

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Bedeutung Clec9a-abhängiger Immunzellen in kardialen
Entzündungsprozessen

von Denise Melanie Messerer

aus München

München 2020

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Angefertigt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des
Klinikums der Universität München in Großhadern

Mentor: Prof. Dr. med. Christian Schulz

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Korreferent: Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Tag der Promotion: 08.02.2020

Meiner lieben Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Das mononukleäre Phagozyten-System	3
1.1.	Historische Entwicklung	3
1.2.	Ursprung, Entwicklung und Funktion von Monozyten.....	4
1.3.	Ursprung und Entwicklung von Makrophagen	6
1.4.	Funktion und Heterogenität von Makrophagen	9
1.5.	Ursprung und Entwicklung von dendritischen Zellen.....	12
1.6.	Subtypen und Funktion von dendritischen Zellen.....	13
2.	Clec9a - Mitglied A der C-Typ-Lectindomänenfamilie 9.....	15
2.1.	<i>Dendritic cell natural killer lectin group receptor-1</i> (DNGR-1).....	15
2.2.	Genetisches <i>lineage tracing</i> via Clec9a	15
2.3.	Rolle des DNGR-1 in unterschiedlichen Geweben.....	17
3.	Kardiale Fibrose.....	18
3.1.	Entwicklung der kardialen Fibrose	18
3.2.	Rolle der mononukleären Phagozyten in der Entstehung einer kardialen Fibrose	19
3.3.	Angiotensin II induziert eine Inflammation und kardiale Fibrose	20
4.	Myokardinfarkt.....	21
4.1.	Entwicklung eines Myokardinfarktes.....	21
4.2.	Rolle mononukleärer Phagozyten im Ischämie/Reperfusionsschaden.....	21
4.3.	Kardiale Umbauprozesse nach Myokardinfarkt.....	24
4.4.	Einfluss der mononukleären Phagozyten auf die Infarktheilung und das kardiale Remodeling	26
III.	ZIELSETZUNG	28
1.	Charakterisierung Clec9a-positiver Zellen unter Ruhebedingungen .	28
2.	Verhalten Clec9a-positiver Zellen nach erhöhtem Zellumsatz im Gewebe	28
3.	Charakterisierung Clec9a-positiver Zellen in kardialer Inflammation	29

4.	Funktion Clec9a-positiver Zellen in dem Modell der kardialen Fibrose und des Myokardinfarktes	29
IV.	MATERIAL UND METHODEN	30
1.	Versuchstiere	30
1.1.	Tierhaltung und Zucht	30
1.2.	Mausstämme.....	31
1.2.1.	Clec9a ^{cre/+} Rs26 ^{tomato/+} Cx3Cr1 ^{gfp/+}	31
1.2.2.	SiglecH ^{gfp}	32
1.2.3.	Clec9a ^{cre/+} Rs26 ^{tomato/+} Zbtb46 ^{gfp/+}	32
1.2.4.	Mx1 ^{cre} Myb ^{flox/flox}	32
1.2.5.	C57BL/6J	33
1.2.6.	Clec9a ^{cre/+} Rs26 ^{tomato/+} Cx3Cr1 ^{gfp/+} Rosa26 ^{DTR}	33
2.	Anästhesie	33
2.1.	Narkotika	33
2.2.	Durchführung der Narkose.....	34
2.3.	Narkose- und Schmerzmanagement.....	35
3.	Erstellen von Knochenmarkchimären	35
3.1.	Definition Knochenmarkchimäre	35
3.2.	Ablauf der Knochenmarktransplantation	35
3.2.1.	KM-Ablation der Bestrahlungschimäre	36
3.2.2.	KM-Ablation der Mx1CreMyb ^{flox/flox} Chimäre	36
3.2.3.	Entnahme und Aufbereitung der KM-Zellen zur Transplantation	36
3.2.4.	Schwanzvenenapplikation	37
3.3.	Erfolgskontrolle der Knochenmarktransplantation	38
4.	Depletionsmodelle.....	39
4.1.	Depletion von Makrophagen mittels Csf1r-Inhibition	39
4.2.	Depletion Clec9a-positiver Zellen mittels Diphtherie-Toxin	40
5.	Inflammationsmodelle	41
5.1.	Modell der kardialen Fibrose (AT II-Infusion)	41
5.2.	Modell des myokardialen Ischämie/Reperfusionsschadens	43
6.	Echokardiografie.....	45
6.1.	Prinzip der Echokardiografie	45
6.2.	Durchführung der Echokardiografie	47

7.	Positron-Emissions-Tomografie (PET)	48
7.1.	Prinzip der Positron-Emissions-Tomografie	48
7.2.	Durchführung der Positron-Emissions-Tomografie	49
7.3.	Beurteilung der Infarktgröße und Fibrosierung	49
8.	Durchflusszytometrie	50
8.1.	Prinzip der Durchflusszytometrie	50
8.2.	Probenentnahme für durchflusszytometrische Analyse	53
8.3.	Aufbereitung von Blut	53
8.4.	Aufbereitung von Herz und Kontrollorganen	54
9.	Histologische Untersuchung	56
9.1.	Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung	56
9.2.	Herstellung der Schnittpräparate	56
9.3.	Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung	56
9.4.	Histologische Auswertung	58
10.	Statistische Auswertung	59
V.	ERGEBNISSE	60
1.	Identifikation Clec9a-abhängiger Zellen in kardialen Gewebe und Charakterisierung unter Ruhebedingungen	60
1.1.	Identifizierung und Lokalisierung Tomato-positiver Zellen im Herzgewebe	60
1.2.	Charakterisierung und Quantifizierung Tomato-positiver Zellen in Herz und Blut	61
1.3.	Abgrenzung Tomato-positiver Makrophagen von klassischen dendritischen Zellen	65
1.4.	Ausschluss von plasmazytoiden dendritischen Zellen in der Clec9aCre-positiven Makrophagenpopulation	68
2.	Clec9a-abhängige Markierung kardialer Makrophagen	69
2.1.	Clec9aCre-Markierungseffizienz in Makrophagen aus postnatalen und adulten Herzen	70
2.2.	Weitere Charakterisierung des Phänotyps Tomato-positiver Makrophagen	71
3.	Clec9a-abhängige Markierung kardialer Makrophagen bei erhöhtem Umsatz	73

3.1.	Makrophagen Depletion durch PLX-Inhibition des Csf1-Rezeptors	73
3.2.	Knochenmark-Ablation im Chimären-Modell	76
4.	Clec9a-markierte Zellen in kardialer Inflammation	81
4.1.	Tomato-positive Zellen im Model der kardialen Fibrose.....	81
4.2.	Tomato-positive Zellen im Ischämie/Reperfusionsschaden nach Myokardinfarkt.....	83
5.	Rolle und Funktion Clec9a-abhängiger Immunzellen in kardialen Entzündungsprozessen	85
5.1.	Depletion Clec9a-abhängiger Immunzellen unter Ruhebedingungen	86
5.2.	Depletion Clec9a-abhängiger Immunzellen im Myokardinfarkt	87
5.3.	Depletion Clec9a-abhängiger Zellen in kardialer Fibrose	89
VI.	DISKUSSION	93
1.	Clec9a-abhängige Zellen im Herzen zeigen unterschiedliche Phänotypen	93
2.	Eine Subpopulation kardialer Makrophagen ist Clec9a-abhängig markiert.....	94
3.	Clec9a-Markierungseffizienz in kardialen Makrophagen ist altersabhängig.....	95
4.	Clec9a-positive Makrophagen besitzen eine hohe Fähigkeit zur Antigen-Präsentierung.....	96
5.	Clec9a-positive Subpopulationen im Herzen reagieren unterschiedlich auf eine Csf1r-Inhibition	96
6.	Während eines Entzündungsgeschehens besteht ein erhöhter Umsatz Clec9a-abhängiger Makrophagen im Vergleich zu Ruhebedingungen.....	98
7.	Anzahl der Clec9a-abhängigen Zellen ist im entzündeten und fibrotischen Gewebe erhöht	99
8.	Depletion Clec9a-abhängiger Zellen im Modell der kardialen Fibrose führt zu einer relevanten Herzinsuffizienz	100
9.	Ausblick.....	104

VII.	ZUSAMMENFASSUNG	105
VIII.	SUMMARY.....	106
IX.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	107
X.	TABELLENVERZEICHNIS	110
XI.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	111
XII.	LITERATURVERZEICHNIS	114
XIII.	DANKSAGUNG	143

I. EINLEITUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen [1]. Auch in Deutschland stellen sie mit 37 %, noch weit vor Krebs (24,4 %) und Erkrankungen des Atmungssystems (7,3 %), die Haupttodesursache dar [2]. Trotz zunehmender medizinischer Fortschritte ist die Mortalität weiterhin hoch. Etwa 50 % der Patienten versterben innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung [3].

Der Myokardinfarkt ist die am meisten verbreitete und klinisch relevanteste Form der akuten Herzerkrankungen. Hierbei kommt es als Folge einer Ischämie zum abrupten Absterben von Kardiomyozyten. [4, 5]. Um den Verlust von funktionsfähigem Gewebe auszugleichen, werden strukturelle Umbauvorgänge am Herzen vorgenommen. Diese können zu einem pathologischen kardialen Umbau (*Remodeling*) führen, welcher durch eine linksventrikuläre Dilatation und Hypertrophie gekennzeichnet ist und letztlich in einer Herzinsuffizienz resultieren kann. Die von abgestorbenen Myozyten freigesetzten Gefahrensignale (*danger signals*) aktivieren die Immunabwehr und lösen eine Entzündungsreaktion aus [6]. Hierbei spielen mononukleäre Phagozyten eine wichtige Rolle. Während sie in der frühen Entzündung die Wunde durch das Phagozytieren von abgestorbenem Gewebe und Zelldebris befreien, sind sie anschließend essenziell für die Suppression und Resolution der inflammatorischen Prozesse, um ein stabiles Narbengewebe zu erhalten und einen pathologischen Umbau zu verhindern [7, 8].

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass Makrophagen und dendritische Zellen einzig von im Blut zirkulierenden Monozyten abstammen. Doch neuere Studien zeigten, dass drei verschiedene Untergruppen des mononukleären Phagozyten-Systems (MPS) anhand ihrer Ontogenese differenziert werden können [9, 10]. Dendritische Zellen entwickeln sich aus einem gemeinsamen dendritischen Zellvorläufer (CDP) im Knochenmark. Die meisten *bona fide* geweberesidenten Makrophagen haben einen embryonalen Ursprung und stammen von Dottersack-Vorläufern oder fetalen Lebermonozyten ab. Diese besitzen die Fähigkeit, sich durch lokale Proliferation im adulten Gewebe selbst zu erneuern [11, 12]. Im Laufe des Alters können sie jedoch durch rekrutierte Monozyten ersetzt werden, sodass es in vielen Organen, wie auch im Herzen, zu einer Mischpopulation

von geweberesidenten Makrophagen mit verschiedenem Ursprung kommt [13]. Im entzündeten Gewebe differenzieren sich zudem Makrophagen und dendritische Zellen aus adulten Monozyten. Diese *monocyte-derived cells* (MCs) können die Anzahl gewebeständiger Makrophagen und dendritischer Zellen weit übersteigen [10].

Mononukleäre Phagozyten zeichnen sich durch eine hohe Heterogenität aus. Aufgrund der Überlappung phänotypischer und funktioneller Merkmale und deren Wandel in Entzündungsprozessen, gestaltet sich eine Differenzierung von Makrophagen, dendritischen Zellen und deren Subtypen anhand dieser Kriterien schwierig [14, 15]. Mit Hilfe des neu generierten Mausstammes Clec9a^{cre/+} Rosa^{yfp/+} gelang es Schraml *et al.* dendritische Zellen anhand ihrer Ontogenese zu differenzieren. Hier wurde die Cre-Rekombinase unter die Kontrolle des Clec9a-Promotors (auch bekannt als DNGR-1) gesetzt und mit geflochten Allelen am Rosa26-Locus (Rosa26-stop^{flox}) kombiniert. Deren Clec9aCre-abhängige Exzision führt zu einer Expression des gelben Fluoreszenzproteins (YFP, *yellow fluorescent protein*). Sowohl CDPs, als auch die daraus differenzierten dendritischen Zellvorläufer (pre-DCs), waren im Knochenmark beziehungsweise lymphoiden Gewebe markiert. So konnten klassische dendritische Zellen durch ihre YFP-Expression (in ihrer Entwicklungsgeschichte aktiver Clec9a-Promotor) identifiziert und zu anderen Zellen abgegrenzt werden [16].

Mononukleäre Phagozyten stellen ein hohes therapeutisches Potential in kardiovaskulären Erkrankungen dar. Doch dafür werden präzise Informationen darüber benötigt, welche Zelluntergruppen eine eher schädliche Funktion im Krankheitsverlauf übernehmen und welche die Reparaturmechanismen nach Erkrankung fördern.

Im Rahmen dieser Dissertation sollen mit Hilfe genetisch modifizierter Mausstämme Clec9a-abhängige Zellen im Herzen identifiziert und ihre Funktion im Krankheitsmodell der kardialen Fibrose und des akuten Myokardinfarktes charakterisiert werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das mononukleäre Phagozyten-System

1.1. Historische Entwicklung

Zu dem mononukleären Phagozyten-System werden Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen sowie ihre gemeinsamen Vorläuferzellen des Knochenmarks gezählt. Diese Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität sowie bei der Wiederherstellung von geschädigtem Gewebe. Zudem sind sie wichtige Effektoren der angeborenen Immunantwort. Dendritische Zellen werden darüber hinaus als Bindeglied zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort gesehen [17].

In der Vergangenheit gab es viele Versuche, mononukleäre Phagozyten zu klassifizieren und ein einheitliches Zellsystem zu definieren. Ende des 19. Jahrhunderts entschlüsselte Metchnikoff, „the father of cellular immunity“, erstmals das Prinzip der Phagozytose [18, 19]. Er erkannte, dass Phagozytose nicht nur das Aufnehmen von fremden Mikroorganismen ist, sondern viel mehr einen aktiven Abwehrmechanismus darstellt und entdeckte damit grundlegende Aspekte der angeborenen Immunität. Zellen, welche die Fähigkeit zur Phagozytose besaßen, nannte er Makro- (große Esser) beziehungsweise Mikrophagen (kleine Esser; heute bekannt als polymorphnukleäre Leukozyten) und teilte sie dem sogenannten Phagozyten-System zu. Im Laufe der Zeit entstanden viele Synonyme für Makrophagen wie Erythrophagen, Adventitia Zellen, rhaginochrine Zellen, Klastozyten oder Histiozyten, was die unterschiedliche Meinung über die Beziehung dieser Zellen zueinander widerspiegelt. Aschoff entwickelte den Begriff Retikuloendotheliales System (RES) und fasste in diesem alle Zellen, welche nach intravenöser Gabe von Lithium carmine „lebend gefärbt“ waren, zusammen. Volterra schlug indessen den Begriff retikuloendotheliales System vor [20, 21]. Viele Forschungsgruppen beschäftigten sich von nun an mit der Herkunft von Makrophagen. Wie auch andere Forschungsgruppen konnten Carrel und Ebbing in ihren *in vitro* Versuchen beobachten, dass sich Makrophagen aus Monozyten entwickeln [22, 23]. Ebert und Florey gelang es erstmals *in vivo* zu zeigen, dass Monozyten aktiv in verletztes Gewebe eindringen und sich dort zu Makrophagen differenzieren [24]. Kurz darauf konnte mit Hilfe von Thymidine Autoradiographie

gezeigt werden, dass Monozyten von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark abstammen und sich die Zellen des retikuloendothelialen Systems in ihrer Funktion, Morphologie sowie in ihrem Ursprung unterscheiden [25, 26]. Ende der sechziger Jahre formulierten Ralph van Furth und Zanvil A. Cohn erstmals den bis heute verwendeten Begriff mononukleäres Phagozyten-System (MPS). Dieses beinhaltete die sogenannten Promonozyten im Knochenmark, die davon abstammenden peripheren Blutmonozyten und sich daraus entwickelnden Gewebemakrophagen [21, 27]. 1973 entdeckte Steinman eine neue Zellart, welche er aufgrund ihres sternenförmigen Aussehens dendritische Zellen nannte [28, 29]. Diese bahnbrechende Entdeckung führte zu einer Neudefinierung der Immunantwort. Seit dieser Zeit werden Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen zu der Gruppe der mononukleären Phagozyten zusammengefasst und anhand ihrer Morphologie, Funktion und ihres Ursprungs voneinander unterschieden [30]. Durch die Entwicklung neuer Technologien und sogenannten *lineage tracing* Studien konnte vor kurzem demonstriert werden, dass ein Teil der Makrophagen von adulten Säugetieren unabhängig von Blutmonozyten ist und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzt [12, 17, 31-36]. Zudem wurde gezeigt, dass sich klassische dendritische Zellen (cDCs) aus von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) abstammenden, sogenannten gemeinsamen dendritischen Vorläuferzellen (common DC precursors, CDPs) entwickeln [16, 37]. Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass das mononukleäre Phagozyten-System kein, wie ursprünglich angenommen, geschlossenes Monozyten-Makrophagen-System ist, sondern mindestens drei Zelllinien umfasst – die von CDPs abstammenden dendritische Zellen, Makrophagen embryonaler Herkunft und sich von Monozyten ableitende Zellen.

1.2. Ursprung, Entwicklung und Funktion von Monozyten

Die technische Entwicklung der polychromatischen Durchflusszytometrie erlaubte erstmals die Beurteilung verschiedener Oberflächenrezeptoren und ermöglichte somit die umfassende Erforschung des Phänotyps und der Heterogenität von Zellen. Monozyten werden im Allgemeinen durch die Expression des Zelladhäsionsmoleküls Integrin α -M (auch bekannt als CD11b) und des *colony-stimulating factor 1 receptor* (Csf1r; auch CD115 genannt) definiert. Sie stammen von dem sogenannten *macrophage dendritic cell precursor* (MDP) ab, einem gemeinsamen hämatopoetischen Vorläufer im Knochenmark, von dem sich

neben dem direkten Monozyten-Vorläufer (cMoP) auch der gemeinsame dendritische Zellvorläufer (CDP) ableitet. Ausdifferenzierte Monozyten verlassen das Knochenmark und zirkulieren in der Blutbahn. Aufgrund unterschiedlicher Funktion und Phänotyp lassen sich murine Monozyten in zwei Untergruppen einteilen. Inflammatorische Monozyten sind durch die Oberflächenmoleküle Lymphozytenantigen 6-Komplex (Ly6C^{high}), Fraktalkine-Rezeptor (Cx3Cr1^{low}) und dem Chemokin-Rezeptor 2 (CCR2^{high}) gekennzeichnet. Die kleinere Gruppe an residenten Monozyten zeichnet sich durch die Expression von Ly6C^{low}, Cx3Cr1^{high} und CCR2^{low} aus [38, 39]. Sie patrouillieren im gesunden Gewebe in Blutgefäßen, indem sie sich unabhängig vom Blutstrom an den Endothelzellen entlangrollen. Hierbei nehmen sie luminale Mikroorganismen auf und spielen eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Endothelzellintegrität. Dieser sogenannte *Crawling*-Mechanismus ist abhängig von der Oberflächenexpression des Lymphozytenfunktions-assoziierten Antigens 1 (LFA-1) und des Chemokin-Rezeptors Cx3Cr1. Neue Untersuchungen zeigten, dass Ly6C^{low} Monozyten sich nicht, wie bislang geglaubt, direkt zu Gewebemakrophagen differenzieren können [40-42]. Diese Funktion bleibt den inflammatorischen Monozyten vorbehalten. Ly6C^{high} Monozyten wandern nicht nur in entzündliches Gewebe ein, sondern ersetzen auch unter Ruhebedingungen einen Teil der geweberesidenten Makrophagen und dendritischen Zellen [43, 44]. Zudem patrouillieren sie in extravasikulärem Gewebe, nehmen Antigene auf und transportieren diese zu den Lymphknoten [45]. Neue Studien zeigten, dass sich inflammatorische Monozyten nicht nur zu sogenannten *monocytes-derived cells* (von Monozyten abstammende Makrophagen und dendritische Zellen) differenzieren, sondern sich, abhängig vom Transkriptionsfaktor NR4A1, auch zu Ly6C^{low} Monozyten entwickeln können (s. Abb. 1) [17, 46, 47].

Auch im Menschen können unterschiedliche Subtypen von Monozyten beschrieben werden. Die klassischen CD14⁺ CD16⁻ Monozyten des Menschen sind vergleichbar zu den murinen Ly6C^{high} Monozyten. Die nicht klassischen CD14⁻ CD16⁺ Monozyten entsprechen den Ly6C^{low} Monozyten der Maus. Trotz aller Ähnlichkeit gibt es diverse Unterschiede zwischen der Genexpression humaner und muriner Subtypen, die bei dem Übertragen von Ergebnissen berücksichtigt werden müssen [48].

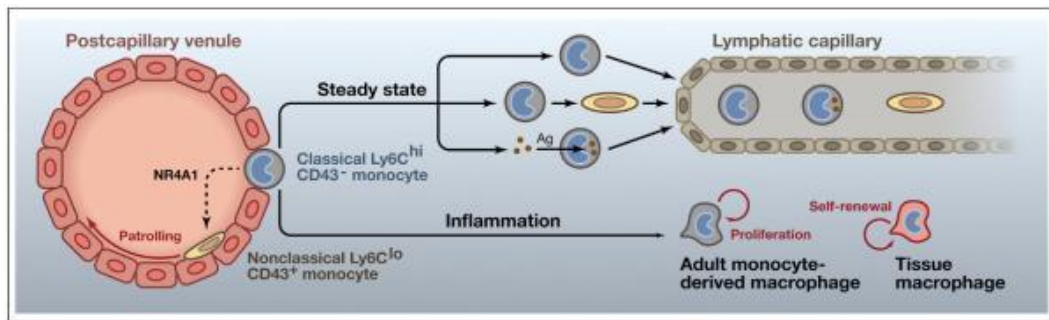


Abbildung 1: Lebenszyklus der Monozytenuntergruppen

In peripheren Gefäßen entwickeln sich aus klassischen $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ Monozyten in Abhängigkeit von NR4A1 nicht klassische Ly6C^{low} Monozyten. Diese patrouillieren entlang der Gefäßinnenseite, um abgestorbene Endothelzellen zu entfernen. Klassische Monozyten können die Blutbahn verlassen, um in extravaskulärem Gewebe zu patrouillieren. Hierbei nehmen sie Antigene auf und transportieren diese zu den Lymphknoten. Zudem können sie sich auch extravaskulär zu Ly6C^{low} Monozyten differenzieren. In der Inflammation wandern sie aktiv in entzündetes Gewebe ein und differenzieren sich dort zu Makrophagen. Sowohl rekrutierte als auch geweberesidente Makrophagen besitzen die Fähigkeit der Proliferation und Selbsterneuerung [49].

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center und Elsevier, Copyright © 2013

Obwohl das Knochenmark das wesentliche Organ für die Generierung von Monozyten darstellt [50], konnten Monozyten-Vorläuferzellen (MDPs) in der Milz detektiert werden. Da im Blut keine Vorläuferzellen, sondern nur ausdifferenzierte Monozyten zu finden sind, scheint die These einer Knochenmark-unabhängigen Monozytenbildung in der Milz nicht unplausibel [47]. Nebenbei dient die Milz als beachtliches Reservoir für $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ sowie Ly6C^{low} Monozyten. Dieser Monozyten-Pool ist den zirkulierenden Monozyten zahlenmäßig weit überlegen [51]. Während eines Entzündungsgeschehens, wie zum Beispiel im Falle einer Atherosklerose oder des Myokardinfarkts, werden diese Monozyten freigegeben und gleichzeitig die Interleukin-1 β -abhängige extramedulläre Monozytopoese gesteigert [51-54]. Die Rolle der beiden unterschiedlichen Monozyten-Reservoirs, sowie der genaue Anteil der vom peripheren Reservoir abstammenden Monozyten an den in das entzündliche Gewebe rekrutierten Monozyten, muss noch weiter erforscht werden [50].

1.3. Ursprung und Entwicklung von Makrophagen

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die Rekrutierung gewebeständiger Makrophagen einzig aus im Blut zirkulierenden Monozyten erfolgt [21]. Neuere Studien konnten jedoch zeigen, dass viele Gewebemakrophagen unter Ruhebedingungen von embryonalen Vorläuferzellen aus dem Dottersack

abstammen und unabhängig von im Knochenmark gereiften Monozyten in adultem Gewebe persistieren [12, 17, 31, 36, 40]. Bereits ab Tag 8 der Embryonalentwicklung (E8) können Makrophagen im Dottersack von Mäusen nachgewiesen werden [55]. Definitive hämatopoetische Stammzellen (HSC) erscheinen erst an Tag E10,5 in der Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region [56-58]. Von dort aus wandern sie zur fetalen Leber. Hier vermehren und differenzieren sie sich ab Tag E12,5 [12, 59, 60]. Die Hämatopoese im Dottersack des Menschen beginnt in etwa an Tag 18-19 der Schwangerschaft und dauert drei bis sechs Wochen an. In der fünften bis siebten Schwangerschaftswoche startet in der Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region des Embryos die definitive Hämatopoese. Zwischenzeitlich findet die Hämatopoese in der fetalen Leber von der vierten und fünften bis zur 22. Schwangerschaftswoche statt. Ab der elften Schwangerschaftswoche beginnt unterdessen die definitive Hämatopoese im Knochenmark [61].

Von Dottersack- und definitiven hämatopoetischen Stammzellen-abstammende Makrophagen lassen sich anhand von Transkriptionsfaktoren und Oberflächenrezeptoren unterscheiden. Während hämatopoetische Stammzellen abhängig von dem Transkriptionsfaktor Myb sind, entwickeln sich Dottersack-Makrophagen Myb-unabhängig. Ihre Entwicklung hängt insbesondere von dem Transkriptionsfaktor PU.1 ab. [12]. So konnte gezeigt werden, dass Makrophagen der Lunge, Milz, Leber sowie Langerhans-Zellen und Mikroglia ursprünglich von Dottersack-Vorläufern abstammen. Des Weiteren werden von Dottersack-abstammende Makrophagen durch die Expression von Cx3Cr1^{high}, F4/80^{high} und CD11b^{low} charakterisiert [12, 17, 44, 62]. Im Laufe ihrer Entwicklung können geweberesidente Makrophagen embryonalen Ursprungs jedoch die Expression von Oberflächenmarkern verändern. So verlieren zum Beispiel Alveolar- und Peritonealmakrophagen sowie Kupffer-Zellen ihre Cx3Cr1-Expression nach der Geburt [17].

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ausdifferenzierte Makrophagen in der Lage sind, wieder in den Zellzyklus einzutreten und sich selbst zu erneuern [12, 62, 63]. In welchem Ausmaß Makrophagen unter Ruhebedingungen lokal proliferieren oder durch Monozyten ersetzt werden, ist von Organ zu Organ verschieden.

Mit Hilfe von unterschiedlichen *fate mapping* Versuchen konnte gezeigt werden, dass die von Dottersack-Vorläufern abstammenden Mikrogliazellen des Gehirns von Mäusen sich ein Leben lang selbst erneuern und nicht durch Monozyten ersetzt werden [31, 64].

In den meisten anderen Organen jedoch werden bereits während der embryonalen Entwicklung ein Großteil der Dottersack-Makrophagen gegen Monozyten aus der fetalen Leber ausgetauscht (s. Abb. 2) [35, 36, 44]. Auch bei Langerhans-Zellen der Epidermis ging man zunächst davon aus, dass sie sich unter Ruhebedingungen durch lokale Proliferation selbst erneuern [65]. Hoeffel *et. al.* konnten jedoch zeigen, dass Langerhans-Zellen zwar ursprünglich aus dem Dottersack stammten, aber an Tag 13,5–16,5 der Embryogenese von Monozyten aus der fetalen Leber ersetzt werden [36]. Dass aber nicht alle Langerhans-Zellen ersetzt werden, wird vor allem bei Hauttransplantaten erkennbar. Hier konnten noch 10 Jahre nach Transplantation Langerhans-Zellen des einstigen Spenders nachgewiesen werden [66]. Dies zeigt, dass ein kleiner Teil der Langerhans-Zellen in der Lage ist, sich unabhängig von hämatopoetischen Stammzellen zu erneuern.

Epelman *et. al.* konnten mit Hilfe von *pulse labeling* Versuchen zeigen, dass sich auch noch in adulten Herzen Makrophagen embryonalen Ursprungs befinden. Hierfür wurde trächtigen Mäusen der Linie Csf1r-Mer-iCre-Mer x RosamTmG am Tag 8,5 der Embryonalentwicklung Tamoxifen verabreicht, wodurch Dottersack-Makrophagen spezifisch markiert wurden. An Tag E10,5 waren circa 30 % der Makrophagen des Dottersacks sowie des fetalen Gehirns markiert. Zehn Wochen nach der Geburt wurden die Tiere euthanasiert und ihre Organe analysiert. Dabei zeigte sich, dass noch immer 30 % der Mikrogliazellen markiert waren. 5 % der kardialen Makrophagen stammten noch aus dem Dottersack. Im Vergleich dazu waren noch 8 % der Makrophagen in der Leber markiert. In Peritoneum, Niere, Milz, Lunge und Haut konnten keine markierten Dottersack-Makrophagen mehr nachgewiesen werden [44]. Molawi *et al.* konnten in ihren Experimenten beobachten, dass die Anzahl der Dottersack-Makrophagen in adulten Herzen aufgrund eines sinkenden Selbsterneuerungspotenzials im Alter abnimmt. Dieser Verlust wird über von Monozyten-abstammenden Makrophagen ausgeglichen. Das heißt, auch unter Ruhebedingungen werden geweberesidente Makrophagen embryonalen Ursprungs in adultem Gewebe durch rekrutierte Monozyten ersetzt [67].

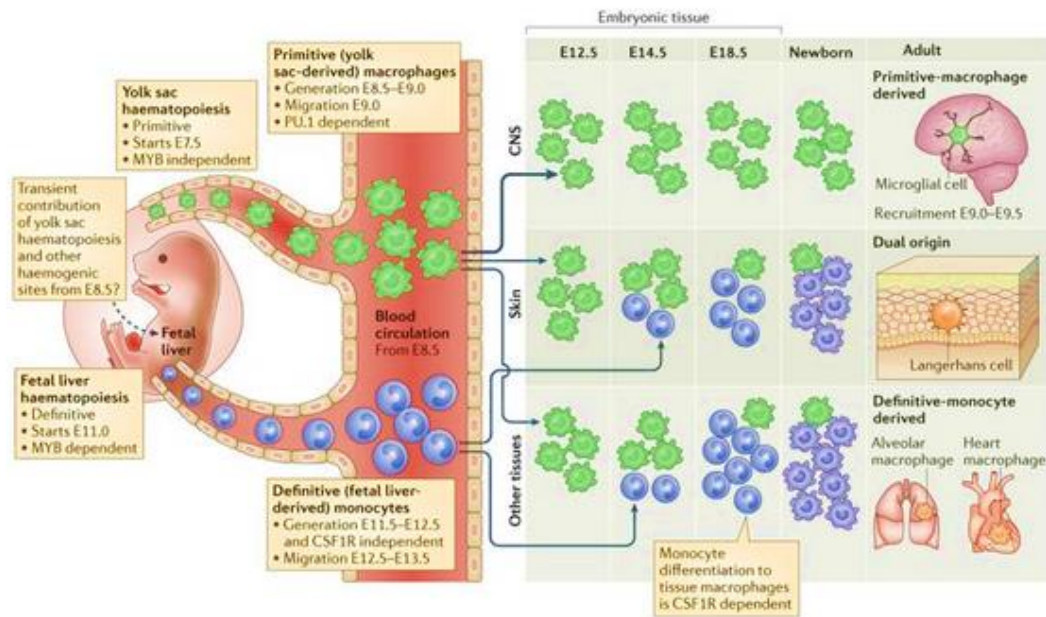


Abbildung 2: Ursprung der Makrophagen in verschiedenen Geweben

Primitive Makrophagen werden an Tag E8,5-9,0 im Dottersack generiert. Diese verteilen sich über die Blutbahn und besiedeln an Tag E9,0–10,0 den gesamten Embryo. Monozyten der definitiven Hämatopoese in der Leber werden an Tag E12,5-13,5 ins Blut freigesetzt. An Tag 13,5-14,5 rekrutieren diese in embryonales Gewebe, wo sie proliferieren und sich Csf1r-abhängig zu Makrophagen differenzieren. Dabei wird, mit Ausnahme der Mikroglia, ein Großteil der Dottersack-Makrophagen durch von Monozyten abstammende Makrophagen ersetzt [61].

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center, Springer Nature, Copyright © 2014

1.4. Funktion und Heterogenität von Makrophagen

Makrophagen sind wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Zudem spielen sie eine zentrale Rolle in der Gewebekomöostase, indem sie verletztes Gewebe und fremde Proteine aufspüren und tote Zellen sowie Zelldebris beseitigen. Durch die Produktion von Zytokinen und Chemokinen übernehmen sie ebenso eine wichtige Funktion in Inflammation und anschließenden Reparaturmechanismen [61, 68, 69]. Makrophagen sind in allen Geweben zu finden und zeichnen sich durch ihre Multifunktionalität und hohe Anpassungsfähigkeit aus [70-72]. Während zum Beispiel Makrophagen in der Milz durch die Phagozytose von Erythrozyten am Eisenabbau beteiligt sind [73], reduzieren Mikroglia im Gehirn während der Entwicklung überzählige Synapsen [74]. Durch die Ausschüttung von Katecholaminen sind sie indessen in braunem Fettgewebe an der Thermoregulation beteiligt [75]. Dies spiegelt die enorme Heterogenität von Makrophagen wider.

Makrophagen können, ähnlich wie Monozyten, in inflammatorische (klassische oder M1-Makrophagen) und nicht inflammatorische (alternativ aktivierte oder M2-Makrophagen) Subtypen eingeteilt werden (s. Abb. 3). Diese Einteilung ist zwar hilfreich, berücksichtigt aber weder den Ursprung und das lokale Milieu der Makrophagen noch die Existenz diverser anderer Subtypen [76, 77]. M1-Makrophagen werden klassisch durch Interferon- γ , IL-12 und IL-18 der Typ1-T-Helferzellen aktiviert, M2-Makrophagen alternativ durch IL-4 und IL-13 der Typ-2-T-Helferzellen [78-82]. Klassisch aktivierte Makrophagen produzieren neben IL-1 β und IL-6 auch TNF- α und lösen damit eine starke Entzündungsreaktion aus. Alternativ aktivierte Makrophagen dagegen produzieren Arginase 1 und 2 und fördern damit die Wundheilung [78, 83, 84].

	M1 (IFN- γ)	M2 (IL-4/IL-13)
Functions elicited in macrophages		
Phagocytosis / endocytosis	-Increases phagocytosis of <i>C. albicans</i> [95] -Decreases Fc-mediated phagocytosis [96] -Decreases complement-mediated phagocytosis [97]	-Decreases phagocytosis of particles while increasing inflammatory cytokine production [98]
Autophagy	-Induces autophagy in TB infection [99]	-Decreases autophagy in TB infection [100]
Macrophage Fusion	-Increases fusion in combination with concanavalin A [101] -Induces fusion in alveolar macrophages [102]	-Induces fusion [103] -Inhibits IFN- γ -induced fusion [101]
Nitric Oxide	-Induces Mycobacteria killing via NO [104]	-Favours Arginase-1 vs. i-NOS, Arg1+ macrophages suppress Th2 inflammation and fibrosis [105]
Parasite killing and expulsion	-Mediates parasite killing via NO [106, 107]	-Although the cytokine is important for worm expulsion, the effect does not depend on macrophages [108]
Virus replication	-Inhibits replication of HIV at early pre-integration steps [109]	-Inhibits HIV replication at post-integration level [109]
Markers		
Human	CD64, IDO, SOCS1, CXCL10	MRC1, TGM2, CD23, CCL22
Mouse	CXCL9, CXCL10, CXCL11, NOS2	Mrc1, tgm2, Fizz1, Ym1/2, Arg1

Abbildung 3: Darstellung der Effekte von IFN- γ und IL-4/IL-13 Stimulation in M1- und M2-Makrophagen

Interferon- γ und IL-4/IL-13 lösen unterschiedliche Funktionen in Makrophagen aus. M1- und M2-Makrophagen können anhand verschiedener Marker differenziert werden [77].

Mit freundlicher Genehmigung von Faculty of 1000 Ltd, Copyright © 2014

Aber auch innerhalb eines Organs stellt die Makrophagenpopulation keine homogene Gruppe dar. Zudem können Makrophagen im Laufe des Lebens ihren Phänotyp und ihre Funktion ändern. So können im Herzen bereits unter Ruhebedingungen unterschiedliche Makrophagenpopulationen ausfindig gemacht werden. Mit Hilfe von verschiedenen Oberflächenmarkern wie CD11b, F4/80

(EMR1; *EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-1*), Cx3Cr1, MHCII (Haupthistokompatibilitätskomplex II), CCR2 und Ly6C können verschiedene Subpopulationen in durchflusszytometrischen Untersuchungen charakterisiert werden [79, 85, 86]. In neugeborenen Mäusen zeigen kardiale Makrophagen einen MHCII^{low} Phänotyp und stammen primär von Vorläuferzellen aus dem Dottersack. Mit zunehmendem Alter verändert sich der Phänotyp der Makrophagen allmählich von MHCII^{low} zu MHCII^{high}. Der *chemokine monocyte chemoattractant protein-1 receptor* (MCP-1/CCL2) ermöglicht Monozyten die Chemotaxis und damit das Migrieren aus dem Knochenmark in die Blutbahn. Anhand dieses Oberflächenmoleküls können Makrophagen, die kürzlich von zirkulierenden Monozyten abstammen, identifiziert werden [44, 87]. Mit Hilfe der beiden Oberflächenrezeptoren CCR2 und MHC-II können Untergruppen von kardialen Monozyten und Makrophagen in neugeborenen und adulten Mäusen definiert werden. Im Herzen von neugeborenen Mäusen können zwei Subpopulationen unterschieden werden. Die vorwiegend aus dem Dottersack abstammenden CCR2⁻MHC-II^{low} und die der definitiven Hämatopoese entspringenden CCR2⁺ MHC-II^{low} Makrophagen. In adulten Herzen von sechs Wochen alten Tieren können vier Populationen anhand ihrer CCR2- und MHC-II-Expression beschrieben werden. Die CCR2⁻MHC-II^{low} und CCR2⁻MHC-II^{high} Makrophagen gemischten Ursprungs und die vom Knochenmark abstammenden CCR2⁺ MHC-II^{low} und CCR2⁺ MHC-II^{high} Subpopulationen [87].

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich Makrophagen durch eine starke Heterogenität in Bezug auf ihren Phänotyp und Funktion auszeichnen. Sie besitzen eine hohe Adaptionfähigkeit an ihre Umgebung und können nicht nur nach Kontakt mit Pathogenen oder verletztem Gewebe, sondern auch unter Ruhebedingungen ihre Funktion und Genexpression verändern [88].

Diese Heterogenität und das Überlappen einiger Oberflächenmarker gestaltet es schwierig, Makrophagen von dendritischen Zellen abzugrenzen. Daher können mononukleäre Phagozyten nicht nur anhand ihres Phänotyps definiert werden. Die Abhängigkeit von verschiedenen Wachstums- und Transkriptionsfaktoren [88, 89], eine Untergruppen-spezifische Genexpression [90], sowie die unterschiedliche Ontogenese [91] müssen bei der Charakterisierung mononukleärer Phagozyten berücksichtigt werden.

1.5. Ursprung und Entwicklung von dendritischen Zellen

Dendritische Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Aktivierung des adaptiven Immunsystems, indem sie aufgenommene Antigene verarbeiten und diese den T-Lymphozyten präsentieren [92-95]. Durch die Produktion von Zytokinen sind sie zudem wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und tragen zur Gewebekomöostase bei [96-100].

Es können zwei Hauptgruppen von dendritischen Zellen unterschieden werden – die konventionellen oder klassischen dendritischen Zellen (cDCs) und die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs). Klassische dendritische Zellen können des Weiteren in die Untergruppen cDC1 und cDC2 unterteilt werden. Alle dendritischen Zellen stammen von einem gemeinsamen Vorläufer (MDP) ab, der sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark entwickelt hat. Dieser gibt den gemeinsamen dendritischen Zellprogenitor (CDP) ab, von dem sich wiederum die Vorläuferzellen pre-cDC1 und pre-cDC2 sowie die plasmazytoiden dendritischen Zellen ableiten [14, 101-106]. Während sich die pDCs bereits im Knochenmark vollständig entwickeln [107, 108], migrieren cDC Vorläuferzellen (pre-cDCs) via Blut in lymphatisches sowie nicht lymphatisches Gewebe, wo sie sich dann schließlich zu cDC1 bzw. cDC2 differenzieren [109, 110]. Ähnlich wie Makrophagen, können auch dendritische Zellen aus Ly6C^{high} Monozyten hervorgehen (s. Abb.4). Da dies nur in Entzündung geschieht, werden diese Zellen als inflammatorische (nicht klassische) dendritische Zellen bezeichnet [111, 112].

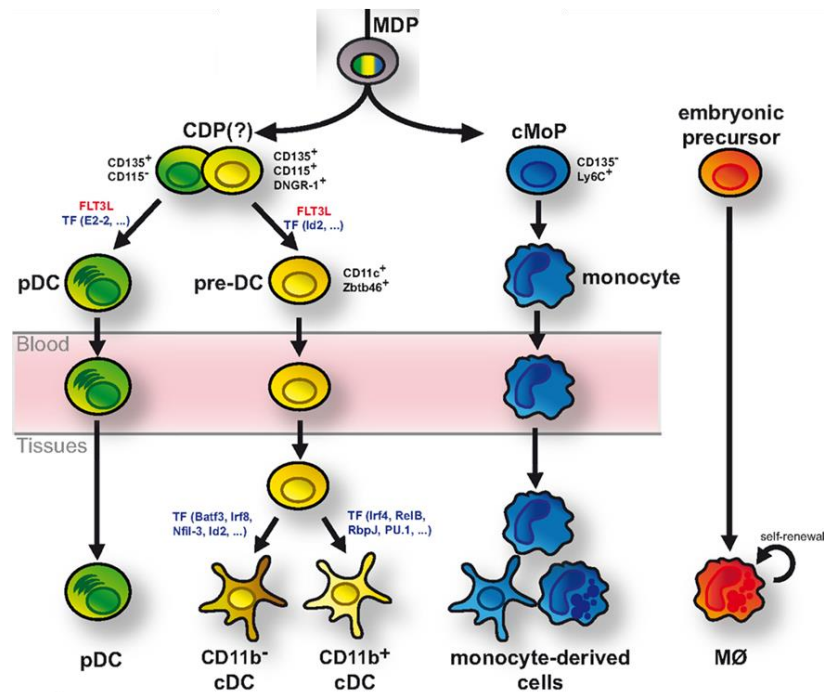


Abbildung 4: Entwicklung der dendritischen Zell-Subpopulationen

Aus dem Makrophagen/dendritischen Zell Vorläufer (MDP) entwickelt sich der dendritische Zellvorläufer (CDP). Dieser separiert sich in pDCs und cDC Progenitoren (pre-DC). Während pDCs sich vollständig im Knochenmark entwickeln, wandern die pre-DCs via Blut ins lymphoide und nicht lymphoide Gewebe, wo sie sich in die beiden Subtypen cDC1 (CD11b⁻) und cDC2 (CD11b⁺) differenzieren. Auch Monozyten können sich zu dendritischen Zellen differenzieren. Die Entwicklung der verschiedenen Subpopulation hängt von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren ab [113].

Mit freundlicher Genehmigung von Frontiers Immunology, Copyright © 2015

1.6. Subtypen und Funktion von dendritischen Zellen

Alle klassischen dendritischen Zellen zeichnen sich durch die Expression von MHC-II⁺ und CD11c⁺ aus [89, 91, 114]. Die Untergruppen können anhand von Transkriptionsfaktoren und Oberflächenmarkern differenziert werden. cDC1 sind abhängig von den Transkriptionsfaktoren Batf3, IRF8 und ID2 und werden im lymphatischen Gewebe durch die Expression von CD8α, CD24 und XCR1 und in nicht lymphatischem Gewebe durch die Expression von XCR1, CD24 und CD103 charakterisiert [9, 115, 116]. Im Gegensatz dazu ist die Differenzierung von cDC2 IRF4, KLF4, RelB und ZEB2 abhängig. Diese exprimieren im lymphatischen Gewebe CD4 und Sirp α und in nicht lymphatischem Sirp α und CD11b [9, 117, 118]. Durch die Produktion von IL-12 induzieren cDC1 eine Typ-1 Immunantwort, indem sie Typ1-T-Helferzellen (Th1) aktivieren [93, 96]. cDC2 scheinen eine prominentere Rolle in der Aktivierung von CD4 T-Lymphozyten zu spielen und fördern die Th2 und Th17 Immunantwort (s. Abb. 5) [119, 120].

