

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

Auswirkungen noradrenerger Innervation auf die lokale
Makrophagenheterogenität

von Vivien Polewka
aus Dachau
München 2022

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: Priv. - Doz. Dr. med. Konstantin Stark

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

Korreferentin: Prof. Dr. Sabine André

Tag der Promotion: 12. Februar 2022

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	3
1.	Makrophagen.....	3
1.1.	Ursprung und Entwicklung von Makrophagen	3
1.2.	Funktion der Makrophagen	5
1.3.	Oberflächenmoleküle von Makrophagen	8
2.	Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC).....	10
2.1.	MHC-Klasse-II.....	12
2.2.	Nischenspezifische MHC-Klasse-II - Expression.....	13
3.	Interaktionen zwischen Nerven und Immunzellen	14
3.1.	Nerv-assoziierte Makrophagen	14
3.2.	Vegetatives Nervensystem	16
3.3.	Auswirkungen der sympathischen Innervation auf Immunzellen.....	18
III.	ZIELSETZUNG	21
IV.	MATERIAL UND METHODEN	22
1.	Versuchstiere	22
1.1.	Tierhaltung und Zucht.....	22
1.2.	Mausstämme.....	23
1.2.1.	Wildtypstamm C57BL/6J.....	23
1.2.2.	Cx3cr1 ^{GFP}	23
1.2.3.	Cx3cr1 ^{CreERT2} x Rosa26 ^{tdTomato}	24
1.3.	Aktivierung der östrogeninduzierten Cre-Rekombinase.....	24
2.	Eingriffe an der Maus.....	24
2.1.	Narkose.....	24
2.1.1.	Inhalationsnarkose.....	24
2.1.2.	Injektionsnarkose	25
2.2.	Blutentnahme aus der Vena facialis	26
2.3.	Intraperitoneale Applikation	27
3.	Versuchsaufbau und -durchführung.....	27
3.1.	Chemische Denervation von sympathischen Nervenfasern	28

3.1.1.	Denervation durch systemische Applikation.....	28
3.1.2.	Denervation der Lunge durch lokale Applikation.....	28
3.2.	Probenentnahme für die durchflusszytometrische und histologische Analyse.....	29
4.	Durchflusszytometrie	30
4.1.	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	30
4.2.	Aufbereitung der Organe.....	32
4.3.	Aufbereitung des Blutes	35
5.	Histologische Untersuchung	35
5.1.	Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung.....	35
5.2.	Erstellung der Schnittpräparate	36
5.3.	Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung.....	36
5.3.1.	Verwendete Antikörper	37
5.3.2.	Quantifizierung der Makrophagen - Nerv - Kontakte	38
6.	ELISA	38
6.1.	Prinzip des ELISA.....	38
6.2.	Aufbereitung der Gewebeproben	39
6.3.	Durchführung des ELISA.....	40
6.3.1.	Extraktion und Acetylierung	40
6.3.2.	Enzymatische Umsetzung und Katecholamin - ELISA	40
7.	Statistische Auswertung.....	41
V.	ERGEBNISSE	42
1.	Makrophagen-Nerv-Kontakte.....	42
1.1.	CX3CR1 ⁺ Makrophagen kolokalisieren mit Nervenfasern über verschiedene Organsysteme	42
1.2.	CX3CR1 ⁺ Makrophagen kolokalisieren vor allem mit sympathischen Nervenfasern über verschiedene Organsysteme	45
2.	Einteilung der Makrophagen in eine CX3CR1^{high}MHCII^{high} und CX3CR1^{low}MHCII^{low} - Population	46
3.	Veränderte Zusammensetzung der Makrophagenpopulation nach Denervation.....	50
3.1.	Absinken des Noradrenalinspiegels nach Denervation.....	50

3.2.	Unveränderte Monozytenzahl nach systemischer Denervation	52
3.2.1.	Abnahme von MHCII ^{high} - und Zunahme von MHCII ^{low} - Makrophagen im Herzen	53
3.2.2.	Abnahme von MHCII ^{high} - und Zunahme von MHCII ^{low} - Makrophagen in der Lunge.....	54
3.2.3.	Abnahme von MHCII ^{high} - und Zunahme von MHCII ^{low} - Makrophagen in der Niere.....	56
3.3.	Lokale Denervation der Lunge reproduziert Befunde der systemischen Denervation	57
3.3.1.	Phänotypische Veränderung der MHCII ^{low} - Makrophagenpopulation nach lokaler Denervation.....	61
3.4.	Repolarisierung der MHCII ^{high} - Makrophagen zu MHCII ^{low} - Makrophagen nach sympathischer Denervation	63
VI.	DISKUSSION	68
1.	Makrophagen bilden Kontakte mit sympathischen Nervenfasern.....	68
2.	Einteilung der Makrophagen in eine CX3CR1^{high}MHCII^{high} und CX3CR1^{low}MHCII^{low} – Population.....	70
3.	Veränderte Zusammensetzung der Makrophagenpopulation nach Denervation.....	71
3.1.	Kommunikation zwischen Sympathikus und Makrophagen.....	73
3.2.	Auswirkungen einer erhöhten Sympathikusaktivität auf den Makrophagenphänotyp.....	73
3.3.	Lokale Denervation der Lunge reproduziert Befunde der systemischen Denervation	74
4.	Repolarisierung der MHCII^{high} - Makrophagen zu MHCII^{low} - Makrophagen nach sympathischer Denervation	75
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	77
VIII.	SUMMARY.....	78
IX.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	79
X.	TABELLENVERZEICHNIS.....	82
XI.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	83
XII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	85

XIII.	DANKSAGUNG	99
--------------	-------------------------	-----------

I. EINLEITUNG

Der Begriff „Makrophagen“ und deren Fähigkeit zu phagozytieren, wurde erstmals von Elie Metchnikoff, dem Nobelpreisgewinner für „Physiologie oder Medizin“ von 1908, im späten 19. Jahrhundert beschrieben. Er beobachtete bei einem Experiment mit Seesternlarven, in die er einen Rosendorn gesteckt hatte, amöboide Fresszellen um den Dorn und erkannte damit die Relevanz der Phagozytose im Entzündungsgeschehen. Inzwischen wurde nachgewiesen, dass Makrophagen sowohl gewebespezifische als auch nischenspezifische Funktionen erfüllen und unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu zahlreichen Prozessen, wie der Entwicklung und Reparatur des Gewebes sowie der Aufrechterhaltung des Gewebegleichgewichts, aber auch zu Entzündungsgeschehnissen und der Immunantwort nach Eindringen von Pathogenen, beitragen [1-4].

Welche Aufgaben Makrophagen letztendlich übernehmen, hängt von vielen Faktoren ab, wie beispielsweise ihrem Zellursprung und ihrer Gewebelokalisation. Durch die Fähigkeit, ihren Stoffwechsel anzupassen und damit auf verschiedene Umweltreize zu reagieren, übernehmen Makrophagen nicht nur zahlreiche Funktionen, sondern unterscheiden sich zudem in ihrer Heterogenität [5]. Zu finden sind Makrophagen unter anderem im Knochen, im Knochenmark, in der Lunge, in der Leber, in der Milz, im Gehirn, in der Haut, im Darm, im Peritoneum, in verschiedenen endokrinen Drüsen, im Herzen und vielen weiteren Geweben, in denen sie als „Wächter“ die Gewebemöostase gewährleisten und damit zum Schutz des Gewebes beitragen sollen [6, 7].

Verschiedene Makrophagenuntergruppen assoziieren in unterschiedlichen Geweben mit peripheren Nerven. Im Darm liegen sie in der Nähe von Ganglien des Plexus myentericus, in der Haut haben Makrophagen engen Kontakt zu sensiblen Nervenfasern, im Fett und dem Herzen sind sie mit sympathischen Nervenfasern assoziiert und selbst im Endo- und Epineurium des Ischiasnervs sind Makrophagen lokalisiert [8]. In einer Arbeit von Chelmicka-Schorr und Kollegen konnte dargestellt werden, dass die Interaktion zwischen Makrophagen und sympathischen Nervenfasern Auswirkungen auf die funktionelle Aktivität der Makrophagen hat. Durch sympathische Denervation verdoppelte sich die Zytokinproduktion der Makrophagen, wohingegen Makrophagen, die *in vitro* mit β 2-Agonisten inkubiert und anschließend mit LPS

stimuliert wurden, deutlich geringere TNF- α – Mengen produzierten [9]. Bislang ist die Datenlage zu Nerv-assoziierten Makrophagen eher mangelhaft [8]. Daher soll in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der sympathischen Innervation auf den Makrophagenphänotypen näher beleuchtet werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Makrophagen

1.1. Ursprung und Entwicklung von Makrophagen

Makrophagen sind Immunzellen mit einem sehr heterogenen Phänotyp, die zum angeborenen Immunsystem zählen und im ganzen Körper verteilt sind [1, 2]. Der wissenschaftliche Konsens war lange Zeit, dass Makrophagen ausschließlich durch zirkulierende Monozyten aus dem Knochenmark entstehen. Dies konnte allerdings durch neue Studien, die die zelluläre Entwicklung untersuchen, widerlegt werden [10, 11]. Es konnte gezeigt werden, dass während der Embryonalentwicklung entstandene Dottersackmakrophagen die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu erneuern und ohne monozytären Einfluss zu erhalten. Weiterhin wird angenommen, dass embryonal entstandene Makrophagen entscheidende Funktionen beim Gewebeumbau, zum Beispiel die Angiogenese nach Myokardinfarkt, übernehmen und im Vergleich zu adulten, aus Monozyten differenzierten Makrophagen ein geringeres Potenzial besitzen, Entzündungsreaktionen hervorzurufen [11, 12]. In der Literatur findet man drei Makrophagen-Vorläufer, die während der Embryonalentwicklung phasenweise gebildet werden. Zunächst entstehen ohne monozytäres Zwischenstadium an Tag 8,5 - 9,0 der Embryonalentwicklung der Maus, die im Dottersack aus frühen erythro-myeloiden Vorläufern gebildeten Dottersackmakrophagen [13]. Dies bezeichnet man auch als „frühe“ oder „primitive Hämatopoese“. Danach folgt an Tag 10,0 - 10,5 der Embryonalentwicklung die „definitive Hämatopoese“. Dabei entwickeln sich Vorläuferzellen von hämatopoetischen Stammzellen in der Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region und besiedeln, zusammen mit Makrophagen-Vorläuferzellen aus dem Dottersack, die fetale Leber [14, 15]. Hier entwickeln sich bis mindestens Tag 16 der Embryonalentwicklung alle hämatopoetischen Linien, die zur endgültigen hämatopoetischen Stammzellpopulation beitragen, bevor Milz und Knochenmark über das Kreislaufsystem von dieser Population besiedelt werden [16-18]. Im adulten Tier bildet das Knochenmark den Hauptort der Hämatopoese, wobei angenommen wird, dass sich die Milz und die Leber unter pathologischen Bedingungen daran beteiligen können [19-21]. Anhand von Transkriptionsfaktoren können Makrophagen aus dem Dottersack von hämatopoetischen Stammzellen unterschieden werden. Dabei ist die Entwicklung

der hämatopoetischen Stammzellen c-Myb abhängig. Dottersackmakrophagen hingegen entwickeln sich in Abhängigkeit von PU.1 [15, 18, 22].

Durch Versuche von Schulz *et. al.* konnte gezeigt werden, dass zu Beginn der Embryonalentwicklung viele PU.1 - abhängige CD45⁺CX3CR1^{bright}F4/80^{bright} - Dottersackmakrophagen im Blut zirkulieren und ausgehend vom Kopfbereich den gesamten Embryo besiedeln. Mit Beginn der fetalen Leber - Hämatopoese tritt eine neue Form der CD45⁺CX3CR1^{bright} - Zellen auf. Diese ist c-Myb - abhängig und exprimiert im Vergleich zu den vom Dottersack abstammenden Makrophagen nur noch wenig F4/80, dafür aber stark CD11b [22]. Mit Hilfe von verschiedenen *Fate Mapping* - Versuchen wurde nachgewiesen, dass Makrophagen der Leber, Lunge, Bauchspeicheldrüse, Niere, Milz sowie Langerhans-Zellen der Haut und Mikroglia des Gehirns ursprünglich von Dottersackmakrophagen abstammen [16, 22]. In vielen Fällen erhalten sich diese Makrophagen, unabhängig von Monozyten aus dem Knochenmark, selbst durch lokale Proliferation. Teilweise findet aber auch ein monozytärer Austausch der Makrophagen statt, wobei die Umsatzrate abhängig vom jeweiligen Organ ist [10]. Zwei sehr unterschiedliche Organe sind in diesem Zusammenhang das Gehirn und der Darm [23, 24]. Die Mikroglia des Gehirns werden beispielsweise nur minimal durch hämatopoetische Stammzellen ersetzt, wie ein Versuch mit Chimären zeigen konnte. Dabei wurden C57BL/6 CD45.2⁺ Mäuse (Wirtstiere) mit einer sublethalen Dosis bestrahlt, und erhielten anschließend hämatopoetische Zellen von CD45.1⁺ Mäusen (Spendertiere). Obwohl man drei Monate nach der Zelltransplantation im Wirtstier mehr als 30 % der zirkulierenden Leukozyten sowie Gewebemakrophagen mit einem CD45.1⁺ Ursprung fand, stammten zu diesem Zeitpunkt die Mikroglia des Gehirns zu 95 % vom Wirtstier selbst ab. Daraus lässt sich schließen, dass sich die Mikroglia des Gehirns fast ausschließlich selbst erneuern und der Beitrag von Monozyten zum Erhalt dieser Makrophagen nur eine minimale Rolle spielt [25]. Im Gegensatz dazu werden im Darm die meisten vom Dottersack abstammenden Makrophagen sehr schnell und konstant durch aus dem Knochenmark stammende Monozyten ersetzt [26-28].

Auch im Tumormodell konnte durch Zhu *et. al.* gezeigt werden, dass die Entwicklung und der Ursprung von Makrophagen von wesentlicher Bedeutung sind. Zum Beispiel übernehmen bei Bauchspeicheldrüsenkrebs monozytär abstammende Makrophagen eher immunogene Funktionen und beteiligen sich bei der Antigenpräsentation, wo hingegen embryonal aus dem Dottersack entstandene Makrophagen fibrosefördernd sind [29]. Es lässt sich also zusammenfassen, dass Gewebemakrophagen abhängig vom

Organ, ihren Ursprung sowohl im Dottersack, der fetalen Leber oder dem Knochenmark haben können (Abb. 1) [12, 13, 30]. Wie groß der Beitrag von Monozyten zu diesen gewebsresidenten Makrophagen ist, wird allerdings immer noch kontrovers diskutiert [31].

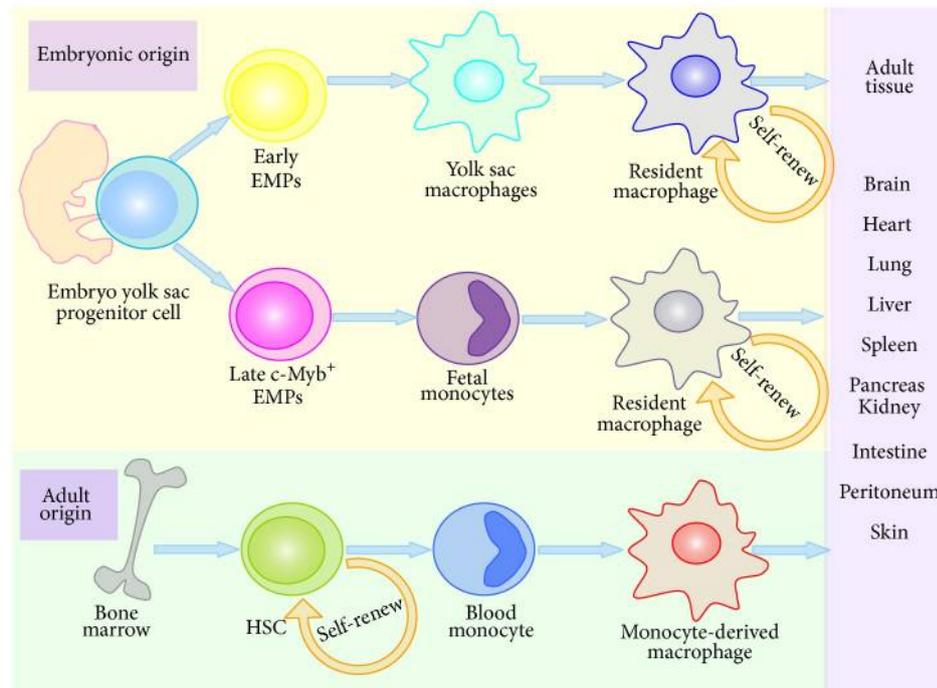


Abbildung 1: Ursprung und Selbsterneuerung von Makrophagen [32]

Aus „Double Roles of Macrophages in Human Neuroimmune Diseases and Their Animal Models“, Xueli Fan et. al., 2016. Copyright © 2016

Es konnten keine Einträge für ein Abbildungsverzeichnis gefunden werden.

1.2. Funktion der Makrophagen

Eine entscheidende Rolle spielen Makrophagen sowohl bei der Immunabwehr, als auch bei der Aufrechterhaltung der Homöostase im Gewebe durch die Entfernung apoptotischer Zellen sowie der Wiederherstellung der Gewebeintegrität [33]. Lange Zeit hat man sich vor allem damit beschäftigt, zu verstehen, wie diese Zellen an der Immunabwehr beteiligt sind und so die bedeutende Rolle der Makrophagen in der Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase unter physiologischen Bedingungen außer Acht gelassen [34]. Dabei ist diese Funktion der Makrophagen von hoher Relevanz. Findet die Wiederherstellung des Gewebes geordnet und kontrolliert statt, kann eine Entzündungsreaktion schnell aufgelöst werden, wodurch das Gewebe wieder seiner

physiologischen Funktion nachgehen kann. Verläuft ein Entzündungsprozess allerdings chronisch bzw. läuft die Wundheilung unkontrolliert ab, kann es zur Entstehung von schädlichen Fibrosen kommen, die die Organfunktion derart beeinträchtigen, dass es zum Organversagen mit anschließendem Tod kommt [35-37]. Neben der Beseitigung von Pathogenen, Zelldebris oder toten Zellen durch Phagozytose, was zur Aufrechterhaltung der Homöostase beiträgt, produzieren sie verschiedene pro- und anti-inflammatorische Zytokine und haben zudem eine antigenpräsentierende Funktion, indem sie Teile von phagozytierten Molekülen mit Hilfe des Haupthistokompatibilitätskomplexes Typ II (MHC) auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Darüber hinaus besitzen sie die Fähigkeit, ihren Phänotyp und ihre Funktionen an Umwelteinflüsse und Veränderungen in der Gewebephysiologie anzupassen [11, 30]. Man unterscheidet zwischen den klassisch aktivierten M1-Makrophagen und den alternativ aktivierten M2-Makrophagen (Abb. 2) [38-40].

Die Aktivierung der M1-Makrophagen erfolgt klassischerweise durch IFN- γ , TNF- α oder durch Bestandteile der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien (Lipopolysaccharide). Das induziert die Expression und Sekretion hoher Spiegel an entzündungsfördernden Zytokinen (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, COX-2 und TNF- α) und toxischer Zwischenprodukte, wie Stickoxide (NO) und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie proteolytischer Enzyme (MMP-1, -2, -7, -9, -12). Andererseits werden niedrigere Spiegel des anti-inflammatorischen IL-10 exprimiert und sezerniert [11, 41-44]. Damit, und durch ihre ausgeprägte Fähigkeit, Antigene zu präsentieren, sind M1-Makrophagen bei entsprechender Aktivierung nicht nur essenzielle Zellen, um Pathogene abzuwehren und das adaptive Immunsystem vorzubereiten und zu aktivieren, sondern können aufgrund ihrer zytotoxischen Aktivität gleichzeitig auch massive Schäden im Gewebe hervorrufen, wodurch der Heilungsprozess und die Geweberegeneration gestört werden [11, 45, 46]. Um solchen Gewebeschäden entgegenzuwirken, regulieren M2-Makrophagen die Entzündungsreaktion durch die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine, nachdem sie durch Zytokine der Th2-Zellen über den alternativen Weg aktiviert wurden [11, 47]. Abhängig davon, auf welchem Weg die M2-Makrophagen aktiviert werden, können sie noch weiter in M2a, M2b und M2c unterteilt werden (Abb. 2) [33, 43]. Dabei wird M2a durch IL-4 und IL-13 aktiviert, M2b durch Immunkomplexe in Verbindung mit IL-1 β und LPS, und M2c durch IL-10, TGF- β und Glukokortikoide aktiviert [48].

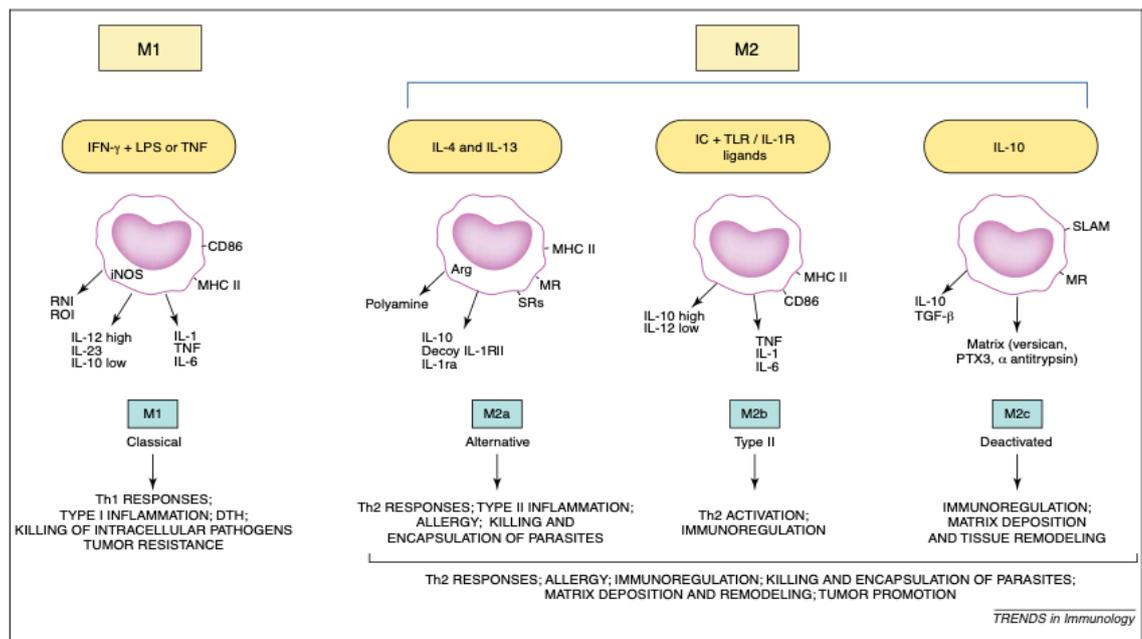


Abbildung 2: Verschieden aktivierte Makrophagen und ihre funktionellen Eigenschaften [43]

Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier, Copyright © 2004

Im Unterschied zu M1-Makrophagen produzieren M2-Makrophagen, mit Ausnahme von M2b-Makrophagen, vor allem entzündungshemmende Zytokine wie IL-10 und IL-1-Rezeptorantagonisten, aber nur geringe Mengen an entzündungsförderndem IL-1, IL-6 und TNF- α . Hingegen produzieren M2b-Makrophagen, die durch LPS oder Immunkomplexe aktiviert werden, neben hohen Spiegeln an IL-10 zur gleichen Zeit auch proinflammatorische Zytokine, was sie dadurch von anderen M2-Makrophagen unterscheidet [43, 49]. Entsprechend der jeweiligen Zytokin- und Chemokinsekretion beteiligen sich die M2-Makrophagen auch in unterschiedlichem Maße am Gewebeumbau und der Angiogenese, der Entzündungshemmung, der Tumorentstehung oder der Beseitigung von Parasiten [50].

Die Unterscheidung zwischen M1- und M2-Makrophagen wurde ursprünglich eingeführt, um die Th1- und Th2-Nomenklatur widerzuspiegeln. Inzwischen ist allerdings bekannt, dass dies eine sehr vereinfachte Darstellung ist, da die beiden Arten der Makrophagenaktivierung lediglich die Enden eines kontinuierlichen Spektrums darstellen [51, 52].

