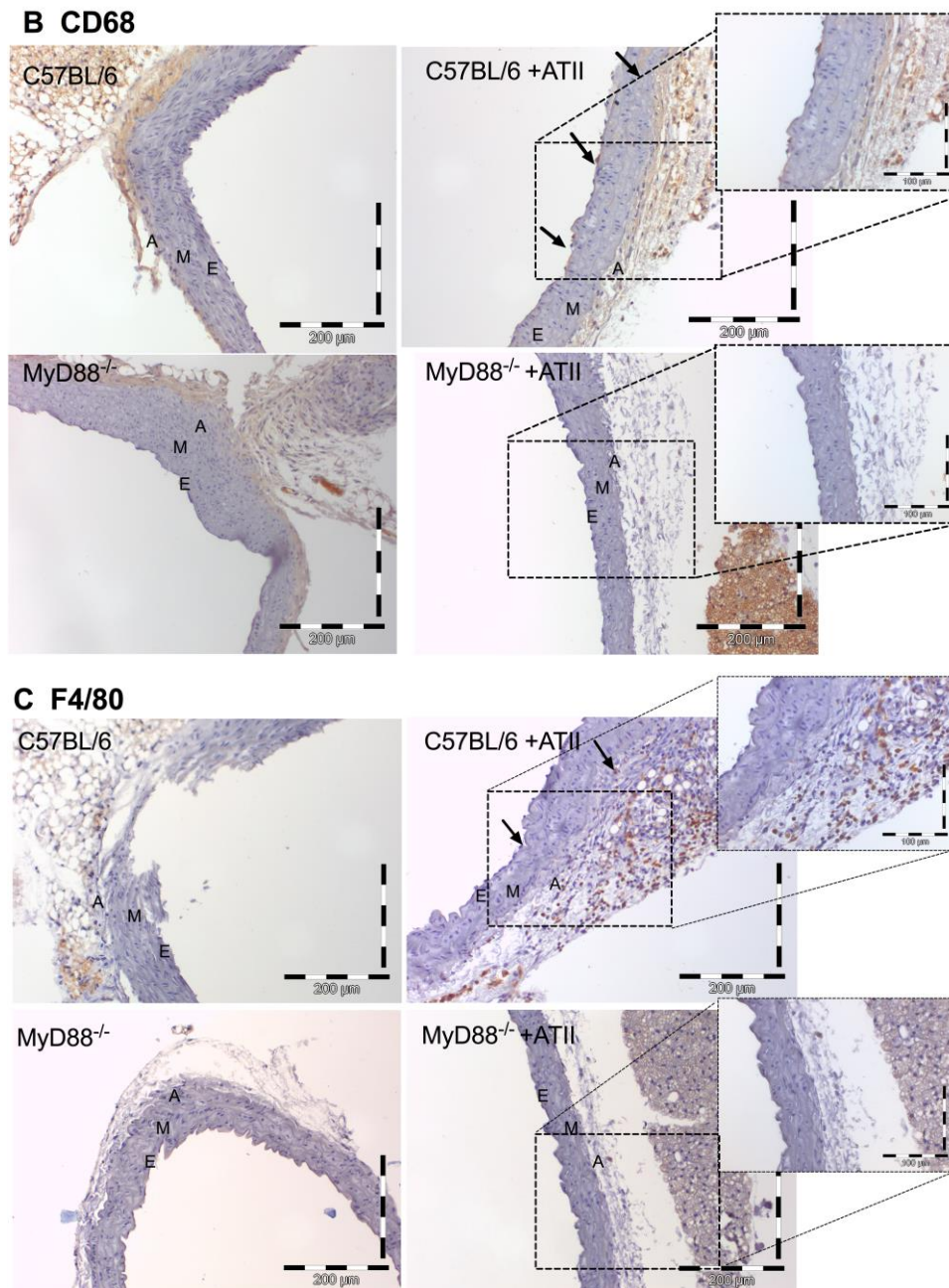


Abbildung 3-19: MyD88 Defizienz führt zur Reduktion der Anzahl an Nox2⁺, CD68⁺ und F4/80⁺ Phagozyten in Aorten ATII-infundierter Mäuse. Immunhistochemischer Nachweis von Nox2 (A), CD68 (B) und F4/80 (C) positiven Zellen in Paraformaldehyd (4%) fixierten, in Paraffin eingebetteten Aortensegmenten von sham oder ATII-infundierten MyD88^{-/-} und C57BL/6 Mäusen. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen; blau eingefärbt wurden die Zellkerne durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin, braun gefärbt sind die spezifischen Antikörperbindungen. A Adventitia, M, Media, E Endothel. 20fache Vergrößerung. Für die ATII-infundierten Gruppen ist jeweils noch ein kleiner Ausschnitt des Aortenschnittes in 40facher Vergrößerung dargestellt. Die Pfeile verdeutlichen Regionen mit positiver Antikörperbindung.

Um im nächsten Schritt die Infiltration mit Monozyten und anderen Leukozytensubpopulationen im Detail zu analysieren und zu quantifizieren wurde eine durchflusszytometrische Analyse von Aortengewebe durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-20 dargestellt.

Parallel zu der Analyse der Gewebeschnitte mittels IHC und den mRNA- und Protein-Expressionsdaten, zeigte die durchflusszytometrische Analyse keine signifikant erhöhte Anzahl an CD45⁺ Leukozyten in Aorten ATII-infundierter MyD88^{-/-} Mäuse, während sich diese Zahl in C57BL/6 Tieren mehr als vervierfachte. Insbesondere führte ATII Infusion zu einer Infiltration von CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} inflammatorischen Monozyten in die Gefäßwände von Wildtyp Mäusen, was in MyD88 defizienten Mäusen nicht zu beobachten war.

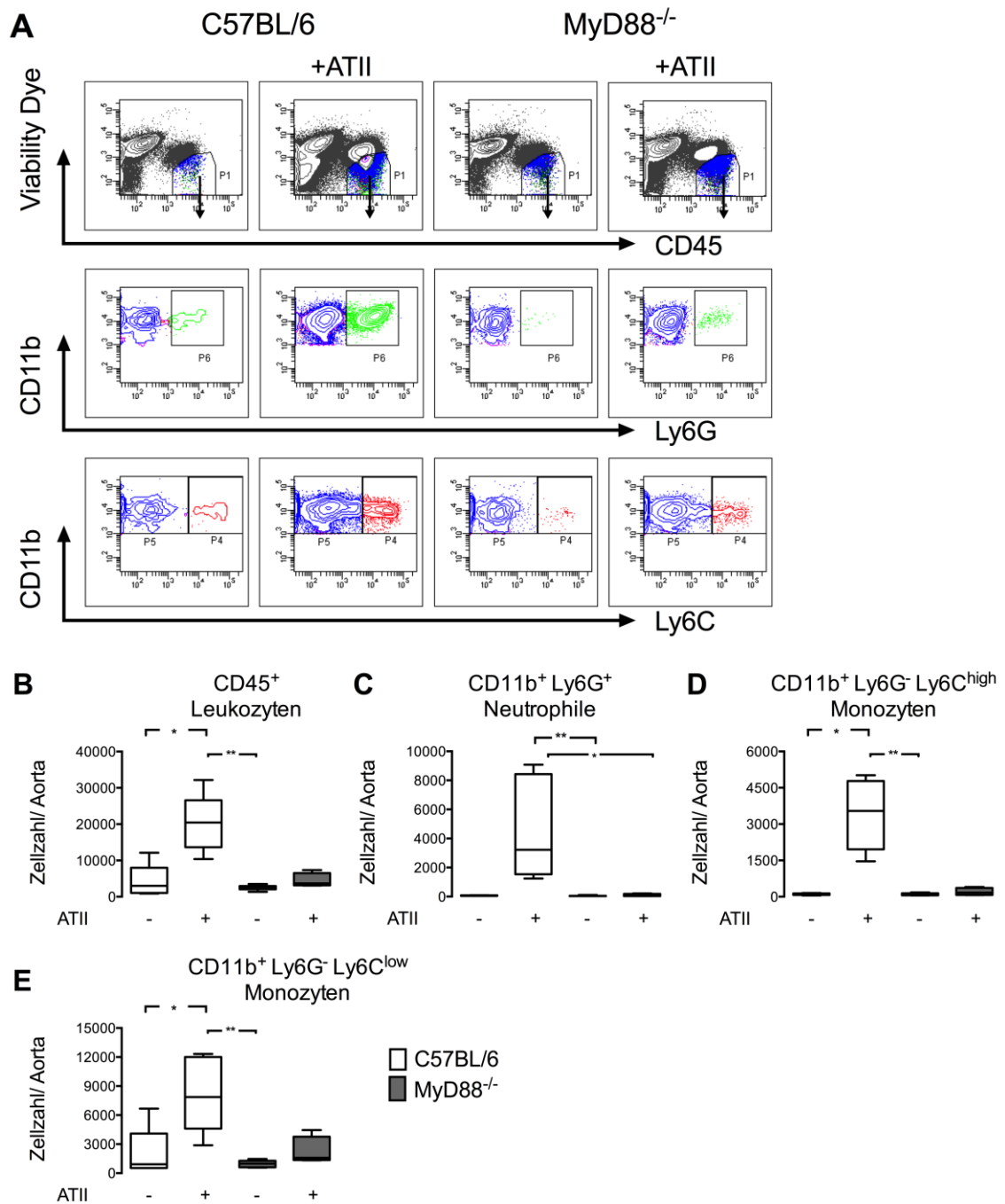


Abbildung 3-20: Reduktion der ATII-induzierten Infiltration des Gefäßes mit Leukozyten in MyD88^{-/-} Mäusen. Durchflusszytometrische Analyse der Infiltration von Leukozyten in die Aorten von sham oder ATII-infundierten C57BL/6 oder MyD88^{-/-} Mäusen. Der Verdau der Aorten erfolgte mit Liberase. Dargestellt sind repräsentative FACS *dot plots* (A) sowie die Quantifizierung pro Aorta (B-E). Gating auf CD45⁺ viable Leukozyten (B) und weitere Differenzierung auf CD11b⁺Ly6G⁺ positive Neutrophile (C), CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{low} nicht-klassische Monozyten (D), sowie CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} inflammatorische Monozyten (E). Tote Zellen wurden mittels Färbung mit Viability Dye ausgeschlossen; n=4-6; ordinäre One-way ANOVA, Bonferoni's multiple comparison test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05.

Zusätzlich wurde die Infiltration von IFN- γ kompetente NK-Zellen in die Aorta überprüft (Abbildung 3-21). MyD88 defiziente Mäuse wiesen eine signifikant verminderte Zahl von NK1.1⁺ NK-Zellen nach Angiotensin II Behandlung auf (Abbildung 3-21, A) und auch die zusätzliche Färbung auf IFN- γ zeigte eine verminderte Zahl an IFN- γ kompetenten NK1.1⁺ Zellen (Abbildung 3-21, B).

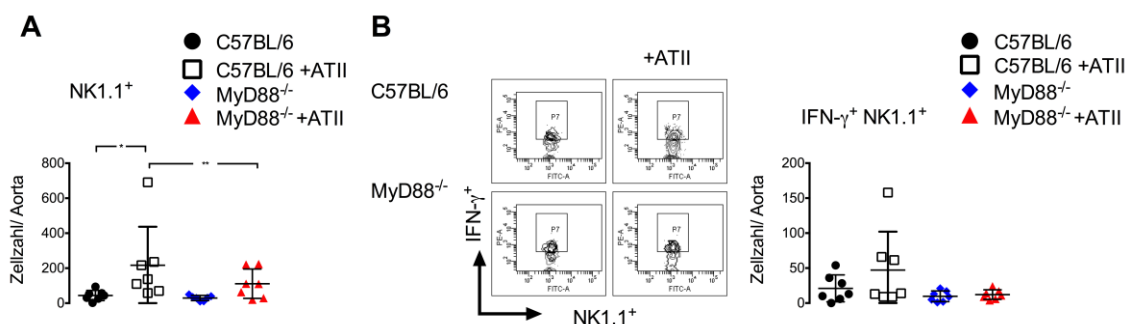


Abbildung 3-21: Nach ATII Infusion zeigen MyD88 defiziente Mäuse eine geringere Infiltration der Aortenwand mit IFN- γ kompetenten NK-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse der NK-Zell-Infiltration in Aorten von sham oder ATII-infundierten C57BL/6 oder MyD88^{-/-} Mäusen. Nach Herstellung der Aorteneinzellsuspensionen mittels Col II/DNase I wurden die Zellen *ex vivo* mit 20 ng/ml IL-12 und 20 ng/ml IL-18 für 4-5 h stimuliert. Anschließend erfolgte die Färbung und durchflusszytometrische Analyse auf CD45, NK1.1 und IFN- γ . A, Zusammenfassende graphische Darstellung und statistische Auswertung der Infiltration mit CD45⁺NK1.1⁺ NK-Zellen. B, Zusätzliche Analyse der IFN- γ Kompetenz der Zellen. Links, Repräsentative Konturplots. Rechts, Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung. Die Symbole repräsentieren jeweils einzelne Versuchstiere; n=7-8; ordinäre One-Way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05.

Basierend auf den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse der Aorten, wurde der Einfluss der MyD88 Defizienz auf die Verteilung von Monozytensubpopulationen mittels mRNA Expressionsanalysen bestimmter Oberflächenmarker in Aortenlysaten und peripheren mononukleären Zellen analysiert (Abbildung 3-22). Proinflammatorische Monozyten wurden als Ly6C^{high}CX₃CR1^{low}CD62L⁺ und nicht nicht-klassische reparativen Monozyten als Ly6C^{low}CX₃CR1^{high}CD62L⁻ definiert (vergleiche 1.7.1.1).

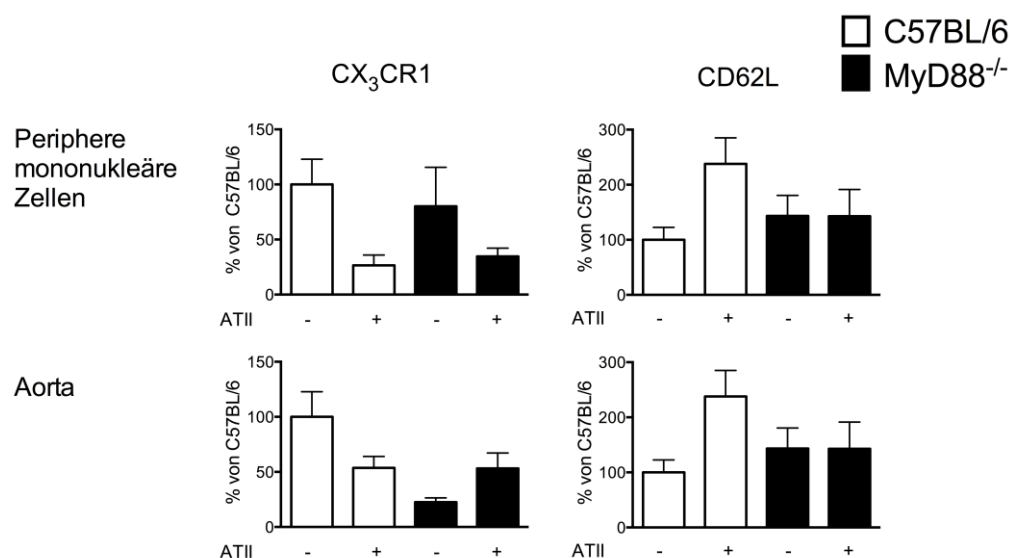


Abbildung 3-22: Die ATII-bedingte Verschiebung der Monozytensubpopulation in Richtung eines proinflammatorischen Phänotyps ist blockiert in MyD88^{-/-} Mäusen. mRNA Expressionsanalyse der Monozytensubpopulationsmarker CD62L und CX₃CR1 in peripheren mononukleären Zellen sowie Aortenlysaten. Monozytäre Zellen wurden mittels eines Histopaque 1.119 - Histopaque 1.077 Gradienten isoliert. Prozentuale Darstellung der Mittelwerte \pm SEM normiert auf C57BL/6 Kontrollmäuse; n= 6-9; One-way ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05.

ATII Infusion führte in C57BL/6 Mäusen zu einer Abnahme der CX₃CR1 und einer Zunahme der CD62L mRNA Expression sowohl in der Aorta als auch in mononukleären Zellen des Blutes. In MyD88^{-/-} Mäusen nahm die CX₃CR1 Expression in der Aorta demgegenüber zu und in peripheren mononukleären Zellen in einem ähnlichen Ausmaß wie bei Wildtyp Tieren ab. Die CD62L Expression blieb sowohl in der Aorta und in mononukleären Zellen des Blutes unverändert durch ATII Infusion.

Gemeinsam mit der Beobachtung der verminderten Infiltration mit CD11b⁺Ly6G⁻ Ly6C^{high} Zellen weisen die Daten auf eine reduzierte Zahl proinflammatorischer Monozyten in MyD88^{-/-} Mäusen hin.

3.3.3 TLR2, TLR7 oder TLR9 Defizienz hat keinen Schutz vor der Angiotensin II-induzierten vaskulären Dysfunktion zur Folge

Die bisherigen Ergebnisse geben keine Auskunft darüber wie Angiotensin II mechanistisch zur Aktivierung des MyD88 Signalwegs führt.

MyD88 stellt ein essentielles Adapterprotein in der Toll-like Rezeptor Signalkaskade dar. Die Beteiligung von TLRs in kardiovaskulären Erkrankungen wurde bereits beschrieben (siehe 1.7.2).

Um der Frage nachzugehen, ob die Angiotensin II Wirkung mit der Aktivierung einer bestimmten TLR Signalkaskade zusammenhängt, wurde in dieser Arbeit getestet, welchen Effekt der Knockout von TLR2, TLR7 oder TLR9 im Angiotensin II Modell auf die vaskuläre Dysfunktion hat. Defiziente Mäuse wurden für eine Woche sham oder ATII infundiert und erneut die vaskuläre Funktion im Vergleich zu C57BL/6 Kontrolltieren mittels isometrischer Spannungsstudien ermittelt.

Wie in Abbildung 3-23 dargestellt, scheint weder der Knockout von TLR2, TLR7 oder TLR9 einen protektiven Effekt in der Angiotensin II-induzierten vaskulären Dysfunktion zu haben. Tendenziell scheint die endotheliale und glattmuskuläre Funktion insbesondere von TLR7 aber auch TLR9 Knockout Mäusen verschlechtert zu sein nach ATII Behandlung.

Anhand dieser Studie der vaskulären Reaktivität kann folglich auf keine Beteiligung von TLR2, TLR7 oder TLR9 in Zusammenhang mit der ATII-induzierten vaskulären Inflammation geschlossen werden, die die protektiven Effekte der MyD88 Defizienz erklären würden.

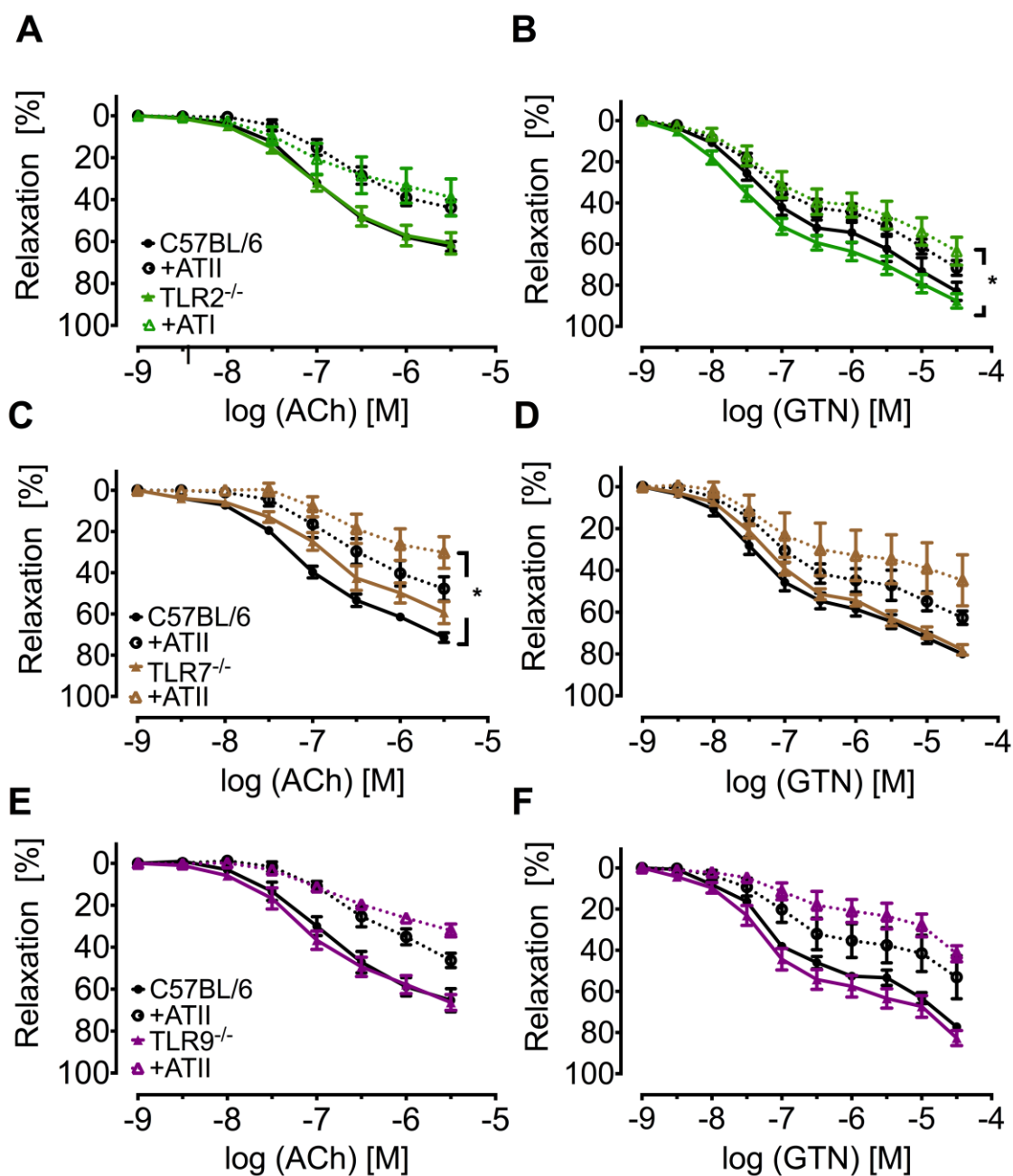


Abbildung 3-23: Weder die Defizienz in TLR2, TLR7 noch TLR9 führt zu einer verbesserten vaskulären Funktion von ATII-behandelten Mäusen. Isometrische Spannungsstudien mit isolierten Aortenringen von sham oder ATII behandelten TLR2 (A,B; n=6-7; grüne Kurven), TLR7 (C,D; n=3-4; braune Kurven) und TLR9 (E,F; n=3; violette Kurven) Knockout Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen. Dargestellt sind Konzentrations-Relaxationskurven von Aortenringen in Antwort auf den endothelabhängigen Vasodilator Acetylcholin (ACh) (A, C, E) und den endothelunabhängigen Vasodilator Glyceroltrinitrat (GTN) (B,D,F). One-way ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison Test; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

3.3.4 Funktion MyD88 positiver inflammatorischer versus residenter Zellen in der Angiotensin II-induzierten vaskulären Dysfunktion und Inflammation

Um zwischen der Funktion MyD88 positiver zirkulierender Leukozyten versus residenter Zellen in der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion und Inflammation zu differenzieren, wurden chimäre Wildtyp (wt) bzw. chimäre MyD88 defiziente Mäuse generiert.

In den nachfolgenden Experimenten wurden drei Gruppen chimärer Mäuse verwendet. Als Kontrollgruppe dienten, um Effekte alleine durch die Bestrahlung auszuschließen, letal bestrahlte C57BL/6 Mäuse, denen Knochenmark (KM) aus Ly5.1 Mäusen transferiert wurde (wt→wt).

Neben dieser Kontrollgruppe wurden zwei weitere Versuchsgruppen angesetzt: Einerseits wurden Ly5.1 Mäuse letal bestrahlt und mit MyD88^{-/-} KM rekonstituiert (MyD88^{-/-}→wt) und andererseits bestrahlten MyD88^{-/-} Mäusen Ly5.1 KM transferiert (wt→MyD88^{-/-}). Das *Engraftment* wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse auf CD45.1 und CD45.2 nach einer Erholungsphase überprüft (siehe Behandlungsschema 2.2.3.6).

Abbildung 3-24 zeigt eine beispielhafte durchflusszytometrische Analyse von Knochenmark und Blutzellen der chimären Versuchstiere. Der Chimärismus lag konstant bei ca. 96 %.

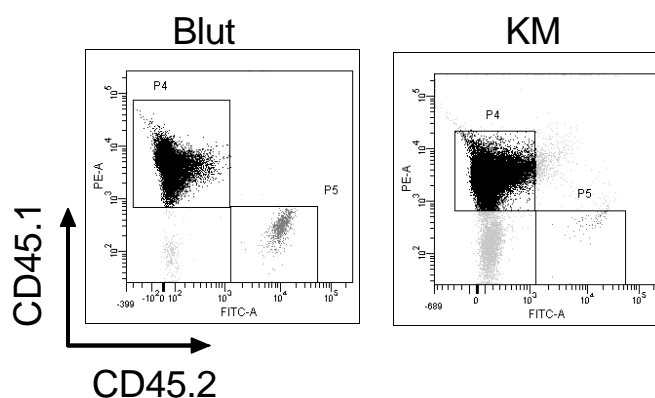


Abbildung 3-24: Überprüfung des *Engraftments* von Spender-Knochenmarkszellen in letal bestrahlten Mäusen mittels durchflusszytometrischer Analyse von Blut und Knochenmark (KM) Letal bestrahlte Wildtyp oder MyD88 defiziente Mäuse wurden mit wt oder MyD88^{-/-} Knochenmarkszellen rekonstituiert. Die durchflusszytometrische Analyse auf CD45.1 und CD45.2 Expression in Blut und KM reflektiert die erfolgreiche Generierung chimärer Mäuse. Gezeigt sind repräsentative FACS *dot plots* am Beispiel einer C57BL/6 Maus (CD45.2), die mit Ly5.1 KM (CD45.1) rekonstituiert wurde.

Um zu evaluieren, in welchem Umfang MyD88 positive zirkulierende Leukozyten oder MyD88 exprimierende Gewebszellen, wie beispielsweise Endothelzellen, an der Pathogenese der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion beteiligt sind, wurde in nachfolgenden Experimenten MyD88^{-/-} oder wt Chimäre einer ATII Infusion unterzogen.