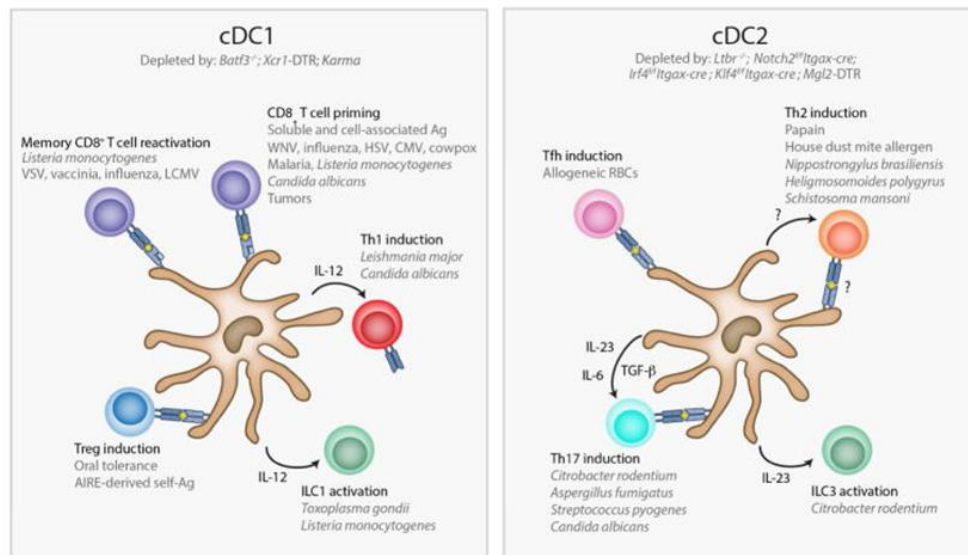


Abbildung 5: Verschiedene Funktionen der klassischen dendritischen Zellen in der Immunantwort

Klassische dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle sowohl in dem angeborenen als auch in dem erworbenen Immunsystem. cDC1 kontrollieren die Typ1-Immunantwort gegen Viren und intrazelluläre Pathogene. cDC2 regulieren die Typ2-Immunantwort indem sie Th2 aktivieren. Außerdem können sie durch die Aktivierung von Th17 eine Typ3-Immunantwort gegen extrazelluläre Bakterien kontrollieren [95].

Mit freundlicher Genehmigung von Cell Press Immunity, Copyright © 2016

Plasmazytoide dendritische Zellen werden durch $CD11c^{low}$, $MHC-II^{low}$, $B220^{+}$ und SiglecH Expression definiert und sind unter Ruhebedingungen vorwiegend in Blut und lymphatischen Organen zu finden. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, Typ1-Interferon (IFN) zu produzieren. Darüber hinaus fördern sie eine antivirale Immunantwort und spielen eine wichtige Rolle in der Immuntoleranz [92, 93, 121].

Von Monozyten abstammende inflammatorische dendritische Zellen (moDCs) sind sowohl in die angeborene als auch in die adaptive Immunantwort involviert. Sie besitzen die Fähigkeit während viraler, bakterieller oder parasitärer Infektion $CD4^{+}$ sowie $CD8^{+}$ T-Zellen zu aktivieren. Zudem sind sie in der Lage, $TNF-\alpha$ und iNOS zu sezernieren [122]. Inflammatorische dendritische Zellen werden durch die Expression von Ly6C, CD11b, MHC-II, CD11c charakterisiert [123]. Zusätzlich kann ein Teil von ihnen auch F4/80 sowie CD64 exprimieren. Aufgrund des ähnlichen Phänotyps lassen sie sich nur schwer von cDC2s und Makrophagen abgrenzen. Zudem sind die Regulationsmechanismen ihrer Entwicklung und Funktion noch nicht ausreichend geklärt [93, 124].

2. Clec9a - Mitglied A der C-Typ-Lectindomänenfamilie 9

2.1. *Dendritic cell natural killer lectin group receptor-1* (DNGR-1)

Mononukleare Phagozyten übernehmen eine wichtige Funktion im Aufspüren von geschädigtem Gewebe. Mit Hilfe sogenannter myeloider Rezeptoren können sie Signale, welche von toten oder absterbenden Zellen freigesetzt werden, aufnehmen. Ein prominenter Vertreter dieser Rezeptoren ist der *dendritic cell natural killer lectin group receptor-1* (DNGR-1 oder auch Clec9a-Rezeptor) aus der Familie der C-Typ Lectin-Rezeptoren [125, 126]. Er besitzt die Fähigkeit F-Actin, welches von nekrotischen Zellen freigegeben wird, aufzuspüren. Zudem fördert er die Kreuzpräsentation nekrotischer Zellantigene an CD8⁺ T-Zellen. Das Protein wird durch das Clec9a-Gen (C-Typ-Lectindomänenfamilie Mitglied A) kodiert und hauptsächlich von klassischen dendritischen Zellen des Typ-1 (cDC1) exprimiert [126-129]. Eine Blockade oder *Knock-out* des DNGR-1 Rezeptors führt zwar nicht zu einer verminderten Phagozytose von nekrotischen Zellen durch cDC1s, reduziert aber die Kreuzpräsentation nekrotischer Zellantigene *in vitro* erheblich und verringert die Immunogenität nekrotischer Zellen *in vivo* [130, 131].

2.2. Genetisches *lineage tracing* via Clec9a

Lange Zeit wurden dendritische Zellen anhand funktioneller Kriterien, wie zum Beispiel ihre Fähigkeit zu migrieren und T-Lymphozyten zu aktivieren, definiert und zu Monozyten und Makrophagen abgegrenzt [89, 92, 132]. Doch funktionelle Attribute stellen keine separaten Zelleigenschaften dar. Zudem kommt es häufig zum Überlappen von Oberflächenmarkern unterschiedlicher Zelltypen, vor allem, wenn diese nach Infektionen oder während einer Inflammation hoch- oder runterreguliert werden. Dies macht es schwierig, dendritische Zellen klar von Makrophagen abzugrenzen und sie als eigenständige Zelllinie zu positionieren [89, 133].

Mit Hilfe des neu generierten Clec9aCre Maus-Modells ist es Schraml *et al.* gelungen, dendritische Zellen und ihre Vorläufer anhand ihrer Ontogenese zu definieren. Bei diesem Mausstamm steht die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Clec9a-Promotors. Diesen verkreuzten sie mit Rosa26- stop^{flox}- *enhanced yellow fluorescent protein* (eYFP) Reporter-Mäusen.

Die Cre-vermittelte Exzision des *Stop Codon* führt in $Clec9a^{cre/+}Rosa^{eYFP/+}$ Mäusen zu einer konstitutiven Expression von YFP. Dadurch werden $Clec9a^{cre}$ -exprimierende Zellen sowie ihre Nachkommen irreversibel markiert (s.Abb.6) [16].

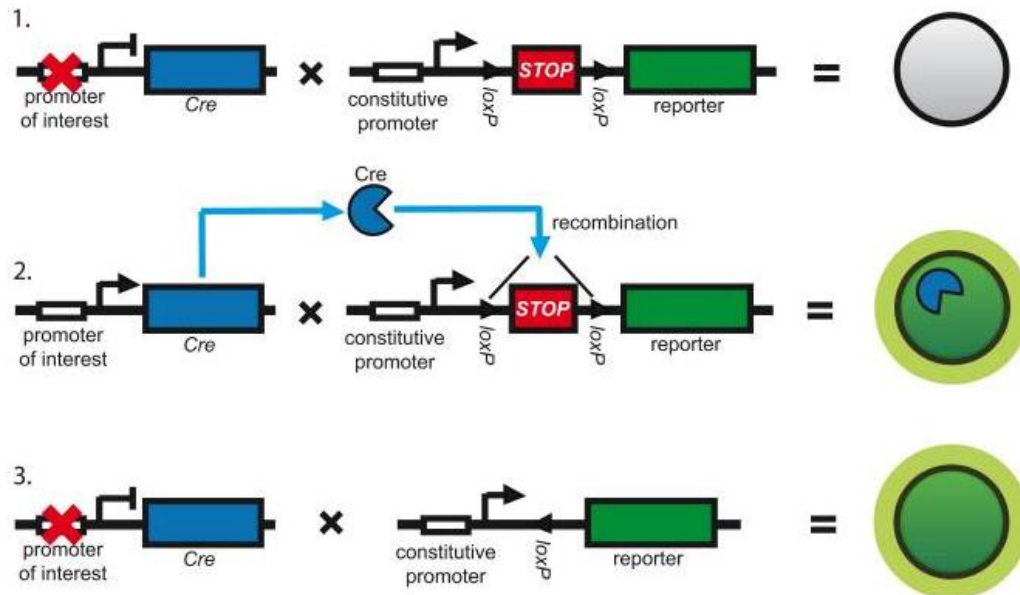


Abbildung 6: Prinzip des $Clec9a^{cre/+}Rosa^{eYFP/+}$ -Maus-Modells

(1.) Die Expression der Cre-Rekombinase wird durch einen Zell-spezifischen Promotor aktiviert. Zusätzlich steht ein Fluoreszenzprotein unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors. Die Expression des Reporters wird durch eine vorgeschaltete *loxP*-flankierte *STOP* Sequenz verhindert. (2.) Cre-Expression führt zur Exzision der *STOP* Sequenz und zum Einschalten des Reportergens. (3.) Die Zielzelle ist, unabhängig von einer kontinuierlichen Cre-Expression, irreversibel markiert [113].

Mit freundlicher Genehmigung von Frontiers Immunology, Copyright © 2015

Mit Hilfe von $Clec9a$ führten Schraml *et al.* eine sogenannte *fate mapping* Studie von dendritischen Zellen durch. Dabei konnten sie zeigen, dass in $Clec9a^{cre/+}Rosa^{eYFP/+}$ Tieren die dendritischen Zellvorläufer CDP und pre-DCs YFP markiert waren, jedoch nicht der gemeinsame Makrophagen-/dendritische Zellvorläufer (MDP). In lymphoiden und nicht lymphoiden Geweben (Lunge, Niere und Dünndarm) exprimierten klassische dendritische Zellen Typ-1 (cDC1) nahezu hundert Prozent YFP ($Clec9a^{cre}$), cDC2s hingegen nur um circa fünfzig Prozent. Das ist dadurch begründet, dass cDC2, im Gegensatz zu cDC1, in ihrer ausdifferenzierten Form kein DNMR-1 exprimieren und es aufgrund des heterozygoten Genotyps der Tiere, zu einer inkompletten Markierung der Vorläuferzellen kommen kann. Obwohl plasmazytoide dendritische Zellen nicht von $Clec9a$ -Vorläufern abstammen, waren sie, durch die DNMR-1 Expression in

ihrer ausdifferenzierten Form, in geringem Maße (circa 20 %) YFP markiert. Kaum YFP-Markierung zeigten B- und T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Neutrophile, Makrophagen und Monozyten. Erythrozyten sowie nicht hämatopoetische Zellen waren nicht markiert. Zusätzlich konnten sie mittels *in vivo* und *in vitro* Versuchen zeigen, dass sich mit Hilfe der Clec9a-Markierung auch in der Inflammation klassische dendritische Zellen von dendritischen Zellen abgrenzen lassen, die von Ly6C^{high} Monozyten abstammten. Obwohl inflammatorische dendritische Zellen einen sehr ähnlichen Phänotyp zu cDCs aufweisen und gleiche Funktionen, wie zum Beispiel das Migrieren als Antigen-präsentierende Zelle und Aktivieren naiver T-Lymphozyten, übernehmen können, waren diese nicht YFP markiert. Damit präsentierten sie, dass Clec9a als *bona fide* Marker für dendritische Zellvorläufer eingesetzt werden kann und mit Hilfe des neu generierten Mausstammes klassische dendritische Zellen und ihre Vorläufer anhand ihrer historischen Clec9a-Markierung identifiziert und von anderen mononukleären Phagozyten abgegrenzt werden können.

2.3. Rolle des DNGR-1 in unterschiedlichen Geweben

Del Fresno *et al.* untersuchten die Rolle des DNGR-1 in dem Modell der akuten nekrotisierenden Pankreatitis, welche mittels intraperitonealer Caerulein-Injektion induziert wurde. In DNGR-1-defizienten Mäusen kam es zu einer gesteigerten Neutrophilen-Rekrutierung und erhöhtem Gewebeschaden. Ähnliche Ergebnisse sahen sie während einer *C. albicans* Infektion. Dieser Effekt war B- und T-Zell unabhängig. Dies deutete darauf hin, dass DNGR-1 sowohl in der sterilen als auch in der infektiösen Inflammation eine wichtige Rolle in der Kontrolle von Gewebeschäden spielt und das Aufspüren von nekrotischem Gewebe durch DNGR-1 die Rekrutierung von Neutrophilen beeinflusst [128].

Haddad *et al.* untersuchten die Rolle des C-Typ Lectin-Rezeptors in an Atherosklerose erkrankten Mäusen (LDL^{-/-}, ApoE^{-/-}). Hier konnten sie sehen, dass eine DNGR-1-Defizienz eine Reduzierung der Atherosklerose bewirkt. Die Plaquegröße während der frühen Phase der Erkrankung war im Vergleich zu der Kontrollgruppe deutlich kleiner. Zudem war die Anzahl inflammatorischer Zellen innerhalb der Plaques reduziert. Dies war mit einem signifikanten Anstieg der IL-10-Produktion assoziiert. Das deutete daraufhin, dass DNGR-1 in der Regulierung von IL-10 involviert war und die vaskuläre Inflammation und damit die Entwicklung der Atherosklerose beeinflusste [134].

Cheng *et al.* konnten in *in vitro* und *in vivo* Versuchen zeigen, dass der Clec9a-Rezeptor fähig war, *Mycobacterium* spp. zu binden und die Expression von CXCL8 and IL-1 β zu aktivieren. Wurde während einer mykobakteriellen Infektion der Rezeptor mittels humanem *Clec9a-Fc Fusion Protein* geblockt, kam es in Folge einer verminderten Zytokin-Produktion zu einer reduzierten Infiltration von Neutrophilen und Inflammation des Lungengewebes. [135]

3. Kardiale Fibrose

3.1. Entwicklung der kardialen Fibrose

Der geordnete Ersatz toter oder geschädigter Zellen stellt einen fundamentalen biologischen Prozess der Wiederherstellung von geschädigtem Gewebe dar. Kommt es durch Fehlregulierung des Heilungsprozesses zu einer vernarbenden Wundheilung, so spricht man von Fibrose [136]. Anhaltende Entzündungsreaktionen, Infektionen oder Gewebsnekrosen können zu einer chronischen Aktivierung von Fibroblasten und Myofibroblasten führen. Hierdurch kommt es zu einer exzessiven Ansammlung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel Kollagen oder Fibronectin, in und um entzündetem oder geschädigtem Gewebe, was zu einer permanenten Vernarbung und damit verbundenen Funktionseinschränkung des Gewebes führen kann [137]. Da das Herz adulter Säugetiere eine reduzierte Regenerationsfähigkeit besitzt, kommt es vor allem bei Erkrankungen, die mit dem Untergang von Kardiomyozyten einher gehen, zu einer umfangreichen Ausbildung von fibrotischem Gewebe [7]. Bei einem akuten Myokardinfarkt zum Beispiel, löst das Absterben zahlreicher Kardiomyozyten eine starke Entzündungsreaktion aus, was fibrotische Umbauprozesse zur Folge hat. Die dadurch entstandene Gewebscarbe soll die strukturelle Integrität der Herzkammern bewahren und vor Dilatation schützen [7]. Doch nicht immer ist die Ausbildung von fibrotischem Gewebe durch das Ersetzen untergegangener Kardiomyozyten begründet. Druckbelastungen des Herzens durch Hypertonie oder Aortenstenose führen ebenfalls zu einer interstitiellen oder perivaskulären Fibrose, was eine Versteifung des Herzmuskels und damit reduzierte Herzfunktion zur Folge hat [138]. In der hypertrophen Kardiomyopathie ist die Fibrose für die starke Zunahme der Herzwanddicke verantwortlich [139]. Auch Alterungsprozesse bringen eine progressive Fibrose mit sich, was in einer diastolischen Dysfunktion resultiert [140]. Ebenso kommt es im Verlauf einer

Herzinsuffizienz durch die Aktivierung von Kompensationsmechanismen, wie der Erhöhung des Blutdruckes, zur Ausbildung von fibrotischem Gewebe. Durch die damit verbundene reduzierte Pumpleistung wird die Insuffizienz zusätzlich weiter vorangetrieben [141]. Obwohl die pathophysiologischen Mechanismen, die zur Ausbildung einer kardialen Fibrose führen, sehr vielfältig sind, sind die molekularen Signale und zellulären Effektoren sehr ähnlich [142].

3.2. Rolle der mononukleären Phagozyten in der Entstehung einer kardialen Fibrose

Durch ihre Fähigkeit, extrazelluläre Matrix zu produzieren, gehören Fibroblasten und Myofibroblasten zu den Haupteffektorzellen im fibrotischen Herzen [143-145]. Doch auch mononukleäre Phagozyten spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung von fibrotischen Umbauprozessen. Inflammatorische Monozyten migrieren in entzündetes Gewebe und differenzieren sich dort zu Makrophagen und dendritischen Zellen. Das Chemokin *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1 oder auch CCR2), welches in inflammatorischen und fibrotischen Prozessen hochreguliert wird, ist dabei entscheidend an der Aktivierung und Rekrutierung von Monozyten beteiligt. Zudem konnte gezeigt werden, dass MCP-1 die Genexpression von Fibroblasten beeinflusst und die Produktion von extrazellulärer Matrix stimuliert. Somit hat es auch einen direkten Effekt auf die Entstehung der Fibrose [146-149]. Abhängig von der Art der myokardialen Erkrankung führen unterschiedlichste Effekte von zum Beispiel *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), neurohumorale Aktivierung (Angiotensin II) oder Zytokin-Sekretion zur Aktivierung von Makrophagen. Diese sind durch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (wie TNF- α und IL-1), anti-inflammatorischer und fibrogener Zytokine (wie IL-10 und TGF- β) sowie Wachstumsfaktoren in fibrotische Umbauprozesse involviert. Zudem sind Makrophagen durch das Sezernieren zellulärer Matrixproteine direkt an der Produktion der extrazellulären Matrix beteiligt [150]. Auch aktivierte CD4⁺ T- Zellen wirken maßgeblich an der Entstehung von fibrotischem Gewebe mit [151]. Typ2-T-Helferzellen fördern das Hochregulieren von den pro-fibrotischen Zytokinen IL-4 und IL-13, welche als potente Stimuli der Kollagensynthese durch Fibroblasten fungieren. Zusätzlich fördern sie die Differenzierung der Makrophagen zu einem M2-Phänotyp, welche wiederum die Fibrosierung unterstützen [136, 152, 153].

Zudem konnte gezeigt werden, dass auch aktivierte Typ17-T-Helferzellen wichtige Effektoren der kardialen Fibrose darstellen [154].

Fibrotische Umbauprozesse spielen in vielen kardialen Erkrankungen eine zentrale Rolle. Daher ist ein besseres Verständnis der regulatorischen Mechanismen, die der Entzündung und Fibrose zu Grunde liegen, wichtig für die Entwicklung neuer effektiver Therapien [155].

3.3. Angiotensin II induziert eine Inflammation und kardiale Fibrose

Das Peptidhormon Angiotensin II (AT II) trägt entscheidend zur Ausbildung der kardialen Fibrose bei. Dabei kann es indirekt, wie zum Beispiel durch das Induzieren einer Hypertonie, perivaskulärer Hypertrophie und vesikulären oder kardialen Inflamationsprozessen, oder direkt eine Fibrosierung des Gewebes fördern [156-158]. Nicht nur Endothelzellen, sondern auch in entzündliche Bereiche infiltrierte Makrophagen und Fibroblasten produzieren das *angiotensin converting enzyme* (ACE), welches wichtig für die Generierung von Angiotensin II aus Angiotensin I (AT I) ist [159]. Angiotensin II stimuliert die Produktion von MCP-1 [160, 161]. Zusätzlich kann lokal freigesetztes Angiotensin II Fibroblasten sowohl direkt als auch indirekt durch die Produktion von *transforming growth factor- β* (TGF- β) aktivieren. *In vitro* Versuche konnten zudem zeigen, dass Angiotensin II die Proliferation von Fibroblasten stimuliert und ihre Kollagensynthese durch Interaktion mit dem Angiotensin II-Typ1-Rezeptor (AT1) aktiviert [162]. Aufgrund dieser Eigenschaften hat sich das AT II Modell für die experimentelle Induktion einer kardialen Fibrose in der Forschung etabliert.

Generell scheint dem AT II-Typ1-Rezeptor eine stärkere Bedeutung als dem AT II-Typ-2-Rezeptor (AT2) in den Mechanismen fibrotischer Umbauprozesse zu zukommen. Schiefer *et al.* konnten demonstrieren, dass es durch die Blockade des AT1-Rezeptors zu einer signifikanten Reduzierung von fibrotischem Gewebe nach einem Myokardinfarkt kommt [163]. Eine weitere Studie zeigte, dass vor allem der AT II-Typ1-Rezeptor für die Entwicklung einer Angiotensin II-abhängigen Hypertension und kardialen Hypertrophie verantwortlich ist [164].

4. Myokardinfarkt

4.1. Entwicklung eines Myokardinfarktes

Der Myokardinfarkt ist die am meisten verbreitete und klinisch relevanteste Form der akuten Herzerkrankungen. Hierbei kommt es als Folge einer Ischämie zum abrupten Absterben von Kardiomyozyten. Die Minderdurchblutung des Gewebes entsteht durch den thrombotischen Verschluss eines Koronargefäßes [4, 5]. Ein schnelles Wiedereröffnen des Gefäßes und Revaskularisierung des Myokards sind entscheidend für die klinischen Ergebnisse. Standardmethode ist die perkutane transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) [165]. Hierbei wird ein Ballonkatheter über einen Führungsdraht in das betroffene Gefäß bis zur Stelle der Stenose geschoben. Anschließend wird der Ballon mit Flüssigkeit gefüllt. Dadurch kommt es zur Erweiterung des Lumens und das betroffene Myokard kann wieder ausreichend mit sauerstoffreichem Blut versorgt werden. Die Ischämie und anschließende Reperfusion des Gewebes führen zu einer starken Entzündungsreaktion, aktivieren das angeborene und adaptive Immunsystem und bringen Reparaturmechanismen in Gang, welche letztlich in Vernarbungen des Gewebes und kardialen Remodeling münden [166-168].

4.2. Rolle mononukleärer Phagozyten im Ischämie/Reperfusionsschaden

Die Ischämie aktiviert die angeborene Immunantwort durch *toll-like receptor* (TLR)-medierte Vorgänge und fördert die Synthese von Chemokinen und Zytokinen in dem Infarktgebiet. TLRs werden von inflammatorischen und endothelialen Zellen sowie von Kardiomyozyten exprimiert. Sie sind in der Lage, abgestorbene Zellen anhand endogener *danger signals* aufzuspüren [169, 170] und zu binden. Durch die Aktivierung des *nuclear factor kappaB* (NF-κB) sind sie maßgeblich an der Induktion proinflammatorischer Mediatoren beteiligt [169-171]. Chemokine, wie zum Beispiel CCR2, stimulieren die Rekrutierung inflammatorischer Zellen in das infarzierte Gebiet [172-174], während Zytokine die adhäsive Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen fördern und die Transmigration inflammatorischer Zellen ins Infarktgebiet unterstützen. Das Rekrutieren inflammatorischer Zellen ist ein dynamischer, gut organisierter Prozess, was sich in einer sequenziellen Infiltration der Zellen in das erkrankte Gewebe widerspiegelt [7, 166, 167].

In den ersten vierundzwanzig Stunden nach Infarkt akkumulieren Neutrophile in dem infarzierten Gewebe. Anschließend kommt es zu einer massiven Rekrutierung von Monozyten [175, 176]. Nahrendorf *et al.* konnten zeigen, dass die Monozyten-Rekrutierung in zwei Phasen stattfindet (s. Abb. 7). In der ersten Phase (Tag 1-4) wandern vor allem $\text{Ly6C}^{\text{high}}\text{CCR2}^+\text{Cx3Cr1}^{\text{low}}$ Monozyten, welche phagozytische, proteolytische und inflammatorische Funktionen besitzen, ein. In der zweiten Phase (bis Tag 8) dominieren $\text{Ly6C}^{\text{low}}\text{CCR2}^-\text{Cx3Cr1}^{\text{high}}$ Monozyten, welche durch die Produktion von IL-10, TGF- β und dem *pro-angiogenic factor* VEGF (*vascular endothelial growth factor*) die Wundheilung fördern. Die sequenzielle Rekrutierung und die unterschiedlichen funktionellen Attribute deuten auf verschiedene Aufgaben im Heilungsprozess des Herzens hin. So ist es die Aufgabe der $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ Monozyten, abgestorbenes Gewebe und Zelldebris zu beseitigen, damit anschließend Ly6C^{low} Monozyten durch Angiogenese und Anlagerung von Kollagen den Heilungsprozess unterstützen können [177].

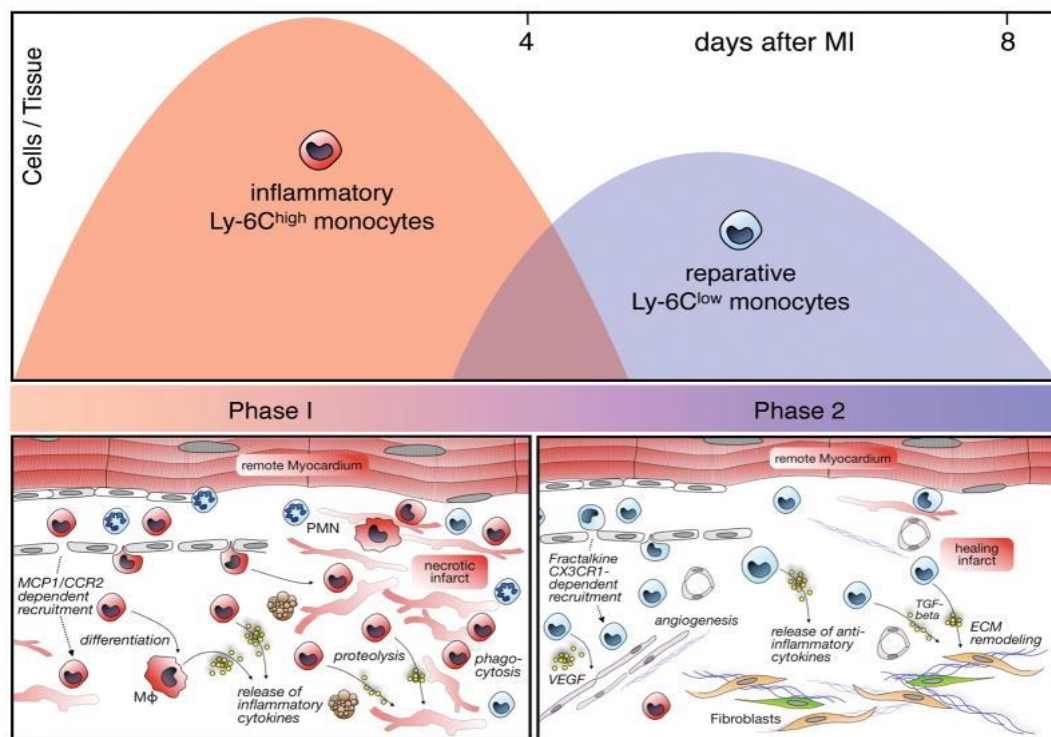


Abbildung 7: Darstellung der biphasischen Monozyten-Rekrutierung und unterschiedlicher funktioneller Attribute

In den ersten vier Tagen dominieren CCR2-abhängige $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ Monozyten, die phagozytische, proteolytische und inflammatorische Funktionen besitzen und sich zu Makrophagen und dendritischen Zellen differenzieren. Anschließend kommt es zu einer vermehrten Infiltration von Cx3Cr1-abhängigen Ly6C^{low} Monozyten, welche durch Angiogenese und Stimulation der Kollagensynthese und Anlagerung von Myofibroblasten die Wundheilung fördern [166].

Rekrutierte Ly6C^{high} Monozyten differenzieren sich im inflammatorischen Gewebe zu Makrophagen. Heidt *et al.* konnten bei Mäusen mit einer chronischen Ligatur der linken Koronararterie innerhalb von 24 Stunden einen kompletten Verlust der geweberesidenten Makrophagen feststellen. Vier Tage nach chronischem Myokardinfarkt hatte sich die Population durch rekrutierte Monozyten wieder regeneriert [86, 178]. Die Funktionen der Makrophagen während eines myokardialen Infarkts sind denen der Monozyten sehr ähnlich. Sie setzen sowohl inflammatorische Mediatoren wie IFN- γ , TNF- α , IL-1 und IL-6 als auch Matrix-Metalloproteasen und Cathepsine frei, welche den Umbau des nekrotischen Gewebes unterstützen. Zudem phagozytieren sie apoptotische und nekrotische Kardiomyozyten und Neutrophile sowie weiteren anfallenden Zelldebris. Durch die Sekretion des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *fibroblast growth factor* (FGF) induzieren sie die Angiogenese. Darüber hinaus transportieren sie reparative Enzyme und *pro-survival factors* wie Transglutaminasen und stimulieren durch die Produktion von TGF- β und FGF die Kollagensynthese und Ansammlung von Myofibroblasten [175, 176, 179]. Troidl *et al.* konnten zeigen, dass in den beiden verschiedenen Phasen nach Infarkt unterschiedliche Populationen von Makrophagen aktiviert werden (s. Abb. 8). In der frühen inflammatorischen Phase (bis Tag 4 nach Infarkt) sind vor allem klassisch aktivierte Makrophagen (M1) zu finden, welche eine starke Entzündungsreaktion auslösen. In der darauffolgenden Proliferationsphase werden Makrophagen alternativ aktiviert (M2). Diese fördern durch die Sekretion von Arginase 1 und 2 die Fibrosierung, Neovaskularisierung und die Wundheilung [78, 84, 180].

Die dendritische Zelle stellt einen potenten Immunregulator dar und ist in der Lage, unterschiedliche inflammatorische Zellen in der angeborenen und adaptiven Immunantwort aufeinander abzustimmen und zu kontrollieren [181-183]. Zang *et al.* konnten als Erste die Infiltration dendritischer Zellen in infarziertes Gewebe demonstrieren [184]. Anzei *et al.* beobachteten, dass am Tag 7 nach Myokardinfarkt ein Peak erreicht wird und die damit verbundene erhöhte Zellzahl mit einem verbesserten LV-Remodeling assoziiert war. cDC2 nehmen α -Myosin Fragmente, welche von nekrotischen Zellen freigesetzt werden auf und präsentieren sie autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen. Diese proliferieren und differenzieren sich daraufhin in IL-17 und IFN- γ produzierende Effektorzellen [185].

Durch ihre Fähigkeit, die Monozyten-/Makrophagen-Homöostase zu kontrollieren, tragen sie entscheidend zum Heilungsprozess nach einem Infarkt bei [186, 187].

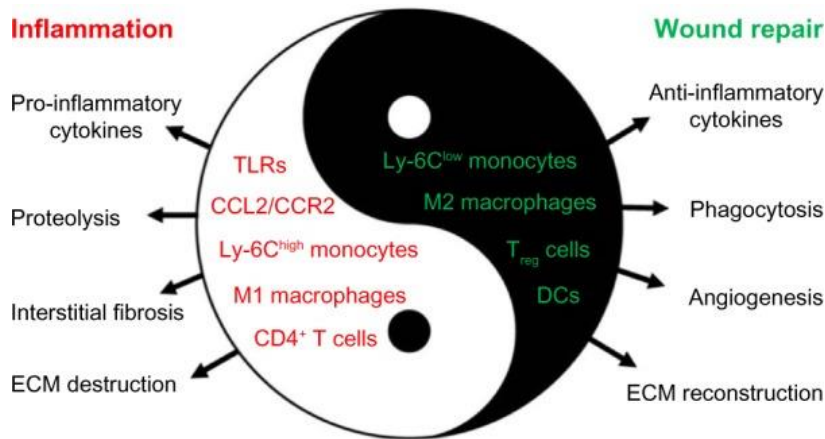


Abbildung 8: Darstellung der verschiedenen Abläufe und Funktionen in den beiden Phasen nach Myokardinfarkt

Die heterogenen Subtypen zeigen unterschiedliche Funktionen in der Pathophysiologie des Ischämie/Reperfusionsschaden und Infarktheilung [188].

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center, SAGE Publications Copyright © 2016

4.3. Kardiale Umbauprozesse nach Myokardinfarkt

In Folge einer Ischämie und dem abrupten Absterben zahlreicher Kardiomyozyten kommt es zur Inflammation, Migration von Zellen und Narbenbildung. Um den Verlust von funktionsfähigem Gewebe auszugleichen, werden strukturelle und funktionelle Veränderungen am Herzen durchgeführt, was als kardiales Remodeling bezeichnet wird [189, 190]. Das kardiale Remodeling kann in eine frühe und eine späte Phase eingeteilt werden (s. Abb. 9). Die Umbauprozesse der frühen Phase (Tag 1-3 nach Infarkt) betreffen vor allem die Infarkt- und Periinfarktzone, während die der späten Phase (ab Tag 3) den gesamten linken Ventrikel miteinbeziehen [189].

Der Ausfall von funktionsfähigem Gewebe führt zu einer verminderten Auswurfleistung. Es bleibt vermehrt Blut im Ventrikel zurück und die Kammer dilatiert. Aufgrund einer Zunahme der Wandspannung kommt es zu einer neurohumoralen Aktivierung und damit verbundenen gegenregulatorischen Maßnahmen, was zu einer kurzfristigen Stabilisierung der Herzfunktion führt. Der

lokale Einfluss neurohumoraler Systeme wie Angiotensin II, führt zu einer Myozytenhypertrophie sowie Fibrosierung und Versteifung des Gewebes [141, 189]. Der verstärkte Sauerstoffbedarf und die vermehrte Belastung der Herzwand fördern wiederum die Hypertrophie des Herzens. Das Herz befindet sich in einem *Circulus vitiosus*.

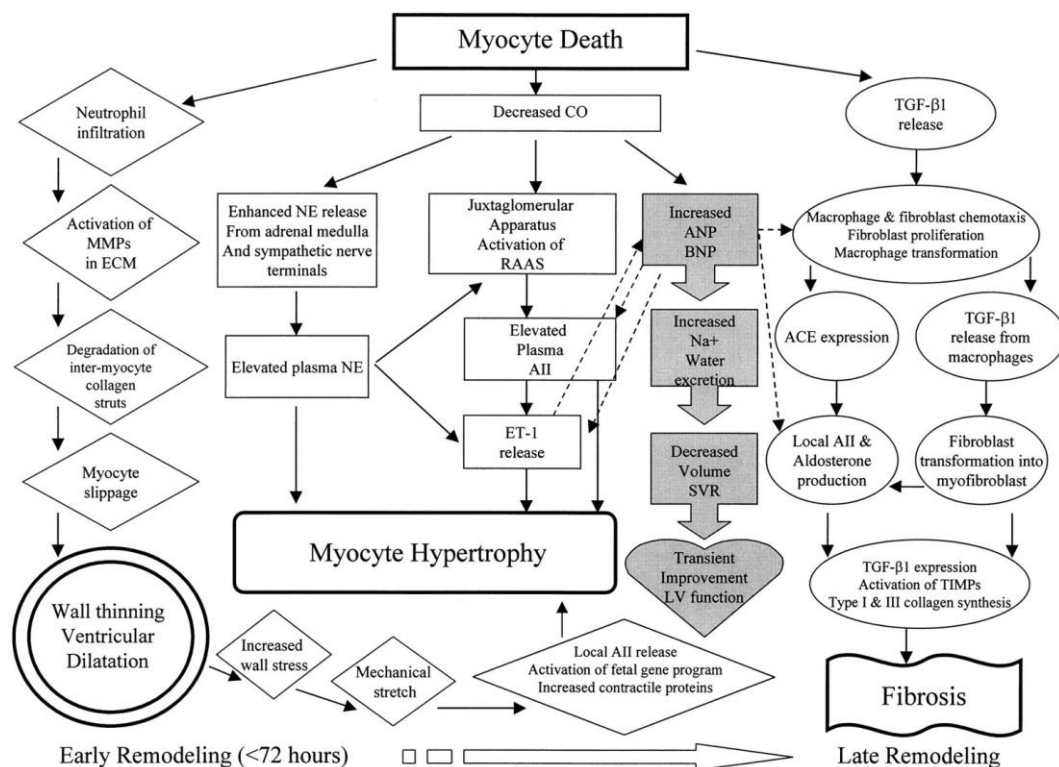


Abbildung 9: Darstellung der pathophysiologischen Vorgänge des kardialen Remodeling

Schematische Darstellung der verschiedenen Einflussfaktoren auf das ventrikuläre Remodeling. ECM: extrazelluläre Matrix, RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, CO: Herzzeitvolumen; SVR: systemischer vaskuläre Widerstand, LV: linker Ventrikel und AII: Angiotensin II [189].

Mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc. Copyright © 2010

Das Ausmaß des Remodeling ist proportional zur Größe des Infarktes [191] und abhängig vom initialen Perfusionsdefizit [192]. Folge des kardialen Remodeling ist eine linksventrikuläre Dysfunktion, was sich in einer verschlechterten Auswurfleistung, Muskelkontraktilität und erhöhtem LV enddiastolischem Volumen widerspiegelt [141].

4.4. Einfluss der mononukleären Phagozyten auf die Infarktheilung und das kardiale Remodeling

Entscheidend für die Infarktheilung ist eine geordnete und balancierte Immunreaktion. Auf der einen Seite ist eine exzessive und lang andauernde Infiltration inflammatorischer Zellen schädlich, da es zu einer starken Entzündungsreaktion kommt, was zur Zerstörung von Gewebe, interstitieller Fibrose und damit verbundenen kardialen Dysfunktion führt [172, 174, 193]. Andererseits ist das kontrollierte Rekrutieren von Monozyten und Makrophagen aufgrund der Phagozytose nekrotischer Zellen und das Fördern der Angiogenese sowie der Rekonstruktion der extrazellulären Matrix essenziell für die Wundheilung und Gewebereparatur [84, 180].

Nahrendorf *et al.* konnten in einer Studie zeigen, dass sich eine Ly6C^{high} Monozytose, welche sich in ApoE-defizienten Atherosklerose-Mäusen entwickelt, negativ auf die Infarktheilung auswirkt und ein kardiales Remodeling verstärkt. Durch die erhöhte Anzahl inflammatorischer Monozyten und Makrophagen wurde die Entzündungsreaktion verstärkt und die antiinflammatorische Heilungsphase hinausgezögert [177]. Eine Depletion der zirkulierenden Ly6C^{high} Monozyten in der frühen Phase nach Infarkt führte zur Ansammlung von Zelldebris und nekrotischem Gewebe. Wohingegen eine Depletion der Ly6^{low} Monozyten während der späten Phase nach Infarkt in einer reduzierten Kollagensynthese und Neoangiogenese resultierte [177, 194].

Courties *et al.* konnten beobachten, dass eine verringerte Infiltration von M1-Makrophagen, ausgelöst durch die reduzierte Expression des *interferon regulatory factor 5* (IRF5), welcher ein wichtiger Faktor für die M1-Polarisation darstellt, zu einer besseren Infarktheilung führt [262].

Mit Hilfe der CD11cDTR Maus konnten Anzei *et al.* erkennen, dass die Depletion von dendritischen Zellen die Produktion von inflammatorischen Zytokinen, das Rekrutieren myeloider Zellen und die Polarisation von M1-Makrophagen im infarzierten Gewebe steigerte. Die depletierten Tiere zeigten eine höhere Mortalität und LV-Remodeling. Zudem hatte die Depletion starke Auswirkungen auf die Wundheilung. Einerseits wurden Matrix-Metalloproteinasen aktiviert, andererseits kam es zur Ansammlung von Kollagen in dem Perinfarkt-Bereich. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass dendritische Zellen durch das Regulieren und Aktivieren von Neutrophilen und Monozyten eine lokale Schutzfunktion in der Inflammation nach

Infarkt übernehmen [187]. Eine andere Studie mit Zbtb46-DTR Mäusen jedoch zeigte, dass nach Depletion der klassischen dendritischen Zellen die Größe des Infarkts verringert und die Herzfunktion verbessert war. Dies korrelierte mit einer verminderten Anzahl von Makrophagen, Neutrophilen und T-Lymphozyten. Zudem war die Anzahl von CD3⁺ T-Zellen und TNF- α mRNA deutlich reduziert, was darauf schließen ließ, dass cDCs eine lokale Th1 Immunantwort induzieren. Eine Depletion der plasmazytoiden dendritischen Zellen hatte hingegen keinen Einfluss auf die Herzfunktion [195].

Dies zeigt, dass die Modulation von dendritischen Zellen einen neuen attraktiven Therapieansatz des LV-Remodeling nach Myokardinfarkt darstellen könnte, es aber noch weiterer Forschung bedarf, um die Funktion und genauen Wirkmechanismen der verschiedenen Subpopulationen dendritischer Zellen zu klären.

III. ZIELSETZUNG

Mononukleäre Phagozyten stellen ein mögliches Ziel für therapeutische Strategien in kardiovaskulären Erkrankungen dar. Doch dafür werden präzise Informationen darüber benötigt, welche Zelluntergruppen eine eher schädliche Funktion im Krankheitsverlauf übernehmen und welche die Reparaturmechanismen nach Erkrankung fördern.

Im Rahmen dieser Dissertation sollen erstmals Clec9a-abhängige Zellen im Herzen charakterisiert und ihre Rolle und Funktion im Verlauf der kardialen Inflammation untersucht werden.

1. Charakterisierung Clec9a-positiver Zellen unter Ruhebedingungen

Mit Hilfe des Mausstammes $\text{Clec9a}^{\text{cre/+}}\text{Rs26}^{\text{tomato/+}}\text{Cx3Cr1}^{\text{gfp/+}}$ sollen Clec9aCre-positive Zellen im Herzen mittels Immunhistologie und Durchflusszytometrie identifiziert und charakterisiert werden. Zudem ermöglichen weitere genetisch veränderte Mauslinien wie $\text{Clec9a}^{\text{cre/+}}\text{Rs26}^{\text{tomato/+}}\text{Zbtb46}^{\text{gfp/+}}$ und $\text{SiglecH}^{\text{gfp/+}}$ die Abgrenzung Clec9aCre-positiver Zellen zu verschiedenen Subpopulationen der mononukleären Phagozyten.

2. Verhalten Clec9a-positiver Zellen nach erhöhtem Zellumsatz im Gewebe

Um das Verhalten Clec9aCre-positiver Zellen nach einem erhöhten Zellumsatz im Gewebe sowie eine mögliche Rekrutierung zu untersuchen, werden zwei unterschiedliche Modelle genutzt. Während in dem einen Modell gezielt gewebeständige Makrophagen mittels Csfr-1 Inhibition depletiert werden, können in dem Chimären Modell die Clec9aCre-Markierung und Rekrutierung nach Knochenmark-Ablation untersucht werden.

3. Charakterisierung Clec9a-positiver Zellen in kardialer Inflammation

Die Charakterisierung Clec9a-markierter Zellen erfolgt in zwei verschiedenen Inflammationsmodellen. Phänotypische und funktionelle Merkmale sowie das Verhalten Clec9a-positiver Zellen werden in den Entzündungsprozessen der durch Angiotensin II-induzierten kardialen Fibrose und des Ischämie/Reperfusionsschadens nach Myokardinfarkt untersucht.

4. Funktion Clec9a-positiver Zellen in dem Modell der kardialen Fibrose und des Myokardinfarktes

Mit Hilfe des Mausstammes Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+}Rosa26^{DTR}, bei welchem Clec9a-markierte Zellen mittels Diphtherie-Toxin Gabe gezielt ausgeschaltet werden können, soll die Rolle und Funktion Clec9a-positiver Zellen in kardialen Entzündungsprozessen untersucht werden. Neben histologischer und durchflusszytometrischer Untersuchung wird die Auswirkung einer Clec9a-Depletion auf den Krankheitsverlauf und das kardiale Remodeling mittels Echokardiografie und Positron-Emissions-Tomografie (PET) bestimmt.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Die Versuche, welcher dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden an dem Versuchstier Maus durchgeführt. Aufgrund der kurzen Reproduktionszeit bei einer gleichzeitig hohen Anzahl an Nachkommen, der einfachen Handhabung, sowie des geringen Platzbedarfes und der daraus resultierenden niedrigen Haltungskosten, eignet sich die Maus sehr gut als Versuchstier. Zudem steht eine Vielzahl transgener Linien zur Verfügung, die sich durch ihre genetische Homogenität innerhalb der Tiergruppen auszeichnen.

