

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und
Hypertensiologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Rolle der regulatorischen T-Lymphozyten in
Angiotensin II-bedingtem hypertensiven
Endorganschaden**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Heda Kvakán
aus Čakovec, Kroatien

Gutachter: 1. Priv.-Doz.Dr.rer.nat. D.N. Müller
2. Prof. Dr. M. Bader
3. Priv.-Doz.Dr.med. D.Müller

Datum der Promotion: 21. November 2008

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Arterielle Hypertonie	1
1.1.1. Pathogenese der arteriellen Hypertonie	1
1.1.2. Morphologie und Mechanismen des kardialen Schadens	3
1.1.3. Morphologie und Mechanismen des vaskulären Schadens	6
1.1.4. Morphologie und Mechanismen des renalen Schadens	7
1.1.5. Angiotensin II und das Immunsystem	9
1.2. Regulatorische T-Lymphozyten	11
1.2.1. Charakteristika der regulatorischen T-Lymphozyten	11
1.2.2. Das Aufgaben- und Wirkungsspektrum der regulatorischen T-Lymphozyten	13
1.2.3. Biologie der regulatorischen T-Lymphozyten	15
1.2.3.1. Transkriptionsfaktor Foxp3	15
1.2.3.2. Interleukin-2	16
1.2.4. Mechanismen der Immunsuppression	17
1.2.4.1. Zellkontakt-vermittelte Immunsuppression	17
1.2.4.2. Zytokin-vermittelte Immunsuppression	18
2. Hypothese und Ziele	19
2.1. Hypothese	19
2.2. Ziele	19
3. Methoden und Materialien	21
3.1. Versuchstiere	21
3.2. Versuchsprotokoll	21
3.3. An lebenden Versuchstieren durchgeführte Eingriffe/Untersuchungen und Probengewinnung	22
3.3.1. Induktion der arteriellen Hypertonie	22
3.3.2. Verabreichen der regulatorischen T-Lymphozyten	23
3.3.3. Telemetrische Blutdruckmessung	23
3.3.4. Gewinnung des 24h-Sammelurins	23
3.3.5. Echokardiografie	24
3.3.6. Elektrophysiologische Untersuchung	24
3.4. Zytologische Methoden	25

3.4.1. Präparation der Splenozyten und Zellen aus den Lymphknoten	25
3.4.2. Oberflächen-Färbungen mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper	25
3.4.3. Intrazelluläre Färbung mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper	26
3.4.4. Auftrennung und Analyse der Zellen mittels magnetischer und Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung	26
3.4.4.1. Das Prinzip der magnetischen Zellsortierung	26
3.4.4.2. Das Prinzip der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung/Durchflusszytometrie	27
3.4.4.3. Isolation der CD4+CD25+ (regulatorischen) Lymphozyten	27
3.4.4.4. Durchflusszytometrische Analyse der isolierten Zellen	28
3.4.4.5. Durchflusszytometrische Analyse der Splenozyten	28
3.4.5. <i>Cell tracking</i>	29
3.5. Aufarbeitung der Urin-, Blut- und Organproben	29
3.5.1. Messung der Kreatinin- und der Harnstoff-Konzentration im Serum	29
3.5.2. Bestimmung der Albuminkonzentration	29
3.5.3. Pathohistologische Aufarbeitung	30
3.5.3.1. Organeinbettung in Paraffin	30
3.5.3.2. Aufarbeitung der Organe für Kryo-Schnitte	30
3.5.3.3. Immunohistologie	30
3.5.3.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	31
3.5.3.5. Masson-Goldner-Trichrom-Färbung	31
3.5.3.6. <i>Sirius red</i> -Färbung	31
3.5.3.7. Pathohistologische Begutachtung	32
3.5.4. Molekularbiologische Methoden	32
3.5.4.1. RNA Isolation und Synthese von cDNA	32
3.5.4.2. <i>Realtime</i> RT-PCR	33
3.5.4.3. Isolation und <i>miRXplore</i> Microarray Analyse der Expression der microRNA	34
3.6. Statistik	35
3.7. Materialien	35

3.7.1. Verbrauchsmaterialien	35
3.7.2. Chemikalien	35
3.7.3. Antikörper	38
3.7.3.1. Für Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie verwendete Antikörper	38
3.7.3.2. Für Immunohistochemie verwendete Antikörper	38
3.7.4. Primer	38
4. Ergebnisse	40
4.1. Isolation der regulatorischen T-Lymphozyten mittels magnetischer und Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung	40
4.2. Einfluss regulatorischer T-Lymphozyten auf die Angiotensin II-induzierte arterielle Hypertonie	42
4.3. Einfluss regulatorischer T-Lymphozyten auf Angiotensin II-bedingte kardiale Pathologie	42
4.3.1. Echokardiografische Daten	42
4.3.2. Postmortaler Herzhypertrophie-Index	44
4.3.3. Pathohistologische Begutachtung	44
4.3.3.1. Darstellung fibrotischer Veränderungen im Herzen	44
4.3.3.2. Immunhistochemische Darstellung der kardialen entzündlichen Infiltrate	45
4.3.4. Einfluss der Dauerbehandlung mit Angiotensin II auf den Lymphozytenphänotyp	46
4.3.5. Einfluss der Angiotensin II-induzierten arteriellen Hypertonie und regulatorischer T-Lymphozyten auf kardiale Expression von <i>brain natriuretic peptide</i> und Interleukin-6	47
4.3.6. Einfluss der Angiotensin II-induzierten arteriellen Hypertonie und regulatorischer T-Lymphozyten auf kardiale microRNA Expression	48
4.3.7. Elektrophysiologische Eigenschaften des Myokards bei Angiotensin II-bedingter kardialer Hypertrophie und ihre Beeinflussung durch den Transfer regulatorischer T-Lymphozyten	49
4.4. Einfluss regulatorischer T-Lymphozyten auf den Angiotensin II-bedingten Nierenschaden	52

4.4.1. Renale Funktion in Angiotensin II -induzierter arterieller Hypertonie	52
4.4.2. Einfluss regulatorischer T-Lymphozyten auf Angiotensin II-bedingte Albuminurie	52
4.4.3. Pathohistologische Begutachtung	53
4.4.3.1. Darstellung pathologischer renalen Veränderungen mittels Masson-Goldner-Trichrom-Färbung	53
4.4.3.2. Immunhistochemische Darstellung der renalen entzündlichen Infiltrate	54
4.4.3.3. <i>Cell tracking</i>	54
5. Diskussion	55
5.1. Die Rolle der proinflammatorischen Zytokine und der Immunzellen in der Entstehung der kardialen Hypertrophie und Fibrose	55
5.2. Die Rolle der Inflammation und des Immunsystems bei Herzinsuffizienz	57
5.3. Die Art der Immunantwort im Angiotensin II-bedingten Endorganschaden	58
5.4. Der Einfluss regulatorischer T-Lymphozyten im Ang II-bedingten renalen Schaden	59
5.5. Einfluss des Angiotensins II auf den Lymphozytenphänotyp	61
5.6. Die Mechanismen der Verbesserung des Angiotensin II-bedingten Endorganschadens	61
5.7. Funktionelle Bedeutung der reduzierten kardialen Hypertrophie und Fibrose bei Angiotensin II- und Treg-behandelten Tieren	63
5.8. Expression der microRNA im Angiotensin II-bedingten kardialen Schaden und ihre Beeinflussung durch den Transfer regulatorischer T-Lymphozyten	64
5.9. Klinische Anwendungen von regulatorischen T-Lymphozyten	66
5.10. Ausblick	67
6. Zusammenfassung	69
7. Literaturverzeichnis	71
8. Eidesstattliche Erklärung	82
9. Publikationsliste und Preise	83
10. Danksagung	84

1. Einleitung

1.1. Arterielle Hypertonie

Die Diagnose der arteriellen Hypertonie wird gestellt, wenn bei wiederholter sachgemäßer Blutdruckmessung ein systolischer Blutdruck von mehr als 140 mmHg, bzw. ein diastolischer Blutdruck von mehr als 90 mmHg gemessen wird.¹ Ungefähr 30% der Bevölkerung in der industrialisierten Welt leiden an arterieller Hypertonie und können Hypertonie-bedingte Endorganschäden entwickeln.² Arterielle Hypertonie stellt den häufigsten Risikofaktor für die Entstehung der kardiovaskulären Erkrankungen dar.³ Hypertonie-bedingte Vaskulopathie begünstigt die Entstehung der Atherosklerose und führt zu Gefäßverschlüssen und somit zu Herz- und Gehirnfarkten bzw. transienten Ischämien.⁴ Außerdem stellt sie den wichtigsten Risikofaktor für intrazerebrale Blutungen dar.⁵ Kardiale Hypertrophie und die daraus resultierende Herzinsuffizienz sowie hypertensive Nephropathie mit chronischem Nierenversagen sind weitere häufige Folgen einer langjährigen arteriellen Hypertonie.^{6,7}

1.1.1. Pathogenese der arteriellen Hypertonie

Im Gegensatz zu den sekundären Hypertonieformen mit einer klaren organspezifischen Ursache oder zugrundeliegendem genetischen Defekt ist der genaue Pathomechanismus der arteriellen Hypertonie bei mehr als 90% der Patienten nicht bekannt, weshalb von essentieller, primärer oder idiopathischer Hypertonie gesprochen wird. An der Entstehung der essentiellen arteriellen Hypertonie sind zugleich mehrere Pathomechanismen beteiligt: erhöhte zirkulatorische und insbesondere lokale Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)⁸, erhöhte Sympatikus-Aktivität⁹, verschiedene genetische Faktoren¹⁰ sowie renale Mechanismen, wie z.B. konstitutiv niedrige Anzahl der Nephronen¹¹. Hinzu kommen weitere Faktoren, die die Entstehung der arteriellen Hypertonie begünstigen, wie z.B. erhöhte Kochsalz-Einnahme¹², Alkoholkonsum¹³, Adipositas und Dyslipidämie¹⁴. Aus diesem komplexen Zusammenspiel verschiedener Pathomechanismen entsteht ein relativ einheitliches klinisches Bild der arteriellen Hypertonie; unterschiedliche Pathomechanismen können sich aber in der unterschiedlichen Ausprägung des hypertensiven Endorganschadens widerspiegeln.

Unter physiologischen Bedingungen dient das RAAS der Erhaltung des normalen systemischen Drucks und wird beim Blutdruckabfall aktiviert. Die wichtigsten Stimuli für die

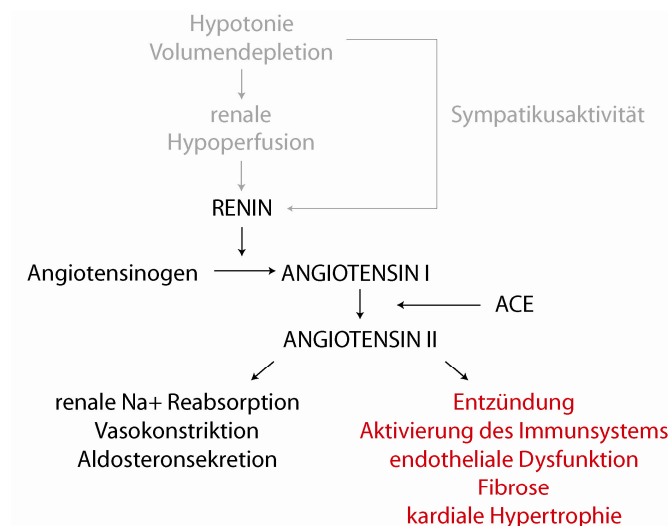


Abbildung 1. Schematische Darstellung des RAAS. Physiologische Aktivierung des RAAS ist in grauer und schwarzer Schrift dargestellt. In roter Schrift sind in Rahmen der prolongierten RAAS-Aktivierung auftretende Effekte aufgelistet.

renale Renin-Sekretion sind renale Hypoperfusion und Sympatikusaktivierung. Renin spaltet Angiotensin (Ang) I von dem, hauptsächlich in der Leber produzierten, Angiotensinogen. Angiotensin converting enzyme (ACE) katalysiert die Umwandlung vom Ang I zum Ang II. Ang II bewirkt die systemische Vasokonstriktion, steigert die renale Natrium- und Wasser-Rückresorption und erhöht die Aldosteronsekretion. In der Regel

beheben diese Ang II-Effekte die initiale Hypotonie die zur Aktivierung des RAAS geführt hat.

Allerdings sprechen mehrere Hinweise dafür, dass das RAAS zumindest bei einem Teil der Patienten entscheidend an der Entstehung der arteriellen Hypertonie beteiligt ist. In diesem Fall findet eine Aktivierung des RAAS ohne zugrunde liegende Hypotonie oder Volumendepletion statt. 60% der Patienten mit arterieller Hypertonie sprechen auf eine Monotherapie mit einem ACE-Inhibitor an. Sogar bei Patienten mit einer niedrigen zirkulatorischen Renin-Aktivität und niedrigen zirkulatorischen Ang II-Spiegeln kommt es unter der Therapie mit einem ACE-Inhibitor zu ausgeprägter Blutdrucksenkung.¹⁵ In diesem Zusammenhang wird insbesondere die Bedeutung der lokalen Ang II-Produktion deutlich. Seikaly et al. haben 1000 Mal höhere Ang II-Spiegel intrarenal als in der Zirkulation gemessen.¹⁶ Weitere Beweise für die Beteiligung des RAAS an der Entstehung der arteriellen Hypertonie und des hypertensiven Endorganschadens kommen aus umfangreichen Tierexperimenten. Mäuse denen das Gen für Angiotensinogen, ACE, oder Ang II Typ 1 (AT1)-Rezeptor fehlte, weisen einen um 35 mmHg niedrigeren Blutdruck als Kontrolltiere auf.¹⁷ Die für Mausrenin transgenen Ratten sind im Gegensatz dazu deutlich hypertensiv und sprechen auf eine Therapie mit niedrigen Dosen von ACE-Inhibitoren an.⁸ Für humanes Renin und Angiotensinogen transgene Ratten weisen ebenfalls eine ausgeprägte arterielle Hypertonie sowie hypertensive Endorganschäden auf. Sie sprechen auf die Therapie mit einem ACE-Inhibitor sehr gut an.¹⁸ Aufgrund der überzeugender Hinweise für die

maßgebliche Beteiligung des Ang II in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie und des hypertensiven Schadens wurde im experimentellen Teil dieser Arbeit ein Mausmodell mit Ang II-induzierter arterieller Hypertonie verwendet.

Wie bereits erwähnt, stellt die arterielle Hypertonie ein erhebliches Risiko für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen³, Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz sowie der hypertensiven Nephropathie und Niereninsuffizienz dar.^{6, 7} Die genannten Endorganschäden entstehen aus einem komplexen Zusammenspiel biomechanischer und neurohumoraler Faktoren. Im Folgenden wird die Morphologie des kardialen, vaskulären und renalen hypertensiven Schadens geschildert. Des Weiteren werden die wichtigsten biomechanischen und neurohumoralen Faktoren sowie die wichtigsten molekularen Mechanismen mit Betonung auf Ang II-bedingter Endorganschädigung dargestellt.

1.1.2. Morphologie und Mechanismen des kardialen Schadens

Hauptmerkmale der hypertensiven Herzerkrankung sind Hypertrophie der Kardiomyozyten, perivaskuläre und interstitielle Fibrosierung sowie entzündliche Infiltrate.

Sowohl biomechanische als auch neurohumorale Stimuli führen zur Hypertrophie der Kardiomyozyten bei arterieller Hypertonie. Der biomechanische Stress kann direkt über kardiale Mechanozeptoren intrazelluläre Signaltransduktionswege aktivieren, oder aber die Sekretion mehrerer Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren anregen, die dann in autokriner/parokriner Weise intrazelluläre Signaltransduktionswege aktivieren. Veränderungen des Genexpressionsprofils, vermehrte Synthese kontraktiler Proteine, sowie allgemeine Kardiomyozytenhypertrophie stellen die gemeinsame Endstrecke der Signaltransduktion sowohl biomechanischer als auch neurohumoraler Stimuli dar.¹⁹

Es sind nur wenige dehnungsempfindliche kardiomyozyteneigene Rezeptoren bekannt. Das Protein Melusin interagiert mit Integrinen, die ihrerseits die extrazelluläre Matrix mit dem intrazellulären Zytoskelett verbinden, und stellt somit einen möglichen Mechanozeptor dar.²⁰

Das so genannte *muscle LIM protein*, das im Bereich des Z-Streifen verankert ist, stellt einen weiteren möglichen Mechanozeptor dar.²¹ Der biomechanische Stress kann auch ohne Beteiligung spezialisierter Mechanozeptoren von Kardiomyozyten wahrgenommen werden. Dehnung führt zur Assoziation zwischen dem (AT1)-Rezeptor und Janus Kinase-2 (JAK2), wodurch G-Proteine ins Zellinnere wandern und das Hypertrophie-Programm aktivieren.²²

Wie bereits erwähnt, werden verschiedene Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren im Rahmen von biomechanischem Stress von Kardiomyozyten freigesetzt. Hinzu kommen die

im Rahmen der arteriellen Hypertonie in der Zirkulation vorhanden Substanzen, wie z.B. Katecholamine. Neurohumorale Stimuli aktivieren eine Vielzahl intrazellulärer Signaltransduktionswege. Ang II, Endothelin-1 und Katecholamine binden an den $G_{\alpha_q/\alpha_{11}}$ -Protein gekoppelten Rezeptor, der in weiterer Folge unter Beteiligung von Phospholipase C β zur Entstehung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-triphosphat führt. DAG aktiviert Proteinkinase C, die unter anderen Histondiacylasen phosphoryliert und somit zur Veränderungen der Chromatinstruktur und des Genexpressionprofils beiträgt. Inositol-triphosphat erhöht den intrazellulären Kalzium-Spiegel. Dies vermittelt über Calmodulin-Histondiacylasen bzw. über Calcineurin-NFAT und Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor GATA4 das Hypertrophie-Signal. *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B) ist ebenfalls dem Calcineurin-NFAT nachgeschaltet und spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung der kardialen Hypertrophie.²³ Das aktivierte Protein $G_{\alpha_q/\alpha_{11}}$ -Protein stellt einen der wichtigsten Stimuli für *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dar. Diese wird auch von *insulin growth factor-I* (IGF-I) und *fibroblast growth factor* (FGF)-2 über einen Tyrosinkinase-gebundenen Rezeptor aktiviert, von Cardiotrophin-1 über gp130-gebundenen Rezeptor sowie von *tumor growth factor* (TGF)- β über Threonin/Serin-gebundenen Rezeptor. MAPK Signaltransduktion aktiviert p38, c-Jun N-terminale Kinase (JNK) sowie *extracellular regulated kinase* (ERK), die wiederum weitere intrazelluläre Proteine, darunter auch mehrere Transkriptionsproteine, phosphorylieren.¹⁹ Es ist erwähnenswert, dass JNK und p38 sowohl an den Signaltransduktionswegen der kardialen Hypertrophie als auch der Apoptose beteiligt sind.²⁴

Einen weiteren, erst vor kurzem entdeckten Signaltransduktionsweg stellt die microRNA dar, die in verschiedenen Formen der kardialen Hypertrophie stark reguliert ist und ursächlich an ihrer Entstehung beteiligt ist. Überexpression bzw. Defizienz einzelner microRNAs führt im Tiermodell zur Hemmung bzw. Verstärkung der kardialen Hypertrophie.²⁵

Da im experimentellen Teil dieser Arbeit das Modell der Ang II-induzierten arteriellen Hypertonie und Endorganschäden verwendet wird, soll an dieser Stelle ausführlicher auf die direkten Effekte von Ang II auf Kardiomyozyten eingegangen werden. *In vivo* und *in vitro* Versuche beweisen, dass Ang II Hypertrophie der Kardiomyozyten hervorruft, unabhängig von der mechanischen Beanspruchung des Herzmuskels. Mazzolai et al. zeigten dass transgene Mäuse die ausschließlich im Herzen Ratten-Angiotensinogen exprimieren bereits bei normalen systemischen Druck kardiale Hypertrophie entwickeln.²⁶ Lindpaintner et al. zeigten, dass niedrig dosiertes Ang II kardiale Hypertonie induziert, ohne den systemischen Blutdruck zu beeinflussen.²⁷ Ang II induziert Hypertrophie der isolierten Kardiomyozyten *in*

vitro; dieser Effekt konnte mittels AT1-Rezeptor-Antagonisten aufgehoben werden.²⁸ Die Hauptquelle des Ang II in der hypertensiven Herzerkrankung ist nicht das zirkulierende, sondern das lokale, im Myokard produzierte Ang II.²⁹ Dieses wird, wie bereits erwähnt, auch als Antwort auf biomechanischen Stress von Kardiomyozyten sezerniert.³⁰ In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass im Mausmodell der Druck-bedingten kardialen Hypertrophie die Behandlung mit ACE-Hemmern ihre Entwicklung hemmt, obwohl sie die für die Entwicklung der kardialen Hypertrophie in diesem Modell unerlässliche Nachlast nicht beeinflusst.³¹ Ang II bedingte kardiale Hypertrophie wird durch parakrin wirkendes TGF- β und FGF-2 vermittelt. Schulz et al. zeigten, dass bei den Mäusen die kein TGF- β exprimieren, die Ang II- bedingte linksventrikuläre Hypertrophie ausbleibt.³² Ein vergleichbares Ergebnis zeigen Versuche mit Mäusen, die kein FGF-2 exprimieren. Sie entwickeln auch keine Ang II-bedingte linksventrikuläre Hypertrophie.³³

Außer der Hypertrophie der Kardiomyozyten spielen Proliferation der kardialen Fibroblasten und Fibrosierung eine entscheidende Rolle im kardialen und Hypertrophie.^{34, 35} Die klinische Bedeutung der Fibrose liegt vor allem in ihrer Assoziation mit dem Auftreten der ventrikulären Arrhythmien.³⁶

Kardiale Fibroblasten produzieren sowohl die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix (Kollagen Typ I und III) als auch die Matrixmetalloproteinasen, die die Bestandteile der extrazellulären Matrix abbauen. Aus diesem Grund stellen sie den Hauptregulator der extrazellulären Matrix dar. Der mechanische Stress führt ähnlich wie bei Kardiomyozyten zur Produktion von Ang II, das in parakriner/autokriner Weise Fibroblastenproliferation sowie Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix anregt.³⁷ Dies wird zum Teil über Induktion von TGF- β , Endothelin-1, Interleukin-6 und Osteopontin vermittelt. Weitere neurohumoralen Faktoren, wie z.B. FGF-2, IGF-I und Katecholamine sind ebenfalls an der Entstehung der Fibrose beteiligt.³⁸ Vor kurzem wurde die Bedeutung von kardialen Mineralokortikoidrezeptoren und Aldosteron wiederentdeckt. Ihre Blockade verbesserte entscheidend die Morbidität und Mortalität der herzinsuffizienten Patienten.³⁹ Weitere Untersuchungen zeigten, dass dieser Effekt zumindest zum Teil auf einem verminderten Umsatz der extrazellulären Matrix beruht.⁴⁰ Durch die perivaskuläre und interstitielle Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine wird die Relaxationsfähigkeit des Myokards negativ beeinflusst, was zum einen in die diastolische Dysfunktion mündet, zum anderen Energieversorgung und Kommunikation zwischen den Kardiomyozyten hemmt. Die daraus resultierende Apoptose und Nekrose der Kardiomyozyten stellt einen weiteren Anreiz für die Fibrosierung dar.³⁸

Kardiale Hypertrophie geht mit einem proinflammatorischen Phänotyp einher. So sind im Mausmodell mit Druck-induzierter kardialer Hypertrophie eine Reihe proinflammatorischer Zytokine wie z.B. *tumor necrosis factor* (TNF)- α , Interleukin-6, *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 und *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 vermehrt exprimiert. Mäuse die TNF- α -defizient sind zeigen verminderte Druck-bedingte kardiale Hypertrophie sowie einen milderen inflammatorischen Phänotyp.⁴¹ Pathohistologische Untersuchungen der Ang II-bedingten kardialen Hypertrophie zeigen signifikante perivaskuläre und interstitielle entzündliche Infiltrate, bestehend aus Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten^{42, 43} Ihre Infiltration könnte durch die Expression der Adhäsionsmoleküle *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 und *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 in hypertensiver kardialen Hypertrophie vermittelt werden.⁴⁴ Arterielle Hypertonie in T- und B-Lymphozyten defizienten Mäusen führte nicht zu der erwarteten kardialen Fibrose, sondern resultierte im verminderten kardialen Kollagengehalt und in der Dilatation des Ventrikels.⁴⁵ Die genauen Mechanismen dieses Effekts sowie die genaue Rolle der Lymphozyten in der kardialen Hypertrophie bleiben letztlich ungeklärt.

Die oben beschriebenen pathologischen Veränderungen führen in ihrer Gesamtheit zum elektrischen Remodeling des Myokards. Kardiale Hypertrophie fördert eine nicht einheitliche Verlängerung der Dauer des Aktionspotentials und der Repolarisation. Diese Veränderungen der elektrischen Eigenschaften erhöhen die Vulnerabilität des Myokards und können zur Entstehung von ventrikulären Tachykardien führen.⁴⁶ So konnten Rials et al. in mehreren Studien zeigen dass eine Regression der kardialen Hypertrophie die elektrophysiologischen Eigenschaften des Myokards positiv beeinflusst.^{47, 48}

1.1.3. Morphologie und Mechanismen des vaskulären Schadens

Arterielle Hypertonie verursacht über eine Vielfalt von Mechanismen vaskuläre Schäden. Diese führen zum erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, die zumindest zum Teil durch schnelleres Fortschreiten der Atherosklerose zu erklären sind, wie aus folgenden tierexperimentellen Arbeiten ersichtlich ist. Wu et al. zeigten, dass die Induktion der arteriellen Hypertonie mittels Aortenkonstriktion in Apoprotein E-defizienten Mäusen zum Ausbruch der atherosklerotischen Veränderungen in den Gefäßabschnitten proximal der gesetzten Aortenstenose führt und betonten somit die Bedeutung mechanischer Beanspruchung der Gefäße.⁴⁹ Weiss et al. zeigten, dass Ang II zum schnelleren Fortschreiten der Atherosklerose in Apoprotein E-defizienten Mäusen führt.⁵⁰ Im Gegensatz dazu

verlangsamte die Hemmung der Entstehung vom Ang II mittels ACE-Inhibitoren bzw. die Blockade seiner Wirkung mittels AT1-Rezeptor-Antagonisten das Fortschreiten der Atherosklerose in Apoprotein E-defizienten Mäusen.⁵¹

Die in der arteriellen Hypertonie herrschende erhöhte Scherspannung und der erhöhte intravasale Druck werden in der Endothelschicht der Gefäße in ein molekulares Signal umgewandelt.⁵² Eine Reihe der Signaltransduktionswege wird durch die einwirkenden mechanischen Kräfte aktiviert. Sie führen zur Proliferation der Endothelzellen und der glatten Muskelzellen sowie zur vermehrten Produktion der extrazellulären Matrix.⁵³ Dies resultiert in der Intima- und Mediaverdickung der kleinen Arterien. Gesteigerte Produktion der Sauerstoffradikale führt zur endothelialen Expression der Adhäsionsmoleküle und somit zur Leukozyteninfiltration.⁵⁴ Diese inflammatorische Kaskade trägt durch proliferative Signale zusätzlich zur Mediaverdickung bei.

Ang II ist entscheidend an der Entstehung der vaskulären Schäden beteiligt. Diese beschränken sich nicht auf ein bestimmtes Organ, sondern betreffen den gesamten Organismus. Ang II erhöht die Expression von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und verschiedenen Prostaglandinen und erhöht somit die Permeabilität des Endothels.^{55,56} Ang II führt zu Entstehung von freien Sauerstoffradikalen in Endothelialzellen und vaskulären glatten Muskelzellen.⁵⁷ Freie Sauerstoffradikale dienen als Signaltransduktionsmoleküle für Transkriptionsfaktoren NF-κB und *activator protein* (AP)-1 und führen zur Expression von verschiedenen proinflammatorischen Molekülen wie z.B. TNF-α, *granulocyte-macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF), MCP-1, E- und P-Selektin an den Endothelialzellen sowie ICAM-1 und VCAM-1. Somit wird die Adhäsion verschiedener Immunzellen, insbesondere der Monozyten und Lymphozyten, und ihre anschließende vaskuläre Infiltration begünstigt.⁵⁸ In der oben beschriebenen Mediaverdickung spielt neben dem mechanischen Stress Ang II ebenfalls eine entscheidende Rolle, da es zur Hypertrophie und Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen führt.^{59,60} Zusammen mit vermehrter Produktion extrazellulärer Proteine trägt dies entscheidend zur Mediaverdickung bei.⁶¹

1.1.4. Morphologie und Mechanismen des renalen Schadens

Die Hypertensive Nephropathie ist charakterisiert durch arteriosklerotische Veränderungen der renalen Arteriolen, glomeruläre Sklerose und interstitielle Nephritis.