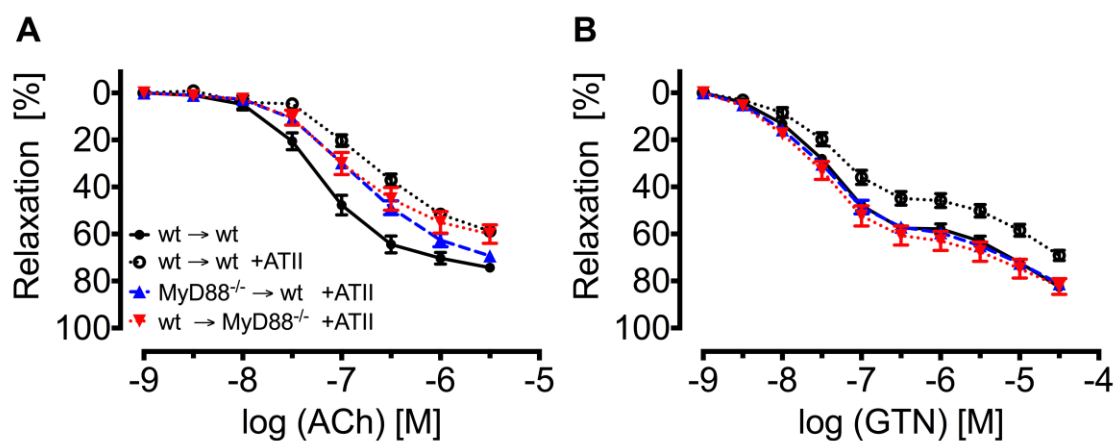


Abbildung 3-25: MyD88 in hämatopoetische Zellen ist involviert in die ATII-induzierte vaskuläre Dysfunktion. Isometrische Spannungsstudien von Knochenmark-chimären Mäusen (wt→wt ±ATII (schwarze Kurven), MyD88^{-/-}→wt +ATII (blaue Kurven) und wt→MyD88^{-/-} +ATII (rote Kurven). Dargestellt sind Dosis-Wirkungskurven auf den endothelabhängigen Vasodilator Acetylcholin (ACh, A) und den endothelunabhängigen Vasodilator Glyceroltrinitrat (GTN, B); n=11-18 Mäuse pro Gruppe; ordinäre One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05.

Letal bestrahlte Wildtyp Mäuse, die auch Wildtyp Knochenmark erhielten entwickelten eine endotheliale und vaskuläre Dysfunktion durch ATII Behandlung, was in der Verschlechterung der maximale Relaxation von 68±4,0% (wt→wt) auf 60±2,1% (wt→wt +ATII) in Antwort auf ACh und von 83±1,6% (wt→wt) auf 72±2,2% (wt→wt +ATII) in Antwort auf GTN widerspiegelt wird.

ATII-infundierte chimäre Wildtyp Tiere, die mit MyD88 defizientem Knochenmark rekonstituiert wurden (MyD88^{-/-}→wt +ATII), zeigten hingegen nur eine geringfügige, nicht signifikante schlechtere Relaxation auf ACh und eine Normalisierung auf GTN im Vergleich zu wt→wt sham infundierten Kontrollen. Die maximale Relaxation betrug: Maximale Relaxation ACh 68±2,6% (MyD88^{-/-}→wt +ATII) und maximale Relaxation GTN 82±3,3% (MyD88^{-/-}→wt +ATII).

Aortenringe von wt→MyD88^{-/-} +ATII Mäusen hingegen zeigten einen intermediären vaskulären Phänotyp. Während die maximale Relaxation in Antwort auf ACh mit 60±3,9% (wt→MyD88^{-/-} +ATII) verschlechtert gegenüber sham infundierten wt→wt Mäusen und ähnlich zu ATII-infundierten Kontrolltieren war, war die maximale

Relaxation in Antwort auf GTN normalisiert ($82 \pm 3,3\%$) wie auch bei den MyD88^{-/-}→wt +ATII Chimären beobachtet.

Die Daten legen nahe, dass MyD88 insbesondere in Zellen des hämatopoetischen Systems in Zusammenhang mit der vaskulären Funktion eine Rolle spielt, aber auch in einem geringeren Ausmaß Einfluss auf die Funktion von Gewebszellen wie Endothel- oder glatten Muskelzellen hat.

Dieses wurde durch durchflusszytometrische Analysen von Aortengewebe untermauert (Abbildung 3-26).

Die Evaluierung der Leukozytenrekrutierungsprofile in den verschiedenen Behandlungsgruppen ergab passend zu den Befunden aus den isometrischen Spannungsstudien für wt→wt Mäuse eine bis zu 4fach höhere Infiltration mit CD45⁺ Leukozyten durch ATII Infusion, darunter vor allem CD11b⁺GR-1^{low} Monozyten.

MyD88 defiziente Mäuse nach Rekonstitution mit Wildtyp Knochenmark in Antwort auf ATII (wt→MyD88^{-/-} +ATII) wiesen im Vergleich zu den wt→wt +ATII Tieren eine verminderte Leukozyteninfiltration auf, dennoch war die Anzahl verdoppelt.

Demgegenüber entsprach die Anzahl an infiltrierenden Leukozyten in die Aortenwand von MyD88^{-/-}→ wt +ATII Mäusen annähernd der sham behandelten wt → wt Gruppe.

Die infiltrierenden Zellen stammten zu über 90% aus dem Knochenmark, da diese die Oberflächenmarker des Spendertiers trugen (Abbildung 3-26, B). Interessanterweise wiesen MyD88^{-/-}→wt +ATII prozentual signifikant fünfmal mehr infiltrierende Zellen vom Empfängertyp auf, was auf einen kompensatorischen Mechanismus hindeuten könnte.

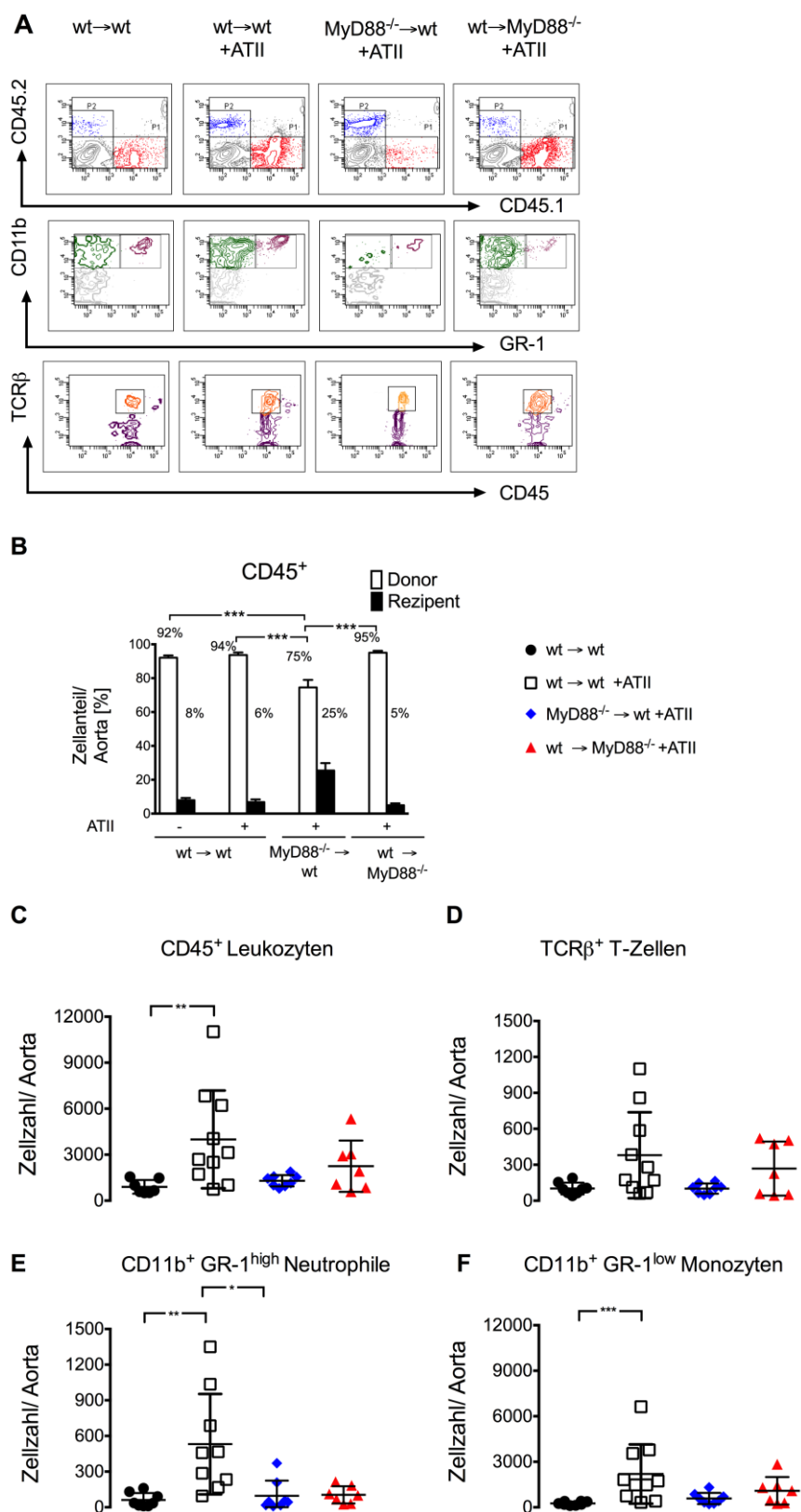


Abbildung 3-26: MyD88 Defizienz in Zellen des hämatopoetischen Systems führt zu einer reduzierten ATII-getriebenen Infiltration von Leukozyten in die Aorta. Einzelzellsuspensionen generiert durch Col II/DNase I Verdau der Aorten von Knochenmark-chimären Mäusen (wt→wt ±ATII, MyD88^{-/-}→wt +ATII und wt→MyD88^{-/-} +ATII) wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen CD45.1 und CD45.2 gefärbt und anschließend die Anzahl an TCRβ⁺ T-Zellen (CD45.1⁺ oder CD45.2⁺ TCRβ⁺, D), Monozyten (CD45.1⁺ oder CD45.2⁺ CD11b⁺GR-1^{low},

F) und Granulozyten (CD45.1⁺ oder CD45.2⁺ CD11b⁺GR-1^{high}, E) durchflusszytometrisch bestimmt. Tote Zellen wurden durch Anfärbung mit *Viability Dye* von der Analyse ausgeschlossen. A, Repräsentative Konturplots. B, Zusammenfassende grafische Darstellung und statistische Auswertung der (B) prozentualen Verteilung von infiltrierenden Leukozyten des Spendertiers oder des Empfängers und (C-F) Einwanderung verschiedener Leukozytenpopulationen; n=7-10; One-way ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05. Die Symbole repräsentieren jeweils einzelne Versuchstiere.

Die Daten stützen somit die Hypothese, dass in die Gefäßwände von Wildtyp Mäusen MyD88 exprimierende Zellen des hämatopoetischen Systems den Leukozyteninflux zu einem hohen Ausmaß regulieren.

3.4 Zusammenfassung Ergebnisteil

Zusammenfassend konnte in den Experimenten dieser Arbeit gezeigt werden, dass die protektive Wirkung der Diptheriatoxin-medierten Monozyten Ablation in LysM^{IDTR} Mäusen durch adoptiven Transfer von Wildtyp Monozyten nicht aber durch Rekonstitution mit gp91^{phox^{-/-}} oder Agt1r^{-/-} Monozyten aufgehoben werden konnte.

IFN- γ ^{-/-} Mäuse waren partiell geschützt vor der Ausbildung einer vaskulären Dysfunktion und zeigten reduzierte ROS-Level in Aorta und Blut. Die ATII-induzierte Rekrutierung mit Inflammationzellen, insbesondere NK-Zellen und Monozyten, war in IFN- γ ^{-/-} Mäusen blockiert.

Die Depletion von NK1.1⁺-Zellen hatte einen protektiven Effekt auf die vaskuläre Funktion nach ATII Infusion. IFN- γ kompetente NK1.1⁺ Zellen und T-bet⁺ IL-12 produzierende LysM⁺ Monozyten scheinen sich gegenseitig zu aktivieren.

MyD88 Defizienz führte zu einem abgeschwächten Anstieg des arteriellen Blutdrucks nach ATII Infusion und normalisierte nahezu die vaskuläre Funktion, korrespondiert mit weniger oxidativem Stress und einer Abnahme an Inflammationsmarkern in der Aortenwand. MyD88^{-/-} Tiere zeigten eine abgeschwächte Einwanderung von Leukozyten, insbesondere inflammatorischen Monozyten und IFN- γ kompetenten NK-Zellen. Der Knockout von TLR2, TLR7 und TLR9 hatte keine Veränderung in der ATII-medierte vaskulären Dysfunktion zur Folge.

Knochenmarktransferexperimente wiesen auf eine Rolle von MyD88 insbesondere in Knochenmark-abstammenden Zellen in der vaskuläre Dysfunktion und Inflammationszellrekrutierung ins Gefäß hin.

4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bringen neue Erkenntnisse über die Mechanismen der inflammationsgetriebenen Entstehung der endothelialen Dysfunktion und arteriellen Hypertonie. Die Arbeit stellt die Nox2 basierte ATII-induzierte reaktive Sauerstoffspezies-Produktion von Gefäß-infiltrierenden Monozyten, ein durch IFN- γ produzierende NK-Zellen getriebener Prozess, ins Zentrum der zugrundeliegenden Entzündungsreaktion und identifiziert MyD88, exprimiert von myeloiden Zellen, als zentrales Signalmolekül.

4.1 Superoxid-produzierende Gefäß-infiltrierende Monozyten mediieren die vaskuläre Dysfunktion

Die primäre Quelle für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) im kardiovaskulären System ist die NADPH Oxidase. Diese wurde erstmals in Granulozyten beschrieben. Heute weiß man, dass diese phagozytäre Isoform (Nox2) von inflammatorischen Zellen, darunter alle myelomonozytären Zellen (Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen) sowie T-Zellen, exprimiert wird. Kathy Griendling gelang es 1994, die Existenz der NADPH Oxidase auch in glatten Muskelzellen nachzuweisen und eine gesteigerte Aktivität durch ATII zu belegen [280].

Inflammatorische Zellen wie zirkulierende Granulozyten, Monozyten und T-Zellen verfügen zudem über ein komplettes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System inklusive der AT₁- und AT₂-Rezeptoren. Hoch et al. haben 2009 nachgewiesen, dass durch T-Zellen produziertes ATII in einer autokrinen Weise wirken und zur Aktivierung der T-Zell-NADPH Oxidase und folgender Produktion von TNF- α führen kann [24].

Dass ATII ein direkter Stimulator der phagozytären NADPH Oxidase ist, wurde erstmals durch eine Studie von El Bekay et al. 2003 [281] bewiesen. Demnach führt ATII in humanen Neutrophilen zu einer endogenen und extrazellulären O₂⁻ Produktion, ausgelöst durch die Aktivierung der NADPH Oxidase über die Multimerisierung und Translokation der regulatorischen Untereinheiten p47^{phox} und p67^{phox} aus dem Zytosol an die Membran. Mit Inhibitoren gegen den AT₁-Rezeptor, den p38/MAPK und ERK1/2 Signalwegen sowie gegen die Flavinoxidase konnte die O₂⁻ Produktion der Zellen inhibiert werden, indikativ dafür, dass ATII diese Signaltransduktionswege innerhalb von neutrophilen Granulozyten aktiviert.

Durch die ATII-induzierte Aktivierung des AT₁-Rezeptors auf Monozyten und nachfolgender Stimulation der Src, ERK/1/2 und p38 MAPK abhängigen Signalkaskaden wird nicht nur die NADPH Oxidase aktiviert, sondern auch ihr Migrationsverhalten u.a. durch die ATII-abhängigen Phosphorylierung von Zytoskelett-assoziierten Proteinen beeinflusst [282]. Durch diese Mechanismen wirkt ATII proatherogen und führt zur Mobilisierung der Monozyten zum Gefäß hin.

In Experimenten mit Ratten konnte die ATII-medierte Expression des proinflammatorischen Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und die Infiltration ED-1-positiver (CD68) Monozyten/Makrophagen inhibiert werden durch kompetitive Inhibition der NADPH Oxidase mittels des (gp91ds)-Peptids [283]. Es blieb ungeklärt, ob für diesen Mechanismus die *vaskuläre* (also endotheliale oder glattmuskuläre) oder in einer Art autokriner Stimulation die *phagozytäre* NADPH Oxidase entscheidend ist.

4.1.1 Nox2 und den AT₁R exprimierende Monozyten sind Mediatoren des Angiotensin II-induzierten Hypertonus und der vaskulären Dysfunktion

Der Fragestellung nachzugehen, welche pathophysiologische Rolle die phagozytäre NADPH Oxidase auf Monozyten im Vergleich zur vaskulären NADPH Oxidase in der ATII-induzierten Hypertonie und vaskulären Dysfunktion einnimmt, war Hauptziel des ersten Teils dieser Arbeit.

Dafür wurde das LysM^{idTR} Mausmodell genutzt, bei dem durch Diptheriatoxin Applikation Monozyten spezifisch ablatiert werden können (siehe Kap. 2.2.31).

Wie Wenzel, Knorr, Kossmann et al. bereits vorab veröffentlichten, sind Monozyten-depletierte LysM^{idTR}+DTX Mäuse geschützt vor der ATII-induzierten Entwicklung einer vaskulären Dysfunktion, oxidativem Stress und eines Blutdruckerstiegs. Der Wildtyp Monozytentransfer in depletierte Mäuse verschlechterte den Phänotyp in Antwort auf ATII wieder signifikant während der Transfer von Neutrophilen keinen Einfluss hatte, eine entscheidende Bedeutung dieser Zellpopulation implizierend [195].

Um die Signifikanz einer funktionellen NADPH Oxidase und eines intakten ATII-Signalweges in Monozyten in der vorliegenden Arbeit zu testen, wurden Monozyten-depletierte LysM^{idTR}+DTX Mäuse mit Monozyten aus Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 Knockout- (Agtr1^{-/-}) oder Nox2 (gp91^{phox -/y}) Knockout Mäusen rekonstituiert und die Mäuse mit ATII behandelt.

Weder die Rekonstitution mit den Nox2 defizienten noch die mit den AT₁R defizienten Monozyten, führte zu einer Wiederherstellung einer vaskulären Dysfunktion, gemessen durch isometrische Spannungsstudien (Abbildung 3-2), noch zeigten die Mäuse erhöhte ROS-Level im Gefäß und Vollblut (Abbildung 3-3).

Der Transfer der Knockout Monozyten hatte zudem auch keine Veränderung des systolischen Blutdrucks der Mäuse im Vergleich zu sham behandelten Monozyten-depletieren LysM^{DTR}+DTX +ATII Tieren zur Folge (Abbildung 3-1). Die ATII Infusion führte weder in den depletierten Tieren noch in den mit Knockout Monozyten transferierten Tieren zu einer arteriellen Hypertonie Entwicklung.

Die Ergebnisse des Knockout Monozytentransfers bestätigen damit die aufgestellte Hypothese, dass der Monozyteneinfluss auf die Gefäßfunktion durch eine Aktivierung des AT₁-Rezeptors auf Monozyten und durch die monozytären-NADPH Oxidase getriggert wird.

Die Bedeutung von Monozyten und Makrophagen für die Entstehung von vaskulärem oxidativem Stress wird durch die Tatsache unterstrichen, dass aktivierte Makrophagen eine der wichtigsten Quellen für das stark proinflammatorische Cytokin TNF- α darstellen und dass TNF- α ein potenter Stimulator der NADPH Oxidase ist [284]. Dies könnte sowohl die vaskuläre Nox als auch in einem positiven Rückkopplungsmechanismus die phagozytären Nox aktivieren.

Ein Versuch die Rolle der phagozytären NADPH Oxidase im ATII-induzierten arteriellen Hypertonus und vaskulären oxidativen Stress zu charakterisieren, wurde bereits von der Arbeitsgruppe von Ernesto Schiffrin durch Experimente mit *macrophage colony-stimulating factor* (m-CSF)-defizienten Mäusen unternommen. Durch das Fehlen dieses chemoattraktiven Faktors für Monozyten, der die Reifung zu reifen Monozyten und Makrophagen steuert [285, 286], sind die Mäuse durch eine Defizienz an Makrophagen, Monozytopenie und gestörte Knochenbildung gekennzeichnet [287, 288]. Klinisch auffällig werden die Tiere durch einen Osteopetrose-Phänotyp, der am ehesten auf eine Osteoklastendefizienz zurückzuführen ist, weshalb dieser Stamm als op/op bezeichnet wird [289]. Die ATII Behandlung von op/op Mäusen führte zu einer deutlichen Abschwächung des arteriellen Hypertonus, des vaskulären Remodellings, der Expression des proinflammatorischen Adhäsionsproteins VCAM-1, der endothelialen Dysfunktion von Widerstandsgefäßen und der vaskulären NADPH Oxidase-Aktivität verglichen mit op/wt und wt/wt Mäusen [290]. Die Aussagekraft dieser Studie ist jedoch limitiert durch

die fehlende Induzierbarkeit der Phagozytendefizienz und damit schwer eingrenzbaeren Gegenregulationsmechanismen in op/op Tieren.

Auch in der Atheroskleroseforschung konnte gezeigt werden, dass die von Monozyten/Makropagen exprimierte NADPH Oxidase eine essenzielle Rolle in der ROS-medierten Progression der Krankheit spielt. Mittels Knochenmarktransfer wurden in einer Studie von Vendrov et al. drei Gruppen von Mäusen hergestellt: Dabei wurden ApoE^{-/-} Mäuse mit funktioneller NADPH Oxidase sowohl in der Gefäßwand als auch in phagozytären Zellen einerseits mit ApoE^{-/-} Mäusen mit nicht-funktioneller NADPH Oxidase in Monozyten/Makrophagen (BMO, *bone-marrow oxidase*) und andererseits auch mit ApoE^{-/-} Mäusen mit nicht-funktioneller *vessel wall* NADPH oxidase (VWO) verglichen.

Nach Fütterung mit einer 12-wöchigen fett- und cholesteinreichen *Western diet* zeigten BMO Mäuse signifikant reduzierte Plasma oxLDL-Level im Vergleich zu Kontrollen und VWO Mäusen, wobei Aorten von VWO Tieren eine reduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen zeigten. Aus diesen und anderen Ergebnissen folgerten die Autoren, dass sowohl die Expression der NADPH Oxidase in Monozyten/Makrophagen als auch in der Gefäßwand eine kritische Rolle in der Atherogense spielt und eine Abnahme der atherosklerotischen Läsionen sowohl auf eine geminderte Superoxid-Produktion von Monozyten/Makrophagen als auch von Gefäßwandzellen herrühren kann [291].

Die Bedeutung der AT₁R Expression auf Leukozyten für die Monozytenfunktion wurde bereits in einer Studie aus der Atheroskleroseforschung beschrieben, in der die Leukozyten-spezifische selektive Deletion von Agtr1a vor der Entwicklung einer Atherosklerose schützte und die Polarisation zu M1 Makrophagen in ApoE^{-/-} Mäusen nach unilaterale Nephrektomie verhinderte [292].

Das Ergebnis dieser Arbeit, dass die Rekonstitution von Monozyten-depletierten Mäusen mit AT₁R defiziente Monozyten zu keiner Verschlechterung des Blutdrucks führt, steht der Studie von Crowley et al. [293] konträr gegenüber, in der die Rolle des AT₁-Rezeptors in der Pathogenese der ATII-induzierten Hypertonie untersucht wurde. Knochenmark-Chimäre, defizient für den AT₁-Rezeptor in Zellen des hämatopoetischen Systems, wurden generiert und überraschenderweise zeigten diese Mäuse mehr renale Makrophagen- und T-Zellinfiltration, einhergehend mit einem erhöhten Level an renalen IL-1β und erhöhten chronischen Blutdruckwerten in Antwort auf ATII.

Demnach würde der AT₁R auf Immunzellen also eine protektive Rolle in der ATII-induzierten Endorganschädigung spielen.

Eine eindeutige Erklärung für diese unterschiedlichen Befunde kann derzeit nicht gegeben werden. Es illustriert aber die komplexe Regulation der Immunfunktion durch das Renin-Angiotensin-System.

Die Befunde dieser Arbeit suggerieren zusammenfassend, dass die phagozytäre NADPH Oxidase von infiltrierenden Monozyten/Makrophagen inflammatorische und oxidative Signalkaskade in der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion antreibt.

Konsekutiv könnte dadurch die Superoxid-Produktion, reichend von der vaskulären NADPH Oxidase (Nox1) bis zu mitochondrialen Atmungskette [294], in VSMCs und im Endothel stimuliert und so die generelle ROS-Bildung amplifiziert werden.

4.2 IFN- γ als treibende Kraft in der Angiotensin II-induzierten vaskulären Inflammation und Dysfunktion

IFN- γ besitzt ein breites Feld an zellulären Funktionen und übt diese durch Aktivierung von Signaltransduktionswegen in den Zielzellen aus. Darunter zählt die Förderung der Chemokin- und Adhäsionmolekülexpression, die Aktivierung von Makrophagen [295] und die Anlockung von Inflammationszellen zum Inflammationsherd [199, 296, 297]. Ein Viertel aller Gene im Transkriptom von Makrophagen scheinen sensitiv für die Aktivierung durch IFN- γ zu sein [298].

Andere zelluläre Antworten wie die Regulation der Zellproliferation und Stimulation der Apoptose, tragen alle zu der komplexen Natur der Atherogenese bei.

Während die Rolle von IFN- γ in der Progression der Atherosklerose mit dessen überwiegend pro- aber antiatherogenen [299] Eigenschaften, u.a. in der Formation von Schaumzellen, der adaptiven Th₁ spezifischen Immunantwort und Plaque Entwicklung, bereits gut beschrieben wurde [300], ist bisher nicht eindeutig geklärt, welche Rolle IFN- γ in der Entwicklung der endothelialen Dysfunktion und Hypertonie einnimmt.

4.2.1 Die Angiotensin II-induzierte vaskuläre Dysfunktion ist abhängig von der IFN- γ -getriebenen Immunzellrekrutierung

C57BL/6 Tiere reagierten auf ATII mit einer signifikant erhöhten IFN- γ mRNA Expression in Aortenlysaten (Abbildung 3-4), was eine proinflammatorische Rolle von

IFN- γ widerspiegelt. Fernandezcastelo et al. konnten bereits 1987 [301] zeigen, dass humane Blut-Lymphozyten auf ATII mit einer gesteigerten IFN- γ Produktion reagieren.