Um die Heterogenität mononukleärer Phagozyten in kardiovaskulären Entzündungsprozessen darzustellen, wurden verschiedene Mausstämme und Modelle verwendet, die im Folgenden näher beschrieben werden.

Die Tierversuche wurden gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Fassung vom 18.5.2006, letzte Änderung am 17.12.2018 durch Artikel 1) und von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: ROB- 55.2- 2532.Vet_02-13-93; ROB-55.2-2532.Vet_02-13-76; ROB-55.2-2532.Vet_02-19-1; ROB-55.2-2532.Vet_02-19-17).

1.1. Tierhaltung und Zucht

Die verwendeten Versuchstiere wurden unter SPF-Bedingungen (*specific pathogen free*) im Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung gezüchtet und anschließend in der Tierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums untergebracht. Hier wurden die Tiere, je nach Gewicht, in Gruppengrößen von zwei bis vier Tieren in Standard Makrolon Käfigen vom Typ II long (Greenline IVC SealsavePLUS, Technikplast, Buguggiate, Italy) in einem IVC System (Individually Ventilated Cage) gehalten. Durch eine Gebläseeinheit (SmartFlow, Technikplast) konnte die relative Luftfeuchtigkeit von 55+/- 5% und eine mittlere Temperatur von 22+/- 1°C innerhalb der Käfige aufrechterhalten werden. Die Beleuchtung war auf einen geregelten Tag-Nacht-Rhythmus mit einer zwölfstündigen Hell-Dunkel-Phase eingestellt. Neben grober Einstreu und einem Maushaus aus Pappkarton, standen den Tieren Holzwolle, Nestlets sowie Kosmetiktücher als Beschäftigungs- und Nistmaterial zur Verfügung. Wasser und pelletiertes Alleinfuttermittel (ssniff

Spezialdiäten GmbH, Soest) wurde den Tieren *ad libitum* bereitgestellt. Das Umsetzen der Mäuse in frische, autoklavierte Käfige fand einmal pro Woche statt und erfolgte unter einer Käfigwechselstation (Techniplast, Varese, Italy) mit einer Frontluftbarriere von 30 m/s. Um eine möglichst geringe Stress- und Keimbelastung der Tiere zu gewährleisten, war der Zugang zu den Räumlichkeiten nur berechtigten Personen unter Tragen von Schutzkleidung, so wie Mundschutz, Handschuhe und Überzieher, erlaubt. Der Gesundheitsstatus der Tiere wurde vierteljährlich anhand der FELASA-Richtlinien nach dem erweiterten FELASA-Protokoll überprüft. Zusätzlich erfolgten stichprobenartige Untersuchungen nach dem kleinen FELASA-Protokoll.

1.2. Mausstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Mausstämme verwendet:

- Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+} Cx3Cr1^{gfp/+}
- SiglecH^{gfp/+}
- Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Zbtb46^{gfp/+}
- Mx1Cre;Myb^{flox/flox}
- C57BL/6J
- Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+}Rosa26^{DTR}

1.2.1. Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+}

Rosa26 wird ubiquitär in embryonalen und adulten Geweben transkribiert und translatiert. Mäuse des Stammes Rosa26^{tomato} besitzen am Rosa26-Genlocus eine LoxP-flankierte *STOP*-Sequenz, welcher eine proteinkodierende Sequenz für das rot fluoreszierende Protein (Tomato) nachgeschaltet ist. Werden diese Mäuse mit einer Cre-Rekombinase exprimierenden Linie verpaart, wird die *STOP*-Sequenz herausgeschnitten und das rot fluoreszierende Protein in den Zellen, welche die Cre-Rekombinase exprimieren, gebildet. Aufgrund ihrer Fluoreszenz können diese Zellen in durchflusszytometrischen oder immunhistologischen Untersuchungen identifiziert werden [196]. In Verbindung der Clec9a^{cre} mit der Rosa26^{tomato} Reportermaus wird der rote Fluoreszenzfarbstoff Tomato nach Aktivierung der Cre-Rekombinase Clec9a-abhängig exprimiert. Mit Hilfe dieses Mausstammes können dendritische Zellen anhand ihrer Ontogenese differenziert werden. Der Chemokin-Rezeptor Cx3Cr1 (auch bekannt als Fraktalkine-Rezeptor), wird

insbesondere auf myeloiden Zellen exprimiert [197]. In der Cx3Cr1^{gfp} Maus wird das grüne Fluoreszenzprotein GFP unter der Kontrolle des endogenen Cx3Cr1-Locus exprimiert (GFP *knock-in*). Dies erlaubt die Untersuchung Cx3Cr1-(GFP) positiver Zellen *in vitro* und *in vivo*. Da in Geweben Cx3Cr1-positive Zellen im wesentlichen Makrophagen oder dendritische Phagozyten sind, können in Kombination mit dem Mausstamm Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+} nun erstmalig diese Populationen getrennt voneinander erfasst und verglichen werden.

1.2.2. SiglecH^{gfp}

Siglecs (*sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*), eine Gruppe Sialinsäure bindender Lectine, gehören zu der Familie von immunregulatorischen Zelloberflächenproteinen [198]. SiglecH wird ausschließlich auf Interferon bildenden Zellen, wie den plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs), exprimiert [199]. In dem SiglecH^{gfp} *knock-in* Mausstamm, können pDCs anhand der GFP-Expression detektiert und zu anderen Zellgruppen abgegrenzt werden [200].

1.2.3. Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Zbtb46^{gfp/+}

Der Zink-Finger Transkriptionsfaktor Zbtb46 wird ausschließlich von klassischen dendritischen Zellen (cDCs) und ihren Vorläufern (pre-cDCs) exprimiert. In dem *knock-in* Mausstamm Zbtb46^{gfp} wird die Translationsinitiationsstelle und Bindungsdomäne des Zink-Fingers durch das grün fluoreszierende Protein ersetzt. Dies ermöglicht die Detektion Zbtb46-positiver Zellen [201]. In der Clec9a^{cre}Rs26^{tomato} Maus werden Zellen mit aktivem Clec9a-Promotor irreversibel markiert. Der Fluoreszenzfarbstoff Tomato wird, unabhängig von einer aktuellen Clec9a-Expression, konstitutiv in den Zellen exprimiert. Durch die Verkreuzung mit der Zbtb46^{gfp} Linie, können ausdifferenzierte DCs innerhalb der Clec9a-Population identifiziert werden.

1.2.4. Mx1^{cre}Myb^{flox/flox}

In der Mx1^{cre} Mauslinie steht die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des ubiquitär vorkommenden Promoters Mx-1, der durch Applikation von Interferon oder rekombinanten poly(I:C), einem synthetischen Analogon doppelsträngiger RNA, aktiviert werden kann [202]. Durch eine repetitive intraperitoneale Injektion von poly(I:C) in Mx1^{cre}Myb^{flox/flox} Mäuse wird der für die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen essenzielle Transkriptionsfaktor Myb, ausgeschaltet (konditioneller *knock-out*) [12, 203-205]. Die daraus resultierende

Myeloablation wird durch eine Knochenmarkstransplantation von Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+} Spendertieren behoben. Mit Hilfe dieses Mausmodells können knochenmarkabhängige und knochenmarkunabhängige mononukleäre Phagozyten charakterisiert und die Rekrutierung Clec9a-abhängiger Zellen untersucht werden. Dabei werden die Spendertiere durch eine GFP- bzw. Tomato-Expression differenziert.

1.2.5. C57BL/6J

Der Wildtypstamm C57BL/6J ist der am häufigsten genutzte Inzuchtstamm und genetischer Hintergrund vieler transgener Linien [206]. Dieser Mausstamm diente als Empfängertier für die Herstellung von Bestrahlungschimären.

1.2.6. Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+} Cx3Cr1^{gfp/+}Rosa26^{DTR}

Tiere der Linie Rosa26^{DTR} besitzen am Rosa26-Locus einen simianen Diphtherie-Toxin Rezeptor (DTR). Mit Hilfe einer vorgeschalteten Lox-P flankierten *STOP*- Sequenz wird die ubiquitäre Expression des Rezeptors verhindert [207]. Durch die Verpaarung mit der Clec9a^{cre} Maus wird der Diphtherie-Toxin Rezeptor aktiviert und Zellen mit aktivem Clec9a-Promotor sensitiv gegenüber Diphtherie-Toxin gemacht. Dies ermöglicht mittels Diphtherie-Toxin Gabe die spezifische Depletion der Clec9a-Zellpopulation, wodurch ihre Rolle in kardialen Entzündungsprozessen näher untersucht werden kann [208].

2. Anästhesie

Unter Allgemeinanästhesie versteht man einen durch Anästhetika bedingten reversiblen Zustand der Bewusstlosigkeit (Hypnose), der Skelettmuskelentspannung (Relaxation) und der Schmerzlinderung (Analgesie). Anästhetika werden nach ihrer klinisch-anästhetischen Eigenschaft in Sedativa, Hypnotika, sowie Analgetika eingeteilt und *per injectionem* oder *per inhalationem* verabreicht [209].

2.1. Narkotika

Um den gewünschten Zustand zu erreichen, wurde eine Tripelnarkose, bestehend aus den Injektionsanästhetika Medetomidin, Midazolam und Fentanyl, eingesetzt. Durch deren Synergismen untereinander konnten die Einzeldosen reduziert und Nebenwirkungen eingeschränkt werden.

Eine gute Steuerbarkeit und die Möglichkeit einer vollständigen Antagonisierung sind weitere positive Aspekte dieses Narkoseregimes [209].

Medetomidin (Dorbene vet, zoetis Deutschland GmbH, Berlin) wurde in einer Dosierung von 0,5 mg/kg KGW eingesetzt. Es gehört zu der Gruppe der α_2 -Adrenozeptor-Agonisten und wirkt dosisabhängig sedativ und analgetisch. Aufgrund von der Hemmung der interneuronalen Reizübertragung im Rückenmark hat es zudem eine gut muskelrelaxierende Wirkung. Medetomidin ist mittels Atipamezol kompetitiv antagonisierbar [209].

Midazolam (Midazolam, B. Braun, Melsungen), ein Vertreter der Benzodiazepine, wirkt sedativ und muskelrelaxierend. Außerdem besitzt es eine beruhigende und antikonvulsive Eigenschaft. Es wurde in einer Dosierung von 5 mg/kg KGW verwendet und mit Flumazenil antagonisiert [209].

Das stark analgetisch wirkende Fentanyl (Fentadon, Albrecht GmbH Aulendorf) wurde als dritter Bestandteil der Injektionsnarkose eingesetzt. Das synthetisch hergestellte Opioid ist 100-fach potenter als Morphin. Die Dosierung betrug 0,05 mg/kg KGW. Seine Wirkung kann durch den Opiatantagonist Naloxon aufgehoben werden [209].

2.2. Durchführung der Narkose

Um den Tieren die intraperitoneale Injektion der Kombinationsnarkose zu erleichtern, wurde eine Narkoseeinleitung mittels Isofluran (Isofluran CP, cp-pharma, Burgdorf) vorgenommen. Dafür wurde die Maus in eine durchsichtige Box aus Plexiglas verbracht, die über zwei Schläuche mit einem Verdampfer (Datex-Ohmeda Isotec 5, UniVet Porta Fa. Groppler, Deggendorf), sowie einer Absaugvorrichtung verbunden war. Über den Verdampfer strömte ein 5 %iges Sauerstoff-Isoflurangemisch in die Kammer. Nach Verlangsamung der Atmung und Erlöschen des Stellreflexes, wurde die Maus aus der Box genommen und die Injektionsnarkose mit einer 1 ml Spritze (Injekt-F, B.Braun, Melsungen) und 30 G Kanüle (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde sie in eine Schlafbox gelegt, um sie vor akustischen und visuellen Reizen zu schützen. Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums (fehlender Zwischenzehenreflex, sowie Fehlen von Schmerzreflexen bei Stimulation des äußeren Gehörgangs) konnte mit dem operativen Eingriff begonnen werden.

2.3. Narkose- und Schmerzmanagement

Das Tier war für die gesamte Narkosedauer auf einer Wärmeplatte (EHE-3503-CU-5WCR, FMI Föhr Medical Instruments, Seeheim/Ober-Beerbach) positioniert, um eine Hypothermie zu verhindern. Um einem Austrocknen der Hornhaut vorzubeugen, wurde zu Beginn der Narkose Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen) aufgetragen. Durch Beobachtung der Atmung und regelmäßiges Prüfen des Flexorreflexes wurde die Narkosetiefe beurteilt und bei Bedarf nachinjiziert.

Da Fentanyl nur eine Wirkdauer von 20-30 min. hat, eignet es sich nicht zur postoperativen Analgesie [209]. Deswegen wurde zur Linderung von postoperativen Schmerzen das Opiat Buprenorphin (Buprenovet, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) in einer Dosierung von 0,1 mg/kg KGW verabreicht. Die Injektion erfolgte hierbei subkutan in die Nackenfalte. Seine analgetische Potenz ist etwa 30-mal stärker als die von Morphin und seine Wirkdauer beträgt 8-10 Stunden [209]. Aufgrund dessen wurde der Opiatantagonist Naloxon nicht verwendet. Die Narkose wurde nach Beenden des Eingriffes lediglich mit den Wirkstoffen Atipamezol (Alzane, zoetis Deutschland GmbH, Ulm; Dosierung 2,5 mg/kg) und Flumazenil (Flumazenil, Hikma Pharma GmbH, Gräfelfing; Dosierung 0,5 mg/kg) antagonisiert.

3. Erstellen von Knochenmarkchimären

3.1. Definition Knochenmarkchimäre

Als Chimäre wird ein aus genetisch verschiedenen Zelllinien oder Geweben bestehender Organismus bezeichnet [210]. Bei sogenannten Knochenmarkchimären erfolgt nach Ablation des Knochenmarks eine Rekonstitution mit Stammzellen eines genetisch nicht verwandten Individuums.

3.2. Ablauf der Knochenmarktransplantation

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Transplantationsmodelle verwendet. Ein genetisches Modell ($\text{Mx1CreMyb}^{\text{flox/flox}}$) und ein Bestrahlungsmodell (C57BL/6J) (s. Abb. 10).

3.2.1. KM-Ablation der Bestrahlungschimäre

Um das endogene Knochenmark zu zerstören, erfolgte eine zweimalige Ganzkörperbestrahlung der Empfängertiere des Wildtypstammes C57BL/6J. Dafür wurden die Tiere in ein Rondell aus Kunststoff gesetzt, wobei die Mäuse durch Kammern voneinander getrennt waren. Das Rondell mit den Mäusen wurde in das Bestrahlungsgerät (Xstrahl Cabinet Irradiator, RS225, Camberley, United Kingdom) verbracht und bei 6 Gray (Gy) für 3 Minuten und 44 Sekunden bestrahlt. Nach vier Stunden wurde dieser Vorgang wiederholt und im Anschluss das Knochenmark der Spendertiere transplantiert. Das angewandte Bestrahlungsregime eignet sich optimal für Knochenmarktransplantationen, da es neben einer hohen Überlebensrate, zu einer vollständige Rekonstitution mit Spenderzellen führt [211].

3.2.2. KM-Ablation der Mx1CreMyb^{flox/flox} Chimäre

Um in den Empfängertieren des Stammes Mx1CreMyb^{flox/flox} eine Myeloablation hervorzurufen, wurde den Tieren 10 µg poly(I:C)/g KGW (Poly(I:C) high molecular weight, InvivoGen, USA) injiziert. Durch die konditionelle Deletion des Transkriptionsfaktors Myb können sich die hämatopoetischen Stammzellen nicht erhalten und differenzieren. So kommt es zu einer Depletion dieser Zellen und die hämatopoetische Nische wird in dem Knochenmark für neue Empfängerzellen frei. Die intraperitonealen Injektionen des Wirkstoffes fanden am Tag 0, 2, 4 und 6 statt. Die Knochenmarktransplantation erfolgte am Tag nach der letzten poly(I:C)-Injektion. Eine weitere Konditionierung, wie zum Beispiel eine Bestrahlung, war nicht erforderlich [205]

3.2.3. Entnahme und Aufbereitung der KM-Zellen zur Transplantation

Das Verhältnis von Spender zu Empfänger betrug 1:4. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Tiere sowohl im Alter als auch im Geschlecht übereinstimmten.

Die Spendertiere der Linie Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+} wurden in tiefer Isofluran-Narkose durch Genickbruch getötet. Nach Desinfektion und Absetzen der Vorder- und Hintergliedmaßen, wurden diese von Haut und Muskulatur befreit und Femur und Humerus sowie Tibia, Radius und Ulna vorsichtig frei präpariert. Die intakten Knochen wurden anschließend in eine mit sterilem PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gefüllte Petrischale (Falcon®, Corning Science, Mexiko) auf Eis gegeben.

Unter einer Sterilbank (Airflow Typ HS12, Kendro Laboratory Products, Hanau) wurden die Knochen an den Epiphysen eröffnet und mit einer 10 ml Spritze (BD Discardit II Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA), gefüllt mit phosphatgepufferter Salzlösung + 2 % FBS (FBS Superior, Biochrom GmbH, Berlin) und einer 26G Nadel (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) gespült. Die gewonnenen Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mittels einer 10 ml Spritze und 20G Nadel (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) vereinzelt. Anschließend wurden sie durch ein 70 µm Sieb (Cell strainer, 70 µm Nylon, Falcon®, Corning, NY, USA) gefiltert und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (50 ml Polypropylen Conical Tube, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) aufgefangen. Nachdem das Röhrchen mit der Pufferlösung auf 30 ml aufgefüllt wurde, erfolgte ein Zentrifugieren für 7 min. bei 300 x g (rcf) und 4°C (Eppendorf Zentrifuge 5810R). Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in 3 ml Ammoniumchloridlysepuffer (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 1mM EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) resuspendiert und für 5 min zur Lysierung der Erythrozyten inkubiert. Anschließend wurden 3 ml PBS hinzugefügt, um den Erylysevorgang zu stoppen. Erneut wurde die Probe wie oben beschrieben zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellzahl unter zur Hilfenahme einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dafür wurde 1 µl der Probe in 99 µl phosphatgepufferter Salzlösung + 0,5 % BSA (Albumin Fraktion V, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gegeben. 10 µl dieser Verdünnung wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gefärbt. Anschließend wurde die Zählkammer mit 10 µl Zellgemisch belegt und die Zellzahl mit Hilfe der Formel (*Gesamtzahl der 64 kleinen Quadrate*/4*100*2*10⁴ = *Zellzahl/ml*) bestimmt. Die Zellsuspension wurde daraufhin mit PBS so verdünnt, dass circa 10 Mio. Zellen in einem Volumen von 150 µl injiziert werden konnten.

3.2.4. Schwanzvenenapplikation

Die Knochenmarktransplantation erfolgte über einen Schwanzvenenkatheter. Hierzu wurde ein circa 5 cm langer Polyethylenschlauch (Fine Bore Polythene Tubing, 0,28 mm ID 0,61 mm OD Smiths Medical International, Hythe, USA) mit zwei Kanülen (30G, BD Mikrolance, Becton Dickson and Company, Franklin Lakes, USA) bestückt. Dabei wurde die Spitze der einen Kanüle vom Konus

abgetrennt und auf die vordere Seite des Schlauches gesetzt, die zweite Kanüle wurde in das andere Ende gesteckt. Anschließend wurde der Schlauch mit NaCl (NaCl 0,9%, B.Braun, Melsungen) gespült, um ihn auf Dichtigkeit zu überprüfen. War dies gegeben, wurde die Spritze (1 ml, Injekt-F, B.Braun, Melsungen) mit den Knochenmarkzellen aufgesteckt.

Um die Injektion vornehmen zu können, wurden die Mäuse in einem Restraîner (Tailveiner Restraîner for Mice, TV-150 STD, Braintree Scientific, USA) fixiert. Hierbei sitzen die Mäuse in einer Röhre, wobei der Schwanz frei liegend bleibt. Mittels Zeige- und Mittelfinger wurden die Gefäße proximal der Schwanzbasis gestaut und eine der beiden lateralen Schwanzvenen (*Venae cocygea lateralis*) aufgesucht. Nach Desinfektion der Injektionsstelle (Octenisept, Schülke GmbH, Norderstedt), wurde der Katheter mithilfe eines Nadelhalters in die Vene platziert und die Zellen langsam injiziert. Nach erfolgreicher Injektion wurde die Spritze vorsichtig gewechselt und mit circa 50 µl NaCl nachgespült. Danach wurde der Venenkatheter entfernt und die Injektionsstelle mit einem Tupfer abgedrückt, bis die Blutung gestillt war.

3.3. Erfolgskontrolle der Knochenmarktransplantation

Der Erfolg der Transplantation wurde anhand des Blutchimärismus beurteilt. Mittels FACS-Analyse wurde überprüft, wieviel Prozent der Zellen im Blut durch Spenderzellen ersetzt waren (siehe Kapitel IV.8).

Hierfür wurde den Mäusen 6 Wochen nach Transplantation circa 50 µl Blut abgenommen. Die Blutentnahme erfolgte hierbei über die *Vena facialis*. Um möglichen Schmerzen entgegenzuwirken, erhielten die Tiere 30 min vor Beginn Buprenorphin subkutan in die Nackenfalte. Für eine möglichst stressfreie Punktion wurden die Tiere kurz mittels Isofluran betäubt. Die Vene wurde etwas oberhalb und leicht kaudal des sogenannten Freckle, einer haarlosen Stelle am Unterkiefer, während der Rekonvalenzphase der Isofluran-Narkose mit einer Lanzette (Solofix, B.Braun, Melsungen) punktiert und das Blut in einem EDTA-Röhrchen (Microvette, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) aufgefangen. Anschließend wurde die Blutung unter Zuhilfenahme eines Wattestäbchens gestillt.

Knochenmarkchimären Modell

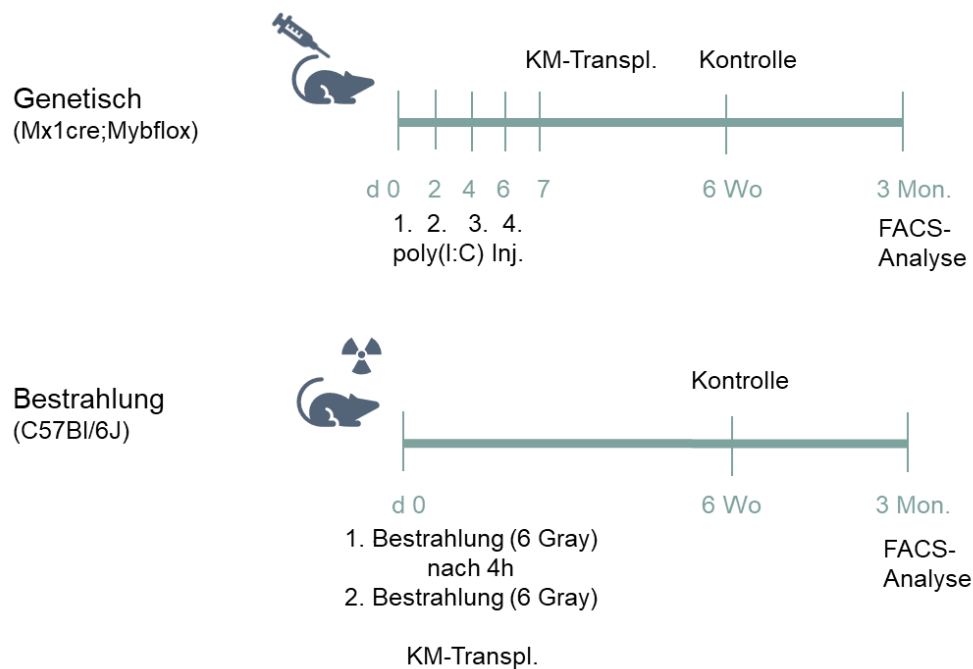


Abbildung 10: Überblick des zeitlichen Ablaufes des Erstellens von Knochenmarkchimären

KM-Ablation im genetischen bzw. Bestrahlungsmodell, nach 6 Wochen Erfolgskontrolle der Knochenmarktransplantation im peripheren Blut, nach 3 Monaten Organentnahme und durchflusszytometrische Untersuchung.

Aufgrund der vorübergehend erhöhten Infektanfälligkeit erhielten alle Tiere für einen Zeitraum von vier Wochen, beginnend drei Tage vor der KM-Ablation, angesäuertes (pH3,1) und mit Antibiotika (Cotrim-ratiopharm Ampullen, SF 480 mg/5 ml, Ratiopharm GmbH, Ulm) versetztes Trinkwasser. Zudem wurden die Tiere über drei Wochen hinweg engmaschig anhand eines *Score Sheets* (Überwachungsbogen) kontrolliert.

4. Depletionsmodelle

4.1. Depletion von Makrophagen mittels Csf1r-Inhibition

Der *Colony-stimulating factor 1* (Csf1) kontrolliert das Wachstum und die Differenzierung von Makrophagen. Wird der *colony-stimulating factor 1 receptor* (Csf1r) blockiert, kommt es zu einer vollständigen Depletion der geweberesidenten Makrophagen [212] [213]. Um eine Depletion zu induzieren, erhielten die Tiere

über drei Tage *ad libitum* ein Diätfutter, welches mit dem Csf1r-Inhibitor PLX5622 (AIN-76A Rodent Diet with 1,200 mg PLX5622 / kg, Research Diets, New Brunswick, USA) angereichert war [214]. Die Organentnahme erfolgte am Tag der letzten Futtergabe sowie nach einer siebentägigen Regenerationszeit (hier erhielten die Tiere unbehandeltes Futter der gleichen Firma), um das Verhalten Clec9Cre-positiver Zellen während einer Makrophagen-Depletion beziehungsweise nach erhöhtem Makrophagen-Umsatz zu untersuchen (s. Abb. 11) [214].

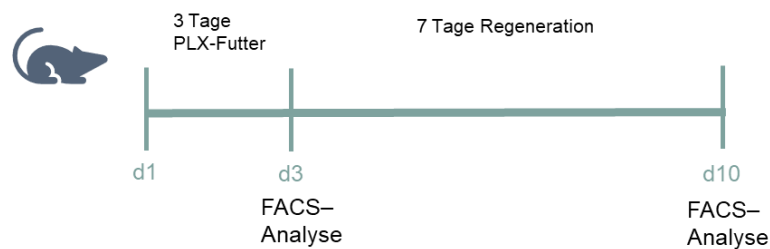


Abbildung 11: Darstellung des zeitlichen Ablaufes des Makrophagen-Depletion Modells mittels Csf1r-Inhibition

Die Tiere erhielten über 3 Tage *ad libitum* PLX5622 Futter, um den Csf1-Rezeptor zu blockieren. Im Anschluss wurden sie mit unbehandeltem Kontrollfutter gefüttert. Die durchflusszytometrische Analyse der Herzen erfolgte am Tag der letzten Futtergabe sowie nach einer Woche Regenerationszeit.

4.2. Depletion Clec9a-positiver Zellen mittels Diphterie-Toxin

Durch die Verpaarung der Clec9a^{cre} Maus mit dem Rosa26^{DTR} Mausstamm, werden Clec9a-exprimierende Zellen sensitiv gegenüber Diphterie-Toxin gemacht. Dabei handelt es sich um einen potenten Inhibitor der Proteinbiosynthese. Im Gegensatz zum Menschen sind Mäuse unempfindlich gegenüber dem Toxin. Dies ermöglichte die spezifische Depletion der Clec9a-Zellpopulation mittels Diphterie-Toxin (DT) Gabe, wodurch ihre Rolle in kardialen Entzündungsprozessen näher untersucht werden sollte. Hierfür wurde den Tieren 25 ng DT/g KGW intraperitoneal injiziert. Die Injektion erfolgte in den Inflammationsmodellen täglich über einen Zeitraum von sieben Tagen. Begonnen wurde ein Tag vor dem chirurgischen Eingriff (s. Abb. 12).

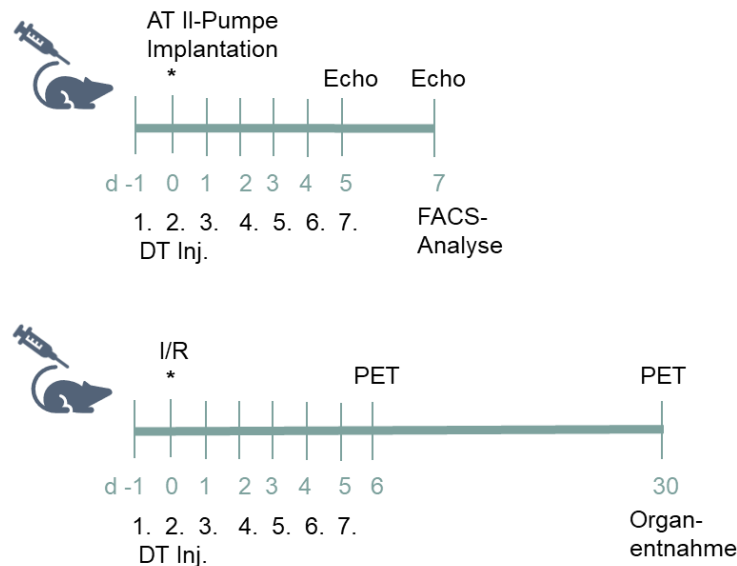


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Diphtherie-Toxin Regimes im AT II und Ischämie/Reperfusion Modell

Um Clec9aCre-positive Zellen in den Inflammationsmodellen zu depletieren, wurde den Tieren einmal täglich über den Zeitraum von sieben Tagen 25 ng DT/g KGW intraperitoneal injiziert. Die erste Injektion erfolgte am Tag vor der Pumpen-Implantation bzw. vor Induktion eines Myokardinfarkts.

5. Inflammationsmodelle

5.1. Modell der kardialen Fibrose (AT II-Infusion)

Die Angiotensin II-Applikation ist ein etabliertes Modell, um in der Maus experimentell eine Hypertension, kardiale Fibrose und Hypertrophie hervorzurufen [215-217]. Für die kontinuierliche Gabe von Angiotensin II (Angiotensin II human 10 mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde den Tieren eine osmotische Pumpe (alzet micro-osmotic pump, Modell 1002, dures Corporation, Cupertino, USA) unter die Haut implantiert (s. Abb. 13). Dabei wurde der Wirkstoff in einer Dosierung von 1,8µg/kg KGW/min mit einem Volumen von 0,21 µl/h abgegeben [218]. Die Pumpen der Kontrolltiere wurden anstelle des Angiotensins mit der Trägerlösung (0,9% NaCl) befüllt.

Die Tiere wurden für diesen Eingriff mittels Isofluran narkotisiert. Um eine ausreichende Schmerzabdeckung zu gewährleisten, wurde ihnen 30 min vor Beginn Buprenorphin subkutan injiziert. Die Mäuse wurden auf eine Wärmematte gelegt, um die Körpertemperatur konstant aufrecht zu erhalten. Zudem wurde ihnen eine Augensalbe appliziert, um ein Austrocknen der Hornhaut zu verhindern.

Zunächst wurden die Haare im Bereich des Nackens mithilfe einer Enthaarungscreme (Enthaarungscreme asid-med, Asid Bonz, Herrenberg) entfernt und die Haut anschließend mit Jod (Braunol, B.Braun AG, Melsungen) desinfiziert. Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz, die anhand des Zwischenzehenreflexes überprüft wurde, erfolgte ein circa 1 cm langer Hautschnitt quer zur Wirbelsäule. Mit Hilfe einer Schere wurde neben der Wirbelsäule stumpf die Unterhaut von der Muskulatur präpariert. Anschließend wurde eine mit AT II oder NaCl befüllte Pumpe in die subkutane Tasche parallel zur Wirbelsäule platziert. Dabei wurde die Pumpe möglichst weit nach kaudal geschoben, um eine Bewegungseinschränkung im Nackenbereich und eine Spannung auf der Naht zu verhindern. Der Verschluss des Hautschnittes erfolgte mittels Einzelknopfteften (7-0 Prolene).



Abbildung 13: Implantation einer AT II- Pumpe

Für eine kontinuierliche Angiotensin II-Infusion wurde eine osmotische Mikropumpe subkutan im Bereich des Nackens implantiert.

Die Dauer der Operation betrug nur etwa 5 min. Die Inhalationsnarkose ermöglichte eine rasche Rekonvaleszenz der Tiere. Spätestens 10 Tage nach Implantation der Pumpen wurde der Versuch beendet und die Organe der Mäuse für durchflusszytometrische und histologische Untersuchungen entnommen.

In diesem Zeitraum wurde der Zustand der Tiere regelmäßig anhand eines Überwachungsbogens (*Score Sheet*) kontrolliert (s. Abb. 14).

		Datum Beginn des chronischen Tierversuchs:						
		Tier-Identifikations Nummer:						
		Tier-Alter bei Versuchsbeginn						
		Gewicht:						
				Scorezeitpunkt (SZP)	d0 (1.)	d0 (2.)	d1	
				Uhrzeit:				
				Datum:				
Parameter	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3				
Allgemeines Befinden	gut (normale Aktivitäten, z.B. Fressen, Ruhen, Bewegen)	geringgradig reduziert (gewölbter Rücken, gesträubtes Fell, bewegt sich verlangsamt)	mittelgradig reduziert, (kein Explorationsverhalten, gewölbter Rücken, Atmung schnell und flach)	hochgradig reduziert, sichtlich abgemagert, dehydriert, apathisch, Maulatmung				
Körpergewichtsreduktion prozentual zum Ausgangsgewicht	0-5%	6-10%	11-15%	> 15%				
Wundheilung	Nahtbereich reizlos	leicht gerötet, trocken	stark gerötet, warm, nässend	klaffend, geschwollen, eitrig				
Pflegezustand	Fell: glatt, glänzend. Körperöffnungen sauber	verminderte oder übersteigerte Fellpflege	Fell: stumpf, matt, struppig	Fell: aufgestellt, verklebt Körperöffnungen: verschmutzt				
Verhalten	aktiv, Nestbau, interessiert an der Umgebung, munter	reduzierte Aufmerksamkeit, Reaktion auf äußere Reize	Selbstisolation, Reaktion auf äußere Reize	Apathisch, keine Reaktion auf äußere Reize				
Kotabsatz	physiologisch	leicht reduziert/breig	Durchfall < 24h	Blutung oder Durchfall aus dem Rektum > 24h oder fehlender Kotabsatz, Rektumprolaps				
Harnabsatz	physiologisch	vermindert/vermehrt	ggf. blutiger Harn	fehlender Harnabsatz				
Gesamtscore								

Gesamtscore 0	keine Belastung				
max 2x Gesamtscore 1 an aufeinanderfolgenden Tagen	leichte bis mittlere Belastung	Versuchsfortführung, tägliche Kontrolle			
Gesamtscore 2	mittlere Belastung	Kontrolle innerhalb der nächsten 6 Stunden dann Entscheid			
vor Erreichen eines Gesamtscore 3 oder mindestens drei aufeinanderfolgende Male Gesamtscore 1 **	schwere Belastung	sofortiger Versuchsabbruch			

Abbildung 14: Score Sheet des AT II Modells

Der Gesundheitszustand der Tiere nach AT II – Pumpenimplantation wurde anhand eines Überwachungsbogens engmaschig kontrolliert.

5.2. Modell des myokardialen Ischämie/Reperfusionsschadens

Zur Induktion eines akuten Myokardinfarkts wurde anstelle der permanenten, eine transiente Ligatur der LAD (*left anterior descending artery*) vorgenommen. Dies ermöglicht einen besseren Bezug zur klinischen Situation des Menschen, bei dem nach Infarkt eine Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes angestrebt wird.

Zunächst wurden die Mäuse mittels Kombinationsnarkose (siehe III 2.1) narkotisiert. Anschließend wurden sie in Rückenlage auf einer Wärmematte mit Klebestreifen fixiert, wobei der Oberkiefer mit Hilfe eines handelsüblichen Gummibandes, welches um die Wärmeplatte gespannt war, stabilisiert wurde, um die nachfolgende Intubation zu erleichtern. Danach erfolgten die Enthaarung und Desinfektion des Halsbereiches sowie der linken Thoraxseite. Nach dem Erreichen

der chirurgischen Toleranz wurde auf Höhe des Kehlkopfes ein circa 1 cm langer Hautschnitt nach kaudal durchgeführt, um freien Blick auf die Trachea zu gewinnen. Anschließend wurde der Tubus (Metallkanüle 19G) unter visueller Lagekontrolle in die Luftröhre eingebracht. Die Beatmung erfolgte über ein Intubationsgerät (MiniVent Type845, Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten) bei einer Atemfrequenz von 150/min und einem Volumen von 200 µl. Im Anschluss wurde der Hautschnitt mittels Einzelknopfheften (7-0 Prolene, Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt) verschlossen.

Um die Körpertemperatur während des Eingriffes aufrecht zu erhalten, wurde der Maus eine Rektalsonde (TMF-3402 Rektaltemperatur Messfühler, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach) eingeführt. Durch ein sich selbst regulierendes Temperatur-Kontroll-System (TMF-0904, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach) konnte die Körpertemperatur konstant bei 37,5°C gehalten werden. Zudem wurde Bepanthen Augensalbe lokal appliziert.

Unter Verwendung eines Mikroskops (Stemi 2000-C, Carl Zeiss, Jena) mit zusätzlicher Lichtquelle (CL 6000 LED, Carl Zeiss, Jena) erfolgte ein Hautschnitt auf Höhe des zweiten Interkostalraumes. *M. pectoralis* und *M. rectus thoracis* wurden durchtrennt, um Sicht auf die Zwischenrippenmuskulatur zu schaffen. Unter Schutz der *A. mammaria sinistra* wurde der zweite Zwischenrippenraum mit einer Mikroschere eröffnet. Um ein geeignetes Sichtfeld auf die linke Koronararterie herzustellen, wurde die zweite und dritte Rippe jeweils mit einem Faden (5-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt) zweifach umstochen und nach kranial bzw. kaudal aufgespannt und die Haltefäden mittels Klebestreifen auf der Wärmplatte fixiert. Im Anschluss wurde das Perikard eröffnet, um die Suche nach der LAD zu erleichtern. Zum Schutz der Lunge wurde der Herzbeutel über die Pleura gelegt und mit einem in Jod getränkten Tupfer (Sugi Eyespear pointed tip, Kettenbach, Eschenburg) abgedeckt. Im nächsten Schritt wurde die LAD mit einem 8-0 Faden (8-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt) proximal umstochen und unmittelbar nach ihrem Abgang ligiert. Hierbei wurde zwischen Herzmuskel und vorgelegtem Doppelknoten ein Platzhalter, in Form eines circa 3 mm kleinen Stückes mit Polyetylen-schlauch umzogener 30G Kanüle, gelegt. Der Erfolg der Ligatur war durch das deutliche Entfärben des Versorgungsgebietes der linken Herzkranzarterie erkennbar (s. Abb. 15). Daraufhin wurden die Haltefäden gelockert und der offene

Brustkorb schützend mit einer in NaCl getränkten Mullkompressen (Noba Verbandmittel Danz, Wetter) abgedeckt.

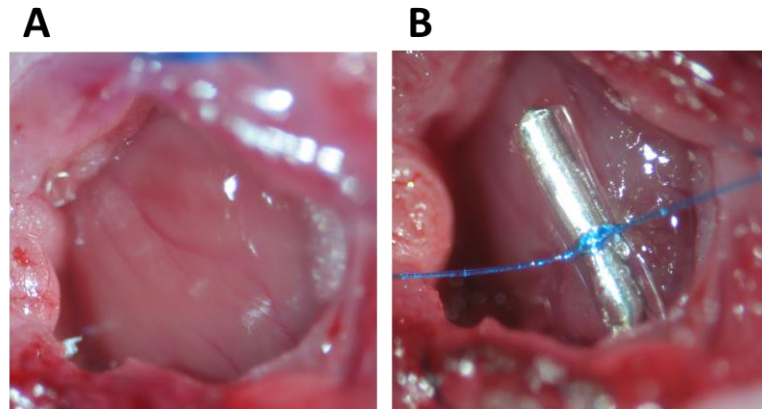


Abbildung 15: Induktion eines Myokardinfarkts

Um einen Myokardinfarkt zu induzieren, wurde die linke Koronararterie für 60 min ligiert. (A) Blick auf den linken Ventrikel. (B) Ablassen des Versorgungsgebietes nach Okklusion der LAD.

Nach circa 60 min Ischämie wurden Platzhalter und Ligatur entfernt, um eine Reperfusion des LAD-Versorgungsgebietes zu erlangen. Die Spannfäden wurden anschließend gelöst und die Zwischenrippenmuskulatur, so wie *M. pectoralis* und *M. rectus thoracis* mit zwei bis drei Einzelknopfheften (5-0 Prolene bzw. 7-0 Prolene, Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt) verschlossen. Die Haut wurde fortlaufend mit einem 7-0 Faden vernäht. Die Op-Dauer betrug circa 90 min.

Es erfolgte eine Antagonisierung der Narkose. Nach Erreichen einer suffizienten Eigenatmung und Zeigen von ersten Abwehrreaktionen wurden die Tiere extubiert und in ihren Käfig auf eine Wärmeplatte gelegt. Die Mäuse erhielten zur Schmerzausschaltung zweimal täglich Buprenorphin über 3 Tage und wurden engmaschig anhand eines *Score Sheets* überwacht.

6. Echokardiografie

6.1. Prinzip der Echokardiografie

Die transthorakale Echokardiografie bietet eine nichtinvasive Methode zur Beurteilung der anatomischen Strukturen, Physiologie und Funktion des Herzens. Hierbei werden von einem Schallkopf hochfrequente Schallwellen ausgesendet, welche die Thoraxhöhle durchdringen und an Gewebegrenzschichten oder

inhomogenen Geweben unterschiedlich stark reflektiert und gestreut werden. Die reflektierten Signale werden von dem Schallkopf aufgenommen und an einen Verstärker geleitet, welcher die Daten verarbeitet und sie als Echtzeit-Bild auf einem Monitor darstellt. Dabei kann zwischen unterschiedlichen Darstellungsmethoden, wie zum Beispiel dem B-Mode (brightness Mode), M-Mode (motion Mode), Dopplerverfahren oder 3-dimensionales Verfahren, gewählt werden [219].

Kardiale Hypertrophie, dilatative Kardiomyopathie und Myokardinfarkt gehen mit einem strukturellen Remodeling des linken Ventrikels (LV) einher [220-222]. Das Maß der Funktionseinschränkung kann anhand verschiedener Parameter bemessen werden. Im B-Mode wird ein zweidimensionales Bild des Herzens dargestellt. Dies ermöglicht die Untersuchung der Kammergröße, der Physiologie (Systole, Diastole) und anatomischer Strukturen (Kammerwand, Herzklappen, Papillarmuskel). Im eindimensionalen M-Mode können zusätzlich Kammerinnendurchmesser während Systole und Diastole und Kontraktilität gemessen werden [219]. Wichtige Parameter zur Beurteilung der Größe und Funktion des LV sind:

Diastolische Septumdicke = IVSTd (interventricular septal thickness diastolic)

diastolische Hinterwanddicke = LVPWd (LV end posterior wall dimension diastolic)

Endsystolischer Durchmesser = LVIDs (LV internal dimension systolic)

Enddiastolischer Durchmesser = LVIDd (LV internal dimension diastolic)

Enddiastolisches Volumen = LVEDV (LV end diastolic volume)

Endsystolisches Volumen = LVESV (LV end systolic volume)

Anhand dieser Werte können die Auswurfleistung (EF %, ejection fraction) und Herzmuskelkontraktilität (FS %, shortening fraction) des LV kalkuliert werden.

$$EF \% = (LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100$$

$$FS \% = (LVIDd - LVIDs) / LVIDd \times 100$$

6.2. Durchführung der Echokardiografie

Zunächst wurden die Mäuse mittels Isofluran narkotisiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Narkosetiefe so reguliert wurde, dass die Herzfrequenz der Tiere zwischen 400 und 500 Schlägen/min lag. Eine zu niedrige (< 400) oder zu hohe ($> 500-600$) Herzfrequenz kann die systolische und diastolische Funktion des LV maßgeblich beeinträchtigen und somit zu verfälschten Resultaten führen [223, 224]. Für die echokardiografische Untersuchung (Vevo 2100 Imaging System, Visualsonics, Kanada) wurden die Tiere auf eine bewegliche Plattform mit integrierter Wärmematte und EKG Sensoren positioniert (s. Abb. 16). Um ein Austrocknen der Hornhaut zu verhindern, wurde Augensalbe aufgetragen. Mittels rektaler Temperatursonde konnte eine konstante Körpertemperatur von $37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ während der Untersuchung aufrechterhalten werden. Die Extremitäten der Maus wurden mit Elektrodengel (Electrode Gel, GE Medical Systems Information Technologies GmbH, Freiburg) benetzt und mittels Klebeband auf den Sensoren befestigt. Der Thoraxbereich wurde mit Enthaarungscreme von Fell befreit und Ultraschallgel (Ultraschall Gel Sonosid®, ASID BONZ, Herrenberg) aufgetragen. Anschließend wurde die Plattform leicht nach links gekippt und der Ultraschallkopf parasternal angelegt. Zunächst wurde das Herz im B-Mode betrachtet, anschließend wurden Aufnahmen im M-Mode von der langen (PLAX) und kurzen (SAX) parasternalen Achse auf Höhe der Papillarmuskeln aufgenommen, um Herzstrukturen ausmessen und Funktionsparameter berechnen zu können. Parallel dazu wurde ein EKG aufgezeichnet. Nach Beendigung der Untersuchung wurde das Tier von Gel befreit und bis zum vollständigen Erwachen in eine aufgewärmte Aufwachbox gelegt.