Letztendlich ist entscheidend, dass die inflammatorische und die anti-inflammatorische Aktivität der Makrophagen ausgeglichen ist, da eine Imbalance oft in verschiedenen Krankheiten oder chronischen Entzündungen resultiert [53, 54].

1.3. Oberflächenmoleküle von Makrophagen

Makrophagen werden anhand ihrer Oberflächenmoleküle charakterisiert, auf die im Folgenden näher eingegangen wird:

CD45, auch als „leukocyte common antigen“ bezeichnet, ist eine Transmembran-Protein-Tyrosinphosphatase. Diese wird mit Ausnahme von Erythrozyten und Thrombozyten auf allen Leukozyten sowie deren hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert [55-57]. Eine wesentliche Rolle spielt CD45 sowohl bei der Aktivierung von Immunzellen, als auch bei der Entwicklung von Lymphozyten [58]. Zudem ist das Oberflächenmolekül auf Makrophagen für eine normale Zellmorphologie und eine ungestörte Beweglichkeit wichtig [59]. Auch in immunologischen Versuchen ist CD45 von Bedeutung. Anhand der allelischen Varianten von CD45 (CD45.1 und CD45.2) können hämatopoetische Zellen durchflusszytometrisch differenziert werden.

Dadurch lassen sich Populationen von Immunzellen, die beispielsweise genetisch verändert und einem Wirtstier in Form einer Knochenmarktransplantation appliziert wurden, identifizieren und so deren Beteiligung an verschiedenen Prozessen im Körper nachvollziehen [60].

CD11b ist die α M-Untereinheit des α M β 2-Moleküls, und bildet zusammen mit CD18 den Oberflächenrezeptor Integrin CD11b/CD18, der auch als Makrophagen-1-Antigen (Mac-1) oder Komplementrezeptor 3 (CR3) bekannt ist. Exprimiert wird CD11b von Zellen des angeborenen Immunsystems, darunter Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten, $\gamma\delta$ T-Zellen und natürliche Killerzellen [61-63]. Zu den Aufgaben des Oberflächenrezeptors zählt die Vermittlung der Adhäsion, Migration, Chemotaxis und Rekrutierung von Makrophagen während eines entzündlichen Prozesses. Des Weiteren konnten Schmid *et. al.* zeigen, dass das Makrophagen-Integrin CD11b proinflammatorische Immunantworten reguliert und damit das Tumorwachstum unterdrücken kann [64]. Bei durchflusszytometrischen Analysen ist CD11b zudem ein guter Marker, um beispielsweise interstitielle Makrophagen in der Lunge, die eine hohe Expression von CD11b aufweisen, von Alveolarmakrophagen, die kein CD11b exprimieren, zu unterscheiden [65].

F4/80 ist ein Glykoprotein auf Mausmakrophagen und spielt eine wesentliche Rolle bei der adaptiven Immunantwort. So konnten Lin *et. al.* zeigen, dass F4/80 indirekt an der Unterdrückung der antigenspezifischen Immunantwort beteiligt ist, indem es den Prozess zur Bildung antigenspezifischer regulatorischer T-Zellen (Treg) vermittelt [66].

Das F4/80-Molekül besteht extrazellulär aus einer Region mit sieben EGF-ähnlichen (epidermal growth factor-like) Wiederholungen, die über einen sogenannten „300-Aminosäure-Spacer“ an eine 7-Transmembran-Domäne gebunden ist. Somit gehört F4/80 als Mitglied der EGF-Transmembran 7 (TM7)-Familie auch zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [67, 68]. 1981 konnte erstmals ein Antikörper, der gegen F4/80 gerichtet war, durch Austyn und Gordon beschrieben werden. Da dieser an Makrophagen aus dem Peritoneum, der Lunge, der Milz sowie an Monozyten und Vorläuferzellen von Makrophagen bindet, nicht aber an polymorphkernige Leukozyten, Lymphozyten oder Fibroblasten, bezeichneten sie den Antikörper als „einzigartigen Marker für Mausmakrophagen“ [69]. Im Verlauf konnte allerdings gezeigt werden, dass F4/80 auch von Langerhans-Zellen und eosinophilen Granulozyten exprimiert wird. Aus diesem Grund und weil die F4/80-Expression der Makrophagen in verschiedenen Organen unterschiedlich stark ausfällt und zum Teil nur gering oder gar nicht vorhanden ist, ist es ratsam, zusätzliche Antikörper zu verwenden, um Makrophagen eindeutig identifizieren zu können [70-72].

CD64, auch bekannt als Fc γ RI (Fc gamma Rezeptor 1), wird auf Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert [73, 74]. Er ist zusammengesetzt aus einer α -Kette, woran die Immunkomplexe binden, und einer FcR- γ -Kette und wird nach Stimulation mit IFN- γ vermehrt exprimiert [75, 76]. Eine Besonderheit des Fc γ RI ist die hohe Bindungsaffinität zu seinem Liganden, dem IgG-Antikörper, die in dieser Form einmalig für die Fc γ R-Familie ist [75, 77]. Zudem ist er der einzige IgG Fc-Rezeptor, der als Monomer vorliegendes IgG binden kann [74, 77]. Die genaue Funktion bzw. der Einfluss des Fc γ RI während einer Immunantwort ist noch nicht geklärt. Allerdings konnten Ioan-Facsinay *et. al.* zeigen, dass das Fehlen des Fc γ RI negative Auswirkungen auf die Phagozytose, die Antigenpräsentation, die Sekretion von Zytokinen und die zytotoxische Wirkung hat [75, 78].

Mertk ist ein Rezeptor, der auf Makrophagen exprimiert wird und zur Familie der TAM-Rezeptoren (Tyro3-Axl-Mer) gehört. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Protein-Tyrosin-Kinasen, die die sogenannte Efferozytose vermitteln, also die Phagozytose von apoptotischen Zellen [79-81]. Über Protein S und Gas6, die als molekulare Bindeglieder dienen, kann Phosphatidylserin, das auf der Zelloberfläche von apoptotischen Zellen exprimiert wird und ein starkes „eat-me“-Signal darstellt, an Mertk auf den Makrophagen binden [82, 83]. Durch die Ligandenbindung wird der im Ruhezustand größtenteils inaktive Rezeptor, der dann nur eine niedrige intrazelluläre

Tyrosinkinaseaktivität aufweist, aktiviert, wodurch es zur Aufnahme von apoptotischen Zellen, zur Hemmung von Entzündungsreaktionen durch gehemmte Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und zur Wiederherstellung des Gewebes kommt [79, 81, 84]. Aufgrund von Proteinexpressionsanalysen empfehlen Gautier *et. al.* sowohl Mertk, als auch den zuvor beschriebenen FcγRI als Marker für die Identifizierung von Gewebemakrophagen zu verwenden [85].

CD11c, das gebunden an CD18, auch als $\alpha X\beta 2$, p150.95 oder Komplementrezeptor 4 (CR4) bezeichnet wird, wird von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen und teilweise von aktivierten B- und T-Zellen exprimiert [63, 86]. Wie auch CD11b/CD18 gehört CD11c/CD18 zur $\beta 2$ -Leukozytenintegrinfamilie CD11/CD18, die unter anderem zur Zelladhäsion, Migration und Phagozytose beitragen und Signale über die Plasmamembran, sowohl von außen nach innen als auch umgekehrt, sendet [87, 88]. Wu *et. al.* konnten zeigen, dass CD11c eine entscheidende Rolle in der Atherogenese spielt, da CD11c^{+/+}ApoE^{-/-} Mäuse nach 12 Wochen hochkalorischer Diät im Vergleich zu CD11c^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen größere atherosklerotische Plaques mit einer höheren Makrophagenansammlung in der Aorta aufwiesen [89]. Des Weiteren könnte die Bindung von ICAM-4 auf Erythrozyten an CD11c/CD18 auf Milzmakrophagen entscheidend für die Entfernung von Erythrozyten aus dem Blutkreislauf sein [90]. Bei durchflusszytometrischen Analysen von Lungengewebe ist CD11c, das gegen CD11b aufgetragen wird, ein guter Marker, um die Population der Alveolarmakrophagen zu bestimmen [65].

MHC wird, aufgrund seiner Relevanz für diese Doktorarbeit, im nachfolgenden Kapitel gesondert aufgeführt.

2. Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

Der „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) ist ein Genabschnitt auf der DNA, der Proteine codiert, die als wichtige Bestandteile des adaptiven Immunsystems entscheidende Funktionen in der adaptiven Immunantwort übernehmen. Da alle diese Gene bei Mensch und Maus ähnlich sind und gebündelt in einer Region auf der DNA liegen, spricht man von (Haupthistokompatibilitäts-) Komplex [91, 92]. Entstanden ist der MHC vor mehr als 550 Millionen Jahren, als es die ersten Wirbeltiere mit Kieferknochen gab.

Die bei der Maus als H-2 bezeichnete MHC-Region, wird beim Menschen „Humanes Leukozyten-Antigen“ (HLA) genannt und ist auf dem kurzen Arm des 6. Chromosoms zu finden [93]. Mit mehr als 26.000 Allelen auf 39 unterschiedlichen Genen, ist die MHC-Region eine der Regionen, mit der größten Gendichte im menschlichen Genom [92]. Zusätzlich zeigen einige der MHC-Gene auch ein breites Spektrum an allelischen Variationen. Dies ist aber eher eine Seltenheit, da ein Allel, das einen Vorteil gegenüber anderen hat bzw. gleichwertig ist, in einem endlichen Zeitraum, normalerweise durch natürliche Selektion oder zufällig in einer Population fixiert wird oder aber verschwindet [91, 94]. Durch die sogenannte „ausgleichende Selektion“ ist aber dennoch ein Polymorphismus, wie es ihn beim MHC gibt, möglich [91, 95]. Man geht davon aus, dass ein Wettlauf auf molekularer Ebene zwischen dem Immunsystem und Krankheitserregern der Grund für die hohe MHC-Varianz ist. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass eine Vielzahl von Mikroorganismen bestimmte Proteine herstellt, wodurch die Antigenpräsentation gehemmt wird. Je nachdem welche MHC-Allel-Form vorliegt, ist der Körper dann entsprechend anfälliger oder weniger empfänglich für Infektionskrankheiten. Es wurden aber auch andere Mechanismen als Ursache für die extreme MHC-Varianz diskutiert, da es nur wenige Hinweise gibt, die dies direkt beweisen [96, 97]. Unabhängig davon, durch was der Polymorphismus in den MHC-Genen begünstigt wird, werden dessen Auswirkungen sowohl im Bereich der Autoimmun- und Infektionskrankheiten, für die bei manchen Individuen eine Prädisposition besteht, als auch bei Transplantationen deutlich. Passen die Allele von Spender und Empfänger nicht zusammen, kann das transplantierte Organ oder Gewebe abgestoßen werden [93, 98]. Obwohl die Abstoßungsreaktion bei Transplantationen eine höchst unerwünschte Komplikation darstellt, ist es schlichtweg eine natürliche Reaktion des Körpers, da dem Immunsystem Fremdantigene präsentiert werden, die es zu bekämpfen gilt [99]. Schon George Snell fand bei Transplantationsversuchen heraus, dass nicht kompatible Antigene der Grund für die Gewebeabstoßung bei Mäusen waren. Vorausgegangen waren Versuche von Peter Gorer, der beobachtet hatte, dass Mäuseerythrozyten durch Immunsereen von Kaninchen anfangen zu verklumpen, wodurch erstmals ein Histokompatibilitätssystem beschrieben werden konnte [100-103].

Abhängig von Funktion und Lokalisation wird die MHC-Region in drei Klassen eingeteilt: MHC-Klasse-I, II und III. Die Gene der MHC-Klasse-I und II enthalten Informationen, die die Antigenpräsentation und generell das adaptive Immunsystem

betreffen. Die MHC-Klasse-III ist auf der DNA zwischen den anderen beiden Regionen lokalisiert und codiert für Proteine, die vor allem mit der angeborenen Immunantwort, der Aktivierung des Komplementsystems sowie Regulationsmechanismen des Immunsystems zusammenhängen [92, 104]. Hauptmerkmal des MHC sind zwei Glykoproteinmoleküle, womit er den T-Zellen Bestandteile von Antigenen aus intra- und extrazellulären Bereichen präsentieren kann [104]. Damit sind die MHC-Moleküle der Klassen I und II entscheidend für eine spezifische Antigenpräsentation [105].

2.1. MHC-Klasse-II

Moleküle der MHC-Klasse-II sind, wie auch MHC-Klasse-I-Moleküle, Heterodimere, die aus zwei Transmembran-Untereinheiten, der α - und β -Kette, zusammengesetzt sind. Die genetische Information für die Ketten ist beim Menschen auf den Genen HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP zu finden [92, 106]. Im endoplasmatischen Retikulum werden die α - und β -Kette mit einem integralen Typ-II Membranglykoprotein, das als invariante Kette (Ii) bezeichnet wird, gekoppelt. Dadurch wird der Komplex stabilisiert und es wird zudem verhindert, dass vorzeitig Peptide im endoplasmatischen Retikulum an die MHC-Klasse-II-Peptidbindungsfurche binden. Die Expression der MHC-Klasse-II-Moleküle ist, im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Molekülen, die von allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, auf professionelle Antigen-präsentierenden-Zellen (APC), wie Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen, beschränkt [107-109]. Damit diese Zellen phagozytierte Fremdantigene auf ihrer Zelloberfläche exprimieren können, sind verschiedene Schritte nötig. Nach Verlassen des endoplasmatischen Retikulums, durchquert der $\alpha\beta$ -Ii-Komplex den Golgi-Komplex sowie das trans-Golgi-Netzwerk (TGN), um anschließend in ein lysosomenähnliches Antigen-verarbeitendes Kompartiment (MIIC) transportiert zu werden [108, 110]. In der Literatur werden neben dem direkten Weg in das MIIC noch zwei indirekte Wege diskutiert, die über die Plasmamembran und/oder Endosomen führen. Obwohl es zu den Wegen viele widersprüchliche Daten gibt, sind Hiltbold und Roche der Meinung, dass alle Wege ihre Gültigkeit haben, wobei es abhängig von der Antigen-präsentierenden Zelle ist, in welchem Maß der eine oder andere Weg genutzt wird [111]. Im MIIC wird die invariante Kette (Ii) bis auf ein kleines Fragment (CLIP), das in der Peptidbindungsfurche verbleibt, durch Cystein- und Asparaginproteasen verdaut. Mithilfe eines speziellen HLA-DM-Chaperon wird das CLIP-Fragment durch ein Peptid ersetzt, das von einem zuvor endosomal abgebauten Fremdantigen stammt. Anschließend wird das MHC-Klasse-II-Molekül, beladen mit dem Peptid des

Fremdantigens, an die Zelloberfläche gebracht (Abb. 3) [107, 112]. Durch die Bindung des präsentierten MHC-Klasse-II-Moleküls an Rezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen, werden diese aktiviert und es kommt zur Vermittlung der Immunantwort, wie beispielsweise die Vermehrung von T-Zellen, die Bildung von Antikörpern oder die Entwicklung von Gedächtniszellen. All dies soll letztendlich dazu führen, dass ein Pathogen aus dem Körper beseitigt wird [108].

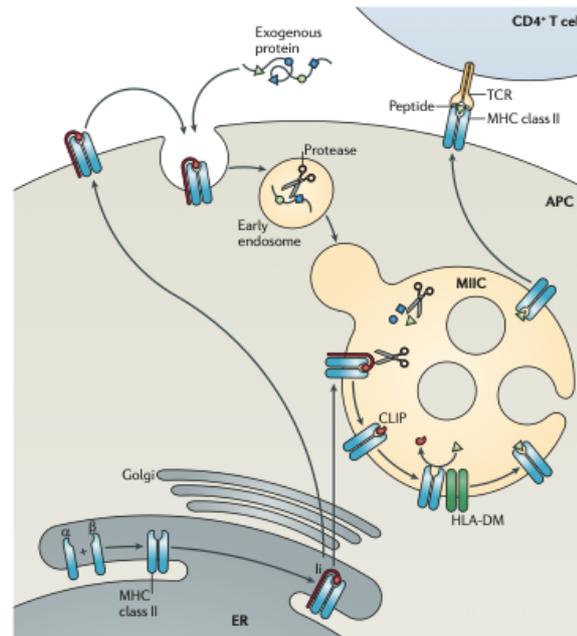


Abbildung 3: Der klassische Weg der MHC-Klasse-II - Antigenpräsentation [107]

Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature, Copyright © 2011

2.2. Nischenspezifische MHC-Klasse-II - Expression

Dass die Menge der exprimierten MHC-Klasse-II - Moleküle auf Makrophagen abhängig von der anatomischen und nischenspezifischen Lage im Gewebe ist, konnten Chakarov *et. al.* zeigen. Sie beschrieben erstmals im Interstitium zwei eigenständige und voneinander unabhängige Makrophagenpopulationen „mit spezifischem, nischenabhängigem Phänotyp und funktioneller Programmierung“. LYVE1^{high}MHCII^{low}CX3CR1^{low} - Makrophagen, die oft mit Blutgefäßen assoziiert sind, exprimieren vor allem Lyve1 (endothelialer Hyaluronsäurerezeptor 1 der Lymphgefäße) und wenig MHCII- und CX3CR1-Moleküle. Die andere Makrophagenpopulation, LYVE1^{low}MHCII^{high}CX3CR1^{high}, ist hauptsächlich um Nerven lokalisiert und exprimiert genau umgekehrt wenig Lyve1, aber dafür viel

MHCII und CX3CR1 (Abb. 4). Mit Hilfe von RNA-Sequenzierung konnten diese beiden Makrophagenuntergruppen zunächst in den interstitiellen Makrophagen der Lunge beschrieben werden, wobei anschließend ähnliche Populationen auch im Herzen, Fettgewebe und der Haut charakterisiert wurden. Funktionell unterscheiden sich beide Populationen dahingehend, dass $LYVE1^{high}MHCII^{low}CX3CR1^{low}$ - Makrophagen signifikant mehr Interleukin-10 produzieren und in ihnen Gene hochreguliert sind, die vermehrt mit dem Gewebeumbau und der Wundheilung assoziiert sind. $LYVE1^{low}MHCII^{high}CX3CR1^{high}$ - Makrophagen hingegen fördern vermehrt die Proliferation der $CD4^{+}$ T-Zellen sowie die Differenzierung der regulatorischen T-Zellen (Treg) und haben eine größere Bedeutung in der Antigenpräsentation. Anhand dieser Publikation wird deutlich, dass Makrophagen ihren Phänotypen und ihre Funktion entsprechend ihrer nischenspezifischen Lage anpassen [113].

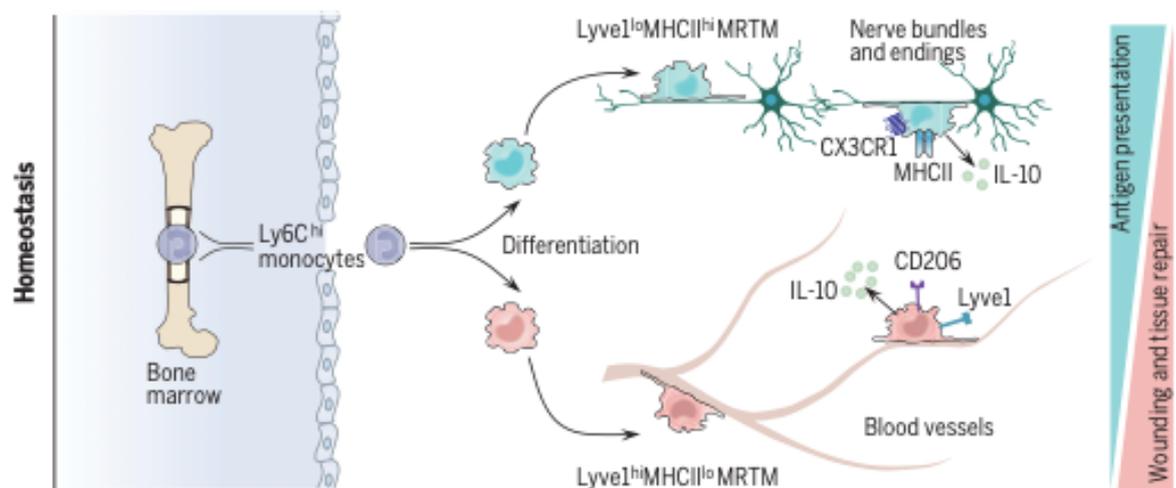


Abbildung 4: Zwei voneinander unabhängige Makrophagenpopulationen mit nischenspezifischem Phänotyp [113]

Aus "Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches, Chakarov et. al., 2019. Reprinted with permission from AAAS". Copyright © 2019

3. Interaktionen zwischen Nerven und Immunzellen

3.1. Nerv-assoziierte Makrophagen

Die Assoziation zwischen Makrophagen und Nerven wurde schon vor mehr als 40 Jahren beschrieben. Dennoch gibt es bis jetzt wenig Daten dazu, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass Nerv-assoziierte Makrophagen im Vergleich zu anderen Gewebemakrophagen deutlich seltener vorkommen [8].

1977 konnte gezeigt werden, dass sich Meerrettichperoxidase, die intravenös in die Oberschenkelvene oder lokal auf den Ischiasnerv geträufelt wurde, schnell in epi- und endoneuralen Zellen anreicherte. Diese phagozytierenden, Peroxidaseakkumulierenden Zellen wiesen strukturelle Merkmale von Makrophagen auf [114]. Drei Jahre später wurde mithilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen, der Anteil der Makrophagen innerhalb eines peripheren Nervs bestimmt. Makrophagen machten ca. 2 - 4 % der endoneuralen Zellen aus [115]. Teilweise findet man aber auch Angaben, dass die zelluläre Komponente eines peripheren Nervs bis zu 9 % aus Makrophagen bestehen soll [116]. Eine genauere Charakterisierung der epi- und endoneuralen Makrophagenpopulation führten Ydens *et. al.* durch. Mithilfe von Einzelzellsequenzierung, durchflusszytometrischen Analysen und Konfokalmikroskopie, konnten sie $\text{Relm}\alpha^+\text{Mgl1}^+$ Makrophagen im Epineurium und $\text{Relm}\alpha^-\text{Mgl1}^-$ Makrophagen im Endoneurium des Ischiasnervs identifizieren [117]. Makrophagen finden sich aber nicht nur innerhalb eines Nervs, sondern überwiegend auch als langgezogene, oft verzweigte Zellen auf einem Nerv, die sich entlang dessen Längsachse ausrichten [118]. Dabei können sie neben der Phagozytose von Axon- und Myelinresten, durch die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auch einen entscheidenden Beitrag zur Regeneration von Nervenfasern leisten [119]. So konnten Stolz und Kollegen *in vitro* zeigen, dass Makrophagen, die eng am wachsenden Ende eines Motoneurons lokalisiert waren, die Verlängerung der Motoneuronfortsätze steuerten [120]. Auch in der Haut konnte nach mechanischer Verletzung *in vivo* nachgewiesen werden, dass $\text{CX3CR1}^{\text{high}}$ - Makrophagen zum Einsprießen von sensiblen axonalen Dendriten beitrugen und Myelinreste von geschädigten Nervenfasern abbauten. Des Weiteren zeigten $\text{CX3CR1}^{\text{high}}$ - Makrophagen im physiologischen Zustand eine große Dynamik entlang sensibler Nervenfasern. Das Ausfahren und Einziehen ihrer bis zu 200 μm langen Fortsätze und das Entlangwandern auf sensiblen axonalen Dendriten, wies auf ein Abtasten des Nervs hin [121]. Weitere Assoziationen zwischen CX3CR1^+ MHCII^+ Makrophagen und sensiblen Nervenfasern, wurden in der Cornea beobachtet, wobei die Anzahl der Kontakte vom inneren, zentralen Hornhautbereich bis zum peripheren Hornhautstroma deutlich zunahm [122]. In der Lunge wurde eine Untergruppe von interstitiellen CD169^+ - Makrophagen charakterisiert, die um Atemwege lokalisiert waren und eng mit sympathischen Nervenfasern assoziierten. Im Gegensatz zu den großen, runden Alveolarmakrophagen, wiesen sie eine längliche Form mit dendritischen Fortsätzen auf. Es wurde zudem gezeigt, dass diese Nerv-assoziierten

Makrophagen nach einer Influenzavirusinfektion aktiv proliferierten und vermehrt IL-10 produzierten, weshalb ihnen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von entzündlichen Geschehen zugeschrieben wird [123]. Auch in der Darmmuskulatur sind Makrophagen dicht mit Nerven des Plexus myentericus assoziiert [124, 125]. Es wurde nachgewiesen, dass Makrophagen durch die Sekretion von BMP2 (Bone morphogenetic protein 2), das auf enterische Neurone wirkt, die Kontraktionsmuster der glatten Muskulatur im Kolon regulieren können [126].