Ferner waren IFN- $\gamma^{-/-}$ Tiere partiell geschützt vor der Ausbildung einer ATII-getriebenen endothelialen und glattmuskulären vaskulären Dysfunktion (Abbildung 3-5) und zeigten eine reduzierte Superoxid-Bildung im Gefäß sowie einen reduzierten oxidativen Burst im Vollblut. IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäuse wiesen damit bezüglich der vaskulären Funktion sowie ROS-Produktion einen sehr ähnlichen Phänotyp zu T-bet⁺ IFN- γ defizienten Tbx21 $^{-/-}$ Mäuse auf [220, 236].

Basierend auf der Beobachtung aus den Vorstudien, dass ATII-infundierte Tbx21 $^{-/-}$ Mäuse keine signifikante Veränderung des Blutdruckanstiegs zeigten sowie aufgrund von Literaturdaten, ist von keiner Verminderung im Anstieg des arteriellen Blutdrucks in Antwort auf ATII bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen auszugehen.

Markó et al. [302] konnten in einem Mausmodell der ATII-induzierten kardialen Fibrose einen Einfluss von IFN- γ auf die Endorganschädigung, nicht aber auf den Blutdruck zeigen. ATII-behandelte IFN- γ -Rezeptor (IFN- γ R) Knockout Mäuse entwickelten weniger kardiale Hypertrophie, zeigten eine reduzierte kardiale Makrophagen und T-Zellinfiltration sowie weniger Fibrose, unabhängig von Blutdruckänderungen im Vergleich zum Wildtyp. Ebenso im Mausmodell der ATII-induzierten kardialen Fibrose demonstrierten Han et al., dass IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäuse eine reduzierte Infiltration von Makrophagen und T-Zellen ins Herzgewebe, reduzierte Fibrose sowie eine geminderte Expression von TNF- α und MCP-1, jedoch den gleichen Blutdruck wie Wildtyp Mäuse aufwiesen [303].

Einhergehend mit den Studien aus der kardialen Fibrose, die weniger Inflammation zeigten, wenn der IFN- γ Signalweg unterbrochen wurde, wiesen auch in dieser Studie IFN- $\gamma^{-/-}$ und IFN- γ defizienten Tbx21 $^{-/-}$ Mäuse eine reduziertes Einwandern von CD45⁺ Leukozyten ins Gefäß in Antwort auf ATII auf (Abbildung 3-7).

IFN- γ scheint demnach für die Initiation der Inflammation, nicht jedoch in Blutdruckeffekte involviert zu sein. Dies bedeutet, dass die T-bet/IFN- γ -getriebenen proinflammatorischen Wirkung von ATII auf das Gefäßsystem unabhängig von der Hämodynamik ist.

4.2.2 IFN- γ produzierende Gefäß-infiltrierende NK-Zellen wechselwirken lokal mit Monozyten und sind Mediatoren der Angiotensin II-induzierten vaskulären Dysfunktion und Inflammation

Die Protektion vor der vaskulären Inflammation in IFN- γ ^{-/-} und Tbx21^{-/-} Mäusen war insbesondere assoziiert mit der reduzierten Infiltration von NK1.1⁺ NK-Zellen in Aorten und die Ablation von NK-Zellen in C57BL/6 Wildtyp Mäusen verbesserte signifikant die ATII-induzierte vaskuläre Dysfunktion und führte zu reduzierten oxidativen Stresslevel (Abbildung 3-6).

Demhingegen führte die CD4⁺ T-Zelldepletion zu keiner signifikanten Veränderung der Gefäßfunktion (Ergebnisse Dissertation Melanie Brähler, Abteilung für Dermatologie, Unimedizin Mainz, 2014). Diese Beobachtung legt nahe, dass NK-Zellen und nicht T-Zellen entscheidend für die Initiation der ATII-induzierten vaskulären Inflammation sind. Auch in einem Atherosklerosemodell mit immundefizienten T-Zell-freien SCID-ApoE^{-/-} Mäusen konnte die Entwicklung atherosklerotischer Plaques auf die IFN- γ -Produktion aus NK-Zellen zurückgeführt werden [304]. Bestrahlte Ldlr^{-/-} Mäuse, die mit dem Knochenmark transgener Ly49A Mäuse, defizient für funktionelle NK-Zellen, rekonstituiert wurden (Ly49A \rightarrow Ldlr^{-/-}), entwickeln kleinere atherosklerotische Läsionen als Kontrollmäuse [305]. Die Rolle von NK-Zellen wird auch durch Befunde von Taherzadeh et al. unterstützt [306]. Die Gruppe identifizierte den *natural killer* (NK) Genkomplex als eine wichtige genetische Determinante in der Sensitivierung von Mausstämmen gegenüber *N(G)-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME)-induziertem Bluthochdruck und vaskulärem Umbau. Durch die Einführung des Genkomplexes aus C57BL/6 Mäuse, die empfänglich für die Atherosklerosentwicklung sind, in Atherosklerose resistente BALB/C Mäuse, entwickelten die Mäuse nach L-NAME Behandlung einen Anstieg im arteriellen Blutdruck sowie eine Verschlechterung der vaskulären und endothelialen Funktion.

4.2.3 Die T-bet Expression in Monozyten/Makrophagen ist essentiell für die NK-Zell-Rekrutierung ins Gefäß

Die ATII-induzierte vaskuläre Dysfunktion und Chemotaxis von inflammatorischen Zellen war, wie in Vorergebnissen zu dieser Arbeit gezeigt reduziert in Tbx21^{-/-} Mäusen. Weder der Transfer von T-bet⁺NK1.1⁺ NK-Zellen oder T-bet⁺CD11b⁺ Monozyten in Tbx21^{-/-} Mäuse konnte den Phänotyp der vaskulären Dysfunktion und oxidativen Stress wiederherstellen (Abbildung 3-11), wie auch schon in Transferexperimenten mit CD4⁺T-bet⁺ T-Zellen beobachtet [221] (Dissertation Maria

Isabel Schmidgen, Labor für Molekulare Kardiologie, II. Med., Unimedizin Mainz, 2013). Diese Ergebnisse implizieren, dass keine der individuellen T-bet⁺ Leukozytenpopulationen alleine ausreichend und kompetent war, die ATII-getriebene vaskuläre Schädigung wiederherzustellen. Dieses bestätigt das Konzept, dass das lokale Mikromilieu unabdingbar ist für die zellulären Antworten von NK-Zellen oder anderen T-bet⁺ Zellen.

Die Rekrutierung von NK-Zellen und die Aktivierung von Makrophagen durch von NK-Zellen gebildetes IFN- γ ist kritisch für die Inflammation. Wie Makrophagen sind auch NK-Zellen Produzenten für MIP-1 α , einem wichtigen chemoattraktiven Protein, das die endotheliale Transmigration und Infiltration von myelomonozytären Zellen und Lymphozyten in das entzündete Gewebe fördert. Neben weniger NK-Zellen wanderten auch weniger CD11b⁺GR-1^{low} Monozyten in Aorten ATII-behandelter Tbx21^{-/-} oder IFN- γ ^{-/-} Mäuse im Vergleich zum Wildtyp ein.

Aus der Literatur ist bekannt, dass NK-Zellen für die Reifung in einen Effektor-Phänotyp durch IL-12 aktiviert werden müssen, das von T-bet⁺CD11b⁺ myelomonozytären Zellen gebildet wird [279].

Das heterodimere Protein IL-12 besteht aus der p35 und p40 Untereinheit. Es wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen produziert. IL-12 stimuliert die Produktion von IFN- γ in NK-Zellen und T-Zellen. ApoE defiziente Mäusen behandelt mit rekombinanten IL-12 zeigen eine verstärkte Produktion von IFN- γ in der Aorta und vergrößerte atherosklerotische Läsionen [307], während doppeldefiziente Mäuse von p40 und ApoE kleinere Läsionen aufweisen [308].

Wie die oben beschriebenen Versuchen mit LysM^{IDTR} Mäusen nahelegen, haben Monozyten eine essentielle Rolle in der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion. Daher stellten wir die These auf, dass es möglicherweise eine gegenseitige Aktivierung zwischen Monozyten/Makrophagen und NK-Zellen geben könnte über IL-12 und IFN- γ . Durch durchflusszytometrische Analyse wurde eine IL-12 Expression in der Aorta restringiert auf CD11b⁺ Zellen nachweisen. mRNA Expressionsdaten zeigten wiederum, eine gesteigerte IL-12p40 Expression in Aortenlysaten ATII-infundierter C57BL/6 Kontrollmäuse, während der Anstieg in Tbx21^{-/-} Mäusen signifikant reduziert war. Eine IFN- γ Produktion von NK.1.1⁺ NK-Zellen per FACS in Aortenlysaten, konnte ebenfalls nur dann nachgewiesen werden, wenn die Zellen mit IL-12/IL-18 *ex vivo* stimuliert und

dies nur wenn die Tiere vorher *in vivo* mit ATII-behandelt worden waren (Abbildung 3-10).

Diese Versuchsergebnisse sprechen für eine gegenseitige Aktivierung von NK1.1⁺ NK Zellen und Monozyten/Makrophagen über IL-12 und IFN- γ im Gefäß.

Wie im ersten Teil der Arbeit gezeigt und auch durch andere bestätigt wurde, fördern inflammatorische Zellen der myelomonozytären Linie die ATII-induzierte vaskuläre Dysfunktion vor allem durch die NADPH Oxidase-getriebene ROS-Bildung [195, 283, 290, 309, 310].

Um ferner die Rolle der T-bet Expression von Monozyten in diesem Prozess zu untersuchen, wurden Rekonstitutionsexperimente durchgeführt.

Interessanterweise, waren T-bet⁻ Monozyten im Gegensatz zu T-bet⁺, nicht kompetent die vaskuläre Dysfunktion und oxidativen Stress in Monozyten-depletierten LysM^{iDTR} ATII Tieren wiederherzustellen, eine Rolle von T-bet als einen Regulator von Monozyten, partizipierend in der vaskulären Inflammation nahelegend (Abbildung 3-12).

In Einklang damit infiltrierten in Monozyten-depletierten LysM^{iDTR} Mäuse auch weniger IFN- γ ⁺NK1.1⁺ NK-Zellen im Vergleich zu ATII-behandelten Kontrollmäusen (LysM) in die Aorta (Abbildung 3-13).

Zusammen zeigen diese Ergebnisse eine wichtige Rolle der monozytären T-bet Expression in der vaskulären NK-Zell-Rekrutierung und in der gegenseitigen Aktivierung von Monozyten und NK-Zellen.

Im Rahmen des zweiten Teils dieser Arbeit wurde zusammenfassend gezeigt, dass die vaskuläre Dysfunktion von dem Eintritt von Monozyten/Makrophagen sowie IFN- γ produzierenden NK-Zellen abhängt. Während Zellen der myelomonozytären Linie bereits als Förderer der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion von uns und anderen in der Literatur beschrieben wurden, wurden NK-Zellen als Mitspieler in der Pathogenese bisher nicht in Betracht gezogen, obwohl NK-Zellen starke Immunregulatoren darstellen, die im Gegensatz zu T-Zellen konstitutiv in der Lage sind, ohne vorige Sensitivierung große Mengen an Cytokinen zu sekretieren [197, 311]. Die Studie stellt myelomonozytären Zellen und NK-Zellen ins Zentrum des IFN- γ -medierten vaskulären oxidativen Stresses und der ATII-induzierten Inflammation und zeigt den T-bet-IFN- γ Signalweg und die gegenseitige Aktivierung von Monozyten und NK-Zellen als ein potentielle therapeutisches Target in kardiovaskulären Krankheiten auf.

4.3 Essentielle Rolle von MyD88 in der Angiotensin II-induzierten vaskulären Dysfunktion, arteriellen Hypertonie und Inflammation

MyD88 ist ein Signalüberträger in der IL-1/-18 und Toll-like Rezeptor Signalkaskade und spielt eine Rolle in der angeborenen Immunität, Inflammation und Apoptose. Die Signaltransduktion über Toll-like Rezeptoren, das Adapterprotein MyD88 involvierend, wurde in Zusammenhang gestellt mit der Pathogenese der Atherosklerose und den proatherosklerotischen Eigenschaften von Angiotensin II.

Die Rolle von MyD88 in der arteriellen Hypertonie und vaskulären Dysfunktion und Mechanismen der zugrundeliegenden Signaltransduktionswegen wurden noch nicht untersucht.

4.3.1 MyD88 Defizienz wirkt protektiv in der Angiotensin II-induzierten endothelialen Dysfunktion, ROS Produktion, Inflammation und arteriellen Hypertonie

Im dritten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MyD88^{-/-} gegenüber Wildtyp C57BL/6 Mäusen eine signifikant verbesserte endotheliale und vaskuläre Relaxationsfähigkeit in Antwort auf ATII aufweisen (Abbildung 3-14).

Telemetrische Blutdruckmessungen zeigten außerdem, dass MyD88 Knockout Mäuse mit einem um ein Drittel reduzierten Anstieg im arteriellen systolischen Blutdruck auf ATII-Infusion reagieren (Abbildung 3-15). Um eine eindeutige Aussage bezüglich des Blutdrucks treffen zu können, muss die Versuchstierzahl in der Kontrollgruppe jedoch noch erhöht werden. Die bisherigen Daten deuten jedoch klar auf einen Einfluss von MyD88 in der Bluthochdruckentwicklung hin.

Konform mit dieser These der Involvierung des MyD88 Signalweges in der arteriellen Hypertonie, ist die Expression des TLR4 in *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR Ratten) im Vergleich zu Wistar-Kyoto Kontrollratten erhöht und die Expression kann induziert werden durch den NOS-Inhibitor L-NAME (*Nω-Nitro- L -arginine methyl ester hydrochloride*) [312]. Des Weiteren führt die Behandlung von SHR Ratten mit einem anti-TLR4 Antikörper zu einer signifikanten Reduktion des Blutdrucks in Mesenterialarterien [313]. Auch adipöse Mäuse, die sowohl defizient für den Leptin-Rezeptor (Ldlr^{-/-}) als auch für TLR4 sind, weisen einen erniedrigten Blutdruck im Vergleich zu nur Leptin defizienten Mäusen auf [314].

Das *downstream* Produkt des TLR/MyD88 Signalweges ist neben proinflammatorischen Cytokinen auch Cox-2 (cyclooxygenase-2). Cox-2 ist eine induzierbare Isoform der

Cox Enzyme, die die Prostaglandin Formation katalysiert. Eines dieser Prostaglandine, das von Cox-1 und Cox-2 gebildet wird, ist Thromboxan A2 (TXB₂), welches einen potenten Vasokonstriktor darstellt, der in der vaskulären Kontraktion in der arteriellen Hypertonie involviert ist. Als eine mögliche Verbindungen zwischen der Entwicklung des vaskulären Dysfunktion assoziierten Hypertonus und der angeborenen Immunzellantwort, potentiell über den TLR4 Siganlweg, schlagen Bomfim und Kollegen daher einen Cox-abhängigen Mechanismus vor [313]. Anti-TLR4 Behandlung führt zu signifikant reduzierten Cox-2 Proteinleveln und TXB₂ Freisetzung in mesenterischen Arterien in SHR Ratten im Vergleich zu Kontrollen.

Ebenso wiesen Sollinger und Kollegen kürzlich einen reduzierten L-NAME-induzierten Hypertonus und eine verminderte Arterienkontraktilität in TLR4^{-/-} Mäusen nach. Sie zeigten ferner, dass die Behandlung mit L-NAME mit der Freisetzung von DAMPs assoziiert ist, resultierend in einer ROS Produktion von VSMCs in einer TLR-abhängigen Weise [315].

Mit der verbesserten vaskulären Relaxationsfähigkeit und dem reduzierten arteriellen Blutdruck einhergehend waren auch die ROS-Level in Gefäßen von MyD88^{-/-} Mäusen gemindert, was anhand von DHE-Färbung (Abbildung 3-16) sowie durch Surrogatparameter wie der Proteinexpression der Hämoxygenase 1 (HO-1) (Abbildung 3-18), ein durch proinflammatorische Mediatoren und oxidativem Stress induzierbares Gen [316] sowie der Proteinexpression der vaskulären NADPH Oxidase (Nox1) und der mRNA und Proteinexpression der phagozytären NADPH Oxidase (Nox2) nachgewiesen wurde. Dies wurde ferner durch den immunhistologischen Nachweis von Nox2 in Aortenschnitten verifiziert (Abbildung 3-19).

Auch die ATII-induzierte Zunahme der mRNA Expression proinflammatorischen Marker (Abbildung 3-17) wie dem Adhäsionsprotein VCAM-1 oder der vor allem mit M1-Makrophagen assoziierten Cytokine IL-12, TNF- α oder IL-1 β [317] waren in Aorten von MyD88^{-/-} Tieren reduziert.

Einzig in der eNOS mRNA Expression zeigte sich kein Unterschied zwischen C57BL/6 Mäusen und MyD88^{-/-} Mäusen, die in beiden Gruppen durch ATII Infusion abnahm.

Diese Abnahme wurde bereits in verschiedenen Hypertonus Modellen und in unterschiedlichen Geweben wie der Nieren, dem Herz und Aorten beobachtet [318, 319]. Die Expression spiegelt allerdings nicht zwingend den Aktivitäts- oder Entkopplungszustand der eNOS wieder, was durch den Phosphorylierungszustand des Enzyms an Ser1177- oder Thr495-Resten oder Glutathionylierung kontrolliert wird [320].

Die Beobachtung, dass MyD88 Defizienz zur Reduktion von oxidativem Stress und der Inflammation in der Aorta führt, geht mit Daten von Tang et al. [321] einher, die zeigen, dass der flussvermittelte-Umbau der *Arteria Carotis* (*flow-mediated inward remodeling*) ein MyD88-abhängiger, durch Superoxid-initiiertes inflammatorischer Prozess ist und dass dieses mit einer transienten adventitialen Makrophagen-Akkumulation assoziiert ist. Die durch geringen Scherstress induzierte Superoxid-Generierung ist in Abwesenheit von MyD88 reduziert und die Superoxid-Bildung trägt zur MyD88 abhängigen Inflammation bei.

Mittels Immunhistochemie wurde in dieser Arbeit neben dem verstärkten Einwandern von Nox2⁺ Phagozyten auch eine erhöhte Infiltration der Aorta von CD68⁺ oder F4/80⁺ Makrophagen insbesondere in die Adventitia aber auch ins Endothel nachgewiesen. Diese Lokalisation der Inflammationszellen stimmt mit Ergebnissen von Rey et al. [322] überein, die zeigen, dass phagozytäre Leukozyten als wichtige Mediatoren von oxidativem Stress hauptsächlich die *Tunica adventitia* von mit ATII-behandelten Nagern infiltrieren.

Demgegenüber wiesen immunhistologische Färbungen ATII-behandelte MyD88^{-/-} Aorten kein erhöhte Anzahl an CD68⁺ bzw. F4/80⁺ Makrophagen oder Nox2⁺ Phagozyten nach (Abbildung 3-19).

Verschiedene Studien konnten bereits einen Einfluss von MyD88 in der Progression der Atherosklerose nachweisen und bestätigen, dass MyD88-Defizienz zu weniger Inflammation im Gefäß führt. Wie schon kurz in der Einleitung erwähnt, zeigte die Gruppe von Alan Daugherty, dass sowohl hypercholesterämische Atheroskleroseempfindliche ApoE^{-/-} [323, 324] als auch Ldlr^{-/-} [191] Mäuse zusätzlich defizient in MyD88 kleinere atherosklerotische Läsionen sowie eine reduzierte AAA Bildung aufweisen. Auch die Anzahl an Plaque-Makrophagen ist reduziert. MyD88^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse auf einer cholesterinreichen *Western diet* zeigten des Weiteren reduzierte IL-12p40 und MCP-1 Spiegel im Serum und mRNA Level in der Aorta und eine reduzierte Rekrutierung von Makrophagen in Aortenläsionen. Knochenmark-abstammende Makrophagen aus MyD88^{-/-} Mäusen zeigten zudem eine 53%ige Reduktion der basalen MCP-1-Rezeptor (CCR2) Expression, indikativ dafür dass der Haupteffekt der MyD88 Deletion in der Makrophagen Chemotaxis durch die Chemokinexpression liegt [323].

Ähnlich wie im Atherosklerose-Modell zeigte sich auch nach Induktion der arteriellen Hypertonie, dass MyD88 Defizienz die ATII-induzierte Infiltration des Gefäßes mit

CD45⁺ Leukozyten um 75% reduziert, nachgewiesen durch durchflusszytometrische Analyse der Aorten (Abbildung 3-20). Insbesondere die Infiltration in die Aorta durch *in vivo* ATII Behandlung mit CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} inflammatorischen Monozyten war drastisch reduziert in MyD88 Knockout Mäusen.

Die Umverteilung von Ly6C Populationen (Ly6C^{low/int} und Ly6C^{high}) [325] wurde bereits für die ATII-induzierte AAA Bildung beschrieben und steht in Zusammenhang mit der Progression der Atherosklerose in ApoE^{-/-} Mäusen [168, 326]. In einer Studie im Zusammenhang mit der ATII-induzierten AAA Entwicklung dämpfte MyD88 Defizienz auch den ATII-induzierten Anstieg an Ly6C^{high} Zellen und die Reduktion der Ly6C^{low} Zellzahl. Unbehandelte MyD88^{+/+} oder MyD88^{-/-} Mäuse zeigen keinen Unterschied in der Leukozytenzahl oder Verteilung der Monozytenpopulationen [191].

4.3.2 MyD88 scheint in die Reifung von Monozyten in einen proinflammatorischen Phänotyp involviert zu sein

MyD88 wurde ursprünglich charakterisiert als ein durch IL-6 in M1 myeloblastischen Leukämiezellen im Rahmen der terminale Differenzierung zu Makrophagen induziertes *myeloid differentiation* (MyD) Gen [327]. Myeloid angereicherte Knochenmarkzellen zeigen hohe Expressionslevel an MyD88, was eine Rolle des Gens in der myeloiden Zellfunktion und Entwicklung nahelegt. Die Rolle von MyD88 in der terminalen Differenzierung ist derzeit noch nicht voll verstanden. Aufgrund der Rolle in der IL-1 und Toll-like Rezeptorkaskade ist es wahrscheinlich, dass die Expression von MyD88 in myeloiden Zellen in der Differenzierung zu Makrophagen dazu dient, die Zellen auf IL-1 zu prägen, um auf pathogen-assoziierte Motive angemessen zu reagieren [328]. In Antwort auf bestimmte Stimuli scheint MyD88 auch eine Rolle in der Reifung von dendritischen Zellen zu spielen [329].

Um diese potentielle Rolle von MyD88 in der Differenzierung von Monozyten in einen inflammatorischen Phänotyp in Antwort auf ATII genauer zu charakterisieren, wurde die Expression von Markern für „klassische“ inflammatorische (Ly6C^{high}CCR2⁺CX₃CR1^{low}CD62L⁺) und „nicht-klassische“, antiinflammatorische/reparative Monozyten (Ly6C^{low}CCR2⁻CX₃CR1^{high}CD62L⁻) auf mRNA Ebene in mononukleären Zellen des Blutes und in Aortenlysaten untersucht (Abbildung 3-22) [330] [165].

Die mRNA Expressionsanalyse zeigte in Wildtyp Mäusen eine tendenzielle Verschiebung zu einem inflammatorischen Phänotyp (CD62L[↑] und CX₃CR1[↓]) in der Aorta und in mononukleären Zellen des Blutes durch ATII Infusion, was in MyD88

defizienten Tieren eher zu einem nicht-klassischen Phänotyp verschoben wurde. Die CD62L Expression veränderte sich nach ATII Infusion in MyD88 defizienten Mäusen nicht, während es zumindest in der Aorta zu einer erhöhten CX₃CR1 Expression kam. Die Aussagekraft der mRNA Expressionanalysen ist allerdings begrenzt, da CD62L sowohl auf transkriptionaler Ebene als auch im hohen Maße postranskriptional durch *ectodomain shedding* reguliert wird [331, 332].

Auch die ATII-induzierte Rekrutierung von IFN- γ kompetenten NK-Zellen in die Aorta war in MyD88^{-/-} Mäusen gestört (Abbildung 3-21) und wie bereits beschrieben das IL-12 Expressionslevel gesenkt, was darauf hindeutet, dass die Monozyten in MyD88^{-/-} Mäusen nur eingeschränkt aktiviert werden.

Gemeinsam mit der durchflusszytometrischen Analyse der Aorten deutet dieses Ergebnis auf eine Rolle von MyD88 in der Reifung von Monozyten in einen proinflammatorischen Typ hin.

4.3.3 TLR2, TLR7 oder TLR9 Defizienz hat keinen protektiven Effekt auf die vaskuläre Dysfunktion

Um zu ergründen, ob die in MyD88 Knockout Mäusen beobachteten Effekte mit dem Signalweg über Toll-like Rezeptoren zusammenhängen, wurden TLR2, TLR7 und TLR9 Knockout Mäuse mit ATII behandelt und die vaskuläre Funktion getestet (Abbildung 3-23).

Insbesondere TLR2 und TLR4 wurden mit kardiovaskulären Erkrankungen wie der Atherosklerose, dem Myokardinfarkt oder der Hypertonie assoziiert.

Die Defizienz von TLR2 oder TLR4 reduzierte beispielsweise die Atherosklerose sowohl in ApoE^{-/-} als auch Ldlr^{-/-} Mäusen [324, 333, 334] und TLR7 und TLR9 wurden mit der Schwangerschafts-assoziierte Hypertonie (Präeklampsie) bei Menschen und Mäusen in Verbindung gebracht [335].

Die Defizienz keiner der getesteten Toll-like Rezeptoren hatte einen protektiven Effekt auf die vaskuläre Dysfunktionsentwicklung. TLR7 und TLR9 scheinen den Phänotyp tendenziell eher zu verschlechtern, auch wenn dieser Effekt nicht signifikant ist.

Die Tendenz zu einer protektiven Rolle von TLR7 korreliert mit den Ergebnissen von Salagianni et al. [336]. In Ihrer Studie zu der Rolle von TLR7 in der Atherosklerose schlugen die Forscher eine protektive Rolle dieses Toll-like Rezeptors durch Einschränkung der proinflammatorischen Aktivität von Monozyten/Makrophagen vor. Die Autoren stellten dabei die Hypothese auf, dass TLR7 möglicherweise die Expression von Ly6C^{high} Monozyten und M1 Makrophagen hindert, ein MCP-1

mediierter Prozess, von dem angenommen wird, dass er durch TLR2 und TLR4 gesteuert wird [336].

Da keiner der Knockout Mausstämme einen protektiven Effekt in der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion zeigte, scheint weder TLR2, TLR7 und TLR9 in den Prozess involviert zu sein. Kooperative Effekte von mehreren TLRs bzw. eine Redundanz kann allerdings nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Im Zuge dieser Arbeit konnte der Einfluss von TLR4 in der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion nicht untersucht werden (siehe Abschnitt 4.4 zu Limitationen der Studie).