Abbildung 16: Echokardiografische Untersuchung der Maus

Mäuse mit AT II-Pumpe wurden am Tag 5 und 7 nach Pumpenimplantation sonographisch untersucht.

7. Positron-Emissions-Tomografie (PET)

Die Positron-Emissions-Tomografie (PET) ist eine nicht-invasive, hochauflösende nuklearmedizinische Bildgebung, die eine gleichzeitige Analyse der Herzfunktion und des myokardialen Metabolismus ermöglicht [225, 226].

7.1. Prinzip der Positron-Emissions-Tomografie

Grundlage der nuklearmedizinischen Bildgebung ist das sogenannte Tracer-Prinzip. Dabei wird eine gering radioaktive Substanz via Blutbahn in den Körper eingebracht. Diese verteilt sich in Abhängigkeit ihres chemischen und physiologischen Verhaltens im Körper und akkumuliert in den verschiedenen Organen. Aufgrund des radioaktiven Zerfalls können diese Ansammlungen im Körper sichtbar gemacht werden.

In der vorliegenden Studie wurde der Tracer ^{18}F -fluorodeoxyglucose (^{18}FDG) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Glukoseanalogon, bei welchem die erste OH-Gruppe durch ein radioaktives Fluorisotop ersetzt wurde. Hauptenergiequelle des Herzens stellen freie Fettsäuren dar. In Stresssituationen, wie zum Beispiel Hypoxie oder Ischämie, kann das Herz jedoch in kürzester Zeit auf Glukosestoffwechsel umstellen. Dadurch wird die ^{18}F -fluorodeoxyglucose in den Kardiomyozyten aufgenommen und zu ^{18}FDG -6-Phosphat phosphoryliert, welches irreversibel in der Zelle gespeichert wird. Während dem radioaktiven Zerfall werden Positronen emittiert. Stoßen diese mit Elektronen zusammen, werden

hochenergetische Photonen freigesetzt, welche von den Detektoren des PET- Scanners registriert werden. Da nur vitales Gewebe einen Glukosemetabolismus aufweist, kann anhand der Tracer-Anreicherung die Zellvitalität beurteilt und vernarbtes Gewebe (Stoffwechseldefekte) identifiziert und quantifiziert werden [227].

7.2. Durchführung der Positron-Emissions-Tomografie

Die PET-Messungen wurden an Tag 6 und 30 nach Myokardinfarkt mit einem speziellen Kleintier PET-Scanner (Inveon Dedicated PET, Preclinical Solutions, Siemens Healthcare Molecular Imaging, Knoxville, TN, USA) durchgeführt. Die Tiere wurden mittels Isofluran narkotisiert. Danach wurde eine Augensalbe aufgetragen, um ein Austrocknen der Hornhaut zu verhindern. Über einen Schwanzvenenkatheter wurden 100 µl Tracer injiziert. Anschließend wurden die Tiere in den Tomografen eingebracht und in gestreckter Bauchlage auf einer Wärmematte positioniert. Für eine EKG-Aufzeichnung wurden Neugeborenen-Elektroden (3M, St. Paul, MN, USA) an den Vorder- und Hintergliedmaßen angelegt. Dreißig Minuten nach Tracer-Injektion wurde mit der Messung begonnen.

7.3. Beurteilung der Infarktgröße und Fibrosierung

Anhand der verminderten Tracer-Anreicherung konnte das Infarktgebiet ausfindig gemacht werden. Die Infarktgröße wurde mit Hilfe des totalen Perfusionsdefizits (TPD), welches das Ausmaß und die Schwere der Hypoperfusion bezogen auf das gesamte Myokardvolumen bemisst, ermittelt [228].

Das linksventrikuläre metabolische Volumen (LVMV) korreliert positiv mit der Zunahme an Herzmuskelmasse sowie an fibrotischem Gewebe. Daher kann es zur Bestimmung der myokardialen Hypertrophie und kardialen Fibrose herangezogen werden [228].

Die Messungen und Auswertung wurden in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Großhadern durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Inveon Acquisition Workplace (Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA). Die linksventrikulären Funktionsparameter wurden mit der Software QGS® (Cedars-Sinai, Los Angeles, CA, USA) bestimmt.

8. Durchflusszytometrie

8.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Der Begriff FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) ist ein häufig verwendetes Synonym für die Durchflusszytometrie [229]. Dabei handelt es sich um ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage hierbei ist das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Für die Analyse werden die in einer Lösung befindlichen Zellen durch eine Kapillare in die Durchflusszelle gesaugt, wo sie im Sensormodul einzeln an gebündelten Laserstrahlen vorbeigeleitet werden. Dabei entsteht Fluoreszenz(= emittiertes Licht) und Streulicht (= gebrochenes Licht), welches mittels Detektoren nachgewiesen werden kann.

Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und ihrer Komplexität. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und ist abhängig vom Volumen der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sideward Scatter*) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel und wird durch die Größe und Struktur des Zellkerns, der Granularität und Menge an Vesikeln in einer Zelle beeinflusst [229]. So streuen Granulozyten, welche eine raue Oberfläche und viele Vesikel in ihrem Inneren besitzen, mehr als kleine glatte Lymphozyten. Anhand dieser beiden Parameter lassen sich zum Beispiel die Zellen im Blut auch ohne weitere Färbung mit Antikörpern bereits recht gut unterscheiden (s. Abb. 17):

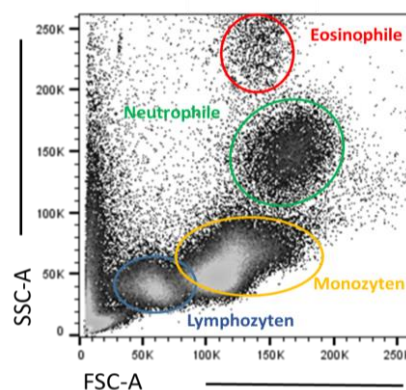


Abbildung 17: Durchflusszytometrie; Identifizierung von Blutzellen anhand des FSC und SSC

Differenzierung der Zellen im Blut anhand ihrer Größe und Granularität

Fluoreszierendes Licht wird von fluoreszierenden Molekülen nach Anregung eines kompatiblen Lasers emittiert. Durch den Laserstrahl werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes kurzzeitig auf ein höheres Energieniveau gebracht. Fallen diese anschließend wieder auf ihr Grundniveau zurück, wird Energie in Form von Photonen freigesetzt. Diese können mit einem Photonendetektor gemessen werden. Fluoreszierendes Licht kann von endogenen Fluoreszenzfarbstoffen der Zelle (= intrinsisches Signal; z.B. in der Clec9a^{cre}Rs26T^{Tomato} Maus oder Eigenfluoreszenz der Zelle) oder von Fluoreszenz-markierten Antikörpern stammen. Die Photonenkonzentration verhält sich hierbei proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern beziehungsweise Zellen. Durch die Zuhilfenahme von Antikörpern, welche gegen spezifische Zelloberflächenantigene gerichtet sind (z.B. Proteine der CD-Klassifizierung), können Subpopulationen innerhalb einer größeren Zellgruppe identifiziert werden.

Durch Einsatz verschiedenfarbiger Laser und unterschiedlichen Filtern kann die Zahl der einsetzbaren Fluorochrome und damit die Informationsdichte pro Messvorgang erhöht werden. Dies ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen. Die Emissionsspektren benachbarter Fluorochrome können sich jedoch überlappen, so dass es zu falsch positiven Signalen kommen kann. Daher muss vor der Analyse eine sogenannte Kompensation erfolgen. Hierbei werden die Emissionsmaxima der verwendeten Farbstoffe mittels Einzelfärbung bestimmt und die spektrale Überlappung anschließend rechnerisch korrigiert. Für die Einzelfärbungen wurden *CompBeads* (Anti-Mouse/Anti-Rat/Anti-Hamster Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set, Becton Dickson and Company, Franklin Lakes, USA) verwendet. Dies sind Mikropartikel aus Polystyrol, an deren Oberflächen bereits anti-IgG Antikörper (z.B. anti-rat IgG) gekoppelt wurden. Diese können nun mit beliebigen Antikörpern der entsprechenden Spezies beladen und im FACS gemessen werden.

Die im Durchflusszytometer gesammelten Daten können als Histogramm oder *Dot Plots* dargestellt werden (s. Abb. 18). Das Histogramm ist eine Häufigkeitsverteilung der Messsignale eines Parameters. Die horizontale Achse gibt dabei die Intensität des Signals und die vertikale Achse die Anzahl der Zellen wieder. Bei einem *Dot Plot* können zwei Parameter gegeneinander aufgetragen werden, um so

ihre Korrelationsverteilung zu zeigen. Dabei werden die gemessenen Zellen als Punkte dargestellt. Diese Art der Darstellung ermöglicht eine Identifizierung und Charakterisierung von Subpopulationen.

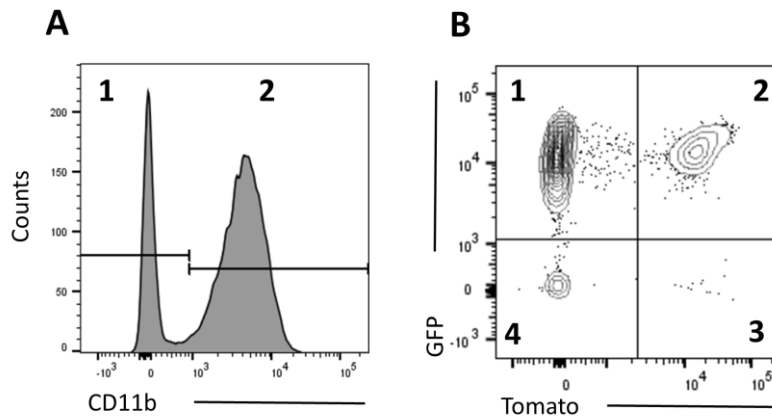


Abbildung 18: Unterschiedliche Darstellungsweisen von FACS-Daten

(A) Darstellung als Histogramm: 1. Negativ-Population, 2. Positiv-Population
 (B) Darstellung der verschiedenen Subtypen im *Dot plot* (angezeigt als *Contour plot*): 1. einfach positiv für GFP, 2. doppelt positiv für GFP und Tomato, 3. einfach positiv für Tomato, 4. doppelt negativ für GFP und Tomato

Durch das Setzen von Gates kann eine Teilmenge der angezeigten Zellen definiert und für weitere Analysen ausgewählt werden. Alle Gates können hierbei miteinander verknüpft werden, so dass sie wie hintereinander geschaltete Filter wirken. Da es sich bei der Durchflusszytometrie um eine Relativmessung handelt, muss definiert werden, was als positiv und negativ gelten soll. Wenn die Fluoreszenzintensität klar getrennte Populationen ergibt, kann die Grenze mittig zwischen die Populationen gesetzt werden. Anderenfalls helfen Negativkontrollen, wie Isotypkontrollen oder FMOs (*fluoreszenz-minus-one*) zur korrekten Trennung der Populationen. Während bei der Isotypkontrolle ein unspezifischer Antikörper des gleichen Subtyps wie der spezifische Detektionsantikörper verwendet wird, wird in der *Fluoreszenz-minus-one*-Methode der zu überprüfende Antikörper als einziger neben allen anderen Antikörpern nicht mitgefärbt [229]. Durch diese Verfahren lassen sich unspezifischen Signale erfassen, welche durch die Eigenfluoreszenz der Zelle und/oder durch unerwünschte Fluoreszenz der eingesetzten Farbstoffe im Detektionskanal erzeugt werden.

8.2. Probenentnahme für durchflusszytometrische Analyse

Die Maus wurde zunächst tief narkotisiert und auf dem Rücken liegend mit Klebestreifen auf einer Wärmeplatte fixiert. Anschließend wurde mit einer Schere ein kleiner thorakaler Hautlappen entfernt, um freien Blick auf Sternum und Rippen zu erlangen. Mit einer mit 5 µl Heparin (Heparin- Natrium- 25.000, ratiopharm GmbH, Ulm) gefüllten 2 ml Spritze (BD Discardit II Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) und einer 27G Kanüle (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) wurde im 2. Intercostalraum in einem 45 Grad Winkel das Herz punktiert.

Nach der Blutentnahme wurde die Maus mittels Genickbruch getötet. Anschließend wurden Bauch- und Brusthöhle zügig eröffnet und ein Leberschnitt vorgenommen. Dann wurde das Tier mithilfe einer mit PBS gefüllten 10 ml Spritze und einer 27G Kanüle durch einen Stich in den linken Ventrikel perfundiert. Im Anschluss wurde das Herz, sowie eventuell benötigte Kontrollorgane (Milz, Leber, Niere, Lymphknoten) vorsichtig herauspräpariert und in ein mit PBS befüllten 15 ml Falcon (Polypropylene Conical Tube, Falcon®, Corning Science, Mexiko) auf Eis überführt.

8.3. Aufbereitung von Blut

Zunächst erfolgte eine Lyse der Erythrozyten. Hierfür wurde 100 µl Blut zu 3 ml Ammoniumchloridlysepuffer hinzugegeben. Nach 5-minütiger Inkubationszeit, wurde der Erylyse-Vorgang durch Zugabe von 3 ml PBS gestoppt. Im Anschluss wurde die Probe für 7 min bei 350 x g (rcf) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Pumpvorrichtung abgesaugt (FTA-1, Aspirator with trap flask, bioSan, Riga, Lettland) und eine zweite Erylyse durchgeführt. Das Pellet wurde nun mit 50 µl Fc-Block resuspendiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper über ihren Fc-Anteil zu verhindern. Anschließend wurde die Probe in eine 96 Well-Platte (Non-Tissue Culture Treated Plate, 96 Well, U-Bottom, Falcon®, Corning, Mexiko) überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 50 µl eines vorbereiteten Antikörpermixes (siehe Tabelle 2) pro Well hinzugegeben. Daraufhin folgte eine 20-minütige Inkubation lichtgeschützt bei 4°C im Kühlschrank. Um die Probe von ungebunden Antikörpern zu befreien, wurde im Anschluss 100 µl FACS-Puffer (PBS, 0,5 % BSA, 2 mM EDTA) pro Well hinzugefügt und die Platte bei 350 x g (rcf) für 7 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 200 µl FACS- Puffer resuspendiert

und anschließend in FACS-Tubes (5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, Falcon®, Corning Science, Mexiko) überführt.

8.4. Aufbereitung von Herz und Kontrollorganen

Nach der Entnahme wurden die Organe halbiert, um Gewebe für eine histologische Untersuchung zurückzubehalten. Die Teilstücke wurden abgewogen und das Gewicht notiert. Daraufhin wurden sie in eine Petrischale (TC-Schale 35, Standard, Sarstedt, Nümbrecht) gegeben und mithilfe eines Skalpells (Einmal-Sicherheitsklingen, Aesculap AG, Tuttlingen) und einer Pinzette in möglichst kleine Stücke geschnitten. Diese wurden anschließend in einen mit 3 ml Enzym Mix (siehe Tabelle 1) befüllten 50 ml Falcon überführt. Danach wurde die Probe bei 37°C und 400 rpm schüttelnd für 30 min inkubiert (Thermomixer comfort, eppendorf, Hamburg). Im nächsten Schritt wurde die Probe mithilfe des Kolbens einer 2 ml Spritze durch ein 70 µm Zellsieb (Cell strainer: 70 µm Nylon, Falcon®, Corning, NY, USA) in eine mit 6 ml FACS-Puffer befüllte 6 Well-Platte (Costar 6 Well Plate, flat bottom, Corning, New York, USA) gedrückt. Nach dem Transfer der Proben in einen 15 ml Falcon, erfolgte eine Zentrifugation für 7 min bei 350 x g (rcf) bei 4°C. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 150 µl Fc-Block resuspendiert und auf 3 Wells einer 96-Well-Platte verteilt. Um die Proben der Milz von Erythrozyten zu befreien, erfolgte hier als Zwischenschritt zunächst eine Erylyse (siehe 5.3). Nach 10-minütiger Inkubation mit Fc-Block wurden 50 µl Antikörpermix (siehe Tabelle 2) pro Well hinzugefügt. Die nachfolgende Inkubationszeit betrug 20 min. Im Anschluss folgte ein Waschschritt mit 100 µl FACS-Puffer pro Well und anschließendem Zentrifugieren bei 350 x g (rcf) bei 4°C für 7 min. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Proben mit 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Daraufhin wurden die Proben durch ein 50 µm Sieb (Cell Trics 50µm, Sysmex Partec, Görlitz) filtriert, in FACS-Tubes überführt.

Für die Analyse aller Proben wurde der Cell Analyzer BD LSR Fortessa verwendet. Die erfassten Daten wurden mit der Software FlowJo 10.3 analysiert.

Enzym	Konzentration	Hersteller
Collagenase I	10 mg/ml	Sigma Aldrich
Collagenase XI	10 mg/ml	Sigma Aldrich
Hyaluronidase	10 mg/ml	Sigma Aldrich
DNase I	60 U/ml	Sigma Aldrich
Dispase	120 mg/ml	Sigma Aldrich
Collagenase D	50 mg/ml	Sigma Aldrich

Tabelle 1: Darstellung der verwendeten Enzyme

Darstellung der für die Zellisolierung verwendeten Enzyme.

Oberflächenmolekül	Fluorochrom	Klon	Hersteller
F4/80	PerpCy.5.5	BM8	Biolegend
CD11c	BV785	N418	Biolegend
CD24	BV605	M1/69	Biolegend
CD11b	BV421	M1/70	Biolegend
MHCII	AF700	M5/114	Biolegend
CD45.2	PE-Cy7	104	Biolegend
CD64	APC	X54-5/7.1	Biolegend
CD115	BV421	AF598	Biolegend
Ly6C	BV510	Hk1.4	Biolegend
CD206	BV605	C086C2	Biolgend
Fixable Viability Dye eFlour 780			Bioscience

Tabelle 2: Antikörper in der Durchflusszytometrie

Darstellung der verwendeten Antikörper für die Markierung verschiedener Oberflächenrezeptoren in der FACS-Analyse.

9. Histologische Untersuchung

9.1. Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenz nutzt Antikörper und Fluoreszenznachweis, um die Lokalisierung und relative Expression von spezifischen Proteinen in fixierten Zellen bzw. Gewebeschnitten zu untersuchen. Die hierbei eingesetzten Antikörper sollten sich durch eine hohe Affinität sowie Spezifität auszeichnen, um eine Kreuzreaktion mit ähnlichen Epitopen zu vermeiden. Bei der Immunfluoreszenzfärbung werden zwei Verfahren unterschieden. Bei der direkten Methode ist der spezifische Antikörper für das zu untersuchende Protein an das Fluorochrom direkt gekoppelt, wohingegen bei der indirekten Methode ein Fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper spezifisch an den unmarkierten Primärantikörper bindet. Durch diese Verfahren ist es möglich, mehrere Strukturproteine gleichzeitig und spezifisch in verschiedenen Farben darzustellen. Durch ein Fluoreszenzmikroskop wird die Reaktion sichtbar gemacht.

9.2. Herstellung der Schnittpräparate

Nach der Organentnahme wurden die halbierten Herzen für 30 min in 4%igen PFA (Formaldehyde Solution Methanol-free, ThermoFisher Scientific, Rockford, USA) fixiert und anschließend in einer 30%igen Sucroselösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) entwässert, um der Bildung von Eiskristallen während dem nachfolgenden Gefriervorgang entgegenzuwirken. Anschließend wurden sie unter Zuhilfenahme eines Einbettmediums (Tissue-tek, Sakura Finetek Europe) in Kryoeinbettförmchen (Tissue-Tek Cryomold 25 x 20 x 5 mm, Sakura Finetek) eingebettet, auf Trockeneis gefroren und bei -80°C im Gefrierschrank gelagert. Mithilfe des Kryotoms (CryoStar NX70, Thermo Fisher Scientific) wurden 12 µm dicke Gewebeschnitte erstellt und auf Objektträger (Menzel Gläser Superfrost Plus, Gerhard Menzel, Braunschweig) gezogen. Hierbei erfolgte nach jeweils sechs Schnitten ein 50 µm dicker Trimschnitt, um Gewebe aus verschiedenen Ebenen zu gewinnen und untersuchen zu können.

9.3. Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung

Zunächst wurden die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur für 15 min aufgewärmt und anschließend mit 4%igen PFA für 10 min fixiert. Danach folgten 3 Waschvorgänge für je 5 min in einer mit PBS-BSA-T Lösung (0,5% BSA, 0,1% Tween20, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) befüllten Küvette. Auf die

mit einem Fettstift (Liquid Blocker, Science Service, Japan) umkreisten Proben, wurde je 50 µl Blocklösung (PBS-BSA-T + 0,5% Saponin (Sigma-Aldrich) + 10% Donkey Serum (Sigma-Aldrich)) aufgetragen, um später unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Nach einer Stunde wurden die Proben abgeklopft und mit je 50 µl in Blocklösung verdünnten Primärantikörpern benetzt (s. Tabelle 3). Die folgende Inkubationszeit betrug zwei Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnitte nicht austrockneten. Nach einem anschließenden Waschvorgang wie oben beschrieben, wurden die Sekundärantikörper, verdünnt in Stocklösung (PBS-BSA-T + 0,5% Saponin) aufgetragen und für 60 min inkubiert. Erneut wurden die Schnitte gewaschen, bevor eine zweite Färberunde folgte. Zuerst wurde wieder für eine Stunde eine Blocklösung aufgetragen (PBS-BSA-T + 0,5% Saponin (Sigma-Aldrich) + 10% Goat Serum (Sigma-Aldrich)). Danach folgte die Inkubation mit weiteren Primärantikörpern für 90 min. Überschüssige Antikörper wurden schließlich wieder abgewaschen und eine 60 minutige Inkubation der Sekundärantikörper folgte. 15 min vor Ablauf der Zeit, wurde zur Kernfärbung der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Hoechst dazugegeben. Nachdem die Inkubationszeit abgelaufen war, wurden die Gewebeschnitte nochmals dreimal je 5 min in PBS gewaschen bevor sie, mit Eindeck-Medium (Dako Fluorescence Mounting Medium, Dako North America Inc., USA) benetzt, mit Deckgläschen (Menzel Gläser, Thermo Scientific) abgedeckt wurden. Die Lagerung der gefärbten Schnitte erfolgte danach im Kühlschrank bei 4°C.

Bei der Linie Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+} wurde eine 4-fach-Färbung durchgeführt. Dabei wurde mit anti-Tomato und anti-GFP das intrinsische Signal verstärkt und mit F4/80 die Makrophagen und mittels Hoechst die Zellkerne gefärbt. Die Herzschnitte der Linie Siglech^{gfp} wurden mit einer 3-fach-Färbung (F4/80, anti-GFP und Hoechst) behandelt. Zum Überprüfen der Spezifität der Antikörper wurde eine Isotypkontrolle für F4/80 (Rat IgG2a kappa Isotype Control, eBioscience), anti-Tomato und für anti-GFP (Rabbit Immunglobulin Fraction Negative Control, Agilent Dako), sowie eine Negativkontrolle, bei welcher nur die Sekundärantikörper aufgetragen wurden, durchgeführt.

Um fibrotisches Gewebe im Herzen sichtbar zu machen, wurde das bereits an ein Fluorochrom gekoppelte Lectin WGA (*Wheat germ agglutinin*) verwendet. Dieses bindet an Sialinsäure und N-Acetylglucosamin-Reste, die unter anderem in Proteinen der extrazellulären Matrix vorkommen. [230]

	Oberflächenmolekül	Klon	Hersteller
Primär-AK	F4/80 rat	BM8	eBioscience
	anti-GFP rabbit	A11122	Life Technologies
	anti-tdTomato goat	C340696	LSBiosciences
	Hoechst	33342	Invitrogen
	WGA (konj. AF647)	W32466	Life Technologies
Sekundär-AK	AF555 goat anti-rat	A21434	Life Technologies
	AF488 goat anti-rabbit	A11034	Life Technologies
	AF647 donkey anti-goat	A21447	Invitrogen

Tabelle 3: Antikörper der Immunhistologie

Darstellung der in der histologischen Untersuchung verwendeten Antikörper

9.4. Histologische Auswertung

Die Aufnahmen der gefärbten Schnitte erfolgten mit 5- oder 40-facher Vergrößerung an einem Epifluoreszenzmikroskop (Axio Imager.M2, Carl Zeiss, Jena) mithilfe einer Digitalkamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss, Jena). Dabei wurden zur Darstellung der Färbung folgende Filter verwendet: DAPI (BP: 445/50), GFP (BP525/50), Cy3 (BP: 605/70), Cy5 (BP: 690/50). Anschließend wurden drei verschiedene Bereiche des Herzens herausgesucht, die näher untersucht werden sollten. Bei mit Angiotensin II behandelten Tieren wurde je ein Bereich ohne fibrotische Veränderungen und ein Bereich mit interstitieller Fibrose untersucht. In der Kontrollgruppe wurden die nicht fibrotisch veränderten Areale charakterisiert.

Hierbei wurde die Anzahl aller einfach-, doppelt-, sowie dreifach-positiver Zellen für F4/80, GFP (Cx3Cr1) und Tomato (Clec9a) pro mm² bestimmt. Pro Tier wurden je Bereich sechs Aufnahmen aus drei verschiedenen Ebenen analysiert.

Um die Fläche des fibrotisches Gewebes bestimmen zu können, wurden Mosaikaufnahmen der Herzen von drei verschiedenen Ebenen pro Tier erstellt.

Mithilfe der Zeiss-Software (AxioVision SE64 Rel. 4.9.1) war es möglich, die Fibrosefläche im Herzen zu ermitteln und das Verhältnis dieser zur gesamten Herzfläche zu berechnen.

Um repräsentative Aufnahmen von sehr guter Qualität zu erhalten, wurden zusätzlich Aufnahmen an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM-880 Airyscan and fast mode, Zeiss) angefertigt. Im Gegensatz zum konventionellen Fluoreszenzmikroskop wird in der Konfokalmikroskopie das Präparat nicht im Ganzen von einem Lichtstrahl beleuchtet, sondern streifenweise von einem Lichtpunkt abgetastet. Daher wird die Fluoreszenz immer nur an einem kleinen Punkt angeregt und so die Entstehung von Streulicht in den umliegenden Bereichen minimiert und der Kontrast erhöht.

10. Statistische Auswertung

Die Bedeutung Clec9a-abhängiger Immunzellen in kardialen Entzündungsprozessen wurde bisher noch nicht untersucht. Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine explorative Studie. Die Größen der Versuchsgruppen sind mit n= 3-8 entsprechend gering.

Die schließende Statistik und graphische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe der Programme IBM SPSS Statistics (Version 26, IBM, NY, USA) und GraphPad Prism (Version 5.1, San Diego, USA). Aufgrund der kleinen Fallzahlen und ihrer Verteilungskurve wurden nicht-parametrische Testverfahren herangezogen. Mittels Wilcoxon- (verbundene Stichproben) und Fisher Pitman-Test (unabhängige Stichproben) wurde die exakte Signifikanz analysiert. Neben dem Mittelwert wurde der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Zusätzlich wurde in der Wachstumskurve die 95 %ige Signifikanzwahrscheinlichkeit dargestellt. Bei einem p-Wert $\leq 0,050$ wurde eine statistische Signifikanz angenommen. * entspricht $p \leq 0,050$, ** $p < 0,010$ und n.s. nicht signifikant.

V. ERGEBNISSE

1. Identifikation Clec9a-abhängiger Zellen in kardialem Gewebe und Charakterisierung unter Ruhebedingungen

1.1. Identifizierung und Lokalisierung Tomato-positiver Zellen im Herzw Gewebe

Zur differentiellen Analyse von Makrophagen und dendritischen Zellen wurde der Mausstamm $Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+}$ verwendet. Um die Anwesenheit Tomato-positiver ($Clec9aCre$) Zellen und deren Lokalisierung in kardialem Gewebe zu bestimmen, wurde die Basis der Herzen histologisch mit einer 4-fach-Färbung (siehe III.9.3) untersucht.

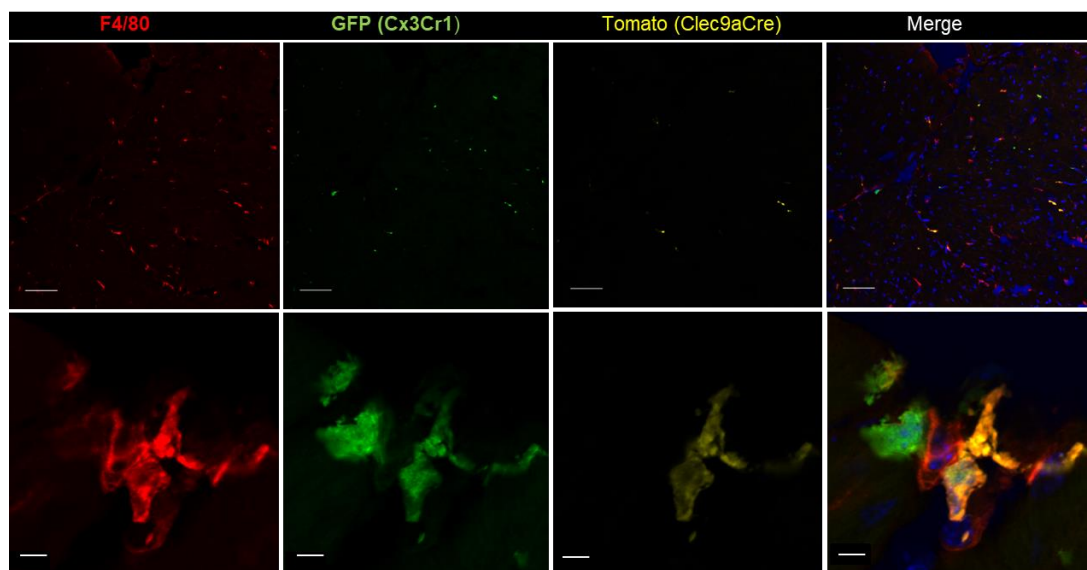


Abbildung 19: Nachweis von Makrophagen und dendritischen Zellen in gesunden Mausherzen

In konfokalen mikroskopischen Aufnahmen sind Makrophagen rot (F4/80, links), Cx3Cr1-positive Zellen grün (GFP, 2. Reihe von links), Clec9aCre-positive Zellen gelb (Tomato, 3. Reihe von links) und Zellkerne blau (Hoechst) dargestellt. Die rechte Bildreihe zeigt die überlappende Darstellung (Merge) aller Färbungen (Maßstab entspricht 50 µm (obere Reihe) bzw. 5 µm (untere Reihe)).

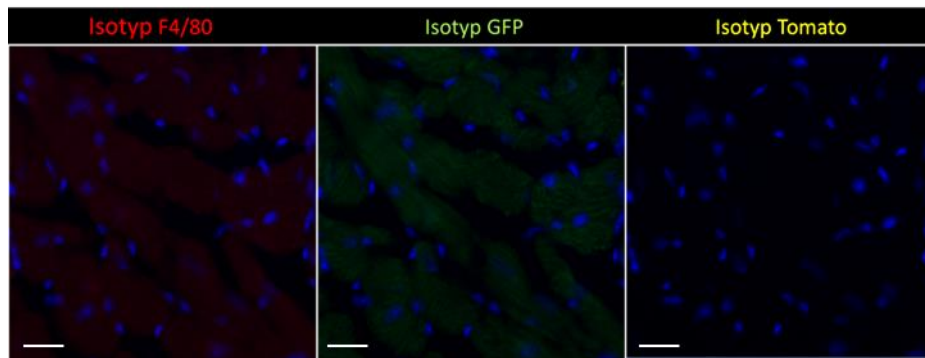


Abbildung 20: Spezifität der Antikörper in der histologischen Analyse

Isotypkontrolle für F4/80, GFP und Tomato (Maßstab entspricht 5 μ m).

Wie zu erwarten, wurden zahlreiche F4/80-positive Makrophagen gefunden. Zusätzlich konnten Tomato-positive Zellen identifiziert werden. Diese exprimierten zum Teil auch die Marker F4/80 und Cx3Cr1 und konnten daher sowohl als dendritische Zellen, als auch als Makrophagen eingeordnet werden. Unter Ruhebedingungen waren die Tomato-markierten Zellen gleichmäßig über das gesamte Myokard verteilt (s. Abb. 19).

Eine Isotypkontrollfärbung bestätigte die Spezifität der Färbungen (s. Abb. 20).

1.2. Charakterisierung und Quantifizierung Tomato-positiver Zellen im Herz und Blut

Um die Tomato-positiven Zellen im Herzen näher zu charakterisieren und zu quantifizieren, wurden Blut und Gewebe von Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+} Mäusen mittels Durchflusszytometrie (s. Kapitel III. 8.) analysiert.

Im Herzen wurden zunächst dendritische Zellen identifiziert. Diese werden im Allgemeinen als myeloide CD64⁻CD11c⁺MHCII⁺ Zellen charakterisiert und können anhand der CD11b- und CD24-Expression in die beiden Subtypen cDC1 und cDC2 unterteilt werden.

Da sich in der histologischen Untersuchung aber auch F4/80, Cx3Cr1 - zwei typische Marker kardialer Makrophagen - und Clec9aCre dreifach-positive Zellen zeigten, erfolgte zudem eine Clec9aCre-Analyse der Makrophagenpopulation.

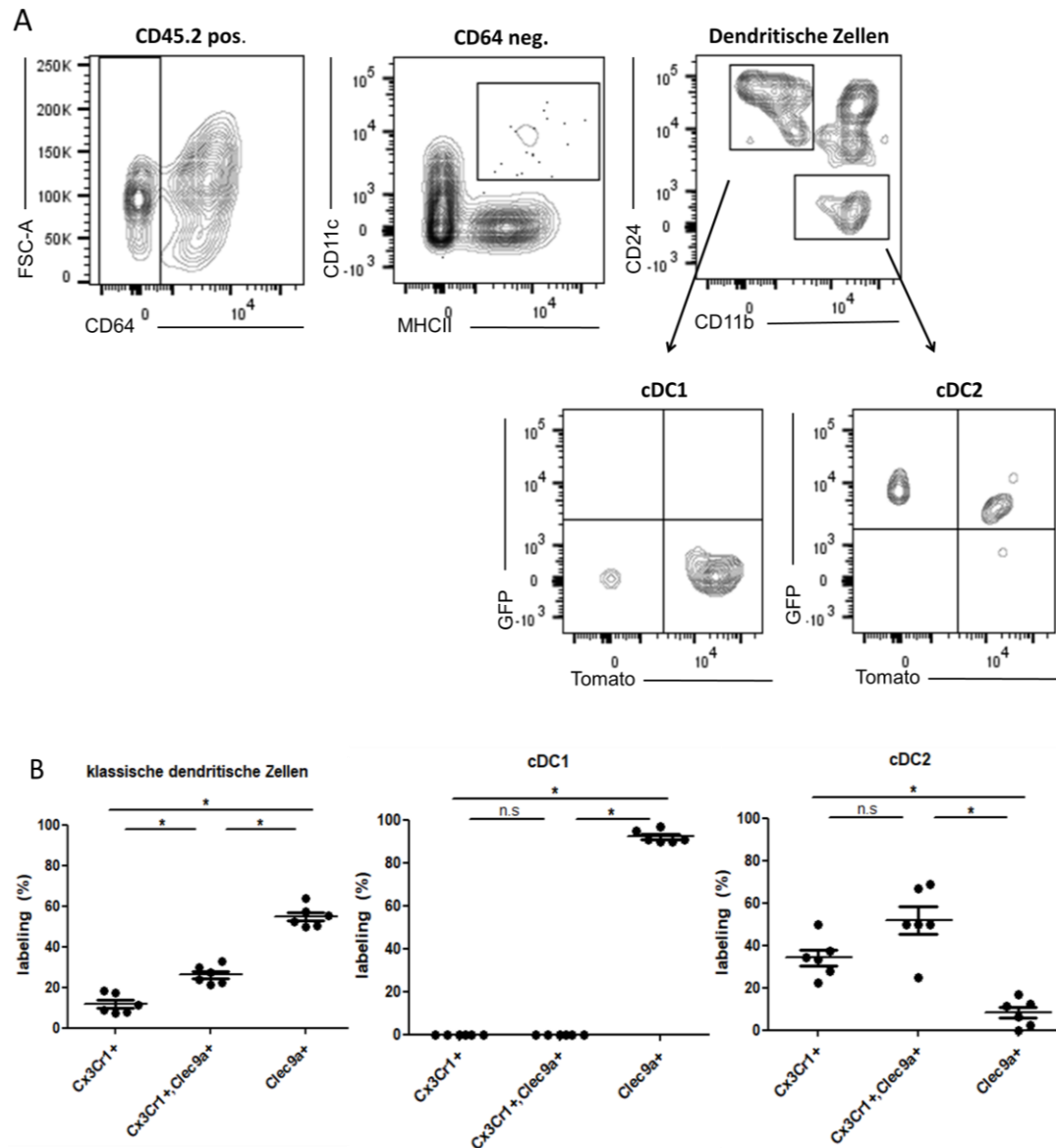


Abbildung 21: Charakterisierung klassischer dendritischer Zellen

Durchflusszytometrie von Mausherzen. (A) Identifikation von Leukozyten (CD45.2 pos.), CD64 negativen Zellen und klassischen dendritischen Zellen (MHCII und CD11c pos.), Ermitteln der Subtypen cDC1 (CD24 pos. und CD11b neg.) und cDC2 (CD24 neg. und CD11b pos.), Analyse der Tomato- (Clec9aCre) und GFP- (Cx3Cr1) Expression. (B) Prozentuale Verteilung von Tomato- und GFP einfach- und doppelt-positiven klassischen dendritischen Zellen (n=6, * $p \leq 0,050$, n.s nicht signifikant).

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass circa 90 % der klassischen dendritischen Zellen (cDCs) im Herzen Tomato-positiv waren. Davon exprimierten circa 30 % zudem Cx3Cr1. Unterteilte man die klassischen dendritischen Zellen in die beiden Subtypen cDC1 (CD64⁻MHCII⁺CD11c⁺CD24⁺) und cDC2 (CD64⁻MHCII⁺CD11c⁺CD11b⁺), waren über 95 % der cDC1 einfach-positiv für Tomato und damit die am häufigsten vertretene Subpopulation ($p=0,031$). Im Vergleich dazu lag die einfache Tomato-Markierung in den cDC2 bei nur etwa 10 %. Hier

war die Subpopulation der Tomato- und Cx3Cr1-positiven Zellen mit etwa 50 % am höchsten vertreten ($p=0,031$). Die verschiedenen Subpopulationen zeichneten sich durch eine starke Homogenität und hohe Schätzgenauigkeit aus (s. Abb. 21). Dies war auf die genetische Identität der Tiere zurückzuführen. Dadurch konnte trotz der geringen Fallgröße von nicht zufälligen Effekten ausgegangen werden.

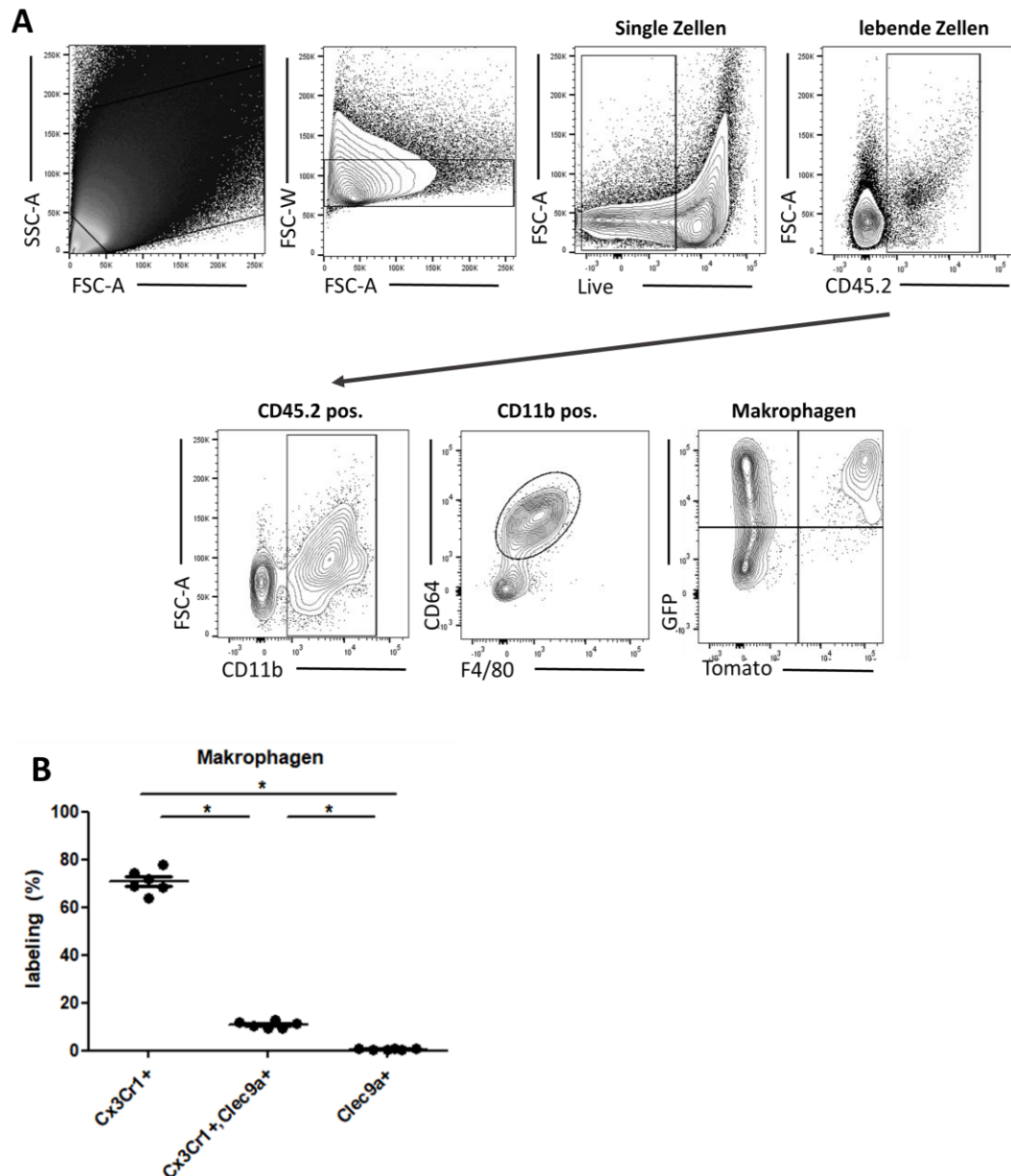


Abbildung 22: Tomato-Expression kardialer Makrophagen unter Ruhebedingungen

Durchflusszytometrie von Mausherzen. (A) Ausschluss von Zellfragmenten und Doubletten anhand des FSC und SSC, Erfassen lebender Zellen, Identifikation von Leukozyten (CD45.2 pos.), myeloiden Zellen (CD11b pos.) und Makrophagen (CD64 und F4/80 pos.), Analyse der Tomato- (Clec9aCre) und GFP- (Cx3Cr1) Expression. (B) Prozent der Cx3Cr1- und Clec9aCre-markierten Makrophagen ($n=6$, * $p \leq 0,050$).