Dass Makrophagen nicht nur mit Nerven assoziiert sind, sondern darüber hinaus zur noradrenergen Homöostase beitragen, wurde in einer Arbeit von Pirzgalska *et. al.* beschrieben. Hier zeigte sich, dass extrazelluläres Noradrenalin, freigesetzt durch sympathische Nervenendigungen, durch sogenannte „sympathikus-assoziierte Makrophagen“ (SAM) über Slc6a2-Transporter importiert und mittels Monoaminoxidase A abgebaut wird. In adipösen Mäusen fand man, im Vergleich zu normalgewichtigen Mäusen, einen signifikant höheren Anteil an SAMs, was dafürspricht, dass die Beseitigung des Noradrenalins durch SAMs zur Fettleibigkeit beiträgt. In der Tat konnte in adipösen Mäusen ohne Slc6a2-Transporter mehr braunes Fett, eine Steigerung der Thermogenese sowie eine klare Gewichtsreduktion beobachtet werden [127].

3.2. Vegetatives Nervensystem

Das vegetative Nervensystem ist für die neuronale Kontrolle und Regulierung sämtlicher Körperteile, mit Ausnahme der Skelettmuskulatur, zuständig und lässt sich in Sympathikus, Parasympathikus und enterisches Nervensystem (intrinsisches Nervensystem des Gastrointestinaltraktes) unterteilen [128, 129].

Häufig werden Sympathikus und Parasympathikus mit den Begriffen „Fight and Flight“ („Kampf oder Flucht“) bzw. „Rest and Digest“ („Ruhe und Verdauung“) in Verbindung gebracht und wirken an einem Organ sowohl als Gegenspieler aber auch als „Mitspieler“ [130]. Die Aufgaben von Sympathikus und Parasympathikus sind vielfältig. Sie reichen von der Kontrolle der Hormonsekretion, über die Thermoregulation, bis hin zu immunmodulatorischen Reaktionen sowie Funktionen im Bereich des Urogenitaltraktes, des Gastrointestinaltraktes, der Pupillen oder des Herz-Kreislaufsystems (siehe Tabelle 1) [130-132].

Erfolgsorgan	Wirkung des	
	Sympathikus	Parasympathikus
Pupille	Erweiterung	Verengung
Bronchien	Erweiterung	Verengung
Herz	Beschleunigung der Herztätigkeit	Verlangsamung der Herztätigkeit
Magen und Darm	Hemmung der Peristaltik	Anregung der Peristaltik
Leber	Glykogenabbau	Glykogenaufbau
Harnblase	Harnverhaltung	Harnentleerung

Tabelle 1: Beispiele der Wirkungsweisen des Sympathikus und Parasympathikus [131]

Für die Signalweiterleitung werden die Neurotransmitter Acetylcholin und Noradrenalin ausgeschüttet. Dabei findet die neuronale Übertragung präganglionär, sowohl beim Sympathikus als auch beim Parasympathikus über Acetylcholin, das an nikotinerge Rezeptoren bindet, statt. Postganglionär bindet das Acetylcholin des Parasympathikus an muskarinerge Rezeptoren, wo hingegen der Sympathikus Noradrenalin ausschüttet, was an adrenergen Rezeptoren des Endorgans bindet [130, 133]. Acetylcholin und Noradrenalin können auch an nikotinerge und adrenerge Rezeptoren auf Immunzellen binden, wodurch eine Immunantwort hervorgerufen wird [132]. Durch Freisetzung der Neurotransmitter in umliegende Bereiche, können sie sich mehrere Mikrometer weit im Gewebe verteilen. Diese Form der „nicht-synaptischen Verbindung“ wurde in den 1960er und 1970er Jahren entdeckt und ermöglicht es, im Vergleich zur synaptischen Übertragung, zur gleichen Zeit viel mehr Zellen anzusprechen [134-136]. Auf der anderen Seite konnte aber auch eine synaptische Verbindung zwischen Nervensystem und Immunzellen gezeigt werden. In der Milz endeten sympathische Nerven in direkter Umgebung von T-, B- sowie dendritischen Zellen und formten Synapsen, sogenannte „neuroimmune Knotenpunkte“ [137-139]. Die Kommunikation zwischen dem Nerven- und Immunsystem ist jedoch nicht einseitig, sondern findet auch in umgekehrter Richtung statt [140, 141]. Schon 1977 konnte durch Besedovsky *et. al.* gezeigt werden, dass die elektrische Aktivität im Hypothalamus der Ratte in einzelnen Nervenzellen um über 100 Prozent zunahm, nachdem zwei verschiedene Substanzen intraperitoneal verabreicht wurden. Es wurde davon ausgegangen, dass die neuronale Aktivität nicht durch die Stoffe an sich

gesteigert wurde, sondern dass die damit in Verbindung stehende Immunantwort zu den Veränderungen geführt hat [142]. Teilweise werden Reize, die von bestimmten Antigenen, Bakterien, Viren oder Tumoren ausgehen und als „nicht-kognitive Reize“ bezeichnet werden, nicht durch das zentrale oder periphere Nervensystem wahrgenommen. Immunzellen können in diesem Fall als „Sinnesorgan“ fungieren und Zytokine, Endorphine, Neurotransmitter oder Hormone ausschütten, die einen derartigen Einfluss auf das Nervensystem haben, dass es zu Veränderungen im Verhalten, dem Bewusstsein und dem Gemütszustand kommt [143-145]. Es wird also deutlich, dass das Immun- und Nervensystem keine funktionell getrennten Bereiche darstellen, sondern eng miteinander agieren, was für die Aufrechterhaltung der Homöostase von wesentlicher Bedeutung ist. Denn durch ein neuro-immunes Ungleichgewicht können viele Erkrankungen ausgelöst werden [146-148].

3.3. Auswirkungen der sympathischen Innervation auf Immunzellen

In der Literatur gibt es widersprüchliche Angaben, wie sich die Sympathikusaktivität auf Immunzellen auswirkt. Dabei kann die Immunreaktion durch den Einfluss des Sympathikus sowohl stimuliert als auch gehemmt werden [149, 150].

Vasamsetti *et. al.* konnten zeigen, dass sowohl die Reifung von myeloiden Zellen, als auch die Proliferation von Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen (GMP) durch Katecholamine, die von Immunzellen oder dem Sympathikus freigesetzt wurden, gesteigert wird. Da die Aktivierung des Sympathikus bei einer Diabeteserkrankung gut erforscht ist, wurden Mäuse mit Typ 1 und Typ 2 Diabetes eingesetzt und deren Milzen, als zentrales blutbildendes Organ, analysiert, um den Einfluss der Sympathikusaktivität auf die myeloide Zellentwicklung zu ermitteln. Durch die chemische, chirurgische und genetische Entfernung der sympathischen Innervation der Milz, konnte eine verminderte Proliferation von Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen (GMP) sowie eine reduzierte myeloide Zellentwicklung festgestellt werden [151].

Heidt und Kollegen konnten ebenfalls zeigen, dass die sympathische Aktivität zur Steigerung von Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen (GMP), hier allerdings im Knochenmark, führt. Zunächst analysierten sie das Blut von chronisch gestressten, auf einer Intensivstation arbeitenden Assistenzärzten. Hier stellten sie eine signifikante Erhöhung von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten fest. Als Kontrollen dienten Blutproben von Ärzten, die nicht im Dienst waren. Ausgehend von diesen Daten, wurde anhand von Mäusen, die täglich, über eine Dauer von ein bis drei

Wochen, einem anderen Stressor ausgesetzt waren, getestet, ob ein stressbedingter Anstieg von Immunzellen die Folge einer gesteigerten Leukozytenproduktion ist. In der Tat wirkte chronischer Stress über die Sympathikusaktivierung auf das Knochenmark. Überschüssiges Noradrenalin bewirkte über die Bindung an β 3-Rezeptoren von Knochenmarkszellen eine Stammzellproliferation und führte zu einer gesteigerten Anzahl von Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen (GMP), Vorläuferzellen von Makrophagen und dendritischen Zellen (MDP) und lymphoiden Progenitorzellen (CLP), deren ausdifferenzierte Zellen auch vermehrt in atherosklerotischen Plaques von ApoE^{-/-} Mäusen zu finden waren [152].

Im Gegensatz zu dieser stimulierenden Wirkung der Sympathikusaktivität auf die Immunantwort, zeigten Liu und Kollegen eine immunsupprimierende Wirkung. In *in vitro* - Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die proinflammatorische Zytokin- und Chemokinproduktion von primären Alveolarmakrophagen nach LPS-Gabe reduziert war, wenn diese zuvor mit Noradrenalin oder spezifischen Adrenorezeptor- β 2-Agonisten (zum Beispiel Formoterol oder Clenbuterol) inkubiert wurden. Passend hierzu führte in *in vivo* - Experimenten mit Mäusen, die genetische, chemische und chirurgische Entfernung der lokalen sympathischen Innervation in der Lunge zu einer verstärkten Immunantwort mit vermehrter Neutrophilenrekrutierung [153].

In Übereinstimmung damit, konnten Willemze *et. al.* ebenfalls eine anti-inflammatorische Wirkung der sympathischen Innervation nachweisen. Knochenmarksmakrophagen, die zuvor mit Noradrenalin vorbehandelt wurden, wiesen nach LPS-Stimulation sowohl im Transkriptom, als auch in der Proteinkonzentration signifikant reduzierte proinflammatorische Zytokinwerte auf. Ähnlich wie Noradrenalin führte auch die Vorbehandlung mit Salbutamol, einem spezifischen Adrenorezeptor- β 2-Agonisten, zu einer verringerten mRNA-Expression und Proteinkonzentration dieser Zytokine. Umgekehrt war die Expression des anti-inflammatorischen IL-10 sowohl nach Noradrenalin- als auch Salbutamolbehandlung signifikant erhöht. Darüber hinaus konnten sie in *in vivo* - Versuchen zeigen, dass die sympathische Denervation des Darms zu einer deutlichen Reduktion von Becherzellen im Darmepithel, einem Kolonödem, erhöhten mRNA-Leveln von entzündungsfördernden Zytokinen im Kolongewebe sowie einer histologischen Schädigung der Darmschleimhaut führt [154].

Durch sympathische Signalübertragung kann die immunologische Aktivität, wie anhand der vorherigen Publikationen erläutert wurde, sowohl gefördert als auch gehemmt werden. Eine kaskadenartige gegenseitige Beeinflussung zwischen Herz, Gehirn und

Niere konnten Fujiu *et. al.* mit ihrer Arbeit darstellen. Mit Hilfe von *Klf5^{fl/fl}Aqp2-Cre*-Mäusen konnte im Modell der experimentellen Aortenkonstriktion (TAC), die zu einer erhöhten chronischen linksventrikulären Belastung des Herzmuskels führte, eine Verknüpfung zwischen Sympathikus, Niere und Herz nachweisen werden. Eine chronische Druckbelastung im Herzen führte zur Aktivierung des Sympathikus. Durch sympathische Innervation der Epithelzellen im Sammelrohr der Niere wurden Makrophagen der Niere stimuliert, die daraufhin TNF- α produzierten. Das wiederum aktivierte Nierenendothelzellen, die infolgedessen CSF-2 (Kolonie-stimulierender Faktor 2) in den Blutkreislauf sezernierten. Ly6C^{low} - Makrophagen des Herzens wurden dadurch angeregt und vermittelten schließlich Anpassungsreaktionen in Form von kardialer Hypertrophie [155].

III. ZIELSETZUNG

Immun- und Nervensystem agieren, wie zuvor beschrieben, in engem Zusammenspiel [146]. Durch die sympathische Überaktivierung in Form von chronischem Stress werden vermehrt hämatopoetische Stammzellen aktiviert [152]. Umgekehrt führt eine Denervation in der Milz zu einer verminderten GMP-Proliferation und einer reduzierten Entwicklung von myeloiden Leukozyten [151]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Makrophagen dicht an sympathischen Nervenfasern lokalisiert sind und einen anderen Phänotyp aufweisen als Makrophagen, die in der Nähe von Gefäßen lokalisiert sind [113, 127].

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde die hier vorliegende Doktorarbeit mit dem Ziel angefertigt, ein besseres Verständnis über die *in vivo* Interaktion zwischen Makrophagen und sympathischen Nervenfasern zu erhalten.

Es wurde die Hypothese untersucht, ob ein funktionelles Zusammenspiel zwischen sympathischen Nervenfasern und Makrophagen besteht. Ziel war es, zunächst zu analysieren, wie Makrophagen in verschiedenen Geweben lokalisiert sind und mit welcher Häufigkeit sie Kontakt zu Nervenfasern haben. Des Weiteren sollte mithilfe von verschiedenen Denervationsversuchen näher beschrieben werden, wie sich das Fehlen des sympathischen Einflusses auf den Makrophagenphänotyp und die Aufrechterhaltung der Makrophagenpopulation auswirkt.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Als Versuchstier wurde in dieser Arbeit die Maus gewählt. Da sie eine geringe Körpergröße aufweist, kann sie im Vergleich zu anderen Versuchstieren kostengünstig und platzsparend untergebracht werden und ist zudem noch leicht handelbar. Des Weiteren eignet sich die Maus als Versuchstier besonders gut, da sie mit einer Wurfgröße von 6-12 Jungtieren und einer Trächtigkeitsdauer von 18-21 Tagen eine schnelle Reproduktionsrate aufweist. Ein weiterer Vorteil ist die Vielzahl transgener Mauslinien, die es erlaubt, verschiedenster Fragestellungen nachzugehen. Zudem können gewonnene Erkenntnisse aus dem Mausmodell auf den menschlichen Organismus übertragen werden und für die Entwicklung neuer Therapieansätze dienen, da die Maus dem Menschen aus immunbiologischer Sicht sehr ähnlich ist [156].

Die Tierversuche wurden gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Fassung vom 18.05.2006, letzte Änderung am 10.08.2021 durch Artikel 105) und von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: ROB-55.2-2532.Vet_02-19-42).

1.1. Tierhaltung und Zucht

Bis auf einige Mäuse des Wildtypstammes C57BL/6J, die der Praktikabilität halber von Charles River Laboratories bezogen wurden, stammten die übrigen Versuchstiere aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung München. Dort wurden sie unter SPF-Bedingungen (specific pathogen free) gezüchtet. Um sicherzustellen, dass Versuchsergebnisse durch den Transport und den örtlichen Wechsel nicht beeinflusst wurden, hatten die Mäuse nach Einsetzen in die Tierhaltungsschränke (Bioscape Uniprotect, Bioscope GmbH, Castrop-Rauxel, Germany) des hausinternen Tierstalls im Walter-Brendel-Zentrum zwei Wochen Zeit, sich an die neue Umgebung und die veränderte Keimbelastung zu gewöhnen. Im Tierstall herrschte eine Temperatur von 22 +/- 1 °C, eine relative Luftfeuchte von 55 +/- 5 % und während der gewählten 12-stündigen Tag-Phase eine Beleuchtungsstärke von 50-100 Lux. Je nach Gewicht wurden bis zu vier Mäuse in einem Polysulfon-Käfig vom Typ M2 bzw. M1L (Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Germany) gehalten. Ausgestattet waren die Käfige mit einer staubarmen und saugstarken Einstreu (Abbed Nestbaumaterial B E-011, Faserbreite 3,5 mm, E-012, Faserbreite 4 mm + NBU E014, Faserbreite 120 mm), Spänen als

Beschäftigungsmaterial sowie Holzwolle und Kosmetiktüchern für den Nestbau. Wasser, über eine Nagetiertrinkflasche, und Futter (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) standen ad libitum zur Verfügung. Einmal pro Woche wurden die Käfige, inklusive Futter und Wasser durch die Tierpfleger gewechselt, wobei der Gesundheitszustand der Mäuse täglich kontrolliert wurde.

1.2. Mausstämme

Nachfolgend sollen die Mauslinien, die in dieser Dissertation verwendet wurden, näher erläutert werden:

- Wildtypstamm C57BL/6J
- Cx3cr1^{GFP}
- Cx3cr1^{CreERT2} x Rosa26^{tdTomato}

1.2.1. Wildtypstamm C57BL/6J

Der am meisten verwendete Inzuchtstamm, dessen Genom als erstes vollständig sequenziert wurde, ist der Wildtypstamm C57BL/6J, auch bekannt als Black-6. In der experimentellen Forschung hat sich diese Mauslinie zum Goldstandard entwickelt, da sie durch ihre Isogenetik erheblich zur Reproduzierbarkeit von Experimenten beiträgt. Häufig werden C57BL/6J Mäuse als genetischer Hintergrund zur Züchtung neuer transgener Mauslinien verwendet, da die meisten Mutationen in den Nachkommen maximal exprimiert werden. Zudem besitzt diese Mauslinie eine geringe Tumoranfälligkeit und ist einfach in der Nachzucht [157, 158].

1.2.2. Cx3cr1^{GFP}

Der Fraktalkinrezeptor CX3CR1 ist ein Rezeptor mit 7 Transmembranhelices (7-Transmembranrezeptor), der auf Monozyten, Makrophagen, Unterarten von natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen und Mikroglia exprimiert wird. Anstelle des Rezeptors kommt es bei dieser Mauslinie, durch einen Knock-in in den endogenen Cx3cr1-Locus, zur Expression des Fluoreszenzreporterproteins eGFP (enhanced green fluorescent protein) unter der Kontrolle des Cx3cr1-Promotors [159]. Somit können die oben genannten Zellen anhand ihrer grünen Fluoreszenz nach Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht identifiziert werden.

Für diese Doktorarbeit wurden homozygote Cx3cr1^{GFP} - Mäuse mit Black-6 Tieren verpaart, um heterozygote Cx3cr1^{GFP}- Tiere, ohne Einschränkung der Rezeptorfunktion durch einen funktionellen Knock-out, zu erhalten.

1.2.3. Cx3cr1^{CreERT2} x Rosa26^{tdTomato}

In dieser Mauslinie exprimieren Cx3cr1^{positive} Zellen eine Tamoxifen-abhängige Cre-Rekombinase. Durch die Kreuzung mit einer Rosa26-tdTomato-Maus werden Cx3cr1^{positive} Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen oder Monozyten, ab dem Zeitpunkt der Tamoxifen-Injektion rot markiert. Dadurch lassen sich gewebresidente Makrophagen von frisch aus dem Knochenmark eingewanderten monozytären Makrophagen unterscheiden (*Fate Mapping*). Es handelt sich um eine Knock-in Maus.

1.3. Aktivierung der östrogeninduzierten Cre-Rekombinase

Durch Bindung des aktivierten Metaboliten 4-Hydroxytamoxifen an die mutierte Ligandenbindungsdomäne des CreERT2-Fusionsproteins kommt es zu einer Konformationsänderung. Der im Zytoplasma zurückgehaltene Komplex aus HSP90 und CreERT2 dissoziiert, wodurch das CreERT2 in den Zellkern gelangen und an der DNA die Rekombination auslösen kann [160]. Um die Cre-Rekombinase in der zuvor beschriebenen Mauslinie zu aktivieren, wurde den Mäusen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen, im Abstand von ca. 24 Stunden immer jeweils 3 mg Tamoxifen (Tamoxifen, T5648, Sigma-Aldrich, Steinheim) i.p. injiziert.

2. Eingriffe an der Maus

2.1. Narkose

Die Allgemeinanästhesie ist definiert als ein Zustand der Bewusstlosigkeit, der Muskelrelaxation und der Aufhebung der Schmerzempfindung und hat eine reversible Ausschaltung von Empfindungs- und Sinneswahrnehmungen zum Ziel [161]. In unserem Labor werden sowohl Inhalations- als auch Injektionsnarkosen durchgeführt.

2.1.1. Inhalationsnarkose

In der hier vorliegenden Doktorarbeit wurden Blutentnahmen unter einer Isofluran-Inhalationsnarkose (Isofluran CP, cp-pharma, Burgdorf) durchgeführt. Die Maus wurde dazu in eine rote Plexiglasbox gesetzt, in die anschließend ein 5%iges Isofluran-Sauerstoffgemisch über einen Verdampfer (Datex-Ohmeda Isotec 5, uniVet Porta Fa. Groppler, Deggendorf) einströmte, das im Anschluss über eine Absaugvorrichtung wieder abgeführt wurde. Der Vorteil des Isoflurans liegt darin, dass es ein leicht flüchtiges Gas ist, welches sehr rasch an- und abflutet. Schon nach kurzer Zeit konnten eine Muskelrelaxation und eine beschleunigte Atmung beobachtet werden. Aufgrund der niedrigen Metabolisierungsrate (<0,2 %) des Isoflurans wird es meist unverändert

und sehr schnell wieder über die Lunge abgeatmet, was bei zu kurzer Verweildauer in der Plexiglasbox ein zu frühes Erwachen der Maus zur Folge hat [161]. Aus diesem Grund wurde die Narkose für eine stressfreie Blutentnahme so lange aufrechterhalten, bis keine Stellreflexe mehr vorhanden waren und die Atmung sich wieder verlangsamte. Die Maus wurde im Anschluss aus der Box genommen und die Blutentnahme konnte durchgeführt werden (vgl. IV. 2.2.).

2.1.2. Injektionsnarkose

Die lokale Denervation des sympathischen Nervensystems wurde mithilfe einer Tripelnarkose aus den Injektionsanästhetika Medetomidin, Midazolam und Fentanyl durchgeführt. Durch diese Kombination konnte eine Dosisreduktion der jeweils einzelnen Anästhetika erzielt werden.

Medetomidin (Dorbene vet, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin) gehört zu den α_2 -Adrenorezeptoragonisten und wird zur Sedation und Narkoseprämedikation eingesetzt, da es vor allem in höheren Dosen anxiolytisch wirkt. Im Vergleich zu Xylazin hat es eine 20-fach gesteigerte Wirkpotenz, wodurch schon mit niedrigen Dosierungen die maximale Wirkstärke erreicht werden kann. Trotz der leicht analgetischen Wirkung, ist für eine ausreichende Analgesie, welche chirurgische Eingriffe erlaubt, die Kombination mit einem Opioid-Analgetikum erforderlich [162, 163]. Pro Dosis wurden 0,5 mg/kg KG Medetomidin appliziert.

Midazolam (Midazolam, B.Braun, Melsungen) ist ein Vertreter der Benzodiazepine und verstärkt durch Bindung an $GABA_A$ -Rezeptoren die hemmende Wirkung des Neurotransmitters GABA. Durch die Dämpfung bestimmter Bereiche im Gehirn, wirkt es vor allem sedierend, aber auch muskelrelaxierend und angstlösend. Zudem verursacht es beim Menschen eine anterograde Amnesie. Dies ist beim Tier schwer nachzuweisen, aber auch denkbar. Midazolam wird gerne mit anderen stärker sedierenden Medikamenten, wie beispielsweise α_2 -Adrenorezeptoragonisten, zur Anästhesie-Einleitung verwendet [162, 163]. Es wurde eine Dosierung von 5,0 mg/kg KG Midazolam appliziert.

Fentanyl (Fentadon, Albrecht GmbH, Aulendorf) wird als Analgetikum bei starken Schmerzen eingesetzt und zählt aufgrund seines Suchtpotenzials zu den sogenannten Betäubungsmitteln. Es bindet selektiv an μ -Opioidrezeptoren und zeigt eine 80-fach stärkere Wirkung als Morphin. Im Schnitt wirkt es 30-60 Minuten und muss bei längeren Eingriffen entsprechend nachdosiert werden. Fentanyl wirkt nur gering

sedierend und wird daher in Kombination mit Midazolam und Medetomidin als Tripelnarkose in unserem Labor angewendet. [162, 163]. Fentanyl wurde mit einer Dosierung von 0,05 mg/kg KG verabreicht.