Ein frühes klinisches Zeichen der hypertensiven Nephropathie ist die Mikroalbuminurie, die außerdem ein Prediktor der kardiovaskulären Ereignisse sowie der Nierensuffizienz ist.⁶² Patienten mit hypertensiven Nephropathie entwickeln meistens eine milde chronische Niereninsuffizienz mit geringer Proteinurie (bis 1g/Tag). Bei Patienten die eine zugrunde liegende Nierenerkrankung haben, steigt die Wahrscheinlichkeit des terminalen Nierenversagens mit dem Ausmaß der arteriellen Hypertonie an.⁶³ Ein weiteres Merkmal der renalen Nephropathie sind ausgeprägte interstitielle entzündliche Infiltrate.⁶⁴

Die oben beschriebenen vaskulären Schäden, insbesondere die Mediaverdickung und die perivaskulären entzündlichen Infiltrate, stellen einen bedeutsamen Teil der renalen Schädigung dar. Die aus der Mediaverdickung resultierende Verengung des Gefäßlumens der großen und kleinen renalen Arterien sowie glomerulären Arteriolen ist ein Ausdruck der hämodynamischen Autoregulation. Sie hemmt initial eine direkte Übertragung des erhöhten intravasalen Drucks auf die renalen Kapillaren, führt aber im Zeitverlauf zu pathologischen vaskulären Veränderungen.⁶⁵

Ang II stellt die Schlüsselsubstanz der renalen Schädigung dar, sowohl bei hypertensiver Nephropathie als auch bei einer Reihe anderer renalen Erkrankungen, wie z.B. bei verschiedenen Glomerulonephritiden oder bei diabetischer Nephropathie.⁶⁶⁻⁶⁸ Die Niere verfügt über ein intrarenales RAAS; die lokale Ang II-Konzentration kann das 1000fache der systemischen Ang II-Konzentration betragen.¹⁶

Der wichtigste hämodynamische Effekt des Ang II besteht in der bevorzugten Konstriktion der Vas efferens des Glomerulus. Dadurch wird der glomeruläre Filtrationsdruck reguliert und die glomeruläre Filtrationsrate auch unter ungünstigen hämodynamischen Bedingungen aufrechterhalten. Allerdings führt eine zeitlich ausgedehnte und übermäßige Vasokonstriktion des Vas efferens sowie eine chronische Erhöhung des glomerulären Kapillardrucks zur Entstehung der Glomerulosklerose.⁶⁹

Großteils über AT1-Rezeptoren aktiviert Ang II die nukläeren Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B in der Niere. In weiterer Folge werden Expression und Synthese extrazellulärer Matrixproteine in den Mesangialzellen, interstitiellen Fibroblasten und Tubuluszellen induziert. Dies wird durch TGF- β und *connective tissue growth factor* (CTGF) vermittelt.^{70, 71} Weitere Signaltransduktionswege der Ang II-bedingten renalen Fibrose führen über die Aktivierung von SMAD-Proteinen und vom Rho-Kinase-System.^{72, 73} Zusammen mit verlangsamter Degradation der extrazellulären Matrix, die zum Teil mit der Induktion von *plasma activator inhibitor* (PAI)-1 stattfindet, führt Ang II zur renalen Fibrose.⁷⁴

Die Aktivierung von AP-1 und NF- κ B durch Ang II wirkt nicht nur profibrotisch, sondern stellt den Beginn der inflammatorischen Reaktion dar, die in weiterer Folge zur Aktivierung des unspezifischen und spezifischen Immunsystems führt. Oben beschriebene vaskuläre Schädigung findet auch an den renalen Gefäßen statt und spielt in der Entwicklung des renalen Schadens eine herausragende Rolle. Ang II erhöht die Gefäßpermeabilität und ermöglicht zusammen mit Expression verschiedener Chemokine (MCP-1, RANTES, Osteopontin), Zytokine (Interleukin-6, TNF- α) und Adhäsionsmoleküle (VCAM-1, ICAM-1) die Bildung von interstitiellen entzündlichen Infiltraten, bestehend aus Monozyten und Lymphozyten (für detaillierte Beschreibung siehe „vaskuläre Schäden“). Außerdem stimuliert Ang II über die bereits erwähnte NF- κ B-Aktivierung die entzündliche Reaktion in den Mesangialzellen und glomerulären Endothelialzellen. Ruiz-Ortega et al. zeigten, dass Ang II mittels NF- κ B-Aktivierung die Produktion von MCP-1 induziert. Wolf et al. zeigten, dass Ang II die Expression von RANTES, einem chemotaktischen Protein, in den glomerulären Endothelialzellen hervorruft. Infiltrierte Zellen können ihrerseits die entzündliche/immunologische Reaktion verstärken, indem sie weitere Chemokine und Zytokine produzieren. Außerdem verfügen sie über alle Komponenten des RAAS und können durch Ang II-Produktion die Hypertonie sowie die hypertensive Nephropathie weiter verstärken.⁷⁵

Neben Ang II ist Aldosteron ein weiterer wichtiger Faktor in der Entstehung der hypertensiven Nephropathie. Klinische Studien zeigten, dass kombinierte Gabe von ACE-Hemmern und Aldosteron-Antagonisten einen besseren Effekt auf die Albuminurie in hypertensiver Nephropathie hat als jeweilige Substanz alleine, trotz der vergleichbaren Blutdrucksenkung.⁷⁶ Längeres Verabreichen von Aldosteron-Analoga (DOCA) sowie gleichzeitige salzreiche Diät führen zur arteriellen Hypertonie, renaler Fibrose und Proteinurie bei der Maus.⁷⁷ Für den renalen Schaden verantwortliche Mechanismen sind, vergleichbar mit Ang II-induziertem Schaden, Bildung von freien Sauerstoffradikalen und Expression von proinflammatorischen Molekülen mit Ausbildung fibrotischer Veränderungen.^{78, 79}

1.1.5. Angiotensin II und Immunsystem

Untersuchungen zur Pathophysiologie des hypertensiven und insbesondere des Ang II-bedingten Endorganschadens weisen auf die proinflammatorischen Eigenschaften des Angs II hin. Die Hypothese, dass antiinflammatorische und immunsuppressive Maßnahmen den hypertensiven Endorganschaden positiv beeinflussen wurde im Labor im Rahmen mehrerer

tierexperimentellen Studien erforscht. Da Ang II ein wesentlicher Faktor in der Entstehung der arteriellen Hypertonie und des hypertensiven Schadens ist, wurden in mehreren Versuchen doppelt-transgene Ratten (dTGR) für das humane Renin und Angiotensinogen verwendet. Diese entwickeln eine arterielle Hypertonie mit ausgeprägtem Endorganschaden und sterben im Alter von 7 Wochen.¹⁸ Inhibition der NF- κ B-Aktivierung mittels Pyrrolidindithiocarbamat bzw. höher Dosen Acetylsalicylsäure verbesserten die Albuminurie und kardiale Hypertrophie, und verringerte entzündliche Infiltrate in der Niere und im Herzen.^{42, 43} Cyclosporin A, ein Inhibitor der T-Lymphozytenaktivierung, verbesserte die Albuminurie und kardiale Hypertrophie. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass der Effekt von Cyclosporin A auf die renale Pathologie auf seine immunsuppressive Eigenschaften zurückzuführen ist. Allerdings könnte es sich bei der Verbesserung der kardialen Hypertrophie um einen direkten Effekt auf Kardiomyozyten handeln, da Cyclosporin A auch ein Calcineurin-Inhibitor ist.⁸⁰ Dexamethason, ein unspezifisches Immunsuppressivum, Etanercept, ein TNF- α -Inhibitor, und Mycophenolatmofetil, ein B- und T-Lymphozyten-Inhibitor, haben die renale Schädigung in den doppelt-transgenen Ratten verbessert, ohne den systemischen Blutdruck bedeutsam zu beeinflussen.⁸¹

In mehreren Studien mit hypertensiven Patienten sowie Patienten mit koronarer Herzerkrankung wurden eindeutige antiinflammatorische Effekte der ACE-Hemmer und AT1-Rezeptor-Antagonisten gesehen. Interleukin-6, TNF- α , PAI-1, MCP-1 wurden bei diesen Patienten mittels ACE-Blockade gesenkt.⁸²

Proinflammatorische Eigenschaften von Ang II spielen nicht nur im hypertensiven Endorganschaden eine wichtige Rolle. Blockade des RAAS wirkt sich positiv auf eine Reihe der immunologisch bedingten Erkrankungen, wie z.B. auf die chronische Abstoßungsreaktion nach der Nierentransplantation im Rattenmodell und nach der Herztransplantation im Mausmodell aus.^{83, 84} Ebenso konnte ein positiver Effekt in der experimentellen autoimmunen Myokarditis sowie in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis gesehen werden.^{85, 86} Die anti-glomeruläre-Basalmembran-Glomerulonephritis zeigt bei AT1-Rezeptor-*knock out*-Mäusen im Vergleich mit den *wild typ* Mäusen einen milderen Phänotyp.⁸⁷ Die positiven Effekte der RAAS-Blockade in immunologischen Erkrankungen beschränken sich nicht nur auf die tierexperimentellen Daten; eine Behandlung mit ACE-Hemmer verbesserte die Symptomatik bei Patienten mit rheumathoider Arthritis.⁸⁸

Ang II übt einen direkten Einfluss auf die Zellen des Immunsystems aus. Mehrere Zellpopulationen des Immunsystems exprimieren den AT1-Rezeptor. Dieser wurde vom Nataraj et al. auf mRNA Ebene in den T und B-Lymphozyten sowie Makrophagen der Maus

nachgewiesen. In derselben Arbeit zeigten sie, dass eine alleinige Zellstimulation mit Ang II ausreichend ist, um Proliferation der Splenozyten hervorzurufen. Dieser Effekt blieb in den Splenozyten einer AT_{1A} Rezeptor-defizienter Maus aus. Ebenso konnte dieser Effekt mittels ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Antagonisten gehemmt werden. Aktivierung der Lymphozyten mittels Angs II bewirkt die Erhöhung des intrazellulären Kalziums und führt somit zur Aktivierung des Calcineurin-Signaltransduktionswegs.⁸⁹ Weitere experimentelle Daten weisen darauf hin, dass Ang II modulatorische Effekte auf das T_H1/ T_H2-Gleichgewicht ausübt. Shao et al. zeigten, dass aus hypertensiven, mit Ang II- behandelten Ratten isolierte T-Lymphozyten mehr Interferon- γ und weniger Interleukin-4 sezernieren als T-Lymphozyten, die aus unbehandelten Ratten isoliert wurden. Das bedeutet, dass Ang II das T_H1/T_H2-Gleichgewicht zugunsten der T_H1-Immunantwort verschieben kann.⁹⁰ Dieses wurde von den Versuchen von Mazzolai et al. weiter untermauert. Splenozyten von Mäusen mit der renovaskulären, Ang II-bedingten, arteriellen Hypertonie sezernieren mehr Interferon- γ als normotensive Mäuse.⁹¹ Außerdem verfügen Lymphozyten und weitere Zellen des Immunsystems über alle Komponenten des RAAS-Systems und können durch Ang II-Produktion die arterielle Hypertonie sowie inflammatorische/immunologische Reaktionen weiter verstärken. Bereits im Jahr 1993 zeigten Gomez et al., dass die Leukozyten von Ratten Angiotensinogen sezernieren.⁹² In einer im Jahr 2007 publizierten Arbeit vom Jurewicz et al. wurden erstmalig humane Immunzellen systematisch nach Komponenten des RAAS untersucht. Es zeigte sich, dass mehrere Subpopulationen mit Komponenten des RAAS ausgestattet sind. Mitogen- oder *T cell receptor* (TCR)-vermittelte Proliferation der T und NK Zellen konnte nicht nur mittels Angs II, sondern auch mittels Angiotensinogens und Angs I verstärkt werden. Dies zeigt, dass in diesen Zellen vorhandene Komponenten des Immunsystems auch funktionell bedeutsam sind. Ähnlich wie Shao zeigte Jurewicz, dass Ang II das T_H1/T_H2-Gleichgewicht zugunsten T_H1-Immunantwort verschiebt.^{90, 93}

1.2. Regulatorische T-Lymphozyten

1.2.1. Charakteristika der regulatorischen T-Lymphozyten

Eine der grundlegenden Voraussetzungen für ein adäquat funktionierendes Immunsystem ist eine ausreichende Toleranz gegenüber den eigenen Körperstrukturen. Die im Thymus stattfindende klonale Deletion der T- und B-Lymphozyten, die eigene Antigene erkennen, stellt den zentralen Mechanismus der Selbsttoleranz dar.⁹⁴ Allerdings werden mittels klonaler

Deletion nicht alle autoreaktiven Lymphozyten beseitigt; ein bedeutender Anteil bleibt erhalten und wird durch weitere, so genannte periphere Mechanismen der Selbsttoleranz unter Kontrolle gehalten.⁹⁵ Diese Mechanismen sind vielfältig. Der Bedeutendste wird von einer separaten Subpopulation der T-Lymphozyten getragen, von den so genannten T-Lymphozyten (Treg).⁹⁶

Regulatorische T-Lymphozyten kommen sowohl unter CD4+ als auch unter CD8+ T-Lymphozyten vor. Es handelt sich hier um keine einheitliche Population, sondern vielmehr um mehrere Subpopulationen der Lymphozyten unterschiedlichen Ursprungs, Phänotyps und Wirkmechanismus. Die zahlreichste und funktionell bedeutendste Subpopulation der regulatorischen T-Lymphozyten stellen die natürlich vorkommende, CD4+CD25+ T-Lymphozyten dar.⁹⁶ Sie werden im Rahmen der negativen Selektion im Thymus ausgebildet und bilden 5-10% der peripheren CD4+ Lymphozytenpopulation, sowohl bei der Maus als auch beim Menschen. Bei der Maus wird der für die regulatorischen T-Lymphozyten spezifische Transkriptionsfaktor *forkhead box protein* (Foxp3) von ca. 90% der CD4+CD25+ Lymphozyten exprimiert.⁹⁷ Die restlichen 10% der CD4+CD25+ Lymphozyten stellen vermutlich aktivierte Effektor-Lymphozyten dar. Weitere T-Lymphozyten mit immunsuppressiven Eigenschaften entstehen in der Peripherie. Bei Antigenpräsentation in Anwesenheit von Interleukin-10 kommt es zur Bildung von so genannten Tr1-Lymphozyten. Sie exprimieren weder CD25 noch Foxp3. Sie spielen in der Begrenzung der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle; ihre Immunsuppression beruht auf Sekretion von Interleukin-10.⁹⁸

Antigenpräsentation bzw. CD3- und CD28-Kostimulation zusammen mit TGF- β führt zur Expression von dem für regulatorische Eigenschaften verantwortlichen Transkriptionsfaktor Foxp3 in CD4+CD25- Lymphozyten.⁹⁹ Die immunsuppressive Funktion wird durch TGF- β bzw. mittels direkten Zellkontakts vermittelt.¹⁰⁰⁻¹⁰² Interessanterweise differenzieren T-Lymphozyten in Anwesenheit von Interleukin-6, einem der wichtigsten Zytokine mit sowohl proinflammatorischen als auch antiinflammatorischen Eigenschaften, nicht zu regulatorischen T-Lymphozyten, sondern zu proinflammatorischen, Interleukin-17 sezernierenden T_H17-Lymphozyten.¹⁰³

Unter den CD8+ Lymphozyten existiert ebenfalls eine inhomogene Lymphozyten-Population mit immunsuppressiven Eigenschaften. Unter dem Einfluss bestimmter aktivierter CD4+ Lymphozyten können CD8+ Lymphozyten immunsuppressive Eigenschaften entwickeln.¹⁰⁴ Der immunsuppressive Mechanismus der CD8+ Lymphozyten ist nicht geklärt, wobei entsprechende Zytokinsekretion bzw. Differenzierung zu zytotoxischen Lymphozyten

wahrscheinlich ist. Weitere Subpopulationen der CD8⁺ Lymphozyten zeichnen sich durch Interleukin-10-vermittelte Immunsuppression.^{105, 106} Wiederholte Stimulation der CD8⁺ Lymphozyten durch bestimmte Antigene kann zur Entstehung der CD8⁺Foxp3⁺ Lymphozyten mit suppressiven Effekten auf antigenpräsentierende Zellen führen. Diese spielen wiederum in der Entwicklung der CD4⁺ regulatorischen T-Lymphozyten eine Rolle.¹⁰⁷

1.2.2. Das Aufgaben- und Wirkungsspektrum der regulatorischen T-Lymphozyten

Regulatorische T-Lymphozyten weisen weder die Eigenschaften der T_H1- noch der T_H2-Lymphozyten auf. Stattdessen haben sie die Fähigkeit, Zellproliferation und Interleukin-2 Produktion der CD4⁺ Lymphozyten zu supprimieren.¹⁰⁸ Außerdem können sie CD8⁺ Lymphozyten, B-Lymphozyten, dendritische Zellen und Makrophagen supprimieren. Auf die genauen Mechanismen der Immunsuppression wird später eingegangen.¹⁰⁹⁻¹¹²

Zentrale Rolle der regulatorischen T-Lymphozyten in der Erhaltung der Selbsttoleranz wurde im Rahmen der folgenden Arbeiten verdeutlicht. Bereits vor mehr als 30 Jahren fiel auf, dass Mäuse und Ratten nach Thymektomie und weitgehender Zerstörung der peripheren Lymphozyten Autoimmunerkrankungen entwickeln.^{113, 114} Die Beobachtung, dass der Transfer normaler Lymphozyten, insbesondere der CD4⁺ Lymphozyten, die Entwicklung der Autoimmunität verhinderte, ließ die Vermutung aufkommen, dass die Depletion einer immunsuppressiven Lymphozytenpopulation für die Entwicklung der Autoimmunität verantwortlich sein könnte.^{115, 116} Dass die immunsuppressiven Effekte an CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten gebunden sind, bewiesen Sakaguchi et al., indem sie T-Lymphozyten-defizienten Mäusen Splenozytensuspension transferierten, die davor von CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten bereinigt worden war. Dies führte zur systemischen inflammatorischen Reaktion, die durch den Kotransfer kleiner Mengen CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten verhindert werden konnte.⁹⁶ Diese Versuche lieferten den Beweis, dass innerhalb des normalen Immunsystems autoreaktive Lymphozyten existieren und, dass diese von CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten unter Kontrolle gehalten werden. Das Wegfallen regulatorischer T-Lymphozyten führte zum Ausbruch der Autoimmunität. Daraus ergibt sich die herausragende Bedeutung der Verschiebungen im quantitativen oder qualitativen Gleichgewicht zwischen regulatorischen T-Lymphozyten und autoreaktiven Lymphozyten in der Pathogenese der Autoimmunität. Die durch verschiedene Noxen hervorgerufene Zahlminderung der regulatorischen T-Lymphozyten führte in Tierversuchen zur Entwicklung autoimmuner

Erkrankungen.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Genetische Polymorphismen in den Genen, die an der Funktionalität der regulatorischen T-Lymphozyten beteiligt sind, bestimmen die individuelle Neigung zur Autoimmunität.¹²⁰ Dies wird insbesondere am Beispiel der Patienten die an einer seltenen autoimmunen Erkrankung namens IPEX (Immunsregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-chromosomal) leiden deutlich. Aufgrund einer Störung im *Foxp3*-Gen bleibt bei den Patienten die Bildung der regulatorischen T-Lymphozyten aus. Eine generalisierte autoimmune Erkrankungen ist die Folge.¹²¹

Mittlerweile wurden pathologische Veränderungen in der Anzahl und in der Funktionalität der regulatorischen T-Lymphozyten bei vielen Autoimmunerkrankungen aufgedeckt, wie z.B. bei der Multiplen Sklerose, Diabetes mellitus Typ 1 und bei der rheumatoiden Arthritis. Während sich das Vorkommen der regulatorischen T-Lymphozyten im peripheren Blut zwischen gesunden Personen und an Multipler Sklerose erkrankten Patienten nicht unterscheidet, zeigen die regulatorischen T-Lymphozyten der Patienten mit schubförmig remittierender Multipler Sklerose ein vermindertes Suppressionspotenzial.^{122, 123} Dies wurde von Feger et al. bestätigt. Sie zeigten außerdem, dass im Liquor der Patienten mit Multipler Sklerose vermehrt regulatorische T-Lymphozyten zu finden sind.¹²⁴ Vergleichbar mit den Befunden bei den Patienten mit Multipler Sklerose zeigte sich zwischen den Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und gesunden Probanden kein Unterschied in der Anzahl der regulatorischen T-Lymphozyten. Ein zeitlicher Verlauf der Anzahl der regulatorischen T-Lymphozyten konnte ebenfalls nicht ermittelt werden. Ähnlich wie bei den Patienten mit Multipler Sklerose, zeigten die regulatorischen T-Lymphozyten, die aus den an Diabetes mellitus Typ 1 erkrankten Patienten isoliert wurden, eine verminderte immunsuppressive Aktivität.¹²⁵ Auch bei rheumatoider Arthritis scheint die suppressive Eigenschaft der regulatorischen T-Lymphozyten gestört zu sein. Das in der Synovialflüssigkeit reichlich vorhandenes TNF- α übt einen negativen Einfluss auf die regulatorischen T-Lymphozyten. Sie exprimieren weniger Foxp3 und weisen verminderte suppressive Eigenschaften auf. Anti-TNF- α -Therapie mit Infliximab führt zur verstärkten Foxp3-Expression und zum verbesserten suppressiven Potenzial der regulatorischen T-Lymphozyten bei rheumatoider Arthritis.^{126, 127}

Über die gesicherte Rolle der regulatorischen T-Zellen in der Autoimmunität und Transplanttoleranz hinaus, zeigte der Einsatz der regulatorischen T-Lymphozyten in verschiedenen inflammatorisch und immunologisch bedingter Erkrankungen einen positiven Effekt. Wolf et al. zeigten im Mausmodell der Anti-glomerulären-Basalmembran-Glomerulonephritis bei unveränderter Immunkomplex-Ablagerung eine deutliche Reduktion der entzündlichen Infiltrate. Im Mausmodell mit Adriamycin-induzierter Nephropathie führte

die Behandlung mit regulatorischen T-Lymphozyten zur verminderten renalen Makrophagen-Infiltration.¹¹²

Außer in den oben erwähnten Gebieten sind regulatorische T-Lymphozyten an der Modulation der Immunantwort auf Allergene und pathogene oder kommensale Mikroben sowie bei der Entwicklung der Toleranz gegenüber transplantierten Organen beteiligt. Des Weiteren unterdrücken sie in der Schwangerschaft die unerwünschte Immunreaktion dem Fetus gegenüber.¹²⁸

1.2.3. Biologie der regulatorischen T-Lymphozyten

1.2.3.1. Transkriptionsfaktor Foxp3

Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 ist ein zentrales Merkmal der CD4+CD25+ regulatorischen T-Lymphozyten. Bei der Maus beschränkt sich seine Expression ausschließlich auf die regulatorischen T-Lymphozyten, bei dem Menschen allerdings ist sie transient auch bei den aktivierten CD4+CD25- und CD8+CD25- Lymphozyten ohne jegliche suppressive Eigenschaften vorhanden.¹²⁹ Der Transkriptionsfaktor Foxp3 wird von einem, auf dem X-Chromosom lokalisierten Gen kodiert. Seine Entdeckung im Jahr 2001 ist auf die intensive Beschäftigung mit der seltenen humanen X-chromosomalen Autoimmunerkrankung namens IPEX sowie auf das Erforschen der genetischen Grundlagen des an generalisierter Autoimmunität leidenden, so genannten „scurfy“ Mausstammes zurückzuführen.^{130, 131} Ein Defekt im Gen *Foxp3* und daraus folgendes Fehlen der regulatorischen T-Lymphozyten liegt beiden Erkrankungen zugrunde. Die Expression von Foxp3 ist für die Entwicklung, Funktion und Aufrechterhaltung der regulatorischen T-Lymphozyten unerlässlich. Wenn einer bestrahlten *wild typ*-Maus Knochenmark einer *Foxp3*-defizienten Maus transplantiert wird, bleibt die Differenzierung der regulatorischen T-Lymphozyten aus.¹³² Die Expression von Foxp3 legt den suppressiven Phänotyp der regulatorischen T-Lymphozyten fest. Retrovirale Transfektion des für Foxp3 kodierenden Gens in die naiven T-Lymphozyten führt zur Expression von, für regulatorische T-Zellen charakteristischer, Oberflächenmolekülen CD25, CTLA-4 und GITR und induziert suppressive Eigenschaften *in vitro* und *in vivo*.⁹⁷ Die Ablation von *Foxp3* in reifen, peripheren regulatorischen T-Lymphozyten führt wiederum zum Verlust der immunsuppressiven Eigenschaften und sogar zur Entwicklung eines insgesamt proinflammatorischen Zellphänotyps mit Produktion von Interleukin-2.¹³³

Die *Microarray*-Analyse der murinen CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten und der CD4⁺CD25⁻ Lymphozyten vor und nach Aktivierung sowie der *Foxp3*-transfizierten und nicht transfizierten CD4⁺ Lymphozyten deckte eine Reihe von *Foxp3* regulierter Gene auf. Ihre genaue Funktion ist noch weitgehend unklar.¹³⁴ Es ist allerdings bekannt, dass die Transkription von Interleukin-2, Interleukin-4 sowie Interferon- γ mittels direkter Interaktion von *Foxp3* mit NF- κ B und NF-AT gehemmt wird.¹³⁵ In einer vor kurzem publizierten Arbeit zeigten Rudensky et al., dass das Fehlen der regulatorischen *Foxp3*⁺ Zellen tatsächlich für den Phänotyp der „scrufty“-Maus verantwortlich ist, und dass darüber hinaus die regulatorischen *Foxp3*⁺ Zellen während des gesamten Lebens Autoimmunität unter Kontrolle halten.¹³⁶

1.2.3.2. Interleukin-2

Regulatorische T-Lymphozyten sind durch die Expression des Oberflächenmoleküls CD25 charakterisiert, der die α -Kette des Rezeptors für Interleukin-2 darstellt. Im Gegensatz zu der ursprünglichen Annahme, hier handele es sich um einen Surrogatmarker, spielt der Rezeptor für Interleukin-2 in der Biologie der regulatorischen T-Lymphozyten eine herausragende Rolle. *Knock out*-Mäuse die keine für Interleukin-2, Interleukin-2-Rezeptor- α oder Interleukin-2-Rezeptor- β kodierenden Gene besitzen, entwickeln eine frühe pathologische Lymphoproliferation und sterben an autoimmunen Erkrankungen.¹³⁷⁻¹³⁹ Interleukin-2-bedingte Signaltransduktion ist unentbehrlich für die Generation der regulatorischen T-Lymphozyten im Thymus sowie für ihre Expansion und Funktionalität in der Peripherie.¹⁴⁰ Regulatorische T-Lymphozyten die keinen Rezeptor für Interleukin-2 aufweisen, konnten die Entwicklung der experimentellen autoimmunen Enzephalitis bei Mäusen nicht verhindern, im Gegensatz zu den regulatorischen T-Lymphozyten, die den Interleukin-2-Rezeptor besitzen, aber aus einer Interleukin-2-defizienten Maus stammten.¹⁴¹ Dies zeigt, dass die Interleukin-2-bedingte Signaltransduktion für die intakte Suppression unentbehrlich ist. *In vitro* *suppressions assay*-Versuche zeigten, dass die Suppression der Proliferation der Effektor-T-Lymphozyten durch die regulatorischen T-Lymphozyten mittels Zugabe des Interleukins-2 aufgehoben wird.¹⁰⁸ Allerdings zeigten weiterführende Versuche, dass die Suppression der Interleukin-2-Produktion, im Gegensatz zu der Proliferation der Effektor-T-Lymphozyten, weiterhin bestehen bleibt.¹⁴² Zorn et al. zeigten des Weiteren, dass das Verabreichen von Interleukin-2 die Expression von *Foxp3* in humanen regulatorischen T-Zellen *in vivo* verstärkt sowie einen transienten Anstieg der Anzahl der regulatorischen T-Lymphozyten auslöst.¹⁴³

Interleukin-2 hat außerdem einen ausgeprägten Einfluss auf das suppressive Potenzial der regulatorischen T-Lymphozyten. Eine Vorbehandlung mit anti-CD3-Antikörper und Interleukin-2 *in vitro* steigerte die suppressiven Eigenschaften der regulatorischen T-Lymphozyten, was sich in einer geringeren Anzahl der für eine komplette Suppression der Effektor-T-Lymphozyten notwendigen, regulatorischen T-Lymphozyten zeigte. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass nach einer solchen Vorbehandlung die von den regulatorischen T-Lymphozyten vermittelte Suppression antigenunspezifisch ist.¹⁴⁴

1.2.4. Die Mechanismen der Immunsuppression

1.2.4.1. Zellkontakt-vermittelte Immunsuppression

Sowohl bei der Maus als auch beim Menschen beruht die Suppression durch die regulatorischen T-Zellen *in vitro* auf Zell-Zell-Kontakt. Thornton und Shevach zeigten bereits 1998, dass eine Trennung der regulatorischen T Zellen von den zu supprimierenden CD4+ Lymphozyten durch eine semi-permeable Membran die Suppression aufhebt. *In vitro* Blockade von Interleukin-10 zeigte keinen Einfluss auf die suppressive Aktivität der regulatorischen T-Zellen.¹⁰⁸ *In vitro* Blockade von TGF- β zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die suppressive Aktivität der regulatorischen T-Zellen, allerdings zeigten Nakamura et al., dass die Zellkontakt-vermittelte Suppression durch das Membran-gebundene TGF- β bedingt ist und die Blockade des Membran-gebundenen TGF- β die Suppression aufhebt.^{145,146}