In der durchflusszytometrischen Analyse der Herzen von neun bis zwölf Wochen alten Tieren zeigte sich, dass, wie zu erwarten, die Anzahl an Cx3Cr1-exprimierenden Makrophagen am höchsten war ($p=0,031$) (s. Abb. 22). Darüber hinaus waren jedoch circa 12 % der Makrophagenpopulation zudem positiv für Tomato ($p=0,031$). Eine Aussage, ob diese Zellen aktuell einen Clec9a-Rezeptor exprimieren oder sie durch die irreversible Markierung (in der Entwicklungsgeschichte aktiver Clec9a-Promotor) Tomato-positiv waren, konnte an dieser Stelle nicht getroffen werden.

Im Blut zeigte sich eine Markierung von Monozyten, die durch die Expression von Ly6C^{high} dem inflammatorischen Subtyp zugeordnet werden konnten ($p=0,031$) (s. Abb. 23). Neutrophile, Eosinophile, sowie Lymphozyten waren nicht markiert (hier nicht dargestellt).

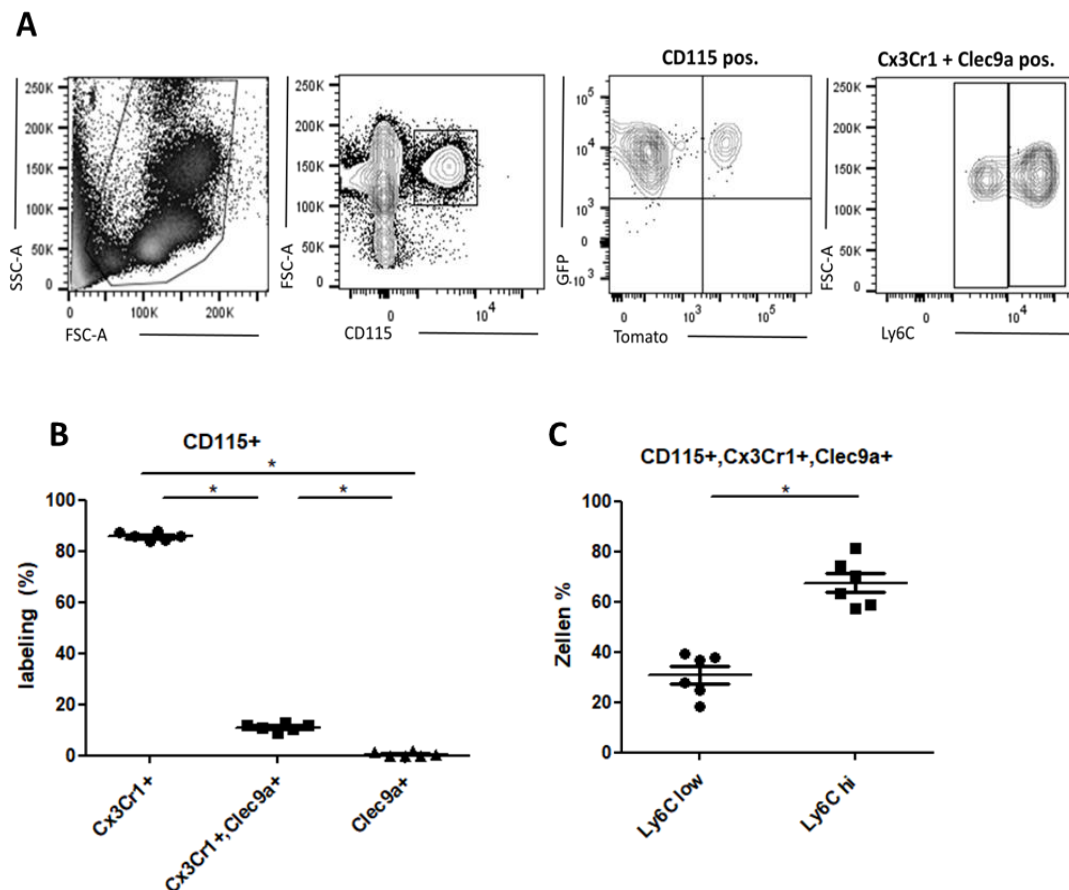


Abbildung 23: Tomato-Expression in Blutmonozyten

Durchflusszytometrie von Mausblut. (A) Ausschluss von Zellfragmenten, Identifikation von CD115 pos. Monozyten, Analyse der Tomato- (Clec9aCre) und GFP- (Cx3Cr1) Expression, Ermitteln der Ly6C-Expression (high und low) der Cx3Cr1- und Clec9aCre-positiven Monozyten. (B) Prozent Clec9aCre- und Cx3Cr1-positiver Monozyten, (C) Prozent der Ly6C high- und low-Expression ($n=6$, * $p\leq 0,050$).

1.3. Abgrenzung Tomato-positiver Makrophagen von klassischen dendritischen Zellen

Eine Clec9a-Markierung innerhalb der Makrophagenpopulation war überraschend, da Clec9a als *bona fide* Marker für dendritische Zellvorläufer angesehen wird [16]. Da sich mononukleäre Phagozyten in ihrer Oberflächenexpression überlappen, wurden weitere modifizierte Mausstämme eingesetzt, um Makrophagen von klassischen dendritischen Zellen abzugrenzen.

Der Transkriptionsfaktor Zbtb46 wird ausschließlich von klassischen dendritischen Zellen und ihren Vorläufern exprimiert, nicht aber von Monozyten, Makrophagen, pDCs oder lymphoiden Zelllinien. Dies ermöglicht eine Abgrenzung der cDCs von anderen mononukleären Phagozyten [201, 231] .

Mit Hilfe der Mauslinie Zbtb46^{gfp/+} können differenzierte dendritische Zellen und ihre Vorläufer anhand ihrer GFP-Expression (Zbtb46) identifiziert werden. Durch die Verpaarung mit dem Mausstamm Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+} konnte überprüft werden, ob es sich bei den Tomato-positiven Zellen innerhalb der Makrophagenpopulation um klassische dendritische Zellen handelte (s. Abb. 24).

Die FACS-Analyse zeigte, dass die Tomato-positiven Zellen der Makrophagenpopulation kein GFP (Zbtb46) exprimierten (p=0,031), wohingegen die cDCs zu 80 % positiv für Zbtb46 waren (p=0,031). Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Tomato-positiven Zellen der ausgewählten Makrophagenpopulation im Herzen um GFP-positive dendritische Zellen handelte

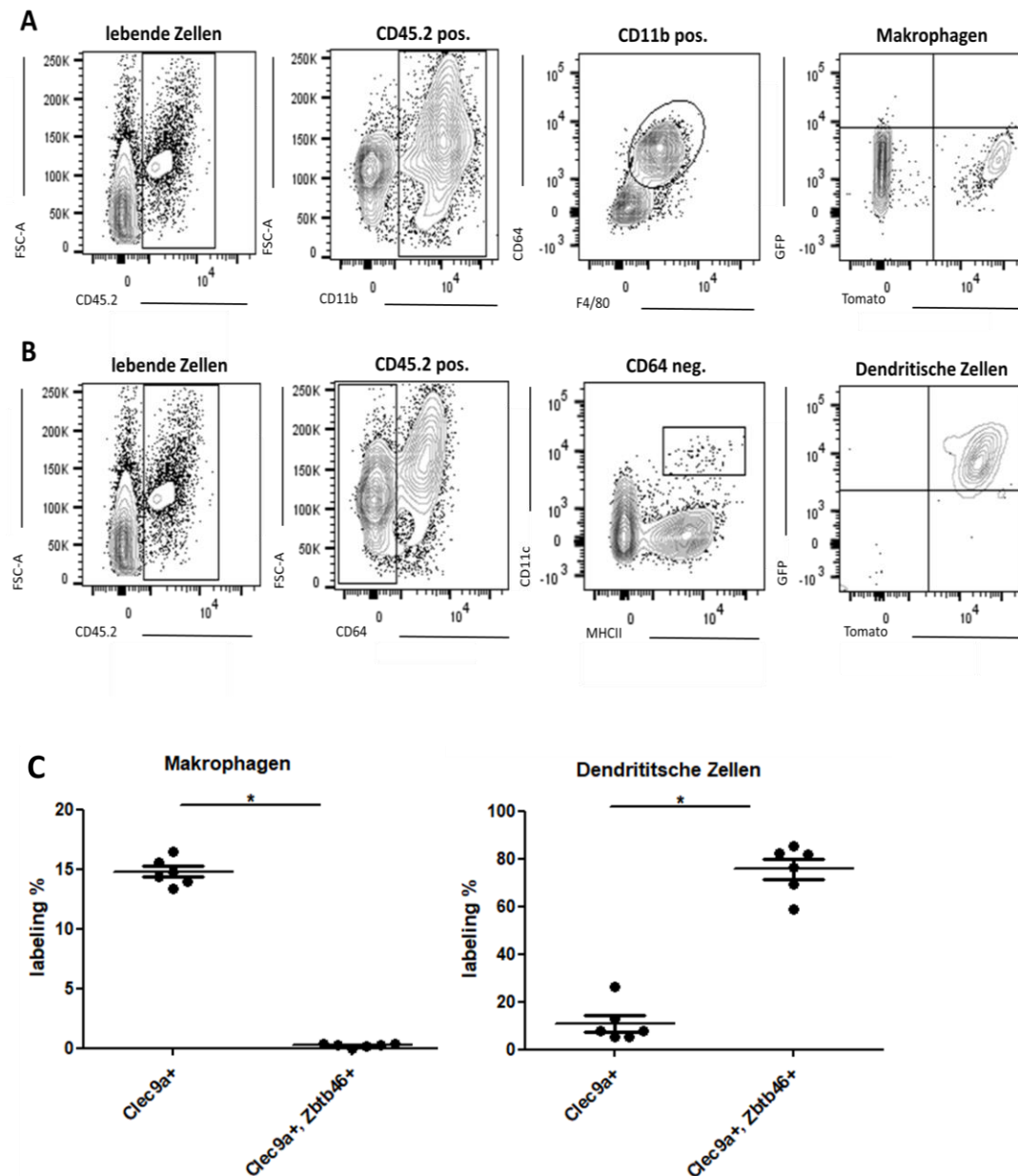


Abbildung 24: Klassische dendritische Zellen exprimieren Zbtb46

Durchflusszytometrie von Mausherzen. Analyse der Tomato- (Clec9aCre) und GFP- (Zbtb46) Expression in (A) Makrophagen ($CD11b^+F4/80^+CD64^+$) und (B) klassischen dendritischen Zellen ($CD64^+MHCII^+CD11c^+$) im Herz. (C) Prozent Clec9aCre- und Zbtb46-positiver Zellen ($n=6$, * $p \leq 0,050$).

Da im Herzgewebe unter Ruhebedingungen nur wenig dendritische Zellen aufzufinden waren, wurden zur Kontrolle der Markierungseffizienz des Mausstammes $Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Zbtb46^{gfp/+}$ zusätzlich die zellreicheren Organe Niere, Milz und Lymphknoten analysiert.

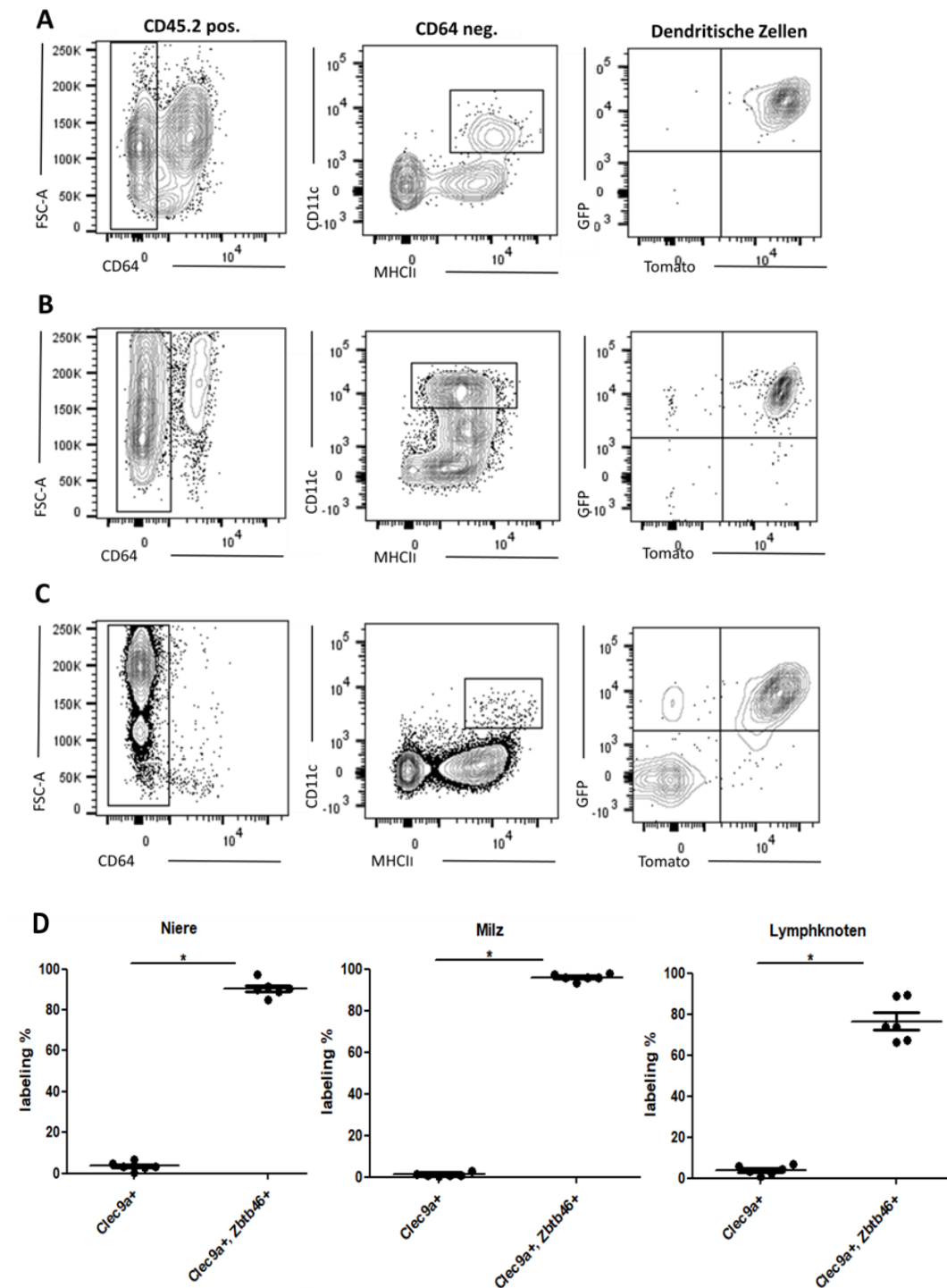


Abbildung 25: Durchflusszytometrie der Vergleichsorgane Niere, Milz und Lymphknoten (cDCs)

Analyse der Tomato- (Clec9aCre) und GFP- (Zbtb46) Expression in cDCs der (A) Niere, (B) Milz und (C) Lymphknoten. (D) Prozent Clec9aCre- und Zbtb46-positiver Zellen (n=6, * p<0,050).

Die Durchflusszytometrie zeigte eine sehr hohe Markierungseffizienz in klassischen dendritischen Zellen (s. Abb. 25). In Milz und Niere waren 90 bis 100 % der Zellen positiv für Tomato und GFP. In den Lymphknoten waren es mit 80 % etwas weniger. Alle Ergebnisse hatten eine Signifikanz von p=0,031.

1.4. Ausschluss von plasmazytoiden dendritischen Zellen in der Clec9aCre-positiven Makrophagenpopulation

Obwohl pDCs nicht von Tomato-positiven Vorläuferzellen abstammen, exprimieren sie in geringem Maße den Clec9a-Rezeptor [16, 131] und können somit in der $Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+}$ Mauslinie Tomato markiert sein. Plasmazytoide dendritische Zellen werden als $CD45^+LyC^+MHCII^{low}CD11c^{low}CD11b^{low/-}B220^+$ exprimierende Zellen definiert. Neben den genannten Oberflächenrezeptoren, welche teils auch auf anderen mononukleären Phagozyten zu finden sind, wird Siglec H vor allem von pDCs exprimiert [232]. Mit Hilfe des Mausstammes $SiglecH^{gfp}$, bei welchem pDCs grün fluoreszieren, wurde überprüft, ob in der dargestellten Makrophagenpopulation im Herzen auch pDCs markiert wurden.

Zunächst wurde die Herzbasis mittels 3-fach-Färbung immunhistologisch untersucht (s. Abb. 26).

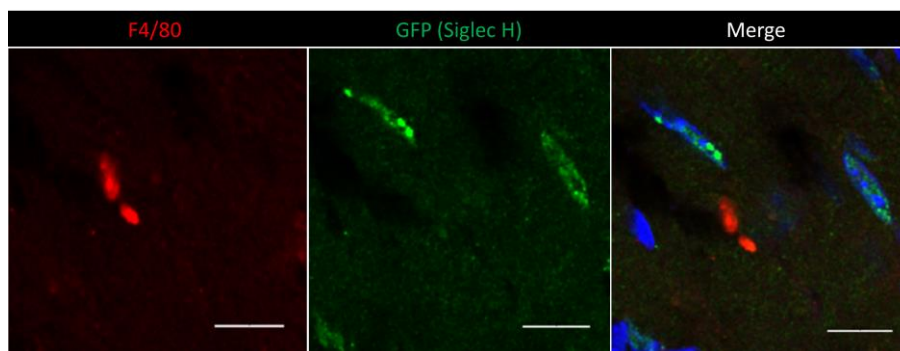


Abbildung 26: Plasmazytoide dendritische Zellen im Herzen

Konfokale Mikroskopie von Mausherzen. Makrophagen sind in rot (F4/80), SiglecH positive Zellen (pDCs) in grün (GFP) und Zellkerne in blau (Hoechst) dargestellt (Maßstab entspricht 10 μ m).

Neben Makrophagen konnten in Herzschnitten vereinzelt SiglecH-positive Zellen auffindig gemacht werden. Eine Überlappung der Oberflächenrezeptoren F4/80 und SiglecH konnte hier nicht beobachtet werden.

Zusätzlich wurden die Herzspitzen der Tiere durchflusszytometrisch analysiert (s. Abb. 27).

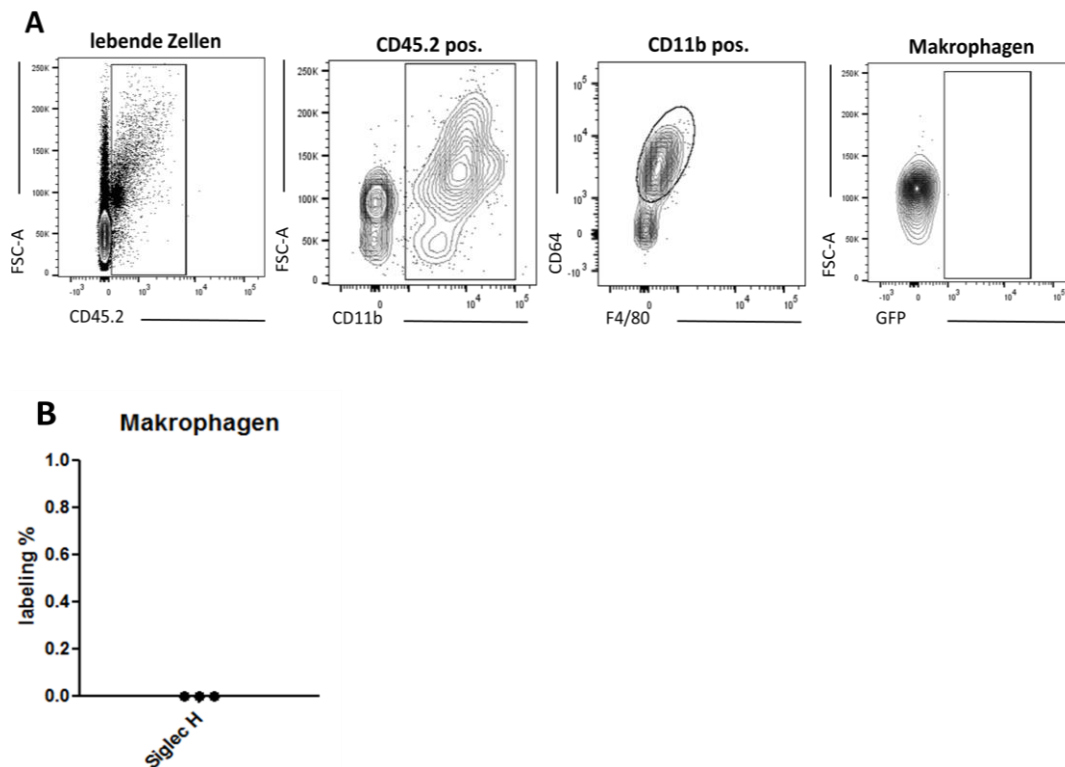


Abbildung 27: Differenzierung zwischen kardialen pDCs und Makrophagen

Durchflusszytometrie von Mausherzen. Analyse der GFP-Expression innerhalb der kardialen Makrophagenpopulation (CD45+CD11b+CD64+F4/80+).

In der durchflusszytometrischen Analyse konnte kein GFP-Signal innerhalb der Makrophagenpopulation im Herzen detektiert werden. Dies bestätigte die Ergebnisse der histologischen Untersuchung. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass das positive Tomato-Signal (Clec9aCre-positiv) in der dargestellten Makrophagenpopulation in Herzen der Mauslinie $Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+}$ von plasmazytoiden dendritischen Zellen stammte.

2. Clec9a-abhängige Markierung kardialer Makrophagen

In den vorangegangenen Untersuchungen zeigten klassische dendritische Zellen eine sehr hohe Clec9aCre-Markierungseffizienz. Überraschenderweise konnten auch innerhalb der kardialen Makrophagenpopulation Tomato-positive Zellen identifiziert werden. Diese zeigten zwar mit etwa 12 % eine deutlich geringere Markierungseffizienz, waren aber zahlenmäßig den dendritischen Zellen unter Ruhebedingungen im Herzen deutlich überlegen. Daher wurden die Tomato-positiven Makrophagen im Folgenden noch näher untersucht.

2.1. Clec9aCre-Markierungseffizienz in Makrophagen aus postnatalen und adulten Herzen

Um die Effizienz der Tomato-Markierung in kardialen Makrophagen näher zu untersuchen, wurden die Herzen von Tieren unterschiedlichen Alters der Linie $Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+}$ mittels Durchflusszytometrie analysiert.

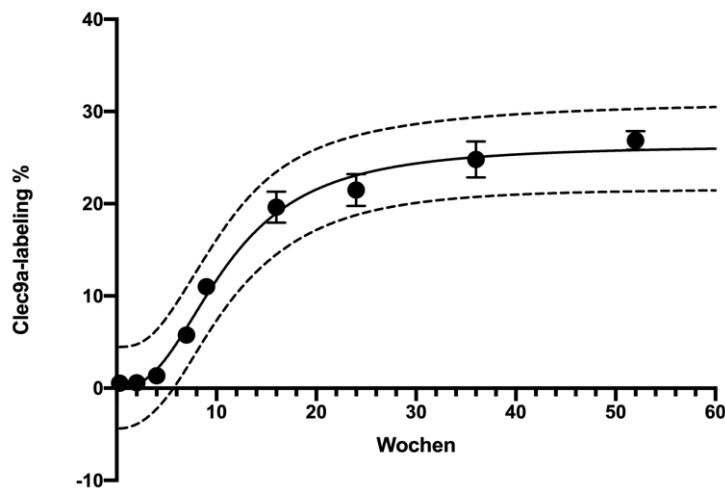


Abbildung 28: Kinetik der Tomato-Expression in Abhängigkeit zum Alter der Maus

Durchflusszytometrie von Mäuseherzen. Die Clec9aCre-Markierung in kardialen Makrophagen ($CD45^+CD11b^+CD64^+F4/80^+$) ist altersabhängig (pro Zeitpunkt $n=3$, gestrichelte Linie zeigt 95 %-Konfidenzintervall).

Die FACS-Analysen der Herzen verschieden alter Tiere der Linie $Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+}$ zeigte, dass Tomato erst in kardialen Makrophagen adulter Tiere exprimiert wird. Bis zum vierten Monat stieg die Anzahl Tomato-positiver Makrophagen rapide an. In sieben Wochen alten Tieren waren circa 5 % der Makrophagen im Herzen positiv für Tomato. Ab dem Alter von vier Monaten wurde ein Plateau erreicht. Hier exprimierten 20–25 % der kardialen Makrophagen Tomato. Die Stichproben zeigten zu den verschiedenen Zeitpunkten eine hohe Homogenität und Schätzgenauigkeit (s. Abb. 28).

Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den positiven Makrophagen nicht um embryonale Makrophagen handelt oder diese erst zu einem späteren Zeitpunkt einen aktiven Clec9a-Promotor besitzen.

2.2. Weitere Charakterisierung des Phänotyps Tomato-positiver Makrophagen

Um Tomato-positive Makrophagen genauer zu charakterisieren und damit Hinweise auf deren Funktion zu erhalten, wurden weitere Oberflächenmarker in der durchflusszytometrischen Analyse eingesetzt.

Der Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHCII) wird von professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie Makrophagen, dendritische Zellen und Monozyten exprimiert und dient zur Präsentation extrazellulärer Peptidfragmente an $CD4^+$ T-Lymphozyten. MHCII Moleküle spielen daher eine wichtige Rolle in der Initiierung der Antigen-spezifischen Immunantwort. Anhand der Höhe der MHCII-Expression von Makrophagen kann die Fähigkeit zur Antigen-Präsentierung und Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen bemessen werden [233, 234].

Bei dem Mannose-Rezeptor CD206 handelt es sich um einen *pattern recognition receptor* (PRR) der C-Type Lectinfamilie und wird vor allem von dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert. Er interagiert mit Glykoproteinen und Glykolipiden, welche auf der Oberfläche von Pathogenen zu finden sind und führt zu deren Endo- und Phagozytose. Zudem aktiviert er Makrophagen und die Antigen Präsentation. Der Mannose-Rezeptor spielt somit eine wichtige Rolle in der Immunabwehr sowie in der Verknüpfung des angeborenen und adaptiven Immunsystems [235, 236].

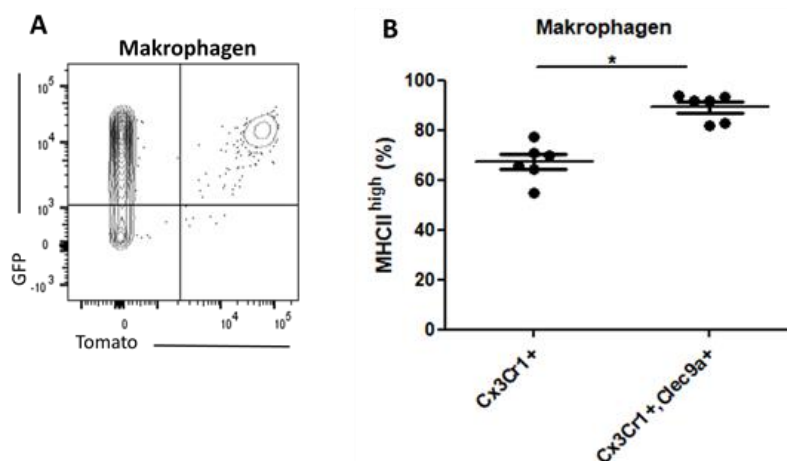


Abbildung 29: MHC-II Expression Clec9a-abhängiger Makrophagen

Durchflusszytometrie von Mausherzen. (A) Analyse der GFP- (Cx3Cr1) und Tomato- (Clec9aCre) Expression kardialer Makrophagen ($CD45^+CD11b^+CD64^+F4/80^+$). (B) Prozent der MHCII^{high} Expression der Cx3Cr1 einfach-positiven sowie Cx3Cr1- und Clec9a-positiven Makrophagen (n=6, * $p \leq 0,050$).

Die Durchflusszytometrie zeigte, dass Clec9a-abhängige Makrophagen über 90 % MHCII^{high} exprimieren. Die höhere MHC-II^{high}-Expression im Vergleich zu Tomato-negativen Makrophagen war mit $p=0,031$ signifikant. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Tomato-positive Subpopulation eine hohe Fähigkeit zur Antigen-Präsentierung besitzt (s. Abb. 29).

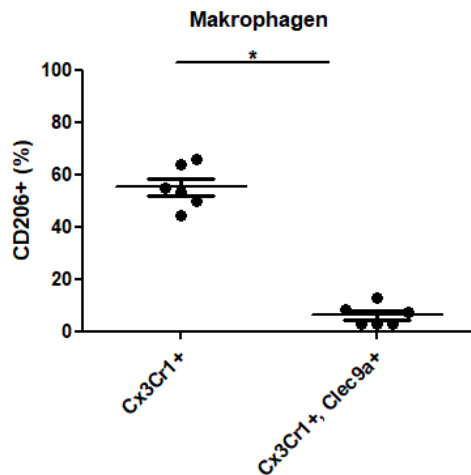


Abbildung 30: Expression des Mannose-Rezeptors auf Tomato-negativen kardialen Makrophagen

Durchflusszytometrie von Mausherzen. Prozent der CD206-Expression der Cx3Cr1 einfach-positiven sowie Cx3Cr1 und Clec9a doppelt-positiven Makrophagen ($n=6$, * $p \leq 0,050$).

Die CD206-Expression der Clec9a-positiven kardialen Makrophagen lag bei unter 10% und war damit deutlich geringer als in Cx3Cr1 einfach-positiven Makrophagen ($p=0,031$). Diese exprimierten etwa 60 % den Mannose-Rezeptor. Dies deutet daraufhin, dass die Funktion der Clec9a-positiven Zellen eher in der Antigen-Präsentierung liegt, als in der Phagozytose (s. Abb. 30).

Die Resultate der durchflusszytometrischen Untersuchung lassen darauf schließen, dass sich die Clec9a-abhängigen Makrophagen hinsichtlich des Phänotyps und funktioneller Attribute von den Cx3Cr1 einfach-positiven Makrophagen unterscheiden.

3. Clec9a-abhängige Markierung kardialer Makrophagen bei erhöhtem Umsatz

Um das Verhalten Tomato-positiver Zellen nach einem erhöhten Zellumsatz im Gewebe sowie eine mögliche Rekrutierung zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Modelle herangezogen. Während in dem Modell der *Csfr-1*-Inhibition gezielt gewebeständige Makrophagen depletiert wurden, konnte in dem Chimären-Modell die Tomato-Markierung und Rekrutierung nach Knochenmark-Ablation untersucht werden.

3.1. Makrophagen Depletion durch PLX-Inhibition des *Csf1*-Rezeptors

Der *Colony-stimulating factor 1* (*Csf1*) kontrolliert das Wachstum und die Differenzierung von Makrophagen. Wird der *colony-stimulating factor 1 receptor* (*Cfs1r*) blockiert, kommt es zu einer vollständigen Depletion der geweberesidenten Makrophagen [212, 213].

Wie in Kapitel IV.4.1 beschrieben, erfolgte eine dreitägige Inhibition des Rezeptors durch die Gabe von mit PLX-angereichertem Futter. Die Herzen der Linie *Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+}* wurden am Tag nach der Depletion sowie nach einer Woche Regeneration auf Normaldiät durchflusszytometrisch analysiert

Nach dreitägiger Blockierung des *Csf1*-Rezeptors war nahezu die gesamte geweberesidente Makrophagenpopulation im Herzen depletiert ($p=0,050$) (s. Abb 31). Etwa die Hälfte der Makrophagen wurde innerhalb einer Woche Regenerationszeit ersetzt ($p=0,050$).

Die rekrutierten Makrophagen zeigten im Vergleich zu den nicht-depletierten Makrophagen mit etwa 25 % eine deutlich höherer *Cx3Cr1*- und *Clec9aCre*-Markierung. Die unterschiedliche Markierung der beiden Gruppen war mit $p=0,050$ signifikant.

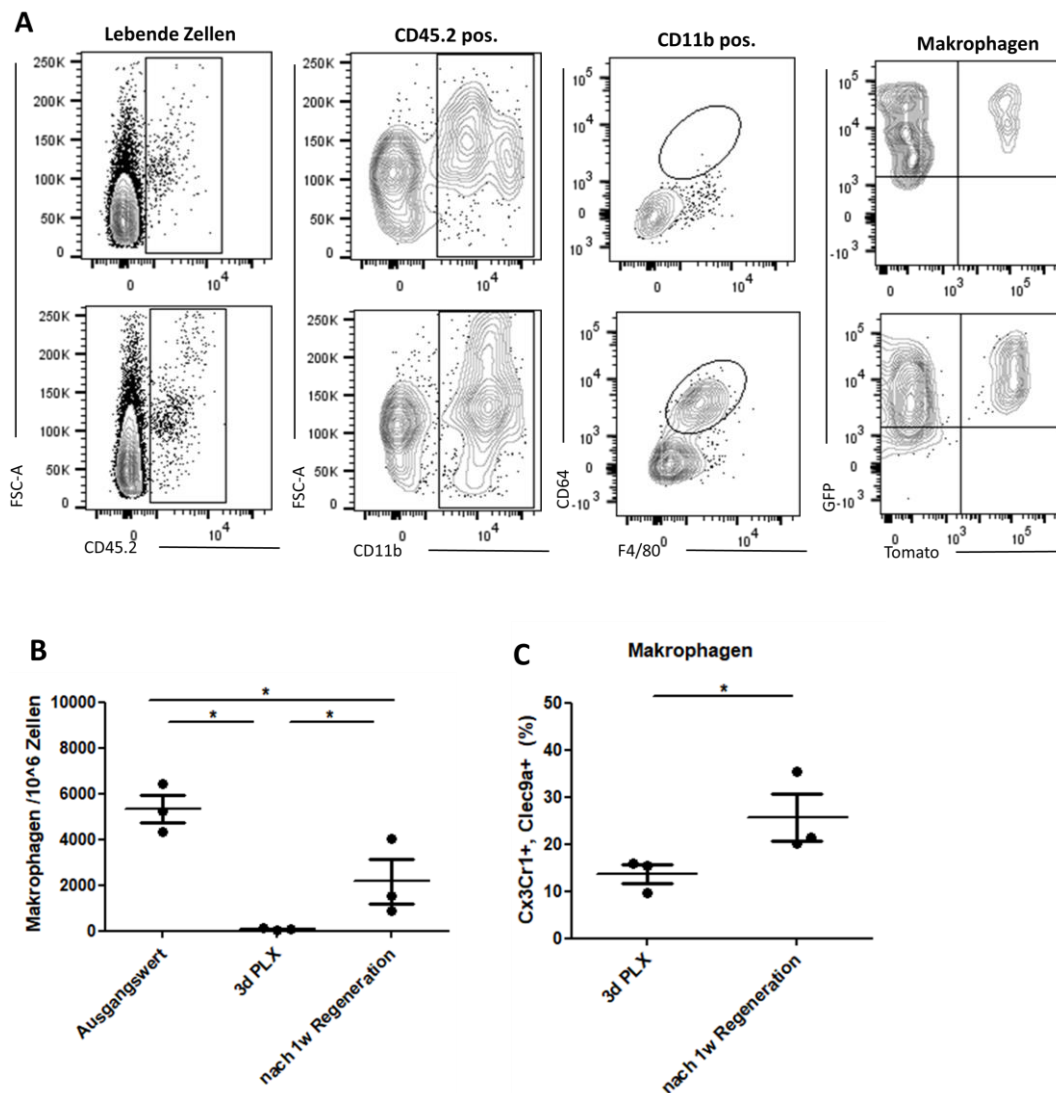


Abbildung 31: Depletion und Wiederherstellung kardialer Makrophagen nach temporärer Csfr1-Inhibition

Durchflusszytometrie von Mausherzen unter Depletion und nach Regeneration auf Normaldiät. (A) Die kardiale Makrophagenpopulation wurde nach 3-tägiger PLX-Inhibition des Csfr1-Rezeptors (obere Reihe) und nach einer Woche Regeneration (untere Reihe) analysiert. (B) Absolute Anzahl der Makrophagen zu verschiedenen Zeitpunkten der Depletion. (C) Prozentuale Verteilung der Clec9aCre- und Cx3Cr1-Markierung nach Makrophagen-Umsatz ($n=3$, * $p \leq 0,050$).

Im Gegensatz dazu war die MHCII^{high}-Expression der neu eingewanderten Cx3Cr1- und Tomato-positiven Makrophagen um etwa 40 % geringer als in den nicht-depletierten Makrophagen ($p=0,050$) (s. Abb. 32).

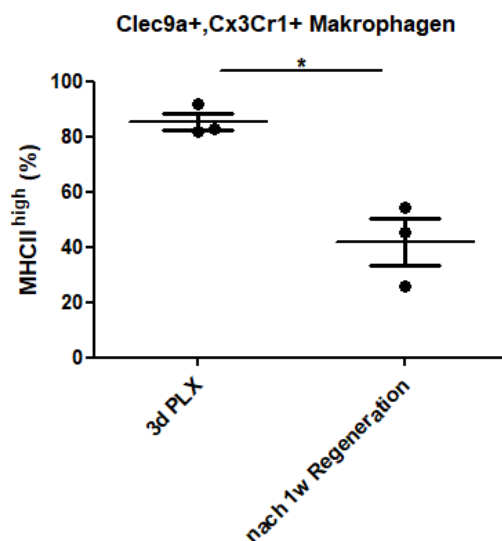


Abbildung 32: MHC-II^{high} Expression in Cx3Cr1- und Clec9aCre-positiven Makrophagen nach Csf1r-Inhibition

Durchflusszytometrie von Mausherzen nach PLX-Gabe. Ersetzte Makrophagen exprimieren weniger MHCII^{high} als nicht-depletierte Makrophagen (n=3, * p≤0,050).

Zusätzlich wurde das Verhalten Tomato-positiver dendritischer Zellen während der Makrophagen-Depletion untersucht. Dabei zeigte sich, dass die klassischen dendritischen Zellen im Herzen kaum von einer Inhibition des Csf1r betroffen war (s. Abb. 33). Jedoch war ihre Anzahl in Folge der Makrophagen-Depletion nach einer Woche um etwa das 3-fache gestiegen (p=0,050).

Die Clec9aCre-Markierung der rekrutierten dendritischen Zellen unterschied sich hierbei kaum zu der von den ursprünglich residenten cDCs. In beiden Gruppen waren etwa 80 % der klassischen dendritischen Zellen Tomato-positiv. Davon exprimierten circa. 40 % zudem GFP.

Das unterschiedliche Verhalten der Clec9aCre-positiven Zellen auf eine Csf1r-Inhibition untermauern die Annahme, dass es sich hierbei um verschiedene Subpopulationen Clec9aCre-markierter mononukleärer Phagozyten handelt.

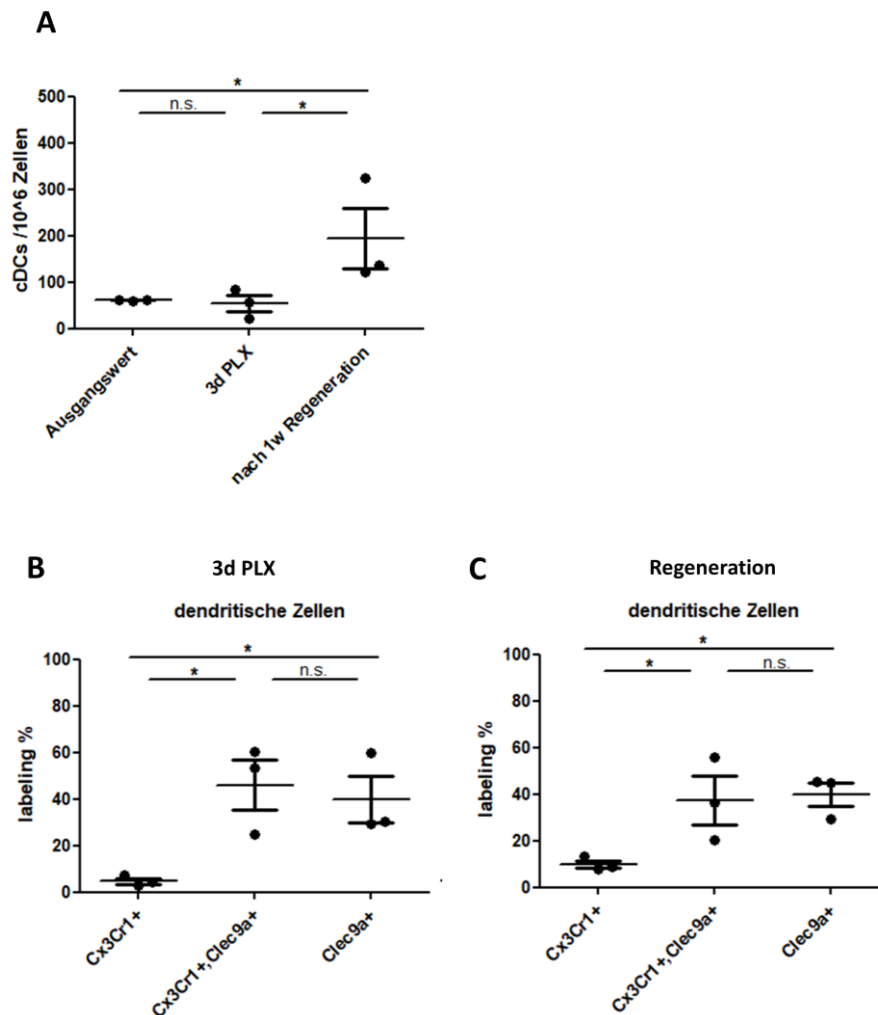


Abbildung 33: Verhalten Tomato-positiver cDCs nach PLX-Gabe

Durchflusszytometrie von Mausherzen nach PLX-Gabe und nach Regeneration auf Normaldiät. (A) In Folge der Makrophagen Depletion ist die Anzahl an klassischen dendritischen Zellen im Herzen gestiegen. Prozent der Clec9aCre- und Cx3Cr1-Markierung in residenten (B) und rekrutierten (C) cDCs (n=3, * $p \leq 0,050$, n.s nicht signifikant).

3.2. Knochenmark-Ablation im Chimären-Modell

Um das Verhalten Tomato-positiver Zellen und ihre Rekrutierung zu analysieren, wurden zwei unterschiedliche Chimären-Modelle genutzt. Bei dem Bestrahlungsmodell wurde das Knochenmark von Wildtyp Mäusen mittels Röntgenstrahlung ablatiert. Im genetischen Modell kamen Mäuse der Linie Mx1CreMyb^{flax/flax}, bei welchen durch die repetitive Gabe von poly(I:C) der für die Hämatopoese wichtige Transkriptionsfaktor Myb deletiert und so eine Myeloablation induziert werden kann, zum Einsatz.

Die Spenderzellen für die Knochenmarktransplantation stammten in beiden Modellen von Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+} Mäusen (s. Kapitel IV. 3.2). Der genetische Hintergrund war in allen Tieren gleich (C57Bl/6J).

Das Bestrahlungsmodell stellt ein tierexperimentelles Standardmodell dar, um das Verhalten hämatopoetischer Zellen zu untersuchen. In unserer Versuchsreihe sollte dadurch der Ersatz von mononukleären Phagozyten (Makrophagen, cDCs) im Herzen durch zirkulierende Vorläuferzellen (Monozyten) geklärt werden. Neuere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass die Ganzkörperbestrahlung der Maus zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie beispielsweise einer Inflammation des Knochenmarks und der zu untersuchenden Organe, führen kann. Dadurch kommt es zu einer entzündungsbedingten Rekrutierung von Blutzellen in das betroffene Gewebe und dem vermehrten Austausch dortiger residenter Immunzellen [237]. In dem von unserer Arbeitsgruppe etablierten genetischen Modell können sich die hämatopoetischen Zellen im Knochenmark nach konditioneller Deletion von Myb nicht entwickeln, sodass eine direkte Transplantation von Spenderzellen ohne weitere Konditionierung ermöglicht wird. Hierbei tritt in Geweben keine Entzündungsreaktion auf, was die Analyse des „echten“ Umsatzes von Immunzellen in Geweben unter Ruhebedingungen ermöglicht [205].

Wie in Kapitel IV.3.3 beschrieben, wurde den Tieren sechs Wochen nach Knochenmarktransplantation Blut über die *Vena facialis* entnommen, um mittels FACS-Analyse den Chimärismus und damit den Erfolg der Transplantation zu überprüfen. Monozyten, welche GFP (Cx3Cr1) beziehungsweise Tomato (Clec9aCre) exprimierten, stammten von den Spendertieren. Da der Chemokin-Rezeptor Cx3Cr1 in nahezu allen Monozyten exprimiert wird (high oder low), konnte mit Hilfe der GFP-Expression der Blutchimärismus bestimmt werden. Je höher der Anteil GFP-positiver Monozyten, desto erfolgreicher war die Knochenmarktransplantation anzusehen.