Vor der intraperitonealen Injektion (vgl. IV 2.3.) der Kombinationsnarkose wurde die Narkose, wie zuvor beschrieben, mit Isofluran (vgl. IV 2.1.1.) eingeleitet, um die Einschlafphase und damit die Stressbelastung zu verkürzen. Sobald sämtliche Stellreflexe erloschen waren und sich die Atmung der Tiere leicht beschleunigte, wurde die Tripelnarkose intraperitoneal appliziert. Danach wurde die Maus in eine Pappbox, welche mit kleinen Luftlöchern versehen war, gelegt, um äußere Reize, die die Einschlafphase stören könnten, zu reduzieren. Gegen das Austrocknen der Cornea wurde eine Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen) aufgetragen. Die Narkosetiefe wurde über den Zwischenzehenreflex kontrolliert und bei Bedarf nachinjiziert.

Zum Antagonisieren wurde Atipamezol (Alzane, Zoetis Deutschland GmbH, Ulm; 3,75 mg/kg KG) als α_2 -Adrenorezeptor-Antagonist und Flumazenil (Flumazenil, Hika Pharma GmbH, Gräfelfing; 0,72 mg/kg KG) als Benzodiazepin-Antagonist subkutan injiziert. Da die Wirkdauer des Fentanyls relativ kurz ist, wurde auf die Verwendung von Naloxon als Opioid-Antagonist verzichtet [163].

2.2. Blutentnahme aus der Vena facialis

Für die Blutentnahme wurde die Maus zunächst mit Isofluran betäubt (vgl. IV 2.1.1.). Bei ausreichender Narkosetiefe wurde das Tier anschließend aus der Plexiglasbox genommen und mit Daumen und Zeigefinger im Nacken gegriffen. Vorteil dieser Technik ist, dass das Tier nicht nur fixiert wird, sondern es gleichzeitig zu einer Stauung der Vene kommt. Zur Orientierung wurde eine kleine haarlose Stelle („freckel spot“) in der Nähe des Kieferwinkels aufgesucht. Etwas kaudodorsal von diesem Punkt wurde mithilfe einer Blutlanzette (Solofix, B.Braun Melsungen AG, OPM, Melsungen) ein kurzer, vier bis fünf Millimeter tiefer Stich gesetzt. Die bei korrekt durchgeführter Venenstauung und -punktion rasch austretenden Blutstropfen wurden mit einem EDTA-Röhrchen (Microvette 100 K3E, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) aufgefangen. Anschließend wurde die Stauung gelöst und die Punktionsstelle mit einem Wattestäbchen komprimiert, um der Entstehung von Hämatomen vorzubeugen. Sobald die Blutung gestillt war, wurde die Maus zurück in ihren Käfig gelegt, wo sie in Ruhe aufwachen konnte. Folgte unmittelbar nach der Blutentnahme die Tötung des Tieres,

wurde sofort eine zervikale Dislokation, ohne vorherige Blutstillung, durchgeführt. Auf die Prämedikation eines Analgetikums wurde bewusst verzichtet, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass das Schmerzmittel einen Effekt auf die Versuchsergebnisse hat.

2.3. Intraperitoneale Applikation

Die Applikation von 6-OHDA, Tamoxifen und der Injektionsnarkose erfolgte über die intraperitoneale Injektion. (Die intraperitoneale Applikation der Injektionsnarkose wurde am bereits durch Isofluran narkotisierten Tier durchgeführt.) Die Maus wurde mit Daumen und Zeigefinger im Nacken gegriffen und auf den Rücken gedreht. Die Hintergliedmaße der Maus konnte bei Bedarf mit dem Ringfinger oder dem kleinen Finger fixiert werden, um ein Wegtreten der Spritze während des Einstiches zu verhindern. Nun wurde das Tier in die Trendelenburg Position gebracht, sodass der Kopf die tiefste und die Hinterläufe die höchste Position einnehmen [164]. Dies soll das Risiko minimieren, versehentlich die Bauchorgane zu punktieren. Anschließend wurde mit einer 26 bzw. 30G Kanüle im caudalen Quadranten, etwas medial der linken Kniefalte der Maus, in einem 30° bis 45° Winkel durch die Bauchdecke gestochen. Bei weiblichen Tieren musste besonders darauf geachtet werden, nicht in die helleren Fellbereiche, also die Zitzen, zu injizieren, da dies mit erheblichen Schmerzen für das Tier verbunden gewesen wäre. Nach kurzer Aspiration konnte ein Volumen von bis zu 10 ml/kg KG langsam injiziert werden [165]. Im Anschluss wurde die Spritze entfernt und das Tier zurück in den Käfig gesetzt.

3. Versuchsaufbau und -durchführung

Die Depletion von sympathischen Nervenfasern und die Probenentnahme für die durchflusszytometrische und histologische Analyse sollen im Folgenden näher erläutert werden.

6-OHDA ist ein catecholaminerges Neurotoxin, das zum einen reversibel die Komplexe I und IV der Atmungskette hemmt und zum anderen die Fähigkeit besitzt, freie Radikale zu produzieren und oxidativen Stress zu verursachen. Des Weiteren bindet 6-OHDA kompetitiv an die Dopaminaufnahmestelle und modifiziert diese irreversibel, wodurch kein Dopamin mehr in die Zelle aufgenommen werden kann. All diese Faktoren führen zu einer Störung der neuronalen Weiterleitung und zum Untergang der sympathischen Nervenfasern [166].

3.1. Chemische Denervation von sympathischen Nervenfasern

Um zu überprüfen, ob sich das Makrophagenexpressionsprofil bei fehlender sympathischer Innervation verändert, wurden die sympathischen Nervenfasern mithilfe von 6-OHDA (6-Hydroxydopamin hydrochloride, H4381, Sigma-Aldrich) denerviert.

3.1.1. Denervation durch systemische Applikation

Pulverförmige Ascorbinsäure (L-Ascorbinsäure, A5960, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) wurde in PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) mit einer Endkonzentration von 10^{-7} Mol gelöst. Anschließend wurde in der 10^{-7} molaren Ascorbinsäure das 6-OHDA gelöst. Die intraperitoneale Applikation erfolgte mit einer 30 G Kanüle (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) und einer 1 ml Spritze (Injekt-F, B.Braun, Melsungen) am nicht narkotisierten Tier (vgl. IV. 2.3.).

Die Tiere der Experimentalgruppe erhielten am 1. und 3. Tag 100 mg/kg KG 6-OHDA und am 4. Tag 200 mg/kg KG 6-OHDA. Nach dem gleichen Schema wurde den Mäusen der Kontrollgruppe je 10 ml/kg KG der 10^{-7} molaren Ascorbinsäure, ohne darin gelöstem 6-OHDA (Vehicle-Kontrolle), intraperitoneal appliziert. Mithilfe eines Scoresheets wurde der Gesundheitszustand der Tiere in regelmäßigen Abständen kontrolliert (Abb. 5).

3.1.2. Denervation der Lunge durch lokale Applikation

6-OHDA wurde in 10^{-7} molarer Ascorbinsäure gelöst (vgl. IV. 3.1.1.), entsprechend so, dass in 60 μ l Flüssigkeit 500 μ g des 6-OHDAs enthalten waren. Anschließend wurde die Maus, wie in IV. 2.1.2. beschrieben, narkotisiert. Sobald eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war, wurde die Maus in Rückenlage auf eine Wärmematte gelegt. Mit einer Pipette wurden 60 μ l 6-OHDA gleichmäßig auf beide Nasenlöcher verteilt. Die Kontrolltiere erhielten 60 μ l der 10^{-7} M Ascorbinsäure ohne 6-OHDA. Im Anschluss wurde die Maus senkrecht gehalten und 5x hoch und runter geschwenkt, um die applizierte Flüssigkeit über die Trachea und Bronchien in der Lunge zu verteilen. Danach wurde die Narkose antagonisiert (vgl. IV. 2.1.2.), die Maus zurück in den Käfig gelegt und noch einige Zeit in regelmäßigen Abständen anhand eines Scoresheets (Abb. 5) überwacht. Nachdem die Mäuse am folgenden Tag noch einmal eine intranasale Dosis des 6-OHDAs erhielten, wurden die Lungen 24 h nach der zweiten Applikation entnommen.

Score System für den Versuchsantrag "Die immunologische Rolle wandständiger Gefäßzellen gegenüber der hämatogener Immunzellen"											
Chronischer Versuch: 6-OHDA intranasal											
Datum Beginn des chronischen Tierversuchs:											
Tier- Identifikations Nummer:											
Tier-Alter bei Versuchsbeginn:											
Scorezeitpunkt (SZP) nach Beginn der Sepsis											
Uhrzeit:											
Datum:											
Parameter	Score 0	Score 1	Score 2	D1	0h	5h	10h	0z	0h	5h	10h
Allgem. Befinden	normal (normale Aktivitäten, z.B. Fressen, Ruhen, Bewegen)	vermindert (gewölbter Rücken, gestäubtes Fell, beweglich verlangsamte) angestrenzte Atmung, eingefallene Flanken	stark vermindert (dehydriert, apathisch, kühle Körperoberfläche, flache oder Pumpalmung, Schwellungen, kachektisch, verklebte Augen)								
Nahrungsaufnahme	Tiere fressen, (Körpergewicht erhalten)	verminderte Nahrungsaufnahme < 24h (Körpergewicht vermindert)	verminderte Nahrungsaufnahme > 24h (Körpergewicht vermindert)								
Bewegungsaktivität	umherlaufen, klettern an den Gitterstäben	zurückgezogen (hockt in der Ecke), schläfrig	liegt bewegungslos > 24h								
Verhalten	Neugierig, interessiert an der Umgebung, munter	Desorientiert an der Umgebung	Automutilation oder Apathisch, abgesondert								
Kotabsatz	normal	Durchfall < 24h	Blutung oder Durchfall aus dem Rektum > 24h oder fehlender Kotabsatz, Rektumprolaps								
Harnabsatz	normal	ggf. blutiger Ham	fehlender Hamabsatz								
Gesamtscore											

Abbruchkriterien: bei Score 2 oder mindestens drei Mal hintereinander Score 1

** erstellt in Anlehnung an den Vortrag von PD Dr. med. vet. Doreen M. Mansweiler Anas "Abbruchkriterien aus wissenschaftlicher Sicht" bei der 2. Fortbildungsveranstaltung für Tierschutzbeauftragte Berlin, 28. Mai 2009

Leichte Belastung: Score 0
Mittlere Belastung: kumulativer Score von 1-3, ohne Erreichen von Score 2 in einzelner Kategorie
Ein Score von 2 in einer einzelnen Kategorie oder von kumulativ >3 würde einer schweren Belastung entsprechen und soll keinesfalls erreicht werden

Handlungsanweisung: Fortführung des Versuchs
Handlungsanweisung: Reevaluation nach maximal 2h, dann erneutes Scoring und Entscheid mit ggf. Terminierung

Dehydratation definieren wir als Flüssigkeitsmangel des Organismus unabhängig von der Ursache. Die fragile Dehydratation untersuchen wir mittels des „Hautfaltentests“. Wenn eine aufgestellte Hautfalte nicht sofort nach dem Loslassen wieder verschwindet, gehen wir von einer relevanten Dehydratation aus.

Durchfall definieren wir als Kotabsatz, die entgegen der üblichen Konsistenz eher breiig / flüssig sind. Außerdem würden wir bei Durchfall einen unangenehmen Geruch erwarten.

Ein klinisch relevantes, vermindertes Körpergewicht definieren wir als die Abnahme des Körpergewichts um mindestens 10% des Körpergewichts vor Beginn des Versuchs.

Abbildung 5: Beispiel eines Scoresheets zur Beurteilung des Allgemeinbefindens nach Denervation

3.2. Probenentnahme für die durchflusszytometrische und histologische Analyse

Vor jeder Organentnahme wurde zunächst Blut aus der Vena facialis (vgl. IV. 2.2.) genommen. Da bei der anschließenden Tötung mittels zervikaler Dislokation eine Ruptur der herznahen Gefäße vermieden werden sollte, und der Tod somit nicht primär durch innerliches Verbluten eintreten konnte, wurde bei der Blutentnahme versucht, so viel Blut wie möglich zu gewinnen.

Nach erfolgtem Genickbruch wurde die Maus in Rückenlage auf einer Styroporunterlage an allen vier Gliedmaßen mit 20 G Kanülen (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) fixiert. Mit einem Schnitt wurden Abdomen und Thorax eröffnet. Für die darauffolgende kardiale Perfusion wurde der Lobus hepatis sinister medialis [167] inzidiert und das Tier durch einen Stich mit einer 27 G Kanüle (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) in den linken Ventrikel, mit 10 ml gekühltem PBS perfundiert. Um die Versuche zu standardisieren, wurden jeweils annähernd die gleichen Organmengen verwendet.

Dazu wurden für die Histologie folgende Organanteile in einem mit PBS gefüllten 50 ml Zentrifugenröhrchen (Polypropylene Conical Tube, Falcon®, Corning Science, Mexiko) gesammelt: die proximale Pars nonglandularis des Magens gefüllt mit

Chymus, ca. $\frac{1}{4}$ des Mesenteriums, linke Lunge, $\frac{1}{2}$ Herz mit beiden Ventrikeln + Atrien. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die andere Herzhälfte, die rechte Niere sowie der Lobus medius und caudalis der rechten Lunge jeweils in mit PBS gefüllten 2 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf Tubes[®], EppendorfVertrieb Deutschland GmbH, Wesseling) gesammelt.

Für die Weiterverarbeitung wurden die Proben stets auf Eis gelagert, um ein rasches Absterben der Zellen zu verhindern.

4. Durchflusszytometrie

4.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, um Zellen und Partikel anhand ihrer physikalischen und molekularen Eigenschaften zu analysieren und zu zählen. Der Begriff FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), der ein eingetragenes Warenzeichen der Firma Becton Dickinson ist, wird dabei häufig als Synonym verwendet. Eine wichtige Rolle in der Durchflusszytometrie spielen Antikörper-Antigenreaktionen und das Phänomen der Fluoreszenz. Spezifische fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper binden an Antigene (beispielsweise Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine), die somit quantitativ bestimmt werden können [168]. Neben der Fluoreszenzintensität werden aber auch die Partikelgröße und die interne Komplexität einer Zelle gemessen. Eine zu analysierende Probe wird zu einer homogenen Einzelzellsuspension verarbeitet und mit entsprechenden Antikörpern gefärbt. Die Zellen mit einer Größe zwischen 0,2 und 150 μm werden anschließend einzeln in einem Flüssigkeitsstrom in das Durchflusszytometer gesaugt, wo sie durch einen Laserstrahl angeregt werden. Es entsteht dabei zum einen Streulicht und zum anderen Fluoreszenzlicht, welche getrennt voneinander detektiert werden. Das Streulicht korreliert dabei mit den physikalischen Eigenschaften der Zelle, also Größe, Zellform, Oberflächenbeschaffenheit und ihrer internen Komplexität. Kleine, glatte Lymphozyten streuen beispielsweise weniger als die größeren Granulozyten mit ihrer rauen Oberfläche und den vielen Vesikeln. Man unterscheidet zwischen dem Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) und dem Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC). FSC korreliert mit der Zellgröße, wobei die Beugung des Lichtes entlang der Achse des einfallenden Lichtes gemessen wird. SSC korreliert mit der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur des Zellkerns und entspricht der Beugung des Lichts im rechten Winkel. In einem Diagramm mit SSC auf

der y-Achse und FSC auf der x-Achse können ungefärbte Zellen somit allein durch ihre Morphologie in unterschiedlichen Populationen dargestellt werden (Abb. 6) [168, 169].

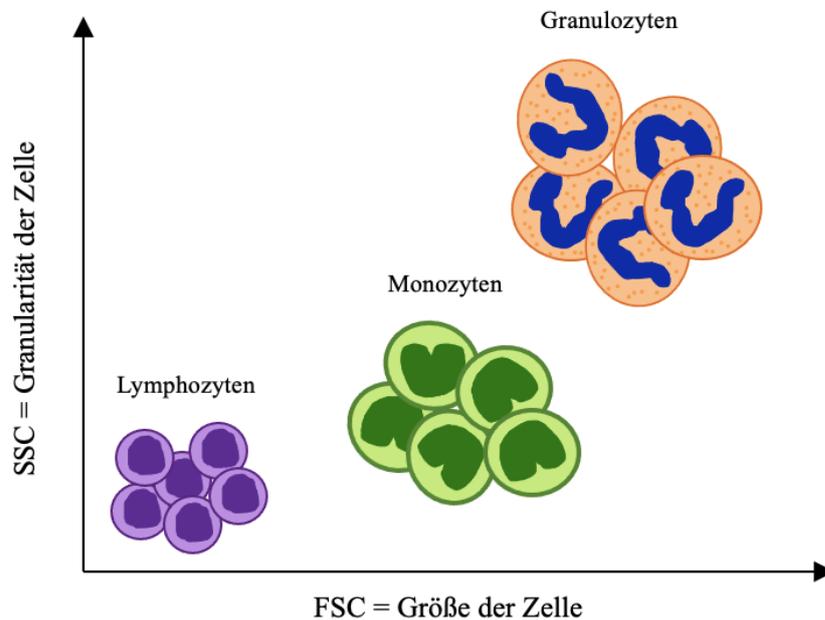


Abbildung 6: Bestimmung von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten anhand von FSC und SSC

Für eine genauere Differenzierung der Zellpopulationen werden zusätzlich fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper, welche gegen bestimmte Oberflächenantigene, wie z. B. Proteine der CD-Klassifizierung, gerichtet sind, verwendet. Die Elektronen der Fluoreszenzfarbstoffe werden durch den Laserstrahl auf ein höheres Energieniveau angehoben. Beim Zurückspringen in ihr ursprüngliches Energieniveau werden Photonen freigesetzt, die erst gefiltert und dann durch Photodetektoren gemessen werden. Je mehr Oberflächenantigene sich auf einer Zelle befinden, desto mehr Antikörper binden daran und desto größer ist die Anzahl der freigesetzten Photonen.

Durch verschiedenfarbige Laser und entsprechende Filter können mehrere Farbstoffe gleichzeitig verwendet werden. Wichtig ist dabei nur, dass sich die Wellenlängen des emittierten Fluoreszenzlichts der Fluorochrome unterscheiden. Durch den Einsatz von sogenannten Tandem-Farbstoffen (z. B. APC-Cy7) können noch mehr Oberflächenantigene zur gleichen Zeit gemessen werden. Das emittierte Licht des ersten Fluorochroms (z. B. APC) regt den zweiten Farbstoff (z. B. Cy7) an. Das emittierte,

längerwellige Licht des zweiten Farbstoffs wird anschließend von Photodetektoren gemessen.

Da sich die Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome häufig überlappen (Spillover), strahlen gefärbte Zellen auch in andere Detektoren als den eigentlich dafür vorgesehenen und erscheinen dann in mehreren Farben positiv. Daher ist eine Korrektur dieser Überlappung mittels Kompensation wichtig, um unterschiedlich markierte Zellen genau voneinander unterscheiden zu können [169].

Nach der Messung werden die Daten analysiert. Ziel ist es dabei, Populationen zu identifizieren und diese durch die Expression verschiedener Oberflächenantigene genauer zu beschreiben. Häufig werden die erfassten Daten eindimensional in einem Histogramm oder zweidimensional in Dot-Plots dargestellt. Beim Histogramm wird auf der x-Achse die Intensität der gemessenen Signale angezeigt und auf der y-Achse die Anzahl der Zellen mit der entsprechenden Intensität. Bei einem Dot-Plot werden zwei Messparameter gegeneinander aufgetragen und die Zellen einzeln als Punkt an der x- und y-Position entsprechend ihrer Intensitäten angezeigt [170]. Die in dieser Doktorarbeit erhobenen Daten wurden mit der Software FlowJo 10.3. analysiert.

4.2. Aufbereitung der Organe

Die auf Eis gelagerten Organe wurden zunächst in einer Petrischale (TC-Schale 35, Standard, Sarstedt, Nümbrecht) mit einem Skalpell (Einmal-Sicherheitsklingen, Aesculap AG, Tuttlingen) und einer Pinzette zerkleinert. Danach wurden 600 µl Enzymmix (siehe Tabelle 2) hinzugegeben und die gesamte Probe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf Tubes®, EppendorfVertrieb Deutschland GmbH, Wesseling) überführt, welches anschließend für 30 Minuten, bei 37 °C und 350 rpm, schüttelnd inkubiert wurde (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg). Nach der Inkubation wurden 3 ml FACS-Puffer (PBS + 0,5 % BSA (Albumin Fraktion V, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) + 2 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid solution, 0,5 M pH 8, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)) in eine 6-Well-Platte (Costar 6 Well Plate, flat bottom, Corning, New York, USA) vorgelegt. Dort hinein wurde ein 70 µm Zellsieb (Cell strainer, 70 µm Nylon, Falcon®, Corning, NY, USA) gelegt, wodurch der gesamte Inhalt aus dem Reaktionsgefäß mit dem Stempel einer 2 ml Spritze gedrückt wurde. Im nächsten Schritt wurden die Proben in 15 ml Zentrifugenröhrchen (Polypropylene Conical Tube, Falcon®, Corning Science, Mexiko) überführt, wobei von Herz, Lunge und Niere jeweils nur die Hälfte der Probe

verwendet und der Rest verworfen wurde. Nach dem Zentrifugieren der Proben für 7 Minuten bei 350 g bei 4 °C, wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt.

Mit 50 µl CD16/CD32-Antikörper (siehe Tabelle 3), welcher unspezifische Antikörperbindungen verhindern soll, wurden die Zellpellets resuspendiert und auf einer 96-Well-Platte (Non Tissue Culture Treated Plate, 96 Well, Round - Bottom, Falcon®, Corning, Mexiko) verteilt. Zu den 50 µl der Probe wurden danach jeweils 50 µl des Antikörpermixes (siehe Tabelle 3) pipettiert und anschließend lichtgeschützt für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurde in jedes Well 100 µl FACS-Puffer hinzugegeben und die Platte für 7 min bei 350 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Proben in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Unmittelbar vor Analyse der Proben mit dem Cell Analyser BD LSR Fortessa wurden die Proben durch ein 50 µm Sieb (Cell Trics 50 µm, Sysmex Partec, Görlitz) in FACS-Röhrchen (5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, Falcon®, Corning, Mexiko) gefiltert, um eine Einzelzell-Suspension zu erhalten, und Life/Dead, mit einer Konzentration von 1:5.000.000 (SYTOX™ Green) bzw. 1:1000 (SYTOX™ Red) zur Färbung/Diskriminierung der toten Zellen, dazupipettiert. Im *Fate Mapping* Versuch wurden außerdem noch 10µl Zähl-Beads (CountBright™ Plus Absolute Counting Beads, ThermoFisher, Eugene, Oregon, USA) zu jeder Probe hinzugegeben.

	Menge	Konzentration	Cat. Nummer	Firma
Collagenase I	1800 µl	1250 U/ml	C0130	Sigma-Aldrich
Collagenase XI	1000 µl	12000 U/ml	C7657	Sigma-Aldrich
DNase I	240 µl	2478 U/ml	D4527	Sigma-Aldrich
Hyaluronidase	120 µl	5000 U/ml	H3506	Sigma-Aldrich
Gibco DPBS (1X) +CaCl² +MgCl²	2840 µl		14040-083	ThermoFisher

Tabelle 2: Herstellung von 6 ml Enzymmix

Alle Antikörper wurden 1:100 mit FACS-Puffer verdünnt, außer CD11c (1:500) und F4/80 (1:50).

Oberflächenmolekül	Fluorochrom	Cat.Nummer	Firma	Mauslinie
Fc-Block CD16/CD32		14-0161-86	Invitrogen eBioscience	Alle Mäuse
Organe				
CD45	APC-Cy7	#557659	BD Biosciences	Alle Mäuse
Folate Receptor β	APC	#153306	Biolegend	Black-6
CD11b	PerCP-Cy5.5	#101228	Biolegend	Alle Mäuse
MHC II	BV510	#107636	Biolegend	Alle Mäuse
CD206	BV605	#141721	Biolegend	Alle Mäuse
CD80	BV650	#104732	Biolegend	Alle Mäuse
TIM-4	BV786	#742778	BD Biosciences	Alle Mäuse
Mertk	PE	#151506	Biolegend	Black-6 Cx3cr1 ^{GFP}
F4/80	BV421	#123132	Biolegend	Alle Mäuse
CD64	PE-Dazzle	#139320	Biolegend	Black-6 Cx3cr1 ^{GFP}
CD11c	PE-Cy7	#117318	Biolegend	Black-6 Cx3cr1 ^{GFP}
Ly6G	A.F. 700	#127622	Biolegend	Alle Mäuse
CD64	APC	#139306	Biolegend	Fate Mapping
Life/Dead	APC (SYTOX TM Red)	#S34859	ThermoFisher	Cx3cr1 ^{GFP}
Life/Dead	FITC (SYTOX TM Green)	#S34860	ThermoFisher	Black-6 Fate Mapping

Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die FACS-Analyse der Organe

4.3. Aufbereitung des Blutes

Nach der Entnahme (vgl. IV.2.2) wurde das Blut mehrmals geschwenkt, um eine Vermischung mit dem EDTA und damit eine Gerinnungshemmung zu erzielen. 50 µl des Blutes wurden mit 50 µl Antikörper-Mastermix (siehe Tabelle 4) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und für 20 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 500 µl Lysing Buffer (BD Pharm Lyse™ Lysing Buffer, Cat: 555899, BD Biosciences, USA) zu dem Blut-Antikörpermix pipettiert und gut gemischt, um die roten Blutzellen zu lysieren. Bis zur anschließenden FACS-Analyse wurde das Blut lichtgeschützt auf Eis gelagert.