Es sind mehrere Mechanismen der Zellkontakt-vermittelten Immunsuppression bekannt. So bindet CTLA-4 an CD80 und CD86 der antigenpräsentierenden Zellen und hemmt somit Aktivierung der T-Lymphozyten.¹¹¹ CTLA-4 kann außerdem an CD80 und CD86 der T-Lymphozyten binden und sie somit unmittelbar negativ beeinflussen.¹⁴⁷ Des Weiteren induziert die Bindung von CTLA-4 an CD80 und CD86 das Enzym Indoleamin-2,3-dioxygenase (IDO) und triggert somit Synthese potenter zytotoxischer Substanzen.¹⁴⁸ Ein weiterer Mechanismus der Zellkontakt-vermittelten Immunsuppression stellt die Bindung von dem an den regulatorischen T-Lymphozyten exprimierten *lymphocyte activation gene* (LAG)-3 an die *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse II-Moleküle.¹⁴⁹ Diese werden an dendritischen Zellen, B-Zellen, Monozyten sowie Makrophagen exprimiert. Dies bietet eine Erklärung für immunsuppressive Wirkung der regulatorischen T-Lymphozyten auf mehrere verschiedene Zelltypen. Außerdem bewirkt die Bindung von CTLA-4 an das CD80 und CD86

der dendritischen Zellen ihre geringere Verfügbarkeit für die Bindung der CD4+ Lymphozyten.¹¹¹

1.2.4.2. Zytokin-vermittelte Immunsuppression

Gegensätzlich zu den *in vitro* Versuchen zeigen die Ergebnisse der *in vivo* Versuche, dass bestimmte Zytokine für die Suppression unentbehrlich sind. Annacker et al. zeigten, dass regulatorische T-Lymphozyten, aus einer Interleukin-10-*knock out*-Maus isoliert, nicht in der Lage sind, eine experimentelle Kolitis zu verhindern.¹⁵⁰ Vergleichbar dazu zeigten Kingsley et al., dass die Blockade vom Interleukin-10 die von den regulatorischen T-Lymphozyten induzierte Toleranz gegenüber allogenen Hauttransplantaten aufhebt.¹⁵¹ TGF- β ist an der Oberfläche von ca. 80% der aktivierten regulatorischen T-Lymphozyten exprimiert. Wie bereits oben erwähnt, zeigten Nakamura et al., dass die Immunsuppression durch das Membran-gebundene TGF- β vermittelt ist, da seine Blockade den immunsuppressiven Effekt aufhebt. Gleichzeitig gibt es aber keinen Beweis für die immunsuppressive Wirkung des löslichen TGF- β .¹⁴⁶ Huber et al. zeigten, dass regulatorische T-Lymphozyten, aus einer TGF- β -*knock out*-Maus isoliert, nicht in der Lage sind, eine Kolitis zu verhindern.¹⁵² Ob TGF- β letztendlich essentiell für die Suppression durch die regulatorischen T-Zellen ist, bleibt weiterhin kontrovers. Im Gegensatz dazu ist seine Rolle in der Aufrechterhaltung der normalen Population der regulatorischen T-Zellen sowie ihrer Induktion aus den naiven T-Lymphozyten eindeutig. TGF- β -*knock out*-Mäuse haben in Vergleich mit normalen Mäusen eine verminderte Anzahl der regulatorischen T-Lymphozyten.¹⁵² Andererseits induziert Antigenpräsentation in Anwesenheit von TGF- β und Interleukin-2 Foxp3 Expression in naiven CD4+ T-Lymphozyten. Diese haben suppressive Eigenschaften, die mit denen der natürlichen regulatorischen T-Lymphozyten vergleichbar sind.¹⁰¹

2. Hypothese und Ziele

2.1. Hypothese

Wie im Rahmen der Einleitung ausführlich dargestellt, handelt es sich bei der arteriellen Hypertonie und dem hypertensiven Schaden zumindest zum Teil um einen inflammatorischen und immunologischen Prozess. Neben der unspezifischen Inflammation, an der zelluläre (Makrophagen) und humorale Bestandteile (z.B. MCP-1) der unspezifischen Abwehr beteiligt sind, bestehen aufgrund der ausgeprägten renalen und kardialen lymphozytären Infiltrate Hinweise auf Beteiligung der spezifischen Abwehr. Ausführliche Vorarbeiten mit den für das humane Renin und Angiotensinogen transgenen Ratten mit arteriellen Hypertonie und hypertensiven Endorganschaden zeigten, dass immunsuppressive Behandlung das Überleben der Tiere verlängerte und den Endorganschaden besserte. Da regulatorische T-Lymphozyten einen suppressiven Effekt, sowohl an die zellulären Bestandteile der unspezifischen als auch spezifischen Immunabwehr haben, wird in dieser Arbeit überprüft, ob **regulatorische T-Lymphozyten den hypertensiven Endorganschaden bei Angiotensin II-induzierter Hypertonie verbessern können.**

2.2. Ziele

Um die oben genannte Hypothese zu überprüfen sollten in die Mäuse mit Ang II-bedingter arterieller Hypertonie regulatorische T-Lymphozyten transferiert werden. Um eventuelle Modifikation des hypertensiven Endorganschadens zu erfassen werden der kardiale und der renale Endorganschaden anhand folgender Fragestellungen untersucht.

- Regulatorischer T-Lymphozyten und der kardiale Endorganschaden
 - Beeinflusst Transfer regulatorischer T-Lymphozyten die Entstehung der Ang II-bedingten kardialen Hypertrophie?
 - Haben regulatorische T-Lymphozyten einen Einfluss auf die Entstehung der kardialen Fibrose?
 - Reduziert Transfer regulatorischer T-Lymphozyten kardiale Inflammation?
 - Führt eine eventuelle Reduktion der kardialen Hypertrophie und Fibrose zu funktionellen Veränderungen wie z.B. zum geringeren elektrischen Remodeling?

- Wie beeinflusst Ang II-Behandlung sowie Transfer regulatorischer T-Lymphozyten die Expression verschiedener microRNAs im Myokard?
- Regulatorische T-Lymphozyten und der renale Endorganschaden
 - Reduziert Transfer regulatorischer T-Lymphozyten Ang II-bedingte Albuminurie?
 - Verbessern regulatorische T-Lymphozyten die renale Pathohistologie?
 - Haben regulatorische T-Lymphozyten einen antiinflammatorischen Effekt in der Niere?

Um die genannten Fragestellungen zu beantworten werden isolierte regulatorische T-Lymphozyten in Mäuse mit Angiotensin II-induzierter arteriellen Hypertonie transferiert und der kardiale und renale Endorganschaden erfasst, wie im nächsten Abschnitt detailliert dargestellt.

3. Methoden und Materialien

3.1. Versuchstiere

Alle Versuche sowie die Isolation der regulatorischen T-Lymphozyten wurden an den Mäusen des Stammes NMRI (benannt nach der Herkunft aus *Naval Medical Research Institute*) durchgeführt. Obwohl es sich hier um einen Auszuchtstamm handelt, was mit breiterer Streuung der biologischen Messwerte sowie Möglichkeit der Abstoßung der transferierten regulatorischen T-Lymphozyten verbunden ist, eignet sich dieser Mausstamm aufgrund der Entwicklung der, mit humaner Pathologie vergleichbaren, hypertensiven Endorganschäden besonders gut zur Überprüfung der oben genannten Hypothese.¹⁵³ Alle Mäuse wurden von Charles River Laboratories in Sulzfeld im Alter zwischen 5 und 7 Wochen gekauft und während der gesamten Zeit der Versuchsdurchführung unter konventionellen Bedingungen ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, Wasser und Futter ad libitum, bis zu sechs Tiere in einem Mikroisolatorkäfig, künstlicher 24 h Tag-Nacht-Zyklus) in den Tierställen des Max-Delbrück-Centrums, Berlin (MDC) gehalten. Alle Tierexperimente wurden von der Tierschutzkommission des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (Reg 125/07 von 31. August 2007) und ordnungsgemäß aufgezeichnet.

3.2. Versuchsprotokoll

Um den Effekt des Transfers regulatorischer T-Lymphozyten auf die Ang II-induzierte arterielle Hypertonie und Endorganschäden zu untersuchen, wurde folgendes Versuchsprotokoll angewendet.

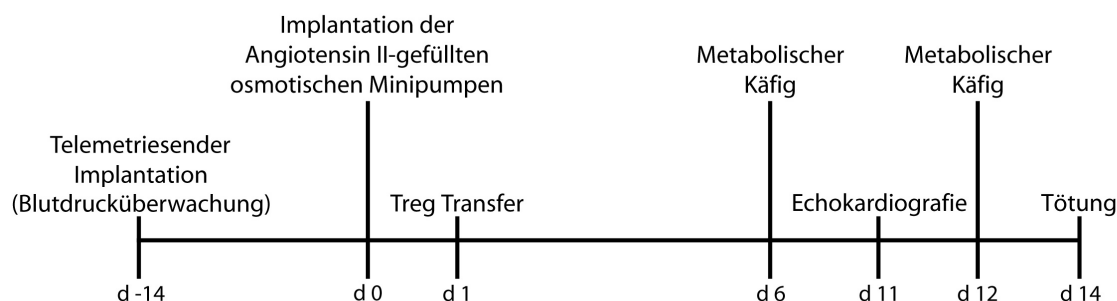


Abbildung 2. Das Versuchsprotokoll.

Das Protokoll gründet sich auf bisherigen Erkenntnissen über den Verlauf des Ang II-induzierten Endorganschadens¹⁵³ sowie auf den Erkenntnissen über die Physiologie der regulatorischen T-Lymphozyten.

Aus den bisherigen Einsätzen der regulatorischen T-Lymphozyten gewonnene Daten liefern keine Klarheit über den idealen Zeitpunkt des Zelltransfers. Kohm et al. verabreichten bei experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis regulatorische T Lymphozyten bereits drei Tage vor der Induktion der Erkrankung und erzielten einen signifikant milderen Verlauf.¹⁵⁴ Im Gegensatz dazu verabreichten Morgan et al. im Mausmodell der rheumatoiden Arthritis regulatorische T-Lymphozyten erst nachdem 50% der Tiere Krankheitssymptome entwickelt haben und erzielten ebenfalls einen milderen klinischen Verlauf.¹⁵⁵ In mehreren Modellen konnte gezeigt werden, dass der gleichzeitige adoptive Transfer der krankheitserregenden T-Lymphozyten und regulatorischer T-Lymphozyten einen positiven Effekt auf den Verlauf der jeweiligen Erkrankung hat.^{155, 156}

Bezüglich der Lebensdauer der transferierten regulatorischen T-Lymphozyten und der eventuellen Notwendigkeit mehrerer Zelltransfers geht aus der Literatur hervor, dass eine einmalige Gabe von regulatorischen T-Lymphozyten ausreicht. Bei den oben beschriebenen Krankheitsmodellen betrug die Versuchsdauer >14 Tage. Ausgehend vom klinischen Verlauf konnte während dieser Zeit keine Abnahme der Funktionalität der regulatorischen T-Lymphozyten registriert werden. Des Weiteren konnten lebende regulatorische T-Lymphozyten auch im fortgeschrittenen Krankheitsstadium in den Milzen und Lymphknoten wiedergefunden werden.¹⁵⁴

Bezüglich der Zahl der verabreichten regulatorischen T-Lymphozyten variieren die Angaben in der Literatur zwischen 1×10^5 und 5×10^6 .

Aus diesen Gründen entschieden wir uns für ein einmaliges Verabreichen von $1,5 \times 10^5$ regulatorischer T-Lymphozyten einen Tag nach dem Beginn der Ang II-Infusion.

3.3. An lebenden Versuchstieren durchgeführte Eingriffe/Untersuchungen und Probengewinnung

3.3.1. Induktion der arteriellen Hypertonie

Arterielle Hypertonie wurde mittels Dauerinfusion mit Ang II (Calbiochem) in einer Dosierung von 1,44 mg/kg KG/d über 14 Tage hervorgerufen. Hierzu wurden Minipumpen (Modell 2002, Alzet) mit einer Ang II-Lösung gefüllt, die in ihrer Konzentration dem

Gewicht des jeweiligen Tieres angepasst wurde. Die Pumpe wurden unter Inhalationsnarkose mit Isofluran (1,6 Vol.% Isofluran in der Raumluft; Curamed) implantiert. Dazu wurde im Bereich des Rückens ein Hautschnitt gesetzt und die Pumpe subkutan positioniert. Anschließend wurde die Wunde mit chirurgischen Nähten verschlossen. Der Eingriff wurde unter der Beachtung der veterinärmedizinischen Leitlinien (Wärmeunterlage, Auftragen einer schützenden Augensalbe nach der Einleitung der Narkose, Aufwachen unter einer Wärmelampe) durchgeführt.

3.3.2. Verabreichen der regulatorischen T-Lymphozyten

Regulatorische T-Lymphozyten wurden nach der Isolation 3-mal in *Hank's balanced salt solution* (HBSS, Invitrogen) gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl kontrolliert und die Zellen zum Injektionszwecken in 200 µl physiologischer Kochsalzlösung (Frenesius Kabi) pro Tier resuspendiert. Mithilfe eines Restriktors wurden die Mäuse kurzzeitig fixiert, die Schwanzvene punktiert und die Zellsuspension intravenös verabreicht.

3.3.3. Telemetrische Blutdruckmessung

Der Telemetriesender (Modell DSI PhysioTel PA-C10, Data Sciences International) wurde unter Inhalationsnarkose mit Isofluran implantiert. Dazu wurde der Halsbereich der Maus eröffnet und der Katheter des Telemetriesenders in die Arteria carotis eingeführt. Die Wundstelle im Gefäß wurde mit Histoacryl-Gewebskleber (B.Braun) verschlossen. Nach der Befestigung des Senders im Bauchraum wurde dieser mit chirurgischen Nähten verschlossen. Der Eingriff wurde unter der Beachtung der oben genannten veterinärmedizinischen Leitlinien durchgeführt.

3.3.4. Gewinnung des 24h-Sammelurins

An den im Versuchsprotokoll festgelegten Tagen wurden Mäuse zur Gewinnung des 24-Stunden-Sammelurins einzeln, unter Beibehaltung der konventionellen Bedingungen der Versuchstierhaltung, in die metabolischen Käfige gesetzt. Nach 24 Stunden wurde Urinvolumen erfasst und feste Partikel mittels Zentrifugation (100g, 3 Minuten, Raumtemperatur) entfernt. Jeweils 200µl Urin wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße abgefüllt und bis zur Bestimmung der Albuminkonzentration bei -20°C aufbewahrt.

3.3.5. Echokardiografie

Die Mäuse wurden mittels Isofluran betäubt und an einer Wärmeplatte leicht fixiert. Während der gesamten Untersuchung wurde Elektrokardiogramm abgeleitet und die rektale Temperatur überwacht. Zur besseren Schallübertragung wurden Mäuse präkordial rasiert. Zweidimensionale Echokardiografie wurde mittels eines Echokardiografie-Gerätes (Modell Vevo 770; VisualSonics) das mit einem 30 MegaHz Schallkopf (Modell RMV 707b; VisualSonics) ausgerüstet ist, durchgeführt. Das Herz wurde im zweidimensionalen Modus in der parasternalen kurzen Achse dargestellt. Von dieser Einstellung aus wurde ein M-Mode-Strahl senkrecht auf das Septum und die Hinterwand gerichtet. Messungen wurden auf Höhe der Papillarmuskeln durchgeführt. Es erfolgte eine *motion mode*-Aufnahme. Anhand von mindestens 3 aufgenommenen Herzschlägen wurden die Dicke der Hinterwand und des Septums sowie der innere Durchmesser des linken Ventrikels während der Systole und der Diastole gemessen. Zur Einschätzung der linksventrikulären Hypertrophie wurde nach der folgenden Formel die linksventrikuläre Masse (*LV mass*) berechnet: $LV\ mass = (V\ ST_d + LV\ ID_d + LV\ PW_d)^3 - (LV\ ID_d)^3$. Dabei ist $V\ ST_d$ die diastolische Septumdicke, $LV\ ID_d$ der innere diastolische Durchmesser des linken Ventrikels, $LV\ PW_d$ die diastolische Hinterwanddicke. Zur Einschätzung der systolischen Funktion wurden im Rahmen der EKG-getriggerten Visualisierung der parasternalen langen Achse das systolische und das diastolische Volumen des linken Ventrikels erfasst. Ejektionsfraktion (EF) wurde anhand der folgenden Formel berechnet: $EF = (LV\ V_d - LV\ V_s) / LV\ V_d \times 100\%$. Dabei ist $LV\ V_d$ das diastolische Volumen des linken Ventrikels, $LV\ V_s$ das systolische Volumen des linken Ventrikels. Echokardiografie ist ein etabliertes Verfahren zur Beurteilung der Morphologie und der kardialen Funktion bei den Mäusen.¹⁵⁷

3.3.6. Elektrophysiologische Untersuchung

Die elektrophysiologische Untersuchung wurde an den Mäusen in Isofluran-Anästhesie durchgeführt. Zum Anfang wurde mit Hilfe von subkutanen Nadel-Elektroden ein Extremitäten-EKG in Ruhe aufgezeichnet. Es folgte programmierte elektrische Vorhof- und Kammerstimulation. Hierzu wurde nach Freilegung der Vena jugularis zunächst ein elektrophysiologischer Mikrokatheter (oktapolar, Durchmesser 0,66 mm, Modell CIBer mouse EP, NuMed Inc.) EKG-gesteuert durch die rechte Jugularvene in den rechten Vorhof eingebracht. Alle abgegebenen elektrischen Stimuli hatten eine Pulslänge von 1 ms und

elektrische Spannung die dem zweifachen diastolischen Schwellenwert entsprach. Mittels elektrischer Stimulation im Vorhof wurde die Erholzeit des Sinusknotens, der Wenkebach-Punkt sowie die Refraktärzeit des AV-Knotens bestimmt. Anschließend wurde der Katheter EKG-gesteuert in die rechte Kammer vorgeschoben. Mittels programmierter elektrischer Stimulation wurde die Refraktärzeit des Ventrikelmyokards bestimmt. Um die Auslösbarkeit von ventrikulären Arrhythmien zu beurteilen, erfolgte im rechten Ventrikel die Abgabe von hochfrequenten Stimuli unter Ruhebedingungen. Das während der Untersuchung abgeleitete Elektrokardiogramm sowie alle intrakardialen Signale wurden gespeichert und anschließend mittels der Software EpTracer (CardioTek) analysiert.

Am Ende der Untersuchung wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet.

3.4. Zytologische Methoden

3.4.1. Präparation der Splenozyten und Zellen aus den Lymphknoten

Spendermäuse wurden im Alter zwischen 5 und 8 Wochen mittels zervikaler Disslokation getötet. Nach der Tötung wurden die Tiere in 75%iges Ethanol getaucht und zur Organentnahme unter eine Sterilbank platziert. Milz sowie inguinale und axiale Lymphknoten wurden mit sterilem Operationsbesteck entnommen und sofort über einem Sieb mit Maschengröße von 100µm (BD) zerkleinert. So gewonnene Zellen wurden im *magnetic cell sorting* (MACS)-Puffer suspendiert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung größerer Partikel wurde die Zellsuspension über einen Sieb mit Maschengröße von 70µm filtriert. Leukozytenzahl wurde mithilfe Türk'scher Lösung (Fluka) und Neubauer-Zählkammer (Hecht) bestimmt. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellsuspension wurde bei 300g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte bei manchen Versuchen die Erythrozytenlyse mittels Erythrozytenlyse-Puffers für 90 Sekunden. Nach dem Abstoppen der osmotischen Lyse durch Zugabe von MACS-Puffer wurde die Zellsuspension für weitere 10 Minuten bei 300g zentrifugiert.

3.4.2. Oberflächen-Färbungen mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper

Um Lymphozyten mittels Fluoreszenz-aktivierter-Zellsortierung (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) zu charakterisieren oder sie zu sortieren wurden Oberflächen-Färbungen mit

Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern durchgeführt. Hierzu verwendete Antikörper sind unter Materialien aufgelistet.

Aufgearbeitete Lymphozyten wurden nach durchgeführter Erythrozytenlyse im MACS-Puffer mit entsprechender Menge Antikörper inkubiert. Die Reaktion wurde nach der Inkubationszeit mit mehrfachem Volumen MACS-Puffer gestoppt. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten bei 300g zentrifugiert und insgesamt 3-mal gewaschen. Die Zellen wurden im FACS-Puffer resuspendiert, durch einen Sieb mit 40µm großen Maschen in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt und der Fluoreszenz-aktivierten Durchflusszytometrie bzw. Sortierung unterzogen. Um die Spezifität der Antikörperbindung zu überprüfen, wurden zusätzlich nicht-bindende Antikörper des entsprechenden Isotyps eingesetzt.

3.4.3. Intrazelluläre Färbung mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper

Um die Expression von Transkriptionsfaktor Foxp3 in regulatorischen T-Lymphozyten mittels Fluoreszenz-aktivierter Durchflusszytometrie zu überprüfen wurde eine intrazelluläre Färbung mit Foxp3-bindenden, Allophycocyanin(APC)-gekoppelten Antikörpern (Miltenyi) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit anti-Foxp3-Antikörper nach den Angaben des Herstellers inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und im FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Lymphozyten der Fluoreszenz-aktivierter Durchflusszytometrie unterzogen. Um die Spezifität der Antikörperbindung zu überprüfen wurde zusätzlich der nicht-bindende Antikörper des Isotyps IgG1 (Miltenyi) eingesetzt.

3.4.4. Auftrennung und Analyse der Zellen mittels magnetischer und Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung

3.4.4.1. Das Prinzip der magnetischen Zellsortierung

Magnetische Zellsortierung basiert auf dem Prinzip der Sortierung von Zellen mittels an Antikörper gebundene, biologisch abbaubare, ferromagnetische Partikel. Binden die eingesetzten Antikörper spezifisch an Oberflächenmoleküle oder an Fluorochrom-gekoppelte Antikörper (welche an die Zelloberfläche gebunden sind), können die Zellen aufgrund der ferromagnetischen Partikeln durch das Anlegen eines Magnetfeldes von den Zellen die den Antikörper nicht binden, separiert werden.

Alle zur magnetischen Zellsortierung verwendeten Antikörper und magnetische Säulen wurden von Miltenyi bezogen.

3.4.4.2. Das Prinzip der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung/Durchflusszytometrie

Die Verwendung eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierers (FACSAria, FACScan, beides BD) ermöglicht es, zuvor mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbte Zellpopulationen nach verschiedenen Parametern (Lichtstreuung und Fluoreszenz) aufzutrennen und zu sortieren. Die Zellsuspensionen werden über ein Piezoelement in Tropfen zerlegt und in einer Messeinheit mit Licht hoher Intensität bestrahlt. Der Lichtstrahl wird durch Zellen in der Suspension gestreut, Maß und Richtung der Lichtstreuung liefern die Information über Größe (gemessen über Vorwärtsstreulicht, FSC) und Granularität (gemessen am Rechtwinkelstreulicht, SSC). Weiterhin werden die an Antikörper gekoppelten Fluorochrome zur Fluoreszenz angeregt. Farbe und Intensität der Fluoreszenz liefern dann weitere Information über die zu untersuchende Zellpopulation. Im Falle von FACS Sortierung, können Zellen auf diese Weise nach verschiedenen Parametern separiert und über elektrostatische Aufladung in verschiedene Gefäße abgelenkt werden.

3.4.4.3. Isolation der CD4⁺CD25⁺ (regulatorischen) Lymphozyten

Zur magnetischen Zellsortierung wurde die wie oben beschrieben gewonnene Zellsuspension verwendet. Mittels MACS wurden CD4⁺ Lymphozyten angereichert sowie CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten isoliert.

Die Separation der CD4⁺ Lymphozyten erfolgte mittels Negativselektion, d.h. es wurden möglichst alle anderen Zellen bis auf die CD4⁺ Lymphozyten aus der Zellsuspension entfernt. Hierzu wurden Splenozyten mit biotinierten Antikörpern gegen das murine CD8a, CD45R, CD49b, CD11b und Ter-119 inkubiert. Anschließend wurde der, an magnetische Partikel gebundene, anti-Biotin Antikörper zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation wurde die Reaktion mittels Zugabe von MACS-Puffer gestoppt und die Zellsuspension für 10 Minuten bei 300g zentrifugiert. Resuspendierte Zellen wurden dem magnetischen Feld der Separationssäule ausgesetzt und der CD4⁺ angereicherte Durchfluss aufgefangen. Auf diese Weise gewonnene Lymphozyten wurden weiter zur Fluoreszenz-aktivierten Sortierung (FACS) der CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten verwendet. Zur Sortierung von Zellen wurde ein FACSAria verwendet. Um bei der Zellsortierung sterile Bedingungen einzuhalten wurde das

Gerät vor der Anwendung mit 75%igem Ethanol gespült. Während der gesamten Zellsortierung wurden die Sammelgefäße für die sortierten Zellen auf 4°C gekühlt.

CD4⁺ angereicherte, mit antiCD4-Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)- und antiCD25-Phycoerythrin (PE)-Antikörper (BD, Miltenyi) gefärbte Lymphozyten wurden nach folgenden Kriterien sortiert; anhand von Vorwärtsstreulicht und Rechtwinkelstreulicht wurden im ersten Schritt Zellen der den Lymphozyten entsprechenden Zellgröße und Granularität eingegrenzt und restliche Zellen von der weiteren Analyse/Sortierung ausgeschlossen. Anschließend wurde die Intensität der FITC- und PE-Färbung gemessen. Doppelt-positive Zellen wurden als CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten erkannt und von den einfach-positiven CD4⁺CD25⁻ Lymphozyten getrennt. Wenige doppelt-negative Zellen wurden verworfen. Im Rahmen der ersten FACS-Analysen wurden Geräteeinstellungen etabliert, Antikörperspezifität anhand der mit Isotyp-Kontrollen gefärbter Proben kontrolliert sowie die bei der Verwendung mehrerer Fluorochrome notwendige Kompensation der Spektralüberschneidung vorgenommen. Zellen wurden in 15ml-Reaktionsgefäße, vorgefüllt mit RPMI 1640-Vollmedium, sortiert.

3.4.4.4. Durchflusszytometrische Analyse der isolierten Zellen

Zur durchflusszytometrischen Reanalyse der sortierten CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten wurde ein FACScan verwendet. Die Expression von CD4 und CD25 wurde analysiert. Weiterhin wurde mittels Zugabe von Propidiumiodid der Anteil toter Zellen bestimmt. Hierzu wurde den zu analysierenden Zellen unmittelbar vor der Messung der Fluoreszenz Propidiumiodid zugegeben (Endkonzentration 1µg/ml). Foxp3-Expression in den sortierten CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten wurde mit FACS Aria gemessen.

3.4.4.5. Durchflusszytometrische Analyse der Splenozyten

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Splenozyten wurden diese wie bereits beschrieben aufgereinigt, mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und anschließend mit LSR II (BD) gemessen. Daten wurden in den Programmen FACSDIVA Standard (BD) und Cellquest pro (BD) aufgezeichnet und analysiert. Das Programm Flowjo (Tree Star) wurde ebenfalls zur Datenanalyse und für die grafische Darstellung verwendet.

3.4.5. Cell tracking

Um die Bewegungsmuster der verabreichten regulatorischen T-Lymphozyten zu verfolgen wurden die regulatorischen T-Lymphozyten für manche Versuche mittels Carboxyfluorescein-diacetat (CFDA, Invitrogen) markiert. CFDA passiert passiv die Zellmembran und wird dort zum grün-fluoreszierenden Carboxyfluorescein-succinimidylester (CFSE) abgebaut. Dieser bindet an die Aminogruppen der Proteine und verbleibt so stabil in der markierten Zelle.

Hierzu wurde die zu transferierenden Zellen bei einer Dichte von 10^7 Zellen/ml in $2,5 \mu\text{M}$ CFDA in HBSS mit 0,1% *fetal calf serum* (FCS) 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 Mal mit HBSS gewaschen.

Nach der Tötung wurden die Organe entnommen und im flüssigen, auf -42°C gekühlten Isopentan eingefroren und anschließend bei -80° aufbewahrt. $5\mu\text{m}$ dicke Schnitte wurden am Kryostat (Leica) angefertigt, mit Aceton fixiert und bei -20°C aufbewahrt. Nachdem die Schnitte aufgetaut waren, wurden sie im Dunklen luftgetrocknet und anschließend mit Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (TBS) in der feuchten Kammer hydriert. Sie wurden mit einem Fluoreszenz-erhaltendem Einbettungsmedium (Vectashield; Vector Laboratories) eingebettet und bei 4°C aufbewahrt. Zur Detektion der CFDA-markierten Zellen wurden die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop angesehen.

3.5. Aufarbeitung der Urin-, Blut- und Organproben

3.5.1. Messung der Kreatinin- und der Harnstoff-Konzentration im Serum

Das Blut wurde durch das Enthaupten unmittelbar nach der Tötung der Mäuse gewonnen, zentrifugiert (400g, 15 Minuten, Raumtemperatur) und das Serum abpipettiert. Dieses wurde im flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zu biochemischen Messungen bei -80°C aufbewahrt. Messung der Kreatinin- und der Harnstoffkonzentration erfolgte am Blutanalysator AU400 (Olympus).