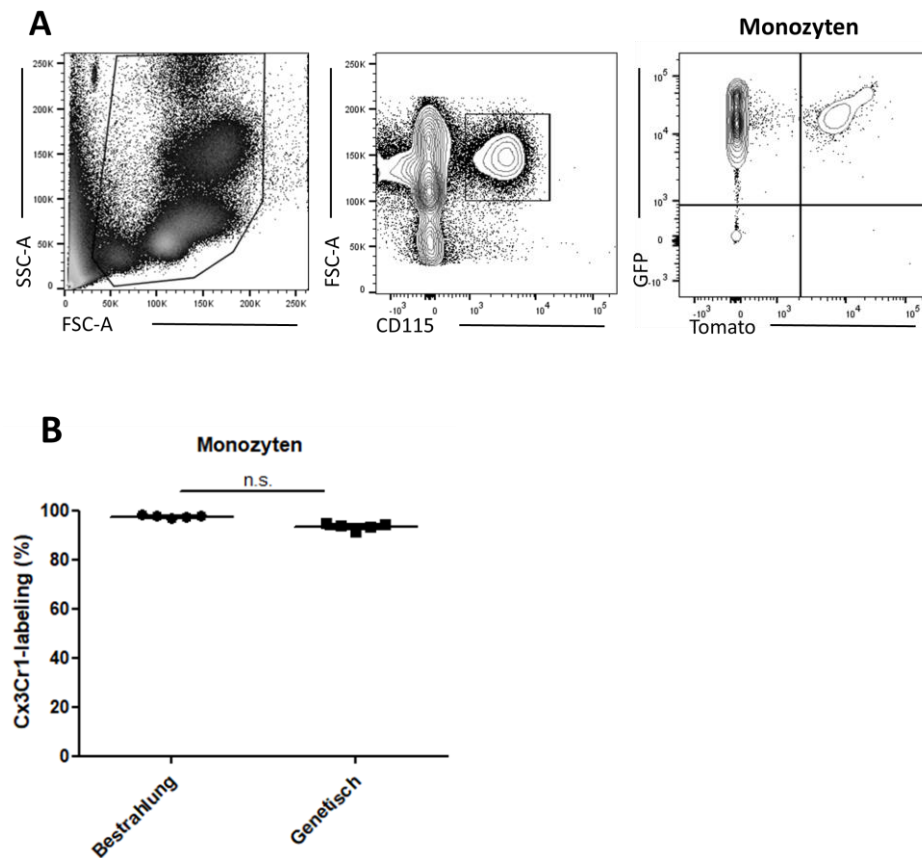


Abbildung 34: Bestimmung des Blutchimärismus

Durchflusszytometrie des Blutes von transplantierten Empfängertieren. (A) Ausschluss von Zellfragmenten, Identifizierung der CD115 positiven Monozyten, Analyse der GFP- (Cx3Cr1) und Tomato- (Clec9aCre) Expression. (B) Chimärismus der verwendeten Tiere (n=5, n.s nicht signifikant).

Nur Tiere, die sechs Wochen nach Transplantation einen Chimärismus von über 90 % im Blut aufwiesen, wurden weiter in den Versuch genommen. Die Tiere zeigten keinen Unterschied bezüglich des Blutchimärismus in den zwei verschiedenen Chimären Modellen ($p=0,063$) (s. Abb. 34).

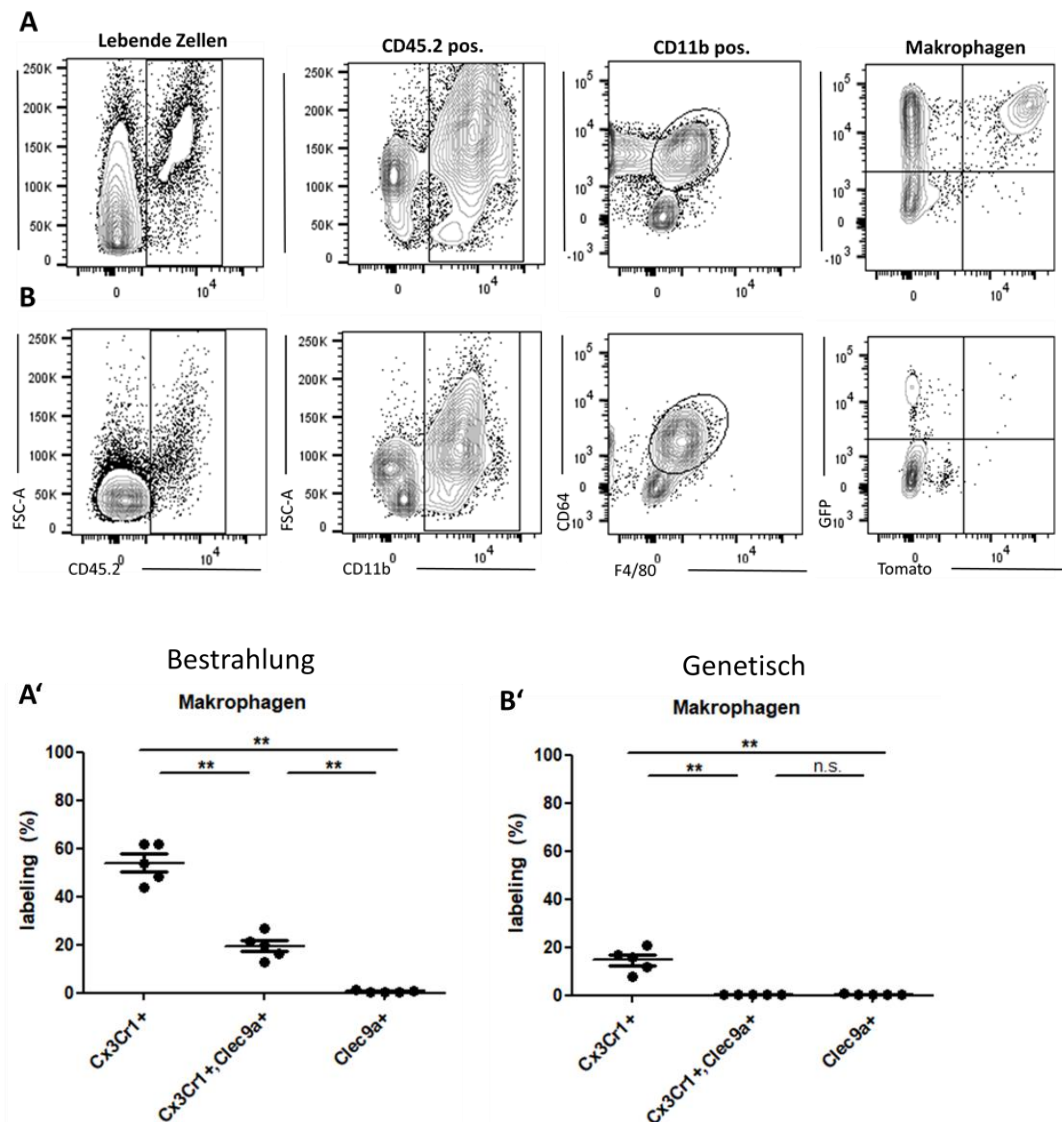


Abbildung 35: Chimärismus kardialer Makrophagen nach Transplantation im Bestrahlungs- bzw. genetischen Modell

Durchflusszytometrie von Mausherzen 3 Monate nach Knochenmarktransplantation. Identifikation der Makrophagen (lebende CD45.2⁺CD11b⁺CD64⁺F4/80⁺) und Analyse der Tomato- (Clec9aCre) und GFP- (Cx3Cr1) Expression in (A) Bestrahlungs- und (B) Mx1CreMyb^{fllox}-Chimären. (A'+B') Prozent Clec9aCre- und Cx3Cr1-positiver Zellen (n=5, ** p≤0,010, n.s nicht signifikant).

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der Herzen von Mx1CreMyb^{fllox} Chimären (genetisch) drei Monate nach Knochenmarktransplantation zeigte sich, dass circa 18 % der Makrophagen GFP (Cx3Cr1) exprimierten und somit von dem Spendertier stammten (s. Abb 35). Dies bedeutet, dass im Rahmen des Umsatzes unter nicht entzündlichen Bedingungen circa 18 % der Gewebemakrophagen durch knochenmarkabstammende Makrophagen ersetzt wurden. Diese exprimierten jedoch kein Tomato (Clec9aCre) (p=0,008). Im Vergleich dazu konnte in den

Bestrahlungschimären ein weitaus höherer Influx knochenmarkstämmiger Makrophagen beobachtet werden. Hier wurden etwa 75 % der Gewebemakrophagen ersetzt. Es scheint, dass die Bestrahlung zu einem Entzündungsgeschehen im Herzen führt und dadurch einen erhöhten Umsatz bedingt. 20 % der rekrutierten Makrophagen waren zudem positiv für Tomato (Clec9aCre) ($p=0,008$), was darauf hindeutet, dass diese Makrophagen eine wichtigere Rolle in der Inflammation spielen als unter Ruhebedingungen.

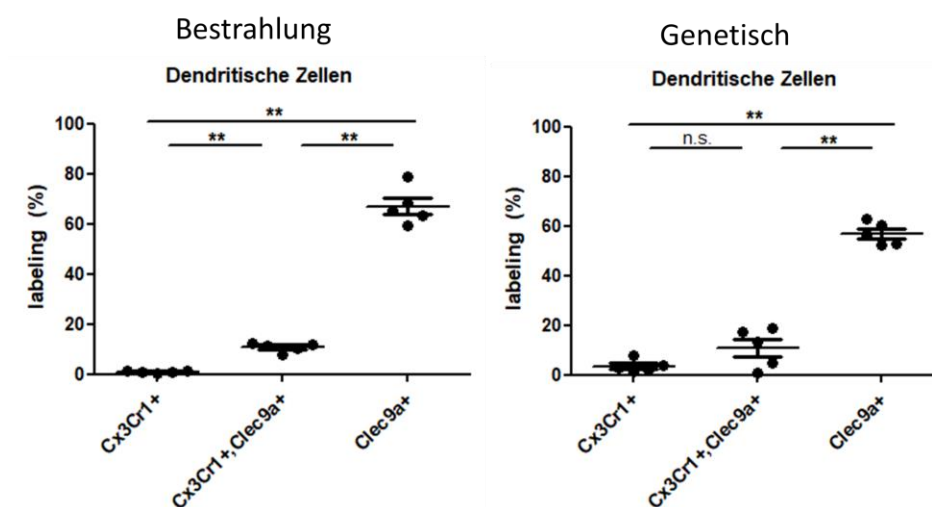


Abbildung 36: Chimärismus dendritischer Zellen im Herzen nach Transplantation

Durchflusszytometrie von Mausherzen 3 Monate nach Transplantation. Prozent GFP und Tomato-positiver cDCs im Bestrahlungs- und genetischem Modell ($n=5$, $** p \leq 0,050$, n.s nicht signifikant).

Im Gegensatz zu den Makrophagen war bei den klassischen dendritischen Zellen kein Unterschied zwischen den beiden Chimären Modellen zu erkennen (s. Abb. 36). Dies ist auf die relativ kurze Halbwertszeit von circa zwei Wochen der dendritischen Zellen zurückzuführen. Drei Monate nach Transplantation waren etwa 70 % der Zellen Tomato und 15-20 % Tomato- und GFP-positiv (sowohl im genetischen als auch im Bestrahlungsmodell $p=0,008$). Dies bedeutet, verglichen mit der Markierungseffizienz kardialer dendritischer Zellen unter Ruhebedingungen, dass alle cDCs im Herzgewebe ersetzt wurden.

4. Clec9a-markierte Zellen in kardialer Inflammation

4.1. Tomato-positive Zellen im Model der kardialen Fibrose

Phagozytierende und Antigen-präsentierende Makrophagen und dendritische Zellen spielen in kardialen Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle. Um das Verhalten Tomato-positiver Zellen in einer chronischen Entzündung zu untersuchen, wurde das Angiotensin II (AT II) Modell verwendet. Die vasokonstriktorische Eigenschaft des Peptidhormons führt zu einer Erhöhung des Blutdruckes und zur Steigerung der Nachlast im Herzen. Infolgedessen kommt es zur Entwicklung von fibrotischem Gewebe im Myokard. Zudem besitzt es auch die Fähigkeit, direkt auf Fibroblasten einzuwirken. Für eine kontinuierliche AT II-Infusion wurde den Tieren der Linie Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+} eine mit AT II befüllte Pumpe implantiert. Die Kontrollgruppe erhielt eine Pumpe mit Natriumchlorid. Nach 10 Tagen wurden die Organe entnommen und die Herzen histologisch untersucht.

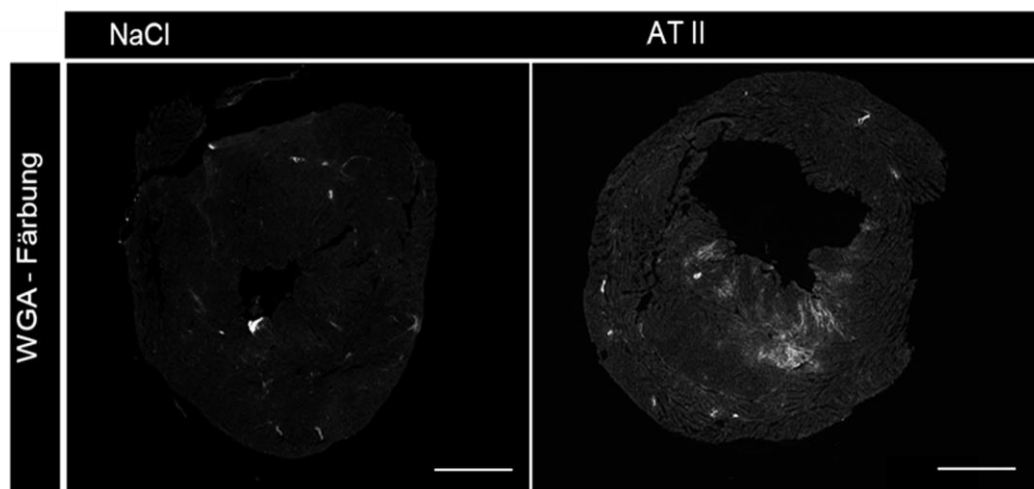


Abbildung 37: Identifikation von fibrotischem Gewebe am Myokard

Epifluoreszenzmikroskopie von Mauserzen nach WGA-Färbung, Herzschnitte der Kontroll- (links) und Versuchsgruppe (rechts) nach 10 Tagen AT II-Infusion (Maßstab entspricht 1000 µm).

Mittels WGA-Färbung konnten fibrotische Areale sichtbar gemacht und quantifiziert werden. Etwa 7 % des Myokards von mit AT II behandelten Tieren waren fibrotisch verändert. Die Kontrolltiere zeigten keine Fibrosierung ($p=0,029$) (s. Abb. 38).

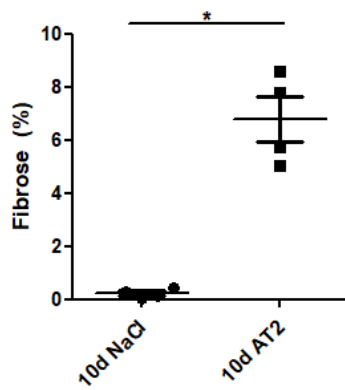


Abbildung 38: Angiotensin II induziert eine kardiale Fibrose

Auswertung der Histologie. Prozent des fibrotischen Gewebes am Myokard (n=4, *p<0,05)

Um die Anzahl der Zellen in den fibrotischen und nicht fibrotischen Bereichen zu bestimmen, wurden die Schnitte zusätzlich immunhistologisch gefärbt (s. Abb. 39).

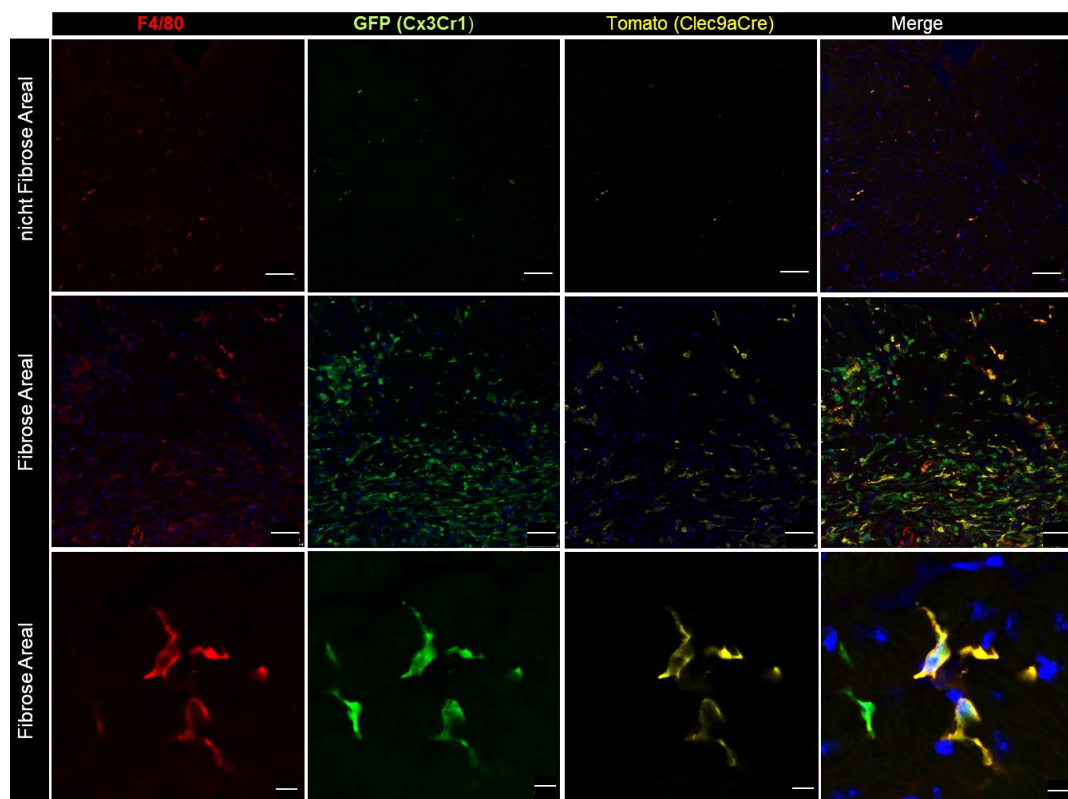


Abbildung 39: Immunzellen in der kardialen Fibrose

Konfokale Aufnahmen der Herzbasis. In mikroskopischen Aufnahmen sind Makrophagen rot (F4/80), Cx3Cr1-positive Zellen grün (GFP), Clec9aCre-positive Zellen gelb (Tomato) und Zellkerne blau (Hoechst) dargestellt (Maßstab entspricht 50 (obere und mittlere Reihe) bzw. 5 µm (untere Reihe)).

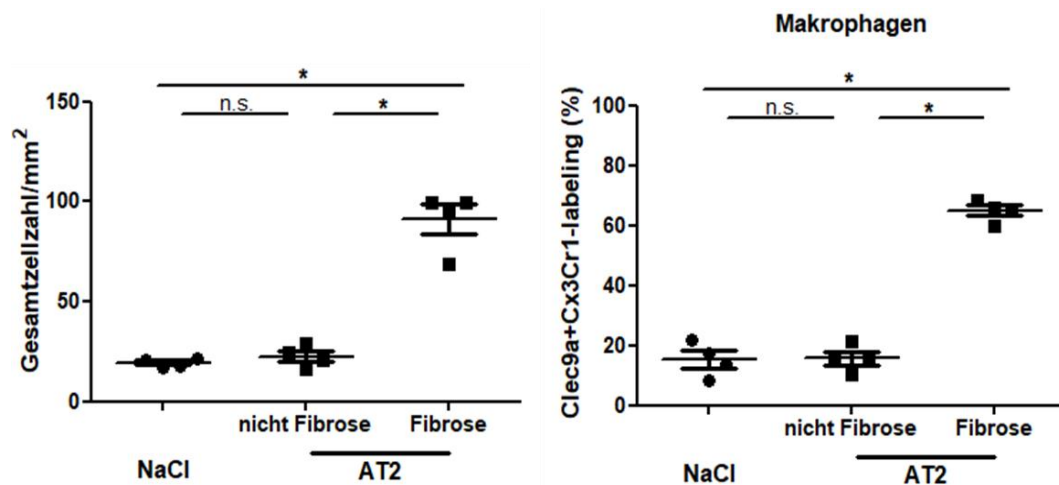


Abbildung 40: Quantifizierung Tomato-positiver Makrophagen im fibrotischen Gewebe

Auswertung der Histologie. Darstellung und Quantifizierung der Zellen in nicht fibrotischen und fibrotischen Arealen des Myokards mit Hilfe einer 4-fach Färbung (n=4, * $p \leq 0,050$, n.s nicht signifikant).

Verglichen mit der Kontrollgruppe wurde kein relevanter Anstieg der Zellzahl in den nicht fibrotischen Arealen AT II-behandelter Tiere beobachtet ($p=0,686$). In Bereichen mit interstitieller Fibrose hingegen zeigte sich eine deutliche Zunahme der Gesamtzellzahl ($p=0,029$). Gewertet wurden hierbei alle markierten, d.h. alle F4/80-, Cx3Cr1- oder Clec9aCre-positiven Zellen. Zudem war ein deutlicher Anstieg Tomato-exprimierender Makrophagen in den fibrotischen Bereichen, verglichen mit der Kontrollgruppe ($p=0,029$) und nicht fibrotischem Gewebe ($p=0,029$), zu erkennen (s. Abb. 40).

Die Resultate der histologischen Untersuchung deuten auf eine Zunahme Tomato-positiver Zellen in fibrotisch verändertem Gewebe hin.

4.2. Tomato-positive Zellen im Ischämie/Reperfusionsschaden nach Myokardinfarkt

In Folge eines Herzinfarktes kommt es durch die auftretende Ischämie zu einem abrupten Absterben von Kardiomyozyten. Dies führt zu einer starken Entzündungsreaktion, Rekrutierung von Immunzellen und Ausbildung von Narbengewebe. Hierbei spielen mononukleäre Phagozyten eine wichtige Rolle. Die Inflammation kann in zwei Phasen eingeteilt werden. In der frühen Phase dominieren vor allem proteolytische, phagozytierende und inflammatorische Zellen. Ly6C^{high} Monozyten rekrutieren ins infarzierte Gewebe und differenzieren

sich zu Makrophagen und dendritischen Zellen. Wohingegen in der späten Phase antiinflammatorische Zellen überwiegen, welche die Entzündung supprimieren und die Wundheilung fördern.

Um das Verhalten Clec9aCre-positiver Zellen nach Myokardinfarkt zu untersuchen, wurden die Herzen von Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+} Mäusen an Tag 2, 6 und 30 nach Induktion eines Myokardinfarkts (siehe IV.5.2) durchflusszytometrisch analysiert (s. Abb. 41).

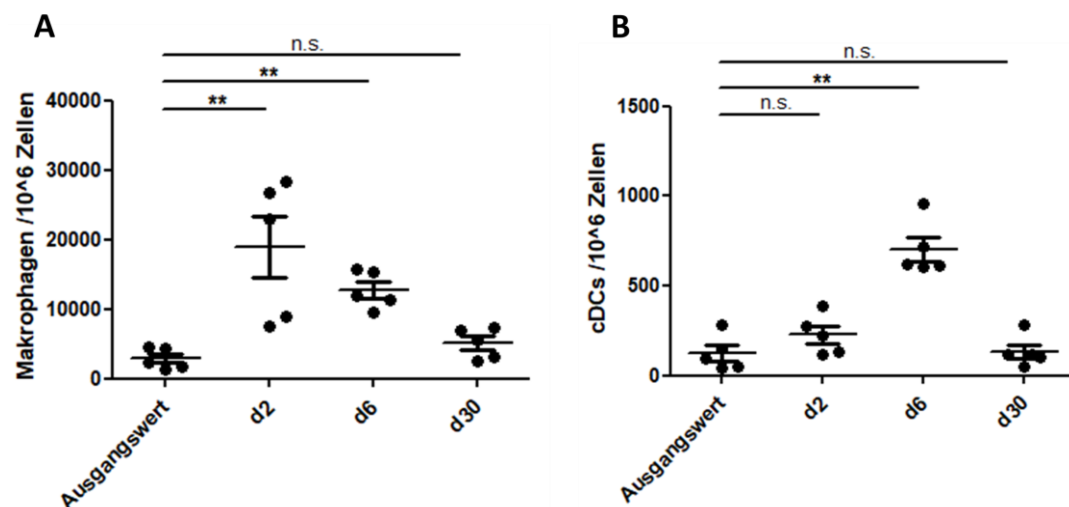


Abbildung 41: Quantifizierung von Makrophagen und dendritischen Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt

Durchflusszytometrie von Mausherzen nach Infarkt. Absolutzahlen von Makrophagen (A) und klassischen dendritischen Zellen (B) an Tag 2, 6 und 30 nach Myokardinfarkt (n=5, **p≤0,010, n.s nicht signifikant).

Die FACS-Ergebnisse zeigten, dass es an Tag 2 nach Myokardinfarkt zu einer vermehrten Einwanderung von Makrophagen kommt (p=0,008). Bereits an Tag 6 war die Anzahl an Makrophagen abnehmend (p=0,008), so dass an Tag 30 der Pool an geweberesidenten Makrophagen fast mit dem zu Ruhebedingungen vergleichbar war (p=0,095). Die Rekrutierung der dendritischen Zellen hingegen erfolgte etwas später. Die Anzahl der klassischen dendritischen Zellen stieg von Tag 2 auf Tag 6 deutlich an (p=0,008). Doch auch hier entsprach die Anzahl am Tag 30 wieder der Zahl an residenten dendritischen Zellen unter Ruhebedingungen (p=0,690).

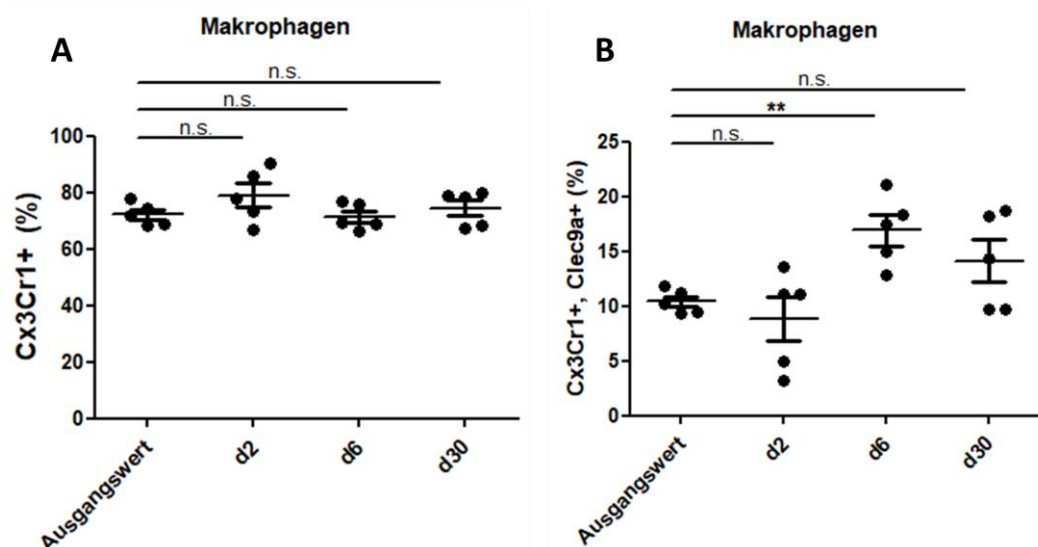


Abbildung 42: GFP- und Tomato-Expression kardialer Makrophagen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt

Durchflusszytometrie im Mausstamm $Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+}$ nach Infarkt. Prozent der GFP- (Cx3Cr1) (A) und GFP- und Tomato- (Cx3Cr1 und Clec9aCre) Expression (B) kardialer Makrophagen an Tag 2, 6 und 30 nach Myokardinfarkt (n=5, ** $p \leq 0,010$, n.s nicht signifikant).

Bei der Analyse der kardialen Makrophagenpopulation zeigte sich, dass der prozentuale Anteil an Tomato-positiven Makrophagen am Tag 6 mit etwa 17 % am höchsten war ($p=0,008$). An Tag 2, in der frühen Entzündungsphase, waren unter 10 % markiert ($p=0,841$) (s. Abb. 42). Das lässt die Hypothese zu, dass Tomato-positive Makrophagen eine antiinflammatorische Funktion besitzen und möglicherweise eine Rolle in dem Prozess der Wundheilung spielen. Die Markierungseffizienz der cDCs zeigte keine Veränderung im Vergleich zu Ruhebedingungen (hier nicht dargestellt).

5. Rolle und Funktion Clec9a-abhängiger Immunzellen in kardialen Entzündungsprozessen

Mit Hilfe des Mausstammes $Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+}Rosa26^{DTR}$ konnte die Rolle Clec9a-abhängiger Makrophagen und dendritischer Zellen in kardialen Entzündungsprozessen genauer untersucht werden. Bei diesem Mausstamm führt, wie in Kapitel IV.1.2.8 beschrieben, die Clec9a-abhängige Cre-Aktivierung zu der Expression des Diphtherie-Toxin Rezeptors. Dies ermöglichte eine spezifische Depletion Clec9a-abhängiger Zellen durch die Gabe von Diphtherie-Toxin (siehe IV.4.2). Die Auswirkung einer Depletion dieser Zellen wurde sowohl in dem

Modell der kardialen Fibrose als auch in dem Modell des Myokardinfarktes untersucht. Um eine kontinuierliche Deletion der Clec9a-abhängigen Zellen zu gewährleisten, wurde den Tieren hierfür einmal täglich über sieben Tage Diphtherie-Toxin injiziert. Die erste Injektion erfolgte dabei am Tag vor der Implantation einer AT II-Pumpe beziehungsweise vor LAD-Ligatur. Die Kontrollgruppe bestand aus Mäusen derselben Linie ohne Diphtherie-Toxin Rezeptor. Auch sie erhielten Diphtherie-Toxin im gleichen Schema wie die Versuchsgruppen.

5.1. Depletion Clec9a-abhängiger Immunzellen unter Ruhebedingungen

Um die Funktionalität dieses Depletion-Modells zu überprüfen, wurde den Tieren zunächst unter Ruhebedingungen dreimal im Abstand von zwei Tagen Diphtherie-Toxin verabreicht. Am Tag nach der letzten Injektion sowie nach einer Woche erfolgte eine FACS-Analyse der Herzen, um die Depletion Clec9a-abhängiger Zellen zu überprüfen. Da am Rosa26-Locus dieser Mauslinie neben dem Diphtherie-Toxin Rezeptor auch Tomato exprimiert wurde (Heterozygosität auf beiden Loci), konnten nicht-depletierte Zellen anhand ihrer Tomato-Markierung detektiert werden.

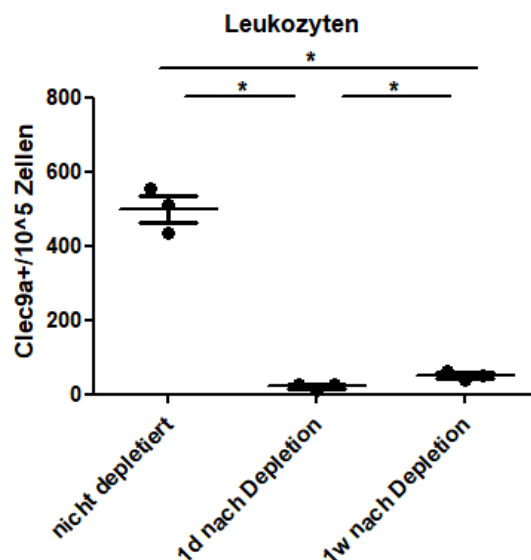


Abbildung 43: Depletion Clec9a-abhängiger Zellen nach Diphtherie-Toxin Gabe

Durchflusszytometrie von Mausherzen nach Diphtherie-Toxin Gabe. Es erfolgte eine dreimalige DT-Injektion (25 ng/g KGW) jeden zweiten Tag. Zur Kontrolle der Depletions-Effizienz wurden die Herzen einen Tag bzw. eine Woche nach der letzten Diphtherie-Toxin Gabe durchflusszytometrisch untersucht und die Leukozyten (lebende CD45.2) hinsichtlich einer Tomato-Expression (Clec9aCre) analysiert (n=3, * p≤0,050).

Die FACS-Analyse zeigte eine effiziente Depletion Clec9aCre-positiver Zellen ($p=0,050$) (s. Abb.43). Auch eine Woche nach der letzten Toxin Gabe war die Anzahl Clec9a-markierter Leukozyten noch sehr gering ($p=0,050$). Da in den Inflammations-Modellen mit einem erhöhten Influx Clec9a-abhängiger Zellen zu rechnen war, wurde die Diphtherie-Toxin Gabe jedoch intensiviert, um auch hier eine kontinuierliche Depletion zu gewährleisten.

5.2. Depletion Clec9a-abhängiger Immunzellen im Myokardinfarkt

Der vorangegangene Versuch mit der Mauslinie Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+} zeigte, dass der Anteil Tomato-positiver Zellen am Tag 6 nach Myokardinfarkt am höchsten war. Dies könnte bedeuten, dass diese Zellen eine antiinflammatorische Funktion besitzen und die Wundheilung fördern. Um herauszufinden, welche Rolle Tomato-positive Phagozyten im Ischämie/Reperfusionsschaden und anschließendem Heilungsprozess spielen, wurde die Auswirkung einer Clec9a-abhängigen Depletion im Modell des Myokardinfarkts untersucht und das kardiale Remodeling mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomografie (PET) bestimmt. Die Tiere erhielten über einen Zeitraum von sieben Tagen, beginnend am Tag vor der Induktion des Myokardinfarktes, Diphtherie-Toxin. Die PET-Analysen fanden an Tag 6 und 30 nach Myokardinfarkt statt. Hierbei wurde jeweils 30 Minuten vor Messbeginn der ¹⁸FDG-Tracer intravenös injiziert (siehe Kapitel IV.7.).

Anhand der Tracer-Anreicherung im vitalen Gewebe, konnten nekrotische Bereiche identifiziert und die Größe des Infarktgebietes bestimmt werden. Mit Hilfe des totalen Perfusionsdefizits (TPD), welches das Ausmaß der Hypoperfusion bezogen auf das gesamte Myokardvolumen bemisst, wurde die Infarktgröße ermittelt.

Zusätzlich wurde das linksventrikuläre metabolische Volumen (LVMV), welches positiv mit der Zunahme der Herzmuskelmasse (Hypertrophie) sowie der fibrotischen Anteile im myokardialen Gewebe korreliert, analysiert [228]. Dadurch konnte indirekt das Ausmaß kardialer Umbauprozesse bemessen werden.

Die Depletionsgruppe zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe ein deutlich schlechteres Allgemeinbefinden. Die Hälfte der Tiere musste zwischen Tag 6 und 15 nach Myokardinfarkt vorzeitig aus dem Versuch genommen werden. Im Gegensatz dazu wurde in der Kontrollgruppe kein Verlust verzeichnet.

Die TPD-Analyse zeigte einen geringen Trend zu größeren Infarkten in Clec9a-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren (s. Abb. 44). Aufgrund der großen Streuung der Messwerte waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant (Tag 5: $p=0,875$, Tag 7: $p=0,750$).

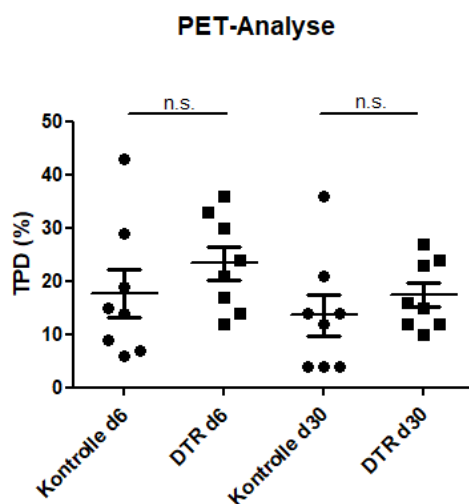


Abbildung 44: Infarktgröße in Clec9a-depletierten Mäusen

Auswertung der PET-Daten. Die Messungen der Kontroll- und Versuchsgruppe fanden am Tag 6 und 30 nach Myokardinfarkt statt. Um die Größe des Infarktgebietes zu ermitteln, wurde das totale Perfusionsdefizit (TPD) analysiert ($n=8$, n.s nicht signifikant).

Die Analyse des linksventrikulären metabolischen Volumens zeigte sowohl an Tag 6 als auch an Tag 30 nach Myokardinfarkt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe (Tag 5: $p=1,000$, Tag 7: $p=0,144$) (s. Abb. 45).

Die Abwesenheit Clec9a-exprimierender Zellen scheint in der frühen Phase des Ischämie/Perfusionsschadens keinen Effekt auf das kardiale Remodeling zu haben.

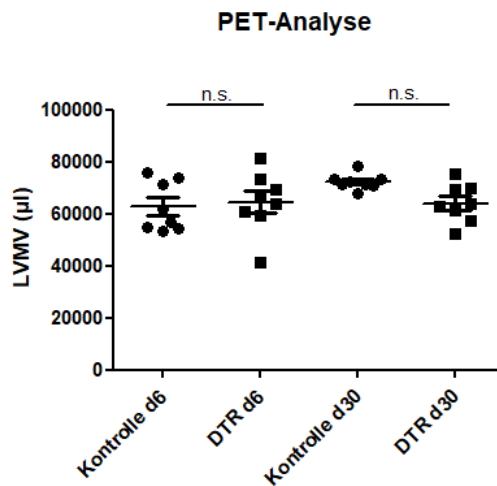


Abbildung 45: Linksventrikuläres metabolisches Volumen nach Myokardinfarkt in Clec9a-depletierten Mäusen

Auswertung der PET-Daten. Um das Ausmaß einer kardialen Fibrose und Hypertrophie zu bestimmen, wurde das linksventrikuläre metabolische Volumen an Tag 6 und 30 nach Myokardinfarkt analysiert (n=8, n.s nicht signifikant).

5.3. Depletion Clec9a-abhängiger Zellen in kardialer Fibrose

Um die Rolle der Clec9aCre-positiven Subpopulationen mononukleärer Phagozyten in der kardialen Fibrose zu untersuchen, wurde Tieren der Linie Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+}Rosa26^{DTR} eine AT II-Pumpe implantiert. Zudem erhielten sie ab dem Tag vor der Pumpen-Implantation einmal täglich über sieben Tage Diphterie-Toxin. An Tag 5 und 7 nach Implantation erfolgte eine echokardiografische Untersuchung, um die Herzfunktion der depletierten Tiere im Verlauf der Angiotensin II-Infusion zu kontrollieren (siehe Abb.12 Kapitel IV.4.2). Am Versuchsende wurden die Herzen für eine histologische Untersuchung entnommen und die Fibrosierung des Myokards mittels WGA-Färbung bestimmt. Die Versuchsgruppe bestand aus Tieren derselben Linie ohne Diphterie-Toxin Rezeptor am Rosa26-Locus. Auch ihnen wurde eine AT II-Pumpe implantiert und Diphterie-Toxin injiziert.

Die Tiere der Depletionsgruppe zeigten im Vergleich zu der Kontrollgruppe ab Tag 6 einen deutlichen Gewichtsverlust und reduziertes Allgemeinbefinden, welches sich rapide verschlechterte. Entsprechend der zuvor festgelegten Bewertungskriterien (Überwachungsbogen, *Score sheet*) wurden die Mäuse am Tag 7 aus dem Versuch genommen und das Experiment vorzeitig beendet.

Wie in Kapitel II.3.3 beschrieben, kommt es in Folge einer AT II-Infusion zu linksventrikulären Dysfunktionen. Um die Herzfunktion der Kontroll- und Depletionstiere zu kontrollieren, wurde am Tag 5 und 7 eine Echokardiografie durchgeführt. Hierbei wurden die kardialen Strukturen untersucht und Funktionsparameter wie die Auswurfleistung (ejection fraction), Herzmuskelkontraktilität (shortening fraction) und linksventrikuläre enddiastolische Volumen bestimmt.

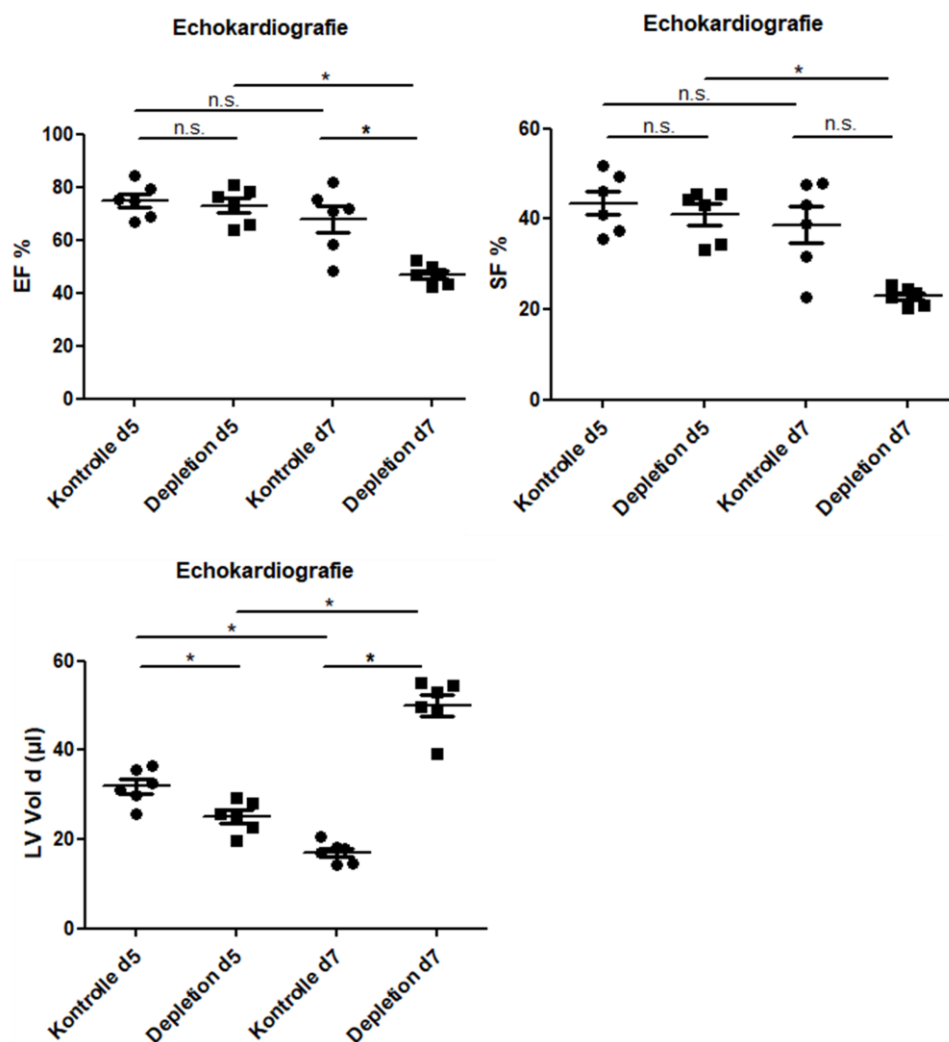


Abbildung 46: Linksventrikuläre Funktion unter AT II-Infusion und Depletion Clec9a-abhängiger Immunzellen

Auswertung echokardiographischer Daten. Sowohl die Clec9aCre-depletierten Tiere als auch die Kontrollgruppe wurde am Tag 5 und 7 nach Pumpen-Implantation echokardiografisch untersucht. Dabei wurden die Funktionsparameter *ejection fraction* (EF%), *shortening fraction* (SF%) und das enddiastolische Volumen (LV Vol d) bestimmt (n=6, * p≤0,050, n.s nicht signifikant).

Die Versuchsgruppe entwickelte in Folge der siebentägigen Depletion mittels Diphtherie-Toxin eine relevante Herzinsuffizienz (s. Abb. 46). Verglichen mit der Kontrollgruppe hat sich die Auswurfleistung im Verlauf der AT II-Behandlung deutlich verschlechtert. Während an Tag 5 noch kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennbar war ($p=0,884$), zeigte die Versuchsgruppe an Tag 7 mit 48 % eine deutlich geringere Auswurfleistung ($p=0,031$).

Ähnliche Ergebnisse ergab die Analyse der Herzmuskelkontraktilität. Auch hier war ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen an Tag 7 erkennbar. Die Kontraktilitätsfähigkeit war in Clec9a-depletierten Tieren um 16 % geringer. Dieser Unterschied war aber aufgrund der großen Streuung der Kontrollgruppe nicht signifikant ($p=0,063$). Jedoch zeigte sich eine signifikante Verschlechterung der Kontraktilität innerhalb der Versuchsgruppe von Tag 5 auf Tag 7 ($p=0,031$).