4.3.4 Defizienz in MyD88 in hematopoetischen Zellen mildert die Angiotensin II-induzierte vaskuläre Dysfunktion und Inflammation

Die Infiltration des Gefäßes mit myelomonozytären Zellen spielt eine entscheidende Rolle in der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion. Die Frage, ob die inflammatorischen Leukozyten tatsächlich aus dem Knochenmark abstammen und in wie fern differenzierte Populationen von nicht-Knochenmark-abstammenden Makrophagen [337, 338] zur vaskulären Inflammation beitragen, ist noch nicht geklärt.

MyD88 wird ubiquitär exprimiert, sodass sowohl die Expression im Gefäß (in Endothelzellen oder glatten Muskelzellen) als auch in Zellen dem hämatopoetischen Systems ursächlich sein könnten, für den protektiven Phänotyp.

ATII-infundierte chimäre Wildtyp Mäuse, die rekonstituiert wurden mit MyD88 defizienten Knochenmark ($\text{MyD88}^{-/-} \rightarrow \text{wt} + \text{ATII}$), zeigten eine stark verbesserte endotheliale Funktion (Abbildung 3-25). Die glattmuskuläre Funktion war sowohl in Mäusen mit MyD88 defizienten Knochenmark ($\text{MyD88}^{-/-} \rightarrow \text{wt} + \text{ATII}$) als auch MyD88 defizienten Empfängertieren ($\text{wt} \rightarrow \text{MyD88}^{-/-} + \text{ATII}$) komplett normalisiert (Abbildung 3-25). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass die Interaktion zwischen Endothel und zirkulierenden Zellen für den inflammatorischen Prozess im Gefäß in Antwort auf ATII offensichtlich zentral ist. Somit ist auch in der endothelabhängigen Gefäßantwort (Acetylcholin-Testung) ein signifikanter Effekt zu erkennen, wenn eine Chimäre mit MyD88 defizientem Knochenmark untersucht wird (und nicht die $\text{MyD88}^{-/-}$ Chimäre mit Wildtyp Knochenmark). Im Gegensatz dazu wird die glattmuskuläre Funktion in beiden Chimären vollständig normalisiert, da MyD88 sowohl in (peri)vaskulären Zellen als auch in Immunzellen, die in die Adventitia infiltrieren, für die Entwicklung der Inflammation unabdingbar ist.

Korrespondierend zu den Daten der endothelabhängigen Relaxation, war in Wildtyp Chimären, rekonstituiert mit $\text{MyD88}^{-/-}$ Knochenmark ($\text{MyD88}^{-/-} \rightarrow \text{wt} + \text{ATII}$), die ATII-getriebene signifikante Zunahme der Infiltration der Aorta mit CD45^{+} Leukozyten,

insbesondere CD11b⁺GR-1^{low} Monozyten stark reduziert, während in MyD88 Chimären, transferiert mit Wildtyp Knochenmark (wt→ MyD88^{-/-} +ATII), die Anzahl an CD45⁺ Leukozyten nur leicht gesenkt war (Abbildung 3-26). Interessanterweise war der prozentuale Anteil an Zellen aus dem Empfängertier stammend, die im Gefäß detektiert werden konnten, in MyD88^{-/-}→ wt +ATII fünffach erhöht im Vergleich zu den anderen Chimären, die Wildtyp Knochenmark erhielten. Dies könnte einen kompensatorischen Mechanismus darstellen, bei dem die wenigen im Knochenmark verbliebenen MyD88 kompetenten Zellen bevorzugt ins Gefäß einwandern bzw. evtl. dort auch proliferieren und unterstreicht die Bedeutung von MyD88 in inflammatorischen Zellen.

Ein Einfluss von MyD88 exprimiert von myeloïden Zellen auf die Infiltration von Monozyten und anderen Immunzellen wurde bereits im Zusammenhang mit der Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen von Subramanian et al beschrieben. Der Transfer von Knochenmarkzellen aus *Cd11c-Cre+Myd88fl/fl* (Cre⁺) Mäusen, die spezifisch in dendritischen Zellen kein MyD88 exprimieren, in eine cholesterinreiche *Western diet* gefütterte *Ldlr^{-/-}* Mäuse, bewirkte eine verminderte Aktivierung von T_{regs} in diesen Mäusen. Dieses war gefolgt von einer verminderten Infiltration mit Zellen der myeloïden Reihe, vor allem Monozyten, was letztendlich in vergrößerten atherosklerotischen Läsionen dieser chimären Mäuse resultierte [339].

Die Knochenmarkstransferdaten in dieser Arbeit spiegeln insgesamt wieder, dass MyD88 vermutlich sowohl in Gefäßzellen aber insbesondere auch in Zellen des hämatopoetischen Systems eine Rolle in der ATII-getriebenen Inflammation spielt. Zusammenfassend wurde durch die beschriebenen Experimente MyD88, exprimiert vor allem durch Zellen des hämatopoetischen Systems, als ein Signalmolekül involviert in die Angiotensin II-vermittelte Inflammation identifiziert. Defizienz von MyD88 wirkt protektiv auf die arterielle Hypertonie und vaskuläre Dysfunktion. Mechanistisch betrachtet, könnten die Effekte auf einer gestörten Aktivierung und Reifung von Monozyten zu proinflammatorischen Zellen beruhen.

4.4 Ausblick auf weiterführende Fragestellungen und Limitationen der Studie

Die Arbeit deckt eine essentielle Rolle von IFN- γ , gebildet durch NK-Zellen, und der Expression von T-bet sowohl in Monozyten/Makrophagen also auch NK-Zellen in der

ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion auf.

Der ATII-induzierte Hypertonus wird begleitet von einer erhöhten Anzahl von aktivierten T-Zellen in der Peripherie und T-Zellen wurden bereits in Betracht gezogen in der vaskulären Dysfunktion mitzuspielen [176, 340]. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen konnten wir keine Rolle von CD4⁺ T-Zellen in der vaskulären Inflammation nachweisen (Dissertation Melanie Brähler, Abteilung für Dermatologie, Unimedizin Mainz, 2014). Obwohl T-Zellen in die Aorta von ATII-infundierten Wildtyp Mäusen einwandern und IFN- γ produzieren, führte die Ablation von CD4⁺ T-Zellen aus gesunden immunkompetenten Tieren weder zu einer signifikant veränderten Reaktivität noch zu einer ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion. Die Beobachtungen stimmen mit der kürzlich publizierten Studie überein, dass T-Zellen nicht zu einem Blutdruckanstieg in Antwort auf ATII beitragen [341]. Die Diskrepanz zwischen den Beobachtungen zwischen denen von Guzik et al. [176], die zeigten, dass nach adoptiven Transfer von pan T-Zellen in Rag1^{-/-} Mäuse, die keine B- und T-Zellen aufweisen, sich die vorher verbesserte vaskuläre Funktion und der reduzierte Blutdruck wieder verschlechterte und unseren Studien, könnten im Versuchsaufbau begründet liegen. Die CD4⁺ Depletion in unseren Studien erfolgte in gesunden Tieren, während Guzik et al. isolierte T-Zellen in Rag1^{-/-} Mäuse drei Wochen vor ATII Infusionsstart transferierten. In dieser lymphopenen Umgebung expandieren die T-Zellen extrem stark, was zu einer Überschätzung der pathophysiologischen Relevanz geführt haben könnte. Dennoch Bedarf es weiter Studien, um die Rolle von T-Zellen eindeutig bestimmen zu können.

Weder unsere Studien, noch die genannte Studie von Guzik et al., schließt eine Rolle von CD8⁺ T-Zellen aus. Eine aktuelle Veröffentlichung schlägt eine Rolle von CD8⁺ T Lymphozyten vor, eine mechanistische Rolle bleibt jedoch aufzuklären [342].

Auch die Rolle einer dritten T-Zellpopulation, die der T regulatorischen Zellen (T_{regs}) wird kontrovers diskutiert. Barhoumi und Kollegen [343] führten einen adoptiven Transfer von CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen in Wildtyp Mäuse durch und infundierten dann ATII über zwei Wochen. Die Blutdruckantwort war gemildert in den Tieren, denen T_{regs} adoptiv transferiert wurden. In einer Studie, in der analog die Rolle von T_{regs} in einem Modell der Mineralocorticoid-induzierten Hypertonie getestet werden sollte, konnte keine Reduzierung des Blutdruckanstieges festgestellt werden, allerdings waren die Tiere geschützt vor der vaskulären Dysfunktion und vaskulären Umbauprozessen [344]. Die Diskrepanz in den Ergebnissen könnte im unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Mäuse sowie unterschiedlicher Administration der T_{regs} begründet sein. Die CD4⁺-T-Zelldepletion (Dissertation Dr. Melanie Brähler, Abteilung für Dermatologie, Unimedizin Mainz, 2014), die auch T_{regs} betrifft, zeigte zumindest keinen Einfluss aus

die endotheliale Dysfunktion in unserem Modell. Um zu einem vollständigen Verständnis der Zusammenhänge zu gelangen sind weitere Studien nötig.

Des Weiteren wurde auch die Rolle von NKT-Zellen im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Da NKT-Zellen auch NK1.1 auf Ihrer Oberfläche exprimieren, führte die Injektion mit dem depletierenden anti-NK1.1 auch zu der Depletion dieser Zellpopulation. Allerdings konnten keine eindeutige Regulation der Einwanderung ins Gefäß dieser Zellpopulation durch Angiotensin II festgestellt und nur vereinzelt doppelt positive TCR β ⁺NK1.1⁺ generell in der Gefäßwand identifiziert werden. Ein Einfluss dieser Population kann dennoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

MyD88 wird ubiquitär exprimiert und ist für die Funktion vieler Zellen wichtig. Knochenmarkstransferdaten geben gute Hinweise, allerdings um den Effekt von MyD88 speziell in Monozyten zu untersuchen, wäre ein Monozyten-spezifischer Knockout nötig. Daher ist für Anschlussexperimente geplant MyD88^{flox/flox} Mäuse mit LysM^{Cre} Mäusen zu kreuzen.

Außerdem ist die Frage der Aktivierung noch nicht geklärt. Weitere Rezeptoren, über die Angiotensin II möglicherweise seine MyD88 involvierenden Effekte entfalten könnte, stellen vor allem TLR4, IL-1RI, IL-18R dar.

Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass TLR4 in die Hypertonus Entwicklung involviert ist. Die TLR4 Expression ist beispielsweise erhöht in Maus Mesangialzellen, die mit ATII inkubiert wurden, andeutend dass diese Signalübertragung in den Mechanismus der ATII-medierten Aktivierung des Immunsystems involviert ist [313].

Ji et al. veröffentlichten 2009 [345] eine Studie, in der sie schildern, dass Angiotensin II seine inflammatorischen Antworten teils durch die Aktivierung von Toll-like Rezeptor 4 in vaskulären glatten Muskelzellen induziert. ATII Behandlung führte zu einer erhöhten TLR4 Expression in den Zellen und die ATII-induzierte inflammatorische Antwort (Sekretion TNF- α , Erhöhte Expression MMP-9 etc.) wurde durch eine Vorbehandlung mit einem anti-TLR4 Antikörper signifikant vermindert. Unter Nutzung des AT₁R-Antagonisten Losartan, eines ERK1/2 Inhibitors und eines anti-IP-10 Antikörper stellten sie folgenden hypothetischen Signalweg auf: ATII aktiviert demnach TLR4 durch die durch *signaling* durch den AT₁-Rezeptor ausgelöste ERK1/2 Produktion in VSMCs. Durch die TLR Aktivierung wiederum kommt es zur Induktion des IFN-abhängige Gens IP-10 (*interferon-gamma induced protein 10 kD*), welches die PKC aktiviert und zur NF- κ B Aktivierung und folgenden Cytokin Bildung führt.

MyD88 ist außerdem in die Signaltransduktion von IL-1 [346] und IL-18 [347] involviert. Knockout Mäuse dieser Rezeptoren zeigen eine verminderte Atherosklerosebildung.

IL-18 agiert in Synergie mit IL-12 und führt zu erhöhter IFN- γ Produktion in NK-Zellen und T-Zellen und wird vor allem produziert in Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Genau wie IL-12^{-/-} Mäuse führt die Behandlung von ApoE^{-/-} Mäusen mit rekombinanten anti-IL-18 zu vergrößerten Läsionen [136], während die Defizienz die Läsionengröße reduziert [347].

Weitere Experimente mit Mäusen, die defizient für diese Rezeptoren sind bzw. mit blockierenden Antikörpern sind zur Aufklärung dieser Zusammenhänge erforderlich.

Der Identifizierung eines involvierten Rezeptors schließt sich die Frage nach dem Aktivierungsmechanismus an. Die Identifizierung von DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) und PAMPs (*pathogen-associated patterns*) im Zusammenhang mit der essenziellen Hypertonie ist ein wichtiger Forschungsfokus. Bei den DAMPs könnte es sich um Gefahrmoleküle oder Neoantigene handeln, freigesetzt von durch gesteigerten Blutdruck gestresstem oder verletztem Gewebe [348].

Verschiedene Heat shock Proteine (HSPs), deren Expression im Zusammenhang mit oxidativem Stress und inflammatorischen Cytokinen steht, wurden als potenzielle DAMPs in der Hypertonie identifiziert. HSP60 und 70 sind in die Faltung und Entfaltung von Proteinen involviert und können Immunzellen zur Produktion von TNF- α sowie anderen Cytokinen und NO^{*} stimulieren [349]. HSP60 ist erhöht im Plasma und in der Niere hypertensiver Patienten [350]. Es gibt beispielsweise Hinweise darauf, dass die Expression von HSP70 in Patienten mit essentiellen Hypertonus erhöht ist [351], und die renale Expression von HSP70 ist erhöht in experimentellen Mausmodellen der Hypertonie [352, 353].

Periphere mononukleäre Zellen aus dem Blut von Patienten mit essentiellen Hypertonus, zeigten eine verstärkte Proliferation in Antwort auf HSP70 [354]. Auch Angiotensin II selbst wird als endogener TLR-Agonist diskutiert [355, 356].

4.5 Schlussfolgerung und klinische Bedeutung

Ziel einer antihypertensiven Behandlung ist die Verringerung des Risikos von kardiovaskulären Erkrankungen und somit die Senkung der Morbiditäts- und Mortalitätsrate. Im Rahmen der pharmakologischen Behandlung werden neben Diuretika, Beta-Blockern, Alpha-Rezeptor-Antagonisten und Calcium-Antagonisten sehr häufig die zusätzlich antiinflammatorisch wirkenden ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Blocker eingesetzt. Darüber hinaus haben Statine neben ihrer direkten cholesterinsenkenden Wirkung einen gefäßprotektiven Effekt. Sie bewirken eine

bessere NO[•]-Bioverfügbarkeit und haben einen antioxidativen und antientzündlichen Einfluss [357]. In tierexperimentellen Studien konnten mit Statinen Inflammationsmarker wie MCP-1 sowie eine NF-κB Aktivierung herabgesetzt werden [358].

In vielen Ländern zeigt die Mehrheit der hypertensiven Patienten allerdings immer noch eine unzureichende Blutdruckeinstellung [193]. Darüber hinaus korreliert die Verminderung des Endorgan-Schadens während einer antihypertensiven Therapie nicht immer unbedingt mit der Reduktion des arteriellen Blutdrucks [359]. Aus diesem Grund sind weitere therapeutische Ansätze bei der Behandlung von Bluthochdruck notwendig.

Die Arbeit zeigt auf, dass zirkulierende LysM⁺ Monozyten in die Gefäßwand in Antwort auf Angiotensin II infiltrieren. Zur Ausübung ihrer Effektorfunktion benötigen sie die phagozytäre Form der NADPH Oxidase (Nox2) und den ATII-Rezeptor Typ I (AT₁R). Unter Involvierung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies mediieren sie den ATII-induzierten arteriellen Hypertonus, die vaskuläre Dysfunktion, den oxidativen Stress und die Inflammation.

In der Reifung der Monozyten zu diesem proinflammatorischen Phänotyp könnte der MyD88 Signalweg involviert sein.

Weitere Analyse der fundamentalen Mechanismen wie immunologische Kaskaden den arteriellen Hypertonus fördernd, könnten zum Design neuer oder spezifischerer Therapien führen, die unerwünschte Nebeneffekte von derzeitigen immunsuppressiven Therapien vermeiden.

Die selektive Ablation von Monozyten beispielsweise könnte ein neues therapeutisches Fenster öffnen in der Behandlung der arteriellen Hypertonie. Eine genauer Charakterisierung des genauen Phänotyps Ihrer Aktivierung und potentiellen Ziele für pharmakologische Interventionen ist jedoch nötig bevor antiinflammatorische Therapien für den Blutdruck entwickelt werden können in der Zukunft.

Wie hier demonstriert schützt die Defizienz von IFN-γ und T-bet vor vaskulären oxidativen Stress, Inflammation und endothelialer und glattmuskulärer Dysfunktion in Antwort auf ATII. IFN-γ freigesetzt durch NK-Zellen scheint essentiell in der vaskulären Dysfunktion zu sein und benötigt die Anwesenheit von T-bet kompetenten LysM positiven Monozyten. Die Studie stimuliert möglicherweise weitere Forschung, potentiell neue therapeutische Targets zu finden, um gezielt die T-bet, IFN-γ oder NK-Zell Funktion zu regulieren. Durch die Behandlung der Inflammationsparameter neben der reinen Blutdruckabsenkung, könnte so die Atherogenese gemindert und die Risiken

für kardiovaskuläre Komplikationen wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall gesenkt werden.

Eine weitere neue Therapiemöglichkeit könnte in Zukunft der Einsatz von TLR-Antagonisten eröffnen, über die Einfluss auf das Entzündungsgeschehen im Gefäß genommen werden könnte [193, 194]. Die Aktivierung oder Blockade von TLRs stellt allgemein eine Möglichkeit dar, die Immunantwort in eine bestimmte Richtung zu lenken.

Interessanterweise verringern die als HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren und damit als Cholesterolsenker eingesetzten Statine die Expression von TLR2 und TLR4 [360]. Dies deutet darauf hin, dass eine verringerte Expression von TLRs tatsächlich prinzipiell zu einer antiatherogenen Wirkung beitragen könnte.

Die TLR-Antagonisten, die derzeit entwickelt werden, sind meist Strukturanaloga zu den natürlichen Liganden die zu keiner Signalweiterleitung führen. Eine zweite Möglichkeit TLRs zu blockieren besteht im Einsatz von anti-TLR-Antikörpern.

Im Rahmen der Behandlung der Sepsis, die über die Bindung von LPS an TLR4 ausgelöst werden kann, wurden bereits TLR-Blocker entwickelt und befinden sich in der klinischen Prüfung [361]. Da zahlreiche Untersuchungen auf eine klinisch relevante Beteiligung von TLR4 an der Entstehung und Progression von kardiovaskulären Krankheiten hindeuten, besteht Interesse auch hier Antagonisten, z.B. als antiatherosklerotische Pharmaka einzusetzen [192]. Es konnte beispielsweise im Tiermodell gezeigt werden, dass durch TLR4-Blockade bei kardialer Ischämie/Reperfusion sowohl die Infarktgröße als auch die NF- κ B Aktivität und Cytokinexpression in Wildtyp Mäusen herabgesetzt werden kann [362].

Auch direkte MyD88 Inhibitoren wurden bereits im Mausmodell eingesetzt. Die pharmakologische Inhibition von MyD88 mit ST2825 oder IMG2005) bzw. der siRNA Knockdown von MyD88 schütze im Modell des akuten Myokardinfarktes vor dem pathologischen linksventrikulären Umbau und der Ventrikel-Dilatation [363].

Demnach könnten Hemmstoffe des TLR-Signalwegs in Zukunft wichtig für die Prävention und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen werden [193, 194].

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle von myelomonozytären Zellen, IFN- γ (Interferon gamma), MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) und zugrundeliegenden Signalwege in der Angiotensin II (ATII)-induzierten vaskulären Inflammation, Dysfunktion und arteriellen Hypertonie untersucht.

Wie bereits veröffentlichte Vordaten aus meiner Arbeitsgruppe zeigten, schützt die Depletion von Lysozym M (LysM)⁺ myelomonozytären Zellen (Diphtheriatoxin-vermittelt in Mäusen, die transgen für den humanen Diphtheriatoxin-Rezeptor sind, LysM^{iDTR} Mäuse) vor der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion und arterieller Hypertonie, und kann durch adoptiven Zelltransfer von Wildtyp Monozyten wiederhergestellt werden.

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die Rekonstitution von Monozyten-depletierten LysM^{iDTR} Mäusen mit Wildtyp Monozyten den Phänotyp der vaskulären Dysfunktion wiederherstellen kann, die Rekonstitution mit gp91^{phox^{-/-}} oder Agtr1^{-/-} Monozyten jedoch nicht. Die Hypertonus-mediierenden Effekte dieser infiltrierenden Monozyten scheinen demnach von der intakten ATII und NADPH Oxidase Signalübertragung in diesen Zellen abhängig zu sein.

Vermutlich ebenfalls für die Aktivierung der Monozyten funktionell wichtig sind IFN- γ , produziert durch NK-Zellen, und der Transkriptionsfaktor T-bet (*T-box expressed in T cells*), exprimiert von NK-Zellen und Monozyten.

IFN- γ ^{-/-} Mäuse waren partiell geschützt vor der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion und charakterisiert durch reduzierte Level an Superoxid im Gefäß im Vergleich zu ATII-infundierten Wildtyp Mäusen. IFN- γ ^{-/-} und T-bet defiziente Tbx21^{-/-} Mäuse zeichneten sich ferner durch eine reduzierte ATII-medierte Rekrutierung von NK1.1⁺ NK-Zellen, als ein Hauptproduzent von IFN- γ , sowie CD11b⁺GR-1^{low} Interleukin-12 (IL-12) kompetenten Monozyten aus. Durch Depletions- und adoptive Transferexperimente konnte ich in dieser Arbeit NK-Zellen als essentielle Mitstreiter in der vaskulären Dysfunktion identifizieren und stellte fest, dass T-bet⁺LysM⁺ myelomonozytäre Zellen für die NK-Zellrekrutierung in die Gefäßwand und lokale IFN- γ Produktion benötigt werden. Damit wurde erstmals NK-Zellen eine essentielle Rolle in der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion zugeschrieben. Außerdem wurde der T-bet-IFN- γ Signalweg und die gegenseitige Monozyten-NK-Zellaktivierung als ein potentielles therapeutisches Ziel in kardiovaskulären Erkrankungen aufgedeckt.

Des Weiteren identifizierte ich in meiner Arbeit MyD88 als ein zentrales Signalmolekül in der ATII-getriebenen Inflammation und vaskulären Gefäßschädigung.

MyD88 Defizienz reduzierte den ATII-induzierten Anstieg des systolischen Blutdrucks und die endotheliale und glattmuskuläre vaskuläre Dysfunktion. Zusätzlich waren die vaskuläre Superoxid-Bildung sowie die Expressionslevel der NADPH Oxidase, der wichtigsten Quelle für oxidativem Stress im Gefäß, in ATII-infundierten MyD88^{-/-} Mäusen im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen deckte ich zudem auf, dass die ATII-induzierte Einwanderung von CD45⁺ Leukozyten, insbesondere CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} inflammatorischen Monozyten in MyD88^{-/-} Mäusen signifikant abgeschwächt war. Diese Resultate wurden durch immunhistochemische Untersuchung von Aortengewebe auf CD68⁺, F4/80⁺ und Nox2⁺ Makrophagen/Phagozyten sowie Expressionsanalysen von Inflammationsmarkern untermauert.

Analysen der mRNA Expression in Aortengewebe zeigten ferner eine in Wildtyp Mäusen nach ATII Infusion tendenziell gesteigerte Expression von inflammatorischen Monozytenmarkern sowie eine abnehmende Expression von reparativen Monozytenmarkern, während dieser Shift zu einem proinflammatorischen Phänotyp in MyD88^{-/-} blockiert zu sein schien. Dies zeigt eine Rolle von MyD88 in der terminalen Differenzierung von myelomonozytären Zellen an.

Um dies weitergehend zu untersuchen und aufzudecken, ob die MyD88 Effekte abhängig sind von Zellen der hämatopoetischen Linie oder Gewebszellen, wurden Knochenmarkstransferexperimente durchgeführt.

MyD88 Defizienz in Knochenmark-abstammende Zellen reduzierte die ATII-induzierte vaskuläre Dysfunktion und Infiltration der Gefäßwand mit CD45⁺ Leukozyten und inflammatorischen myelomonozytären Zellen.

Die protektiven Effekte der MyD88 Defizienz in der Angiotensin II-induzierten Inflammation konnten nicht auf Signalwege über die Toll-like Rezeptoren TLR2, -7 oder -9 zurückgeführt werden, wie die Untersuchung der vaskulären Reaktivität entsprechender Knockout Mäuse zeigte.

Zusammenfassend konnte ich in meiner Arbeit zeigen, dass die Infiltration der Gefäßwand mit Nox2⁺AT₁R⁺T-bet⁺MyD88⁺ myelomonozytären Zellen und die Wechselwirkung und gegenseitige Aktivierung dieser Zellen mit IFN- γ produzierenden NK-Zellen eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese der Angiotensin II (ATII)-induzierten vaskulären Dysfunktion, Inflammation und arteriellen Hypertonie einnehmen.

Summary

This thesis explores the role of myelomonocytic cells, IFN- γ (Interferon gamma), MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) and the underlying signaling pathways in Angiotensin II (ATII)-induced vascular inflammation, dysfunction and arterial hypertension.

As shown previously by my research group, depletion of Lysozyme (LysM⁺) myelomonocytic cells (diphtheria toxin-mediated in mice which are transgenic for the human Diphtheriatoxin receptor, LysM^{iDTR} mice) protects from ATII-induced vascular dysfunction and arterial hypertension and can be restored by adoptive transfer of wild type (wt) monocytes. Within this thesis I could demonstrate that neither reconstitution with gp91^{phox -/y} nor Agtr1^{-/-} monocytes was able to restore vascular dysfunction and blood pressure increase indicating that hypertension-mediating effects of infiltrating monocytes depend on an intact Nox2 and AT₁R signaling.

As I could show here also IFN- γ produced by NK cells and the transcription factor T-bet (T-box expressed in T cells) expression in NK cells as well as monocytes are functional important in the activation of monocytes. IFN- γ ^{-/-} mice were partially protected from ATII-induced vascular dysfunction and showed decreased superoxide levels in the vasculature compared to ATII-infused wild type controls. IFN- γ ^{-/-} and T-bet deficient Tbx21^{-/-} mice were characterized by ATII-mediated NK1.1⁺ NK cell as well as CD11b⁺GR-1^{low} Interleukin-12 (IL-12) competent monocytes recruitment. By depletion and adoptive transfer I identified NK cells as essential key players in vascular dysfunction and rendered evidence that T-bet⁺LysM⁺ myelomonocytic cells are required for NK cell recruitment into the vascular wall and local IFN- γ production. The work discloses the T-bet-IFN- γ pathway and mutual monocyte–NK-cell activation as potential therapeutic targets in cardiovascular disease.