3.5.2. Bestimmung der Albuminkonzentration

Albuminbestimmung erfolgte mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (CellTrend). Dabei handelt es sich um einen kompetitiven ELISA. An die Kavitäten der

Mikrotiterplatte ist Maus-Albumin gebunden. Im ersten Schritt werden die Proben und die entsprechenden Standards mit einem Peroxidase-markierten anti-Albumin-Antikörper auf die Platte aufgetragen und inkubiert. Das in der Probe befindliche Albumin hemmt kompetitiv die Bindung des Antikörpers an das Platten-gebundene Albumin. Nach einem Waschschrift wird die Mikrotiterplatte mit Tetramethyl-benzidin inkubiert, das als Substrat für die enzymatische Reaktion der Peroxidase dient; danach wird die Reaktion mit verdünnter Schwefelsäure gestoppt und die optische Dichte im Photometer gemessen. Die Farbintensität ist umgekehrt proportional der Albuminkonzentration in der Probe.

3.5.3. Pathohistologische Aufarbeitung

3.5.3.1. Organeinbettung im Paraffin

Zur Anfertigung der Paraffin-Schnitte wurden die Organe nach der Entnahme für 24 Stunden in 4%igem Formalin fixiert. Danach wurden die Organe mit Sørensen'schem Puffer gespült und anschließend in einer ansteigenden Ethanolreihe entwässert. Nach der Entwässerung wurden die Präparate für weitere 1,5 Stunden in Toluol (Sigma-Aldrich) und anschließend für 4 Stunden in 56°C warmes Paraffin eingelegt. Danach wurden sie in Einbettungskassetten in Paraffin eingebettet. Von ausgehärteten Paraffinblöcken wurden mithilfe eines Rotationsmikrotoms (Modell HM355S, Microm) Schnitte (2µm) angefertigt, bei 50°C für 3 Stunden getrocknet und anschließend bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.5.3.2. Aufarbeitung der Organe für Kryo-Schnitte

Zur Anfertigung der Kryo-Schnitte wurden die Organe nach der Entnahme im flüssigen, auf -42°C gekühlten Isopentan eingefroren und anschließend bei -80° aufbewahrt. Schnitte (5µm) wurden am Kryostat (Leica) angefertigt, mit Aceton fixiert und bei -20°C aufbewahrt.

3.5.3.3. Immunohistologie

Hierzu wurden Kryo-Schnitte verwendet. Sie wurden aufgetaut und an der Luft getrocknet. Nachdem die einzelnen Präparate mit einem wasserabweisenden Stift (PAP pen, Abcam) umrandet wurden, wurden die Präparate mit Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (TBS) in der feuchten Kammer hydriert. Um unspezifische Bindung des Antikörpers zu

vermeiden wurden die Schnitte für 45 Minuten mit 10%igem *donkey serum* inkubiert. Anschließend erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit dem primären Antikörper und nach einem Waschvorgang eine weitere 60-minütige Inkubation mit einem sekundären, Fluorochrom-gekoppelten Antikörper. Alle Antikörper sind unter Verbrauchsmaterialien aufgelistet. Nach dem Waschen wurden die Schnitte mit einem Fluoreszenz-erhaltendem Einbettungsmedium (Vectashield, Vector Laboratories) eingebettet und bei 4°C aufbewahrt.

3.5.3.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hierzu wurden Paraffin-Schnitte mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe auf wässrige Hämatoxylin-Lösung (Merck) vorbereitet. Nach 3-minütiger Inkubation wurden die Präparate mit destilliertem und anschließend mit Leitungswasser gespült. Es folgte 4-minütige Inkubation im wässrigen 1%igen Eosin (Sigma). Danach wurden die Präparate mit destilliertem Wasser gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Nach einer weiteren Stunde in Xylol wurden sie mit Histoclear® (National Diagnostics Inc.) eingedeckt.

3.5.3.5. Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Paraffinschnitte wurden mittels Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe auf wässrige Weigert'sche Eisenhämatoxylin-Lösung vorbereitet. Nach dem Spülen im Leitungswasser wurden die Schnitte mit Masson'scher Lösung gefärbt und nach einem weiteren Spülen in 1%iger Essigsäure wurden sie mit Wolframatophosphorsäure-Orange gefärbt. Nach einer weiteren Spülung in 1%iger Essigsäure wurden die Schnitte mit Lichtgrün gefärbt und anschließend ein weiteres Mal mit 1%iger Essigsäure gewaschen. In einer aufsteigenden Ethanol-Reihe wurden die Schnitte entwässert, eine Stunde ins Xylol gestellt und danach mit Histoclear® eingedeckt.

3.5.3.6. Sirius red-Färbung

Paraffinschnitte wurden entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe auf das im Wasser unter Zusatz von Pikrinsäure gelöste *Sirius red* vorbereitet. Nach ca. 1 Stunde Inkubationszeit wurden die Schnitte mit 0,5% Essigsäure gewaschen. Es folgte Entwässerung

der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe und Einbettung der Präparate mit HistoClear®.

3.5.3.7. Pathohistologische Begutachtung

Pathohistologische Begutachtung wurde geblindet am Mikroskop (Axioplan 2 Imaging, Zeiss) durchgeführt.

Bei *Sirius red*-gefärbten Herzschnitten wurden separat interstitielle, perivaskuläre und endokardiale Fibrose beurteilt. Diese lässt sich aufgrund der intensiven Rotfärbung leicht von umliegendem Gewebe abgrenzen. Je nach der Ausprägung der verschiedenen Fibroseformen wurde eine Note zwischen 0 und 3 vergeben (0 = keine Fibrose; 1 = vereinzelte fibrotische Stränge; 2 = einzelne fibrotische Areale; 3 = zusammenhängende Fibrose die große Teile des Schnittes umfasst). Alle drei Noten des jeweiligen Präparats wurden addiert und in der weiteren statistischen Auswertung verwendet.

Bei der Begutachtung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden die CD4+, CD8+ bzw. F4/80+ Zellen in einem ganzen Herzschnitt, bzw. in einem Gesichtsfeld ausgezählt.

Bei der Begutachtung der nach Masson und Goldner gefärbten Nierenpräparate wurde insbesondere die Ausprägung der interstitiellen und perivaskulären Fibrose, das Ausmaß der Verdickung der kleinen Arteriolen und die Häufigkeit der interstitiellen und perivaskulären zellulären Infiltrate begutachtet. Jedem Tier wurde eine Gesamtnote zwischen 0 und 4 vergeben (0 = keine pathologischen Veränderungen; 1 = einzelne fibrotische Areale, insgesamt weniger als 3 im gesamten Präparat; 2 = mehr als 3 fibrotische Areale pro Präparat; 3 = mehr als 3 fibrotische Areale pro Präparat und/oder vereinzelte verdickte Arteriolen und/oder vereinzelte infiltrierte Entzündungszellen; 4 = mehr als 5 fibrotische Areale pro Präparat, mehrere verdickte Arteriolen, ausgedehnte entzündliche Infiltrate). Die Noten wurden in der weiteren statistischen Auswertung verwendet.

3.5.4. Molekularbiologische Methoden

3.5.4.1. RNA Isolation und Synthese von cDNA

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus murinen Zellen wurde eine kombinierte Methode (Trizol, Invitrogen und *RNeasy*, Qiagen) verwendet. Hierbei werden pro Isolierung etwa 5-10 mm³ Gewebe gebraucht. Als erstes wurde das im flüssigen Stickstoff eingefrorene und bei

-80°C aufbewahrte Gewebe in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das homogenisierte Gewebe wurde in 1mL Trizol aufgenommen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 200µL Chloroform und 5-minütiger Inkubation wurden die Proben zentrifugiert (12 000g, 15 Minuten, 4°C). Dies führt zur Trennung der wässrigen, RNA-haltigen Phase von der organischen Phase. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 500µL RLT-Lysispuffer mit β-Mercaptoethanol versetzt. Die nächsten Schritte erfolgten laut dem Herstellerprotokoll des RNA-Isolationssatzes *RNeasy* (Invitrogen). Das Prinzip dieser Isolationsmethode ist die Bindung der RNA an eine Silicamembran. Hierzu wird die RNA in einem stabilisierenden, Guanidin-Isothiocyanat-haltigen Puffer aufgenommen, mit Ethanol versetzt und auf eine Silicamembran aufgetragen. In mehreren Zentrifugations- und Waschschrritten werden andere Zellbestandteile entfernt und zum Schluss RNA eluiert. Die verbliebenen Reste der genomischen DNA wurden mittels eines DNase Verdaus (RNase free DNase Set, Qiagen) entfernt. Die RNA wurde in RNase freiem Wasser (Fluka) aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die Konzentration der RNA wurde am NanoDrop (Thermo Scientific) photometrisch bestimmt. Hierzu wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Der Quotient 260/280 dient der Beurteilung einer eventuellen Proteinkontamination und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Zur Synthese der cDNA wurden definiert 2µg RNA verwendet. Hierzu wurden aus kurzen Oligonukleotiden bestehende Random-Primer, dNTPs und eine reverse Transkriptase (SuperScript® III Reverse Transkriptase; Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Nach Inaktivierung des Enzyms wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

3.5.4.2. Realtime RT-PCR

Der Nachweis der cDNA-Amplifikate erfolgte entweder über den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green oder über eine fluoreszenzmarkierte TaqMan-Sonde. Die spezifischen Primer sowie die TaqMan-Sonde für das entsprechende Gen wurden mit der Software Primer Express (Applied Biosystems), ausgehend von der publizierten Sequenz der jeweiligen cDNA, ausgewählt. Der Reaktionsansatz nach dem SYBR Green Protokoll wurde in 25µl Volumen durchgeführt und bestand aus 12,5 µl SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl cDNA, 10 µl Wasser (Fluka) und jeweils 0,75µl *forward primer* und *reverse-primer*.

Der Reaktionsansatz nach dem TaqMan-Protokoll wurde in 10µl Volumen durchgeführt und bestand aus 5µl TaqMan-Fast-Mastermix (Applied Biosystems), 0,4µl cDNA, 3,5µl Wasser, jeweils 0,3µl Forward-Primer und Reverse-Primer sowie 0,4µl TaqMan-Sonde. Um eine

Kontamination mit PCR-Produkten zu vermeiden, wird der Reaktionsansatz mit 0,1µL AmpErase Uracil-N-Glycosylase (UNG)(Applied Biosystems) versetzt.

Nach Optimierung der Bedingungen für jedes Primerpaar, erfolgte die Realtime-PCR über 45 Zyklen bei einer in der Regel optimalen Hybridisierungs-Temperatur der Oligonukleotide zwischen 50 und 60°C (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems). Jeder Ansatz wurde in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Es wurden mindestens 5 Proben aus jeder Gruppe untersucht. Als Kontrolle diente eine Reaktion ohne cDNA (*non template*). Die Bestimmung des *threshold cycle* (Ct) und die weitere Analyse der Daten erfolgte mittels der zugehörigen Software (7500 Fast System Software). Zunächst wurden die Daten auf die Expression des *housekeeping* Gens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert und anschließend die relativen Unterschiede in der Genexpression in verschiedenen Gruppen anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode ermittelt. Der ΔCt Wert wurde über die Differenz des Ct-Wertes des Zielgenes und des Ct-Wertes des *housekeeping* Gens berechnet. Der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert wurde dann über die Differenz der ΔCt -Werte der zu vergleichenden Proben berechnet. Der relative Expressionsunterschied (R) zwischen zwei Proben kann dann über die Formel $R = 2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ bestimmt werden.

3.5.4.3. Isolation und *miRXplore* Microarray Analyse der Expression der microRNA

Im flüssigen Stickstoff eingefrorene Herzspitzen wurden auf Trockeneis (-80°C) zu Miltenyi Biotec, Köln, geschickt. Dort wurde Gesamt-RNA nach einem, für die Erhaltung kleiner RNA-Stücke optimierten, Trizol-Protokoll isoliert und RNA aus jeweils drei Tieren einer Gruppe zu einer Probe gepoolt: Kontrolle, Ang II, Ang II + Treg. Jeweils eine fluoreszent markiert Probe und eine als Referenz fungierende, vom Miltenyi definierte, Mischung ca. 1000 verschiedener microRNAs wurden über Nacht an ein so genanntes *miRXplore* *Microarray* hybridisiert (Hybridisierungsstation a-Hyb, Miltenyi). Hier handelt es sich um eine Matrix die mit mehr als 500 Oligonukleotidsonden besetzt ist. Bei den Oligonukleotidsonden handelt es sich um definierte Oligonukleotide die für die zu testenden microRNAs komplementär sind und diese somit binden können. Nach der Hybridisierung wurde die Fluoreszenz-Intensität mittels eines Laser-Lesegeräts (Agilent) gemessen und mittels ImaGene Software (Biodiscovery) und PIQOR Software (Miltenyi) weiterverarbeitet. Nach dem Ausschluss der Spots nicht ausreichender Qualität wurden die drei hier verwendeten *miRXplore* *Microarrays* anhand der Referenz normalisiert und die Expression der microRNAs in den Proben Kontrolle, Ang II, Ang II + Treg miteinander verglichen. Eine

2-fach erhöhte Expression, bzw. 0,5-fach erniedrigte Expression wurde anhand der Empfehlung von Miltenyi als signifikant erachtet.

3.6. Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mit ungepaartem, zweiseitigem t-Test durchgeführt. Multiple Vergleiche wurden mittels einseitiger Varianzanalyse (*one way ANOVA*) auf signifikante Unterschiede untersucht. Anschließend wurde Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche durchgeführt. Eine Normalverteilung der Werte wurde bei den biologischen Daten angenommen. Vor dem Vergleich der Daten die in Kategorien ausgedrückt werden, wurde der D'Agostino-Pearson-Test auf Normalverteilung durchgeführt. Sollte dieser auf nicht normalverteilte Werte hindeuten, wurde zum Vergleich mehrerer Gruppen der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert unter 0,05 angenommen.

3.7. Materialien

3.7.1. Verbrauchsmaterialien

Plastik-Verbrauchsmaterialien wurden soweit nicht anders angegeben von den Firmen Braun, Greiner, Eppendorf, Roth, Costar oder BD Falcon bezogen.

3.7.2. Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von Sigma oder Invitrogen bezogen.

Isotonische Kochsalzlösung (Fresenius Kabi)

- Destilliertes Wasser
- NaCl 154mM

Hank's balanced salt solution (HBSS)

- Destilliertes Wasser
- NaCl 137,93mM

- NaHCO_3 4,17mM
- KCl 5,33mM
- KH_2PO_4 0,441mM
- Na_2HPO_4 0,338mM
- Glukose 5,56mM

Angotensin II Stammlösung

- 1% Essigsäure in isotonischer Kochsalzlösung (Fresenius Kabi)
- Ang II (Konzentration 25mg/ml, Calbiochem)

MACS-Puffer

- HBSS
- 2% fetales Kälberserum (Biochrom)
- 2mM EDTA

FACS-Puffer

- HBSS

Türk'sche Lösung (Fluka)

- 1% Essigsäure
- 0,02% Gentianaviolett

Erythrozytenlyse-Puffer

- Destilliertes Wasser
- 155mM NH_4Cl
- 10mM KHCO_3
- 0,1mM EDTA

TBS

- Destilliertes Wasser
- Tris-HCl 50mM
- NaCl 154mM

Sørensen'scher Puffer

- Destilliertes Wasser
- KH_2PO_4 80mM
- Na_2HPO_4 320mM

Weigert'sche Lösung (Lösung A: Lösung B = 1:1)

- Lösung A
 - 96% Ethanol 100ml
 - Hämatoxylin 1g (Merck)
- Lösung B
 - Destilliertes Wasser 99ml
 - Eisen(III)-chlorid 1,16g (Merck)
 - 1,25% Salzsäure 1ml

Masson'sche Lösung

- Destilliertes Wasser 176ml
- Eisessig 0,35ml
- Ponceau de Xylidine 15ml (Waldeck)
 - Ponceau de Xylidine 1g in 100ml dest. Wasser
- Säurefuchsin 5ml (Fluka)
 - Säurefuchsin 1g in 100ml dest. Wasser
- Azophloxin 4ml(Fluka)
 - Azophloxin 0,5g in 100ml dest. Wasser

Wolframatophosphorsäure-Orange

- Destilliertes Wasser 100ml
- Wolframatophosphorsäure 3g (Merck)
- Orange G 2g (Fluka)

Lichtgrün

- Destilliertes Wasser 100ml
- Eisessig 0,2ml
- Lichtgrün 0,1g (Fluka)

Sirius red

- Gesättigte Pikrinsäure 100ml
 - Destilliertes Wasser 100ml
 - Pikrinsäure-Kristalle 1,5g
- *Sirius red* 0,1g (Sigma)

3.7.3. Antikörper

3.7.3.1. Für Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie verwendete Antikörper

Alle Antikörper wurden, sofern nicht anders angegeben, von BD bezogen.

Ratten anti-Maus CD4-Antikörper, FITC- bzw. Allophycocyanin-Cy7 (APC-Cy7)-konjugiert, Klon GK 1.5

Ratten anti-Maus CD25-Antikörper, PE- bzw. Phycoerythrin-Cy5 (PE-Cy7)-konjugiert, Klon 7D4

Maus anti-Maus Foxp3-Antikörper, APC bzw. Pacific blue-konjugiert, Klon 3G3 (Miltenyi)

Ratten anti-Maus CD44-Antikörper, Biotin-konjugiert, Klon IM7

Ratten anti-Maus CD62L-Antikörper, APC-konjugiert, Klon MEL-14

Hamster anti-Maus CD69-Antikörper, PE-konjugiert, Klon H1.2F3

Streptavidin, Peridinin Chlorophyll-Protein (PerCP)-konjugiert

3.7.3.2. Für Immunohistochemie verwendete Antikörper

Ratten anti-Maus CD4-Antikörper, FITC-konjugiert, Klon GK 1.5 (Serotec)

Ratten anti-Maus CD8a-Antikörper, nicht konjugiert, Klon 53-6.7

Ratten anti-Maus F4/80-Antigen-Antikörper, nicht konjugiert, Klon CI:A3-1 (Serotec)

Donkey anti-Ratten-IgG-Antikörper, Cy3-konjugiert, poliklonal (Jackson)

3.7.4. Primer

Primer wurden von Biotez bezogen.

Maus BNP

Fwd GCC AGT CTC CAG AGC AAT TCA

Rev GGG CCA TTT CCT CCG ACT T

Maus Interleukin-6

Fwd ACT TCA CAA GTC GGA GGC TTA ATT

Rev TTG CCA TTG CAC AAC TCT TTT C

Maus GAPDH

Fwd GGCAAATTCAACGGCACAGT

Rev AGATGGTGATGGGCTTCCC

4. Ergebnisse

4.1. Isolation der regulatorischen T-Lymphozyten mittels magnetischer und Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung

Aus Milz und Lymphknoten einer NMRI-Maus ließen sich durchschnittlich $2,5 \times 10^8$ Leukozyten gewinnen, wie in Zellzahlung mithilfe der Türk'schen Lösung und der Neubauer Zählkammer unmittelbar nach der Zubereitung der Zellsuspension ermittelt wurde. CD4+ Zellen machen ca. 10% der gesamten Leukozytenpopulation aus, so dass eine magnetische Zellsortierung (*magnetic cell sorting*, MACS) durchschnittlich $2,5 \times 10^7$ CD4+ Zellen pro Maus ergab. Der Anteil der CD4+25+ Lymphozyten, d.h. der regulatorischen T-Lymphozyten betrug ca. 7%, wobei die Anzahl der regulatorischen T-Lymphozyten am Ende der sämtlichen, nach der FACS folgenden Waschvorgängen ca. 3×10^5 regulatorischen T-Lymphozyten pro Maus betrug, 1,2% der CD4+ Population entsprechend. Eine Propidiumjodid-Färbung zeigte, dass es sich bei 80% der sortierten Zellen um lebende Zellen handelte (Daten nicht gezeigt).

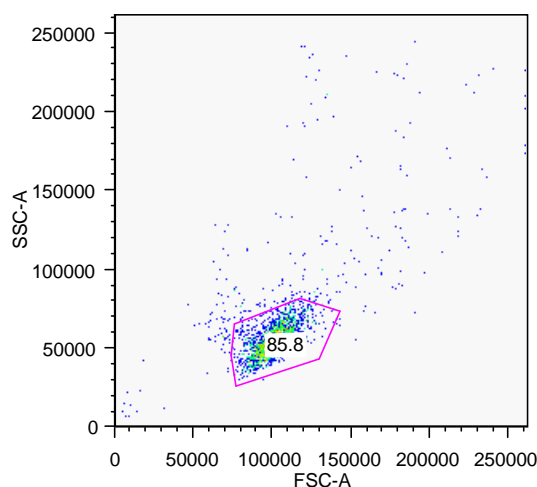


Abbildung 3. Darstellung der CD4+ angereicherten Lymphozyten im Vorwärtsstreulicht/Rechtwinkelstreulicht (FCS/SSC).

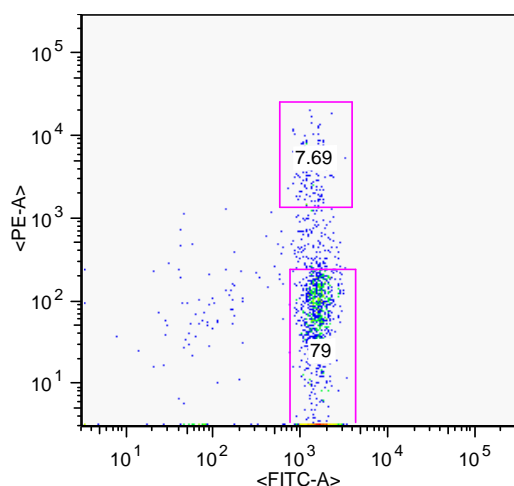


Abbildung 4. Darstellung der CD4+CD25+ und CD4+CD25- Zellpopulationen. Signalstärke im FITC-Kanal (FL1) entspricht der CD4-Expression. Signalstärke im PE-Kanal (FL2) entspricht der CD25-Expression. Die ursprünglich registrierten Lichtsignale werden im Rahmen der Datenverarbeitung in die elektrischen Signale umgewandelt. Diese wiederum werden zu Zahlen umgewandelt, die anschließend grafisch dargestellt werden. Es handelt sich hier um eine dimensionslose Größe die ohne Einheit angegeben wird.

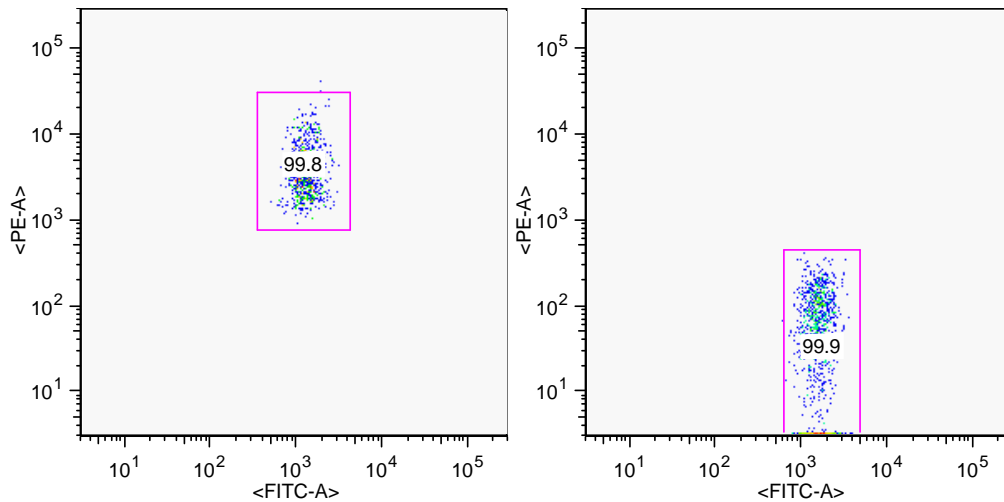


Abbildung 5. Reanalyse der CD4+CD25+ (links) und der CD4+CD25- (rechts) Zellpopulationen nach der Sortierung. Signalstärke im FITC-Kanal (FL1) entspricht der CD4-Expression. Signalstärke im PE-Kanal (FL2) entspricht der CD25-Expression.

Die Foxp3-Färbung der isolierten CD4+CD25+ Lymphozyten sowie der CD4+CD25- Lymphozyten zeigte, dass die isolierten regulatorischen T-Lymphozyten tatsächlich Foxp3-positiv sind (Abbildung 6).

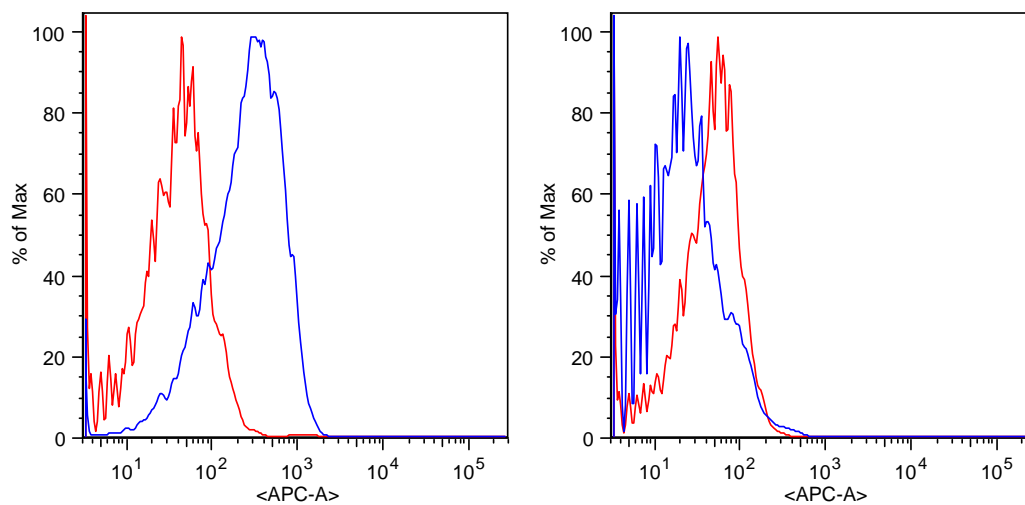


Abbildung 6. Foxp3-Färbung der CD4+CD25+ (links) und der CD4+CD25- (rechts) Population nach der FACS. Blaue Linie zeigt die Intensität der Foxp3-Expression, rote Linie zeigt die Isotypen-Kontrolle.

4.2. Einfluss regulatorischer T-Lymphozyten auf die Angiotensin II-induzierte arterielle Hypertonie

Der arterielle Blutdruck wurde mittels eines intra-arteriell platzierten Messkatheters viertelstündlich gemessen und telemetrisch erfasst, beginnend 9 Tage vor dem Anfang der Ang II-Dauerinfusion sowie während der 2-wöchigen Behandlung. Bei jeweils 4 mit Ang II + Treg-behandelten, bzw. nur mit Ang II behandelten Mäusen konnte die Messung während des gesamten Zeitraums komplikationslos erfasst werden. Der mittlere arterielle Druck vor der Ang II-Behandlung betrug $110,9 \pm 1,4$ mmHg. Bereits am ersten Tag nach der Implantation der mit Ang II-gefüllten osmotischen Minipumpen stieg der mittlere arterielle Druck um fast 40 mmHg an und betrug zwischen 5. und 7. Tag bei den lediglich mit Ang II behandelten Tieren $150,5 \pm 7,1$ mmHg und bei den Ang II + Treg-behandelten Tieren $149,4 \pm 7,5$ mmHg (Abbildung 7). Daraus ist ersichtlich, dass der Transfer regulatorischer T-Lymphozyten keinen Einfluss auf die Ang II-induzierte arterielle Hypertonie hat.

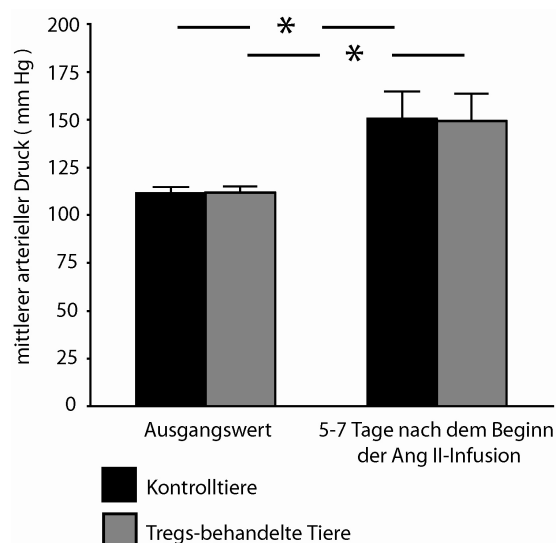


Abbildung 7. Der mittlere arterielle Druck vor dem Beginn der Ang II-Behandlung sowie 5-7 Tage nach dem Beginn der Ang II-Behandlung bei den Kontrolltieren und den Tieren denen Treg transferiert worden sind. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt; * steht für $p < 0,05$ vs. Ausgangswert.