Die Antikörper für das Blut wurden 1:200 mit FACS-Puffer verdünnt.

Oberflächenmolekül	Fluorochrom	Cat.Nummer	Firma
Blut			
CD45.2	APC-Cy7	#560694	BD Biosciences
CD115	BV421	#135513	Biolegend
Ly6G	PE	#127608	Biolegend
CD45R/B220	PE-Cy7	25-0452-81	Invitrogen eBioscience
CD3	APC	#100235	Biolegend
Ly6C	PerCP-Cy5.5	#128012	Biolegend

Tabelle 4: Verwendete Antikörper für die FACS-Analyse des Blutes

5. Histologische Untersuchung

5.1. Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung beruht genauso wie die Durchflusszytometrie auf dem Prinzip der Fluoreszenz und der Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht wird. Um bestimmte Strukturen in Gewebeschnitten nachzuweisen, werden fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper, die gegen die gesuchten Strukturen gerichtet sind, verwendet. Dabei unterscheidet man zwischen der direkten Immunfluoreszenzfärbung, bei der der Antikörper gegen das gesuchte Epitop schon mit einem Fluorochrom markiert ist, und der indirekten Immunfluoreszenzfärbung, bei der erst ein unkonjugierter Antikörper

(Primärantikörper) an das gesuchte Epitop bindet und daran dann ein zweiter fluorochrom-markierter Antikörper (Sekundärantikörper). Daher ist es bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung sehr wichtig, darauf zu achten, dass bei der Verwendung mehrerer Antikörper, die Primärantikörper aus verschiedenen Wirten stammen. Bei gleichen Wirten würden die Sekundärantikörper sonst an alle Primärantikörper gleichzeitig binden, wodurch eine Unterscheidung der Strukturen nicht mehr möglich wäre.

5.2. Erstellung der Schnittpräparate

Die entnommenen und in PBS gelagerten Organe (vgl. IV. 3.2.) wurden zunächst für eine Stunde in 4%iger Formaldehyd-Lösung (16 % Formaldehyde Solution, Methanol-free, Thermo Scientific, Rockford, USA) fixiert und anschließend über Nacht im Kühlschrank in 30%iger Sucrose-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) entwässert, um eine Eiskristallbildung während des Einfrierens zu vermeiden. Anschließend wurden die entwässerten Organe in Einbettformen (Tissue-Tek Cryomold 25 x 20 x 5 mm, Sura Finetek) gelegt und umgeben von Einbettmedium (Tissue-Tek, Sakura Finetek Europe) auf Trockeneis gefroren. Abhängig vom Organ wurden 10-14 µm dicke Schnitte am Kryotom (CryoStar NX70, Thermo Fisher Scientific) erstellt. Mit einer schnellen Kippbewegung wurde ein vorgewärmter Objektträger (Menzel Gläser Superfrost Plus, Gerhard Menzel, Braunschweig) vorsichtig auf den frischen, glatt gezogenen Schnitt des Organs gedrückt, um diesen darauf zu fixieren. Die nicht geschnittenen Organe wurden bei -80 °C und die Objektträger mit den angefertigten Schnitten bei -20 °C in einer Aufbewahrungsbox gelagert.

5.3. Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung

Die Objektträger mit den zu färbenden Schnitten wurden zunächst auf Raumtemperatur aufgewärmt und für die Färbung in eine dunkle Feuchtkammer gelegt. Danach wurden die Schnitte mit 4%iger Formaldehyd-Lösung für 15 Min. fixiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für je 5 Minuten in einer mit PBS-Tween (0,1 % Tween20, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gefüllten Küvette gewaschen. Nun wurden die Objektträger an den Rändern abgetrocknet, um danach die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift (Liquid-Blocker, Science Service, Japan) zu umranden. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurden auf jeden Objektträger 200 µl Blocklösung (PBS + 0,5 % Saponin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) + 1 % BSA + 10 % Ziegen Serum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)) pipettiert. Nach 60 Min.

Inkubationszeit wurde die Blocklösung auf einem Papiertuch leicht abgeklopft, die Primärantikörper (siehe Tabelle 5) auf die Schnitte gegeben und danach für eine Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween konnten die Sekundärantikörper (siehe Tabelle 5) sowie der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst für die Kernfärbung auf die Schnitte pipettiert werden. Nach einer Stunde lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Objektträger, wie zuvor, dreimal für 5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen und danach eingedeckelt. Dazu wurde ein Tropfen Eindeck-Medium (Dako Fluorescence Mounting Medium, Dako North America Inc., USA) auf den Objektträger gegeben und ein Deckgläschen (Menzel Gläser, Thermo Scientific) daraufgelegt. Anschließend wurden die Objektträger bei 4 °C in einer Münchener Mappe gelagert.

In einer Färbung wurden mit CD31 Gefäße bzw. das Endothel, mit Tubulin 3 (Tub3) Nervenfasern (spezifisch für Neuronen) und mit Hoechst Zellkerne angefärbt. In einer weiteren Färbung wurde neben CD31 und Hoechst, ein Tyrosinhydroxylase-Antikörper (Th) verwendet, der durch Bindung an Tyrosinhydroxylase, ein Enzym der Katecholamin-Biosynthese [171], sympathische Nervenfasern anfärbt.

5.3.1. Verwendete Antikörper

Die Primärantikörper wurden in Blocklösung und die Sekundärantikörper in Stocklösung (PBS + 0,5 % Saponin + 1 % BSA) verdünnt.

Antikörper	Verdünnung	Cat. Nummer	Firma
Primärantikörper			
CD31/PECAM mit AF647 konjugiert	1:100	# 102516	Biologend
Tub3 rabbit anti mouse	1:500	#ab18207	Abcam
Th rabbit anti mouse	1:500	#ab112	Abcam
Hoechst 33342 (Kernfärbung)	1:1000	# H3570	Invitrogen eBioscience
Sekundärantikörper			
Cy3 goat anti rabbit	1:200	#111-165-003	JacksonImmunoResearch

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

5.3.2. Quantifizierung der Makrophagen - Nerv - Kontakte

Zunächst wurde die Gesamtzahl der CX3CR1⁺ Makrophagen ermittelt. Danach wurden die Kontakte zwischen Makrophagen und Nerven bzw. Makrophagen und Gefäßen ausgezählt. Dabei wurden alle Makrophagen, die Kontakt zu Nerven (bzw. Gefäßen) hatten, inkludiert, unabhängig davon, ob die Makrophagen zusätzlich auch noch Kontakt zu Gefäßen (bzw. Nerven) hatten. Dies wurde im letzten Schritt berücksichtigt, bei dem ausschließlich Makrophagen gezählt wurden, die sowohl mit Nerven als auch mit Gefäßen gleichzeitig assoziiert waren. Von Herz, Lunge und Magen wurden je 9 Schnittpräparate bzw. beim Mesenterium 12 Schnittpräparate analysiert. Für die histologische Auswertung wurde die Software Fiji verwendet.

6. ELISA

6.1. Prinzip des ELISA

ELISA ist die Abkürzung für „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ und ein Verfahren zur Messung von Antigen- oder Antikörperkonzentrationen. Standardmäßig läuft ein ELISA in vier Schritten ab: Zuerst wird die ELISA-Platte mit dem Probenmaterial beschichtet. Dazu binden die Probenantigene bzw. -antikörper an bereits auf der Well-Oberfläche der Platte gebundene Antikörper. Um falsch-positive Ergebnisse möglichst gering zu halten, werden anschließend alle noch freien, ungebundenen Bindungsstellen mit Hilfe einer Pufferlösung geblockt. Im dritten Schritt erfolgt die Detektion. Dabei werden enzymkonjugierte Detektionsantikörper auf die ELISA-Platte gegeben, welche eine spezifische Bindung mit dem Zielantigen oder dem Zielantikörper eingehen. Zuletzt erfolgt die enzymatische Umsetzung eines Substrats, wodurch es zu einer Farbreaktion kommt, welche sowohl eine qualitative als auch quantitative Analyse erlaubt. Je mehr Antigen oder Antikörper in der Probe ist, desto stärker ist die Substratumsetzung und damit der Farbumschlag [172, 173].

Bei einem kompetitiven ELISA, wie er in dieser Doktorarbeit verwendet wurde, ist es umgekehrt: Je größer die Konzentration eines gesuchten Antigens bzw. Antikörpers ist, desto weniger Substrat wird umgesetzt und desto geringer ist die Signalstärke. Die zu messende Probe wird auf eine Mikrotiterplatte gegeben und bindet an primäre Antikörper auf der Plattenoberfläche. Nach abgeschlossener Reaktion wird ein enzymgebundenes Antigen bzw. ein Antikörper dazugegeben. Diese konjugierten Antigene oder Antikörper binden nun an alle freien, noch nicht durch die Probenantigene/-antikörper besetzten, primären Antikörper auf der Mikrotiterplatte. Je

mehr der gesuchten Substanz in der Probe ist, desto weniger Enzym steht hinterher für die Substratumsetzung zur Verfügung, weshalb der Farbumschlag geringer ausfällt [173].

Vom Grundprinzip ist der hier verwendete ELISA zwar ein kompetitiver ELISA, allerdings gibt es eine Besonderheit: Die Mikrotiterplatte ist mit Katecholaminen (Antigenen) beschichtet, woran die Antikörper aus dem Antiserum (Anti-Adrenalin/Anti-Noradrenalin) binden können, wenn sie nicht vorher mit Katecholaminen aus der zu messenden Probe reagieren und Antikörper-Antigen-Komplexe bilden. Letztendlich hängt es also davon ab, wie viel Immuns Serum von den Katecholaminen aus der Probe abgefangen wird und somit nicht mehr an die mit Adrenalin/Noradrenalin beschichtete Mikrotiterplatte binden kann. Mit den Waschschr itten werden die Antigen-Antikörper-Komplexe schließlich entfernt. Standardmäßig binden mit Enzym konjugierte Antikörper an die an Katecholamine der Mikrotiterplatte gebundenen Antikörper aus dem Immuns Serum, wodurch am Ende das Substrat umgesetzt wird.

6.2. Aufbereitung der Gewebep roben

Nach Tötung der Maus und Perfusion der Organe mit kaltem PBS (vgl. IV 3.2.) wurden jeweils ca. 90 mg von Herz, Lunge und Niere entnommen. Um einen Zerfall der Katecholamine zu verhindern, musste dabei sehr zügig gearbeitet werden. Direkt nach Entnahme der drei Organe wurden diese exakt gewogen und in einem Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff getaucht, um die Organe rasch einzufrieren. Da das Protokoll des ELISA sehr zeitintensiv ist, bot es sich an, die Organentnahme und den ELISA auf zwei Tage aufzuteilen und somit die Proben für eine Nacht bei -20 °C zu lagern.

Die eingefrorenen Gewebep roben wurden in einem 37 °C warmen Wasserbad zügig aufgetaut und anschließend mit 1 ml Stabilisierungspuffer (0,01 M HCl (Salzsäure 2 mol/l, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) + 1 mM EDTA + 4 mM Natriummetabisulfit (Sodium disulfite, Merck KGaA, Darmstadt) + Wasser (Aqua ad injectabilia, Berlin-Chemie AG, Berlin)) in Gegenwart von Zirkonium-Mahlkügelchen in einem Tissue-Homogenizer (Benchmark BeadBug Microtube Homogenizer, TEquipment, New Jersey, USA) zerkleinert.

Nach der Inkubation von einer Stunde auf Eis, wurde 1 ml des homogenisierten Gewebes in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und nach Zugabe von 200 µl Chloroform (Chloroform zur Analyse, Merck KGaA, Darmstadt) und sorgfältigem

Mischen, zentrifugiert (15 Min., 4 °C, 13000 g). Der Überstand wurde anschließend für den ELISA verwendet.

6.3. Durchführung des ELISA

Der ELISA wurde in zwei Schritte aufgeteilt. Zuerst erfolgte die Extraktion und Acetylierung der Katecholamine, um diese aufgrund ihrer Kurzlebigkeit zu stabilisieren, und danach die enzymatische Umsetzung eines Substrates in Abhängigkeit von der vorhandenen Menge an Katecholaminen.

Für den ELISA wurde ein Test-Kit von LDN (2-Cat (A-N) Research ELISA™, BA E-5400R, LDN Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG, Nordhorn) verwendet.

6.3.1. Extraktion und Acetylierung

In die vom Test-Kit mitgelieferte 48-Well-Platte wurden 500 µl des Überstandes und je 20 µl der Standards und der Kontrollen, die anschließend mit destilliertem Wasser auf 500 µL aufgefüllt wurden, pipettiert. Nach Zugabe von 25 µl TE-Puffer wurde die Platte mit einer Klebefolie abgedeckt und anschließend schüttelnd inkubiert (60 Minuten, RT, 450 rpm). Danach wurde die Klebefolie entfernt, der Inhalt der Platte mit einer schnellen Bewegung abgekippt und die umgedrehte Platte mehrmals auf einen Stapel Papierhandtücher geklopft, um sie zu trocknen. Zum Waschen wurden zu jeder Probe 900 µl Waschpuffer pipettiert und die Platte schüttelnd inkubiert (5 Minuten, RT, 450 rpm). Nachfolgend wurde der Inhalt abgekippt und die Platte, wie zuvor beschrieben, auf Papierhandtüchern getrocknet. Dann erfolgte ein zweiter Waschschrift. Im Anschluss wurden zunächst 150 µl Acetylierungspuffer und gleich darauf 25 µl der Acetylierungsreagenz in die Wells pipettiert und die Platte wieder schüttelnd inkubiert (20 Minuten, RT, 450 rpm). Nach der Inkubationszeit wurde der Inhalt der Platte abgekippt und es folgten zwei Waschschriffe. Im Anschluss daran wurden 150 µl hydrochlorische Säure in jedes Well pipettiert, die Platte mit Klebefolie abgedeckt und schüttelnd inkubiert (10 Minuten, RT, 450 rpm).

6.3.2. Enzymatische Umsetzung und Katecholamin - ELISA

Je 140 µl der Proben sowie Standards und Kontrollen wurden nach Entfernen der Folie in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Zu jedem Well wurden 50 µl Enzymlösung pipettiert und, abgedeckt mit einer Klebefolie, für eine Minute bei Raumtemperatur und 450 rpm geschüttelt. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation der Platte bei 37 °C.

Nun wurde die Klebefolie wieder entfernt und jeweils 90 µl der Proben, Standards und Kontrollen, in die dafür vorgesehenen Adrenalin bzw. Noradrenalin Mikrotiter Strips pipettiert. Dazu wurden 50 µl des entsprechenden Antiserums (Anti-Adrenalin bzw. Anti-Noradrenalin) gegeben. Die Mikrotiter Strips wurden erneut mit einer Klebefolie abgedeckt, für eine Minute bei Raumtemperatur 450 rpm geschüttelt und anschließend bei 2 bis 8 °C über Nacht (15-20 h) inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde die Klebefolie abgezogen, der Inhalt der Mikrotiter Strips abgekippt, die Strips getrocknet und mit 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dieser Schritt wurde viermal wiederholt. Als Nächstes wurden 100 µl Enzymkonjugat in jedes Well pipettiert und abgedeckt durch Klebefolie, schüttelnd inkubiert (30 Minuten, RT, 450 rpm). Danach folgten, wie zuvor beschrieben, erneut vier Waschschritte. Im Anschluss wurden 100 µl Substrat in jedes Well gegeben, die Mikrotiter Strips abgeklebt und danach für ca. 20-30 Minuten dunkel in einer Schublade inkubiert. Der Stand des Farbumschlages wurde ca. alle 5 Minuten kontrolliert. Sobald keine Farbveränderung mehr zu sehen war, wurde die Folie entfernt und 100 µl Stopplösung in jedes Well pipettiert, um die enzymatische Umsetzung zu beenden. Im letzten Schritt konnte die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm (optische Dichte) mit einem Mikroplatten Leser (GENios™ plate reader, Tecan Trading AG, Schweiz) bestimmt werden.

Da es sich bei diesem Test-Kit um einen kompetitiven ELISA handelt, nahm die Absorption (optische Dichte) mit zunehmender Katecholaminkonzentration ab.

7. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der in dieser Doktorarbeit erhobenen Daten und die Erstellung der entsprechenden Graphen wurde mithilfe der Software GraphPad Prism 9 durchgeführt. Mit Microsoft Powerpoint wurde die Darstellung der Graphen optimiert.

Alle Daten wurden vor der Testung auf Signifikanz mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Lag eine Normalverteilung vor, wurde ein t-Test durchgeführt. Bei einer Nicht-Normalverteilung wurde der Mann-Whitney-Test angewendet. Bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ wurde eine statistische Signifikanz angenommen. Alle Graphen sind mit Mittelwert und Standardfehler +/-SEM (standard error of mean) dargestellt.

V. ERGEBNISSE

1. Makrophagen-Nerv-Kontakte

1.1. CX3CR1⁺ Makrophagen kolokalisieren mit Nervenfasern über verschiedene Organsysteme

Zur Visualisierung der Kontakte zwischen Makrophagen und Nerven wurden Organschnitte vom Mesenterium, Herz, Lunge und Magen von Cx3cr1^{GFP}-Mäusen angefertigt und gefärbt (vgl. IV 5.2. und 5.3).

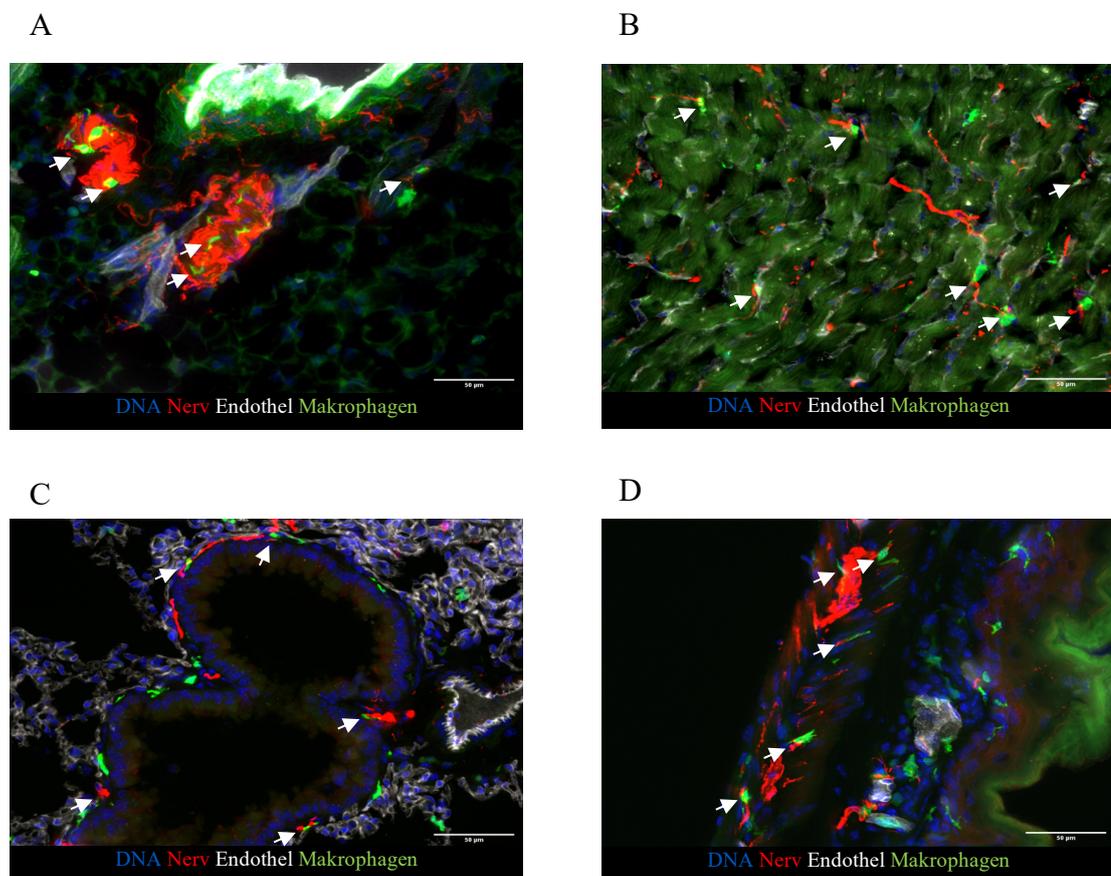
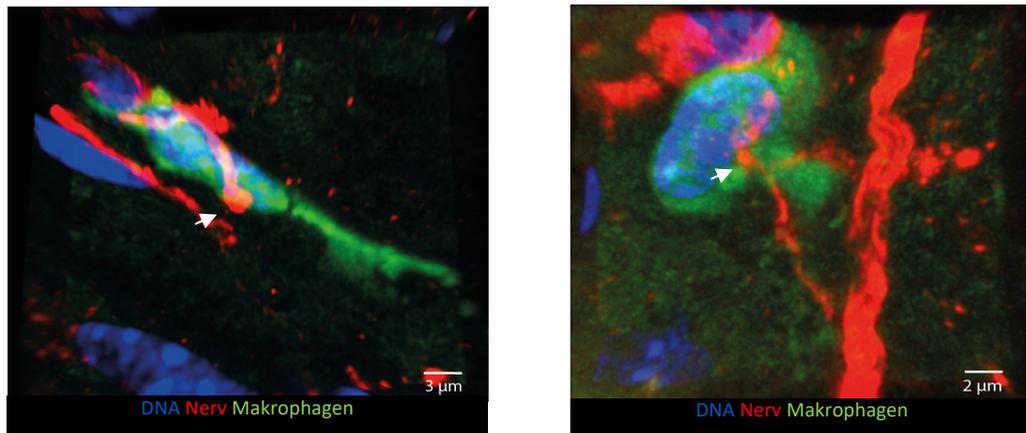


Abbildung 7: Qualitative Darstellung von Makrophagen im Gewebe und deren Verteilung um Nerven und Gefäße mittels Epifluoreszenzmikroskopie

A: Anschnitt von Nerven und einem Gefäß im Mesenterium; B: Anschnitt des Herzmuskels; C: Querschnitt eines Bronchus in der Lunge mit umliegendem Lungengewebe; D: Querschnitt der Magenwand. Mit einem Epifluoreszenzmikroskop wurden in einer 40-fachen Vergrößerung die mit Tubulin 3 und Cy3 angefärbten Nervenfasern in rot, mit CD31 gefärbte Gefäße in weiß, Makrophagen durch ihr endogenes Signal in grün und Zellkerne mit Hoechst in blau dargestellt. Pfeile deuten auf Kontakte zwischen Makrophagen und Nervenfasern. Maßstab 50 µm. n=3 Mäuse

CX3CR1⁺ Makrophagen assoziierten vor allem mit Nervenfasern und teilweise mit Gefäßen (Abb. 7). Die engen Kontakte zwischen Nerven und Makrophagen im Herzen und der Lunge konnten auch mithilfe eines hochauflösenden Konfokalmikroskops im Detail visualisiert werden. Dort zeigten sie zum Teil einen synapsen-ähnlich Charakter (Abb. 8).