Additionally I identified MyD88 as a central signaling molecule in ATII-driven inflammation and vascular injury. MyD88 deficiency attenuated the ATII-induced increase in systolic blood pressure and endothelial and vascular smooth muscle dysfunction. Additionally vascular superoxide generation as well as expression levels of NADPH oxidase as the most important source of superoxide in the vasculature was decreased in MyD88^{-/-} compared to C57BL/6 controls after ATII infusion. Furthermore, flow cytometric analysis revealed a significantly dampened infiltration of the aortic wall with CD45⁺ leukocytes, especially CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{high} inflammatory monocytes. These results were supported by immunohistochemical analysis of aortic tissue for macrophage and inflammation markers (CD68, F4/80, Nox2).

Analysis of mRNA expression levels also indicated that ATII treatment leads to a shift of monocytes to an inflammatory phenotype, which was blocked in MyD88^{-/-} mice indicating an essential role of MyD88 in terminal differentiation of monocytes.

To further reveal if the effects were dependent on the expression of MyD88 in hematopoietic cells or tissue cells, bone marrow transfer experiments were performed. MyD88 deficiency in bone marrow derived cells improved ATII-induced vascular dysfunction and dampened infiltration with CD45⁺ leukocytes and inflammatory myelomonocytic cells revealing a role of MyD88 expressed by inflammatory cells in ATII-induced vascular inflammation.

The protective effects of MyD88 deficiency and ATII-induced inflammation seem to be independent of TLR2, -7, or -9 demonstrated by vascular relaxation studies with corresponding TLR knockout mice.

In conclusion I could show within my doctoral thesis that infiltration of the aortic wall with Nox2⁺AT₁R⁺T-bet⁺MyD88⁺ myelomonocytic cells and their interplay and reciprocal activation with IFN- γ competent NK cells have a central role in the pathogenesis of ATII-induced vascular inflammation, dysfunction and arterial hypertension.

6 Literatur

1. Murray, C.J., et al., *UK health performance: findings of the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2013. **381**(9871): p. 997-1020.
2. Riede, U.-N., M. Werner, and H.-E. Schäfer, *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5., kompl. überarb. Aufl. ed. 2004, Stuttgart: Thieme. 1235 S., 1720 Abb., 168 Tab.
3. Fuster, V., et al., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2)*. N Engl J Med, 1992. **326**(5): p. 310-8.
4. Fuster, V., et al., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)*. N Engl J Med, 1992. **326**(4): p. 242-50.
5. Duguid, J.B., *Pathogenesis of atherosclerosis*. Lancet, 1949. **2**(6586): p. 925-7.
6. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)*. N Engl J Med, 1976. **295**(8): p. 420-5.
7. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)*. N Engl J Med, 1976. **295**(7): p. 369-77.
8. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
9. Kearney, P.M., et al., *Global burden of hypertension: analysis of worldwide data*. Lancet, 2005. **365**(9455): p. 217-23.
10. Gesellschaft, D.H.e.V.D.H., *Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung der arteriellen Hypertonie*. Nieren- und Hochdruckkrankheiten, 2005. **34**(11): p. 481-498.
11. Berry, J.D., et al., *Lifetime risks of cardiovascular disease*. N Engl J Med, 2012. **366**(4): p. 321-9.
12. Carretero, O.A. and S. Oparil, *Essential hypertension. Part I: definition and etiology*. Circulation, 2000. **101**(3): p. 329-35.
13. Soubrier, F., et al., *Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: II. Structure-function. Gene polymorphism and clinical implications*. J Hypertens, 1993. **11**(6): p. 599-604.
14. De Gasparo, M., *[AT(1) and AT(2) angiotensin II receptors: key features]*. Drugs, 2002. **62 Spec No 1**: p. 1-10.
15. Verheijen, I., et al., *AT1 receptor antagonists*. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents, 2004. **2**(1): p. 69-77.
16. Touyz, R.M., *Recent advances in intracellular signalling in hypertension*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003. **12**(2): p. 165-74.
17. Timmermans, P.B., et al., *Angiotensin II receptor subtypes*. Am J Hypertens, 1992. **5**(6 Pt 1): p. 406-10.
18. Obermuller, N., et al., *Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat brain nuclei*. Neurosci Lett, 1991. **132**(1): p. 11-5.
19. Tsutsumi, K. and J.M. Saavedra, *Angiotensin-II receptor subtypes in median eminence and basal forebrain areas involved in regulation of pituitary function*. Endocrinology, 1991. **129**(6): p. 3001-8.
20. Matsubara, H., et al., *Tissue-specific expression of human angiotensin II AT1 and AT2 receptors and cellular localization of subtype mRNAs in*

- adult human renal cortex using in situ hybridization.* Nephron, 1998. **80**(1): p. 25-34.
21. Rasini, E., et al., *Angiotensin II type 1 receptor expression on human leukocyte subsets: a flow cytometric and RT-PCR study.* Regul Pept, 2006. **134**(2-3): p. 69-74.
 22. Jurewicz, M., et al., *Human T and natural killer cells possess a functional renin-angiotensin system: further mechanisms of angiotensin II-induced inflammation.* J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(4): p. 1093-102.
 23. Nahmod, K.A., et al., *Control of dendritic cell differentiation by angiotensin II.* FASEB J, 2003. **17**(3): p. 491-3.
 24. Hoch, N.E., et al., *Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009. **296**(2): p. R208-16.
 25. Nagata, K., et al., *Effects of blockade of the renin-angiotensin system on tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in human cultured monocytes.* J Hypertens, 2001. **19**(4): p. 775-83.
 26. Dzau, V.J. and G.H. Gibbons, *Autocrine-paracrine mechanisms of vascular myocytes in systemic hypertension.* Am J Cardiol, 1987. **60**(17): p. 991-1031.
 27. Tang, S.S., et al., *Characterization of nuclear angiotensin-II-binding sites in rat liver and comparison with plasma membrane receptors.* Endocrinology, 1992. **131**(1): p. 374-80.
 28. Stock, P., et al., *Local renin-angiotensin systems in cardiovascular tissues: localization and functional role.* Cardiology, 1995. **86 Suppl 1**: p. 2-8.
 29. Hunyady, L. and K.J. Catt, *Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II.* Molecular endocrinology, 2006. **20**(5): p. 953-70.
 30. Porrello, E.R., L.M. Delbridge, and W.G. Thomas, *The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor.* Frontiers in bioscience, 2009. **14**: p. 958-72.
 31. Carey, R.M., Z.Q. Wang, and H.M. Siragy, *Update: role of the angiotensin type-2 (AT(2)) receptor in blood pressure regulation.* Curr Hypertens Rep, 2000. **2**(2): p. 198-201.
 32. Nakamura, T., et al., *Blocking angiotensin II ameliorates proteinuria and glomerular lesions in progressive mesangioproliferative glomerulonephritis.* Kidney Int, 1999. **55**(3): p. 877-89.
 33. Stoll, M., et al., *The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells.* J Clin Invest, 1995. **95**(2): p. 651-7.
 34. Ishida, J. and A. Fukamizu, *[Angiotensin II and apoptosis].* Nihon Rinsho, 1999. **57**(5): p. 1117-23.
 35. Kakar, S.S., et al., *Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation.* Biochem Biophys Res Commun, 1992. **183**(3): p. 1090-6.
 36. Sandberg, K., et al., *Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype.* J Biol Chem, 1992. **267**(14): p. 9455-8.
 37. Burson, J.M., et al., *Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse.* Am J Physiol, 1994. **267**(2 Pt 1): p. E260-7.

38. Oliverio, M.I. and T.M. Coffman, *Angiotensin II Receptor Physiology Using Gene Targeting*. News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society, 2000. **15**: p. 171-175.
39. Unger, T., et al., *Angiotensin receptors*. J Hypertens Suppl, 1996. **14**(5): p. S95-103.
40. de Gasparo, M., et al., *International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors*. Pharmacological reviews, 2000. **52**(3): p. 415-72.
41. Ai, D., J.Y. Shyy, and Y. Zhu, *Linking an insect enzyme to hypertension: angiotensin II-epoxide hydrolase interactions*. Kidney Int, 2010. **77**(2): p. 88-92.
42. Noda, K., et al., *The active state of the AT1 angiotensin receptor is generated by angiotensin II induction*. Biochemistry, 1996. **35**(51): p. 16435-42.
43. Balla, T., et al., *Signaling events activated by angiotensin II receptors: what goes before and after the calcium signals*. Endocrine research, 1998. **24**(3-4): p. 335-44.
44. Berk, B.C., *Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: pathways activated by specific tyrosine kinases*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10 Suppl 11**: p. S62-8.
45. Marrero, M.B., et al., *Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor*. Nature, 1995. **375**(6528): p. 247-50.
46. Ruiz-Ortega, M., et al., *Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms*. Circ Res, 2000. **86**(12): p. 1266-72.
47. Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N Engl J Med, 1989. **320**(14): p. 915-24.
48. Hernandez-Presa, M., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis*. Circulation, 1997. **95**(6): p. 1532-41.
49. Zhang, H., et al., *Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases*. Cardiovasc Res, 1999. **44**(1): p. 215-22.
50. Fishman, A.P., *Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities*. Ann N Y Acad Sci, 1982. **401**: p. 1-8.
51. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
52. Ignarro, L.J., *Signal transduction mechanisms involving nitric oxide*. Biochem Pharmacol, 1991. **41**(4): p. 485-90.
53. Garg, U.C. and A. Hassid, *Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1989. **83**(5): p. 1774-7.

54. De Caterina, R., et al., *Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines.* J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 60-8.
55. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5193-7.
56. Radomski, M.W., et al., *Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide.* Cardiovasc Res, 1993. **27**(7): p. 1380-2.
57. Sneddon, J.M. and J.R. Vane, *Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(8): p. 2800-4.
58. Bath, P.M., et al., *Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro.* Arterioscler Thromb, 1991. **11**(2): p. 254-60.
59. Charles, I.G., et al., *Cloning and expression of a rat neuronal nitric oxide synthase coding sequence in a baculovirus/insect cell system.* Biochem Biophys Res Commun, 1993. **196**(3): p. 1481-9.
60. MacNaul, K.L. and N.I. Hutchinson, *Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions.* Biochem Biophys Res Commun, 1993. **196**(3): p. 1330-4.
61. Knowles, R.G. and S. Moncada, *Nitric oxide synthases in mammals.* Biochem J, 1994. **298 (Pt 2)**: p. 249-58.
62. Ganster, R.W., et al., *Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8638-43.
63. Gao, J., et al., *An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide.* J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 1226-30.
64. Nathan, C. and Q.W. Xie, *Regulation of biosynthesis of nitric oxide.* J Biol Chem, 1994. **269**(19): p. 13725-8.
65. Forstermann, U., et al., *Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions.* Hypertension, 1994. **23**(6 Pt 2): p. 1121-31.
66. Stuehr, D., S. Pou, and G.M. Rosen, *Oxygen reduction by nitric-oxide synthases.* J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 14533-6.
67. Denninger, J.W. and M.A. Marletta, *Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway.* Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 334-50.
68. Horowitz, A., et al., *Mechanisms of smooth muscle contraction.* Physiol Rev, 1996. **76**(4): p. 967-1003.
69. Lewicki, J.A., et al., *Properties of purified soluble guanylate cyclase activated by nitric oxide and sodium nitroprusside.* J Cyclic Nucleotide Res, 1982. **8**(1): p. 17-25.
70. Bolotina, V.M., et al., *Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle.* Nature, 1994. **368**(6474): p. 850-3.

71. Sausbier, M., et al., *Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation*. *Circ Res*, 2000. **87**(9): p. 825-30.
72. Soderling, S.H. and J.A. Beavo, *Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions*. *Curr Opin Cell Biol*, 2000. **12**(2): p. 174-9.
73. Münzel, T. and T. Gori, *Endotheliale Dysfunktion: Ursachen und prognostische Bedeutung*. *Kardiologie up2date*, 2009. **5**: p. 361-370.
74. Gimbrone, M.A., Jr., et al., *Vascular endothelium. An integrator of pathophysiological stimuli in atherogenesis*. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. **748**: p. 122-31; discussion 131-2.
75. Perticone, F., et al., *Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients*. *Circulation*, 2001. **104**(2): p. 191-6.
76. Ohara, Y., T.E. Peterson, and D.G. Harrison, *Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(6): p. 2546-51.
77. Busse, R. and I. Fleming, *Endothelial dysfunction in atherosclerosis*. *Journal of vascular research*, 1996. **33**(3): p. 181-94.
78. Harrison, D.G., *Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(9): p. 2153-7.
79. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. *Circ Res*, 2000. **87**(10): p. 840-4.
80. Lum, H. and K.A. Roebuck, *Oxidant stress and endothelial cell dysfunction*. *American journal of physiology. Cell physiology*, 2001. **280**(4): p. C719-41.
81. Celermajer, D.S., et al., *Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis*. *Lancet*, 1992. **340**(8828): p. 1111-5.
82. Clarkson, P., et al., *Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(8): p. 1989-94.
83. Iiyama, K., et al., *Impaired endothelial function with essential hypertension assessed by ultrasonography*. *Am Heart J*, 1996. **132**(4): p. 779-82.
84. Sorensen, K.E., et al., *Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level*. *J Clin Invest*, 1994. **93**(1): p. 50-5.
85. Clarkson, P., et al., *Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels*. *J Am Coll Cardiol*, 1996. **28**(3): p. 573-9.
86. Clarkson, P., et al., *Endothelium-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease*. *Circulation*, 1997. **96**(10): p. 3378-83.
87. Celermajer, D.S., et al., *Impaired endothelial function occurs in the systemic arteries of children with homozygous homocystinuria but not in their heterozygous parents*. *J Am Coll Cardiol*, 1993. **22**(3): p. 854-8.
88. Kari, J.A., et al., *Physiology and biochemistry of endothelial function in children with chronic renal failure*. *Kidney Int*, 1997. **52**(2): p. 468-72.
89. Griending, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. *Circ Res*, 2000. **86**(5): p. 494-501.

90. Kojda, G. and D. Harrison, *Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 562-71.
91. Goldstein, S. and G. Czapski, *The reaction of NO. with O₂.- and HO₂.: a pulse radiolysis study*. Free Radic Biol Med, 1995. **19**(4): p. 505-10.
92. Kuzkaya, N., et al., *Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 22546-54.
93. Forstermann, U. and T. Munzel, *Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace*. Circulation, 2006. **113**(13): p. 1708-14.
94. Munzel, T., et al., *Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(8): p. 1551-7.
95. Heitzer, T., H. Just, and T. Munzel, *Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers*. Circulation, 1996. **94**(1): p. 6-9.
96. Hornig, B., et al., *Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure*. Circulation, 1998. **97**(4): p. 363-8.
97. Ting, H.H., et al., *Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1996. **97**(1): p. 22-8.
98. Taddei, S., et al., *Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension*. Circulation, 1998. **97**(22): p. 2222-9.
99. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
100. Uhlinger, D.J., et al., *The respiratory burst oxidase of human neutrophils. Guanine nucleotides and arachidonate regulate the assembly of a multicomponent complex in a semirecombinant cell-free system*. J Biol Chem, 1993. **268**(12): p. 8624-31.
101. Lassegue, B., et al., *Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways*. Circ Res, 2001. **88**(9): p. 888-94.
102. Gorlach, A., et al., *A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall*. Circ Res, 2000. **87**(1): p. 26-32.
103. Sorescu, G.P., et al., *Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase*. Circ Res, 2004. **95**(8): p. 773-9.
104. Chamseddine, A.H. and F.J. Miller, Jr., *Gp91phox contributes to NADPH oxidase activity in aortic fibroblasts but not smooth muscle cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(6): p. H2284-9.

105. Ellmark, S.H., et al., *The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(2): p. 495-504.
106. Van Buul, J.D., et al., *Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(3-4): p. 308-17.
107. Segal, A.W. and O.T. Jones, *Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes*. Nature, 1978. **276**(5687): p. 515-7.
108. Takeya, R., et al., *Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases*. J Biol Chem, 2003. **278**(27): p. 25234-46.
109. Clark, R.A., et al., *Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation*. J Clin Invest, 1990. **85**(3): p. 714-21.
110. Quinn, M.T., et al., *Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components*. J Biol Chem, 1993. **268**(28): p. 20983-7.
111. Wientjes, F.B., et al., *p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains*. Biochem J, 1993. **296** (Pt 3): p. 557-61.
112. De Keulenaer, G.W., et al., *Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle*. Biochem J, 1998. **329** (Pt 3): p. 653-7.
113. De Keulenaer, G.W., et al., *Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase*. Circ Res, 1998. **82**(10): p. 1094-101.
114. Drummond, G.R., et al., *Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets*. Nature reviews. Drug discovery, 2011. **10**(6): p. 453-71.
115. Rueckschloss, U., et al., *Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(11): p. 1845-51.
116. Zalba, G., et al., *Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase*. Hypertension, 2001. **38**(6): p. 1395-9.
117. Dikalova, A., et al., *Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice*. Circulation, 2005. **112**(17): p. 2668-76.
118. Matsuno, K., et al., *Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice*. Circulation, 2005. **112**(17): p. 2677-85.
119. Bendall, J.K., et al., *Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice*. Circulation, 2002. **105**(3): p. 293-6.
120. Lavigne, M.C., et al., *Genetic demonstration of p47phox-dependent superoxide anion production in murine vascular smooth muscle cells*. Circulation, 2001. **104**(1): p. 79-84.
121. Wingler, K., et al., *Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(11): p. 1456-64.

122. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
123. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, 1997. **388**(6640): p. 394-7.
124. Gay, N.J. and F.J. Keith, *Drosophila Toll and IL-1 receptor*. Nature, 1991. **351**(6325): p. 355-6.
125. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
126. Hopkins, P.A. and S. Sriskandan, *Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond*. Clin Exp Immunol, 2005. **140**(3): p. 395-407.
127. Gill, R., A. Tsung, and T. Billiar, *Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors*. Free Radic Biol Med, 2010. **48**(9): p. 1121-32.
128. Frantz, S., et al., *Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium*. J Clin Invest, 1999. **104**(3): p. 271-80.
129. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. **17**(1): p. 1-14.
130. Kawai, T. and S. Akira, *Pathogen recognition with Toll-like receptors*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(4): p. 338-44.
131. Bowie, A. and L.A. O'Neill, *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(4): p. 508-14.
132. Hashimoto, C., K.L. Hudson, and K.V. Anderson, *The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein*. Cell, 1988. **52**(2): p. 269-79.
133. Rock, F.L., et al., *A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(2): p. 588-93.
134. Janssens, S. and R. Beyaert, *A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(9): p. 474-82.
135. Oshiumi, H., et al., *TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction*. Nat Immunol, 2003. **4**(2): p. 161-7.
136. Adachi, O., et al., *Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function*. Immunity, 1998. **9**(1): p. 143-50.
137. O'Neill, L.A., D. Golenbock, and A.G. Bowie, *The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(6): p. 453-60.
138. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Semin Immunol, 2007. **19**(1): p. 24-32.
139. White, F.N. and A. Grollman, *Autoimmune Factors Associated with Infarction of the Kidney*. Nephron, 1964. **1**: p. 93-102.
140. Svendsen, U.G., *Evidence for an initial, thymus independent and a chronic, thymus dependent phase of DOCA and salt hypertension in mice*. Acta Pathol Microbiol Scand A, 1976. **84**(6): p. 523-8.
141. Olsen, F., *Transfer of arterial hypertension by splenic cells from DOCA-salt hypertensive and renal hypertensive rats to normotensive recipients*. Acta Pathol Microbiol Scand C, 1980. **88**(1): p. 1-5.
142. Viridis, A. and E.L. Schiffrin, *Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension?* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003. **12**(2): p. 181-7.

143. Barnes, P.J. and M. Karin, *Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases*. N Engl J Med, 1997. **336**(15): p. 1066-71.
144. Cheng, Z.J., H. Vapaatalo, and E. Mervaala, *Angiotensin II and vascular inflammation*. Med Sci Monit, 2005. **11**(6): p. RA194-205.
145. Androulakis, E.S., et al., *Essential hypertension: is there a role for inflammatory mechanisms?* Cardiology in review, 2009. **17**(5): p. 216-21.
146. Victorino, G.P., C.R. Newton, and B. Curran, *Effect of angiotensin II on microvascular permeability*. J Surg Res, 2002. **104**(2): p. 77-81.
147. Suzuki, Y., et al., *Inflammation and angiotensin II*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(6): p. 881-900.
148. Kansas, G.S., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3259-87.
149. Keelan, E.T., et al., *Characterization of E-selectin expression in vivo with use of a radiolabeled monoclonal antibody*. Am J Physiol, 1994. **266**(1 Pt 2): p. H278-90.
150. Ley, K., *The role of selectins in inflammation and disease*. Trends Mol Med, 2003. **9**(6): p. 263-8.
151. Pastore, L., et al., *Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo*. Circulation, 1999. **100**(15): p. 1646-52.
152. Tummala, P.E., et al., *Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis*. Circulation, 1999. **100**(11): p. 1223-9.
153. Touyz, R.M., *Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2005. **14**(2): p. 125-31.
154. Chen, X.L., et al., *Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1998. **83**(9): p. 952-9.
155. Wolf, G., et al., *Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta*. J Clin Invest, 1993. **92**(3): p. 1366-72.
156. Su, E.J., et al., *Mitogenic effect of angiotensin II on rat carotid arteries and type II or III mesenteric microvessels but not type I mesenteric microvessels is mediated by endogenous basic fibroblast growth factor*. Circ Res, 1998. **82**(3): p. 321-7.
157. Castoldi, G., et al., *ANG II increases TIMP-1 expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(2): p. H635-43.
158. Mills, P.J., et al., *Peripheral blood mononuclear cell CD62L and CD11a expression and soluble interstitial cell adhesion molecule-1 levels following infused isoproterenol in hypertension*. J Hypertens, 2002. **20**(2): p. 311-6.
159. Ross, R., *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. Am Heart J, 1999. **138**(5 Pt 2): p. S419-20.

160. Bataillard, A., C. Renaudin, and J. Sassard, *Silica attenuates hypertension in Lyon hypertensive rats*. J Hypertens, 1995. **13**(12 Pt 2): p. 1581-4.
161. Dai, Q., et al., *Angiotensin AT1 receptor antagonists exert anti-inflammatory effects in spontaneously hypertensive rats*. Br J Pharmacol, 2007. **152**(7): p. 1042-8.
162. Dorffel, Y., et al., *Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension*. Hypertension, 1999. **34**(1): p. 113-7.
163. Hahn, A.W., et al., *Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II*. FEBS Lett, 1994. **347**(2-3): p. 178-80.
164. Ishibashi, M., et al., *Critical role of monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 on monocytes in hypertension-induced vascular inflammation and remodeling*. Circ Res, 2004. **94**(9): p. 1203-10.
165. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
166. Shi, C. and E.G. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 762-74.
167. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
168. Swirski, F.K., et al., *Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 195-205.
169. Lapteva, N., et al., *Activation and suppression of renin-angiotensin system in human dendritic cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(1): p. 194-200.
170. Muller, D.N., et al., *Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II-induced renal damage*. Am J Pathol, 2002. **161**(5): p. 1679-93.
171. Ji, Y., et al., *Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells*. Cell Physiol Biochem, 2009. **23**(4-6): p. 265-76.
172. Lv, J., et al., *Candesartan attenuates Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis via TLR4/MyD88 pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **380**(1): p. 81-6.
173. Yang, J., et al., *Valsartan preconditioning protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through TLR4/NF-kappaB signaling pathway*. Mol Cell Biochem, 2009. **330**(1-2): p. 39-46.
174. Kvakan, H., et al., *Regulatory T cells ameliorate angiotensin II-induced cardiac damage*. Circulation, 2009. **119**(22): p. 2904-12.
175. Crowley, S.D., et al., *Stimulation of lymphocyte responses by angiotensin II promotes kidney injury in hypertension*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(2): p. F515-24.
176. Guzik, T.J., et al., *Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction*. J Exp Med, 2007. **204**(10): p. 2449-60.
177. Madhur, M.S., et al., *Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction*. Hypertension, 2010. **55**(2): p. 500-7.

178. Benigni, A., P. Cassis, and G. Remuzzi, *Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging*. EMBO molecular medicine, 2010. **2**(7): p. 247-57.
179. Cook, D.N., D.S. Pisetsky, and D.A. Schwartz, *Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 975-9.
180. Kiechl, S., et al., *Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis*. N Engl J Med, 2002. **347**(3): p. 185-92.
181. Ameziane, N., et al., *Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(12): p. e61-4.
182. Boekholdt, S.M., et al., *Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events*. Circulation, 2003. **107**(19): p. 2416-21.
183. Shishido, T., et al., *Central role of endogenous Toll-like receptor-2 activation in regulating inflammation, reactive oxygen species production, and subsequent neointimal formation after vascular injury*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(4): p. 1446-53.
184. Ziegler, G., et al., *TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **359**(3): p. 574-9.
185. Favre, J., et al., *Toll-like receptors 2-deficient mice are protected against postischemic coronary endothelial dysfunction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(5): p. 1064-71.
186. Schoneveld, A.H., et al., *Toll-like receptor 2 stimulation induces intimal hyperplasia and atherosclerotic lesion development*. Cardiovasc Res, 2005. **66**(1): p. 162-9.
187. Kiemer, A.K., *Angeborenes Immunsystem: TLR eröffnen neue Möglichkeiten*. Pharmazeutische Zeitung, 2008. **04**.
188. Hua, F., et al., *Blocking the MyD88-dependent pathway protects the myocardium from ischemia/reperfusion injury in rat hearts*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(2): p. 1118-25.
189. Feng, Y., et al., *Innate immune adaptor MyD88 mediates neutrophil recruitment and myocardial injury after ischemia-reperfusion in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(3): p. H1311-H1318.
190. Feng, Y., et al., *Bone marrow MyD88 signaling modulates neutrophil function and ischemic myocardial injury*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **299**(4): p. C760-9.
191. Owens, A.P., 3rd, et al., *MyD88 deficiency attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation independent of signaling through Toll-like receptors 2 and 4*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(12): p. 2813-9.
192. Oude Nijhuis, M.M., et al., *Activation of the innate immune system in atherosclerotic disease*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(10): p. 983-94.
193. Frantz, S., G. Ertl, and J. Bauersachs, *Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2007. **4**(8): p. 444-54.
194. Andreaskos, E., B. Foxwell, and M. Feldmann, *Is targeting Toll-like receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to modulating cytokine-driven inflammation?* Immunol Rev, 2004. **202**: p. 250-65.