4.3. Einfluss regulatorischer T-Lymphozyten auf Angiotensin II-bedingte kardiale Pathologie

4.3.1. Echokardiografische Daten

Mittels transthorakaler Echokardiografie wurden am 11. Tag des Versuchs kardiale Morphologie und Funktion erfasst. Wie erwartet führte die Dauerinfusion mit Ang II zur Entstehung der kardialen Hypertrophie. Diese zeigte sich als Erhöhung des echokardiografisch ermittelten Herzhypertrophie-Indexes (linksventrikuläre Masse (mg)/Körpergewicht (g)). Dieser betrug bei Ang II-behandelten Tieren $4,57 \pm 0,16$ mg/g vs. $3,36 \pm 0,10$ mg/g bei unbehandelten Tieren. Sowohl die diastolische Septumdicke als auch die

diastolische Hinterwanddicke waren bei den Ang II-behandelten Tieren vergrößert (Abbildung 8). Behandlung mit regulatorischen T-Lymphozyten reduzierte die kardiale Hypertrophie um 30%. Der Herzhypertrophie-Index betrug bei Ang II + Treg-behandelten Tieren $3,87 \pm 0,27$ mg/g. Die diastolische Septumdicke sowie die diastolische Hinterwanddicke waren ebenfalls signifikant reduziert (Abbildung 8).

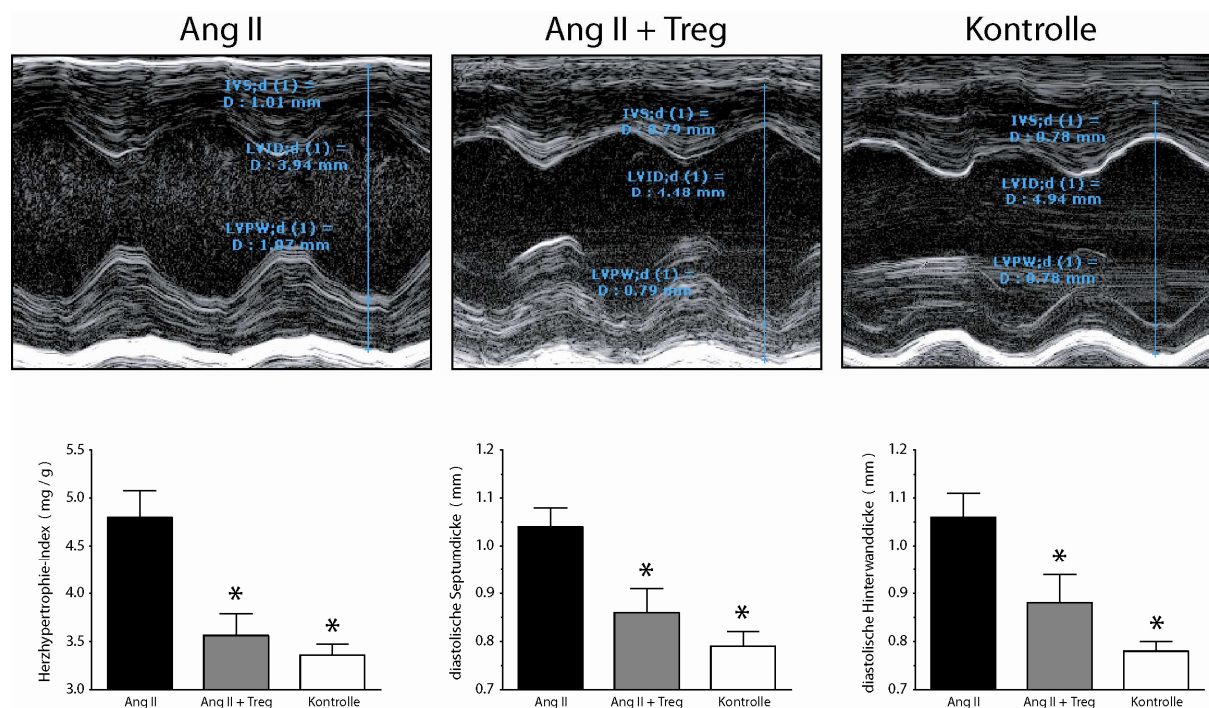


Abbildung 8. Obere Reihe: Echokardiografische Darstellung der parasternalen kurzen Achse (*motion mode*) und ein Beispiel der Ausmessung der diastolischen Septumdicke, Hinterwanddicke und des linksventrikulären Diameters bei einem Ang II-, Ang II + Treg-behandelten Tier sowie bei einem unbehandelten Kontrolltier. **IVSd** diastolische Septumdicke; **LVIDd** diastolischer linksventrikulärer Durchmesser; **LVPWd** diastolische Hinterwanddicke. Untere Reihe: grafische Darstellung des echokardiografisch ermittelten Herzhypertrophie-Indexes, der diastolischen Septumdicke und der diastolischen Hinterwanddicke bei den genannten Tiergruppen. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt; * steht für $p < 0,05$ vs. Ang II.

Der diastolische linksventrikuläre Durchmesser blieb bei der Behandlung mit Treg unverändert ($4,20 \pm 0,13$ mm bei Ang II + Treg vs. $4,20 \pm 0,08$ mm bei Ang II). Es wurde kein Unterschied in der echokardiografisch berechneten Ejektionsfraktion gesehen ($49,5 \pm 3,1\%$ bei Ang II + Treg vs. $56,1 \pm 2,7\%$ bei Ang II).

4.3.2. Postmortaler Herzhypertrophie-Index

Nach der Tötung der wurden die Tiere sowie auch die Herzen gewogen und der klassische Herzhypertrophie-Index (Herzgewicht (mg)/Körpergewicht (g)) berechnet. Dieser zeigte Ergebnisse die mit den echokardiografisch gewonnenen Daten vergleichbar waren. Herzhypertrophie-Index betrug $3,95 \pm 0,06$ mm bei unbehandelten Kontrolltieren vs. $5,33 \pm 0,13$ mm bei Ang II-behandelten Tieren vs. $4,90 \pm 0,13$ mm bei Ang II + Treg-behandelten Tieren. Diese Daten bestätigen, dass Ang II kardiale Hypertrophie induziert und auch, dass der Transfer von regulatorischen T-Lymphozyten kardiale Hypertrophie reduziert (Abbildung 9).

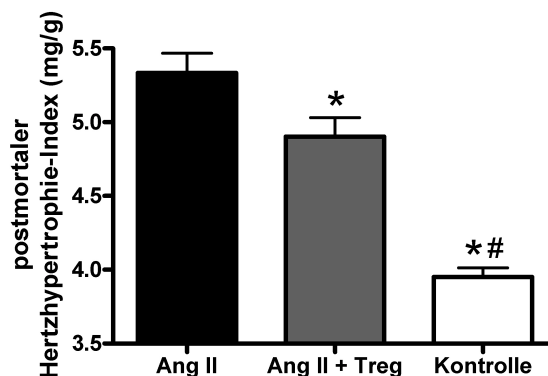


Abbildung 9. Der postmortale Herzhypertrophie-Index bei Ang II-, Ang II- und Treg-behandelten Tieren sowie unbehandelten Kontrolltieren. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt, * steht für $p < 0,05$ vs. Ang II; # steht für $p < 0,05$ vs. Ang II + Treg.

4.3.3. Pathohistologische Begutachtung

4.3.3.1. Darstellung fibrotischer Veränderungen im Herzen

Ausprägung der fibrotischen Veränderungen wurde anhand von *Sirius red*-gefärbten Herzschnitte beurteilt. Kardiale Fibrose bei den Treg-behandelten Tieren war weniger ausgeprägt als bei den lediglich mit Ang II-behandelten Tieren ($2,18 \pm 0,47$ arbitrary units (A.U.) bei Ang II + Treg vs. $4,17 \pm 0,61$ A.U. bei Ang II vs. $0,56 \pm 0,17$ A.U. bei unbehandelten Kontrolltieren; Abbildung 10).

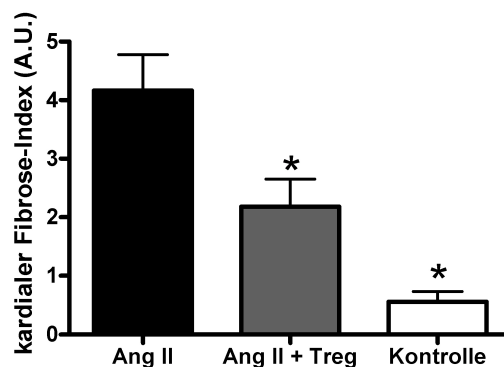


Abbildung 10. Pathohistologische Beurteilung der fibrotischen Veränderungen bei Ang II-, Ang II- und Treg-behandelten Tieren sowie unbehandelten Kontrolltieren anhand von *Sirius-red*-gefärbten Herzpräparaten. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt, * steht für $p < 0,05$ vs. Ang II.

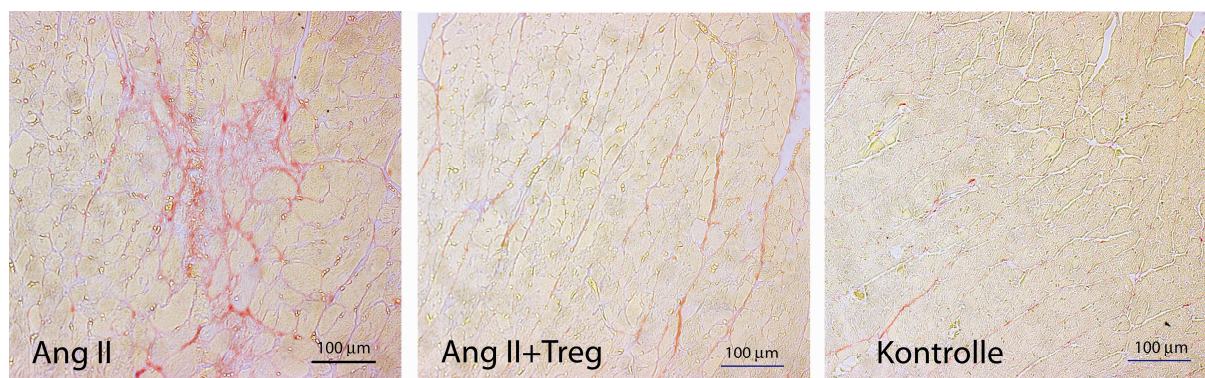


Abbildung 11. Ein repräsentativer Ausschnitt aus einem *Sirius red*-gefärbten Herzpräparate eines Ang II-, Ang II + Treg-behandelten Tieres sowie eines Kontrolltieres.

4.3.3.2. Immunhistochemische Darstellung der kardialen entzündlichen Infiltrate

Immunhistologische Färbung mit anti-CD4-, anti-CD8- und anti-F4/80-Antikörpern ermöglicht die selektive Darstellung der CD4+ Lymphozyten, CD8+ Lymphozyten sowie Makrophagen. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit regulatorischen T-Lymphozyten die Entstehung der entzündlichen Infiltrate im Herzen hemmt. In Herzschnitten die mit anti-CD4-Antikörpern gefärbt waren, wurden durchschnittlich bei Ang II-behandelten Tieren $40,25 \pm 10,97$ positive Zellen ausgezählt, $12,75 \pm 2,56$ bei Ang II + Treg-behandelten Tieren sowie $3,60 \pm 0,57$ bei unbehandelten Kontrolltieren.

Vergleichbar dazu war die Anzahl der CD8+ Lymphozyten bei den Treg-behandelten Tieren ebenfalls reduziert und betrug $43,75 \pm 8,34$ bei Ang II-behandelten Tieren, $11,5 \pm 1,94$ bei Ang II + Treg-behandelten Tieren sowie 5 ± 1 bei unbehandelten Kontrolltieren. Die Zahl der Makrophagen war ebenfalls bei Ang II + Treg-behandelten Tieren reduziert und betrug $74,75 \pm 17,13$ bei Ang II-behandelten Tieren, $21,50 \pm 1,55$ bei Ang II + Treg-behandelten Tieren und $10,20 \pm 1,64$ bei unbehandelten Kontrolltieren (Abbildung 12).

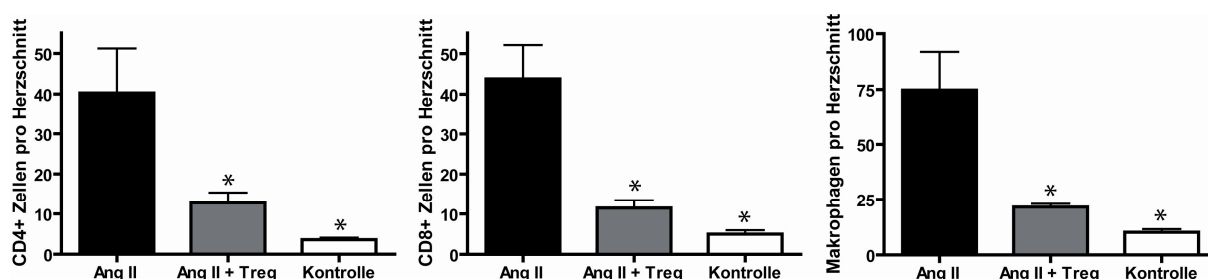


Abbildung 12. Grafische Darstellung der entzündlichen zellulären Infiltrate im Herzen bei Ang II-, Ang II + Treg-behandelten Tieren sowie bei den unbehandelten Kontrolltieren. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt; * steht für $p < 0,05$ vs. Ang II.

4.3.4. Einfluss der Dauerbehandlung mit Angiotensin II auf den Lymphozytenphänotyp

Um eine eventuelle Ang II-bedingte Aktivierung der Lymphozyten bzw. eine Änderung der Anzahl der natürlichen, tiereigenen regulatorischen T-Lymphozyten wurden Splenozyten aus den Mäusen einer 2-wöchigen Ang II-Dauerinfusion ausgesetzt waren sowie aus Kontrolltieren isoliert und mit Antikörpern gegen CD4, CD25, CD44, CD62L, CD69 sowie Foxp3 inkubiert. Anschließend wurde der Anteil der CD25+, CD44^{high}, CD62L^{low}, CD69+ und Foxp3+ Zellen in der Population der CD4+ Zellen bestimmt. Dabei weist Expression von CD69, hohe Expression von CD44 sowie niedrige Expression von CD62L einen aktivierten Lymphozytenphänotyp aus. Der Anteil der CD4+CD44^{high} Splenozyten war bei den Ang II-behandelten Tieren signifikant höher als bei den Kontrolltieren (18,44 ± 1,03% bei Ang II vs. 14,91 ± 0,99% bei Kontrolltieren). Der Anteil der CD4+CD62L^{low} Splenozyten war bei den Ang II-behandelten Tieren ebenfalls erhöht (20,72 ± 1,23% bei Ang II vs. 16,42 ± 0,91% bei Kontrolltieren; Abbildung 13). Dies weist auf eine Aktivierung der Lymphozyten unter Ang II-Behandlung hin.

Der Anteil der CD25+, CD69+ sowie Foxp3+ Zellen war zwischen Ang II-behandelten Tieren und Kontrolltieren nicht unterschiedlich (Daten nicht gezeigt).

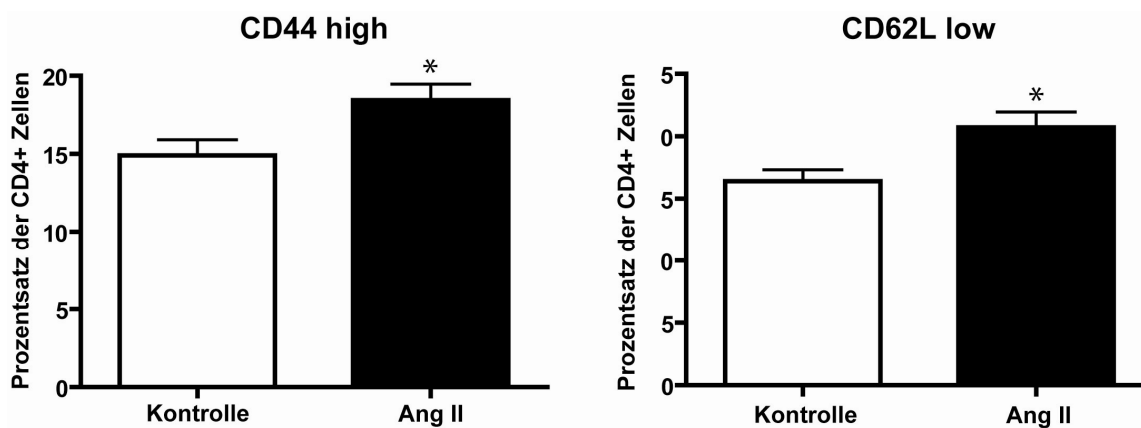


Abbildung 13. Graphische Darstellung des Anteils der CD4+ Lymphozyten die eine starke Expression von CD44 (links) bzw. eine schwache Expression von CD62L (rechts) aufweisen. Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt; * steht für $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.3.5. Einfluss der Angiotensin II-induzierten arteriellen Hypertonie und der regulatorischen T-Lymphozyten auf kardiale Expression von *brain natriuretic peptide* und Interleukin-6

Passend zu dem erhöhten Herzhypertrophie-Index sowie zu der vermehrten kardialen Fibrose bei den Ang II-behandelten Tieren war auch die kardiale Expression des Herzhypertrophie-Markers *brain natriuretic peptide* (BNP) erhöht. Sie betrug $6,37 \pm 0,67$ A.U. bei Ang II-behandelten Tieren und $2,09 \pm 0,36$ A.U. bei unbehandelten Kontrolltieren. BNP-Expression war mit $3,10 \pm 0,49$ A.U. bei Ang II + Treg-behandelten Tieren signifikant reduziert (Abbildung 14).

Im Gegensatz zu der Vermutung, dass die Reduktion der kardialen entzündlichen Infiltrate bei Ang II + Treg-behandelten Tieren mit einer Reduktion der kardialen Expression der Entzündungsmediatoren einhergeht, konnte keine signifikante Reduktion der kardialen Interleukin-6-Expression bei Ang II + Treg-behandelten Tieren im Vergleich zu den lediglich mit Ang II behandelten Tieren gesehen werden ($10,37 \pm 2,94$ A.U. bei Ang II, $7,83 \pm 3,11$ A.U. bei Ang II + Treg, $4,74 \pm 0,70$ A.U. bei Kontrolltieren; Abbildung 15).

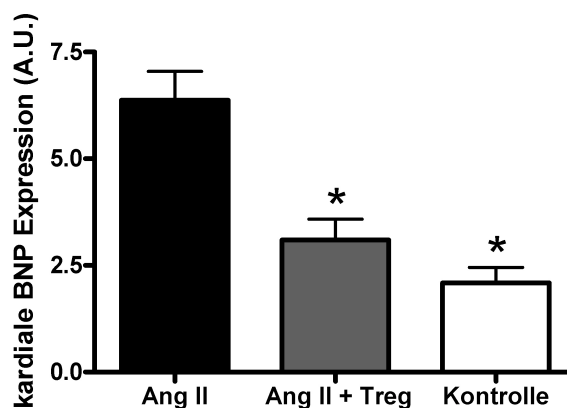


Abbildung 14. Grafische Darstellung der kardialen BNP Expression. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt; * steht für $p < 0,05$ vs. Ang II.

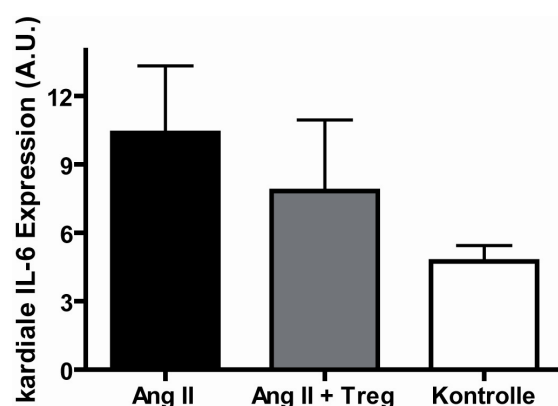


Abbildung 15. Grafische Darstellung der kardialen Interleukin-6 -Expression. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

4.3.6. Einfluss der Angiotensin II-induzierten arteriellen Hypertonie und der regulatorischen T-Lymphozyten auf kardiale microRNA-Expression

In der folgenden Tabelle sind die, bei den Ang II-behandelten, Ang II + Treg-behandelten und unbehandelten Tieren unterschiedlich regulierte microRNAs im Herzen aufgeführt. Die Bezeichnung Ang II + Treg > Ang II \approx Kontrolle bedeutet, dass die Expression der genannten microRNAs im Herzgewebe der Ang II-behandelten Tieren nicht signifikant unterschiedlich war als bei den unbehandelten Tieren, bei den Ang II + Treg-behandelten Tieren aber signifikant vermehrt exprimiert war. Insgesamt 49 auf diese Weise regulierten microRNAs wurden detektiert, wobei MicroRNA (MIR)-328-3P und MIR-466G mit 5,8- bzw. 4,3-fachen Expression am stärksten reguliert waren.

Ang II + Treg > Ang II \approx Kontrolle			
MIR-328-3P	MIR-615-3P	MIR-323-5P	MIR-346
MIR-466G	MIR-324-5P	MIR-298	MIR-466H
MIR-423-5P	MIR-423-3P	MIR-760-3P	MIR-673-3P
MIR-877	MIR-344-5P	MIR-412	MIR-500-3P
MIR-541	MIR-671-3P	MIR-470	MIR-327
MIR-214	MIR-207	MIR-370	MIR-501-3P
MIR-100	MIR-134	MIR-770-3P	MIR-503
MIR-483-5P	MIR-205	MIR-665	MIR-337-5P
MIR-494	MIR-532-3P	MIR-874	MIR-615-5P
MIR-296-3P	MIR-491-5P	MIR-129-5P	MIR-197
MIR-296-3P	MIR-351	MIR-324-3P	MIR-184
MIR-485-5P	MIR-183	MIR-672	MIR-326
MIR-330-3P			

Tabelle 1. Darstellung der kardialen microRNA Expression, Teil 1.

MIR-690 war als einzige microRNA sowohl in den Ang II-behandelten Tieren als auch in den Ang II + Treg behandelten Tieren verstärkt exprimiert (4-fach, bzw. 2-fach). MIR-133A* und MIR-489 waren lediglich bei den Ang II-behandelten Tieren verstärkt exprimiert; ihre Expression bei den Ang II + Treg behandelten Tieren unterschied sich nicht signifikant von der Expression in den Kontrolltieren (Bezeichnung Ang II > Ang II + Treg > Kontrolle). Expression 7 microRNAs war sowohl bei den Ang II- behandelten als auch bei den Ang II + Treg behandelten Tieren signifikant erniedrigt (Bezeichnung Ang II \approx Ang II + Treg < Kontrolle), Expression weiterer acht microRNAs war bei den Ang II- behandelten und Ang II + Treg-behandelten Tieren signifikant erhöht (Bezeichnung Ang II \approx Ang II + Treg > Kontrolle).

Ang II > Ang II + Treg > Kontrolle	Ang II ≈ Ang II + Treg > Kontrolle
MIR-690	MIR-1
	MIR-208A
	MIR-22*
	MIR-26B
	MIR-805
	MIR-487B
	MIR-212
	MIR-30E*
Ang II > Ang II + Treg ≈ Kontrolle	
MIR-133A*	
MIR-489	
Ang II ≈ Ang II + Treg < Kontrolle	
LET-7I	
MIR-709	
MIR-21	
LET-7A	
MIR-99A	
MIR-181A	

Tabelle 2. Darstellung der kardialen microRNA Expression, Teil 2.

4.3.7. Elektrophysiologische Eigenschaften des Myokards in Angiotensin II-bedingter kardialer Hypertrophie und ihre Beeinflussung durch den Transfer regulatorischer T-Lymphozyten

Elektrophysiologische Untersuchung wurde exemplarisch an einigen wenigen Tieren durchgeführt. Die erhobenen Daten geben einen ersten Überblick über den Einfluss der regulatorischen T-Lymphozyten auf die elektrophysiologischen Eigenschaften und die Auslösbarkeit der Arrhythmien in Ang II-induzierter kardialer Hypertrophie. Eine statistische Auswertung ist aufgrund der



Abbildung 16. Ruhe-EKG der Maus Nr. 1216 (exemplarisch).

begrenzten Fallzahl nicht möglich. Das zum Beginn der elektrophysiologischen Untersuchung abgeleitete Ruhe-EKG zeigte keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Ang II-behandelten Tieren und den Ang II + Treg-behandelten Tieren.

Ruhe-EKG

Tier-Nr.	Gruppe	RR	HF	P	PQ	QR	QRS	QTp	Qtend	QTc
1216	Ang II	130	462	18	39	8	13	15	65	57
1218	Ang II	140	429	15	28	7	12	15	71	60
1217	Ang II + Treg	103	583	15	31	7	12	14	68	67
1219	Ang II + Treg	121	496	18	36	9	17	24	66	60

Tabelle 3. RR Abstand zwischen zwei R-Zacken; HF Herzfrequenz (pro Min.); P Dauer der P-Welle PQ PQ-Intervall; QR Intervall zwischen dem Beginn der Q-Zacke und dem höchsten Punkt der R-Zacke; QRS Dauer des QRS-Komplexes; QTp Zeit vom Beginn der Q-Zacke bis zum höchsten Punkt der T-Welle; Qtend Zeit vom Beginn der Q-Zacke bis zum Ende der T-Welle; QTc Frequenz-korrigierte QT-Zeit (berechnet nach adaptierter Bazett-Formel $QTc = QT / \sqrt{RR/100}$). Alle Angaben, ausgenommen Herzfrequenz, in ms.

Die mittels elektrischer Stimulation im Vorhof erhobene Refraktärzeit des Sinusknotens, der Wenkebach-Punkt des AV-Knotens sowie die Refraktärzeit des AV-Knotens unterschieden sich zwischen den Ang II und Ang II + Treg-behandelten Tiere nicht. Allerdings konnten Unterschiede in der Refraktärzeit des Ventrikels festgestellt werden. Diese betrug bei den Ang II-behandelten Tieren 20 bis 22 ms, was in Übereinstimmung mit früheren Studien deutlich unter dem Normalbereich für Mäuse liegt.¹⁵⁸ Im Gegensatz dazu lag die Refraktärzeit des Ventrikels bei den Ang II + Treg-behandelten Tieren mit Werten zwischen 42 und 68ms im Normbereich.

Elektrophysiologische Eigenschaften des Myokards

Tier-Nr.	Gruppe	AV-WP	AV 2:1	AVNERP 100	AVNERP 90	SNRT 100	SNRT 90	VERP 100	VERP 90
1216	Ang II	82	54	53	56	142	149	20	22
1218	Ang II	70	54	46	48	124	130	20	22
1217	Ang II + Treg	76	62	57	58	110	117	44	42
1219	Ang II + Treg	74	56	54	54	138	153	66	68

Tabelle 4. AV-WP Wenkebach-Punkt des AV-Knotens, d.h. minimale Zykluslänge der Stimulation bei der die AV-Überleitung noch stattfindet; AV 2:1 Zykluslänge der Stimulation bei der eine 2:1 Überleitung im AV-Knoten stattfindet; AVNERP 100 Refraktärzeit des AV-Knotens bei einer Stimulation mit Zykluslänge von 100ms; AVNERP 90 Refraktärzeit des AV-Knotens bei einer Stimulation mit Zykluslänge von 90ms; SNRT 100 Refraktärzeit des Sinusknotens bei einer Stimulation mit Zykluslänge von 100ms; SNRT 90 Refraktärzeit des Sinusknotens bei einer Stimulation mit Zykluslänge von 90ms; VERP 100 Refraktärzeit des Ventrikels bei einer Stimulation mit Zykluslänge von 100ms; VERP 90 Refraktärzeit des Ventrikels bei einer Stimulation mit Zykluslänge von 90ms. Alle Angaben in ms.

Hochfrequente elektrische Stimulation im rechten Ventrikel führte bei den Ang II-behandelten Tieren mehrfach zu nicht anhaltenden ventrikulären Tachykardien, mit einer maximalen Dauer von 2,7 Sekunden. Im Gegensatz dazu bot das Ang II + Treg-behandelte Tier 1219 keine Arrhythmien. Das Tier 1217, ebenfalls mit Ang II + Treg behandelt, bot unter der hochfrequenten elektrischen Stimulation im rechten Ventrikel lediglich eine 513ms anhaltende ventrikuläre Tachykardie.