Herz



Lunge

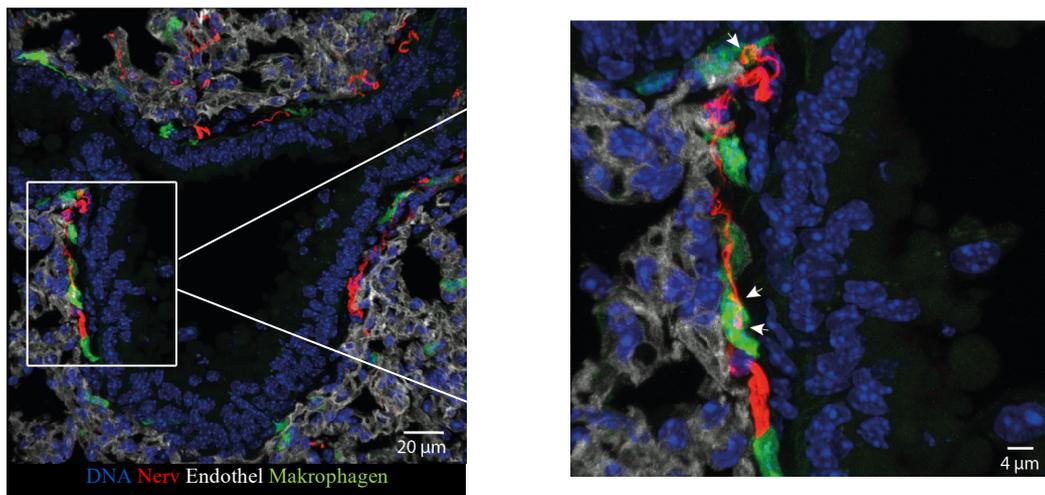


Abbildung 8: Qualitative Darstellung der synapsen-ähnlichen Interaktionen zwischen Makrophagen und Nerven in Herz und Lunge

Mit einem Konfokalmikroskop wurden mit einer 63-fachen Vergrößerung die mit Tubulin 3 und Cy3 angefärbten Nervenfasern in rot, mit CD31 gefärbte Gefäße in weiß, Makrophagen durch ihr endogenes Signal in grün und Zellkerne mit Hoechst in blau dargestellt. Pfeile deuten auf synapsen-ähnliche Interaktionen zwischen Makrophagen und Nervenfasern. Maßstäbe oben links: 3 µm, oben rechts: 2 µm, unten links: 20 µm, unten rechts: 4 µm. n=1 Maus

Die Kontakte zwischen Makrophagen und Nerven bzw. Gefäßen, die zuvor visualisiert werden konnten, wurden anschließend im Mesenterium, Herz, Lunge und Magen mit der Software Fiji quantifiziert (vgl. IV.5.3.2).

Mit der quantitativen Analyse konnte bestätigt werden, dass CX3CR1⁺ Makrophagen vor allem mit Nerven assoziieren (Abb. 9).

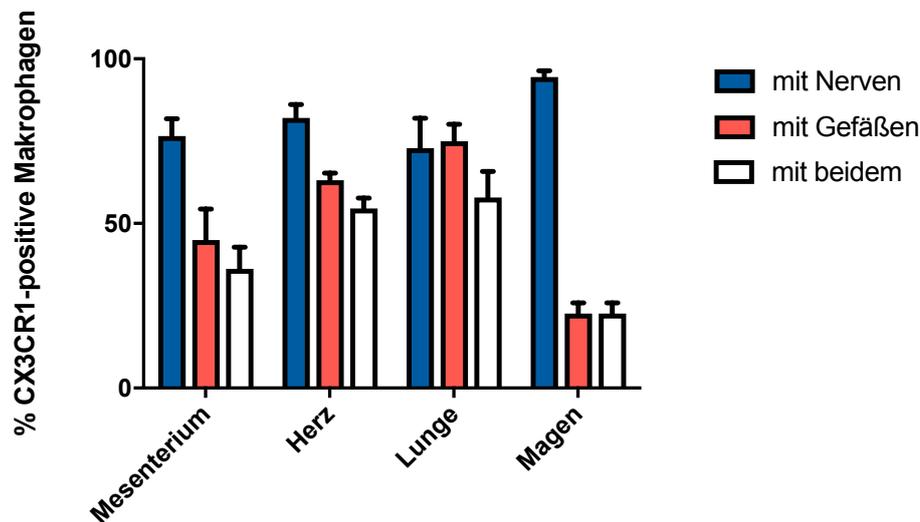


Abbildung 9: CX3CR1⁺ Makrophagen assoziieren häufiger mit Nerven als mit Gefäßen

Die Kontakte zwischen Makrophagen und Nerven bzw. Gefäßen im Mesenterium, Herz, Lunge und Magen sind in Prozent in einem Balkendiagramm dargestellt. Blaue Balken = Kontakte zwischen CX3CR1⁺ Makrophagen und Nerven, rote Balken = Kontakte zwischen CX3CR1⁺ Makrophagen und Gefäßen, weiße Balken = CX3CR1⁺ Makrophagen, die sowohl Kontakt mit Nerven als auch mit Gefäßen haben. Die Makrophagen der weißen Balken sind entsprechend in den roten und blauen Balken mit enthalten. n=3 Tiere pro Organ

Mesenterium: 76,51 % der CX3CR1⁺ Makrophagen waren mit Nerven assoziiert. 44,92 % der Makrophagen waren an Gefäßen lokalisiert, wobei 36,19 % der Gesamtmakrophagen gleichzeitig mit Gefäßen und Nerven in Kontakt traten.

Herz: Hier waren 82,01 % der Makrophagen um Nerven lokalisiert. Mit Gefäßen hatten 63,15 % der Makrophagen Kontakt, und sowohl mit Nerven als auch mit Gefäßen waren 54,57 % der Makrophagen assoziiert.

Lunge: Mit Nerv und Gefäß gleichzeitig in Kontakt standen 57,91 % der Gesamtmakrophagen. Mit Nerven waren 72,83 % und mit Gefäßen 74,94 % der Makrophagen assoziiert.

Magen: Fast alle ausgezählten Makrophagen, nämlich 94,47 %, traten mit Nerven in Kontakt. 22,63 % der Makrophagen waren an Gefäßen lokalisiert und assoziierten dabei

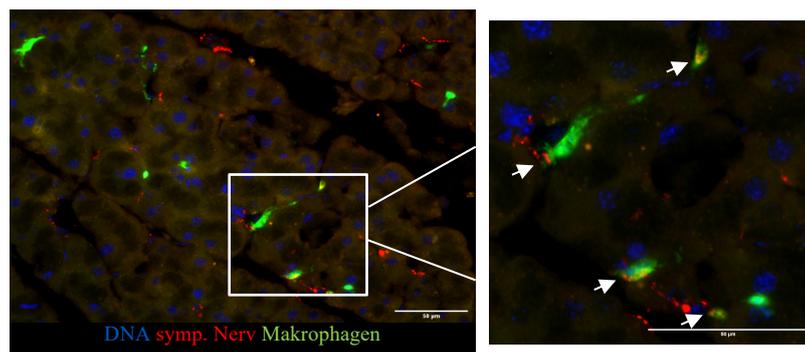
immer gleichzeitig auch mit Nerven. (Es wurden nur Makrophagen in der äußeren Wandschicht gezählt).

1.2. CX3CR1⁺ Makrophagen kolokalisieren vor allem mit sympathischen Nervenfasern über verschiedene Organsysteme

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Makrophagen überwiegend mit Nerven in Kontakt stehen, stellte sich die Frage, ob diese Nerven von sympathischem Ursprung waren. Dazu wurden Gewebeschnitte des Mesenteriums, des Herzens, der Lunge und des Magens von Cx3cr1^{GFP}-Mäusen angefertigt und gefärbt (vgl. IV 5.2. und 5.3).

Anhand der Bilder in Abbildung 10 und 11 wurde deutlich, dass Makrophagen eng an sympathischen Nervenfasern lokalisiert sind. Somit konnte gezeigt werden, dass CX3CR1^{positive} Makrophagen in verschiedenen Geweben dicht mit Nervenfasern und vor allem sympathischen Nervenfasern in Kontakt treten.

A



B

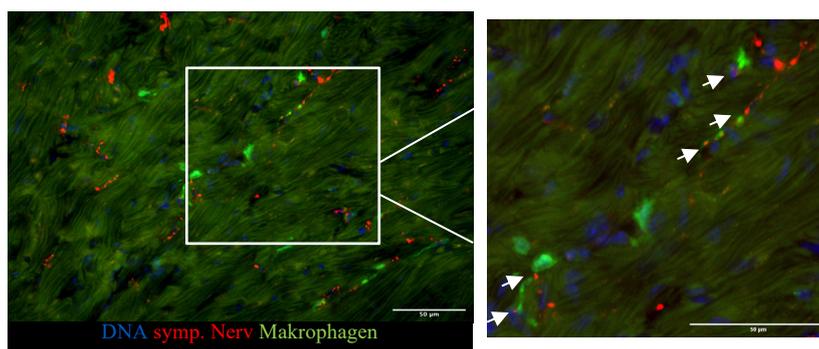


Abbildung 10: Qualitative Darstellung von Makrophagen und sympathischen Nerven in Mesenterium und Herz

A: Anschnitt des Mesenteriums; B: Anschnitt des Herzmuskels; Mit einem Epifluoreszenzmikroskop wurden in einer 40-fachen Vergrößerung die mit Tyrosinhydroxylase und Cy3 angefärbten sympathischen Nervenfasern in rot, Makrophagen durch ihr endogenes Signal in grün und Zellkerne mit Hoechst in blau dargestellt. Pfeile deuten auf Kontakte zwischen Makrophagen und sympathischen Nervenfasern. Maßstab 50 µm. n=3 Mäuse

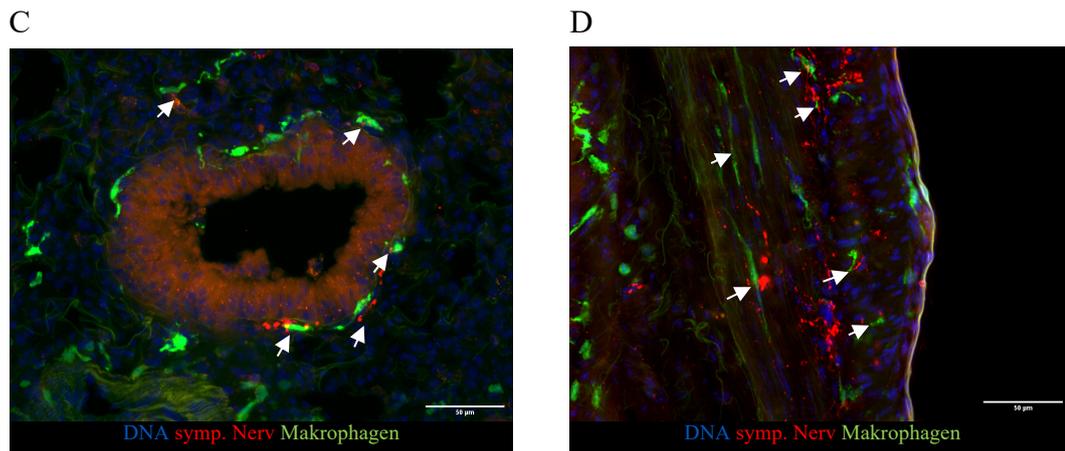


Abbildung 11: Qualitative Darstellung von Makrophagen und sympathischen Nerven in Lunge und Magen

C: Anschnitt der Lunge; D: Anschnitt der Magenwand. Mit einem Epifluoreszenzmikroskop wurden in einer 40-fachen Vergrößerung die mit Tyrosinhydroxylase und Cy3 angefärbten sympathischen Nervenfasern in rot, Makrophagen durch ihr endogenes Signal in grün und Zellkerne mit Hoechst in blau dargestellt. Pfeile deuten auf Kontakte zwischen Makrophagen und sympathischen Nervenfasern. Maßstab 50 µm. n=3 Mäuse

2. Einteilung der Makrophagen in eine $CX3CR1^{high}MHCII^{high}$ und $CX3CR1^{low}MHCII^{low}$ - Population

In der vorliegenden Doktorarbeit waren die wichtigsten Oberflächenmoleküle zur Charakterisierung der Makrophagenpopulationen $CX3CR1$ und $MHCII$. In einer Veröffentlichung von Chakarov *et. al.* konnten zwei Populationen anhand dieser Oberflächenmoleküle unterschieden werden: zum einen $CX3CR1^{high}MHCII^{high}$ und zum anderen $CX3CR1^{low}MHCII^{low}$ [113]. Um die zuvor histologisch charakterisierte $CX3CR1^{+}$ Makrophagenpopulation genauer analysieren zu können, wurden das Herz, die Lunge und die Niere von zwei $Cx3cr1^{GFP}$ -Mäusen qualitativ mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht (vgl. Kapitel IV. 3.2. und 4.2.).

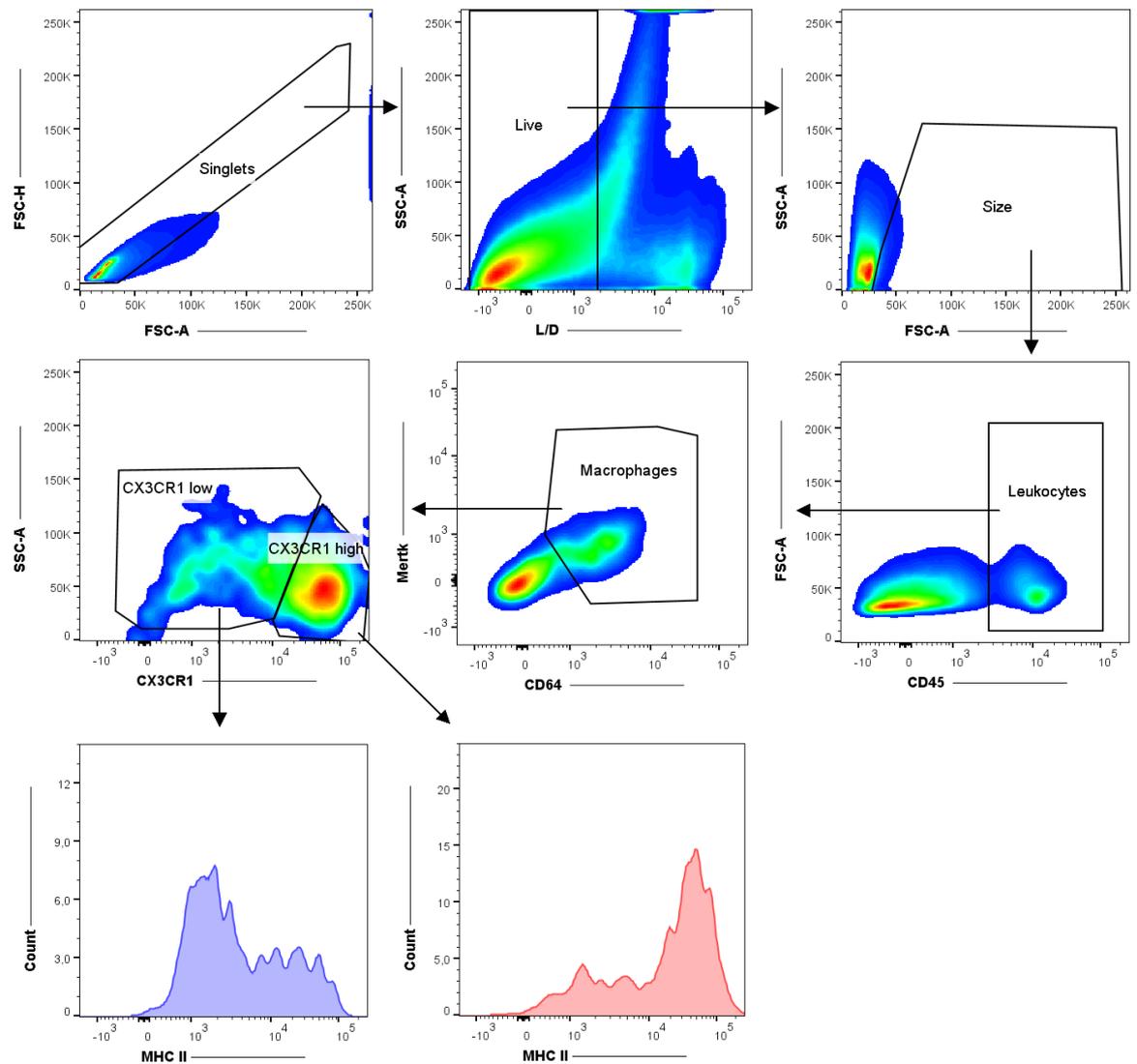


Abbildung 12: Gating-Strategie der FACS-Analyse vom Herz, dargestellt in Dot Plots und Histogrammen

Dargestellt ist eine Abbildung der Gating-Strategie, die für die FACS-Analyse des Herzens einer $Cx3cr1^{GFP}$ -Maus verwendet wurde. Gates wurden in folgender Reihenfolge gesetzt: Einzelzellen (Ausschluss von Zellfragmenten und Zelldubletten), lebende (Sytox Red negative) Zellen, Größe und Granularität der Zellen anhand SSC und FSC, Leukozyten ($CD45^+$), Makrophagen ($CD64^+$ $MERTK^+$), $CX3CR1^{high}$ & low und $MHCII^{high}$ & low . $n=2$ Mäuse

Im Herzen konnte bestätigt werden, dass $CX3CR1^{high}$ Makrophagen in der Tat auch $MHCII^{high}$ sind und entsprechend $CX3CR1^{low}$ Makrophagen geringere $MHCII$ -Expressionen aufweisen (Abb. 12).

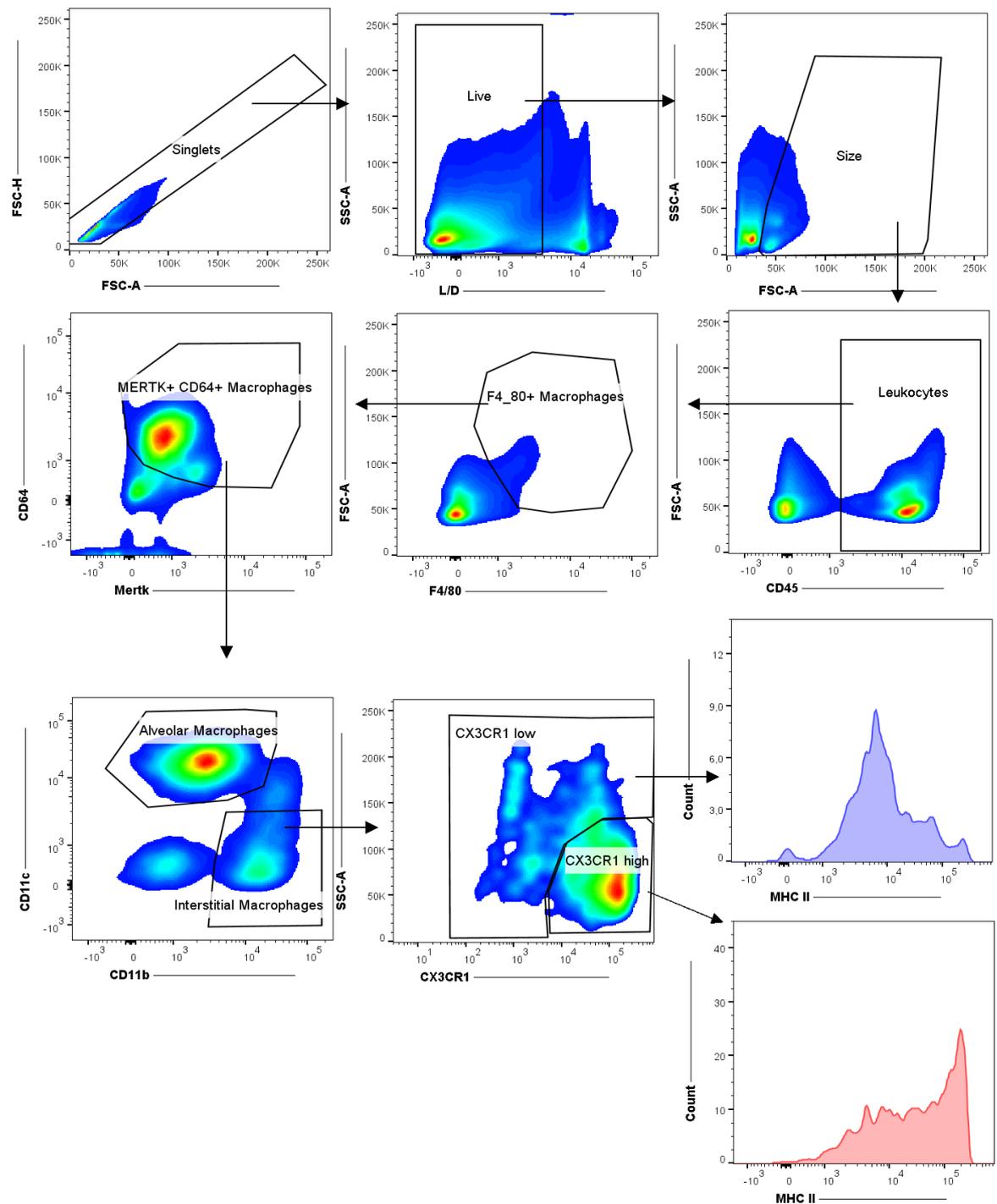


Abbildung 13: Gating-Strategie der FACS-Analyse der Lunge, dargestellt in Dot Plots und Histogrammen

Dargestellt ist eine Abbildung der Gating-Strategie, die für die FACS-Analyse der Lunge einer $Cx3cr1^{GFP}$ -Maus verwendet wurde. Gates wurden in folgender Reihenfolge gesetzt: Einzelzellen (Ausschluss von Zellfragmenten und Zeldubletten), lebende (Sytox Red negative) Zellen, Größe und Granularität der Zellen anhand SSC und FSC, Leukozyten ($CD45+$), $F4/80+$ Makrophagen, $CD64+$ $MERTK+$ Makrophagen, interstitielle Makrophagen ($CD11b+$ $CD11c-$) und Alveolarmakrophagen ($CD11b-$ $CD11c+$), $CX3CR1^{high}$ & low und $MHCII^{high}$ & low . $n=2$ Mäuse

Auch in der Lunge konnte gezeigt werden, dass interstitielle Makrophagen, die eine erhöhte Expression an CX3CR1 aufweisen, gleichzeitig auch mehr MHCII exprimieren und umgekehrt, dass interstitielle Makrophagen, die CX3CR1^{low} sind, eine geringe MHCII-Expression aufweisen (Abb. 13).