195. Wenzel, P., et al., *Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular dysfunction*. *Circulation*, 2011. **124**(12): p. 1370-81.
196. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(2): p. 163-89.
197. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(5): p. 503-10.
198. Munder, M., et al., *Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation*. *J Exp Med*, 1998. **187**(12): p. 2103-8.
199. van Boxel-Dezaire, A.H. and G.R. Stark, *Cell type-specific signaling in response to interferon-gamma*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2007. **316**: p. 119-54.
200. Sad, S., R. Marcotte, and T.R. Mosmann, *Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines*. *Immunity*, 1995. **2**(3): p. 271-9.
201. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. *Annu Rev Immunol*, 1989. **7**: p. 145-73.
202. Wang, X. and T. Mosmann, *In vivo priming of CD4 T cells that produce interleukin (IL)-2 but not IL-4 or interferon (IFN)-gamma, and can subsequently differentiate into IL-4- or IFN-gamma-secreting cells*. *The Journal of experimental medicine*, 2001. **194**(8): p. 1069-80.
203. Frucht, D.M., et al., *IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge*. *Trends Immunol*, 2001. **22**(10): p. 556-60.
204. Lazarevic, V. and L.H. Glimcher, *T-bet in disease*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(7): p. 597-606.
205. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. *Cell*, 2000. **100**(6): p. 655-69.
206. Lord, G.M., et al., *T-bet is required for optimal proinflammatory CD4+ T-cell trafficking*. *Blood*, 2005. **106**(10): p. 3432-9.
207. Townsend, M.J., et al., *T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells*. *Immunity*, 2004. **20**(4): p. 477-94.
208. Esensten, J.H., et al., *T-bet-deficient NOD mice are protected from diabetes due to defects in both T cell and innate immune system function*. *J Immunol*, 2009. **183**(1): p. 75-82.
209. Juedes, A.E., et al., *T-bet controls autoaggressive CD8 lymphocyte responses in type 1 diabetes*. *J Exp Med*, 2004. **199**(8): p. 1153-62.
210. Bettelli, E., et al., *Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Exp Med*, 2004. **200**(1): p. 79-87.
211. Lovett-Racke, A.E., et al., *Silencing T-bet defines a critical role in the differentiation of autoreactive T lymphocytes*. *Immunity*, 2004. **21**(5): p. 719-31.
212. Peng, S.L., S.J. Szabo, and L.H. Glimcher, *T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(8): p. 5545-50.

213. Neurath, M.F., et al., *The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease*. J Exp Med, 2002. **195**(9): p. 1129-43.
214. Wang, J., et al., *Transcription factor T-bet regulates inflammatory arthritis through its function in dendritic cells*. J Clin Invest, 2006. **116**(2): p. 414-21.
215. Tellides, G., et al., *Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes*. Nature, 2000. **403**(6766): p. 207-11.
216. Leon, M.L. and S.H. Zuckerman, *Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis*. Inflamm Res, 2005. **54**(10): p. 395-411.
217. Shao, J., et al., *Imbalance of T-cell subsets in angiotensin II-infused hypertensive rats with kidney injury*. Hypertension, 2003. **42**(1): p. 31-8.
218. Crowley, S.D., et al., *Lymphocyte responses exacerbate angiotensin II-dependent hypertension*. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology, 2010. **298**(4): p. R1089-97.
219. Marko, L., et al., *Interferon-gamma signaling inhibition ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage*. Hypertension, 2012. **60**(6): p. 1430-6.
220. Kossmann, S., et al., *Angiotensin II-Induced Vascular Dysfunction Depends on Interferon-gamma- Driven Immune Cell Recruitment and Mutual Activation of Monocytes and NK-Cells*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2013. **33**(6): p. 1313-9.
221. Schmidgen, M.I., *Der Transkriptionsfaktor T-box expressed in T cells (T-bet) vermittelt Gefäßdysfunktion und oxidativen Stress in der Angiotensin II-induzierten arteriellen Hypertonie (Dissertation)*, Department of Medicine 2013: Johannes Gutenberg-University Mainz.
222. Ito, M., et al., *Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3521-5.
223. Buch, T., et al., *A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration*. Nat Methods, 2005. **2**(6): p. 419-26.
224. Pollock, J.D., et al., *Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production*. Nat Genet, 1995. **9**(2): p. 202-9.
225. Dalton, D.K., et al., *Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes*. Science, 1993. **259**(5102): p. 1739-42.
226. Finotto, S., et al., *Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet*. Science, 2002. **295**(5553): p. 336-8.
227. Wooten, R.M., et al., *Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to Borrelia burgdorferi*. J Immunol, 2002. **168**(1): p. 348-55.
228. Hemmi, H., et al., *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 196-200.
229. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.

230. Clausen, B.E., et al., *Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice*. Transgenic Res, 1999. **8**(4): p. 265-77.
231. Goren, I., et al., *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, 2009. **175**(1): p. 132-47.
232. Theeuwes, F., *Elementary osmotic pump*. J Pharm Sci, 1975. **64**(12): p. 1987-91.
233. Theeuwes, F. and S.I. Yum, *Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations*. Ann Biomed Eng, 1976. **4**(4): p. 343-53.
234. Butz, G.M. and R.L. Davisson, *Long-term telemetric measurement of cardiovascular parameters in awake mice: a physiological genomics tool*. Physiol Genomics, 2001. **5**(2): p. 89-97.
235. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 77-89.
236. Boyum, A., *Isolation and removal of lymphocytes from bone marrow of rats and guinea-pigs*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 91-106.
237. Chen, C.F., et al., *Xenotransplantation of microencapsulated canine islets into diabetic rats*. Artif Organs, 1994. **18**(3): p. 193-7.
238. Schumm, M., et al., *Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device*. J Hematother, 1999. **8**(2): p. 209-18.
239. Daiber, A., Münzel T, *Pentaerythryltetranitrat - Oxidativer Stress, Redoxregulation und NO-Bioverfügbarkeit - experimentelle und klinische Aspekte*. Vol. I. 2006, Darmstadt: Steinkopff Verlag.
240. Zeiher, A.M. and V. Schachinger, *Coronary endothelial vasodilator dysfunction: clinical relevance and therapeutic implications*. Z Kardiol, 1994. **83 Suppl 4**: p. 7-14.
241. Ludmer, P.L., et al., *Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries*. N Engl J Med, 1986. **315**(17): p. 1046-51.
242. Vita, J.A., et al., *Patients with evidence of coronary endothelial dysfunction as assessed by acetylcholine infusion demonstrate marked increase in sensitivity to constrictor effects of catecholamines*. Circulation, 1992. **85**(4): p. 1390-7.
243. Nabel, E.G., et al., *Dilation of normal and constriction of atherosclerotic coronary arteries caused by the cold pressor test*. Circulation, 1988. **77**(1): p. 43-52.
244. Gerbes, A.M., *Vasoprotektive Effekte des nicht-selektiven Endothelin-1-Rezeptorantagonisten Bosentan auf die Gefäßreagibilität und endotheliale Superoxidanionenbildung nitratoleranter Ratten (Dissertation)*, Department of Medicine 2009: Eppendorf-Hamburg.
245. Munzel, T., et al., *Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance*. J Clin Invest, 1995. **95**(1): p. 187-94.

246. Munzel, T., et al., *Evidence for a role of endothelin 1 and protein kinase C in nitroglycerin tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 5244-8.
247. Schuhmacher, S., et al., *A new class of organic nitrates: investigations on bioactivation, tolerance and cross-tolerance phenomena*. Br J Pharmacol, 2009. **158**(2): p. 510-20.
248. Koenig, A., et al., *NO donors. Part 16: investigations on structure-activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator*. Bioorg Med Chem Lett, 2007. **17**(21): p. 5881-5.
249. Koenig, A., et al., *Potency and in vitro tolerance of organic nitrates: partially denitrated metabolites contribute to the tolerance-devoid activity of pentaerythrityl tetranitrate*. J Cardiovasc Pharmacol, 2007. **50**(1): p. 68-74.
250. Zhao, H., et al., *Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(11): p. 1359-68.
251. Zhao, H., et al., *Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(16): p. 5727-32.
252. Dikalov, S., K.K. Griendling, and D.G. Harrison, *Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies*. Hypertension, 2007. **49**(4): p. 717-27.
253. Zielonka, J. and B. Kalyanaraman, *Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth*. Free Radic Biol Med, 2010. **48**(8): p. 983-1001.
254. Kalyanaraman, B., et al., *Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(1): p. 1-6.
255. Daiber, A., et al., *Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(1): p. 101-11.
256. Nishinaka, Y., et al., *A new sensitive chemiluminescence probe, L-012, for measuring the production of superoxide anion by cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **193**(2): p. 554-9.
257. Kielland, A., et al., *In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in inflammation using the luminescent probe L-012*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(6): p. 760-6.
258. Imada, I., et al., *Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012*. Anal Biochem, 1999. **271**(1): p. 53-8.
259. Repine, J.E., et al., *Effects of phorbol myristate acetate on the metabolism and ultrastructure of neutrophils in chronic granulomatous disease*. J Clin Invest, 1974. **54**(1): p. 83-90.
260. Tauber, A.I., *Protein kinase C and the activation of the human neutrophil NADPH-oxidase*. Blood, 1987. **69**(3): p. 711-20.
261. Tauber, A.I., et al., *Relation of human neutrophil phorbol ester receptor occupancy and NADPH-oxidase activity*. Blood, 1982. **60**(2): p. 333-9.

262. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
263. Compton, S.J. and C.G. Jones, *Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay*. Anal Biochem, 1985. **151**(2): p. 369-74.
264. Chial, H.J., H.B. Thompson, and A.G. Splittgerber, *A spectral study of the charge forms of Coomassie blue G*. Anal Biochem, 1993. **209**(2): p. 258-66.
265. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
266. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
267. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
268. Dilella, B.A., L.A. Penberthy, and C.G. Fraser, *Six methods for determining urinary protein compared*. Clin Chem, 1983. **29**(3): p. 553-7.
269. McElderry, L.A., I.F. Tarbit, and A.J. Cassells-Smith, *Six methods for urinary protein compared*. Clin Chem, 1982. **28**(2): p. 356-60.
270. Yosselson-Superstine, S. and Y. Sinai, *Drug interference with urine protein determination*. J Clin Chem Clin Biochem, 1986. **24**(1): p. 103-6.
271. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. Nat Protoc, 2006. **1**(2): p. 581-5.
272. Puissant, C. and L.M. Houdebine, *An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Biotechniques, 1990. **8**(2): p. 148-9.
273. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
274. Huggett, J., et al., *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. Genes Immun, 2005. **6**(4): p. 279-84.
275. Nolan, T., R.E. Hands, and S.A. Bustin, *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1559-82.
276. Clegg, R.M., et al., *Observing the helical geometry of double-stranded DNA in solution by fluorescence resonance energy transfer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(7): p. 2994-8.
277. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
278. Doerfler, W., *Malignant transformation of cells by DNA viruses: adenovirus DNA integration in the mammalian genome*. Crit Rev Oncog, 1989. **1**(2): p. 211-9.
279. Soderquest, K., et al., *Monocytes control natural killer cell differentiation to effector phenotypes*. Blood, 2011. **117**(17): p. 4511-8.

280. Griendling, K.K., et al., *Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells*. *Circ Res*, 1994. **74**(6): p. 1141-8.
281. El Bekay, R., et al., *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*, 2003. **102**(2): p. 662-71.
282. Kintscher, U., et al., *Angiotensin II induces migration and Pyk2/paxillin phosphorylation of human monocytes*. *Hypertension*, 2001. **37**(2 Pt 2): p. 587-93.
283. Liu, J., et al., *NAD(P)H oxidase mediates angiotensin II-induced vascular macrophage infiltration and medial hypertrophy*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(5): p. 776-82.
284. Satriano, J.A., et al., *Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase*. *J Clin Invest*, 1993. **92**(3): p. 1564-71.
285. Stanley, E.R., et al., *CSF-1--a mononuclear phagocyte lineage-specific hemopoietic growth factor*. *J Cell Biochem*, 1983. **21**(2): p. 151-9.
286. Wang, J.M., et al., *Induction of monocyte migration by recombinant macrophage colony-stimulating factor*. *J Immunol*, 1988. **141**(2): p. 575-9.
287. Lieschke, G.J., et al., *Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization*. *Blood*, 1994. **84**(6): p. 1737-46.
288. Wiktor-Jedrzejczak, W., et al., *Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(12): p. 4828-32.
289. Yoshida, H., et al., *The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene*. *Nature*, 1990. **345**(6274): p. 442-4.
290. De Ciuceis, C., et al., *Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(10): p. 2106-13.
291. Vendrov, A.E., et al., *Atherosclerosis is attenuated by limiting superoxide generation in both macrophages and vessel wall cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(12): p. 2714-21.
292. Yamamoto, S., et al., *Macrophage polarization by angiotensin II-type 1 receptor aggravates renal injury-acceleration of atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(12): p. 2856-64.
293. Crowley, S.D., et al., *A role for angiotensin II type 1 receptors on bone marrow-derived cells in the pathogenesis of angiotensin II-dependent hypertension*. *Hypertension*, 2010. **55**(1): p. 99-108.
294. Doughan, A.K., D.G. Harrison, and S.I. Dikalov, *Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking*

- mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction.* Circ Res, 2008. **102**(4): p. 488-96.
295. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma.* Annual review of immunology, 1997. **15**: p. 749-95.
296. Flaishon, L., et al., *Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells.* J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1381-8.
297. Bancroft, G.J., R.D. Schreiber, and E.R. Unanue, *Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse.* Immunol Rev, 1991. **124**: p. 5-24.
298. Ehrt, S., et al., *Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase.* J Exp Med, 2001. **194**(8): p. 1123-40.
299. Muhl, H. and J. Pfeilschifter, *Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma.* Int Immunopharmacol, 2003. **3**(9): p. 1247-55.
300. McLaren, J.E. and D.P. Ramji, *Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis.* Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(2): p. 125-35.
301. Fernandezcastelo, S., et al., *Angiotensin-II Regulates Interferon-Gamma Production.* Journal of Interferon Research, 1987. **7**(3): p. 261-268.
302. Marko, L., et al., *Interferon-gamma Signaling Inhibition Ameliorates Angiotensin II-Induced Cardiac Damage.* Hypertension, 2012. **60**(6): p. 1430-U154.
303. Han, Y.L., et al., *Reciprocal interaction between macrophages and T cells stimulates IFN-gamma and MCP-1 production in Ang II-induced cardiac inflammation and fibrosis.* PLoS One, 2012. **7**(5): p. e35506.
304. Tenger, C., et al., *IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN-gamma and CXCL16 expression independently of T cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(4): p. 791-6.
305. Whitman, S.C., et al., *Depletion of natural killer cell function decreases atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor null mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(6): p. 1049-54.
306. Taherzadeh, Z., et al., *Strain-dependent susceptibility for hypertension in mice resides in the natural killer gene complex.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(4): p. H1273-82.
307. Lee, T.S., et al., *The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(3): p. 734-42.
308. Davenport, P. and P.G. Tipping, *The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.* Am J Pathol, 2003. **163**(3): p. 1117-25.
309. Bush, E., et al., *CC chemokine receptor 2 is required for macrophage infiltration and vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension.* Hypertension, 2000. **36**(3): p. 360-3.
310. Rey, F.E., et al., *Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O(2)(-) and systolic blood pressure in mice.* Circ Res, 2001. **89**(5): p. 408-14.
311. Lodoen, M.B. and L.L. Lanier, *Natural killer cells as an initial defense against pathogens.* Curr Opin Immunol, 2006. **18**(4): p. 391-8.

312. Eissler, R., et al., *Hypertension augments cardiac Toll-like receptor 4 expression and activity*. *Hypertens Res*, 2011. **34**(5): p. 551-8.
313. Bomfim, G.F., et al., *Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats*. *Clin Sci (Lond)*, 2012. **122**(11): p. 535-43.
314. Wolf, G., et al., *Angiotensin II upregulates toll-like receptor 4 on mesangial cells*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(6): p. 1585-93.
315. Sollinger, D., et al., *Damage-associated molecular pattern activated Toll-like receptor 4 signalling modulates blood pressure in L-NAME-induced hypertension*. *Cardiovasc Res*, 2014. **101**(3): p. 464-72.
316. Yachie, A., et al., *Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(1): p. 129-35.
317. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(12): p. 958-69.
318. Wickman, A., et al., *Endothelial nitric oxide synthase protein is reduced in the renal medulla of two-kidney, one-clip hypertensive rats*. *J Hypertens*, 2001. **19**(9): p. 1665-73.
319. Kobayashi, N., et al., *Celiprolol stimulates endothelial nitric oxide synthase expression and improves myocardial remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats*. *J Hypertens*, 2001. **19**(4): p. 795-801.
320. Chen, C.A., et al., *S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function*. *Nature*, 2010. **468**(7327): p. 1115-8.
321. Tang, P.C., et al., *MyD88-dependent, superoxide-initiated inflammation is necessary for flow-mediated inward remodeling of conduit arteries*. *J Exp Med*, 2008. **205**(13): p. 3159-71.
322. Rey, F.E., et al., *Perivascular superoxide anion contributes to impairment of endothelium-dependent relaxation: role of gp91(phox)*. *Circulation*, 2002. **106**(19): p. 2497-502.
323. Bjorkbacka, H., et al., *Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways*. *Nature medicine*, 2004. **10**(4): p. 416-21.
324. Michelsen, K.S., et al., *Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(29): p. 10679-84.
325. Tacke, F., et al., *Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 185-94.
326. Nahrendorf, M., et al., *Detection of macrophages in aortic aneurysms by nanoparticle positron emission tomography-computed tomography*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(4): p. 750-7.
327. Lord, K.A., B. Hoffman-Liebermann, and D.A. Liebermann, *Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6*. *Oncogene*, 1990. **5**(7): p. 1095-7.
328. Liebermann, D.A. and B. Hoffman, *Myeloid differentiation (MyD) primary response genes in hematopoiesis*. *Blood Cells Mol Dis*, 2003. **31**(2): p. 213-28.

329. Kaisho, T. and S. Akira, *Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice*. Trends Immunol, 2001. **22**(2): p. 78-83.
330. Palframan, R.T., et al., *Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues*. J Exp Med, 2001. **194**(9): p. 1361-73.
331. Chao, C.C., R. Jensen, and M.O. Dailey, *Mechanisms of L-selectin regulation by activated T cells*. J Immunol, 1997. **159**(4): p. 1686-94.
332. Kaldjian, E.P. and L.M. Stoolman, *Regulation of L-selectin mRNA in Jurkat cells. Opposing influences of calcium- and protein kinase C-dependent signaling pathways*. J Immunol, 1995. **154**(9): p. 4351-62.
333. Mullick, A.E., P.S. Tobias, and L.K. Curtiss, *Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3149-56.
334. Naiki, Y., et al., *TLR/MyD88 and liver X receptor alpha signaling pathways reciprocally control Chlamydia pneumoniae-induced acceleration of atherosclerosis*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 7176-85.
335. Chatterjee, P., et al., *Placental Toll-like receptor 3 and Toll-like receptor 7/8 activation contributes to preeclampsia in humans and mice*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41884.
336. Salagianni, M., et al., *Toll-like receptor 7 protects from atherosclerosis by constraining "inflammatory" macrophage activation*. Circulation, 2012. **126**(8): p. 952-62.
337. Schulz, C., et al., *A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells*. Science, 2012. **336**(6077): p. 86-90.
338. Gautier, E.L., et al., *Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages*. Nat Immunol, 2012. **13**(11): p. 1118-28.
339. Subramanian, M., et al., *Treg-mediated suppression of atherosclerosis requires MYD88 signaling in DCs*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 179-88.
340. Mattson, D.L., et al., *Immune suppression attenuates hypertension and renal disease in the Dahl salt-sensitive rat*. Hypertension, 2006. **48**(1): p. 149-56.
341. Zhang, J.D., et al., *A novel role for type 1 angiotensin receptors on T lymphocytes to limit target organ damage in hypertension*. Circ Res, 2012. **110**(12): p. 1604-17.
342. Youn, J.C., et al., *Immunosenescent CD8+ T cells and C-X-C chemokine receptor type 3 chemokines are increased in human hypertension*. Hypertension, 2013. **62**(1): p. 126-33.
343. Barhoumi, T., et al., *T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury*. Hypertension, 2011. **57**(3): p. 469-76.
344. Kasal, D.A., et al., *T regulatory lymphocytes prevent aldosterone-induced vascular injury*. Hypertension, 2012. **59**(2): p. 324-30.
345. Ji, Y., et al., *Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells*. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 2009. **23**(4-6): p. 265-76.

346. Kirii, H., et al., *Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(4): p. 656-60.
347. Elhage, R., et al., *Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice*. *Cardiovasc Res*, 2003. **59**(1): p. 234-40.
348. Leibowitz, A. and E.L. Schiffrin, *Immune mechanisms in hypertension*. *Current hypertension reports*, 2011. **13**(6): p. 465-72.
349. Wallin, R.P., et al., *Heat-shock proteins as activators of the innate immune system*. *Trends Immunol*, 2002. **23**(3): p. 130-5.
350. Pockley, A.G., et al., *Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease*. *Hypertension*, 2000. **36**(2): p. 303-7.
351. Pockley, A.G., et al., *Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension*. *J Hypertens*, 2002. **20**(9): p. 1815-20.
352. Bravo, J., et al., *Vimentin and heat shock protein expression are induced in the kidney by angiotensin and by nitric oxide inhibition*. *Kidney Int Suppl*, 2003(86): p. S46-51.
353. Ishizaka, N., et al., *Regulation and localization of HSP70 and HSP25 in the kidney of rats undergoing long-term administration of angiotensin II*. *Hypertension*, 2002. **39**(1): p. 122-8.
354. Pons, H., et al., *Immune reactivity to heat shock protein 70 expressed in the kidney is cause of salt-sensitive hypertension*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. **304**(3): p. F289-99.
355. Erridge, C., *Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants?* *Journal of leukocyte biology*, 2010. **87**(6): p. 989-99.
356. Harrison, D.G., et al., *Inflammation, immunity, and hypertension*. *Hypertension*, 2011. **57**(2): p. 132-40.
357. Wassmann, S. and G. Nickenig, *Interrelationship of free oxygen radicals and endothelial dysfunction--modulation by statins*. *Endothelium*, 2003. **10**(1): p. 23-33.
358. Bustos, C., et al., *HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis*. *J Am Coll Cardiol*, 1998. **32**(7): p. 2057-64.
359. Levy, B.I., et al., *Microcirculation in hypertension: a new target for treatment?* *Circulation*, 2001. **104**(6): p. 735-40.
360. Alves-Filho, J.C. and F.Q. Cunha, *Modulation of toll-like receptor expression: a further effect of statins?* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(7): p. e128.
361. Fort, M.M., et al., *A synthetic TLR4 antagonist has anti-inflammatory effects in two murine models of inflammatory bowel disease*. *J Immunol*, 2005. **174**(10): p. 6416-23.
362. Shimamoto, A., et al., *Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury*. *Circulation*, 2006. **114**(1 Suppl): p. I270-4.
363. Van Tassell, B.W., et al., *Pharmacologic inhibition of myeloid differentiation factor 88 (MyD88) prevents left ventricular dilation and hypertrophy after experimental acute myocardial infarction in the mouse*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010. **55**(4): p. 385-90.