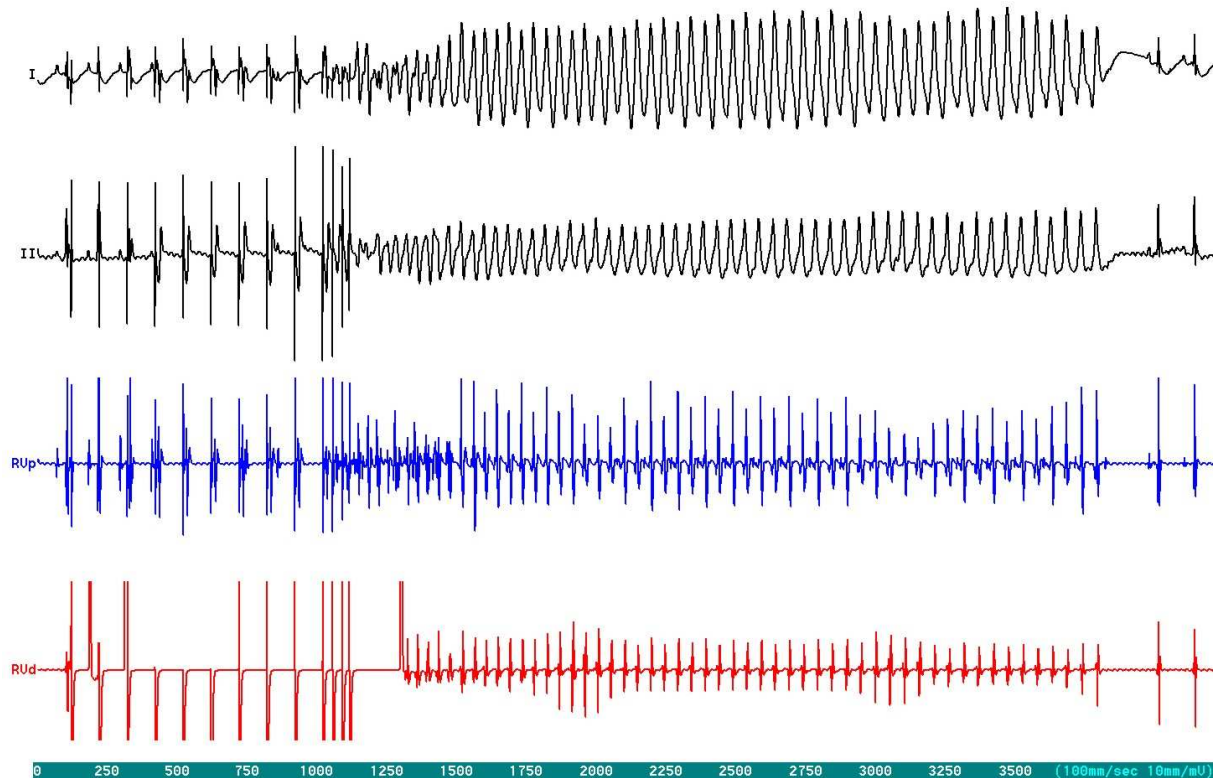


Abbildung 17. Tier 1216: Beispiel einer mittels hochfrequenter Stimulation in der rechten Kammer ausgelösten ventrikulären Tachykardie. Dauer 2,7 Sekunden, spontanes Sistieren.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass Ang II-induzierte kardiale Hypertrophie zu Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften des Myokards führt, die mit einer erhöhten Auslösbarkeit ventrikulärer Tachykardien einhergehen. Die Frage, ob regulatorische T-Lymphozyten tatsächlich die elektrophysiologischen Eigenschaften des Myokards positiv beeinflussen und somit die Auslösbarkeit der ventrikulären Tachykardien verringern können, kann nur in weiteren, umfangreicheren elektrophysiologischen Studien endgültig beantwortet werden.

4.4. Einfluss regulatorischer T-Lymphozyten auf den Angiotensin II-bedingten Nierenschaden

4.4.1. Renale Funktion in Angiotensin II-induzierter arterieller Hypertonie

Dauerinfusion mit Ang II in einer Dosierung von 1,44 mg/kg KG/d über 14 Tage führt nicht zum Anstieg der Serum-Kreatinin-Konzentration. Der Transfer regulatorischer T-Lymphozyten bewirkt ebenfalls keine Änderung der Serum-Kreatinin-Konzentration. Diese betrug bei unbehandelten Kontrolltieren $21,7 \pm 1,0 \mu\text{mol/L}$, bei Ang II-behandelten Tieren $21,6 \pm 1,2 \mu\text{mol/L}$ und bei den Ang II + Treg-behandelten Tieren $20,1 \pm 0,3 \mu\text{mol/L}$ (Abbildung 18).

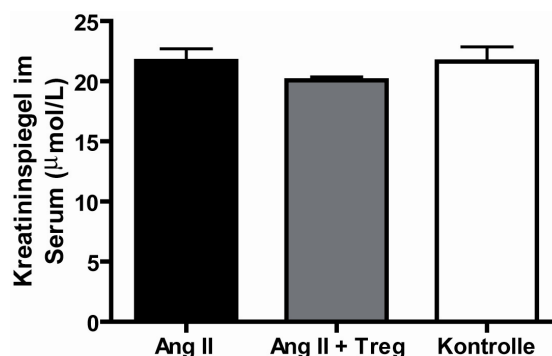


Abbildung 18. Kreatininspiegel bei Ang II-, Ang II + Treg-behandelten Tieren sowie Kontrolltieren. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

4.4.2. Einfluss regulatorischer T-Lymphozyten auf Angiotensin II-bedingte Albuminurie

Aus der im Urin gemessenen Albuminkonzentration und dem jeweiligen 24h-Urinvolumen wurde 24h-Albuminausscheidung berechnet. Da alle Versuchstiere bis zum Ende des Versuchs normale bzw. aufgrund der Ang II-Infusion erhöhte Diurese hatten sowie normale Kreatininwerte aufwiesen, d.h. keine Zeichen eines akuten Nierenversagens aufwiesen, gingen wir von stabilen und vergleichbaren Kreatininkonzentrationen im Urin aus.

Dauerinfusion mit Ang II führte zu einer vermehrten Albuminausscheidung im Urin bereits am 6. Tag des Versuchs ($257,8 \pm 67,7 \mu\text{g/d}$ bei Ang II vs. $49,7 \pm 5,9 \mu\text{g/d}$ bei Kontrolltieren) und bewirkte eine weitere Zunahme der Albuminurie am 12. Tag des Versuchs ($516,5 \pm 113,1 \mu\text{g/d}$ bei Ang II). Das Verabreichen der regulatorischen T-Lymphozyten bewirkte keine signifikante Besserung der Albuminurie. Es zeigte sich lediglich ein Trend zur verminderten Albuminurie am 6. Tag ($142,1 \pm 32,3 \mu\text{g/d}$ bei Ang II + Treg vs. $257,8 \pm 67,7 \mu\text{g/d}$ bei Ang II). Albuminurie bei den Ang II + Treg-behandelten Tieren am 12. Tag betrug $525,5 \pm 86,7 \mu\text{g/d}$ und war somit mit der Albuminurie der lediglich mit Ang II-behandelten Tiere vergleichbar.

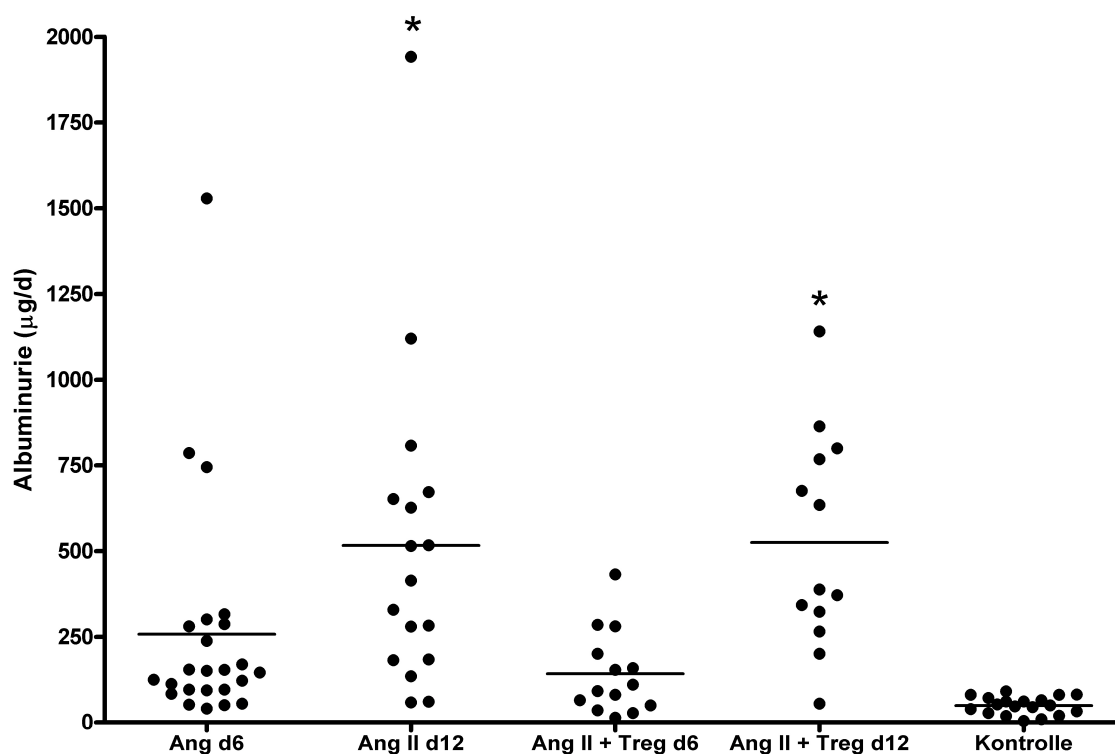


Abbildung 19. Grafische Darstellung der Albuminurie ($\mu\text{g/d}$) gemessen am Tag 6/7 und am Tag 12/13 des Versuchs bei den Tieren die mit Ang II-, Ang II + Treg-behandelten Tieren und unbehandelten Kontrolltieren. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt; * steht für $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.4.3. Pathohistologische Begutachtung

4.4.3.1. Darstellung pathologischer renaler Veränderungen mittels Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Ang II-behandelte Tiere wiesen starke pathologische Veränderungen auf ($2,13 \pm 0,31\text{A.U.}$ bei Ang II vs. $0,71 \pm 0,18\text{A.U.}$ bei Kontrolltieren). Transfer regulatorischer T-Lymphozyten führte zur signifikanten Besserung des pathohistologischen Befundes ($1,12 \pm 0,28\text{A.U.}$ bei Ang II + Treg) (Abbildung 20).

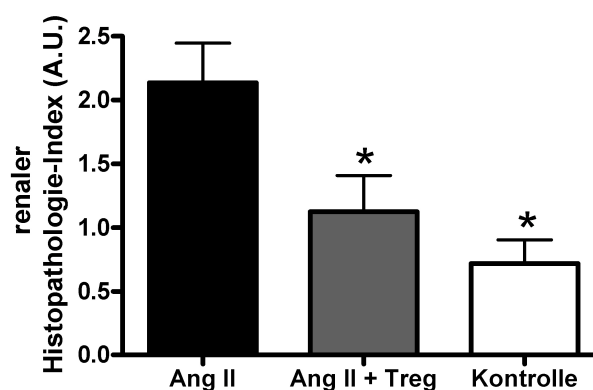


Abbildung 20. Grafische Darstellung des Ausmaßes der renalen pathologischen Veränderungen, beurteilt anhand der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt; * steht für $p < 0,05$ vs. Ang II.

4.4.3.2. Immunohistochemische Darstellung der renalen entzündlichen Infiltrate

Im Gegensatz zu den Effekten der regulatorischen T-Lymphozyten auf die Infiltration der

entzündlichen Zellen ins Herz wurde in den Nieren der Ang II + Treg-

behandelten Tieren keine signifikante Reduktion der entzündlichen Infiltrate gesehen. Kontrolltiere wiesen $3,75 \pm 0,25$ CD4+ Zellen pro Gesichtsfeld, Ang II-behandelte Tiere $12,86 \pm 0,73$, Ang II + Treg-behandelte Tiere $9,44 \pm 1,11$. Die Zahl der Makrophagen betrug bei den Kontrolltieren $7,75 \pm 0,48$, bei den Ang II-behandelten Tiere $22,57 \pm 0,95$, bei den Ang II + Treg-behandelten Tieren $19,33 \pm 1,11$ (Abbildung 21). Auf die Erfassung der CD8+ Zellen wurde aufgrund des zu schwachen Signals und somit fehlender bedeutsamen CD8+ Infiltration verzichtet.

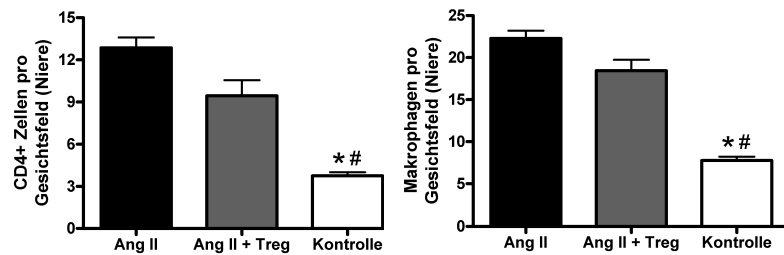


Abbildung 21. Grafische Darstellung der entzündlichen zellulären Infiltrate in der Niere bei Ang II-, Ang II- und Treg-behandelten Tieren sowie bei den unbehandelten Kontrolltieren. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt; * steht für $p < 0,05$ vs. Ang II; # steht für $p < 0,05$ vs. Ang II + Treg.

4.4.3.3. Cell tracking

Die mittels CFDA-SE markieren Zellen konnten Fluoreszenz-mikroskopisch in der Niere der Treg-behandelten Tiere nicht detektiert werden. Aus diesem Grund liegen keine Erkenntnisse über die Lokalisation der transferierten regulatorischen T-Lymphozyten vor.

5. Diskussion

5.1. Die Rolle der proinflammatorischen Zytokine und der Immunzellen in der Entstehung der kardialen Hypertrophie und Fibrose

Das zentrale Ergebnis dieser Arbeit stellt der positive Einfluss des Transfers regulatorischer T-Lymphozyten auf die Entstehung des Ang II-bedingten kardialen Schadens dar.

Bereits früh im Verlauf der arteriellen Hypertrophie kommt es zur Entwicklung des linksventrikulären konzentrischen Remodelings (relative Verdickung der Herzwände im Vergleich zu dem Ventrikeldiameter ohne absolute Massenzunahme) oder der konzentrischen Hypertrophie (absolute Massenzunahme des Myokards).¹⁵⁹ Linksventrikuläre Hypertrophie beim Menschen ist assoziiert mit erhöhtem Risiko für Herzinsuffizienz, für ventrikuläre Arrhythmien sowie kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Ereignisse.¹⁶⁰⁻¹⁶³ Regression der linksventrikulären Hypertrophie führt zur Verringerung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität.¹⁶⁴

Ang II-induzierte arterielle Hypertonie führt sowohl über vermehrte mechanische Belastung als auch durch eine direkte Ang II-Wirkung im Herzen zur Hypertrophie der Kardiomyozyten, zur Fibrose und zu entzündlichen perivaskulären Infiltraten. In dem hier verwendeten Modell des Ang II-bedingten Endorganschadens bewirkte der Transfer regulatorischer Lymphozyten signifikante Besserung der kardialen Pathologie.

Kardiale Hypertrophie wurde am 11. Tag des zweiwöchigen Versuchs echokardiografisch erfasst sowie am Ende des Versuchs anhand des Herzhypertrophie-Indexes bestimmt. Sie zeigte sich bei den Ang II + Treg-behandelten Tieren im Vergleich zu den Ang II-behandelten Tieren um ca. 30% reduziert. Kardiale Fibrose war bei Ang II + Treg-behandelten Tieren ebenfalls signifikant reduziert.

Da regulatorische T-Lymphozyten in erster Linie immunsuppressiv wirken, wurde die aktuelle Literatur nach den Daten bezüglich des Einflusses immunsuppressiver Therapie auf die Entstehung der kardialen Hypertrophie durchsucht, lieferte aber weder im tierexperimentellen noch im klinischen Bereich eindeutige Ergebnisse. Das Immunsuppressivum Cyclosporin reduzierte kardiale Hypertrophie sowohl im Mausmodell mit Druck-induzierter Herzhypertrophie als auch im Rattenmodell der Ang II-bedingten kardialen Hypertrophie.^{80, 165} Allerdings ist Cyclosporin ein Calcineurin-Inhibitor und kann somit den Calcineurin/NF-AT/GATA4 Signaltransduktionsweg hemmen, der in der Entstehung der kardialen Hypertrophie eine bedeutsame Rolle spielt. Deswegen kann bei der

Cyclosporin-bedingten Reduktion der kardialen Hypertrophie nicht von einem reinen immunsuppressiven Effekt ausgegangen werden.

Ang II-bedingte kardiale Hypertrophie sowie andere Formen der kardialen Hypertrophie gehen mit entzündlichen Veränderungen einher. Besserung der kardialen Hypertrophie und Fibrose gehen im Modell der Ang II-vermittelten kardialen Hypertrophie mit einer Reduktion der entzündlichen zellulären Infiltrate, bestehend aus CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten sowie Makrophagen, einher. Da die infiltrierten Entzündungszellen verschiedene Zytokine sezernieren können, und diese pathophysiologisch eine Rolle in der Entstehung der kardialen Hypertrophie spielen könnten, wird im folgenden Abschnitt die Rolle der proinflammatorischen Zytokine genauer dargestellt. Des Weiteren wird die Rolle der Lymphozyten bei der kardialen Hypertrophie beschrieben.

Druck-induzierte kardiale Hypertrophie geht mit entzündlichen Infiltraten und Expression entzündlicher Zytokine im Myokard einher. So konnten Sun et al. ausgeprägte CD45⁺ zelluläre Infiltrate zeigen sowie auch kardiale Expression von TNF- α , Interleukin-6, MCP-1 und MIP-1. TNF- α -defiziente Tiere wiesen neben dem milderem inflammatorischen kardialen Phänotyp auch eine Reduktion der kardialen Hypertrophie und der Fibrose auf. Diese Studie etabliert einen direkten Link zwischen der kardialen Zytokinproduktion und kardialen Hypertrophie und Fibrose.⁴¹ Ang II-vermittelte Fibroblastenproliferation und Produktion des extrazellulären Matrix ist zumindest zum Teil durch das Interleukin-6 vermittelt.³⁷ Außerdem können TNF- α und Interleukin-1 β die Expression von AT1-Rezeptoren auf Fibroblasten steigern und somit die Ang II-Effekte weiter verstärken.¹⁶⁶ Überexpression des sowohl proinflammatorisch als auch antiinflammatorisch wirkenden Zytokins Interleukin-6 ruft durch kontinuierliche Aktivierung der Interleukin-6-Untereinheit gp130 die Aktivierung des Janus kinase-STAT-Signaltransduktionsweges hervor und induziert somit eine kardiale Hypertrophie.¹⁶⁷ Wie bereits aus der Literatur bekannt, konnten wir zeigen, dass Ang II die Expression von Interleukin-6 induziert.¹⁶⁸ Diese war bei Ang II + Treg-behandelten Tieren im Vergleich zu den lediglich mit Ang II behandelten Tieren reduziert, allerdings nicht statistisch signifikant. Dass MCP-1, ein weiteres Zytokin mit proinflammatorischen Eigenschaften, ebenfalls an der Entstehung der kardialen Hypertrophie beteiligt ist, zeigt die Studie von Kolattukudy et al.. Selektive kardiale Überexpression vom MCP-1 bei der Maus führte zur kardialen Hypertrophie und Dilatation, begleitet von ausgeprägten Makrophagen-Infiltraten und Fibrosierungen. Weiterhin zeigten sie, dass Interleukin-6 und MCP-1 synergistisch den Janus kinase-STAT-Signaltransduktionsweg aktivieren.¹⁶⁹

Neben der Produktion der inflammatorischen Zytokine durch die Kardiomyozyten und Fibroblasten unter dem Einfluss der mechanischen Beanspruchung und der neurohormonalen Faktoren, sind die infiltrierenden Leukozyten eine nicht minder wichtige Quelle der entzündlichen Zytokine im Myokard. Yu et al. zeigten, dass das Verabreichen der nichtspezifischen NO-Synthase-Blocker L-NAME bei den T- und B-Lymphozyten-defizienten SCID-Mäusen im Vergleich zur *wild typ*-Mäusen zu einer mildereren kardialen Fibrose führt als bei den *wild typ*-Mäusen.⁴⁵ Vergleichbare Daten liegen bereits für die Entstehung der Tetrachlorkohlenstoff-induzierten Leberfibrose vor und betonen somit die Rolle der Lymphozyten in der Entstehung der Fibrose.¹⁷⁰

Zusammenfassend kann man festhalten, dass proinflammatorische Zytokine Signaltransduktionswege der kardialen Hypertrophie und Fibrose aktivieren. Das Myokard infiltrierende Zellen stellen neben den kardialen Myozyten und Fibroblasten eine wichtige Quelle der proinflammatorischen Zytokine dar. Signifikante Reduktion der kardialen Hypertrophie und der Fibrose bei den Treg-behandelten Tieren könnte ursächlich mit der Reduktion der entzündlichen Infiltrate zusammenhängen.

5.2. Die Rolle der Inflammation und des Immunsystems in der Herzinsuffizienz

Auch im fortgeschrittenen Stadium der Herzinsuffizienz, nicht nur in ihrem Entstehen, spielen Entzündung und Aktivierung des Immunsystems eine bedeutsame Rolle. Erhöhte zirkulatorische Spiegel der proinflammatorischen Zytokine wie z.B. TNF- α , Interleukin-6, Interleukin-1 β und Interleukin-2 wurden bei herzinsuffizienten Patienten gemessen und korrelierten mit der Verschlechterung der Pumpfunktion.¹⁷¹ Des Weiteren sind erhöhte Spiegel der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 und TNF- α mit gesteigertem Risiko für Herzinsuffizienz assoziiert.¹⁷² Dass kardiale Überexpression vom MCP-1 im Herzen zur kardialen Hypertrophie und Dilatation führt, wurde bereits diskutiert. Tierexperimentelle Studien zeigen, dass TNF- α die Entwicklung der Herzinsuffizienz begünstigt. Bryant et al. zeigten, dass transgene, auf das Myokard beschränkte TNF- α Expression biventrikuläre Dilatation, entzündliche Myokardreaktion sowie Fibrose bei eingeschränkter Pumpfunktion und klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz hervorruft.¹⁷³ Obwohl diese Ergebnisse die Hoffnung erweckten, dass die Blockade von TNF- α eine Besserung der Herzinsuffizienz bei Menschen bewirken könnte, bestätigte sich das in den klinischen Studien nicht.¹⁷⁴ Einer der Gründe dafür könnte darin liegen, dass TNF- α ein sehr breites Wirkungsspektrum hat. TNF- α ist einer der stärksten NF- κ B Aktivatoren, der wiederum ein ubiquitär exprimierter

Transkriptionsfaktor ist und sowohl zellprotektive als auch anti-apoptotische Signale auslösen kann. Trotzdem bietet die Beeinflussung der Entzündung und der Immunantwort weiterhin einen Spielraum zur Verbesserung der Herzinsuffizienz-Therapie, da andere therapeutische Ansätze, die schädliche kompensatorische Mechanismen der Herzinsuffizienz beeinflussen, bereits ausgereizt sind. In einigen wenigen Studien konnte mittels intravenöser Immunglobulingaben eine Besserung der Pumpfunktion erzielt werden.¹⁷⁵ In weiteren Studien führte Immunoabsorption zur Verbesserung der Pumpfunktion.¹⁷⁶ Zusammenfassend kann man festhalten, dass weiteres Erforschen der pro- und antiinflammatorischen Mechanismen in Herzinsuffizienz zu besserem Verständnis und folglich zu weiteren Therapieoptionen der Herzinsuffizienz führt.

5.3. Die Art der Immunantwort im Angiotensin II-bedingten Endorganschaden

In Rahmen der obigen Diskussion der Rolle der Entzündung und des Immunsystems in kardialer Hypertrophie bzw. Herzinsuffizienz erwähnten inflammatorischen Zytokine werden im Rahmen der T_H1 -Immunantwort sezerniert. Ursprünglicher T_H1/T_H2 -Theorie nach differenzieren die naiven $CD4^+$ T-Lymphozyten nach der Stimulation mit einem Antigen in zwei verschiedene Subpopulationen: in die T-Helfer Typ 1-Lymphozyten (T_H1) und T-Helfer Typ 2-Lymphozyten (T_H2). Diese Lymphozyten-Subpopulationen unterscheiden sich im Profil der Zytokinexpression und somit in ihren Funktionen. Die T_H1 -Lymphozyten sezernieren u.a. Interferon- γ und sind für die Gewebsschädigungen verantwortlich, die durch die aus Lymphozyten und Makrophagen bestehenden zellulären Infiltrate hervorgerufen sind, während die Population der T_H2 -Lymphozyten u.a. Interleukin-4 sezerniert und für Antikörper-vermittelte Gewebsschädigung, so wie sie z.B. bei Allergie vorkommt, verantwortlich ist. Obwohl bedeutende experimentelle und klinische Daten die T_H1/T_H2 -Hypothese unterstützen, wurde in den vergangenen Jahren klar, dass diese Hypothese, trotz ihrer Eleganz, Unstimmigkeiten aufweist, bzw. unvollständig ist. Des Weiteren führten Fortschritte der Zytokinforschung zur Entdeckung der Zytokine, die weder von der Subpopulation der T_H1 -Lymphozyten, noch der Subpopulation der T_H2 -Lymphozyten produziert werden und trotzdem maßgebend bei der Entstehung der vermeintlich T_H1 -vermittelten Erkrankungen sind. Zu diesen Zytokinen gehören Interleukin-17 und -23, die essentiell für die Entstehung der experimentellen allergischen Enzephalitis, ehemals Mustererkrankung der T_H1 -Immunantwort, beteiligt sind.^{177, 178} Bei weiteren, ebenfalls vermeintlich T_H1 -vermittelten Erkrankungen, spielen Interleukin-17 und -23 ebenfalls eine

tragende Rolle: bei der Kollagen-induzierten Arthritis sowie bei der experimentellen Myokarditis.^{179,180} Dies führte zur Erweiterung der T_H1/T_H2-Hypothese um eine weitere Lymphozyten-Subpopulation, um T_H17-Lymphozyten. Ein weiteres wichtiges Zytokin der T_H17-Immunantwort ist Interleukin-27. Es hat eine suppressive Wirkung auf die Aktivität der T_H17-Lymphozyten und stellt somit eine Art physiologische Bremse dar. Ausprägung der T_H17-Immunantwort wurde bisher weder in Ang II-bedingter kardialer Hypertrophie noch in weiteren Hypertrophie-Formen bzw. Herzinsuffizienz untersucht. Unter dem Aspekt der Rolle der Inflammation und des Immunsystems in der Entstehung der kardialen Hypertrophie stellt das Erforschen der T_H17-Immunantwort einen interessanten Ausblick dar.

5.4. Der Einfluss regulatorischer T-Lymphozyten im Angiotensin II-bedingten renalen Schaden

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist, dass ein positiver Einfluss des Transfers der regulatorischen T-Lymphozyten auf den renalen Endorganschaden gezeigt werden konnte, allerdings nur aus der pathohistologischen Sicht. In der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung wiesen Ang II-behandelte Tiere interstitielle und perivaskuläre Fibrose, verdickte Arteriolen sowie interstitielle und perivaskuläre zelluläre Infiltrate auf. All diese pathologischen Veränderungen waren in den Ang II + Treg-behandelten Tieren signifikant reduziert. Der Transfer regulatorischer T-Lymphozyten bewirkte keine Besserung der Albuminurie. Unterschiede in der Ausprägung der entzündlichen zellulären Infiltrate zwischen Ang II- und Ang II + Treg-behandelten Tieren waren nicht signifikant, obwohl ein Trend zu Reduktion der CD4⁺ und Makrophagen-Infiltration ersichtlich war. Somit steht anhand unserer bisherigen Ergebnisse fest, dass sich die positive Wirkung regulatorischer Lymphozyten im Ang II-bedingten Endorganschaden auf die Verbesserung des kardialen Schadens beschränkt. Im Folgenden sollten die diesen Befund möglicherweise hervorrufende Gründe diskutiert werden.

In mehreren tierexperimentellen Studien wurden regulatorische T-Lymphozyten erfolgreich in der Behandlung renaler Erkrankungen eingesetzt. Wolf et al. verwendeten das Mausmodell mit experimenteller anti-glomerulärer Basalmembran Glomerulonephritis als Modell einer durch die spezifische Immunabwehr bedingten renalen Erkrankung. Hier konnte der Transfer von 10⁶ regulatorischer Lymphozyten Proteinurie, histopathologische Veränderungen sowie entzündliche Infiltrate deutlich verbessern.¹⁸¹ Auch im Mausmodell einer durch die unspezifische Immunabwehr hervorgerufenen renalen Erkrankung, in Adriamycin-

Nephropathie, konnte der Transfer von 10^6 regulatorischer Lymphozyten die Erkrankung deutlich mildern.¹¹² Beachtenswert erscheint, dass in den beiden Modellen deutlich mehr regulatorische T-Lymphozyten transferiert worden sind als in unseren Versuchen. Da die entzündliche Reaktion und Ang II-bedingter Endorganschaden ein generalisiertes Phänomen darstellen und nicht wie die oben genannten renalen Erkrankungen auf ein Organsystem begrenzt sind, reichten möglicherweise die in unseren Versuchen transferierten regulatorischen T-Lymphozyten nicht aus, um sowohl die renale als auch kardiale Entzündungsreaktion zu unterdrücken. Diese Hypothese würde insbesondere dann an Wichtigkeit gewinnen, wenn transferierte regulatorische T-Lymphozyten in der Niere lokalisiert wären und somit ihre immunsuppressive Wirkung lokal ausüben würden. In diesem Fall würde die Anzahl der transferierten regulatorischen T-Lymphozyten nicht ausreichen, um mehrere Entzündungsherde gleichzeitig abzudecken.