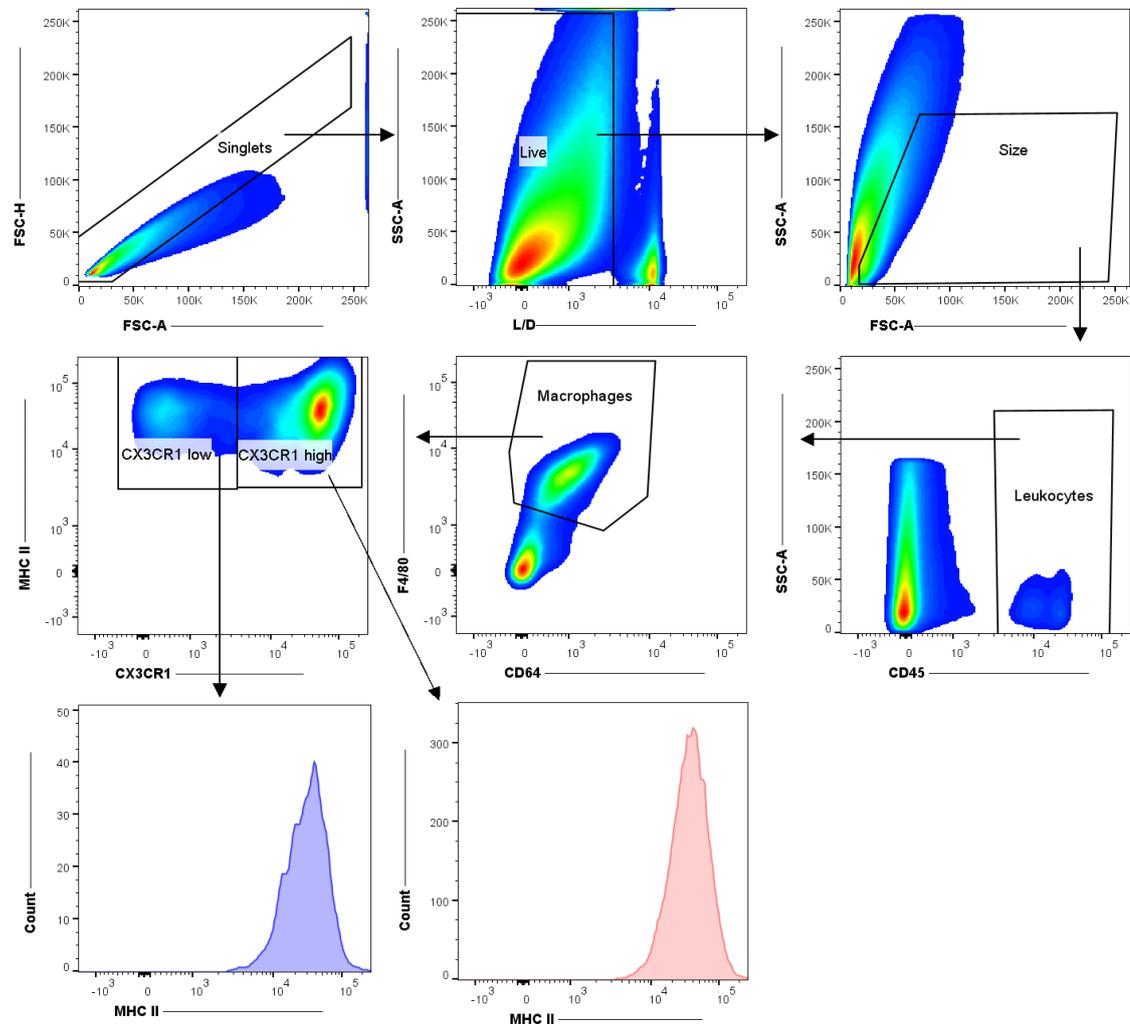


Abbildung 14: Gating-Strategie der FACS-Analyse der Niere, dargestellt in Dot Plots und Histogrammen

Dargestellt ist eine Abbildung der Gating-Strategie, die für die FACS-Analyse der Niere einer Cx3cr1^{GFP}-Maus verwendet wurde. Gates wurden in folgender Reihenfolge gesetzt: Einzelzellen (Ausschluss von Zellfragmenten und Zelldubletten), lebende (Sytox Red negative) Zellen, Größe und Granularität der Zellen anhand SSC und FSC, Leukozyten (CD45+), Makrophagen (F4/80+ CD64+), CX3CR1^{high} & ^{low} und MHCII^{high}. n=2 Mäuse

In der Niere gab es ebenfalls zwei Makrophagenpopulationen, die in CX3CR1^{high} und CX3CR1^{low} eingeteilt werden konnten. Allerdings konnte keine Unterscheidung bei MHCII gemacht werden, da sowohl CX3CR1^{high} als auch CX3CR1^{low} Makrophagen eine hohe MHCII-Expression aufwiesen (Abb. 14).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die zuvor histologisch visualisierten Makrophagen mittels FACS-Analyse, anhand der Oberflächenmoleküle CX3CR1 und MHCII, in Herz und Lunge in eine CX3CR1^{high}MHCII^{high}- und CX3CR1^{low}MHCII^{low}-Population und in der Niere, bei konstant hoher MHCII-Expression, in eine CX3CR1^{high}- und CX3CR1^{low}-Population eingeteilt werden konnten.

3. Veränderte Zusammensetzung der Makrophagenpopulation nach Denervation

Histologisch konnten enge Kontakte zwischen Makrophagen und sympathischen Nerven gezeigt werden (vgl. V. 1.). Teilweise hatten die Kontakte einen synapsenähnlichen Charakter. Mittels FACS-Analyse konnten die Makrophagen in eine CX3CR1^{high}MHCII^{high}- und eine CX3CR1^{low}MHCII^{low}-Population eingeteilt werden (vgl. V. 2.). Im Grundzustand konnte somit gezeigt und bestätigt werden, dass CX3CR1⁺ Makrophagen vornehmlich mit sympathischen Nerven assoziieren.

Die Frage, die sich daraufhin stellte, war, ob die sympathische Innervation einen Einfluss auf den Makrophagenphänotyp hat. Um dies beantworten zu können, wurde ein Modell gewählt, welches durch Applikation von 6-OHDA zu einem Untergang der sympathischen Nervenfasern, bzw. einer gestörten sympathischen Weiterleitung und damit zur Denervation führt (siehe Kapitel IV. 3.1.).

3.1. Absinken des Noradrenalinspiegels nach Denervation

Um das Modell der Denervation mittels 6-OHDA zu validieren und zu bestätigen, dass 6-OHDA zu einer Reduktion der sympathischen Innervation führt, wurde der Noradrenalinegehalt in Herz, Lunge und Niere nach Denervation im Vergleich zur Kontrollgruppe mithilfe eines kompetitiven ELISAs (vgl. Kapitel IV. 6.) analysiert.

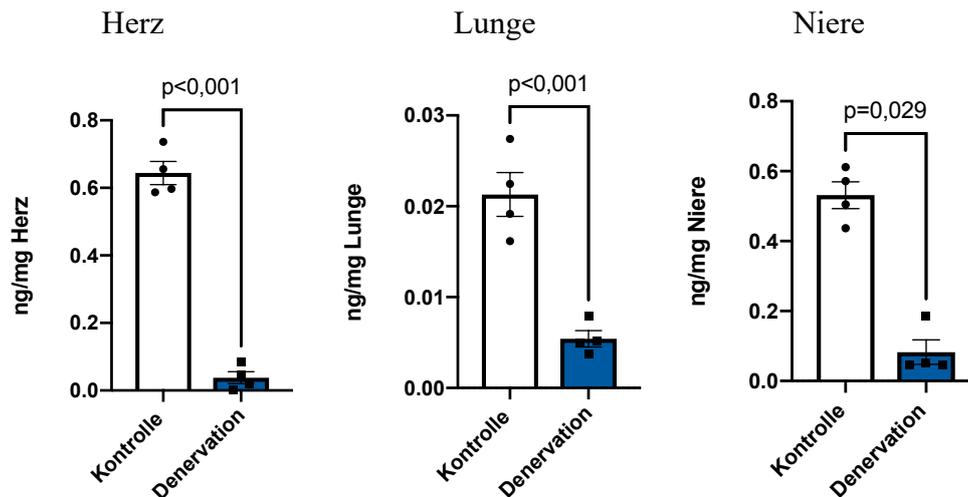


Abbildung 15: Absinken des Noradrenalinpiegels im Gewebe verschiedener Organe nach sympathischer Denervation

Die Versuchsgruppe nach Denervation ist in blau, die Kontrollgruppe in weiß dargestellt. Schwarze Rechtecke bzw. Punkte kennzeichnen jeweils die Einzelwerte. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test, für die Niere wurde der Mann-Whitney-Test angewendet. n=4 Mäuse pro Gruppe

In der Tat konnte nach der Denervation mit 6-OHDA im Herzen und der Lunge eine hochsignifikante ($p < 0,001$) und in der Niere eine signifikante ($p = 0,029$) Reduktion der NoradrenalinKonzentration festgestellt werden. Im Herzen war die NoradrenalinKonzentration in der Versuchsgruppe mit 0,03793 ng/mg Organ 17-mal geringer als in der Kontrollgruppe mit 0,6441 ng/mg Organ. Die Lunge enthielt allgemein weniger Noradrenalin, im Vergleich zu Herz und Niere, aber auch hier war die Konzentration mit 5,41 pg/mg Organ in der Versuchsgruppe viermal niedriger als in der Kontrollgruppe mit 21,29 pg/mg Organ. Im dritten Organ, der Niere, wurde in der denervierten Gruppe ebenfalls ein geringerer Noradrenalin Gehalt als in der Kontrollgruppe gemessen. Mit 0,08259 ng/mg Organ war der Noradrenalin Gehalt 6,5-fach niedriger als in der Kontrollgruppe mit einer Konzentration von 0,5314 ng/mg Organ.

Somit konnte also in allen drei Organen bestätigt werden, dass 6-OHDA zu einer deutlichen Reduktion des Noradrenalin Gehalts im Gewebe führte, was sehr wahrscheinlich auf die gestörte sympathische Innervation zurückzuführen ist (Abb. 15).

3.2. Unveränderte Monozytenzahl nach systemischer Denervation

Um festzustellen, ob es nach systemischer Denervation zu Veränderungen in den Monozytenzahlen kommt, wurde Blut von der Versuchs- und Kontrollgruppe einen Tag nach der letzten 6-OHDA-Gabe entnommen und durchflusszytometrisch analysiert (vgl. IV. 2.2. und 4.3.).

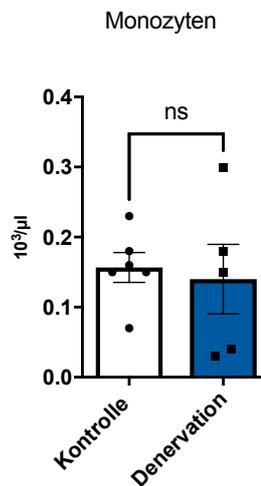


Abbildung 16: Gleichbleibende Monozytenzahl im Blut nach systemischer Denervation

Die Versuchsgruppe nach Denervation ist in blau, die Kontrollgruppe in weiß dargestellt. Schwarze Rechtecke bzw. Punkte kennzeichnen jeweils die Einzelwerte. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test. n=5-6 Mäuse pro Gruppe

Einen Tag nach systemischer Denervation konnte kein signifikanter Unterschied ($p=0,750$) in den Zellzahlen der Monozyten festgestellt werden. Bei den denervierten Tieren lagen die Monozytenkonzentrationen bei $0,14 \times 10^3$ pro Mikroliter, in der Kontrollgruppe bei $0,16 \times 10^3$ pro Mikroliter (Abb. 16).

3.2.1. Abnahme von MHCII^{high} - und Zunahme von MHCII^{low}- Makrophagen im Herzen

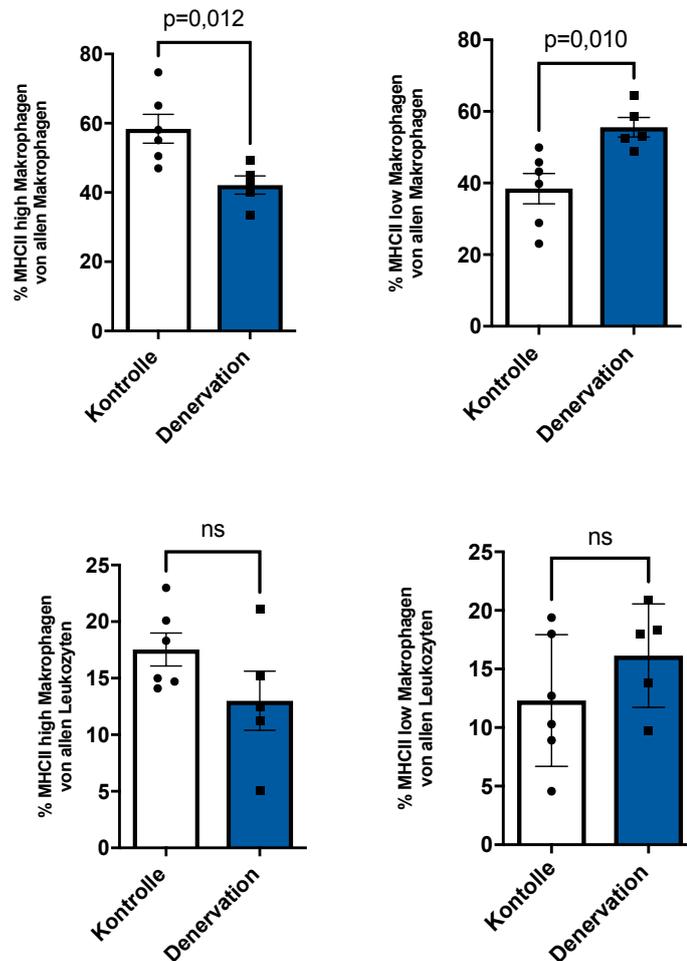


Abbildung 17: MHCII^{high} - Abnahme und MHCII^{low} - Zunahme im Herzen nach systemischer Denervation

Die Versuchsgruppe nach Denervation ist in blau, die Kontrollgruppe in weiß dargestellt. Schwarze Rechtecke bzw. Punkte kennzeichnen jeweils die Einzelwerte. Obere Reihe: Prozentualer Anteil der MHCII^{high} und MHCII^{low} - Population unter allen Makrophagen. Untere Reihe: Prozentualer Anteil der MHCII^{high} und MHCII^{low} - Population unter allen Leukozyten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test. n=5-6 Mäuse pro Gruppe

Im Herzen konnte nach Denervation unter allen Makrophagen ein signifikanter Abfall ($p=0,012$) der MHCII^{high} - Population und eine signifikante Zunahme ($p=0,010$) der MHCII^{low} - Population festgestellt werden. Im Vergleich zur Kontrolle nahm der MHCII^{high} - Anteil in den denervierten Mäusen um knapp 30,0 % von 58,42 % auf 42,16 % ab. Gleichzeitig nahm die MHCII^{low} - Population nach Denervation um fast 45,0 % zu, von 38,45 % in der Kontrollgruppe auf 55,58 % in der denervierten Gruppe.

Unter den Leukozyten konnte ebenfalls nach Denervation ein Abfall der MHCII^{high} - Population um 25,0 % von 17,53 % auf 13,0 % und eine Zunahme der MHCII^{low} - Population um 31,0 % von 12,31 % auf 16,14 % registriert werden, allerdings war sowohl der Abfall ($p=0,148$) als auch die Zunahme ($p=0,249$) nicht statistisch signifikant (Abb. 17).

3.2.2. Abnahme von MHCII^{high} - und Zunahme von MHCII^{low}- Makrophagen in der Lunge

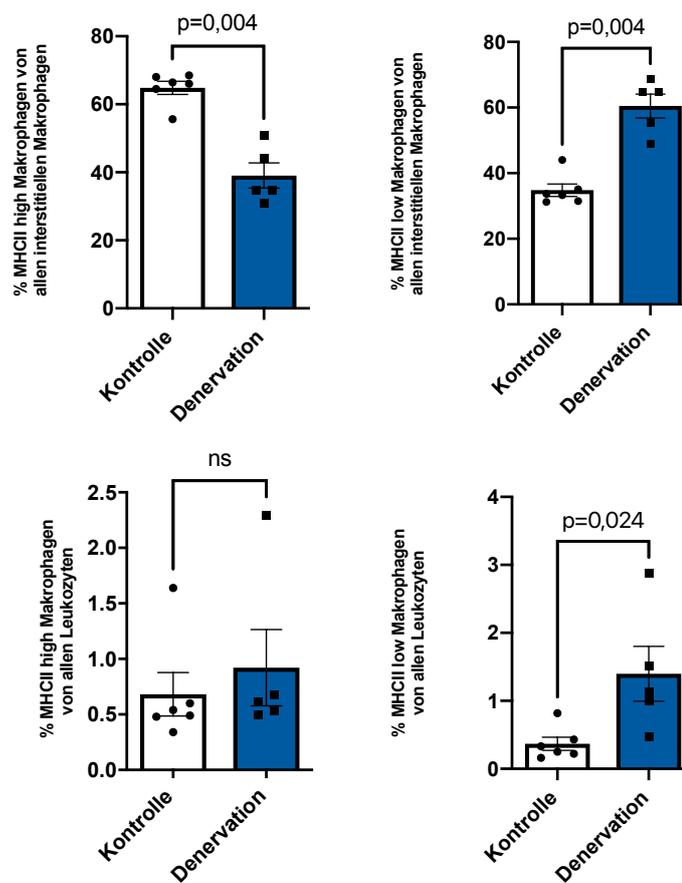


Abbildung 18: MHCII^{high} - Abnahme und MHCII^{low} - Zunahme in der Lunge nach systemischer Denervation

Die Versuchsgruppe nach Denervation ist in blau, die Kontrollgruppe in weiß dargestellt. Schwarze Rechtecke bzw. Punkte kennzeichnen jeweils die Einzelwerte. Obere Reihe: Prozentualer Anteil der MHCII^{high} und MHCII^{low} - Population unter allen interstitiellen Makrophagen. Untere Reihe: Prozentualer Anteil der MHCII^{high} und MHCII^{low} - Population unter allen Leukozyten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test, unten rechts wurde der t-Test angewendet. $n=5-6$ Mäuse pro Gruppe

Einen Tag nach Denervation war in der Lunge eine statistisch signifikante ($p=0,004$) Abnahme der MHCII^{high} - Makrophagen und eine statistisch signifikante ($p=0,004$) Zunahme der MHCII^{low} - Makrophagen zu verzeichnen. Unter den interstitiellen Makrophagen sank die MHCII^{high} - Population im Vergleich zur Kontrolle um fast 40,0 % von 64,83 % auf 39,06 %. Die MHCII^{low} - Population unter den interstitiellen Makrophagen nahm hingegen um knapp drei Viertel von 34,8 % auf 60,48 % im Vergleich zur Kontrolle zu. Auch konnte ein signifikanter Anstieg ($p=0,024$) der MHCII^{low} - Population unter den Leukozyten beobachtet werden. Nach Denervation vervierfachte sich diese Population nahezu (von 0,37 % auf 1,4 %). Bei Betrachtung der MHCII^{high} - Makrophagen unter den Leukozyten war ebenfalls ein Anstieg ($p=0,247$) der MHCII^{high} - Population zu sehen. Diese stieg um 35,0 % von 0,68 % auf 0,92 % (Abb. 18).

3.2.3. Abnahme von MHCII^{high} - und Zunahme von MHCII^{low} - Makrophagen in der Niere

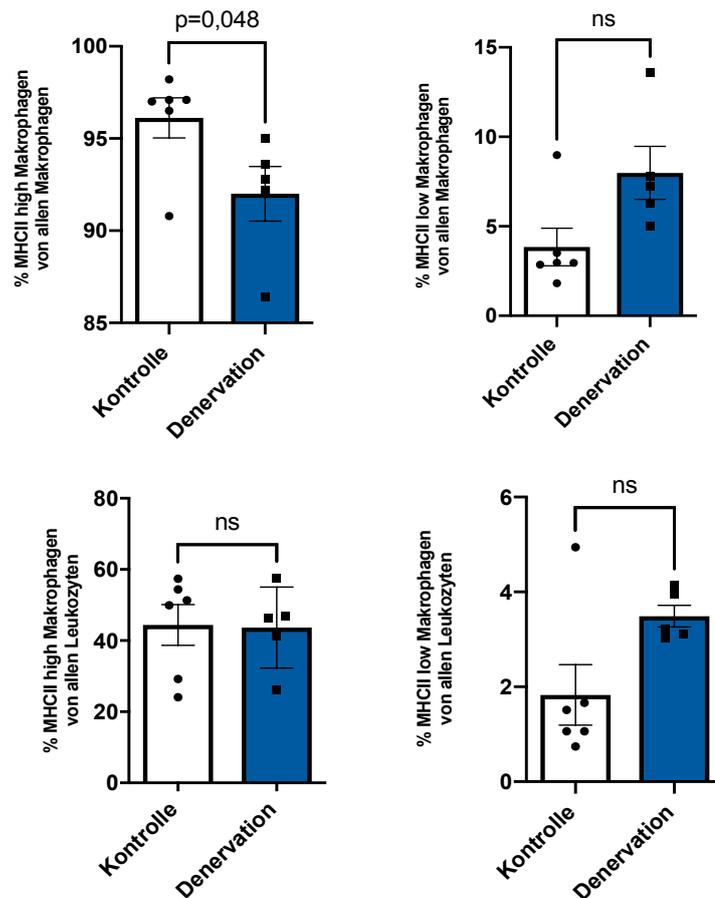


Abbildung 19: MHCII^{high} - Abnahme und MHCII^{low} - Zunahme in der Niere nach systemischer Denervation

Die Versuchsgruppe nach Denervation ist in blau, die Kontrollgruppe in weiß dargestellt. Schwarze Rechtecke bzw. Punkte kennzeichnen jeweils die Einzelwerte. Obere Reihe: Prozentualer Anteil der MHCII^{high} und MHCII^{low} - Population unter allen Makrophagen. Untere Reihe: Prozentualer Anteil der MHCII^{high} und MHCII^{low} - Population unter allen Leukozyten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test, unten links wurde der t-Test verwendet. n=5-6 Mäuse pro Gruppe

Nach Denervation konnte in der Niere, wie auch schon in Herz und Lunge, ein Abfall der MHCII^{high} - und eine Zunahme der MHCII^{low} - Population beobachtet werden. Die MHCII^{high} - Population der denervierten Mäuse nahm in der Niere signifikant (p=0,048) ca. 4,0 % von 96,12 % auf 92,0 % ab. Hingegen stieg die MHCII^{low} - Population im Vergleich zur Kontrollgruppe annähernd signifikant (p=0,052) um mehr als das Doppelte von 3,85 % auf 7,98 % an. Bei der MHCII^{high} - Population unter den Leukozyten war nach Denervation eine ca. zweiprozentige, nicht signifikante (p=0,927)

Abnahme von 44,38 % auf 43,64 % zu sehen. MHCII^{low} stieg dagegen um 90 % nicht signifikant ($p=0,076$) von 1,83 % auf 3,49 % an (Abb. 19).

3.3. Lokale Denervation der Lunge reproduziert Befunde der systemischen Denervation

Durch die systemische Denervation konnte ein Abfall der MHCII^{high} - Population und ein Anstieg der MHCII^{low} - Population in verschiedenen Organen festgestellt werden. Als Nächstes musste ausgeschlossen werden, dass diese Veränderungen nicht auf systemische Störfaktoren zurückzuführen waren, die durch 6-OHDA hervorgerufen werden könnten. Dazu wurde das Modell der intranasalen Applikation gewählt, um die Lunge lokal denervieren zu können (vgl. IV. 3.1.2). Um den Effekt der lokalen Denervation zu untersuchen, wurden die Lungen einen Tag nach der zweiten intranasalen Applikation entnommen und durchflusszytometrisch analysiert.

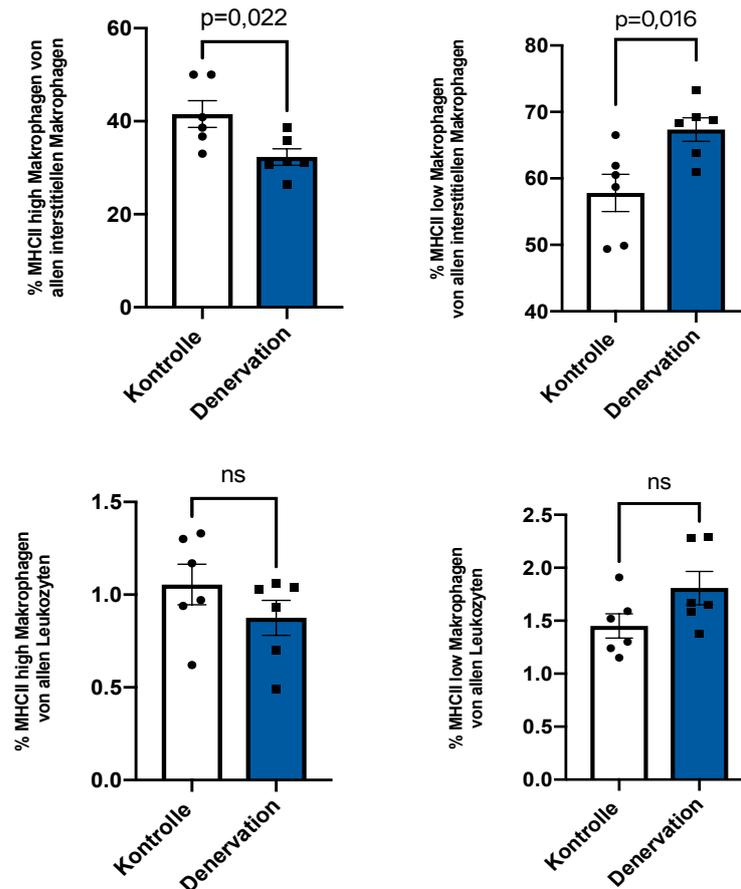


Abbildung 20: MHCII^{high} - Abnahme und MHCII^{low} - Zunahme in der Lunge nach lokaler Denervation

Die Versuchsgruppe nach Denervation ist in blau, die Kontrollgruppe in weiß dargestellt. Schwarze Rechtecke bzw. Punkte kennzeichnen jeweils die Einzelwerte. Obere Reihe: Prozentualer Anteil der MHCII^{high} - und MHCII^{low} - Population unter allen interstitiellen Makrophagen. Untere Reihe: Prozentualer Anteil der MHCII^{high} - und MHCII^{low} - Population unter allen Leukozyten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test. n=6 Mäuse pro Gruppe

Die lokale Applikation des 6-OHDAs führte zu ähnlichen Veränderungen wie die systemische. Dabei nahm die MHCII^{high} - Population in der Versuchsgruppe signifikant (p=0,022) um 22,0 % von 41,53 % auf 32,32 % ab. Gleichzeitig war ein signifikanter Anstieg (p=0,016) um 16,0 % in der MHCII^{low} - Population der denervierten Tiere zu beobachten (von 57,82 % auf 67,35 %). Ähnliche Veränderungen konnten auch bei Betrachtung der MHCII - Population unter den Leukozyten festgestellt werden. MHCII^{high} sank im Vergleich zur Kontrollgruppe, allerdings nicht signifikant (p=0,242) um 17,0 % von 1,06 % auf 0,88 %, wo hingegen die MHCII^{low} - Population nach Denervation, ebenfalls nicht signifikant (p=0,096), um ein Viertel von 1,45 % auf 1,81 % anstieg (Abb. 20).