Während an Tag 5 das linksventrikuläre enddiastolische Volumen in den Clec9a-depletierten Tieren, möglicherweise als Folge einer voranschreitenden Versteifung des Myokards, verringert war ($p=0,031$), stieg es an Tag 7 im Gegensatz zu den Kontrolltieren stark an ($p=0,031$). Die Tiere entwickelten eine Ventrikeldilatation. Die ausgeprägte Herzinsuffizienz erklärt den deutlich reduzierten Allgemeinzustand der Mäuse am siebten Versuchstag.

Um das Ausmaß einer Fibrosierung des Myokards zu bestimmen, wurden Herzschnitte der Tiere mit WGA gefärbt und histologisch untersucht (s. Abb.47).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte in den Clec9aCre-depletierten Tieren sieben Tage nach AT II-Pumpen-Implantation im Mittel 2 % mehr fibrotisches Gewebe im Herzen nachgewiesen werden ($p=0,031$). Es scheint, dass es in Clec9a-defizienten Mäusen zu einer ausgeprägteren oder schneller voranschreitenden Fibrosierung des Myokards kommt. Zusammen mit den Ergebnissen der histologischen Auswertung der nicht Clec9a-depletierten Tiere, bei welchen eine erhöhte Anzahl an Clec9a-positiven Zellen in den fibrotischen Bereichen des Myokards erkennbar war, deutet dies auf einen antiinflammatorischen und protektiven Effekt auf die Wundheilung von Clec9a-positiven Zellen hin.

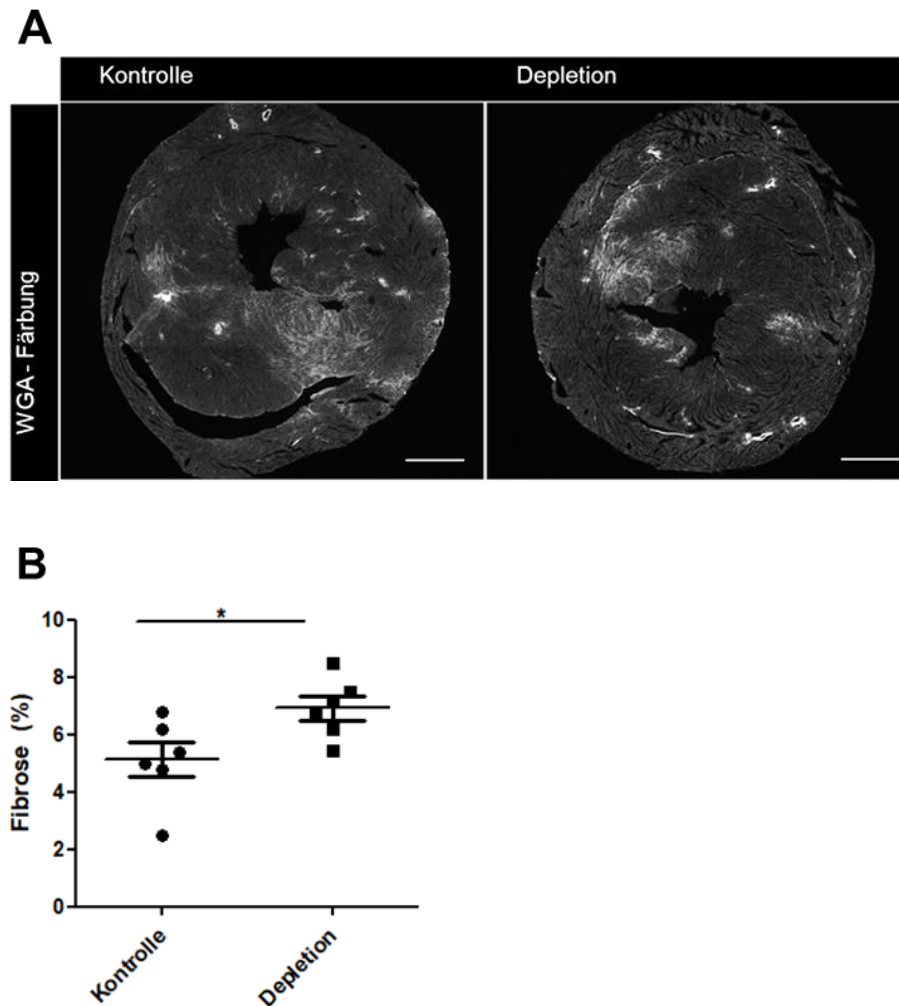


Abbildung 47: Kardiale Fibrose in Clec9a-depletierten Mäusen unter AT II-Infusion

Epifluoreszenzmikroskopie von Mausherzen nach WGA-Färbung. (A) Mittels WGA-Färbung konnte fibrotisches Gewebe (in weiß dargestellt) in den Herzen der Kontroll- und Depletionsgruppe nach 7-tägiger AT II-Infusion identifiziert und quantifiziert werden (Maßstab entspricht 1000 μ m). (B) Prozent der Fibrose am Myokard (n=6, * $p \leq 0,050$).

Die unterschiedlichen Effekte einer Clec9a-Depletion in dem Modell der kardialen Fibrose und des Myokardinfarktes lassen darauf schließen, dass die Bedeutung von Clec9a im Herzen abhängig von den zugrundeliegenden Entzündungsprozessen (z.B. Angiotensin II versus Ischaemie) ist. Die genauen pathophysiologischen Mechanismen sollten in weiterführenden Studien analysiert werden.

VI. DISKUSSION

Mononukleäre Phagozyten zeichnen sich durch eine hohe Heterogenität aus. Aufgrund der Überlappung phänotypischer und funktioneller Merkmale und deren Wandel in Entzündungsprozessen, gestaltet sich eine Differenzierung von Makrophagen, dendritischen Zellen und deren Subtypen anhand dieser Kriterien schwierig [14, 15]. Mit Hilfe des neu generierten Mausstammes $Clec9a^{cre/+} Rosa^{yfp/+}$ gelang es Schraml *et al.*, dendritische Zellen anhand ihrer Ontogenese zu differenzieren. Hier wurde die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Clec9a-Promotors (auch bekannt als DNNGR-1) mit dem $Rosa26-stop^{flox}$ *yellow fluorescent protein* (YFP) kombiniert. Sowohl CDPs, als auch die daraus differenzierten pre-DCs, waren im Knochenmark beziehungsweise lymphoiden Gewebe markiert. So konnten klassische dendritische Zellen durch ihre YFP Expression identifiziert und zu anderen Zellen abgegrenzt werden [16].

Mononukleäre Phagozyten stellen ein hohes therapeutisches Potential in kardiovaskulären Erkrankungen dar. Doch dafür werden präzise Informationen darüber benötigt, welche Zelluntergruppen eine eher schädliche Funktion im Krankheitsverlauf übernehmen und welche die Reparaturmechanismen nach Erkrankung fördern. Ziel dieser Arbeit war es, Clec9a-abhängige Zellen im Herzen zu charakterisieren und ihre Rolle und Funktion in kardialen Entzündungsprozessen zu untersuchen.

1. Clec9a-abhängige Zellen im Herzen zeigen unterschiedliche Phänotypen

Mit Hilfe der Mauslinie $Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+}$ konnten Clec9a-abhängige Zellen mittels Immunhistologie und Durchflusszytometrie im Herzen identifiziert und phänotypisch charakterisiert werden. Clec9a-positive Zellen konnten anhand der konstitutiven Tomato-Expression, aufgrund einer in ihrer Entwicklungsgeschichte temporären Aktivität des Clec9a-Promotors, detektiert werden. Diese Zellen sind unabhängig von einer kontinuierlichen Cre-Expression irreversibel markiert. Das bedeutet, dass in dieser Linie keine Aussage über eine aktuelle Genexpression oder Expression des Clec9a-Rezeptors auf der Zelloberfläche getroffen werden kann.

Die Herzbasis der Tiere wurde mittels 4-fach-Färbung histologisch untersucht. Dabei wurden neben Clec9aCre-einfach-positiven Zellen und Cx3Cr1- und F4/80-positiven Makrophagen auch Clec9aCre-positive Zellen entdeckt, welche zudem F4/80 und Cx3Cr1 exprimierten. Zwar können auch dendritische Zellen in geringem Maße F4/80 und Cx3Cr1 exprimieren [16, 201, 231], dennoch werden diese Marker typischerweise kardiovaskulären Makrophagen zugeordnet [79, 238, 239]. Clec9aCre-positive Zellen waren unter Ruhebedingungen gleichmäßig über das gesamte Myokard verteilt.

Die durchflusszytometrische Analyse der gesunden Herzen zeigte eine sehr hohe Markierungseffizienz in $CD64^+CD11c^+MHCII^+$ klassischen dendritischen Zellen. cDC1 waren über 95 % Tomato markiert. cDC2 exprimierten circa 60 % Tomato, davon waren etwa 50 % zudem positiv für Cx3Cr1. Die niedrigere Tomato-Expression in cDC2 ist am ehesten dadurch begründet, dass diese im Gegensatz zu cDC1 in ihrer ausdifferenzierten Form kein Clec9a exprimieren und es aufgrund des heterozygoten Genotyps der Tiere zu einer inkompletten Markierung der Vorläuferzellen kommen kann [16]. Etwa 12 % der $CD11b^+CD64^+F4/80^+$ kardialen Makrophagenpopulation von neun bis zwölf Wochen alten Tieren waren Tomato-positiv. Diese exprimierten zudem den Chemokin-Rezeptor Cx3Cr1. Auch Schraml *et al.* konnten in ihrer DNCR-1 *lineage tracing* Studie Clec9aCre-positive Zellen in der Niere entdecken, die zusätzlich positiv für CD64 und F4/80 waren. Um diese von Makrophagen abzugrenzen, überprüften sie *in vitro* die Fähigkeit dieser Zellen, naive $CD4^+$ T-Lymphozyten zu stimulieren. Dabei zeigte sich, dass diese renale Zellpopulation fähig war, die Differenzierung von T-Zellen in IFN- γ und TNF- α sezernierende Effektorzellen zu aktivieren. Aufgrund der funktionellen Merkmale ordneten sie diese Subpopulation den dendritischen Zellen zu [16].

2. Eine Subpopulation kardialer Makrophagen ist Clec9a-abhängig markiert

Um kardiale Clec9a-positive Makrophagen von dendritischen Zellen abzugrenzen, wurden die Herzen von SiglecH^{Gfp} und Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Zbtb46^{gfp/+} Mäusen histologisch und durchflusszytometrisch untersucht.

Obwohl plasmazytoide dendritische Zellen nicht von Clec9aCre-Vorläuferzellen abstammen, exprimieren sie in ihrer ausdifferenzierten Form in geringem Maße

Clec9a [16, 131] und können somit in der Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+} Mauslinie Tomato markiert sein. Während sich einige Oberflächenrezeptoren mit denen von Makrophagen überlappen, wird Siglec H vor allem von pDCs exprimiert [232]. Mit Hilfe des Mausstammes SiglecH^{gfp}, bei welchem pDCs grün fluoreszieren, wurde überprüft, ob in der kardialen Makrophagenpopulation auch pDCs markiert wurden. Sowohl in der histologischen als auch in der durchflusszytometrischen Untersuchung konnte kein GFP-Signal in der kardialen Makrophagenpopulation detektiert werden. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass das positive Tomato-Signal in der dargestellten Makrophagenpopulation in Herzen der Mauslinie Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+} von plasmazytoiden dendritischen Zellen stammte.

Mit Hilfe des Mausstammes Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Zbtb46^{gfp/+} konnten ausdifferenzierte dendritische Zellen und ihre Vorläufer anhand ihrer Zbtb46-Expression innerhalb der Clec9aCre-Population identifiziert werden. Der Transkriptionsfaktor Zbtb46 wird ausschließlich von klassischen dendritischen Zellen und ihren Vorläufern exprimiert, nicht aber von Monozyten, Makrophagen, pDCs oder anderen lymphoiden oder myeloiden Zelllinien [201, 231]. Dies ermöglichte eine Abgrenzung der cDCs zu Makrophagen. Die FACS-Analyse von Niere, Milz und Lymphknoten sowie vom Herzen zeigte eine hohe GFP- (Zbtb46) Markierungseffizienz in den klassischen dendritischen Zellen. Im Gegensatz dazu wurde kein GFP-Signal in der kardialen Makrophagenpopulation verzeichnet. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Clec9aCre-positiven Zellen der Makrophagenpopulation im Herzen um Zbtb46-positive klassische dendritische Zellen handelte.

3. Clec9a-Markierungseffizienz in kardialen Makrophagen ist altersabhängig

Ähnlich wie die vom Dottersack abstammenden Cx3Cr1⁺CD11b^{low}F4/80^{high} Makrophagen [12], exprimierten die Clec9aCre-positiven kardialen Makrophagen vor allem F4/80^{high}. Die FACS-Analyse von Makrophagen aus postnatalen und adulten Herzen zeigte jedoch, dass erst adulte kardiale Makrophagen Clec9a-abhängig markiert waren. In sieben Wochen alten Tieren waren circa 5 % der Makrophagen positiv für Clec9aCre. Bis zum vierten Monat stieg die Anzahl Clec9aCre-positiver Makrophagen rapide an. Ab dem Alter von vier Monaten

wurde ein Plateau erreicht. Hier exprimierten 20-25 % der kardialen Makrophagen Tomato. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den Tomato-positiven Makrophagen nicht um Makrophagen embryonalen Ursprungs handelt oder diese erst zu einem späteren Zeitpunkt einen aktiven Clec9a-Promotor besitzen. Die Frage nach dem Ursprung könnte anhand einer Flt3-Abhängigkeit geklärt werden. Während sich Dottersack-abstammende Makrophagen unabhängig von Flt3 entwickeln, hängt die Differenzierung der Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von diesem Wachstumsfaktor ab [12].

4. Clec9a-positive Makrophagen besitzen eine hohe Fähigkeit zur Antigen-Präsentierung

Um die Clec9aCre-positiven Makrophagen des Herzens näher zu charakterisieren und Hinweise auf ihre Funktion zu erhalten, wurden weitere Oberflächenmarker in der FACS-Analyse eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass Clec9aCre-positive Makrophagen unter Ruhebedingungen über 90 % MHCII^{high} exprimierten. Im Gegensatz dazu fiel die CD206 Expression mit unter 10 % relativ gering aus. Im Vergleich dazu, exprimierten etwa 58 % der Cx3Cr1 einfach positiven Makrophagen den Mannose-Rezeptor CD206 und 67 % MHCII^{high}. Dies deutet darauf hin, dass sich diese beiden Subpopulationen hinsichtlich phänotypischer und funktioneller Merkmale unterscheiden. Clec9aCre-positive Zellen besitzen durch ihre hohe MHCII^{high} Expression die Fähigkeit zur Antigen-Präsentierung und Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen [233, 234]. Zudem scheint, aufgrund der geringen CD206 Expression, ihre Hauptfunktion nicht in der Phagozytose zu liegen [235, 236]. Eine hohe MHCII^{high} Expression wird mit M1 und eine CD206 Expression mit M2 Makrophagen assoziiert. Aber auch M2 können im hohen Maße MHCII^{high} exprimieren [240]. Ein Zell-Sorting der Clec9aCre-positiven und Clec9aCre-negativen Makrophagen und anschließende RNA-Sequenzierung könnte Aufschluss über eine unterschiedliche Genexpression und Hinweise auf die Funktion der beiden Subpopulationen geben.

5. Clec9a-positive Subpopulationen im Herzen reagieren unterschiedlich auf eine Csf1r-Inhibition

Der *Colony-stimulating factor 1* (Csf1) kontrolliert das Wachstum und die Differenzierung von Makrophagen. Wird der *colony-stimulating factor 1 receptor*

(Csf1r) blockiert, kommt es zu einer vollständigen Depletion der geweberesidenten Makrophagen [212, 213]. Es erfolgte eine dreitägige Inhibition des Rezeptors mittels PLX5622. Die Herzen der Linie Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+} wurden am Tag nach der Depletion sowie nach einer Woche Regeneration durchflusszytometrisch analysiert. Dabei konnte demonstriert werden, dass nach dreitägiger Blockierung des Csf1-Rezeptors nahezu die gesamte geweberesidente Makrophagenpopulation im Herzen depletiert war. Rund die Hälfte der Makrophagen wurde innerhalb einer Woche ersetzt. Diese zeigten mit über 25 % eine deutlich höherer Cx3Cr1- und Clec9aCre-Markierung. Zudem unterschieden sie sich in ihrer MHCII^{high}-Expression. Diese waren im Vergleich zu den wenigen nicht depletierten Makrophagen mit knapp unter 40 % deutlich geringer.

Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die klassischen dendritischen Zellen im Herzen kaum von einer Inhibition des Csf1-Rezeptors betroffen waren. Doch ihre Anzahl im kardialen Gewebe ist in Folge der Makrophagen-Depletion nach einer Woche deutlich gestiegen. Die Clec9aCre-Markierung der rekrutierten dendritischen Zellen unterschied sich hierbei kaum zu der von den ursprünglich residenten cDCs.

Weitere Studien konnten zeigen, dass es in Folge einer dreitägigen Csf1r-Blockierung mittels PLX5622-Inhibition auch in anderen Organen zu einer signifikanten Depletion gewebeständiger Makrophagen kommt. In der Leber waren beispielsweise bis zu 75 % der Kupffer-Zellen depletiert [241]. Rosin *et al.* konnte demonstrieren, dass 99 % der embryonalen Mikroglia in Folge einer PLX5622-Inhibition depletiert wurden. Diese erholten sich nach einer Woche Regenerationszeit nahezu vollständig [214]. Im Gegensatz zu Makrophagen, spielt Csf1r keine wichtige Rolle in der Entwicklung von dendritischen Zellen. Diese ist viel mehr von dem Flt3-Liganden abhängig [89, 242, 243]. Thepen *et al.* konnten zeigen, dass es nach Depletion der alveolären Makrophagen zu einer verstärkten Rekrutierung von Antigen-präsentierenden Zellen in das Lungengewebe gekommen ist [244]. Ob Gewebemakrophagen die Rekrutierung von klassischen dendritischen Zellen direkt beeinflussen können wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

6. Während eines Entzündungsgeschehens besteht ein erhöhter Umsatz Clec9a-abhängiger Makrophagen im Vergleich zu Ruhebedingungen

Um das Verhalten Clec9aCre-positiver Zellen nach einer Knochenmark-Ablation zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Chimären Modelle verwendet. Mit Hilfe eines genetischen Modells, konnte in Mäusen der Linie Mx1CreMyb^{flox/flox} durch die repetitive Gabe von poly(I:C) eine Myeloablation induziert werden. Im Bestrahlungsmodell wurde das Knochenmark von Wildtyp Mäusen mittels zweimaliger Bestrahlung ablatiert. Infolgedessen kann es hierbei zu einer lokalen oder systemischen Entzündungsreaktion kommen [245]. Dieser sonst negative Aspekt des Bestrahlungsmodells wurde hier zum Nutzen gemacht. Die zwei unterschiedlichen Modelle erlaubten den Vergleich des Clec9aCre-Umsatzes im Herzen unter Ruhebedingungen und während eines Entzündungsgeschehens. Sechs Wochen nach Knochenmark-Transplantation wurde der Chimärismus im Blut kontrolliert. Nur Tiere, die einen Blutchimärismus von über 90 % aufwiesen, wurden in den weiterführenden Versuch genommen.

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der Herzen von Mx1CreMyb^{flox/flox} Chimären drei Monate nach Knochenmarktransplantation, zeigte sich, dass circa 18 % der Makrophagen GFP (Cx3Cr1) exprimierten und somit von dem Spendertier stammten. Dies bedeutet, dass im Rahmen des Umsatzes unter nicht entzündlichen Bedingungen circa 18 % der Gewebemakrophagen durch Knochenmark-abstammende Makrophagen ersetzt wurden. Diese exprimierten jedoch kein Tomato (Clec9aCre). Im Vergleich dazu konnte in den Bestrahlungschimären ein weitaus höherer Influx knochenmarkstämmiger Makrophagen beobachtet werden. Hier wurden etwa 75 % der Gewebemakrophagen ersetzt. 20 % der rekrutierten Makrophagen waren zudem positiv für Clec9aCre, was darauf hindeutet, dass Tomato-exprimierende Makrophagen eine wichtigere Rolle in der Inflammation spielen als zu Ruhebedingungen. Auch Molawi *et al.* konnte demonstrieren, dass im Bestrahlungsmodell drei Monate nach Transplantation 80 % der Gewebemakrophagen im Herzen ersetzt wurden. In einem bestrahlungsunabhängigen Modell zeigte sich acht Wochen nach Transplantation ein Umsatz durch Knochenmark-abstammende Makrophagen von 8 % [67].

Im Gegensatz zu den Makrophagen war bei den klassischen dendritischen Zellen kein Unterschied zwischen den beiden Chimären Modellen zu erkennen. Drei Monate nach Transplantation waren etwa 70 % der Zellen Clec9aCre- und 15-20 % Clec9aCre- und Cx3Cr1-positiv. Dies bedeutet, verglichen mit der Markierungseffizienz kardialer dendritischer Zellen unter Ruhebedingungen, dass alle cDCs im Herzgewebe ersetzt wurden. Dies liegt darin begründet, dass dendritische Zellen eine relativ kurze Halbwertszeit von circa zwei Wochen haben und es zu einem kontinuierlichen Ersatz durch Vorläuferzellen aus dem Knochenmark kommt [246].

Die Unterschiede im Verhalten und Rekrutierung Clec9aCre-positiver Zellen nach erhöhtem Zellumsatz im Herzen untermauern die Annahme, dass es sich hierbei um verschiedene Subpopulationen Clec9aCre-markierter mononukleärer Phagozyten handelt.

7. Anzahl der Clec9a-abhängigen Zellen ist im entzündeten und fibrotischen Gewebe erhöht

Fibrotische Umbauprozesse spielen in vielen kardialen Erkrankungen eine zentrale Rolle. Daher ist ein besseres Verständnis der regulatorischen Mechanismen, die der Entzündung und Fibrose zu Grunde liegen, wichtig für die Entwicklung neuer effektiver Therapien [155].

Das Verhalten Tomato-positiver Zellen wurde in dem Modell der durch Angiotensin II induzierten kardialen Fibrose sowie in dem Modell des akuten Myokardinfarkts untersucht. Der Vorteil des AT II Modells gegenüber anderen Fibrose Modellen, wie zum Beispiel der experimentellen Aortenstenose (TAC; *transverse aortic constriction*), ist der deutlich weniger invasive Eingriff und die damit verbundene niedrigere Mortalität [247]. Als vasoaktives Peptid induziert es direkt eine arterielle Hypertonie [162].

Die histologische Untersuchung der Herzen zeigte, dass nach 10-tägiger Angiotensin II-Infusion etwa 7 % des Myokards fibrotisch verändert war. In den Gebieten mit fibrotischen Veränderungen konnten deutlich mehr mononukleäre Phagozyten quantifiziert werden, als in den Bereichen ohne Fibrose und der mit NaCl behandelten Kontrolltiere. Zudem war der Anteil Clec9a-markierter Zellen in fibrotischen Arealen deutlich höher als in nicht fibrotischen Bereichen.

Zur Induktion eines akuten Myokardinfarkts wurde anstelle der permanenten, eine transiente Ligatur der LAD (*left anterior descending artery*) vorgenommen. Dies ermöglichte einen besseren Bezug zur klinischen Situation des Menschen, bei dem nach Infarkt eine Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes angestrebt wird.

Die FACS-Ergebnisse zeigten, dass es an Tag 2 nach Myokardinfarkt zu einer vermehrten Einwanderung von Makrophagen kommt. Bereits an Tag 6 ging die Anzahl an Makrophagen wieder zurück, so dass an Tag 30 der Pool an geweberesidenten Makrophagen fast mit dem zu Ruhebedingungen vergleichbar war. Die Rekrutierung der dendritischen Zellen hingegen erfolgte etwas später. Die Anzahl der klassischen dendritischen Zellen stieg von Tag 2 auf Tag 6 deutlich an. Doch auch hier entsprach die Anzahl an Tag 30 wieder dem Pool an residenten dendritischen Zellen unter Ruhebedingungen. Diese Ergebnisse spiegeln die zwei Phasen der Entzündungsreaktion nach Myokardinfarkt wider. In der frühen Phase dominieren vor allem proteolytische, phagozytierende und inflammatorische Zellen. Ly6C^{high} Monozyten rekrutieren in das infarzierte Gewebe und differenzieren sich zu Makrophagen. Wohingegen in der späten Phase antiinflammatorische Zellen überwiegen, welche die Entzündung supprimieren und die Wundheilung fördern [78, 84, 180].

Bei der Analyse der kardialen Makrophagenpopulation zeigte sich, dass der prozentuale Anteil an Tomato-positiven Makrophagen am Tag 6 mit etwa 17 % am höchsten war. Wohingegen er an Tag 2, in der frühen Entzündungsphase, unter 10 % lag. Das lässt darauf schließen, dass Clec9a-abhängige Makrophagen eher eine antiinflammatorische Funktion besitzen und möglicherweise eine Rolle in dem Prozess der Wundheilung spielen. Die Markierungseffizienz der cDCs zeigte an allen Tagen keine Veränderung im Vergleich zu Ruhebedingungen.

8. Depletion Clec9a-abhängiger Zellen im Modell der kardialen Fibrose führt zu einer relevanten Herzinsuffizienz

Um die Rolle der Clec9a-abhängigen Subpopulationen mononukleärer Phagozyten in der kardialen Fibrose zu untersuchen, wurde Tieren der Linie Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+}Rosa26^{DTR}, in welchen Clec9a-markierte Zellen mittels Diphtherie-Toxin Gabe depletiert werden können, eine mit Angiotensin II befüllte Pumpe implantiert. Am Tag 5 und 7 nach Implantation erfolgte eine

echokardiografische Untersuchung, um die Herzfunktion der depletierten Tiere im Verlauf der Angiotensin II-Infusion zu kontrollieren. Am Versuchsende wurden die Herzen für eine histologische Untersuchung entnommen und die Fibrosierung des Myokards mittels WGA-Färbung bestimmt.

Aufgrund starken Gewichtsverlustes und hochgradig reduziertem Allgemeinbefinden der depletierten Versuchsgruppe, musste das Experiment vorzeitig abgebrochen werden. Die echokardiografische Untersuchung an Tag 5 und 7 nach Pumpen-Implantation zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verschlechterte Auswurfleistung und Muskelkontraktilität sowie eine Dilatation des linken Ventrikels. Die kardiale Fibrose war in diesen Tieren deutlich ausgeprägter. Mäuse sind im Gegensatz zum Menschen unempfindlich gegenüber Diphtherie-Toxin, da sie den entsprechenden Rezeptor normalerweise nicht exprimieren. Zudem erfolgte bei der Kontrollgruppe das gleiche Diphtherie-Toxin Regime. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass der schlechte Zustand der Tiere durch die Diphtherie-Toxin Gabe *per se* begründet war. Das verschlechterte kardiale Remodeling nach Clec9aCre-Depletion lässt einen protektiven Effekt Clec9a-abhängiger Zellen auf die Wundheilung und fibrotische Umbauprozesse vermuten.

Anzei *et al.* konnte ähnliche Ergebnisse nach einem Myokardinfarkt beobachten. Mit Hilfe der CD11cDTR Maus konnten sie erkennen, dass die Depletion von dendritischen Zellen die Produktion von inflammatorischen Zytokinen, das Rekrutieren myeloider Zellen und die pro-inflammatorische M1-Polarisation von Makrophagen im infarzierten Gewebe steigerte. Die depletierten Tiere zeigten eine höhere Mortalität und LV-Remodeling. Zudem hatte die Depletion starke Auswirkungen auf die Wundheilung. Einerseits wurden Matrix-Metalloproteinasen aktiviert, andererseits kam es zur Ansammlung von Kollagen in dem Perinfarkt-Bereich. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass dendritische Zellen durch das Regulieren und Aktivieren von Neutrophilen und Monozyten, eine lokale Schutzfunktion in der Inflammation nach Infarkt übernehmen [187]. Da CD11c nicht exklusiv von klassischen dendritischen Zellen exprimiert wird, sondern auch auf Makrophagen, Monozyten, pDCs, natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten zu finden ist [248-251], kann nicht davon ausgegangen werden, dass diese Ergebnisse durch eine alleinige Depletion der dendritischen Zellen begründet sind.

Eine Depletion der CD11c-positiven Zellen führte in den meisten Studien zu einer Monozytose und Neutrophilie [249, 252, 253].

Einen interessanten Nebebefund entdeckten Männ *et al.* während einer *Aspergillus fumigatus*-Infektionsstudie. Innerhalb von vier bis fünf Tagen nach trachealer Diphtherie-Toxin Gabe kam es zu einer 100 %igen Mortalitäts-Rate unabhängig von einer Pilzinfektion. Bei weiteren Nachforschungen entdeckten sie, dass es nach DT-Gabe in CD11c-DTR Mäusen in Folge einer massiven Leukozyten Rekrutierung in das Myokard, vor allem von Neutrophilen, zur Ausbildung einer schweren Myokarditis und letalen Arrhythmien kam. Welche genauen Wirkmechanismen dahinterstecken, konnten sie nicht klären [254].

Möglicherweise waren durch die Depletion CD11c-positiver Zellen auch antiinflammatorische Monozyten und Makrophagen betroffen. Falkenham *et al.* konnten feststellen, dass es nach spezifischer Depletion dieser Zellen in mit Angiotensin II behandelten Tieren zu einer erhöhten Zellinfiltration und Kollagenablagerung kam. Dies könnte durch die vermehrte Sekretion von IL-1 β und TNF- α begründet sein. Die Ergebnisse deuteten auf einen protektiven Effekt von nicht-inflammatorischen Phagozyten auf die Gewebekomöostase hin [255].

Im Gegensatz dazu zeigten Lee *et al.* in einer Herzinfarkt-Studie mit Zbtb46DTR Mäusen, dass nach Depletion der klassischen dendritischen Zellen, die Größe des Infarkts verringert und die Herzfunktion verbessert war. Dies korrelierte mit einer verminderten Anzahl von Makrophagen, Neutrophilen und T-Lymphozyten. Zudem war die Anzahl von CD3⁺ T-Zellen und TNF- α mRNA deutlich reduziert, was darauf schließen ließ, dass cDCs eine lokale Th1 Immunantwort induzieren [195].

Eine Reduzierung der Infarktgröße sowie der myokardialen Hypertrophie und Fibrose konnte in den Clec9a-depletierten Mäusen nicht beobachtet werden. Allerdings kann von keiner kontinuierlichen Clec9a-Depletion bis zum Versuchsende ausgegangen werden. Aufgrund der DT-Antikörperbildung infolge einer längeren Diphtherie-Toxin Behandlung, war eine langfristige Depletion der Zellen nicht möglich [256]. Jedoch macht es den Anschein, dass eine Clec9a-Defizienz in der frühen Phase des Ischämie/Reperfusionsschadens keine langfristigen Effekte auf das kardiale Remodeling hat. Eine größere Stichprobenanzahl könnte eine genauere Aussage darüber geben.

Eine erhöhte Mortalitätsrate von mit Diphtherie-Toxin behandelten Clec9aDTR Tieren wurde in anderen Modellen bisher nicht beschrieben [257-260]. Zudem zeigten auch in dem vorliegenden Versuchsaufbau die Clec9aCre-depletierten Mäuse unter Ruhebedingungen ein gutes Allgemeinbefinden. Dennoch sollte die Möglichkeit der Entwicklung einer akuten Myokarditis aufgrund einer erhöhten Neutrophilen Rekrutierung berücksichtigt und untersucht werden. Del Fresno *et al.* untersuchte die Rolle des Clec9a in dem Modell der akuten nekrotisierenden Pankreatitis, welche mittels intraperitonealer Caerulein-Injektion induziert wurde. In Clec9a-Rezeptor-defizienten Mäusen kam es zu einer gesteigerten Neutrophilen Rekrutierung und erhöhtem Gewebeschaden. Ähnliche Ergebnisse sahen sie während einer *C. albicans* Infektion. Dieser Effekt war B- und T-Zell unabhängig. Dies deutete darauf hin, dass Clec9a sowohl in der sterilen als auch in der infektiösen Inflammation eine wichtige Rolle in der Kontrolle von Gewebeschäden spielt und das Aufspüren von nekrotischem Gewebe durch Clec9a die Rekrutierung von Neutrophilen beeinflusst [128].

Um mögliche Auswirkungen der Effekte eines abrupten Absterbens Clec9Cre-positiver Zellen nach Diphtherie-Toxin Gabe zu umgehen, könnte an Stelle der Clec9a^{Cre}Rs26^{DTR} Maus, der Clec9a^{Cre}Rs26^{DTA} Mausstamm verwendet werden. Hier wird DT in abgeschwächter Form endogen in den Clec9a-positiven Zellen produziert und diese dadurch ausgeschaltet. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass eine seit der Embryonalentwicklung bestehende konstitutive Depletion Clec9a-positiver Zellen die Zellzusammensetzung im Myokard verändert und damit die Reaktion auf Entzündungsreize beeinflusst. Salvermoser *et al.* konnten zum Beispiel entdecken, dass es im Gegensatz zu den Clec9a^{Cre}Rs26^{DTR} Mäusen in Tieren des Clec9a^{Cre}Rs26^{DTA} Stammes zu keiner Depletion der cCD2 kommt. Da sowohl cDC Vorläuferzellen sowie cDC1 fehlten, deutet das auf die Möglichkeit einer alternativen Entwicklung der cDC2 aus lymphoiden Vorläuferzellen hin, wenn der konventionelle myeloide Entwicklungsweg klassischer dendritischer Zellen blockiert ist [261].

9. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Clec9a im Herzen nicht nur klassische dendritische Zellen markiert, sondern auch einen Teil der kardialen Makrophagenpopulation. Ob sich diese Subpopulation einen gemeinsamen Entwicklungsweg mit klassischen dendritischen Zellen teilt oder nur im Laufe ihrer Entwicklung kurzzeitig einen aktiven Clec9a-Promotor besitzt, kann hier nicht geklärt werden. Allerdings lässt sich die Frage stellen, inwieweit die Herkunft dieser Zellen Relevanz hat oder vielmehr die funktionellen Merkmale in der Erkrankung im Vordergrund stehen.

Mittels *bulk sequencing* könnte eine unterschiedliche Genexpression der Clec9aCre-positiven und Clec9aCre-negativen Makrophagen-Subpopulation aufgezeigt werden und Hinweise auf verschiedene funktionelle Attribute geben.

Zudem sollte geklärt werden, ob die Subpopulationen im Herzen nur Clec9a-abhängig markiert sind oder auch einen Clec9a-Rezeptor exprimieren. Das Markieren des endogenen Rezeptors mittels Antikörper gestaltet sich schwierig, da dieser extrem sensibel ist und während dem Prozedere einer histologischen oder durchflusszytometrischen Untersuchung zu Grunde gehen kann. Diese Frage kann jedoch auch mit Hilfe der Mauslinie Clec9a^{gfp} geklärt werden. In dieser Maus wird das grüne Fluoreszenzprotein GFP unter der Kontrolle des endogenen Clec9a-Locus exprimiert (GFP *knock-in*). Dies ermöglicht im Gegensatz zur Clec9a^{cre}Rs26^{tomato} Maus eine Aussage über die aktuelle Proteinexpression.

Gleichzeitig kann mit diesem Mausstamm auch die Rolle und Funktion des Clec9a-Rezeptors untersucht werden. Da es sich hierbei um ein GFP *knock-in* Konstrukt handelt, zeigen homozygote Tiere (Clec9a^{gfp/gfp}) einen funktionellen Rezeptor *knock-out*. Dadurch kann die Bedeutung des Clec9a-Rezeptors für die Funktion kardialer Makrophagen und dendritischer Zellen sowie für die Immunantwort in der kardialen Fibrose und Myokardinfarkt untersucht werden.

Eine Generierung Clec9a-defizienter Hoxb8-Zellen ermöglicht eine zelluläre Analyse *in vitro*. Hierbei können ihre Funktionen, wie zum Beispiel die Fähigkeit zur Phagozytose oder TNF- α Produktion sowie ihr Verhalten auf unterschiedliche Stimuli untersucht und mit denen nicht defizienter Zellen verglichen werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Clec9a-abhängige Immunzellen im Herzen charakterisiert und ihre Bedeutung in kardialen Entzündungsprozessen untersucht. Hierfür wurde der Mausstamm Clec9a^{cre/+}Rs26^{tomato/+}Cx3Cr1^{gfp/+} verwendet, bei welchem Clec9aCre-positive Zellen unabhängig von der aktuellen Genexpression irreversibel markiert sind. Histologische und durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten, dass es im Herzen unterschiedliche Clec9aCre-abhängig markierte Subpopulationen gibt. Neben den klassischen dendritischen Zellen war auch ein Teil der Makrophagenpopulation Clec9aCre markiert. Clec9aCre-positive kardiale Makrophagen konnten mit Hilfe genetisch modifizierter Mauslinien, bei welchen pDCs beziehungsweise cDCs spezifisch markiert waren, zu dendritischen Zellen abgegrenzt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Clec9aCre Markierungseffizienz in kardialen Makrophagen altersabhängig ist und im Laufe der Zeit zunimmt. Die beiden Clec9aCre-positiven Subpopulationen zeigten ein unterschiedliches Verhalten auf eine Csf1r-Inhibition. Während die Clec9a-abhängigen Makrophagen nach einer dreitägigen Blockierung des Rezeptors nahezu vollständig depletiert waren, zeigten die dendritischen Zellen keine Veränderung in ihrer Zellzahl. Mit Hilfe zwei verschiedener Knochenmarkchimären-Modelle (Bestrahlung und genetisches Modell) konnte demonstriert werden, dass während eines Entzündungsgeschehens ein höherer Umsatz durch Clec9a-abhängige Makrophagen im Herzen besteht als unter Ruhebedingungen. Das Verhalten und die Funktion Clec9aCre-positiver Zellen in kardialer Inflammation wurde in dem Modell der durch AT II-induzierten kardialen Fibrose und im Modell des Ischämie/Reperfusionsschadens nach Myokardinfarkt (induziert durch eine transiente LAD-Ligatur) untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl Clec9aCre-markierter Zellen im entzündeten und fibrotischen Gewebe erhöht ist. Nach der Depletion Clec9a-positiver Zellen mittels Diphtherie-Toxin, entwickelten die mit AT II-behandelten Tiere eine relevante Herzinsuffizienz. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Clec9a-abhängige Zellen in der kardialen Inflammation eine antiinflammatorische Wirkung sowie einen protektiven Effekt auf die Wundheilung und Gewebekomöostase besitzen. Die gezielte Modulation dieser Zellen könnte ein hohes therapeutisches Potential darstellen. Doch dafür müssen die genauen Wirkmechanismen noch weiter erforscht werden.

VIII. SUMMARY

In this thesis the role and function of Clec9a-dependent immune cells in cardiac inflammation were investigated. For this purpose we used the mouse model $\text{Clec9a}^{\text{cre/+}}\text{Rs26}^{\text{tomato/+}}\text{Cx3Cr1}^{\text{gfp/+}}$, in which Clec9a positive cells are irreversibly labeled with tomato irrespective of continuous Cre expression. Immunohistology and flow cytometric analyses showed, that different Clec9a positive subpopulations are found in the heart. Besides classical dendritic cells a fraction of cardiac macrophages were also labeled. By using further transgenic mouse lines, tomato labeled cardiac macrophages could be distinguished from pDCs and cDCs. Furthermore, we showed that the labeling efficiency in cardiac macrophages is age-dependent and increases with age. The two Clec9a positive subpopulations showed different responses to Csf1r-blocking. Clec9a positive macrophages were almost completely depleted in response to Csf1r-blocking via PLX. In contrast, there was no effect on the absolute number of dendritic cells. By using two different chimera models (x-ray and genetic model) we were able to demonstrate that the turnover of Clec9a positive macrophages in heart tissue increase under inflammatory conditions compared to steady state. The role and function of Clec9a positive cells in cardiac inflammation were investigated in the model of AT II-induced cardiac fibrosis and myocardial infarction (transient ligation of LAD). Here, we observed an enhanced number of Clec9a positive cells in inflamed and fibrotic tissue. A Clec9a-mediated ablation of immune cells with diphtheria toxin resulted in a relevant heart failure in AT II-treated mice. These results suggest, that Clec9a positive immune cells in cardiac inflammation do have an anti-inflammatory function as well as protective effect on heart healing and tissue homeostasis. There is a highly therapeutic potential in the targeted modulation of these cells. For these purposes, however, further research is necessary on the exact mechanism and function in injury and repair of these cell subtypes.

IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AT II	Angiotensin II
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
cDC	klassische dendritische Zelle
cDC1	klassische dendritische Zelle Typ-1
cDC2	klassische dendritische Zelle Typ-2
CDP	common dendritic cell precursors
Clec9a	C-Typ-Lectindomänenfamilie 9 Mitglied a
cm	Zentimeter
cMoP	monocyte precursor
Csf1	Colony-stimulating factor 1
d	Tag
DNGR-1	Dendritic cell natural killer lectin group receptor-1
DT	Diphtherie-Toxin
DTR	Diphtherie Toxin Rezeptor
E8	Tag 8 der Embryonalentwicklung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	ejection fraction
EKG	Elektrokardiografie
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal bovine Serum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association
FGF	Fibroblast growth factor
FSC	Forward scatter
g	Erdbeschleunigung
G	Gauge
g	Gramm
GFP	Green fluorescent protein

HCS	Definitive hämatopoetische Stammzellen
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
I/R	Ischämie/Reperfusion
IL	Interleukin
Inj.	Injektion
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
Kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KM	Knochenmark
KM-Transpl.	Knochenmark-Transplantation
LAD	left anterior descending artery
LV	linker Ventrikel
LV-Remodeling	linksventrikuläres Remodeling
M1	klassisch aktivierte Makrophagen
M2	alternativ aktivierte Makrophagen
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MCs	Monocyte-derived cells
MDP	Macrophage dendritic cell precursor
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MPS	mononukleäres Phagozyten-System
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
PBS	Phosphat Buffered Saline
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PET	Positron-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-aktivität
Poly(I:C)	Polyinosinic-polycytidylic acid
pre-DC	predendritic cell

s.c.	subkutan
SF	Shortening fraction
SPF	Specific pathogen free
SSC	Side scatter
TGF- β	Transforming growth factor β
Th	T-Helferzellen
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor
w	Woche
WGA	Wheat germ agglutinin
YFP	Yellow fluorescent protein
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Darstellung der verwendeten Enzyme	55
Tabelle 2: Antikörper in der Durchflusszytometrie	55
Tabelle 3: Antikörper der Immunhistologie.....	58

XI. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Lebenszyklus der Monozytenuntergruppen	6
Abbildung 2: Ursprung der Makrophagen in verschiedenen Geweben	9
Abbildung 3: Darstellung der Effekte von IFN- γ und IL-4/IL-13 Stimulation in M1- und M2-Makrophagen	10
Abbildung 4: Entwicklung der dendritischen Zell-Subpopulationen	13
Abbildung 5: Verschiedene Funktionen der klassischen dendritischen Zellen in der Immunantwort	14
Abbildung 6: Prinzip des Clec9a ^{cre/+} Rosa ^{eYFP/+} -Maus-Modells	16
Abbildung 7: Darstellung der biphasischen Monozyten-Rekrutierung und unterschiedlicher funktioneller Attribute	22
Abbildung 8: Darstellung der verschiedenen Abläufe und Funktionen in den beiden Phasen nach Myokardinfarkt	24
Abbildung 9: Darstellung der pathophysiologischen Vorgänge des kardialen Remodeling	25
Abbildung 10: Überblick des zeitlichen Ablaufes des Erstellens von Knochenmarkchimären.....	39
Abbildung 11: Darstellung des zeitlichen Ablaufes des Makrophagen-Depletion Modells mittels Csf1r-Inhibition	40
Abbildung 12: Schematische Darstellung des Diphtherie-Toxin Regimes im AT II und Ischämie/Reperfusion Modell	41
Abbildung 13: Implantation einer AT II- Pumpe.....	42
Abbildung 14: Score Sheet des AT II Modells	43
Abbildung 15: Induktion eines Myokardinfarkts.....	45
Abbildung 16: Echokardiografische Untersuchung der Maus	48
Abbildung 17: Durchflusszytometrie; Identifizierung von Blutzellen anhand des FSC und SSC	50
Abbildung 18: Unterschiedliche Darstellungsweisen von FACS-Daten	52
Abbildung 19: Nachweis von Makrophagen und dendritischen Zellen im gesunden Mausherzen.....	60
Abbildung 20: Spezifität der Antikörper in der histologischen Analyse	61
Abbildung 21: Charakterisierung klassischer dendritischer Zellen	62

Abbildung 22: Tomato-Expression kardialer Makrophagen unter Ruhebedingungen	63
Abbildung 23: Tomato-Expression in Blutmonozyten	64
Abbildung 24: Klassische dendritische Zellen exprimieren Zbtb46.....	66
Abbildung 25: Durchflusszytometrie der Vergleichsorgane Niere, Milz und Lymphknoten (cDCs)	67
Abbildung 26: Plasmazytoide dendritische Zellen im Herzen.....	68
Abbildung 27: Differenzierung zwischen kardialen pDCs und Makrophagen	69
Abbildung 28: Kinetik der Tomato-Expression in Abhängigkeit zum Alter der Maus	70
Abbildung 29: MHC-II Expression Clec9a-abhängiger Makrophagen	71
Abbildung 30: Expression des Mannose-Rezeptors auf Tomato-negativen kardialen Makrophagen	72
Abbildung 31: Depletion und Wiederherstellung kardialer Makrophagen nach temporärer Csf1r-Inhibition.....	74
Abbildung 32: MHC-II ^{high} Expression in Cx3Cr1- und Clec9aCre-positiven Makrophagen nach Csf1r-Inhibition	75
Abbildung 33: Verhalten Tomato-positiver cDCs nach PLX-Gabe	76
Abbildung 34: Bestimmung des Blutchimärismus	78
Abbildung 35: Chimärismus kardialer Makrophagen nach Transplantation im Bestrahlungs- bzw. genetischen Modell.....	79
Abbildung 36: Chimärismus dendritischer Zellen im Herzen nach Transplantation	80
Abbildung 37: Identifikation von fibrotischem Gewebe am Myokard.....	81
Abbildung 38: Angiotensin II induziert eine kardiale Fibrose.....	82
Abbildung 39: Immunzellen in der kardialen Fibrose	82
Abbildung 40: Quantifizierung Tomato-positiver Makrophagen im fibrotischen Gewebe	83
Abbildung 41: Quantifizierung von Makrophagen und dendritischen Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt	84
Abbildung 42: GFP- und Tomato-Expression kardialer Makrophagen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt	85
Abbildung 43: Depletion Clec9a-abhängiger Zellen nach Diphtherie-Toxin Gabe	86
Abbildung 44: Infarktgröße in Clec9a-depletierten Mäusen	88

Abbildung 45: Linksventrikuläres metabolisches Volumen nach Myokardinfarkt in Clec9a-depletierten Mäusen	89
Abbildung 46: Linksventrikuläre Funktion unter AT II-Infusion und Depletion Clec9a-abhängiger Immunzellen	90
Abbildung 47: Kardiale Fibrose in Clec9a-depletierten Mäusen unter AT II-Infusion	92

XII. LITERATURVERZEICHNIS

1. WHO; *The top 10 causes of death* [Zugriff am 15.07.19], verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
2. Statistisches Bundesamt (DEStatis), [Zugriff am 15.07.19], verfügbar unter https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html.
3. Taylor, C.J., et al., *Trends in survival after a diagnosis of heart failure in the United Kingdom 2000-2017: population based cohort study*. BMJ (Clinical research ed.), 2019. **364**: p. 1223-1223.
4. Hansson, G.K., *Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease*. N Engl J Med., 2005. **352**(16): p. 1685-1695.
5. Frangogiannis, N.G., *The immune system and cardiac repair*. Pharmacological Research, 2008. **58**(2): p. 88-111.
6. Zhang, W., et al., *Necrotic myocardial cells release damage-associated molecular patterns that provoke fibroblast activation in vitro and trigger myocardial inflammation and fibrosis in vivo*. J Am Heart Assoc., 2015. **4**(6): p. e001993.
7. Frangogiannis, N.G. and A. Rosenzweig, *Regulation of the Inflammatory Response in Cardiac Repair*. Circulation research, 2012. **110**(1): p. 159-173.
8. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction*. circulation research, 2016. **119**(1): p. 91-112.
9. Guillems, M., et al., *Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny*. Nature Reviews Immunology, 2014. **14**: p. 571.