Eine weitere Hypothese zur unterschiedlichen Ausprägung der positiven Wirkung regulatorischer Lymphozyten in der Niere und im Herzen liegt in der unterschiedlichen Ausprägung der Entzündung. Entzündliche zelluläre Infiltrate sind in der Niere deutlich ausgeprägter als im Herzen. Eventuell hat das stark entzündliche Milieu in der Niere einen negativen Effekt auf die transferierten regulatorischen T-Lymphozyten, so dass ihre immunsuppressiven Eigenschaften nicht ausreichen, ausgeprägte renale Entzündung zu unterdrücken. Dies wird im folgenden Abschnitt näher erörtert.

Regulatorische T-Lymphozyten, so wie auch CD4+CD25- Lymphozyten, exprimieren das Oberflächenmolekül CD28 das in der T-Zell-Aktivierung ein unerlässliches kostimulatorisches Signal darstellt. Bei den naiven CD4+25- Lymphozyten steigert die Signaltransduktion über CD28 die Produktion von Interleukin-2 und induziert Zellproliferation, während bei den regulatorischen T-Lymphozyten die Zugabe der anti-CD28-Antikörper die suppressive Wirkung der regulatorischen T-Lymphozyten auf die Proliferation und Interleukin-2-Produktion der Effektor-T-Lymphozyten aufhebt.^{142, 144} Daraus folgt, dass Signaltransduktion über CD28 synergistisch durch die Stimulation der Effektor-T-Lymphozyten und Abschwächung des suppressiven Potentials der regulatorischen T-Lymphozyten insgesamt die Immunantwort verstärkt. Dieser Mechanismus wird in Rahmen einer Infektion aktiviert. Die Expression der CD28-Liganden CD80 und CD86 an den antigenpräsentierenden Zellen steigt im Rahmen einer Infektion an und führt zur gesteigerten Bindung an CD28.¹⁸² Obwohl es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten Mausmodell nicht um eine infektiöse Erkrankung handelt, könnte die abgeschwächte Wirkung regulatorischer

Lymphozyten in der Niere mit ihren, durch das lokale Milieu abgeschwächten immunsuppressiven Eigenschaften zusammenhängen.

5.5. Einfluss einer Angiotensin II-Behandlung auf den Lymphozytenphänotyp

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, weisen mehrere Studien der letzten Jahre darauf hin, dass Ang II einen direkten Einfluss auf das Immunsystem hat. Nataraj et al. zeigten, dass alleinige Stimulation mit Ang II ausreichend ist, um Proliferation der Splenozyten hervorzurufen und dass sich dieser Effekt mittels ACE-Hemmer und AT1-Rezeptor-Antagonisten hemmen lässt.⁸⁹ Shao et al. zeigten, dass aus hypertensiven, mit Ang II-behandelten Ratten isolierte T-Lymphozyten mehr Interferon- γ und weniger Interleukin-4 sezernieren als T-Lymphozyten die aus unbehandelten Ratten isoliert wurden. Das bedeutet, dass Ang II das T_H1/T_H2 -Gleichgewicht zugunsten der T_H1 -Immunantwort verschieben kann.⁹⁰ In einer vor kurzem publizierten Studie zeigten Guzik et al., dass der Anteil der CD44+, CCR5+ und CD69+ Zellen unter CD4+ Lymphozyten in den Mäusen die mit Ang II behandelt wurden höher war als bei den unbehandelten Mäusen. Da es sich bei CD44, CCR5 und CD69 um Aktivierungsmarker für Lymphozyten handelt, spricht ihr erhöhter Anteil dafür, dass Ang II das Immunsystem aktivieren kann und somit den hypertensiven, bzw. Ang II-induzierten Endorganschaden verstärken kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls CD4+ Lymphozyten aus den Ang II-behandelten und unbehandelten Mäusen auf die Expression von CD44, CD62L sowie CD69 untersucht. Der Anteil der CD4+ Lymphozyten die CD44^{high} und CD62L^{low} waren, d.h. einen Effektor-Gedächtnis-Phänotyp aufwiesen, war bei den Ang II-behandelten Tieren höher als bei den unbehandelten Tieren. Dieses Ergebnis ist mit den Ergebnissen von Guzik et al. vergleichbar und spricht für eine Ang II-bedingte Aktivierung des Immunsystems.¹⁸³

5.6. Die Mechanismen der Verbesserung des Angiotensin II-bedingten Endorganschadens

Unvermeidlich stellt sich die Frage nach der Lokalisation und dem hier wirksamen Mechanismus der positiven Wirkung der regulatorischen T-Lymphozyten auf den Ang II-bedingten Endorganschaden. Versuche mit dem Transfer regulatorischer T-Lymphozyten in verschiedenen Modellen der autoimmunen Erkrankungen liefern reichlich Informationen über ihre Bewegungsmuster nach dem Transfer. So konnten in einer der ersten Arbeiten über den positiven Einfluss der regulatorischen T-Lymphozyten auf die experimentelle autoimmune

Enzephalomyelitis Kohm et al. keine transferierten regulatorischen T-Lymphozyten weder im Gehirn noch im Rückenmark der erkrankten Tiere nachweisen, obwohl diese die primär betroffenen Organe waren. Allerdings konnten sie regulatorische T-Lymphozyten in den peripheren Lymphknoten nachgewiesen.¹⁵⁴ Im Gegensatz dazu konnten McGeachy et al. Akkumulation der natürlichen regulatorischen T-Lymphozyten in zentralen Nervensystem der an der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis erkrankten Mäuse detektieren.¹⁸⁴ Im Mausmodell der rheumatoiden Arthritis wurden die transferierten regulatorischen T-Lymphozyten nicht nur in der Milz und peripheren Lymphknoten gefunden, sondern auch im entzündeten Synovialgewebe und Synovialflüssigkeit.¹⁵⁵ Im Mausmodell der autoimmunen Kolitis wurde die Lamina propria der Darmschleimhaut als der zentrale Ort der immunsuppressiven Effekte der regulatorischen T-Lymphozyten charakterisiert.¹⁸⁵ In zwei weiteren Arbeiten wurde die Lokalisation der Treg nach Transfer in zwei unterschiedlichen Nierenerkrankungen beschrieben. Mahajan et al. konnten im Mausmodell der Makrophagen-induzierten Nierenschädigung, in der Adriamycin-Nephropathie, neue Foxp3-Expression in der Niere nach dem Transfer der Treg zeigen.¹¹² Im Mausmodell der anti-glomerulären Basalmembran Glomerulonephritis konnten nach dem Transfer keine Treg in der Niere, sondern nur in der Milz und in den peripheren Lymphknoten nachgewiesen werden.¹⁸¹

Zu diesem Zeitpunkt liegen uns keine Informationen über die Verteilung der regulatorischen T-Lymphozyten in nach ihrem Transfer in unserem Tiermodell vor. CFDA-markierte, transferierte Treg konnten am Ende des Versuchs, d.h. zwei Wochen nach dem Transfer, weder in der Niere noch in der Milz detektiert werden. Weitere Organe, wie z.B. das Herz oder die Lymphknoten wurden bisher nicht untersucht.

Die Mechanismen der Immunsuppression durch die regulatorischen T-Lymphozyten sind nicht gänzlich geklärt und werden grob in Zellkontakt-vermittelte und Zytokin-vermittelte Mechanismen unterteilt. Thornton und Shevach lieferten bereits 1998 einen der wichtigsten Hinweise auf Zellkontakt-vermittelten Mechanismus der Immunsuppression. Trennung der regulatorischen T Zellen von den zu supprimierenden CD4+ Lymphozyten durch eine semi-permeable Membran hebt die Suppression auf. Im Gegensatz zu den *in vitro* Versuchen stehen die Ergebnisse der *in vivo* Versuche, die zeigen, dass bestimmte Zytokine für die Suppression unentbehrlich sind. Annacker et al. zeigten, dass regulatorische T-Lymphozyten, isoliert aus einer Interleukin-10-*knock out*-Maus, nicht in der Lage sind, eine experimentelle Kolitis zu verhindern.¹⁵⁰ Huber et al. zeigten, dass regulatorische T-Lymphozyten, isoliert aus einer TGF- β -*knock out*-Maus, nicht in der Lage sind, eine Kolitis zu verhindern.¹⁵²

Ob regulatorische T-Lymphozyten in unserem Modell die gezeigten Effekte mittels Sekretion verschiedener Zytokine oder mittels direkten Zellkontakts vollbringen ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Eine der Möglichkeiten diese Frage zu erläutern liegt im Transfer regulatorischer T-Lymphozyten die entweder kein Interleukin-10 oder TGF- β sezernieren können, bzw. an Zellkontakt-vermittelter Immunsuppression beteiligte Moleküle, wie z.B. CTLA-4 oder LAG-3, nicht exprimieren.

5.7. Funktionelle Bedeutung der reduzierten kardialen Hypertrophie und Fibrose bei Ang II + Treg-behandelten Tieren

Wie bereits erwähnt, stellt die hypertensive kardiale Hypertrophie im Gegensatz zu der physiologischen kardialen Hypertrophie einen wichtigen Risikofaktor für die Entstehung der ventrikulären Arrhythmien und der Herzinsuffizienz dar.^{160,163} Um zu überprüfen, ob die 30%ige Reduktion der Ang II-induzierten kardialen Hypertrophie unter der Behandlung mit regulatorischen T-Lymphozyten eine funktionelle Bedeutung bezüglich der Auslösbarkeit der Arrhythmien hat, wurde exemplarisch an einigen Tieren elektrophysiologischen Untersuchungen durchgeführt. Diese zeigte bei den Ang II-behandelten Tieren eine Verkürzung der ventrikulären Refraktärzeit und im Gegensatz dazu eine im Normbereich liegende ventrikuläre Refraktärzeit bei den Ang II + Treg-behandelten Tieren. Eine verkürzte ventrikuläre Refraktärzeit kann, so wie auch eine übermäßige Verlängerung der ventrikulären Refraktärzeit, zur gesteigerten Auslösbarkeit der ventrikulären Arrhythmien führen. Dies bestätigte sich in der elektrophysiologischen Untersuchung. Bei den Ang II-behandelten Tieren wurden mittels programmierter elektrischer Stimulation mehrere und länger andauernde ventrikuläre Tachykardien ausgelöst als bei den Ang II + Treg-behandelten Tieren. Dies spricht dafür, dass die Reduktion der kardialen Hypertrophie und Fibrose bei den Ang II + Treg-behandelten Tieren eine funktionale Bedeutung hat. Diese Ergebnisse entsprechen den tierexperimentellen Daten in denen gezeigt wurde, dass die Regression der kardialen Hypertrophie mit einem Rückgang der elektrophysiologischen Veränderungen einhergeht. Rials et al. zeigten, dass die Therapie mit ACE-Hemmer Captopril zur Regression der linksventrikulären Hypertrophie bei Kaninchen mit induziertem renovaskulären Hypertonus führt und gleichzeitig pathologische elektrophysiologische Eigenschaften des Myokards aufhebt.⁴⁸ Dass es sich hier nicht um einen spezifischen Effekt des ACE-Hemmers handelt zeigten Rials et al. bereits in einer früheren Arbeit. Nachdem bei Katzen mittels Induktion der Aortenstenose eine Druck-bedingte kardiale Hypertrophie herbeigeführt wurde,

wurde die Aortenstenose aufgehoben, um eine spontane Regression der kardialen Hypertrophie zu erlauben. Die Tiere bei denen es zur solchen spontanen Regression gekommen ist, wiesen im Vergleich zu den Tieren bei denen die kardiale Hypertrophie bestehen blieb eine komplette Normalisierung der elektrophysiologischen Eigenschaften des Myokards auf.⁴⁷ Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in den klinischen Studien. Captopril führte in einer kleinen randomisierten Studie zur Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie sowie Reduktion der ventrikulären Ektopie. In einer weiteren Studie wurden linksventrikuläre Hypertrophie und ventrikuläre Ektopie mittels Enalapril (ACE-Hemmer), Atenolol (β -Blocker) und Verapamil (Ca-Kanalblocker), nicht aber mittels Hydrochlorothiazid (Diuretikum) gesenkt. Eine post-hoc-Analyse der LIFE-Studie unterstützt die genannten Ergebnisse und erweitert den Vorteil einer Regression der linksventrikulären Hypertrophie auf die Reduktion des plötzlichen Herztodes. Mehr als 9000 Patienten mit arterieller Hypertonie und kardialen Hypertrophie wurden mit Atenolol (ein β -Blocker) oder Losartan (ein AT1-Rezeptor-Antagonist) behandelt. Eine Reduktion der kardialen Hypertrophie hat unabhängig von der Art der Behandlung und der Senkung des Blutdrucks das Risiko eines plötzlichen Herztodes reduziert.¹⁸⁶ Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Reduktion der kardialen Hypertrophie durch den Einsatz regulatorischer Lymphozyten einen positiven Effekt auf elektrophysiologischen Eigenschaften des Myokards hat und dass diese, vergleichbar mit den oben genannten Daten, mit einer Reduktion der kardialen Hypertrophie einhergehen.

5.8. Expression der microRNA im Angiotensin II-bedingten kardialen Schaden und ihre Beeinflussung durch den Transfer regulatorischer T-Lymphozyten

Die Anpassung einer Zelle an die aktuellen Anforderungen beinhaltet komplexe Veränderungen in der Expression vieler verschiedener Gene und somit unterschiedlicher Proteine. Vor kurzem wurde ein neuartiger Mechanismus der post-transkriptionellen und translationellen Genregulation entdeckt. Es handelt sich hier um kleine, einsträngige, nicht-kodierende RNA-Stückchen, microRNA (MIR) genannt. Sie sind der Regel 22 Nukleotide lang und in der Lage, kodierende mRNA zu degradieren bzw. ihre Translation zu hemmen, und somit die tatsächliche Proteinsynthese der Zelle entscheidend zu beeinflussen.¹⁸⁷ MicroRNA entsteht aus langen primären Transkripten die mittels des Enzyms Drosha im Nukleus und Dicer im Zytoplasma zur reifen, funktionellen microRNA geschnitten werden.^{188, 189} Diese werden in das so genannte *RNA-induced silencing complex* geladen.¹⁹⁰

Der eigentliche Mechanismus der Suppression der Proteinexpression ist weitgehend ungeklärt. In manchen Fällen bleibt die Menge der mRNA unverändert, obwohl die Menge des produzierten Proteins sinkt, in manchen Fällen kommt es zur Degradation der mRNA.¹⁹¹

Es wird angenommen, dass microRNA in der Regulation eines Drittels des gesamten Genoms beteiligt ist. So spielt microRNA auch in der kardiovaskulären Biologie eine wichtige Rolle. MIR-1, das in diesem Versuch sowohl bei den Ang II- als auch bei Ang II + Treg-behandelten Tieren in Vergleich zu den Kontrolltieren vermehrt exprimiert ist, beeinflusst kardiale Embryonalentwicklung, indem sie die Proliferation der kardialen Progenitorzellen hemmt. Ihre Überexpression führt zur vorzeitigen Ausdifferenzierung der Kardiomyozyten und ihr Fehlen in *knock out*-Mäusen zur kardialen Hyperplasie, bzw. Defekten in embryonaler Herzentwicklung. MIR-133-Familie hat entgegengesetzte Eigenschaften und inhibiert die Ausdifferenzierung der Kardiomyozyten. Es wurden bereits mehrere Targetgene für MIR-1 und MIR-133 gefunden. Darunter überwiegen Gene, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. In unserem Versuch war MIR-133 bei den Ang II-behandelten Tieren hochreguliert. Dies steht im Widerspruch zur aktuellen Literatur. Care et al. zeigten vor kurzem, dass MIR-1 und MIR-133 im Mausmodell Druck-bedingter kardialer Hypertrophie vermindert exprimiert sind. Im Myokard der Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie zeigte sich die Expression von MIR-1 und MIR-133 ebenfalls erniedrigt. Eine plausible Erklärung für die Diskrepanz zwischen diesen und unseren Daten gibt es bisher nicht. Laut der rezenten Literaturdurchsicht gibt es bisher keine weiteren Arbeiten, die die Expression der verschiedenen microRNAs in der Ang II-bedingten Herzhypertrophie untersuchten. Eine weitere microRNA, MIR-208 spielt eine interessante Rolle in der Entstehung der kardialen Hypertrophie. Sie wird vom Intron 27 des *α-Myosin heavy chain* kodiert und scheint die Expression des *β-Myosin heavy chain* in Stresssituationen zu regulieren. *Knock out*-Mäuse für MIR-208 entwickeln nach Induktion der Aortenstenose eine mildere kardiale Hypertrophie und Fibrose. In unserem Versuch war die Expression vom MIR-208 sowohl bei den Ang II-behandelten als auch bei den Ang II + Treg-behandelten Mäusen vermehrt exprimiert, während es in den Mäusen mit Druck-bedingter Hypertrophie parallel zur Abnahme der Expression von *α-Myosin heavy chain* ebenfalls zum Abfall der Expression der pre-MIR-208 kommt, während die Konzentration der reifen MIR-208 aufgrund ihrer sehr guten Stabilität unverändert bleibt. Eines der Targetgene für MIR-208 ist *thyroid hormone receptor (TR)-associated protein 1* (THRAP1), das das Gleichgewicht zwischen *α-Myosin heavy chain* und *β-Myosin heavy chain* zugunsten von *β-Myosin heavy chain* verschiebt.¹⁹² Die Bedeutung der erhöhten Expression von MIR-208 in unseren Ang II-behandelten Tieren bleibt unklar.

Die Bedeutung dieser, zum Teil der aktuellen Datenlage bezüglich der Druck-bedingten kardialen Hypertrophie widersprüchlichen Ergebnisse, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt. Bei der Fülle der Daten über die Rolle der microRNAs in der Druck-bedingten kardialen Hypertrophie ist es anzunehmen, dass sie in der Ang II-bedingten Hypertrophie eine Rolle spielen. Ob unterschiedliche Regulation von MIR-1, 133 und 208 in diesen zwei Formen der kardialen Hypertrophie tatsächlich unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen widerspiegeln, bleibt zu klären.

5.9. Klinische Anwendungen von regulatorischen T-Lymphozyten

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde der therapeutische Effekt der regulatorischen T-Lymphozyten in einigen Mausmodellen mit autoimmunen Erkrankungen sowie bei Transplantatabstoßung und Graft-versus-Host-Reaktion gezeigt. Neben den quantitativen und qualitativen Defekten der regulatorischen T-Lymphozyten in autoimmunen Erkrankungen bei Menschen, zeigte sich bei humaner Nieren-, Leber- und Lungentransplantation eine deutliche positive Korrelation zwischen der Zahl der zirkulierenden regulatorischen T-Lymphozyten und dem Überleben des transplantierten Organs. Vergleichbare Untersuchungen bezüglich der Graft-versus-Host-Reaktion nach der Transplantation der hämatopoetischen Stammzellen lieferten zum Teil gegensätzliche Befunde, allerdings konnte hier ebenfalls eine positive Korrelation zwischen der Zahl der zirkulierenden regulatorischen T-Lymphozyten und dem Nichtauftreten der Graft-versus-Host-Reaktion gezeigt werden. Im folgenden Abschnitt werden die ersten klinischen Studien in denen regulatorische T-Lymphozyten transferiert werden dargestellt. M. Edinger (Regensburg) leitet eine Studie in der Patienten mit malignen Erkrankungen nach der allogenen Transplantation der hämatopoetischen Stammzellen zusätzlich zur immunsuppressiven Behandlung sowie Donor-Lymphozyten auch natürliche, nicht-manipulierte, aus dem Donoren-Blut isolierte regulatorischen Lymphozyten verabreicht bekommen. In einer weiteren Studie, geleitet von B. Balzar (Minneapolis, USA) werden mittels anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper sowie mittels Interleukin-2 expandierte regulatorische Donoren-T-Lymphozyten gleichzeitig mit der Transplantation der hämatopoetischen Stammzellen transferiert. In Mailand, Italien, leitet M.-G. Roncarolo eine weitere Studie in der regulatorische T-Lymphozyten die mit antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers und Interleukin-10 vorbehandelt worden sind in Rahmen der Transplantation der hämatopoetischen Stammzellen den Patienten verabreicht werden. Diese Studien leisten zusätzlich zu ihren eventuellen positiven Effekt auf die Graft-versus-Host-Reaktion einen

wichtigen Beitrag zum Verständnis der Physiologie der regulatorischen T-Lymphozyten nach dem Transfer. Somit ebnet sie den Weg zur Verwendung der regulatorischen T-Lymphozyten in weiteren, im Tiermodell bereits erforschten, Erkrankungen.¹⁹³

5.10. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit betonen die Rolle des Gleichgewichts zwischen pro- und antiinflammatorischen Stimuli in der Entstehung der Ang II-bedingten kardialen Hypertrophie. Ein weiteres Modell der kardialen Hypertrophie ist die Druck-bedingte kardiale Hypertrophie. Wie bereits diskutiert, zeigt das hypertrophierte Myokard im Mausmodell mit induzierter Aortenstenose einen ausgesprochen entzündlichen Phänotyp.⁴¹ Ang II-induzierte Signaltransduktion spielt auch in diesem Modell eine Rolle, da die biomechanische Beanspruchung des Myokards zur lokalen Bildung von Ang II führt. Trotzdem würde der Einsatz regulatorischer Lymphozyten im Mausmodell mit induzierter Aortenstenose erlauben, die Hypothese zu überprüfen, ob regulatorische T-Lymphozyten auch in einem anderen Modell der kardialen Hypertrophie diese wirksam reduzieren können, bzw. ob ihr Effekt auf die Ang II-bedingte kardiale Hypertrophie beschränkt ist.

Bei Ang II-bedingter kardialer Hypertrophie handelt es sich um eine pathologische Form der Hypertrophie, im Gegensatz zu der physiologischen kardialen Hypertrophie, wie sie klassischerweise bei Leistungssportlern auftritt. Während physiologische Herzhypertrophie mit keinem erhöhten Risiko für höhergradige Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz einhergeht stellt die kardiale Hypertrophie auf dem Boden einer hypertensiven Erkrankung einen der häufigsten Gründe der Herzinsuffizienz dar.¹⁶⁰ Mit einer Prävalenz von ca. 7% in der Altersgruppe der 80- bis 89-jährigen stellt Herzinsuffizienz ein ernstzunehmendes Problem dar, insbesondere bei der zunehmend alternden Bevölkerung.¹⁹⁴ Die ischämische Kardiomyopathie bei koronarer Herzerkrankung mit oder ohne vorausgegangenem Myokardinfarkt ist aber die häufigste Ursache der Herzinsuffizienz.¹⁹⁵ Revaskularisation und umfangreiche medikamentöse Therapie stellen den Standard in der Behandlung der koronaren Herzerkrankung und der ischämischen Kardiomyopathie dar. Sowohl zeitbegrenzte als auch anhaltende Unterbrechung des koronaren Blutflusses führt zu einer ausgeprägten entzündlichen Reaktion des Myokards.¹⁹⁶ Das Ausmaß der Entzündung und der Aktivierung der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr beeinflusst das Gleichgewicht zwischen weiterer Schädigung des Herzmuskels und der Induktion der Reparaturprozesse. Eine breite, unspezifische antiinflammatorische und immunsuppressive Therapie mit Prednisolon führte zur

gesteigerten Rate der Myokardruptur nach Infarkt.¹⁹⁷ Andererseits können bestimmte anti-inflammatorisch wirkende Interleukine zur Heilung mit beitragen. Zu diesen gehört unter anderem Interleukin-10, das im reperfundierten Myokard von infiltrierten T-Lymphozyten freigesetzt wird.¹⁹⁸ Die regulatorischen T-Lymphozyten bieten wegen des günstigen Zytokin-Expressionsprofils eine interessante Möglichkeit der günstigen Beeinflussung der post-ischämischen myokardialen Reparaturmechanismen. Potenzielle klinische Relevanz wird durch rezente Veröffentlichungen betont. Sardella et al. zeigten einen Abfall der peripheren regulatorischen T-Lymphozyten bei Patienten mit einem akuten Hebungsinfarkt.¹⁹⁹ Eine Normalisierung der Anzahl der peripheren regulatorischen T-Lymphozyten 48h nach erfolgter koronarer Revaskularisierung impliziert Kompartimentalisierung der regulatorischen T-Lymphozyten im ischämischen Myokard in der Akutphase. Zum jetzigen Zeitpunkt liegen keine Daten der tierexperimentellen Studien vor, in denen regulatorische Lymphozyten in kardialer Ischämie, bzw. Reperfusion eingesetzt worden sind. Angesichts der Rolle der Inflammation, bzw. des Immunsystems in diesem Krankheitsbild stellt der Einsatz regulatorischer Lymphozyten einen interessanten Ausblick dar.

6. Zusammenfassung

Die Arterielle Hypertonie und ihre Folgeschäden stellen aufgrund ihrer hohen Prävalenz in der industrialisierten Gesellschaft ein bedeutsames gesundheitspolitisches Problem dar. Bei den hypertensiven Endorganschäden handelt es sich zumindest zum Teil um einen inflammatorischen und immunologischen Prozess. Ausführliche tierexperimentelle Arbeiten belegen den positiven Einfluss einer antiinflammatorischen und immunsuppressiven Behandlung auf den renalen und kardialen Angiotensin (Ang) II-bedingten Endorganschaden. Regulatorische T-Lymphozyten (CD4+CD25+) stellen eine natürlich vorkommende Zellpopulation dar, deren wichtigste Aufgabe in der Suppression der Autoimmunität liegt. Das Ziel dieser Arbeit war das Überprüfen der Hypothese, dass regulatorische T-Lymphozyten aufgrund ihrer immunsuppressiven Eigenschaften den Ang II-bedingten Endorganschaden verbessern.

Um diese Fragestellung zu beantworten wurde mittels Dauerinfusion mit Ang II bei den Mäusen des NMRI-Stammes eine arterielle Hypertonie induziert. Mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung wurden aus den Milzen und Lymphknoten der Spendermäuse regulatorische T-Lymphozyten isoliert und einer Gruppe der Ang II-behandelten Tieren transferiert. Während der zweiwöchigen Versuchsdauer wurden die kardiale Funktion mittels Echokardiografie und die renale Funktion mittels Albuminurie-Messung erfasst. Am Ende des Versuchs wurden die Tiere getötet und der hypertensive Endorganschaden untersucht. Eine Dauerinfusion mit Ang II führte zur arteriellen Hypertonie die von dem Transfer regulatorischer Lymphozyten nicht beeinflusst war. Transfer regulatorischer Lymphozyten verbesserte Ang II-bedingte kardiale Hypertrophie. Ang II + Treg-behandelte Tiere wiesen im Vergleich mit Ang II-behandelten Tieren eine Reduktion des Herzhypertrophie-Indexes um 30% auf. Dazu passend war die kardiale Expression des Herzhypertrophie-Markers *brain natriuretic peptid* (BNP) bei Ang II + Treg-behandelten Tieren signifikant reduziert. Pathohistologisch zeigte sich eine signifikante Reduktion der kardialen Fibrose. In einer elektrophysiologischen Untersuchung wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften des Myokards erfasst. Während Ang II-behandelten Tiere einen Trend zur Reduktion der ventrikulären Refraktärzeit aufwiesen war diese bei den Ang II + Treg-behandelten Tieren im Normalbereich. Des Weiteren konnten bei Ang II + Treg-behandelten Tieren weniger ventrikuläre Tachykardien ausgelöst werden als bei den lediglich mit Ang II behandelten Tieren. Regulatorische T-Lymphozyten hatten einen weniger ausgeprägten Einfluss auf renalen Ang II-induzierten Schaden. Während sich in der Ang II-bedingten Albuminurie kein

signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigte, wurde eine signifikante Besserung der renalen Pathologie mit dem Transfer der regulatorischen T-Lymphozyten gesehen. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Transfer regulatorischer Lymphozyten kardiale Ang II-bedingte Hypertrophie und Fibrose verbessert und dass dieser Effekt funktionell bedeutsam ist, wie in der elektrophysiologischen Untersuchung gezeigt wurde. Ein genaues Erforschen der pro- und antiinflammatorischen Mechanismen in kardialer Hypertrophie führt zum besseren Verständnis der Pathophysiologie und in weiterer Folge zu eventuellen neuen Therapieansätzen.