7 Verzeichnisse

7.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1-1: Das Renin-Angiotensin-(Aldosteron-)System (RA(A)S). Abk.: AT₁R, Angiotensin II-Rezeptor Typ 1; AT₂R, Angiotensin II-Rezeptor Typ 2; ACE, *angiotensin-converting enzyme*..... 6
- Abbildung 1-2: Überblick über die ATII-induzierten Signaltransduktionswege im kardiovaskulären System. Die Angiotensin II (ATII) Bindung an AT₁R führt zur konsequenten Hochregulation von *downstream* Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor* (NF)-κB, *activating protein 1* (AP-1), *nuclear factor of activated T-cell* (NFAT) und *signal transducers and activators of transcription* (STATs). Alle dadurch aktivierten Gene tragen zu den Angiotensin II Effekten bei, einschließlich Vasokonstriktion, vaskuläre Inflammation, Zellproliferation, myokardiale Hypertrophie, Fibrose und Nierenschädigung. Die Effekte können durch sEH Inhibitoren (sEH, *soluble epoxide hydrolase*) vermindert werden [41]. 8
- Abbildung 1-3: Der über die eNOS vermittelte NO[•]/sGC/cGMP Signalweg. Dargestellt ist der Mechanismus der endothelabhängigen Relaxation von Gefäßen durch Stickstoffmonoxid (NO[•]). NO[•] wird durch die endotheliale NO-Synthase gebildet. Die Aktivierung erfolgt entweder Rezeptor-vermittelt oder durch pulsatile Dehnung bzw. Scherkräfte. NO[•] diffundiert dann in den glatten Gefäßmuskel, wo es die lösliche Guanylatzyklase (sGc) aktiviert, was wiederum zur Aktivierung der cGMP abhängigen Kinase (cGK-I) und letztlich zur Relaxation des glatten Muskels durch Ca²⁺-Influx führt. Abk: NTG, Glyceroltrinitrat (\triangle GTN); BH₄, Tetrahydrobiopterin; M, Muskarinergere Rezeptor; eNOS, endotheliale NO-Synthase“ [73]. 13
- Abbildung 1-4: Aufbau der NADPH Oxidase am Beispiel der phagozytären Isoform Nox2. Nox2, die katalytische Untereinheit, benötigt die regulatorischen Untereinheiten p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} und Rac zur Aktivierung und Superoxid-Bildung. In diesem Aktivierungsprozess muss p47^{phox} phosphoryliert werden. Die p40^{phox} Assoziation mit dem Komplex trägt vermutlich ebenfalls zur Aktivierung bei, ist allerdings nicht essenziell [99]. 16
- Abbildung 1-5: Der Toll-like Rezeptor Signalweg. TLR5, TLR11, TLR4 und die Heterodimere von TLR2–TLR1 oder TLR2–TLR6 binden ihre respektiven Liganden an der Zelloberfläche, während TLR3, TLR7–TLR8, TLR9 und TLR13 an den Endosomen lokalisiert sind, wo sie mikrobielle und fremde Nukleinsäuren

erkennen. TLR4 ist sowohl an der Plasmamembran als auch an Endosomen lokalisiert. Der TLR Signalweg wird initiiert durch die Ligand-induzierte Dimerisierung des Rezeptors. Davon gefolgt rekrutieren die Toll/IL-1 *receptor homology* (TIR) Domänen der TLRs *TIR domain-containing adaptor Proteine* (entweder *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) und *MyD88-adaptor-like protein* (MAL), oder *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN- β* (TRIF) und *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM)). TLR4 bewegt sich von der Plasmamembran zu den Endosomen, um von der Signalgebung über MyD88 zu Trif zu wechseln. Durch die Einbeziehung der Signaladapterproteine folgt die Initiierung von *downstream* Signaltransduktionswegen unter Involvierung der Interaktion zwischen *IL-1R-associated kinases* (IRAKs) und dem *adaptor molecules TNF receptor-associated factors* (TRAFs), und führen zur Aktivierung der *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), *JUN N-terminal kinase* (JNK) und p38, und schließlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Zwei wichtige Familien von Transkriptionsfaktoren, die durch TLR Signaltransduktion aktiviert werden, sind *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) und der *interferon-regulatory factors* (IRFs), so wie andere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. *cyclic AMP-responsive element-binding protein* (CREB) und *activator protein 1* (AP1). Als Konsequenz kommt es zur Aktivierung proinflammatorischer Cytokine und bei endosomalen TLRs zur Induktion von *type I interferon* (IFN). Abk: dsRNA, *double-stranded RNA*; IKK, *inhibitor of NF- κ B kinase*; LPS, *lipopolysaccharide*; MKK, MAP kinase kinase; RIP1, *receptor-interacting protein 1*; rRNA, *ribosomal RNA*; ssRNA, *single-stranded RNA*; TAB, *TAK1-binding protein*; TAK, *TGF β -activated kinase*; TBK1, *TANK-binding kinase 1* [137]..... 21

Abbildung 1-6: Die Angiotensin II-induzierte inflammatorische Antwort. Eine kurze Darstellung potenzieller Verbindung zwischen Hypertonie und inflammatorischen Prozessen. Abkürzungen: ATII, Angiotensin II; *bFGF*, *basic fibroblast growth factor*; ET-1, *endothelin-1*; ROS, *reactive oxygen species*; NF- κ B, *nuclear factor-kappaB*; AP-1, *activator protein-1*; HIF-1, *hypoxia-inducible factor-1*; VEGF, *vascular endothelial cell growth factor*; MCP-1, *monocyte chemoattractant protein 1*; MMP, *matrix metalloproteinase*; TIMP, *tissue inhibitor of MMP*; VEGF, *vascular endothelium growth factor*; TGF- β *transforming growth factor-beta*; TNF- α , *tumor necrosis factor-alpha*; STAT, *signal transducers and activators of transcription*. Verändert nach [145]..... 25

Abbildung 1-7: Die Rolle von Angiotensin II in der Gewebeinflammation. Angiotensin II trägt durch Signaltransduktion über den ATII-Rezeptor Typ 1 (AT₁R) in Immunzellen sowie Mesangial-Zellen und vaskulären glatten Muskelzellen zur

lokalen Aktivierung des Immunsystems bei [178]. Abk.: MCP-1, *monocyte chemoattractant protein*; CCR2, *C-C chemokine receptor type 2*; TLR-4, *Toll-like receptor 4*; ROS, *reactive oxygen species*. 29

Abbildung 1-8: LysM⁺ Monozyten medieren die ATII-induzierte vaskuläre Dysfunktion und arterielle Hypertonie. A-B: Selektive Ablation LysM⁺ myelomonozytärer Zellen durch i.p. Gabe von niedrigdosiertem Diphtheriatoxin (DTX, 25 ng/g d1 bis d3 ng/g d4 bis d10) führte zur Depletion von Monozyten (CD115⁺GR-1^{low}, CD11b⁺GR-1^{low} CD115⁺F4/80⁺) nicht aber zur Depletion von CD11b⁺GR-1^{high} oder CD115⁻GR-1^{high} neutrophilen Granulozyten im Blut gemessen durch Durchflusszytometrie. Repräsentative Konturdiagramme (A); links statistische Auswertung (B). C-D: Die Monozyten Ablation in LysM^{IDTR} Mäusen führt zur Abschwächung des ATII (1mg/kg/d, 7d s.c.)-induzierten arteriellen Hypertonus (telemetrisch aufgezeichnet, D.S.I *carotid implants*) und der vaskulären Dysfunktion (endothelabhängige (ACh, Acetylcholin) und endothelunabhängige (GTN, Glyzeroltrinitrat) Relaxation). Als Kontrollmäuse dienten LysM Mäuse ohne Cre-induzierbaren Diphtherietoxin-Rezeptor, die mit DTX kontrollinjiziert wurden. E-F: Beide Phänomene können durch Rekonstitution der Tiere mit CD11b⁺GR-1⁺ Monozyten wiederhergestellt werden, nicht jedoch mit CD11b⁺GR-1⁺ Neutrophilen (aus [195]). 32

Abbildung 1-9: Tbx21^{-/-} Mäuse sind partiell geschützt vor der ATII-induzierten vaskulären Dysfunktion und oxidativen Stress. T-bet defiziente Tbx21^{-/-} und C57BL/6 Mäuse wurden über eine Woche mit Angiotensin II (1 mg/kg/d, s.c.) behandelt und anschließend die endotheliale (A, Acetylcholin, ACh) und glattmuskuläre Funktion (B, Glyceroltrinitrat, GTN) mittels isometrischer Spannungsstudien an isolierten Aortenringen und der oxidative Burst im Vollblut mittels L-012-verstärkter Chemilumineszenz (D) untersucht. Der arterielle systolische Blutdruck wurde telemetrisch mittels Carotis-Katheter eine Woche vor und während der ATII Behandlung gemessen (C) [220, 221]. 35

Abbildung 2-1: Behandlungsregime LysM und LysM^{IDTR} Mäuse. 52

Abbildung 2-2: Depletionseffizienz LysM⁺ myelomonozytärer Zellen mittels Diphtheriatoxin Applikation in LysM^{IDTR} Mäuse. Durchflusszytometrische Analyse von Blut nach 10-tägiger Diphtheriatoxin (DTX) Behandlung. Vergleich zwischen sham und ATII behandelten LysM Kontrollmäusen gegenüber Diphtheriatoxin-Rezeptor exprimierenden LysM^{IDTR} Mäusen. Färbung und *gating* auf CD45⁺ Leukozyten, CD45⁺Ly6G⁺CD11b⁺ Neutrophile, CD45⁺Ly6G⁻CD11b⁺ Monozyten, die Ly6C^{high} (inflammatorische Monozyten) oder Ly6C^{low} sein können (reparative Monozyten). A, Representative *dot plots* und B, graphische Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse (siehe 2.2.6); n=4-8; One-way ANOVA,

| | |
|---|----|
| Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison Test; ***, $p < 0,001$, **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$ | 53 |
| Abbildung 2-3: Behandlungsschema zur Depletion von NK-Zellen in C57BL/6 Mäusen. | 54 |
| Abbildung 2-4: Repräsentative Effizienz der Depletion NK1.1 positiver Zellen im Blut. Durchflusszytometrische Analyse des Blutes nach 10-tägiger anti-NK1.1 bzw. Kontroll IgG (CTR IgG) Injektion von C57BL/6±ATII Mäusen. A, Repräsentative <i>dot plots</i> , Analyse auf NK1.1 ⁺ CD45 ⁺ Zellen und B, graphische Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse (siehe 2.2.6) bezogen auf CD45 ⁺ Lymphozyten; n=5-7; One-way ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison Test; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$ | 54 |
| Abbildung 2-5: Behandlungsschema zur Herstellung von Knochenmark-chimären Mäusen. | 57 |
| Abbildung 2-6: Beispiel für eine durchflusszytometrische Reinheitskontrolle von aus Mausblut isolierten Monozyten. Über Histopaque 1083 und MACS-Isolation aufgereinigte Monozyten wurden mit Antikörpern gegen CD11b, Ly6G und F4/80 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Die Reinheit der CD11b ⁺ Ly6G ⁻ Monozyten lag bei mindestens 80%. Die Abb. zeigt repräsentative <i>dot plots</i> | 60 |
| Abbildung 2-7: Durchflusszytometrische Analyse der NK-Zellreinheit und Erfolg des adoptiven Zelltransfers in Tbx21 ^{-/-} Mäuse. NK1.1 positive Zellen wurden mittels Positivselektion aus Milzen von Rag1 ^{-/-} Mäusen isoliert. A, Durchflusszytometrische Analyse der Reinheit mittels Färbung auf CD45 und NK1.1. B, Nachweis transferierter NK1.1 ⁺ -Zellen 7 Tage nach adoptivem Zelltransfer durch Färbung mit CFSE vor Injektion der Zellen in die Maus. | 61 |
| Abbildung 2-8: Übersicht der Organentnahme der Maus. „Fellschnitt und Eröffnung des Peritoneums (A,B), Anheben des Brustbeins (C), Heparininjektion in das noch schlagende Herz (D), dorsaler Rippenschnitt (E), Umlagerung der inneren Organe (F), Abtrennung des Herzens (G), Sicht auf die Aorta im Aortenbett (H), Abtrennung der Aortenabgänge und des Binde- und Fettgewebes (I) und Entnahme der Aorta (K)“ (Abbildung und Abbildungstext aus [221]). | 62 |
| Abbildung 2-9: Schematische Darstellung einer Organbadanlage (verändert nach [244])..... | 66 |
| Abbildung 3-1: ATII Infusion führt weder in Monozyten-depletierten LysM ^{IDTR} +DTX+ATII Mäusen noch in mit gp91 ^{phox^{-/-}} oder Agtr1 ^{-/-} Monozyten rekonstituierten Mäusen zu der Entwicklung eines arteriellen Hypertonus. Telemetrische Erfassung des arteriellen systolischen Blutdrucks von Diptheriatoxin (DTX) behandelten | |

- LysM^{IDTR}+DTX+ATII Mäusen über einen Zeitraum von 240 h. Nach ca. 96 h erfolgten der adoptive Monozytentransfer und der Start der ATII Infusion. Mittelung der Einzelwerte über 24 h. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM; n=3-4 Tiere; Two-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test. .. 83
- Abbildung 3-2: Die ATII-induzierte vaskuläre Dysfunktion ist abhängig von der Expression des AT₁-Rezeptors und Nox2 in Monozyten. Isometrische Tonusstudien mit isolierten Aortenringen von LysM^{IDTR}+DTX+ATII Mäusen, entweder mit Puffer (schwarze Kurven, n=17), Agtr1^{-/-} (rote Kurven, n=6) oder gp91^{phox^{-/-}} (blaue Kurven, n=7) Monozyten behandelt. Angegeben ist die prozentuale Relaxation nach Acetylcholin- (Ach, A) oder Glyceroltrinitrat- (GTN, B) Gabe. One-way ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison Test. 84
- Abbildung 3-3: Rekonstitution von LysM⁺ Zell-depletierten LysM^{IDTR}+DTX+ATII Mäuse mit Nox2 oder AT₁R defizienten Monozyten führt zu keiner erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. Messung reaktiver Sauerstoffspezies im Vollblut (A) und Aortengewebe (B) von LysM^{IDTR}+DTX+ATII Mäusen transferiert mit Agtr1^{-/-} oder gp91^{phox^{-/-}} Monozyten im Vergleich zu Puffer behandelten Kontrollen (Ctr). (A) Produktion reaktiver Sauerstoffspezies im venösen Vollblut, gemessen durch L-012-verstärkte Chemilumineszenz in Anwesenheit des Phorbolesters PDBu (10 μ M). (B) Dihydroethidium (DHE) Färbung von Aortenkryoschnitten. Links, Repräsentative Originalabbildungen. Rot: Durch Superoxid oxidiertes DHE, grün: Autofluoreszenz der *Lamina elastica*. E, Endothel, M, Media, A, Adventitia. Rechts, Densitometrische Analyse. One-way ANOVA Kruskal-Wallis, Bonferroni's multiple comparison Test..... 85
- Abbildung 3-4: Angiotensin II Infusion führt zur mRNA Expressionserhöhung von IFN- γ in der Aorta. Analyse der IFN- γ mRNA Expression in Aortenlysaten von ATII oder sham infundierten C57BL/6 Mäusen. Der Mittelwerte ist angegeben als % der C57BL/6 Kontrolle; Kreise und Quadrate stellen einzelne Tiere dar; n =13-21; unpaired t-Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05. 86
- Abbildung 3-5: ATII-behandelte IFN- γ ^{-/-} Mäuse sind partiell geschützt vor der endothelialen und glattmuskulären Dysfunktion im Vergleich zu Wildtyp Artgenossen. Mittels isometrischer Spannungsstudien wurde die Relaxationsfähigkeit von isolierten Aortensegmenten von IFN- γ (blaue Kurven) und C57BL/6 (schwarze Kurven) \pm ATII Mäusen in Antwort auf den endothelabhängigen Vasodilator Acetylcholin (ACh) und den endothelabhängigen Vasodilator Glyceroltrinitrat (GTN) getestet. Angegeben ist die prozentuale

- Relaxation \pm SEM; n=11-16; ordinäre One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05. 88
- Abbildung 3-6: IFN- γ Defizienz führt zur Reduktion der ATII-induzierten ROS-Produktion im Vollblut und Aortengewebe. Reaktive Sauerstoffspezies Produktion in sham und ATII behandelten C57BL/6 und IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen. A, L-012 verstärkte Chemilumineszenz in Vollblut nach Phorbol ester (PDBu) Inkubation; n=7-9. B, DHE Färbung von Aortenkryoschnitten. Links, Repräsentative Fluoreszenz-Mikrotopographie Aufnahmen. Superoxid erscheint in rot, Autofluoreszenz der Laminae in grün. A, Adventitia, E, Endothel und M, Media. Rechts, Quantifizierung; n=3 unabhängige Experimente; ordinäre One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05. 89
- Abbildung 3-7: IFN- γ defiziente Mäuse weisen ein vermindertes Einwandern von Leukozyten, insbesondere NK-Zellen, in die Aortenwand auf. Durchflusszytometrische Analyse der Leukozyteninfiltration von IFN- $\gamma^{-/-}$ und Tbx21 $^{-/-}$ Mäusen in Vergleich zu C57BL/6 Kontrollen in Abhängigkeit von ATII. Einzelzellsuspensionen der Aorten, hergestellt durch Col II/DNase I Verdau wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen CD45, NK1.1, die β -Kette des α/β T-Zell-Rezeptors (TCR β) sowie gegen die Moleküle GR-1 und CD11b gefärbt und anschließend die Anzahl an NK1.1 $^{+}$ NK-Zellen (CD45 $^{+}$ NK1.1 $^{+}$ TCR β^{-}), TCR β^{+} T-Zellen (CD45 $^{+}$ TCR β^{+} NK1.1 $^{-}$) sowie Monozyten (CD45 $^{+}$ CD11b $^{+}$ GR-1 low) und Neutrophilen (CD45 $^{+}$ CD11b $^{+}$ GR-1 high) durchflusszytometrisch bestimmt. Tote Zellen wurden durch Anfärbung mit *Viability Dye* von der Analyse ausgeschlossen. A, Repräsentative Konturdiagramme; B, Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung. Quantifizierung der Zellen pro Aorta; n=6-8; One-way ANOVA Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05. 90
- Abbildung 3-8: Durchflusszytometrische Kontrolle der NK-Zell-Depletion in Blut, Milz und Knochenmark. C57BL/6 Mäuse wurden über 10 Tage mit einem anti-NK1.1 Antikörper behandelt und die Depletion an verschiedenen Zeitpunkten in Blut, Milz und Knochenmark durchflusszytometrisch überprüft. Als Kontrolle (Ctr) diente ein Maus-IgG Antikörper. Angegeben sind der prozentuale Anteil NK1.1 $^{+}$ CD45 $^{+}$ NK-Zellen bezogen auf alle CD45 $^{+}$ Zellen. 92
- Abbildung 3-9: NK-Zell-depletierte Mäuse sind partiell geschützt vor der Entwicklung einer endothelialen und glattmuskulären Dysfunktion. Isometrische Spannungsstudien an isolierten Aortensegmenten von C57BL/6 (schwarze

Kurven) \pm anti-NK1.1 (blaue Kurven) \pm ATII Mäusen. Dargestellt ist die prozentuale Relaxation isolierter Aortenringe auf Acetylcholin- (ACh, A) oder Glyceroltrinitratgabe (GTN, B). N=14-16; ordinäre One-way ANOVA der maximalen Relaxation, Bonferroni's multiple comparison Test; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$ 93

Abbildung 3-10: IFN- γ -abhängige IL-12 Produktion durch CD11b⁺ Zellen im Gefäß. mRNA Expressionsanalyse von IL-12 und IFN- γ ^{-/-} in Aortenlysaten von C57BL/6 und Tbx21^{-/-} Tieren \pm ATII. A, mRNA Expression von IL-12 in Aortenlysaten. Oben, densitometrische Auswertung mit Normalisierung der IL12-p40 Expression auf auf L32 (Haushaltsgen). Unten, Auftrennung IL-12p40 und L32 PCR-Produkte mittels eines Agarosegels; n=3-5; One-way ANOVA, Kruskal-Wallis, Bonferroni's multiple comparison Test. B, Durchflusszytometrische Analyse der IL-12 Formation von CD11b⁺ myelomonozytären Zellen in der Aorta von C57BL/6 Mäusen mit und ohne IFN- γ *in vitro* Stimulation. Repräsentative Punkt-Wolken-Diagramme. C, Durchflusszytometrische Analyse der IFN- γ Produktion NK1.1⁺ NK-Zellen in Aortengewebe von sham oder ATII-behandelten C57BL/6 Mäusen. Links, Repräsentative Konturdiagramme von IL-12/IL-18 stimulierten Aortenlysaten. Rechts, Quantifizierung; n=4-5; t-Test (Wilcoxon-matches pairs Test); ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$ 94

Abbildung 3-11: Weder die Rekonstitution von Angiotensin II-behandelten Tbx21^{-/-} Mäusen mit T-bet⁺NK1.1⁺ Zellen noch mit T-bet⁺ Monozyten führt zu einer Wiederverschlechterung der vaskulären Funktion oder der reaktiven Sauerstoffspezies-Level. Dargestellt sind Dosis-Wirkungskurven auf den endothelabhängigen Vasodilator Acetylcholin (ACh, A, C) und den endothelunabhängigen Vasodilator Glyceroltrinitrat (GTN, B, D) von isolierten Aortenringen von ATII-infundierten Tbx21^{-/-} Mäusen rekonstituiert mit T-bet positiven NK1.1⁺ Zellen (blaue Kurven, n=4-8) oder Monozyten (braune Kurven, n=9-12) bzw. sham (schwarze Kurven, 7-18) behandelt. E, F, DHE Färbung von Aortenkryoschnitten. Links, Repräsentative Fluoreszenz-Mikrotopographie Aufnahmen. Superoxid erscheint in rot, Autofluoreszenz der Laminae in grün. A, Adventitia, E, Endothel und M, Media. Rechts, Quantifizierung; n=3 unabhängige Experimente. Mann-Whitney U t-Test, Bonferroni's multiple comparison Test. ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$ 96

Abbildung 3-12: Adoptiver Transfer von T-bet⁻ Monozyten in Monozyten-depletierte LysM^{IDTR} Mäuse kann die vaskuläre Dysfunktion nicht wiederherstellen. Isometrische Tonusstudien von LysM^{IDTR}+DTX+ATII Tieren, die entweder mit T-

- bet⁺ (blaue Kurven, n=9), T-bet⁻ (rote Kurven, n=4) Monozyten oder Puffer (schwarze Kurven, n=13) behandelt wurden. Relaxation auf ACh (A, endothelabhängig) oder GTN (B, endothelunabhängig); n=4-14; One-way ANOVA der maximale Relaxation, Dunn's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05. 97
- Abbildung 3-13 Die Abwesenheit von Monozyten führt zu einer reduzierten Infiltration IFN- γ kompetenter NK1.1⁺ Zellen in die Aortenwände ATII-behandelter Mäuse. C57BL/6, Tbx21^{-/-} und IFN- γ ^{-/-} Mäuse wurden für sieben Tage mit ATII behandelt. Durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD45 und NK1.1 konnten infiltrierte Immunzellen und NK-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie detektiert werden. A, Repräsentative Konturplots der IFN- γ Produktion von NK-Zellen in der Aortenwand nach *ex vivo* Restimulation mit IL-12 (20 ng/ml) und IL-18 (20 ng/ml) für 4-5 Stunden. B, Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung; n=5-8; One-way ANOVA, Dunn's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05. 98
- Abbildung 3-14: Protektion vor der Entwicklung einer endothelialen und glattmuskulären vaskulären Dysfunktion durch MyD88 Defizienz. A, Endothelabhängige Vasorelaxation auf Acetylcholin (ACh) und B, endothelunabhängige Vasorelaxation auf Glyceroltrinitrat (GTN) der Aorten von MyD88^{-/-} (rote Kurven) vs. C57BL/6 (schwarze Kurven) in Abhängigkeit von *in vivo* ATII Behandlung; n=11-16; ordinäre One-way ANOVA der maximale Relaxation, Bonferroni's multiple Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05. 99
- Abbildung 3-15: MyD88^{-/-} Mäuse sind partiell vor der Ausbildungen einer arteriellen Hypertonie geschützt. Der systolische arterielle Blutdruck von MyD88^{-/-} Mäusen (rote Kurven) im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen (schwarze Kurven) wurde telemetrisch mit Hilfe von Carotis-Kathetern über einen Zeitraum von 336 h erfasst. Mittelung der Einzelwerte über 24h \pm SEM; n=3-4; T-Test mit Mann-Whitney U-Test (Mittelung Einzelwerte der letzten 72 h) und Two-way ANOVA (Einzelwerte), Bonferroni's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05. 100
- Abbildung 3-16. ATII-induzierte ROS-Bildung in der arteriellen Gefäßwand ist abhängig von MyD88. Aortenkryoschnitte von sham oder ATII-infundierten C57BL/6 oder MyD88^{-/-} Mäusen wurden mittels DHE gefärbt. Links, Repräsentative Originalabbildung von mit Dihydroxyethidium gefärbten Kryoschnitten der Aorta. Rot, Durch Superoxid oxidiertes DHE; grün, Autofluoreszenz der *Lamina elastica*. E, Endothel, M, Media, A, Adventitia. Rechts, Densitometrische Analyse. One-way

- ANOVA, Kruskal-Wallis Test, Bonferroni's multiple comparison Test; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$ 101
- Abbildung 3-17: MyD88 Knockout Mäuse zeigen eine Reduktion in der mRNA Expression von Inflammations- und oxidativen Stress-Markern. Die Diagramme zeigen die qRT-PCR basierte Messung der mRNA Expression der Inflammationsmarker Nox2 (n=12), VCAM-1 (n=12), iNOS (n=10-12), IL-12p40 (n=5-6), eNOS (n=4), CD68 (n=11-12), TNF- α (n=5-6) und IL-1 β (n=5-6) in Aorten von MyD88^{-/-} \pm ATII und C57BL/6 \pm ATII Mäusen. Mittelwerte \pm SEM, angegeben als % der C57BL/6 Kontrolle; n=4-12; One-way ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison Test; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$ 103
- Abbildung 3-18: Reduktion des ATII-induzierten Anstiegs der Proteinexpression von oxidativen Stressmarkern durch MyD88 Knockout. Western Blot Analyse der Nox2 (A), Nox1 (B) und HO-1 (C) Expression in Aortenhomogenaten von MyD88^{-/-} und C57BL/6 Mäusen \pm ATII. Original Blots sind gezeigt unter der densitometrischen Quantifizierung von drei Tieren pro Gruppe. N=3, One-way ANOVA; Kruskal-Wallis Test, Dunn's multiple comparison Test; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$ 105
- Abbildung 3-19: MyD88 Defizienz führt zur Reduktion der Anzahl an Nox2⁺, CD68⁺ und F4/80⁺ Phagozyten in Aorten ATII-infundierter Mäuse. Immunhistochemischer Nachweis von Nox2 (A), CD68 (B) und F4/80 (C) positiven Zellen in Paraformaldehyd (4%) fixierten, in Paraffin eingebetteten Aortensegmenten von sham oder ATII-infundierten MyD88^{-/-} und C57BL/6 Mäusen. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen; blau eingefärbt wurden die Zellkerne durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin, braun gefärbt sind die spezifischen Antikörperbindungen. A Adventitia, M, Media, E Endothel. 20fache Vergrößerung. Für die ATII-infundierten Gruppen ist jeweils noch ein kleiner Ausschnitt des Aortenschnittes in 40facher Vergrößerung dargestellt. Die Pfeile verdeutlichen Regionen mit positiver Antikörperbindung. 107
- Abbildung 3-20: Reduktion der ATII-induzierten Infiltration des Gefäßes mit Leukozyten in MyD88^{-/-} Mäusen. Durchflusszytometrische Analyse der Infiltration von Leukozyten in die Aorten von sham oder ATII-infundierten C57BL/6 oder MyD88^{-/-} Mäusen. Der Verdau der Aorten erfolgte mit Liberase. Dargestellt sind repräsentative FACS *dot plots* (A) sowie die Quantifizierung pro Aorta (B-E). Gating auf CD45⁺ viable Leukozyten (B) und weitere Differenzierung auf CD11b⁺Ly6G⁺ positive Neutrophile (C), CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{low} nicht-klassische Monozyten (D), sowie CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} inflammatorische Monozyten (E). Tote Zellen wurden mittels Färbung mit Viability Dye ausgeschlossen; n=4-6;

- ordinäre One-way ANOVA, Bonferonis's multiple comparison test; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$109
- Abbildung 3-21: Nach ATII Infusion zeigen MyD88 defiziente Mäuse eine geringere Infiltration der Aortenwand mit IFN- γ kompetenten NK-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse der NK-Zell-Infiltration in Aorten von sham oder ATII-infundierten C57BL/6 oder MyD88^{-/-} Mäusen. Nach Herstellung der Aorteneinzellsuspensionen mittels Col II/DNase I wurden die Zellen *ex vivo* mit 20 ng/ml IL-12 und 20 ng/ml IL-18 für 4-5 h stimuliert. Anschließend erfolgte die Färbung und durchflusszytometrische Analyse auf CD45, NK1.1 und IFN- γ . A, Zusammenfassende graphische Darstellung und statistische Auswertung der Infiltration mit CD45⁺NK1.1⁺ NK-Zellen. B, Zusätzliche Analyse der IFN- γ Kompetenz der Zellen. Links, Repräsentative Konturplots. Rechts, Zusammenfassende grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung. Die Symbole repräsentieren jeweils einzelne Versuchstiere; n=7-8; ordinäre One-Way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$110
- Abbildung 3-22: Die ATII-bedingte Verschiebung der Monozytensubpopulation in Richtung eines proinflammatorischen Phänotyps ist blockiert in MyD88^{-/-} Mäusen. mRNA Expressionsanalyse der Monozytensubpopulationsmarker CD62L und CX₃CR1 in peripheren mononukleären Zellen sowie Aortenlysaten. Monozytäre Zellen wurden mittels eines Histopaque 1.119 - Histopaque 1.077 Gradienten isoliert. Prozentuale Darstellung der Mittelwerte \pm SEM normiert auf C57BL/6 Kontrollmäuse; n= 6-9; One-way ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison Test; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$111
- Abbildung 3-23: Weder die Defizienz in TLR2, TLR7 noch TLR9 führt zu einer verbesserten vaskulären Funktion von ATII-behandelten Mäusen. Isometrische Spannungsstudien mit isolierten Aortenringen von sham oder ATII behandelten TLR2 (A,B; n=6-7; grüne Kurven), TLR7 (C,D; n=3-4; braune Kurven) und TLR9 (E,F; n=3; violette Kurven) Knockout Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen. Dargestellt sind Konzentrations-Relaxationskurven von Aortenringen in Antwort auf den endothelabhängigen Vasodilator Acetylcholin (ACh) (A, C, E) und den endothelunabhängigen Vasodilator Glyceroltrinitrat (GTN) (B,D,F). One-way ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison Test; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$113
- Abbildung 3-24: Überprüfung des *Engraftments* von Spender-Knochenmarkzellen in letal bestrahlten Mäusen mittels durchflusszytometrischer Analyse von Blut und Knochenmark (KM) Letal bestrahlte Wildtyp oder MyD88 defiziente Mäuse wurden