10. Williams, M. and L. van de Laar, *A Hitchhiker's Guide to Myeloid Cell Subsets: Practical Implementation of a Novel Mononuclear Phagocyte Classification System*. Front Immunol, 2015. **6**(406).
11. Ginhoux, F. and M. Williams, *Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis*. Immunity, 2016. **44**(3): p. 439-449.
12. Schulz, C., et al., *A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells*. Science, 2012. **336**(6077): p. 86-90.
13. van de Laar, L., et al., *Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages*. Immunity, 2016. **44**(4): p. 755-768.
14. Auffray, C., et al., *CX3CR1⁺ CD115⁺ CD135⁺ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation*. J Exp Med, 2009. **206**(3): p. 595-606.
15. Schraml, B.U. and C. Reis e Sousa, *Defining dendritic cells*. Curr Opin Immunol, 2015. **32**: p. 13-20.
16. Schraml, Barbara U., et al., *Genetic Tracing via DNNGR-1 Expression History Defines Dendritic Cells as a Hematopoietic Lineage*. Cell, 2013. **154**(4): p. 843-858.
17. Yona, S., et al., *Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis*. Immunity, 2013. **38**(1): p. 79-91.
18. Gordon, S., *Elie Metchnikoff: Father of natural immunity*. Immunology, 2008. **38**(12): p. 3257-3264.
19. Metchnikoff, E., *Über den Kampf der Zellen gegen Erysipelkokken. Ein Beitrag zur Phagocytenlehre*. 1887. **107**(2): p. 209-249.

20. Aschoff, L., *Das reticuloendotheliale System*. Erg. Inn. Med. Kinderheilk., 26, 19924: p. 1-118
21. van Furth, R., et al., The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. Bulletin of the World Health Organization, 1972. **46**(6): p. 845-852.
22. Carrel, A. and A.H. Ebeling, *The fundamental properties of the fibroblast and the macrophage : I. the fibroblast*. The Journal of experimental medicine, 1926. **44**(2): p. 261-284.
23. Lewis, M.R. and W.H. Lewis, *The transformation of white blood cells: into clasmatocytes (macrophages), epithelioid cells and giant cells*. JAMA, 1925. **84**(11): p. 798-799.
24. Ebert, R.H. and H.W. Florey, *The Extravascular Development of the Monocyte Observed In vivo*. British Journal of Experimental Pathology, 1939. **20**(4): p. 342-356.
25. Volkman, A. and J.L. Gowans, *The origin of macrophages from bone marrow in the rat*. British journal of experimental pathology, 1965. **46**(1): p. 62-70.
26. Gall, E.A., *The cytological identity and interrelation of mesenchymal cells of lymphoid tissue*. Ann NY Acad Sci, 1958. **73**(1): p. 120-130.
27. van Furth, R. and Z.A. Cohn, *The origin and kinetics of mononuclear phagocytes*. The Journal of experimental medicine, 1968. **128**(3): p. 415-435.
28. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. The Journal of experimental medicine, 1973. **137**(5): p. 1142-1162.

29. Steinman, R.M. and M.D. Witmer, *Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1978. **75**(10): p. 5132-5136.
30. van Furth, R., 27 - *Identification of mononuclear phagocytes: overview and definitions*, in *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*, D.O. Adams, P.J. Edelson, and H.S. Koren, Editors. 1981, Academic Press. p. 243-251.
31. Ginhoux, F., et al., *Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages*. Science, 2010. **330**(6005): p. 841-845.
32. Naito, M., G. Hasegawa, and K. Takahashi, *Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells*. Microscopy research & technique, 1997. **39**(4): p. 350-364.
33. Yamada, M., M. Naito, and K. Takahashi, *Kupffer Cell Proliferation and Glucan-Induced Granuloma Formation in Mice Depleted of Blood Monocytes by Strontium-89*. Journal of leukocyte biology, 1990. **47**(3): p. 195-205.
34. Alliot, F., I. Godin, and B. Pessac, *Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain*. Developmental Brain Research, 1999. **117**(2): p. 145-152.
35. Guilliams, M., et al., *Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF*. The Journal of experimental medicine, 2013. **210**(10): p. 1977-1992.
36. Hoeffel, G., et al., *Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages*. The Journal of experimental medicine, 2012. **209**(6): p. 1167-1181.

37. Naik, S.H., et al., *Diverse and heritable lineage imprinting of early haematopoietic progenitors*. Nature, 2013. **496**: p. 229.
38. Sunderkötter, C., et al., *Subpopulations of Mouse Blood Monocytes Differ in Maturation Stage and Inflammatory Response*. journal of immunology, 2004. **172**(7): p. 4410-4417.
39. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
40. Auffray, C., et al., *Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior*. Science, 2007. **317**(5838): p. 666-670.
41. Carlin, Leo M., et al., *Nr4a1-Dependent Ly6Clow Monocytes Monitor Endothelial Cells and Orchestrate Their Disposal*. Cell, 2013. **153**(2): p. 362-375.
42. Hilgendorf, I., et al., *Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium*. Circulation research, 2014. **114**(10): p. 1611-1622.
43. Bain, C.C., et al., *Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice*. Nature Immunology, 2014. **15**: p. 929.
44. Epelman, S., et al., *Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation*. Immunity, 2014. **40**(1): p. 91-104.
45. Jakubzick, C., et al., *Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes*. Immunity, 2013. **39**(3): p. 599-610.

46. Hanna, R.N., et al., *The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C- monocytes*. Nature immunology, 2011. **12**(8): p. 778-785.
47. Hettinger, J., et al., *Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor*. Nature Immunology, 2013. **14**: p. 821.
48. Ingersoll, M.A., et al., *Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets*. Blood, 2010. **115**(3): p. e10-e19.
49. Epelman, S., K.J. Lavine, and G.J. Randolph, *Origin and functions of tissue macrophages*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 21-35.
50. Guilliams, M., A. Mildner, and S. Yona, *Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes*. Immunity, 2018. **49**(4): p. 595-613.
51. Swirski, F.K., et al., *Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites*. Science 2009. **325**(5940): p. 612-616.
52. Leuschner, F., et al., *Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis*. The Journal of experimental medicine, 2012. **209**(1): p. 123-137.
53. Robbins, C.S., et al., *Extramedullary Hematopoiesis Generates Ly-6Chigh Monocytes That Infiltrate Atherosclerotic Lesions*. Circulation, 2012. **125**(2): p. 364-374.
54. van der Laan, A.M., et al., *Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir*. European Heart Journal, 2013. **35**(6): p. 376-385.
55. Bertrand, J.Y., et al., *Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac*. Blood, 2005. **106**(9): p. 3004-3011.

56. Bertrand, J.Y., et al., *Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 108-111.
57. Kissa, K. and P. Herbomel, *Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition*. Nature, 2010. **464**: p. 112.
58. Boisset, J.-C., et al., *In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium*. Nature, 2010. **464**: p. 116.
59. McGrath, K.E., J.M. Frame, and J. Palis, *Early hematopoiesis and macrophage development*. Seminars in immunology, 2015. **27**(6): p. 379-387.
60. Palis, J., et al., *Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse*. Development, 1999. **126**(22): p. 5073-5084.
61. Ginhoux, F. and S. Jung, *Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis*. Nature Reviews Immunology, 2014. **14**: p. 392.
62. Hashimoto, D., et al., *Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes*. Immunity, 2013. **38**(4): p. 792-804.
63. Sieweke, M.H. and J.E. Allen, *Beyond Stem Cells: Self-Renewal of Differentiated Macrophages*. Science, 2013. **342**(6161): p. 1242974.
64. Kierdorf, K., et al., *Microglia emerge from erythromyeloid precursors via *Pu.1*- and *Irf8*-dependent pathways*. Nature Neuroscience, 2013. **16**: p. 273.
65. Merad, M., et al., *Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions*. Nature immunology, 2002. **3**(12): p. 1135-1141.

66. Kanitakis, J., et al., *Self-renewal capacity of human epidermal Langerhans cells: observations made on a composite tissue allograft*. *Experimental Dermatology*, 2011. **20**(2): p. 145-146.
67. Molawi, K., et al., *Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age*. *The Journal of experimental medicine*, 2014. **211**(11): p. 2151-2158.
68. Lavin, Y., et al., *Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment*. *Cell*, 2014. **159**(6): p. 1312-1326.
69. A. Aderem and D.M. Underhill, *Mechanism of phagocytosis in macrophages*. *Annu Rev Immunol.*, 1999. **17**(1): p. 593-623.
70. Varol, C., A. Mildner, and S. Jung, *Macrophages: Development and Tissue Specialization*,. 2015. **33**(1): p. 643-675.
71. Davies, L.C., et al., *Tissue-resident macrophages*. *Nature Immunology*, 2013. **14**: p. 986.
72. Gordon, S., A. Plüddemann, and F. Martinez Estrada, *Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions*. *Immunol Rev.*, 2014. **262**(1): p. 36-55.
73. Halder, M., et al., *Heme-Mediated SPI-C Induction Promotes Monocyte Differentiation into Iron-Recycling Macrophages*. *Cell*, 2014. **156**(6): p. 1223-1234.
74. Hong, S., et al., *Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models*. *Science* 2016. **352**(6286): p. 712-716.
75. Nguyen, K.D., et al., *Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis*. *Nature*, 2011. **480**: p. 104.

76. Murray, Peter J., et al., *Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 14-20.
77. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. F1000prime reports, 2014. **6**: p. 13-13.
78. Troidl, C., et al., *Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction*. Journal of molecular and cellular medicine, 2009. **13**(9b): p. 3485-3496.
79. Pinto, A.R., et al., *An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile*. PloS one, 2012. **7**(5): p. e36814-e36814.
80. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(1): p. 23-35.
81. Stein, M., et al., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. 1992. **176**(1): p. 287-292.
82. Nahrendorf, M. and F. Swirski, *Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function*. Circulation Research, 2016. **119**: p. 414-417.
83. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. Journal of leukocyte biology, 2003. **73**(2): p. 209-212.
84. Fujiu, K., J. Wang, and R. Nagai, *Cardioprotective function of cardiac macrophages*. Cardiovascular Research, 2014. **102**(2): p. 232-239.
85. Weinberger, T. and C. Schulz, *Myocardial infarction: a critical role of macrophages in cardiac remodeling*. Frontiers in physiology, 2015. **6**(107).

86. Heidt, T., et al., *Differential Contribution of Monocytes to Heart Macrophages in Steady-State and After Myocardial Infarction*. Circulation research, 2014. **115**(2): p. 284-295.
87. Lavine, K.J., et al., *Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(45): p. 16029-16034.
88. Lawrence, T. and G. Natoli, *Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity*. Nature Reviews Immunology, 2011. **11**: p. 750.
89. Hashimoto, D., J. Miller, and M. Merad, *Dendritic Cell and Macrophage Heterogeneity In Vivo*. Immunity, 2011. **35**(3): p. 323-335.
90. Robbins, S.H., et al., *Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling*. Genome Biology, 2008. **9**(1): p. R17.
91. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-661.
92. Steinman, R.M. and J. Idoyaga, *Features of the dendritic cell lineage*. Immunol Rev. , 2010. **234**(1): p. 5-17.
93. Merad, M., et al., *The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting*. Annu Rev Immunol., 2013. **31**(1): p. 563-604.
94. Schlitzer, A. and F. Ginhoux, *Organization of the mouse and human DC network*. Current Opinion in Immunology, 2014. **26**: p. 90-99.

95. Durai, V. and K.M. Murphy, *Functions of Murine Dendritic Cells*. Immunity, 2016. **45**(4): p. 719-736.
96. Briseño, C.G., T.L. Murphy, and K.M. Murphy, *Complementary diversification of dendritic cells and innate lymphoid cells*. Current Opinion in Immunology, 2014. **29**: p. 69-78.
97. Satpathy, A.T., et al., *Notch2-dependent classical dendritic cells orchestrate intestinal immunity to attaching-and-effacing bacterial pathogens*. Nature immunology, 2013. **14**(9): p. 937-948.
98. Kinnebrew, Melissa A., et al., *Interleukin 23 Production by Intestinal CD103(+) CD11b(+) Dendritic Cells in Response to Bacterial Flagellin Enhances Mucosal Innate Immune Defense*. Immunity, 2012. **36**(2): p. 276-287.
99. Arora, P., et al., *A Single Subset of Dendritic Cells Controls the Cytokine Bias of Natural Killer T Cell Responses to Diverse Glycolipid Antigens*. Immunity, 2014. **40**(1): p. 105-116.
100. Loschko, J., et al., *Absence of MHC class II on cDCs results in microbial-dependent intestinal inflammation*. The Journal of experimental medicine 2016. **213**(4): p. 517-534.
101. Fogg, D.K., et al., *A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells*. 2006. **311**(5757): p. 83-87.
102. Naik, S.H., et al., *Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo*. Nature Immunology, 2007. **8**: p. 1217.
103. Onai, N., et al., *Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow*. Nature Immunology, 2007. **8**: p. 1207.

104. Liu, K., et al., *In Vivo Analysis of Dendritic Cell Development and Homeostasis*. Science, 2009. **324**(5925): p. 392-397.
105. Naik, S.H., et al., *Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes*. Nature Immunology, 2006. **7**(6): p. 663-671.
106. Varol, C., et al., *Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells*. Annu Rev Immunol., 2007. **204**(1): p. 171-180.
107. Shortman, K., et al., *Chapter Four - Plasmacytoid Dendritic Cell Development*, in *Advances in Immunology*, K.M. Murphy and M. Merad, Editors. 2013, Academic Press. p. 105-126.
108. Reizis, B., *Regulation of plasmacytoid dendritic cell development*. Current Opinion in Immunology, 2010. **22**(2): p. 206-211.
109. Grajales-Reyes, G.E., et al., *Batf3 maintains autoactivation of Irf8 for commitment of a CD8 α ⁺ conventional DC clonogenic progenitor*. Nature Immunology, 2015. **16**: p. 708.
110. Schlitzer, A., et al., *Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow*. Nature Immunology, 2015. **16**: p. 718.
111. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. Nature Reviews Immunology, 2006. **7**: p. 19.
112. Mildner, A., S. Yona, and S. Jung, *Chapter Three - A Close Encounter of the Third Kind: Monocyte-Derived Cells*, in *Advances in Immunology*, K.M. Murphy and M. Merad, Editors. 2013, Academic Press. p. 69-103.
113. Poltorak, M.P. and B.U. Schraml, *Fate mapping of dendritic cells*. Frontiers in immunology, 2015. **6**: p. 199-199.

114. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces*. Nature Immunology, 2009. **10**: p. 1237.
115. Merad, M., et al., *The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting*. 2013. **31**(1): p. 563-604.
116. Murphy, T.L., et al., *Transcriptional Control of Dendritic Cell Development*. Annu Rev Immunol., 2016. **34**(1): p. 93-119.
117. Tussiwand, R., et al., *Expression in Conventional Dendritic Cells Is Required for T Helper 2 Cell Responses*. Immunity, 2015. **42**(5): p. 916-928.
118. Scott, C.L., et al., *The transcription factor Zeb2 regulates development of conventional and plasmacytoid DCs by repressing Id2*. The Journal of experimental medicine, 2016. **213**(6): p. 897-911.
119. Schlitzer, A., et al., *IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b(+) Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses*. Immunity, 2013. **38**(5): p. 970-983.
120. Persson, Emma K., et al., *IRF4 Transcription-Factor-Dependent CD103(+) CD11b(+) Dendritic Cells Drive Mucosal T Helper 17 Cell Differentiation*. Immunity, 2013. **38**(5): p. 958-969.
121. Swiecki, M. and M. Colonna, *The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells*. Nature Reviews Immunology, 2015. **15**: p. 471.
122. Serbina, N.V., et al., *TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 59-70.

123. Domínguez, P.M. and C. Ardavín, *Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation*. Immunol Rev., 2010. **234**(1): p. 90-104.
124. Mildner, A. and S. Jung, *Development and function of dendritic cell subsets*. Immunity, 2014. **40**(5): p. 642-56.
125. Robinson, M.J., et al., *Myeloid C-type lectins in innate immunity*. Nature Immunology, 2006. **7**(12): p. 1258-1265.
126. Sancho, D., et al., *Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity*. Nature, 2009. **458**: p. 899.
127. Poulin, L.F., et al., *DNDR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and non-lymphoid tissues*. Blood, 2012. **119**(25): p. 6052-62
128. del Fresno, C., et al., *DNDR-1 in dendritic cells limits tissue damage by dampening neutrophil recruitment*. Science, 2018. **362**(6412): p. 351-356.
129. Hanč, P., et al., *Structure of the Complex of F-Actin and DNDR-1, a C-Type Lectin Receptor Involved in Dendritic Cell Cross-Presentation of Dead Cell-Associated Antigens*. Immunity, 2015. **42**(5): p. 839-849.
130. Huysamen, C., et al., *CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(24): p. 16693-16701.
131. Sancho, D., et al., *Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin*. The Journal of Clinical Investigation, 2008. **118**(6): p. 2098-2110.

132. Milling, S., et al., *Subsets of migrating intestinal dendritic cells*. Immunol Rev., 2010. **234**(1): p. 259-267.
133. Hume, D.A., *Macrophages as APC and the Dendritic Cell Myth*. Journal of immunology, 2008. **181**(9): p. 5829-5835.
134. Haddad, Y., et al., *The Dendritic Cell Receptor DNGR-1 Promotes the Development of Atherosclerosis in Mice*. Circulation research, 2017. **121**(3): p. 234-243.
135. Cheng, A.-C., et al., *CLEC9A modulates macrophage-mediated neutrophil recruitment in response to heat-killed Mycobacterium tuberculosis H37Ra*. PLOS ONE, 2017. **12**(10): p. e0186780.
136. Wynn, T.A., *Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis*. The Journal of experimental medicine, 2011. **208**(7): p. 1339-1350.
137. Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. The Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(2): p. 209-218.
138. Berk, B.C., K. Fujiwara, and S. Lehoux, *ECM remodeling in hypertensive heart disease*. The Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(3): p. 568-575.
139. Unverferth, D.V., et al., *Regional myocyte hypertrophy and increased interstitial myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy*. American Journal of Cardiology, 1987. **59**(9): p. 932-936.
140. Biernacka, A. and N.G. Frangogiannis, *Aging and Cardiac Fibrosis*. Aging and disease, 2011. **2**(2): p. 158-173.
141. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling*. J. of the American College of Cardiology, 2000. **35**(3): p. 569-582.

142. Kong, P., P. Christia, and N.G. Frangogiannis, *The pathogenesis of cardiac fibrosis*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2014. **71**(4): p. 549-574.
143. Willems, I.E., et al., *The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars*. The American journal of pathology, 1994. **145**(4): p. 868-875.
144. Weber, K.T. and C.G. Brilla, *Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system*. Circulation, 1991. **83**(6): p. 1849-1865.
145. Cleutjens, J.P., et al., *Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart*. The American journal of pathology, 1995. **147**(2): p. 325-338.
146. Sakai, N., et al., *MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes*. Journal of leukocyte biology, 2006. **79**(3): p. 555-563.
147. Frangogiannis Nikolaos, G., et al., *Critical Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 in the Pathogenesis of Ischemic Cardiomyopathy*. Circulation, 2007. **115**(5): p. 584-592.
148. Gharaee-Kermani, M., E.M. Denholm, and S.H. Phan, *Costimulation of Fibroblast Collagen and Transforming Growth Factor β 1 Gene Expression by Monocyte Chemoattractant Protein-1 via Specific Receptors*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(30): p. 17779-17784.
149. Kim, J., et al., *Cytokine-Like 1 Regulates Cardiac Fibrosis via Modulation of TGF- β Signaling*. PLOS ONE, 2016. **11**(11): p. e0166480.
150. Frangogiannis, N.G., *Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities*. Molecular Aspects of Medicine, 2019. **65**: p. 70-99.

151. Barron, L. and T.A. Wynn, *Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2011. **300**(5): p. G723-G728.
152. Cieslik, K.A., et al., *Immune-inflammatory dysregulation modulates the incidence of progressive fibrosis and diastolic stiffness in the aging heart*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2011. **50**(1): p. 248-256.
153. Chiamonte, M.G., et al., *An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response*. The Journal of clinical investigation, 1999. **104**(6): p. 777-785.
154. Baldeviano, G.C., et al., *Interleukin-17A Is Dispensable for Myocarditis but Essential for the Progression to Dilated Cardiomyopathy*. Circulation Research, 2010. **106**(10): p. 1646-1655.
155. Travers, J.G., et al., *Cardiac Fibrosis*. Circulation research, 2016. **118**(6): p. 1021-1040.
156. Duprez, D.A., *Role of the renin–angiotensin–aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review*. 2006. **24**(6): p. 983-991.
157. Kurdi, M. and G.W. Booz, *New take on the role of angiotensin II in cardiac hypertrophy and fibrosis*. Hypertension (Dallas, Tex. : 1979), 2011. **57**(6): p. 1034-1038.
158. Letavernier, E., et al., *Targeting the Calpain/Calpastatin System as a New Strategy to Prevent Cardiovascular Remodeling in Angiotensin II-induced Hypertension*. Circulation research, 2008. **102**(6): p. 720-728.
159. Weber, K.T., et al., *Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart*. Nature Reviews Cardiology, 2012. **10**: p. 15.

160. Pan, Q., X.-H. Yang, and Y.-X. Cheng, *Angiotensin II stimulates MCP-1 production in rat glomerular endothelial cells via NAD(P)H oxidase-dependent nuclear factor-kappa B signaling*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2009. **42**: p. 531-536.

161. Matsuda, S., et al., *Angiotensin II Activates MCP-1 and Induces Cardiac Hypertrophy and Dysfunction via Toll-like Receptor 4*. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 2015. **22**(8): p. 833-844.

162. Sadoshima, J. and S. Izumo, *Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype*. *Circulation research*, 1993. **73**(3): p. 413-423.

163. Schieffer, B., et al., *Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat*. *Circulation*, 1994. **89**(5): p. 2273-2282.

164. Crowley, S.D., et al., *Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 2006. **103**(47): p. 17985-17990.

165. Kolh, P., et al., *2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI)*. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2014. **46**(4): p. 517-592.

166. Nahrendorf, M., M.J. Pittet, and F.K. Swirski, *Monocytes: Protagonists of Infarct Inflammation and Repair After Myocardial Infarction*. *Circulation*, 2010. **121**(22): p. 2437-2445.

167. Swirski, F.K. and M. Nahrendorf, *Leukocyte Behavior in Atherosclerosis, Myocardial Infarction, and Heart Failure*. Science 2013. **339**(6116): p. 161-166.
168. Jiang, B. and R. Liao, *The Paradoxical Role of Inflammation in Cardiac Repair and Regeneration*. Journal of Cardiovascular Translational Research, 2010. **3**(4): p. 410-416.
169. Marchant, D.J., et al., *Inflammation in Myocardial Diseases*. Circulation research, 2012. **110**(1): p. 126-144.
170. Coggins, M. and A. Rosenzweig, *The Fire Within: Cardiac Inflammatory Signaling in Health and Disease*. circulation research, 2012. **110**(1): p. 116-125.
171. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nature Reviews Immunology, 2004. **4**(7): p. 499-511.
172. Kaikita, K., et al., *Targeted Deletion of CC Chemokine Receptor 2 Attenuates Left Ventricular Remodeling after Experimental Myocardial Infarction*. The American Journal of Pathology, 2004. **165**(2): p. 439-447.
173. Dewald, O., et al., *CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Regulates Inflammatory Responses Critical to Healing Myocardial Infarcts*. circulation research, 2005. **96**(8): p. 881-889.
174. Frangogiannis, N.G., et al., *Critical Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 in the Pathogenesis of Ischemic Cardiomyopathy*. Circulation, 2007. **115**(5): p. 584-592.
175. Ertl, G. and S. Frantz, *Healing after myocardial infarction*. Cardiovascular Research, 2005. **66**(1): p. 22-32.
176. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovascular Research, 2002. **53**(1): p. 31-47.

177. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. The Journal of experimental medicine, 2007. **204**(12): p. 3037-3047.
178. Nahrendorf, M. and F.K. Swirski, *Monocyte and Macrophage Heterogeneity in the Heart*. Circulation research, 2013. **112**(12): p. 1624-1633.
179. Frantz, S., J. Bauersachs, and G. Ertl, *Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation*. Cardiovascular Research, 2008. **81**(3): p. 474-481.
180. Frantz, S. and M. Nahrendorf, *Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease*. Cardiovascular Research, 2014. **102**(2): p. 240-248.
181. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-252.
182. Pulendran, B., H. Tang, and S. Manicassamy, *Programming dendritic cells to induce TH2 and tolerogenic responses*. Nature Immunology, 2010. **11**: p. 647.
183. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of Dendritic Cells*. Annu Rev Immunol., 2000. **18**(1): p. 767-811.
184. Zhang, J., et al., *Interstitial dendritic cells of the rat heart. Quantitative and ultrastructural changes in experimental myocardial infarction*. Circulation, 1993. **87**(3): p. 909-920.
185. Van der Borgh, K., et al., *Myocardial Infarction Primes Autoreactive T Cells through Activation of Dendritic Cells*. Cell Reports, 2017. **18**(12): p. 3005-3017.

186. Naito, K., et al., *Differential Effects of GM-CSF and G-CSF on Infiltration of Dendritic Cells during Early Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction*. The Journal of Immunology, 2008. **181**(8): p. 5691-5701.
187. Anzai, A., et al., *Regulatory Role of Dendritic Cells in Postinfarction Healing and Left Ventricular Remodeling*. Circulation, 2012. **125**(10): p. 1234-1245.
188. Liu, J., H. Wang, and J. Li, *Inflammation and Inflammatory Cells in Myocardial Infarction and Reperfusion Injury: A Double-Edged Sword*. Clin Med Insights Cardiol, 2016. **10**: p. 79-84.
189. Sutton, M.G.S.J. and N. Sharpe, *Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction*. Circulation, 2000. **101**(25): p. 2981-2988.
190. Swynghedauw, B., *Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling*. Physiol Rev., 1999. **79**(1): p. 215-262.
191. Pfeffer, J.M., et al., *Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction*. Am J Physiol., 1991. **260**(5): p. H1406-H1414.
192. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. Circulation, 1990. **81**(4): p. 1161-1172.
193. Hayashidani, S., et al., *Anti-Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Therapy Attenuates Left Ventricular Remodeling and Failure After Experimental Myocardial Infarction*. Circulation, 2003. **108**(17): p. 2134-2140.
194. van Amerongen, M.J., et al., *Macrophage Depletion Impairs Wound Healing and Increases Left Ventricular Remodeling after Myocardial Injury in Mice*. The American Journal of Pathology, 2007. **170**(3): p. 818-829.

195. Lee, J.S., et al., *Conventional Dendritic Cells Impair Recovery after Myocardial Infarction*. Journal of Immunology, 2018. **201**(6): p. 1784-1798.
196. Srinivas, S., et al., *Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus*. BMC developmental biology, 2001. **1**(1): p. 4.
197. Fogg, D.K., et al., *A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells*. Science, 2006. **311**(5757): p. 83-7.
198. Bornhöfft, K.F., et al., *Siglecs: A journey through the evolution of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*. Developmental & Comparative Immunology, 2018. **86**: p. 219-231.
199. Schmitt, H., et al., *Siglec-H protects from virus-triggered severe systemic autoimmunity*. The Journal of experimental medicine, 2016. **213**(8): p. 1627-1644.
200. Swiecki, M., et al., *Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual*. Immunity, 2010. **33**(6): p. 955-966.
201. Satpathy, A.T., et al., *Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages*. J Exp Med, 2012. **209**(6): p. 1135-52.
202. Kuhn, R., et al., *Inducible gene targeting in mice*. Science 1995. **269**(5229): p. 1427-1429.
203. Lieu, Y.K. and E.P. Reddy, *Conditional c-myb knockout in adult hematopoietic stem cells leads to loss of self-renewal due to impaired proliferation and accelerated differentiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(51): p. 21689-21694.

204. Soza-Ried, C., et al., *Essential role of c-myb in definitive hematopoiesis is evolutionarily conserved*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(40): p. 17304-17308.
205. Stremmel, C., et al., *Inducible disruption of the c-myb gene allows allogeneic bone marrow transplantation without irradiation*. Journal of immunological methods, 2018. **457**: p. 66-72.
206. The Jackson Laboratory. *Mouse strain datasheet - 000664 C57BL/6J* [Zugriff am 22.06.19] verfügbar unter:
<https://www.jax.org/Strain/UrlAsPDF/000664>
207. Buch, T., et al., *A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration*. Nature Methods, 2005. **2**(6): p. 419-426.
208. van Blijswijk, J., et al., *Altered lymph node composition in diphtheria toxin receptor-based mouse models to ablate dendritic cells*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2015. **194**(1): p. 307-315.
209. Erhardt, W., Henke, J., Haberstroh, J., Baumgartner, C., Tacke, S., Kölle, P., Korbel, R., Kroker, R., Lendl, C., Lierz, M., *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. (2. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed. Stuttgart: Schattauer): p. p. 980.
210. Eckardt, S., K.J. McLaughlin, and H. Willenbring, *Mouse chimeras as a system to investigate development, cell and tissue function, disease mechanisms and organ regeneration*. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 2011. **10**(13): p. 2091-2099.
211. Cui, Y.Z., et al., *Optimal protocol for total body irradiation for allogeneic bone marrow transplantation in mice*. Bone Marrow Transplantation, 2002. **30**(12): p. 843-849.

212. Dai, X.-M., et al., *Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects*. Blood, 2002. **99**(1): p. 111-120.
213. MacDonald, K.P.A., et al., *An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation*. Blood, 2010. **116**(19): p. 3955-3963.
214. Rosin, J.M., S.R. Vora, and D.M. Kurrasch, *Depletion of embryonic microglia using the CSF1R inhibitor PLX5622 has adverse sex-specific effects on mice, including accelerated weight gain, hyperactivity and anxiolytic-like behaviour*. Brain, Behavior, and Immunity, 2018. **73**: p. 682-697.
215. Matsumoto, E., et al., *Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis are promoted in mice lacking Fgf16*. Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms, 2013. **18**(7): p. 544-553.
216. Sopel, M.J., et al., *Myocardial fibrosis in response to Angiotensin II is preceded by the recruitment of mesenchymal progenitor cells*. Laboratory Investigation, 2010. **91**: p. 565.
217. Zhan, Y., et al., *Ets-1 is a critical regulator of Ang II-mediated vascular inflammation and remodeling*. The Journal of clinical investigation, 2005. **115**(9): p. 2508-2516.
218. Letavernier, E., et al., *Targeting the Calpain/Calpastatin System as a New Strategy to Prevent Cardiovascular Remodeling in Angiotensin II-Induced Hypertension*. 2008. **102**(6): p. 720-728.
219. Lindsey, M.L., et al., *Guidelines for measuring cardiac physiology in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol., 2018. **314**(4): p. H733-H752.

220. Asai, K., et al., *Beta-adrenergic receptor blockade arrests myocyte damage and preserves cardiac function in the transgenic G(salphi) mouse*. The Journal of clinical investigation, 1999. **104**(5): p. 551-558.
221. Odashima, M., et al., *Inhibition of Endogenous Mst1 Prevents Apoptosis and Cardiac Dysfunction Without Affecting Cardiac Hypertrophy After Myocardial Infarction*. circulation research, 2007. **100**(9): p. 1344-1352.
222. Sørensen, L.L., et al., *Echocardiographic Characterization of a Murine Model of Hypertrophic Obstructive Cardiomyopathy Induced by Cardiac-specific Overexpression of Epidermal Growth Factor Receptor 2*. Comparative medicine, 2016. **66**(4): p. 268-277.
223. Mattson, D.L., *Comparison of arterial blood pressure in different strains of mice**. American Journal of Hypertension, 2001. **14**(5): p. 405-408.
224. Wu, J., et al., *Letter to the editor: When what you see might not be what you get: prudent considerations of anesthetics for murine echocardiography*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2015. **308**(12): p. H1612-H1613.
225. Gropler, R.J., et al., *Imaging myocardial metabolic remodeling*. Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine, 2010. **51** (Suppl 1): p. 88S-101S.
226. Higuchi, T., et al., *Characterization of Normal and Infarcted Rat Myocardium Using a Combination of Small-Animal PET and Clinical MRI*. J Nucl Med 2007. **48**(2): p. 288-294.
227. He, Z.-X., et al., *Direct Imaging of Exercise-Induced Myocardial Ischemia With Fluorine-18-labeled Deoxyglucose and Tc-99m-Sestamibi in Coronary Artery Disease*. Circulation, 2003. **108**(10): p. 1208-1213.

228. Todica, A., et al., *Monitoring of Cardiac Remodeling in a Mouse Model of Pressure-Overload Left Ventricular Hypertrophy with [18F]FDG MicroPET*. Molecular Imaging and Biology, 2017. **20**.
229. Sack, U., *Zelluläre Diagnostik und Therapie*. 2015: De Gruyter. p. 1-27.
230. Emde, B., et al., *Wheat germ agglutinin staining as a suitable method for detection and quantification of fibrosis in cardiac tissue after myocardial infarction*. European journal of histochemistry : EJH, 2014. **58**(4): p. 2448-2448.
231. Meredith, M.M., et al., *Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage*. The Journal of experimental medicine, 2012. **209**(6): p. 1153-1165.
232. Blasius, A.L., et al., *Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAPI2*. Blood, 2006. **107**(6): p. 2474-2476.
233. Holling, T.M., E. Schooten, and P.J. van Den Elsen, *Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men*. Human Immunology, 2004. **65**(4): p. 282-290.
234. Herkel, J., et al., *MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes*. Hepatology. , 2003. **37**(5): p. 1079-1085.
235. Hussell, T. and T.J. Bell, *Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context*. Nature Reviews Immunology, 2014. **14**: p. 81.
236. Suzuki, Y., et al., *Macrophage mannose receptor, CD206, predict prognosis in patients with pulmonary tuberculosis*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 13129.

237. Lumniczky, K., T. Szatmári, and G. Sáfrány, *Ionizing Radiation-Induced Immune and Inflammatory Reactions in the Brain*. *Frontiers in Immunology*, 2017. **8**(517).
238. Ensan, S., et al., *Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1(+) precursors and circulating monocytes immediately after birth*. *Nat Immunol*, 2016. **17**(2): p. 159-68.
239. Cybulsky, M.I., C. Cheong, and C.S. Robbins, *Macrophages and Dendritic Cells: Partners in Atherogenesis*. *Circ Res*, 2016. **118**(4): p. 637-52.
240. Ma, Y., A.J. Mouton, and M.L. Lindsey, *Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction*. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 2018. **191**: p. 15-28.
241. Santamaria-Barria, J.A., et al., *Colony Stimulating Factor Receptor 1 (CSF1R) Inhibition Impairs Liver Regeneration*. *Journal of the American College of Surgeons*, 2014. **219**(3): p. S24.
242. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. *Nature Reviews Immunology*, 2005. **5**(12): p. 953-964.
243. Sathaliyawala, T., et al., *Mammalian target of rapamycin controls dendritic cell development downstream of Flt3 ligand signaling*. *Immunity*, 2010. **33**(4): p. 597-606.
244. Thepen, T., N. Van Rooijen, and G. Kraal, *Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice*. *The Journal of experimental medicine*, 1989. **170**(2): p. 499-509.
245. Paris, F., et al., *Endothelial Apoptosis as the Primary Lesion Initiating Intestinal Radiation Damage in Mice*. *Science* 2001. **293**(5528): p. 293-297.

246. Liu, K., et al., *Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice*. Nature Immunology, 2007. **8**: p. 578.
247. Breckenridge, R., *Heart failure and mouse models*. Dis Model Mech., 2010. **3**(3-4): p. 138-143.
248. Probst, H.C., et al., *Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells*. Clinical and experimental immunology, 2005. **141**(3): p. 398-404.
249. Hochweller, K., et al., *A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells*. Eur J Immunol., 2008. **38**(10): p. 2776-2783.
250. Huleatt, J.W. and L. Lefrançois, *Antigen-driven induction of CD11c on intestinal intraepithelial lymphocytes and CD8+ T cells in vivo*. Journal of Immunology, 1995. **154**(11): p. 5684-5693.
251. Carlens, J., et al., *Common γ -Chain-Dependent Signals Confer Selective Survival of Eosinophils in the Murine Small Intestine*. Journal of Immunology, 2009. **183**(9): p. 5600-5607.
252. Tittel, A.P., et al., *Functionally relevant neutrophilia in CD11c diphtheria toxin receptor transgenic mice*. Nature Methods, 2012. **9**: p. 385.
253. Jiao, J., et al., *Central role of conventional dendritic cells in regulation of bone marrow release and survival of neutrophils*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2014. **192**(7): p. 3374-3382.
254. Männ, L., et al., *CD11c.DTR mice develop a fatal fulminant myocarditis after local or systemic treatment with diphtheria toxin*. Eur J Immunol., 2016. **46**(8): p. 2028-2042.

255. Falkenham, A., et al., *Nonclassical Resident Macrophages Are Important Determinants in the Development of Myocardial Fibrosis*. The American Journal of Pathology, 2015. **185**(4): p. 927-942.
256. Rombouts, M., et al., *Long-Term Depletion of Conventional Dendritic Cells Cannot Be Maintained in an Atherosclerotic Zbtb46-DTR Mouse Model*. PloS one, 2017. **12**(1): p. e0169608-e0169608.
257. Tetlak, P. and C. Ruedl, *Analysis of Dendritic Cell Function Using Clec9A-DTR Transgenic Mice*, in *Dendritic Cell Protocols*, E. Segura and N. Onai, Editors. 2016, Springer New York: New York, NY. p. 275-289.
258. Gilfillan, C.B., et al., *Clec9A+ Dendritic Cells Are Not Essential for Antitumor CD8+T Cell Responses Induced by Poly I:C Immunotherapy*. Journal of immunology 2018. **200**(8): p. 2978-2986.
259. Sheng, J., et al., *A Discrete Subset of Monocyte-Derived Cells among Typical Conventional Type 2 Dendritic Cells Can Efficiently Cross-Present*. Cell Reports, 2017. **21**(5): p. 1203-1214.
260. Muzaki, A.R.B.M., et al., *Intestinal CD103+CD11b- dendritic cells restrain colitis via IFN- γ -induced anti-inflammatory response in epithelial cells*. Mucosal Immunology, 2015. **9**: p. 336.
261. Salvermoser, J., et al., *Clec9a-Mediated Ablation of Conventional Dendritic Cells Suggests a Lymphoid Path to Generating Dendritic Cells In Vivo*. Frontiers in immunology, 2018. 9(699).
262. Courties, G., et al., *In vivo silencing of the transcription factor IRF5 reprograms the macrophage phenotype and improves infarct healing*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(15): p. 1556-66.

XIII. DANKSAGUNG

Zum Gelingen meiner Doktorarbeit haben eine Vielzahl von Personen beigetragen, denen ich an dieser Stelle aufrichtig danken möchte.

An erster Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. Christian Schulz für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Zudem bedanke ich mich sehr für die hervorragende Betreuung, konstruktiven Anregungen sowie fortwährende Unterstützung und ermutigende Worte.

Herrn Priv.-Doz. med. vet. Sven Reese danke ich für die Übernahme des Dissertationsvorhabens, die Durchsicht der Arbeit und deren Einreichung an der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Außerdem möchte ich mich für die große Unterstützung und Geduld bei der statistischen Auswertung herzlich bedanken.

Frau Prof. Dr. Barbara Schraml sowie ihrer Arbeitsgruppe möchte ich für die wissenschaftliche und technische Hilfestellung danken.

Dem SFB914 sowie dem Graduiertenprogramm IRTG 914 danke ich für die Förderung und die herausragenden Möglichkeiten der wissenschaftlichen Weiterbildung.

Die tolle Arbeitsatmosphäre im Labor und die große Hilfsbereitschaft der gesamten Arbeitsgruppe trug maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Hier möchte ich besonders Anna Titova, Zeljka Sisic, Micheal Lorenz, Dr. med. Tobias Weinberger und Dr. med. vet. Susanne Sauer für die Hilfestellung in jeglichen Laborbelangen danken. Sehr herzlich bedanke ich mich bei Dr.med. vet. Vanessa Schneider, Lukas Klösger, Dr. med. vet. Annegret Boda, Niklas Bürgener und Julia Winterhalter für ihre Unterstützung und die motivierenden Worte sowie der gesamten AG Massberg/Schulz, die die Zeit der Promotion erheblich bereichert hat.

Ein großer Dank geht an meine wundervolle Familie und lieben Freunde, die durch die gesamte Studien- und Promotionszeit an meiner Seite standen, mir den Rücken gestärkt und immer an mich geglaubt haben. Besonders danke ich Carolin Hohmann und meinen Vet-Mädls, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und die richtigen Worte gefunden haben.