7. Literaturverzeichnis

1. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *Jama*. May 21 2003;289(19):2560-2572.
2. Fields LE, Burt VL, Cutler JA, et al. The burden of adult hypertension in the United States 1999 to 2000: a rising tide. *Hypertension*. Oct 2004;44(4):398-404.
3. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, et al. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. Dec 14 2002;360(9349):1903-1913.
4. Wilson PW. Established risk factors and coronary artery disease: the Framingham Study. *Am J Hypertens*. Jul 1994;7(7 Pt 2):7S-12S.
5. Thrift AG, McNeil JJ, Forbes A, et al. Risk factors for cerebral hemorrhage in the era of well-controlled hypertension. Melbourne Risk Factor Study (MERFS) Group. *Stroke*. Nov 1996;27(11):2020-2025.
6. Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. Jul 25 2000;102(4):470-479.
7. Hsu CY, McCulloch CE, Darbinian J, et al. Elevated blood pressure and risk of end-stage renal disease in subjects without baseline kidney disease. *Arch Intern Med*. Apr 25 2005;165(8):923-928.
8. Bader M, Zhao Y, Sander M, et al. Role of tissue renin in the pathophysiology of hypertension in TGR(mREN2)27 rats. *Hypertension*. Jun 1992;19(6 Pt 2):681-686.
9. Julius S, Krause L, Schork NJ, et al. Hyperkinetic borderline hypertension in Tecumseh, Michigan. *J Hypertens*. Jan 1991;9(1):77-84.
10. Kupper N, Willemsen G, Riese H, et al. Heritability of daytime ambulatory blood pressure in an extended twin design. *Hypertension*. Jan 2005;45(1):80-85.
11. Hoy WE, Hughson MD, Bertram JF, et al. Nephron number, hypertension, renal disease, and renal failure. *J Am Soc Nephrol*. Sep 2005;16(9):2557-2564.
12. Adroge HJ, Madias NE. Sodium and potassium in the pathogenesis of hypertension. *N Engl J Med*. May 10 2007;356(19):1966-1978.
13. Stranges S, Wu T, Dorn JM, et al. Relationship of alcohol drinking pattern to risk of hypertension: a population-based study. *Hypertension*. Dec 2004;44(6):813-819.
14. de Simone G, Devereux RB, Chinali M, et al. Risk factors for arterial hypertension in adults with initial optimal blood pressure: the Strong Heart Study. *Hypertension*. Feb 2006;47(2):162-167.
15. Materson BJ, Preston RA. Angiotensin-converting enzyme inhibitors in hypertension. A dozen years of experience. *Arch Intern Med*. Mar 14 1994;154(5):513-523.
16. Seikaly MG, Arant BS, Jr., Seney FD, Jr. Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J Clin Invest*. Oct 1990;86(4):1352-1357.
17. Bernstein KE, Xiao HD, Adams JW, et al. Establishing the role of angiotensin-converting enzyme in renal function and blood pressure control through the analysis of genetically modified mice. *J Am Soc Nephrol*. Mar 2005;16(3):583-591.
18. Bohlender J, Fukamizu A, Lippoldt A, et al. High human renin hypertension in transgenic rats. *Hypertension*. Jan 1997;29(1 Pt 2):428-434.
19. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Aug 2006;7(8):589-600.
20. Brancaccio M, Fratta L, Notte A, et al. Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nat Med*. Jan 2003;9(1):68-75.

21. Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, et al. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell*. Dec 27 2002;111(7):943-955.
22. Zou Y, Akazawa H, Qin Y, et al. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol*. Jun 2004;6(6):499-506.
23. Freund C, Schmidt-Ullrich R, Baurand A, et al. Requirement of nuclear factor-kappaB in angiotensin II- and isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in vivo. *Circulation*. May 10 2005;111(18):2319-2325.
24. Wang Y, Su B, Sah VP, et al. Cardiac hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase kinase 7, a specific activator for c-Jun NH2-terminal kinase in ventricular muscle cells. *J Biol Chem*. Mar 6 1998;273(10):5423-5426.
25. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 28 2006;103(48):18255-18260.
26. Mazzolai L, Nussberger J, Aubert JF, et al. Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. *Hypertension*. Jun 1998;31(6):1324-1330.
27. Lindpaintner K, Ganten D. The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ Res*. Apr 1991;68(4):905-921.
28. Baker KM, Aceto JF. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am J Physiol*. Aug 1990;259(2 Pt 2):H610-618.
29. Dzau VJ. Tissue renin-angiotensin system in myocardial hypertrophy and failure. *Arch Intern Med*. Apr 26 1993;153(8):937-942.
30. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, et al. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*. Dec 3 1993;75(5):977-984.
31. Linz W, Scholkens BA, Ganten D. Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin Exp Hypertens A*. 1989;11(7):1325-1350.
32. Schultz Jel J, Witt SA, Glascock BJ, et al. TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin Invest*. Mar 2002;109(6):787-796.
33. Pellieux C, Foletti A, Peduto G, et al. Dilated cardiomyopathy and impaired cardiac hypertrophic response to angiotensin II in mice lacking FGF-2. *J Clin Invest*. Dec 2001;108(12):1843-1851.
34. Tanaka M, Fujiwara H, Onodera T, et al. Quantitative analysis of myocardial fibrosis in normals, hypertensive hearts, and hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J*. Jun 1986;55(6):575-581.
35. Ciulla M, Paliotti R, Hess DB, et al. Echocardiographic patterns of myocardial fibrosis in hypertensive patients: endomyocardial biopsy versus ultrasonic tissue characterization. *J Am Soc Echocardiogr*. Jul-Aug 1997;10(6):657-664.
36. Mammarella A, Paradiso M, Basili S, et al. Morphologic left ventricular patterns and prevalence of high-grade ventricular arrhythmias in the normotensive and hypertensive elderly. *Adv Ther*. Sep-Oct 2000;17(5):222-229.
37. Bouzeghrane F, Thibault G. Is angiotensin II a proliferative factor of cardiac fibroblasts? *Cardiovasc Res*. Feb 1 2002;53(2):304-312.
38. Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res*. Dec 13 2002;91(12):1103-1113.

39. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. Sep 2 1999;341(10):709-717.
40. Zannad F, Alla F, Douset B, et al. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation*. Nov 28 2000;102(22):2700-2706.
41. Sun M, Chen M, Dawood F, et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state. *Circulation*. Mar 20 2007;115(11):1398-1407.
42. Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, et al. NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension*. Jan 2000;35(1 Pt 2):193-201.
43. Muller DN, Heissmeyer V, Dechend R, et al. Aspirin inhibits NF-kappaB and protects from angiotensin II-induced organ damage. *Faseb J*. Aug 2001;15(10):1822-1824.
44. Muller DN, Mervaala EM, Schmidt F, et al. Effect of bosentan on NF-kappaB, inflammation, and tissue factor in angiotensin II-induced end-organ damage. *Hypertension*. Aug 2000;36(2):282-290.
45. Yu Q, Horak K, Larson DF. Role of T lymphocytes in hypertension-induced cardiac extracellular matrix remodeling. *Hypertension*. Jul 2006;48(1):98-104.
46. Volders PG, Sipido KR, Vos MA, et al. Cellular basis of biventricular hypertrophy and arrhythmogenesis in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsade de pointes. *Circulation*. Sep 15 1998;98(11):1136-1147.
47. Rials SJ, Wu Y, Ford N, et al. Effect of left ventricular hypertrophy and its regression on ventricular electrophysiology and vulnerability to inducible arrhythmia in the feline heart. *Circulation*. Jan 15 1995;91(2):426-430.
48. Rials SJ, Wu Y, Xu X, et al. Regression of left ventricular hypertrophy with captopril restores normal ventricular action potential duration, dispersion of refractoriness, and vulnerability to inducible ventricular fibrillation. *Circulation*. Aug 19 1997;96(4):1330-1336.
49. Wu JH, Hagaman J, Kim S, et al. Aortic constriction exacerbates atherosclerosis and induces cardiac dysfunction in mice lacking apolipoprotein E. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Mar 1 2002;22(3):469-475.
50. Weiss D, Kools JJ, Taylor WR. Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation*. Jan 23 2001;103(3):448-454.
51. Hayek T, Attias J, Coleman R, et al. The angiotensin-converting enzyme inhibitor, fosinopril, and the angiotensin II receptor antagonist, losartan, inhibit LDL oxidation and attenuate atherosclerosis independent of lowering blood pressure in apolipoprotein E deficient mice. *Cardiovasc Res*. Dec 1999;44(3):579-587.
52. Chien S, Li S, Shyy YJ. Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension*. Jan 1998;31(1 Pt 2):162-169.
53. Tulis DA, Unthank JL, Prewitt RL. Flow-induced arterial remodeling in rat mesenteric vasculature. *Am J Physiol*. Mar 1998;274(3 Pt 2):H874-882.
54. Suzuki H, DeLano FA, Parks DA, et al. Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 14 1998;95(8):4754-4759.
55. Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. Upregulation of vascular endothelial growth factor by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. Feb 4 1998;1401(2):187-194.

56. Gimbrone MA, Jr., Alexander RW. Angiotensin II stimulation of prostaglandin production in cultured human vascular endothelium. *Science*. Jul 18 1975;189(4198):219-220.
57. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, et al. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*. Feb 4 1997;95(3):588-593.
58. Luft FC, Mervaala E, Muller DN, et al. Hypertension-induced end-organ damage : A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension*. Jan 1999;33(1 Pt 2):212-218.
59. Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, et al. Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. Apr 10 1998;273(15):8890-8896.
60. Weber H, Taylor DS, Molloy CJ. Angiotensin II induces delayed mitogenesis and cellular proliferation in rat aortic smooth muscle cells. Correlation with the expression of specific endogenous growth factors and reversal by suramin. *J Clin Invest*. Feb 1994;93(2):788-798.
61. Kato H, Suzuki H, Tajima S, et al. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. Jan 1991;9(1):17-22.
62. Bigazzi R, Bianchi S, Baldari D, et al. Microalbuminuria predicts cardiovascular events and renal insufficiency in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. Sep 1998;16(9):1325-1333.
63. Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, et al. Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N Engl J Med*. Jan 4 1996;334(1):13-18.
64. Truong LD, Farhood A, Tasby J, et al. Experimental chronic renal ischemia: morphologic and immunologic studies. *Kidney Int*. Jun 1992;41(6):1676-1689.
65. Zucchelli P, Zuccala A. Primary hypertension--how does it cause renal failure? *Nephrol Dial Transplant*. 1994;9(3):223-225.
66. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. Mar 2000;52(1):11-34.
67. Kwoh C, Shannon MB, Miner JH, et al. Pathogenesis of nonimmune glomerulopathies. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:349-374.
68. Mezzano S, Aros C, Droguett A, et al. NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. Oct 2004;19(10):2505-2512.
69. Miller PL, Rennke HG, Meyer TW. Glomerular hypertrophy accelerates hypertensive glomerular injury in rats. *Am J Physiol*. Sep 1991;261(3 Pt 2):F459-465.
70. Border WA, Noble NA. Evidence that TGF-beta should be a therapeutic target in diabetic nephropathy. *Kidney Int*. Oct 1998;54(4):1390-1391.
71. Ruperez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, et al. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation*. Sep 23 2003;108(12):1499-1505.
72. Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Esteban V, et al. Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. *Circulation*. May 17 2005;111(19):2509-2517.
73. Yamakawa T, Tanaka S, Numaguchi K, et al. Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. Jan 2000;35(1 Pt 2):313-318.
74. Kagami S, Kuhara T, Okada K, et al. Dual effects of angiotensin II on the plasminogen/plasmin system in rat mesangial cells. *Kidney Int*. Mar 1997;51(3):664-671.

75. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Gomez-Guerrero C, et al. Angiotensin II, the immune system and renal diseases: another road for RAS? *Nephrol Dial Transplant*. Aug 2003;18(8):1423-1426.
76. Pitt B, Reichek N, Willenbrock R, et al. Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: the 4E-left ventricular hypertrophy study. *Circulation*. Oct 14 2003;108(15):1831-1838.
77. Hartner A, Cordasic N, Klanke B, et al. Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice. *Nephrol Dial Transplant*. Oct 2003;18(10):1999-2004.
78. Nishiyama A, Yao L, Nagai Y, et al. Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension*. Apr 2004;43(4):841-848.
79. Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, et al. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int*. May 2003;63(5):1791-1800.
80. Mervaala E, Muller DN, Park JK, et al. Cyclosporin A protects against angiotensin II-induced end-organ damage in double transgenic rats harboring human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension*. Jan 2000;35(1 Pt 2):360-366.
81. Muller DN, Shagdarsuren E, Park JK, et al. Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II-induced renal damage. *Am J Pathol*. Nov 2002;161(5):1679-1693.
82. Dagenais NJ, Jamali F. Protective effects of angiotensin II interruption: evidence for antiinflammatory actions. *Pharmacotherapy*. Sep 2005;25(9):1213-1229.
83. Amuchastegui SC, Azzollini N, Mister M, et al. Chronic allograft nephropathy in the rat is improved by angiotensin II receptor blockade but not by calcium channel antagonism. *J Am Soc Nephrol*. Oct 1998;9(10):1948-1955.
84. Furukawa Y, Matsumori A, Hirozane T, et al. Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 reduces graft coronary artery disease and preserves graft status in a murine model. A comparative study with captopril. *Circulation*. Jan 15 1996;93(2):333-339.
85. Godsel LM, Leon JS, Wang K, et al. Captopril prevents experimental autoimmune myocarditis. *J Immunol*. Jul 1 2003;171(1):346-352.
86. Constantinescu CS, Ventura E, Hilliard B, et al. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. Aug 1995;17(3):471-491.
87. Hisada Y, Sugaya T, Yamanouchi M, et al. Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. *J Clin Invest*. Mar 1999;103(5):627-635.
88. Martin MF, Surrall KE, McKenna F, et al. Captopril: a new treatment for rheumatoid arthritis? *Lancet*. Jun 16 1984;1(8390):1325-1328.
89. Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, et al. Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *J Clin Invest*. Dec 1999;104(12):1693-1701.
90. Shao J, Nangaku M, Miyata T, et al. Imbalance of T-cell subsets in angiotensin II-infused hypertensive rats with kidney injury. *Hypertension*. Jul 2003;42(1):31-38.
91. Mazzolai L, Duchosal MA, Korber M, et al. Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE^{-/-} mice. *Hypertension*. Sep 2004;44(3):277-282.
92. Gomez RA, Norling LL, Wilfong N, et al. Leukocytes synthesize angiotensinogen. *Hypertension*. Apr 1993;21(4):470-475.
93. Jurewicz M, McDermott DH, Sechler JM, 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*. Apr 2007;18(4):1093-1102.

94. Kappler JW, Roehm N, Murrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*. Apr 24 1987;49(2):273-280.
95. Weigle WO. Analysis of autoimmunity through experimental models of thyroiditis and allergic encephalomyelitis. *Adv Immunol*. 1980;30:159-273.
96. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. Aug 1 1995;155(3):1151-1164.
97. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. Feb 14 2003;299(5609):1057-1061.
98. O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med*. Aug 2004;10(8):801-805.
99. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. May 11 2006;441(7090):235-238.
100. Yamaguchi S, Gray JD, Hashimoto S, et al. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol*. Jun 15 2001;166(12):7282-7289.
101. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. Dec 15 2003;198(12):1875-1886.
102. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, et al. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol*. May 1 2004;172(9):5149-5153.
103. Xu L, Kitani A, Fuss I, et al. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25- Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol*. Jun 1 2007;178(11):6725-6729.
104. Jiang H, Chess L. The specific regulation of immune responses by CD8+ T cells restricted by the MHC class Ib molecule, Qa-1. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:185-216.
105. Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*. Mar 18 2002;195(6):695-704.
106. Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I, et al. Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med*. Nov 1 2004;200(9):1123-1134.
107. Vlad G, Cortesini R, Suciuc-Foca N. License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC. *J Immunol*. May 15 2005;174(10):5907-5914.
108. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. Jul 20 1998;188(2):287-296.
109. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol*. Aug 1 2001;167(3):1137-1140.
110. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, et al. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. Oct 1 2005;175(7):4180-4183.
111. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, et al. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol*. Apr 15 2004;172(8):4676-4680.
112. Mahajan D, Wang Y, Qin X, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells protect against injury in an innate murine model of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. Oct 2006;17(10):2731-2741.

113. Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*. Nov 7 1969;166(906):753-755.
114. Penhale WJ, Farmer A, McKenna RP, et al. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clin Exp Immunol*. Oct 1973;15(2):225-236.
115. Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med*. Dec 1 1982;156(6):1577-1586.
116. Penhale WJ, Irvine WJ, Inglis JR, et al. Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells. *Clin Exp Immunol*. Jul 1976;25(1):6-16.
117. Sakaguchi S, Sakaguchi N. Organ-specific autoimmune disease induced in mice by elimination of T cell subsets. V. Neonatal administration of cyclosporin A causes autoimmune disease. *J Immunol*. Jan 15 1989;142(2):471-480.
118. Sakaguchi N, Miyai K, Sakaguchi S. Ionizing radiation and autoimmunity. Induction of autoimmune disease in mice by high dose fractionated total lymphoid irradiation and its prevention by inoculating normal T cells. *J Immunol*. Mar 1 1994;152(5):2586-2595.
119. Morse SS, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Virus and autoimmunity: induction of autoimmune disease in mice by mouse T lymphotropic virus (MTLV) destroying CD4+ T cells. *J Immunol*. May 1 1999;162(9):5309-5316.
120. Bassuny WM, Ihara K, Sasaki Y, et al. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics*. Jun 2003;55(3):149-156.
121. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest*. Dec 2000;106(12):R75-81.
122. Putheti P, Pettersson A, Soderstrom M, et al. Circulating CD4+CD25+ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. *J Clin Immunol*. Mar 2004;24(2):155-161.
123. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, et al. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*. Apr 5 2004;199(7):971-979.
124. Feger U, Luther C, Poeschel S, et al. Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol*. Mar 2007;147(3):412-418.
125. Brusko TM, Wasserfall CH, Clare-Salzler MJ, et al. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes*. May 2005;54(5):1407-1414.
126. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J Exp Med*. Jan 22 2007;204(1):33-39.
127. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, et al. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood*. Jul 1 2006;108(1):253-261.
128. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*. Mar 2007;13(3):108-116.
129. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 25 2006;103(17):6659-6664.
130. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. Jan 2001;27(1):20-21.

131. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* Jan 2001;27(1):68-73.
132. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* Apr 2003;4(4):330-336.
133. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol.* Mar 2007;8(3):277-284.
134. Ocklenburg F, Moharregg-Khiabani D, Geffers R, et al. UBD, a downstream element of FOXP3, allows the identification of LGALS3, a new marker of human regulatory T cells. *Lab Invest.* Jul 2006;86(7):724-737.
135. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 5 2005;102(14):5138-5143.
136. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol.* Feb 2007;8(2):191-197.
137. Sadlack B, Lohler J, Schorle H, et al. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* Nov 1995;25(11):3053-3059.
138. Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science.* Jun 9 1995;268(5216):1472-1476.
139. Willerford DM, Chen J, Ferry JA, et al. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity.* Oct 1995;3(4):521-530.
140. Malek TR, Yu A, Vincek V, et al. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity.* Aug 2002;17(2):167-178.
141. Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, et al. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med.* Sep 16 2002;196(6):851-857.
142. Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, et al. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol.* Jun 1 2004;172(11):6519-6523.
143. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood.* Sep 1 2006;108(5):1571-1579.
144. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol.* Jan 1 2000;164(1):183-190.
145. Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, et al. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med.* Jul 15 2002;196(2):237-246.
146. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.* Sep 3 2001;194(5):629-644.
147. Paust S, Lu L, McCarty N, et al. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 13 2004;101(28):10398-10403.

148. Fallarino F, Grohmann U, You S, et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol.* Jun 1 2006;176(11):6752-6761.
149. Huang CT, Workman CJ, Flies D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* Oct 2004;21(4):503-513.
150. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, et al. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol.* Mar 1 2001;166(5):3008-3018.
151. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, et al. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol.* Feb 1 2002;168(3):1080-1086.
152. Huber S, Schramm C, Lehr HA, et al. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol.* Dec 1 2004;173(11):6526-6531.
153. Gratze P, Dechend R, Stocker C, et al. Novel role for inhibitor of differentiation 2 in the genesis of angiotensin II-induced hypertension. *Circulation.* May 20 2008;117(20):2645-2656.
154. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, et al. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* Nov 1 2002;169(9):4712-4716.
155. Morgan ME, Flierman R, van Duivenvoorde LM, et al. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis Rheum.* Jul 2005;52(7):2212-2221.
156. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* Apr 2000;12(4):431-440.
157. Gardin JM, Siri FM, Kitsis RN, et al. Echocardiographic assessment of left ventricular mass and systolic function in mice. *Circ Res.* May 1995;76(5):907-914.
158. Berul CI, Maguire CT, Aronovitz MJ, et al. DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *J Clin Invest.* Feb 1999;103(4):R1-7.
159. Frohlich ED, Apstein C, Chobanian AV, et al. The heart in hypertension. *N Engl J Med.* Oct 1 1992;327(14):998-1008.
160. Drazner MH, Rame JE, Marino EK, et al. Increased left ventricular mass is a risk factor for the development of a depressed left ventricular ejection fraction within five years: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol.* Jun 16 2004;43(12):2207-2215.
161. Verdecchia P, Carini G, Circo A, et al. Left ventricular mass and cardiovascular morbidity in essential hypertension: the MAVI study. *J Am Coll Cardiol.* Dec 2001;38(7):1829-1835.
162. Verdecchia P, Porcellati C, Reboldi G, et al. Left ventricular hypertrophy as an independent predictor of acute cerebrovascular events in essential hypertension. *Circulation.* Oct 23 2001;104(17):2039-2044.
163. Ghali JK, Kadakia S, Cooper RS, et al. Impact of left ventricular hypertrophy on ventricular arrhythmias in the absence of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* May 1991;17(6):1277-1282.
164. Okin PM, Devereux RB, Jern S, et al. Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy during antihypertensive treatment and the prediction of major cardiovascular events. *Jama.* Nov 17 2004;292(19):2343-2349.

165. Shimoyama M, Hayashi D, Takimoto E, et al. Calcineurin plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation*. Dec 14 1999;100(24):2449-2454.
166. Gurantz D, Cowling RT, Villarreal FJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha upregulates angiotensin II type 1 receptors on cardiac fibroblasts. *Circ Res*. Aug 6 1999;85(3):272-279.
167. Hirota H, Yoshida K, Kishimoto T, et al. Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 23 1995;92(11):4862-4866.
168. Sano M, Fukuda K, Kodama H, et al. Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes. *J Biol Chem*. Sep 22 2000;275(38):29717-29723.
169. Kolattukudy PE, Quach T, Bergese S, et al. Myocarditis induced by targeted expression of the MCP-1 gene in murine cardiac muscle. *Am J Pathol*. Jan 1998;152(1):101-111.
170. Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 30 1997;94(20):10663-10668.
171. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, et al. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol*. Apr 1996;27(5):1201-1206.
172. Vasan RS, Sullivan LM, Roubenoff R, et al. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation*. Mar 25 2003;107(11):1486-1491.
173. Bryant D, Becker L, Richardson J, et al. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation*. Apr 14 1998;97(14):1375-1381.
174. Celis R, Torre-Martinez G, Torre-Amione G. Evidence for activation of immune system in heart failure: is there a role for anti-inflammatory therapy? *Curr Opin Cardiol*. May 2008;23(3):254-260.
175. Gullestad L, Aass H, Fjeld JG, et al. Immunomodulating therapy with intravenous immunoglobulin in patients with chronic heart failure. *Circulation*. Jan 16 2001;103(2):220-225.
176. Felix SB, Staudt A, Dorffel WV, et al. Hemodynamic effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study. *J Am Coll Cardiol*. May 2000;35(6):1590-1598.
177. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. Jan 17 2005;201(2):233-240.
178. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. Feb 13 2003;421(6924):744-748.
179. Nakae S, Nambu A, Sudo K, et al. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol*. Dec 1 2003;171(11):6173-6177.
180. Rangachari M, Mauermann N, Marty RR, et al. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J Exp Med*. Aug 7 2006;203(8):2009-2019.
181. Wolf D, Hohegger K, Wolf AM, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol*. May 2005;16(5):1360-1370.

182. Schwartz RH. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol.* Apr 2005;6(4):327-330.
183. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med.* Oct 1 2007;204(10):2449-2460.
184. McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol.* Sep 1 2005;175(5):3025-3032.
185. Makita S, Kanai T, Nemoto Y, et al. Intestinal lamina propria retaining CD4+CD25+ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. *J Immunol.* Apr 15 2007;178(8):4937-4946.
186. Wachtell K, Okin PM, Olsen MH, et al. Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy during antihypertensive therapy and reduction in sudden cardiac death: the LIFE Study. *Circulation.* Aug 14 2007;116(7):700-705.
187. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* Jan 23 2004;116(2):281-297.
188. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* Sep 25 2003;425(6956):415-419.
189. Lee Y, Jeon K, Lee JT, et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J.* Sep 2 2002;21(17):4663-4670.
190. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* Sep 3 2004;305(5689):1437-1441.
191. Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet.* May 2007;23(5):243-249.
192. Latronico MV, Catalucci D, Condorelli G. Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology. *Circ Res.* Dec 7 2007;101(12):1225-1236.
193. Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol.* Aug 2007;7(8):585-598.
194. Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, et al. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol.* Oct 1993;22(4 Suppl A):6A-13A.
195. Baldasseroni S, Opasich C, Gorini M, et al. Left bundle-branch block is associated with increased 1-year sudden and total mortality rate in 5517 outpatients with congestive heart failure: a report from the Italian network on congestive heart failure. *Am Heart J.* Mar 2002;143(3):398-405.
196. Entman ML, Smith CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* Sep 1994;28(9):1301-1311.
197. Roberts R, DeMello V, Sobel BE. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation.* Mar 1976;53(3 Suppl):I204-206.
198. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, et al. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol.* Sep 1 2000;165(5):2798-2808.
199. Sardella G, De Luca L, Francavilla V, et al. Frequency of naturally-occurring regulatory T cells is reduced in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Thromb Res.* Jan 26 2007.

8. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Heda Kvakan, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Rolle regulatorischer T-Lymphozyten in Angiotensin II-bedingtem Endorganschaden“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

6. August 2008

Heda Kvakan

9. Publikationsliste und Preise

1. Feldt S, Batenburg WW, Mazak I, Maschke U, Wellner M, **Kvakan H**, Dechend R, Fiebeler A, Burckle C, Contrepas A, Jan Danser AH, Bader M, Nguyen G, Luft FC, Muller DN. Prorenin and renin-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in monocytes is not blocked by aliskiren or the handle-region peptide. *Hypertension*. 2008 Mar; 51(3):682-8.
2. Weiss TW, **Kvakan H**, Kaun C, Prager M, Speidl WS, Zorn G, Pfaffenberger S, Huk I, Maurer G, Huber K, Wojta J. No evidence for a direct role of *Helicobacter pylori* and *Mycoplasma pneumoniae* in carotid artery atherosclerosis. *J Clin Pathol*. 2006 Nov; 59(11):1186-90.
3. Niessner A, Marculescu R, **Kvakan H**, Haschemi A, Endler G, Weyand CM, Maurer G, Mannhalter C, Wojta J, Wagner O, Huber K. Fractalkine receptor polymorphisms V249I and T280M as genetic risk factors for restenosis. *Thromb Haemost*. 2005 Dec; 94(6):1251-6.
4. Weiss TW, **Kvakan H**, Kaun C, Zorn G, Speidl WS, Pfaffenberger S, Maurer G, Huber K, Wojta J. The gp130 ligand oncostatin M regulates tissue inhibitor of metalloproteinases-1 through ERK1/2 and p38 in human adult cardiac myocytes and in human adult cardiac fibroblasts: a possible role for the gp130/gp130 ligand system in the modulation of extracellular matrix degradation in the human heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2005 Sep; 39(3):545-51.

Gordon Research Conference Angiotensin 2008 Poster Award

Kvakan H, Gratze P, Dechend R, Park J-K, Luft FC, Müller DN. Regulatory T cells ameliorate Angiotensin II induced cardiac hypertrophy.

10. Danksagung

Für die außerordentliche Betreuung und Unterstützung sowohl im Laboralltag als auch im wissenschaftlichen Denken, sowie fürs geduldige Beantworten meiner zahlreichen Fragen möchte ich mich sehr herzlich bei Dominik Müller bedanken. Ralf Dechend möchte ich ebenfalls herzlich für seine Unterstützung danken, insbesondere weil er mir gezeigt hat, dass sich Forschung und Klinik gut verbinden lassen.

Für die zahlreichen wertvollen Hinweise und Anregungen sowie aufmunternde Gespräche und Unterstützung bedanke ich mich bei Friedrich Luft.

Ludwig Thierfelder danke ich dafür, dass er mich ermutigt hat, Forschung zu machen.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Gabi N'Diaye für die angenehme Zusammenarbeit und ihr großes Engagement auf dem Gebiet der Tierversuche. Bei May-Britt Köhler, Joon-Keun Park, Fatimunissa Quadri, Saban Elitok und Mathilde Schmid bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung in Fragen der Pathohistologie. Für freundliche Unterstützung bezüglich der FACS bedanke ich mich bei Hans-Peter Rahn, Adrian Schreiber, Susanne Rolle und Birgit Salanova. Allen Mitarbeitern der Firma CellTrend, Luckenwalde, möchte ich herzlich für ihre Unterstützung bezüglich der Albuminmessungen danken. Robert Fischer und Ines Schwarz danke ich für geduldige Einführung in die Elektrophysiologie; Martin Taube und Arnd Heuser für die Durchführung der Echokardiografie; Ralph Plehm für die telemetrische Überwachung. Uta Höpken, Gerd Müller und Markus Kleinewietfeld danke ich für das freundliche Beantworten meiner immunologischen Fragen. Maren Wellner möchte ich für das geduldige Beantworten meiner molekularbiologischer Fragen danken, sowie Jana Czychi für ihre Unterstützung bezüglich der molekularbiologischen Arbeiten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre und uneingeschränkte Hilfsbereitschaft.

Schließlich danke ich meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung und ihr Verständnis.