- mit wt oder MyD88^{-/-} Knochenmarkzellen rekonstituiert. Die durchflusszytomtrische Analyse auf CD45.1 und CD45.2 Expression in Blut und KM reflektiert die erfolgreiche Generierung chimärer Mäuse. Gezeigt sind repräsentative FACS *dot plots* am Beispiel einer C57BL/6 Maus (CD45.2), die mit Ly5.1 KM (CD45.1) rekonstituiert wurde.114
- Abbildung 3-25: MyD88 in hämatopoetische Zellen ist involviert in die ATII-induzierte vaskuläre Dysfunktion. Isometrische Spannungsstudien von Knochenmark-chimären Mäusen (wt→wt ±ATII (schwarze Kurven), MyD88^{-/-}→wt +ATII (blaue Kurven) und wt→MyD88^{-/-} +ATII (rote Kurven). Dargestellt sind Dosis-Wirkungskurven auf den endothelabhängigen Vasodilator Acetylcholin (ACh, A) und den endothelunabhängigen Vasodilator Glyceroltrinitrat (GTN, B); n=11-18 Mäuse pro Gruppe; ordinäre One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05.115
- Abbildung 3-26: MyD88 Defizienz in Zellen des hämatopoetischen Systems führt zu einer reduzierten ATII-getriebenen Infiltration von Leukozyten in die Aorta. Einzelzellsuspensionen generiert durch Col II/DNase I Verdau der Aorten von Knochenmark-chimären Mäusen (wt→wt ±ATII, MyD88^{-/-}→wt +ATII und wt→MyD88^{-/-} +ATII) wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen CD45.1 und CD45.2 gefärbt und anschließend die Anzahl an TCRβ⁺ T-Zellen (CD45.1⁺ oder CD45.2⁺ TCRβ⁺, D), Monozyten (CD45.1⁺ oder CD45.2⁺ CD11b⁺GR-1^{low}, F) und Granulozyten (CD45.1⁺ oder CD45.2⁺ CD11b⁺GR-1^{high}, E) durchflusszytometrisch bestimmt. Tote Zellen wurden durch Anfärbung mit *Viability Dye* von der Analyse ausgeschlossen. A, Repräsentative Konturplots. B, Zusammenfassende grafische Darstellung und statistische Auswertung der (B) prozentualen Verteilung von infiltrierenden Leukozyten des Spendertiers oder des Empfängers und (C-F) Einwanderung verschiedener Leukozytenpopulationen; n=7-10; One-way ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison Test; ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05. Die Symbole repräsentieren jeweils einzelne Versuchstiere.117

7.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1-1: Einteilung der Blutdruck-Werte nach den Leitlinien der Deutschen Hochdruckliga (2005) [10]..... | 3 |
| Tabelle 1-2: Einteilung von humanen und murinen Monozyten in verschiedene Klassen anhand Ihrer Funktion und Oberflächenmarker. Abk.: Ly6C, <i>lymphocyte antigen</i> C; CCR2, C-C <i>chemokine receptor type 2</i> ; CX ₃ CR1, CX3C <i>chemokine receptor 1</i> oder <i>fractalkine receptor</i> ; CD62L, L-Selectin; CD11b, Mac-1 α , integrin α M chain, CD115, <i>cluster of differentiation 115</i> (verändert nach [166])..... | 28 |
| Tabelle 2-1: Verwendete Mausstämme..... | 51 |
| Tabelle 2-2: Zusammensetzung diskontinuierliches SDS-PAGE Gel..... | 72 |
| Tabelle 3-1: Systolische Blutdruckwerte von LysM ^{iDTR} +DTX+ATII Mäusen mit Puffer oder Agtr1 ^{-/-} oder gp91 ^{phox^{-/-}} Monozyten behandelt. | 83 |

ANHANG

Isometrische Spannungsstudien:

Anhang Tabelle 1: Maximale Relaxation (*efficacy*) und $-\log(\text{EC}_{50})$ (*potency*) der Konzentrations-Relaxationskurven isolierter Aortenringe von $\text{LysM}^{\text{IDTR}}$ Mäusen infundiert mit ATII und rekonstituiert mit $\text{Agtr1}^{-/-}$ oder $\text{gp91}^{\text{phox}^{-/-}}$ Monozyten.

| Parameter | $\text{LysM}^{\text{IDTR}}$ +Puffer | +DTX | +ATII | $\text{LysM}^{\text{IDTR}}$ +ATII + $\text{Agtr1}^{-/-}$ Monozyten | $\text{LysM}^{\text{IDTR}}$ +DTX +ATII + $\text{gp91}^{\text{phox}^{-/-}}$ Monozyten |
|-----------------------------------|--|------|-------|---|---|
| ACh Efficacy [max. Relaxation, %] | 71,31±3,019 (n=17) | | | 70,57±4,978 (n=6) | 77,06±4,440 (n=7) |
| GTN Efficacy [max. Relaxation, %] | 81,30±2,421 (n=13) | | | 86,78±2,597 (n=6) | 79,39±3,334 (n=6) |

| Parameter | $\text{LysM}^{\text{IDTR}}$ +Puffer | +DTX | +ATII | $\text{LysM}^{\text{IDTR}}$ +ATII + $\text{Agtr1}^{-/-}$ Monozyten | $\text{LysM}^{\text{IDTR}}$ +DTX +ATII + $\text{gp91}^{\text{phox}^{-/-}}$ Monozyten |
|--|--|------|-------|---|--|
| ACh Potency [EC_{50} , -log M] | 7,29±0,116 (n=17) | | | 7,44±0,104 (n=6) | 7,51±0,145 (n=7) |
| GTN Potency [EC_{50} , -log M] | 7,41±0,062 (n=13) | | | 7,54±0,065 (n=6) | 7,48±0,094 (n=7) |

Anhang Tabelle 2: Maximale Relaxation (*efficacy*) und $-\log(\text{EC}_{50})$ (*potency*) der Konzentrations-Relaxationskurven isolierter Aortenringe von C57BL/6 vs. $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ Mäusen infundiert mit ATII oder sham.

| Parameter | C57BL/6 | C57BL/6 +ATII | $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ | $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ +ATII |
|-----------------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| ACh Efficacy [max. Relaxation, %] | 74,98±2,45 (n=11) | 36, 21±4,90 (n=13) * | 62,33±4,81 (n=14) # | 53,26±5,28 (n=11) * |
| GTN Efficacy [max. Relaxation, %] | 88,76±1,85 (n=16) | 57,94±4,86 (n=14) * | 82,14±3,67 (n=14) # | 71,63±2,40 (n=15) ** |

*, $p < 0,05$ vs. C57BL/6 und #, $p < 0,05$ vs. C57BL/6 +ATII.

| Parameter | C57BL/6 | C57BL/6 +ATII | IFN- $\gamma^{-/-}$ | IFN- $\gamma^{-/-}$ +ATII |
|---|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------------|
| ACh Potency [EC ₅₀ , -log M] | 7,06±0,078 (n=11) | 6,55±0,094 (n=13) * | 6,84±0,066 (n=14) | 6,58±0,073 (n=12) * |
| GTN Potency [EC ₅₀ , -log M] | 7,18±0,115 (n=17) | 6,41±0,237 (n=14) * | 6,86±0,191 (n=15) | 7,02±0,136 (n=15) |

*, p<0,05 vs. C57BL/6 und #, p<0,05 vs. C57BL/6 +ATII.

Anhang Tabelle 4: Maximale Relaxation (*efficacy*) und $-\log(\text{EC}_{50})$ (*potency*) der Konzentrations-Relaxationskurven isolierter Aortenringe von C57BL/6 infundiert mit ATII oder sham und behandelt mit anti-NK1.1 oder sham.

| Parameter | C57BL/6 | C57BL/6 +ATII | C57BL/6 +anti-NK1.1 | C57BL/6 +anti-NK1.1 +ATII |
|-----------------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|
| ACh Efficacy [max. Relaxation, %] | 69,11±3,85 (n=16) | 33,02±5,49 (n=14) * | 72,74±1,70 (n=15) # | 53,19±3,76 (n=14) *#† |
| GTN Efficacy [max. Relaxation, %] | 86,74±1,82 (n=16) | 55,98±4,18 (n=16) * | 89,15±1,44 (n=15) # | 69,08±3,83 (n=15) *#† |

*, p<0,05 vs. C57BL/6, #, p<0,05 vs. C57BL/6 +ATII und †, p<0,05 vs. C57BL/6 +anti-NK1.1.

| Parameter | C57BL/6 | C57BL/6 +ATII | C57BL/6 +anti-NK1.1 | C57BL/6 +anti-NK1.1 +ATII |
|---|----------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|
| ACh Potency [EC ₅₀ , -log M] | 6,98±0,335 (n=16) | 6,31±0,709 (n=14) * | 7,05±0,319 (n=15) # | 6,62±0,111 (n=14) |
| GTN Potency [EC ₅₀ , -log M] | 7,16±0,057 (n=16) | 6,26±0,218 (n=15) * | 7,23±0,077 (n=15) # | 6,86±0,214 (n=15) |

*, p<0,05 vs. C57BL/6; #, p<0,05 vs. C57BL/6 +ATII und †, p<0,05 vs. C57BL/6 +anti-NK1.1.

Anhang Tabelle 5: Maximale Relaxation (*efficacy*) und $-\log(\text{EC}_{50})$ (*potency*) der Konzentrations-Relaxationskurven isolierter Aortenringe von $\text{Tbx}21^{-/-}$ Mäusen infundiert mit ATII oder sham und rekonstituiert mit $\text{NK}1.1^{+}$ Wildtyp NK-Zellen bzw. Puffer.

| Parameter | $\text{Tbx}21^{-/-}$ +ATII +Puffer | $\text{Tbx}21^{-/-}$ +ATII + $\text{NK}1.1^{+}$ Zellen |
|-----------------------------------|------------------------------------|--|
| ACh Efficacy [max. Relaxation, %] | 47,69±3,28 (n=18) | 55,23,02±6,88 (n=4) |
| GTN Efficacy [max. Relaxation, %] | 75,63±2,93 (n=16) | 76,15±2,03 (n=4) |

*, $p < 0,05$ vs. $\text{Tbx}21^{-/-}$ +ATII +Puffer.

| Parameter | $\text{Tbx}21^{-/-}$ +ATII +Puffer | $\text{Tbx}21^{-/-}$ +ATII + $\text{NK}1.1^{+}$ Zellen |
|--|------------------------------------|--|
| ACh Potency [EC_{50} , -log M] | 6,66±0,073 (n=18) | 6,77±0,043 (n=4) |
| GTN Potency [EC_{50} , -log M] | 6,99±0,063 (n=12) | 7,00±0,038 (n=8) |

*, $p < 0,05$ vs. $\text{Tbx}21^{-/-}$ +ATII +Puffer.

Anhang Tabelle 6: Maximale Relaxation (*efficacy*) und $-\log(\text{EC}_{50})$ (*potency*) der Konzentrations-Relaxationskurven isolierter Aortenringe von $\text{Tbx}21^{-/-}$ Mäusen infundiert mit ATII oder sham und rekonstituiert mit $\text{CD}11\text{b}^{+}$ Wildtyp Monozyten.

| Parameter | $\text{Tbx}21^{-/-}$ +ATII +Puffer | $\text{Tbx}21^{-/-}$ +ATII +Monozyten |
|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| ACh Efficacy [max. Relaxation, %] | 47,49±5,70 (n=7) | 44,49±4,44 (n=9) |
| GTN Efficacy [max. Relaxation, %] | 71,54±5,24 (n=7) | 71,54±2,07 (n=9) |

*, $p < 0,05$ vs. $\text{Tbx}21^{-/-}$ +ATII +Puffer.

| Parameter | $\text{Tbx}21^{-/-}$ +ATII +Puffer | $\text{Tbx}21^{-/-}$ +ATII +Monozyten |
|--|------------------------------------|---------------------------------------|
| ACh Potency [EC_{50} , -log M] | 6,72±0,076 (n=6) | 6,68±0,059 (n=9) |
| GTN Potency [EC_{50} , -log M] | 7,04±1,01 (n=7) | 6,79±0,068 (n=12) |

*, $p < 0,05$ vs. $\text{Tbx}21^{-/-}$ +ATII +Puffer.

Anhang Tabelle 7: Maximale Relaxation (*efficacy*) und $-\log(\text{EC}_{50})$ (*potency*) der Konzentrations-Relaxationskurven isolierter Aortenringe von $\text{LysM}^{\text{IDTR}}$ Mäusen alle behandelt mit DTX, infundiert mit ATII und rekonstituiert mit T-bet⁻ oder T-bet⁺ Monozyten bzw. sham behandelt.

| Parameter | LysM ^{IDTR} +DTX | LysM ^{IDTR} +DTX | LysM ^{IDTR} +DTX |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | +ATII | +ATII +T-bet ⁻ | +ATII +T-bet ⁺ |
| | +Puffer | Monozyten | Monozyten |
| ACh Efficacy [max. Relaxation, %] | 55,06±4,093 (n=13) | 54,35±8,088 (n=4) | 33,86±3,345 (n=10) * |
| GTN Efficacy [max. Relaxation, %] | 75,81±3,603 (n=13) | 77,40±3,930 (n=4) * | 53,99±5,698 (n=8) |

*, p<0,05 vs. LysM^{IDTR}+DTX+ATII+Puffer.

| Parameter | LysM ^{IDTR} +DTX | LysM ^{IDTR} +DTX | LysM ^{IDTR} +DTX |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | +ATII | +ATII +T-bet ⁻ | +ATII +T-bet ⁺ |
| | +ATII | Monozyten | Monozyten |
| ACh Potency [EC ₅₀ , -log M] | 6,63±0,151 (n=13) | 6,59±0,119 (n=4) | 6,30±0,166 (n=9) |
| GTN Potency [EC ₅₀ , -log M] | 7,08±0,062 (n=13) | 7,29±0,033 (n=4) | 6,76±0,295 (n=8) |

*, p<0,05 vs. LysM^{IDTR}+DTX+ATII+Puffer.

Anhang Tabelle 8: Maximale Relaxation (*efficacy*) und $-\log(\text{EC}_{50})$ (*potency*) der Konzentrations-Relaxationskurven isolierter Aortenringe von C57BL/6 vs. MyD88^{-/-} Mäusen infundiert mit ATII oder sham.

| Parameter | C57BL/6 | C57BL/6 | MyD88 ^{-/-} | MyD88 ^{-/-} |
|-----------------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| | | +ATII | | +ATII |
| ACh Efficacy [max. Relaxation, %] | 66,24±1,46 (n=24) | 38,46±4,21 (n=23) * | 73,92±35 (n=17) # | 62,59±4,54 (n=18) # |
| GTN Efficacy [max. Relaxation, %] | 85,18±1,91 (n=29) | 71,88±2,82 (n=23) * | 81,28±2,47 (n=17) | 79,23±2,82 (n=18) |

*, p<0,05 vs. C57BL/6 und #, p<0,05 vs. C57BL/6 +ATII.

| Parameter | C57BL/6 | C57BL/6 +ATII | MyD88 ^{-/-} | MyD88 ^{-/-} +ATII |
|---|---------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|
| ACh Potency [EC ₅₀ , -log M] | 6,99±0,08 (n=24) | 6,40±0,14 (n=23) * | 7,31±0,14 (n=17) # | 6,96±0,11 (n=18) # |
| GTN Potency [EC ₅₀ , -log M] | 7,18±1,91 (n=24) | 6,81±2,82 (n=17) * | 7,19±2,47 (n=16) | 7,23±2,82 (n=18) |

*, p<0,05 vs. C57BL/6 und #, p<0,05 vs. C57BL/6 +ATII.

Anhang Tabelle 9: Maximale Relaxation (*efficacy*) und $-\log(\text{EC}_{50})$ (*potency*) der Konzentrations-Relaxationskurven isolierter Aortenringe von C57BL/6 vs. TLR2^{-/-} Mäusen infundiert mit ATII oder sham.

| Parameter | C57BL/6 | C57BL/6 +ATII | TLR2 ^{-/-} | TLR2 ^{-/-} +ATII |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|
| ACh Efficacy [max. Relaxation, %] | 62,28±2,277 (n=6) | 43,87±3,704 (n=6) | 60,83±5,034 (n=7) | 38,96±8,812 (n=6) |
| GTN Efficacy [max. Relaxation, %] | 82,97±4,387 (n=6) | 71,59±3,568 (n=6) | 87,64±3,462 (n=7) | 63,47±6,750 (n=6) |

*, p<0,05 vs. C57BL/6 und #, p<0,05 vs. C57BL/6 +ATII.

| Parameter | C57BL/6 | C57BL/6 +ATII | TLR2 ^{-/-} | TLR2 ^{-/-} +ATII |
|---|---------------------|-----------------------|---------------------|------------------------------|
| ACh Potency [EC ₅₀ , -log M] | 6,99±0,048 (n=6) | 6,68±0,110 (n=6) | 7,01±0,064 (n=7) | 6,73±0,257 (n=6) |
| GTN Potency [EC ₅₀ , -log M] | 7,10±0,058 (n=6) | 6,91±0,162 (n=6) * | 7,33±0,064 (n=7) | 7,01±0,123 (n=6) |

*, p<0,05 vs. C57BL/6 und #, p<0,05 vs. C57BL/6 +ATII.

Anhang Tabelle 10: Maximale Relaxation (*efficacy*) und $-\log(\text{EC}_{50})$ (*potency*) der Konzentrations-Relaxationskurven isolierter Aortenringe von C57BL/6 vs. TLR7^{-/-} Mäusen infundiert mit ATII oder sham.

| Parameter | C57BL/6 | C57BL/6 +ATII | TLR7 ^{-/-} | TLR7 ^{-/-} +ATII |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|------------------------------|
| ACh Efficacy [max. Relaxation, %] | 77,23±1,338 (n=3) | 53,10±10,46 (n=3) | 82,70±3,651 (n=317) | 41,70±3,868 (n=3) |
| GTN Efficacy [max. Relaxation, %] | 80,47±1,651 (n=3) | 62,65±3,181 (n=4) | 78,03±2,471 (n=4) | 44,75±12,16 (n=4) |

*, p<0,05 vs. C57BL/6 und #, p<0,05 vs. C57BL/6 +ATII,

| Parameter | C57BL/6 | C57BL/6 +ATII | TLR7 ^{-/-} | TLR7 ^{-/-} +ATII |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|------------------------------|
| ACh Potency [EC ₅₀ , -log M] | 7,08±0,075 (n=4) | 6065±0,225 (n=4) | 6,81±0,118 (n=4) | 6,30±0,386 (n=3) |
| GTN Potency [EC ₅₀ , -log M] | 7,24±0,119 (n=4) | 7,01±0,143 (n=4) | 7,05±0,054 (n=4) | 6,83±0,291 (n=4) |

*, p<0,05 vs. C57BL/6 und #, p<0,05 vs. C57BL/6 +ATII.

Anhang Tabelle 11: Maximale Relaxation (*efficacy*) und -log(EC50) (*potency*) der Konzentrations-Relaxationskurven isolierter Aortenringe von C57BL/6 vs. TLR9^{-/-} Mäusen infundiert mit ATII oder sham.

| Parameter | C57BL/6 | C57BL/6 +ATII | TLR9 ^{-/-} | TLR9 ^{-/-} +ATII |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|
| ACh Efficacy [max. Relaxation, %] | 65,30±5,478 (n=3) | 46,27±3,380 (n=3) | 66,33±3,718 (n=3) | 32,00±3,044 (n=3) |
| GTN Efficacy [max. Relaxation, %] | 77,23±1,338 (n=3) | 53,10±10,46 (n=3) | 82,70±3,651 (n=3) | 41,70±3,868 (n=3) |

*, p<0,05 vs. C57BL/6 und #, p<0,05 vs. C57BL/6 +ATII.

| Parameter | C57BL/6 | C57BL/6 +ATII | TLR9 ^{-/-} | TLR9 ^{-/-} +ATII |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|------------------------------|
| ACh Potency [EC ₅₀ , -log M] | 6,91±0,066 (n=3) | 6,48±0,128 (n=3) | 7,03±0,128 (n=3) | 6,70±0,117 (n=3) |
| GTN Potency [EC ₅₀ , -log M] | 7,04±1,91 (n=3) | 6,84±2,82 (n=3) | 7,15±2,47 (n=3) | 6,05±2,82 (n=3) |

*, p<0,05 vs. C57BL/6 und #, p<0,05 vs. C57BL/6 +ATII.

Anhang Tabelle 12: Maximale Relaxation (*efficacy*) und $-\log(\text{EC}_{50})$ (*potency*) der Konzentrations-Relaxationskurven isolierter Aortenringe von wt→wt, wt→wt +ATII, MyD88^{-/-}→wt +ATII vs. wt→ MyD88^{-/-}+ATII Mäusen.

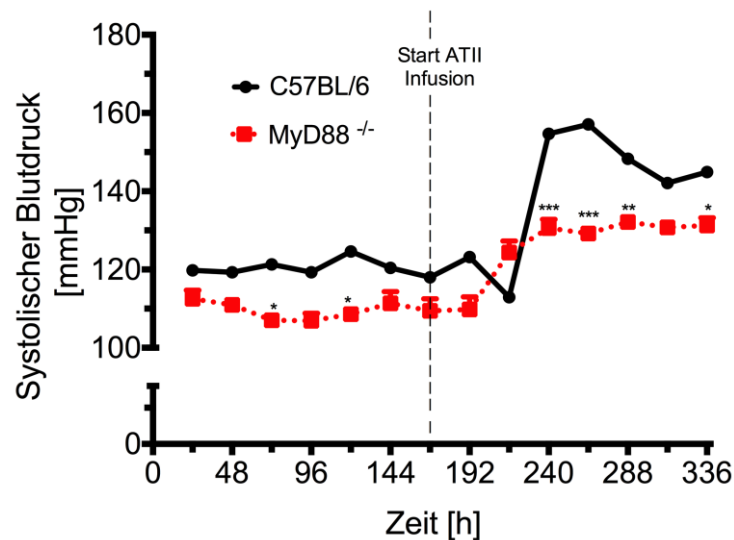
| Parameter | wt→wt | wt→wt +ATII | MyD88 ^{-/-} →wt | wt→ +ATII | MyD88 ^{-/-} |
|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------|
| ACh Efficacy [max. Relaxation, %] | 68,39±4,036 (n=12) | 60,00±2,074 (n=15) | 69,29±2,586 (n=16) | 60,04±3,876 (n=12) | |
| GTN Efficacy [max. Relaxation, %] | 82,88±1,590 (n=18) | 71,51±2,185 (n=18) * | 81,15±1,536 (n=15) # | 82,33±3,268 (n=11) # | |

*, p<0,05 vs. C57BL/6 und #, p<0,05 vs. C57BL/6 +ATII.

| Parameter | wt→wt | wt→wt +ATII | MyD88 ^{-/-} →wt | wt→ MyD88 ^{-/-} +ATII |
|---|----------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| ACh Potency [EC ₅₀ , -log M] | 7,13±0,077 (n=11) | 6,70±0,071 (n=15) * | 6,83±0,063 (n=16) | 6,89±0,093 (n=12) |
| GTN Potency [EC ₅₀ , -log M] | 7,23±0,044 (n=15) | 7,11±0,098 (n=15) | 7,32±0,062 (n=15) | 7,39±0,067 (n=15) |

*, p<0,05 vs. C57BL/6 und #, p<0,05 vs. C57BL/6 +ATII.

Telemetrische Aufzeichnung des arteriellen systolischen Blutdrucks:



Anhang Abbildung 1: MyD88^{-/-} Mäusen sind partiell vor der Ausbildungen einer arteriellen Hypertonie geschützt. Der systolische arterielle Blutdruck von MyD88^{-/-} Mäusen (n=4) im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle (n=1) wurde telemetrisch mit Hilfe von Carotis-Kathetern über einen Zeitraum von 336 h erfasst. Mittelung der Einzelwerte über 24 h. Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SEM; n=3-4, Two-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test. ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05.

Anhang Tabelle 13: Two-Way ANOVA des systolischen Blutdrucks von MyD88^{-/-} Mäusen (n=4) im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (n=1). Two-way ANOVA; .***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05..

| Bonferroni's multiple comparisons Test | Mittlere Differenz | 95% CI of diff. | Signifikant? | Zusammenfassung |
|---|--------------------------------------|------------------------|---------------------|------------------------|
| Zeit (h) | C57BL/6 - MyD88^{-/-} | | | |
| 24 | 7,267 | -6,228 to 20,76 | Nein | ns |
| 48 | 8,333 | -5,161 to 21,83 | Nein | ns |
| 72 | 14,27 | 0,7721 to 27,76 | Ja | * |
| 96 | 12,40 | -1,095 to 25,89 | Nein | ns |
| 120 | 16,03 | 2,539 to 29,53 | Ja | * |
| 144 | 9,067 | -4,428 to 22,56 | Nein | ns |
| 168 | 8,567 | -4,928 to 22,06 | Nein | ns |
| 192 | 13,40 | -0,09452 to 26,89 | Nein | ns |
| 216 | -11,43 | -24,93 to 2,061 | Nein | ns |
| 240 | 24,13 | 10,64 to 37,63 | Ja | *** |
| 264 | 27,90 | 14,41 to 41,39 | Ja | *** |
| 288 | 16,17 | 2,672 to 29,66 | Ja | ** |
| 312 | 11,33 | -2,161 to 24,83 | Nein | ns |
| 336 | 13,63 | 0,139 to 27,13 | Ja | * |

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich gemäß § 16 Abs. 3d der Promotionsordnung vom 30.04.1990, 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.

Sabine KOSSMANN

(Sabine Kossmann)

DANKSAGUNG

CURRICULUM VITAE