Um die vorliegenden Ergebnisse noch einmal besser zu veranschaulichen, wurde mithilfe der Software FlowJo 10.3., mit dem Datensatz eine t-SNE -basierte Reduzierung der Dimensionalität vorgenommen. t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) ist eine Methode, um hochdimensionale Daten in weniger Dimensionen zu veranschaulichen, ohne dass die Struktur der Daten verloren geht. Dabei wird jedem Datenpunkt eine Position in einer zwei- oder dreidimensionalen Karte zugewiesen [174]. Je ähnlicher sich die Zellen sind, desto näher liegen die Datenpunkte zusammen und je unähnlicher sie sich sind, desto weiter entfernt sind die Punkte voneinander.

Zunächst einmal wurden Versuchs- und Kontrollgruppe zusammen dargestellt (Abb. 21 A). Dabei kennzeichnen rote Bereiche viele Zellen und blaue Bereiche wenig Zellen. Anschließend konnten, anhand des Oberflächenmarkers MHCII, die beiden Populationen MHCII^{high} und MHCII^{low} gut voneinander abgegrenzt werden. In roten Arealen wurde viel MHCII exprimiert und in grünen weniger (Abb. 21 B). Nachfolgend wurde die gepoolte Darstellung beider Gruppen jeweils in die Versuchs- und Kontrollgruppe aufgeteilt und die zuvor ermittelten Gates auf die beiden Proben gezogen (Abb. 21 C+D). Damit konnte noch einmal deutlich gemacht werden, dass die MHCII^{high} - Makrophagenpopulation in der Lunge nach Denervation im Vergleich zu den Kontrollmäusen abnimmt und die MHCII^{low} - Makrophagenpopulation zunimmt.

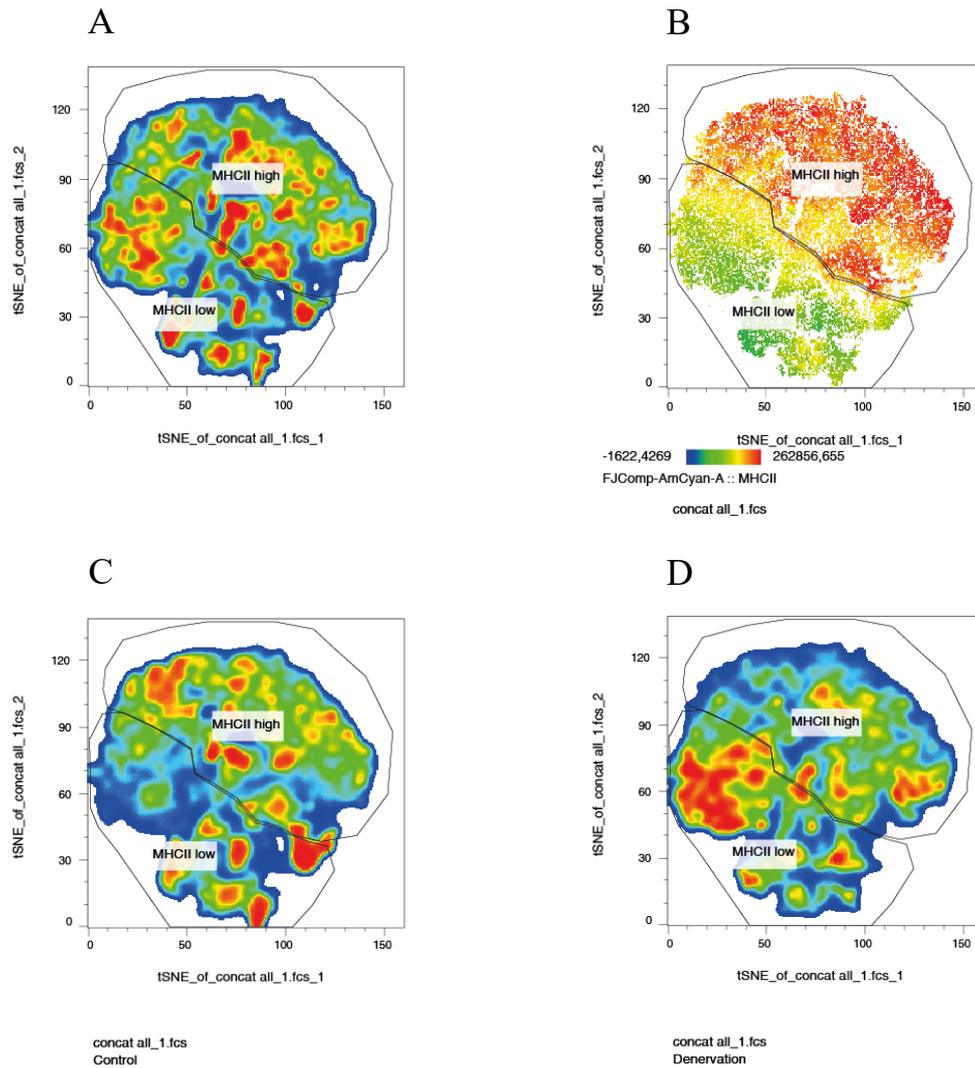


Abbildung 21: t-SNE - basierte Darstellung der Makrophagenpopulationen nach lokaler Denervation der Lunge

A: Gemeinsame Darstellung der Zellen von denervierten Mäusen und Kontrolltieren; B: Abgrenzung der beiden MHCII - Populationen, Gates wurden auf MHCII^{high} und MHCII^{low} gesetzt; C: Kontrollgruppe mit MHCII^{high} - und ^{low} - Gates; D: denervierte Versuchsgruppe mit MHCII^{high} - und ^{low} - Gates. n=6 Mäuse pro Gruppe

3.3.1. Phänotypische Veränderung der MHCII^{low} - Makrophagenpopulation nach lokaler Denervation

In einem weiteren Schritt wurden die beiden Populationen noch einmal genauer charakterisiert. Dazu wurden die sogenannten MFIs (Mean Fluorescence Intensity) zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe verglichen. Innerhalb der Experimentalgruppe sowie der Kontrollgruppe war jeweils der höchste Wert der mittleren Fluoreszenzintensität eines Oberflächenmarkers mit 1 gleichgesetzt. Die anderen Fluoreszenzintensitäten wurden anschließend relativ dazu ins Verhältnis gesetzt. Je näher der Wert an 1 war, desto stärker war das Signal des konjugierten Antikörpers.

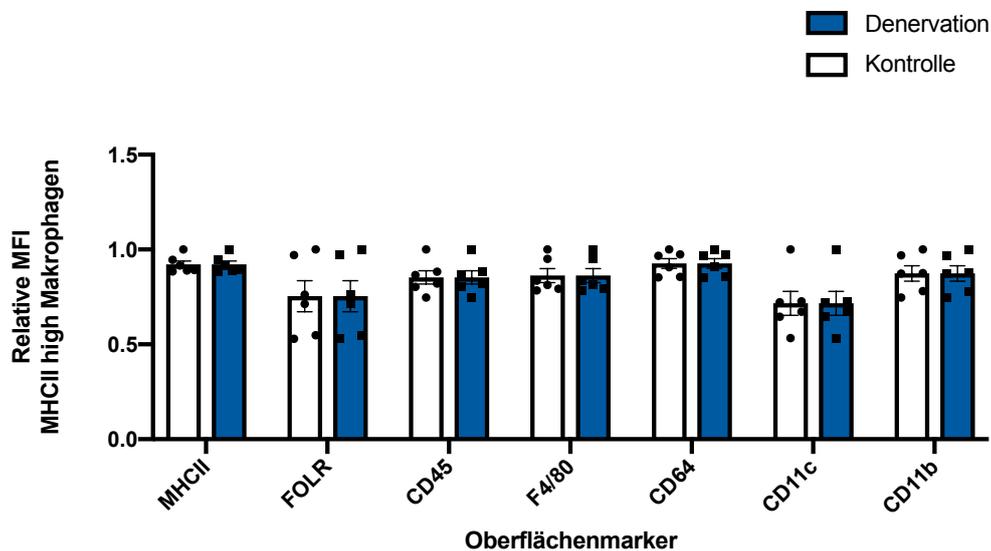


Abbildung 22: Relative MFIs verschiedener Oberflächenmarker der MHCII^{high} - Population

Dargestellt sind die relativen MFIs verschiedener Oberflächenmarker der MHCII^{high} - Makrophagenpopulation von denervierten und Kontrollmäusen. Die Versuchsgruppe nach lokaler Denervation der Lunge ist in blau, die Kontrollgruppe in weiß dargestellt. Schwarze Rechtecke bzw. Punkte kennzeichnen jeweils die Einzelwerte. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Multiple t - Test. n=6 Mäuse pro Gruppe

Es gab keinen Unterschied der relativen MFIs der MHCII^{high} - Makrophagenpopulation der Lunge zwischen denervierten und Kontrolltieren (Abb. 22). Alle P-Werte lagen über 0,999 und waren somit nicht statistisch signifikant.

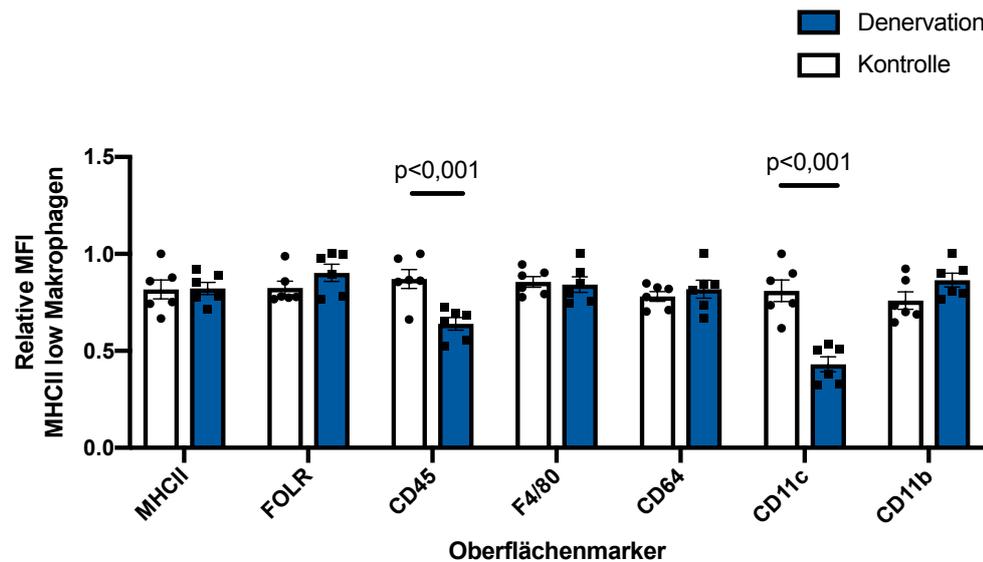


Abbildung 23: Relative MFIs von CD45 und CD11c nehmen nach lokaler Denervation der Lunge auf der MHCII^{low} - Population ab

Dargestellt sind die relativen MFIs verschiedener Oberflächenmarker der MHCII^{low} - Makrophagenpopulation von denervierten und Kontrollmäusen. Die Versuchsgruppe nach lokaler Denervation der Lunge ist in blau, die Kontrollgruppe in weiß dargestellt. Schwarze Rechtecke bzw. Punkte kennzeichnen jeweils die Einzelwerte. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Multiple t - Test. n=6 Mäuse pro Gruppe

CD45 und CD11c zeigten statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,001$). Die relative MFI von CD45 war in der Versuchsgruppe mit einer relativen mittleren Fluoreszenzintensität von 0.6394 um 27,0 % niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 0.871. Bei CD11c war die relative MFI der denervierten Gruppe mit 0.431 um fast die Hälfte geringer als die der Kontrollmäuse mit 0.810. Die Analyse von MHCII ($p=0.928$), FOLR ($p=0.196$), F4/80 ($p=0.794$), CD64 ($p=0.495$) und CD11b ($p=0.097$) ergab keine statistischen Signifikanzen (Abb. 23).

3.4. Repolarisierung der MHCII^{high} - Makrophagen zu MHCII^{low} - Makrophagen nach sympathischer Denervation

In verschiedenen Organen und mit zwei unterschiedlichen Denervationsmodellen konnte gezeigt werden, dass die Denervation der sympathischen Nervenfasern eine Veränderung des Makrophagenexpressionsprofils bewirkt. Makrophagen, die im Grundzustand eine hohe MHCII-Expression zeigten, nahmen ab, und Makrophagen mit geringer MHCII-Expression nahmen zu. An diesem Punkt stellte sich nun die Frage, wie diese Verschiebung der Populationen zustande kommt:

1. Werden in denervierten Mäusen weniger MHCII^{high} - Makrophagen rekrutiert?
2. Oder werden umgekehrt mehr MHCII^{low} - Makrophagen rekrutiert?
3. Findet eine Repolarisierung der MHCII^{high} - Makrophagen zu MHCII^{low} statt?
4. Gibt es einen tatsächlichen Untergang der CX3CR1^{high}MHCII^{high} - Makrophagen?

Da interstitielle Makrophagen konstant durch Monozyten ersetzt werden [113, 175], wurden zur Klärung der Frage Cx3cr1^{CreERT2} x Rosa26^{tdTomato} - Mäuse (siehe Kapitel IV. 1.2.3.) verwendet. Um sicherzustellen, dass alle Blutmonozyten, die aufgrund der aktivierten Cre-Rekombinase ebenfalls tdTomato exprimierten, nahezu vollständig durch neue, unmarkierte Monozyten ersetzt waren und nur noch interstitielle Immunzellen tdTomato exprimierten, wurde zwischen der Denervation (siehe Kapitel IV. 3.1.1.) und der letzten Tamoxifengabe ein Abstand von drei Wochen eingehalten.

Initial zeigten einen Tag nach der letzten Tamoxifengabe 59,0 % der Blutmonozyten ein tdTomato-positives Signal. Nach einer Woche waren noch 46,1 % tdTomato positiv, nach 2 Wochen 30,8 % und nach 3 Wochen zeigten nur noch 0,13 % der Blutmonozyten ein rotes tdTomato-Signal (Abb. 24).

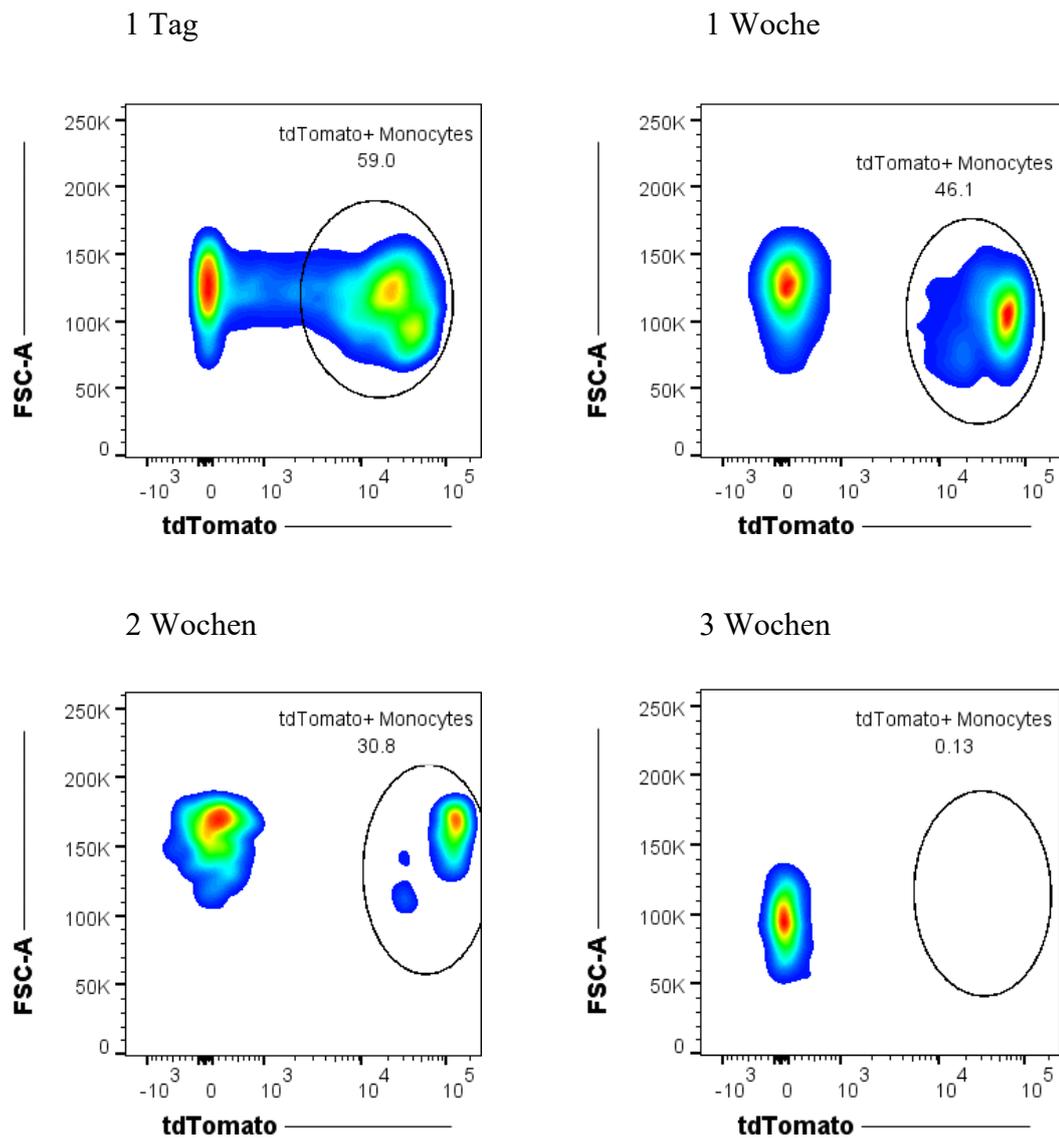


Abbildung 24: Abnahme der tdTomato⁺ Blutmonozyten im Verlauf bis drei Wochen nach der letzten Tamoxifengabe, dargestellt in Dot Plots nach FACS-Analyse

Dargestellt ist eine Abbildung der Gates von tdTomato⁺ Blutmonozyten einer Cx3cr1^{CreERT2} x Rosa26^{tdTomato}-Maus einen Tag, eine, zwei und drei Wochen nach der letzten Tamoxifengabe. Gates wurden in folgender Reihenfolge gesetzt: Einzelzellen (Ausschluss von Zellfragmenten und Zelldoubletten), Größe der Zellen anhand SSC und FSC, Leukozyten (CD45⁺), Monozyten (CD115⁺), tdTomato⁺ (PE⁺). n=2-3 Mäuse

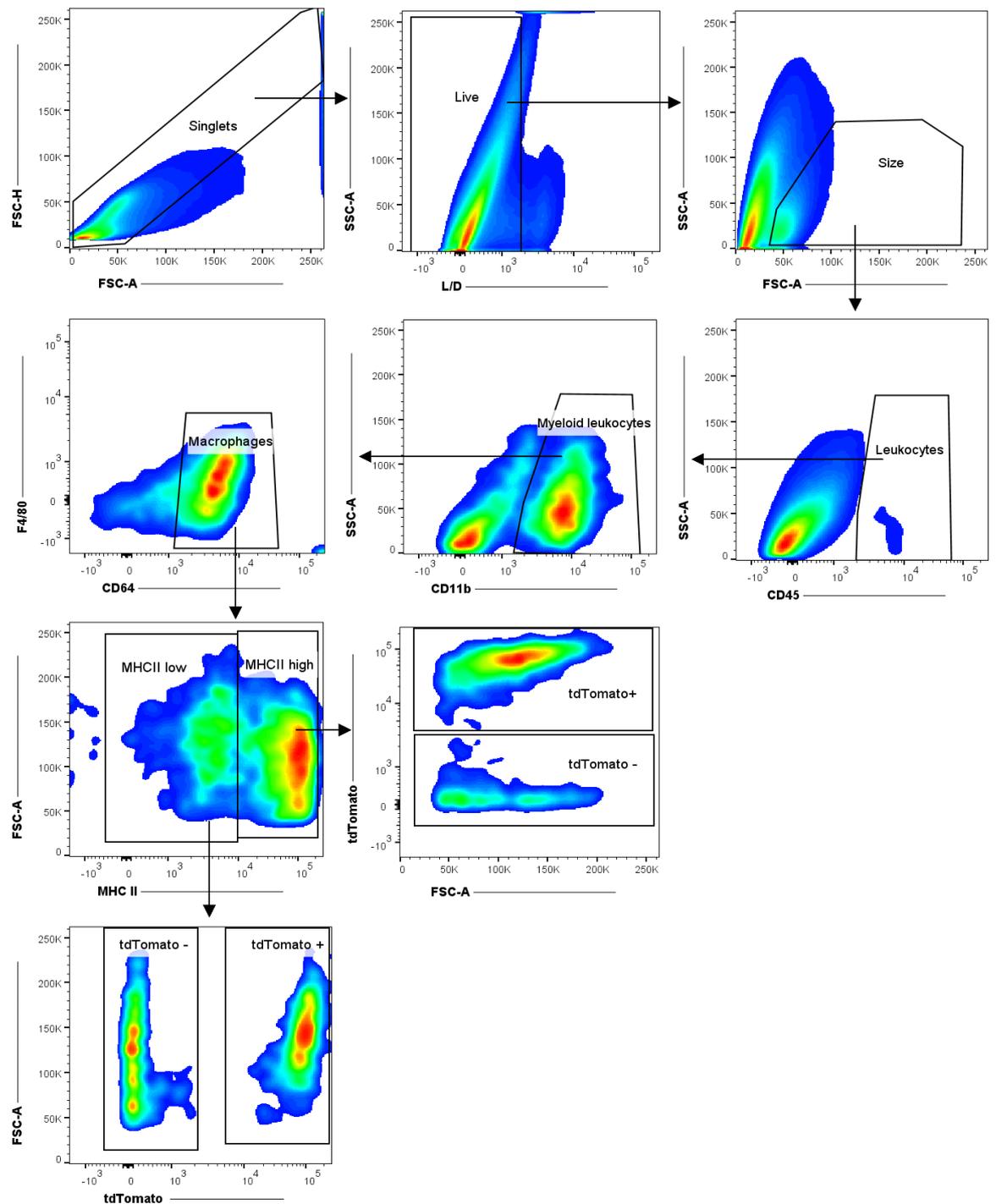


Abbildung 25: Gatingstrategie des *Fate Mapping*-Versuchs im Herzen, dargestellt in Dot Plots

Dargestellt ist eine Abbildung der Gating-Strategie, die für die FACS-Analyse des Herzens einer $Cx3cr1^{CreERT2} \times Rosa26^{tdTomato}$ -Maus verwendet wurde. Gates wurden in folgender Reihenfolge gesetzt: Einzelzellen (Ausschluss von Zellfragmenten und Zeldubletten), lebende (Sytox Green negative) Zellen, Größe und Granularität der Zellen anhand SSC und FSC, Leukozyten ($CD45^+$), myeloide Leukozyten ($CD11b^+$), Makrophagen ($F4/80^+ CD64^+$), $MHCII^{high}$ & low ($MHCII$), $tdTomato^+$ & $tdTomato^-$ $MHCII^{high}$ - Makrophagen, $tdTomato^+$ & $tdTomato^-$ $MHCII^{low}$ - Makrophagen. $n=4$ Mäuse pro Gruppe

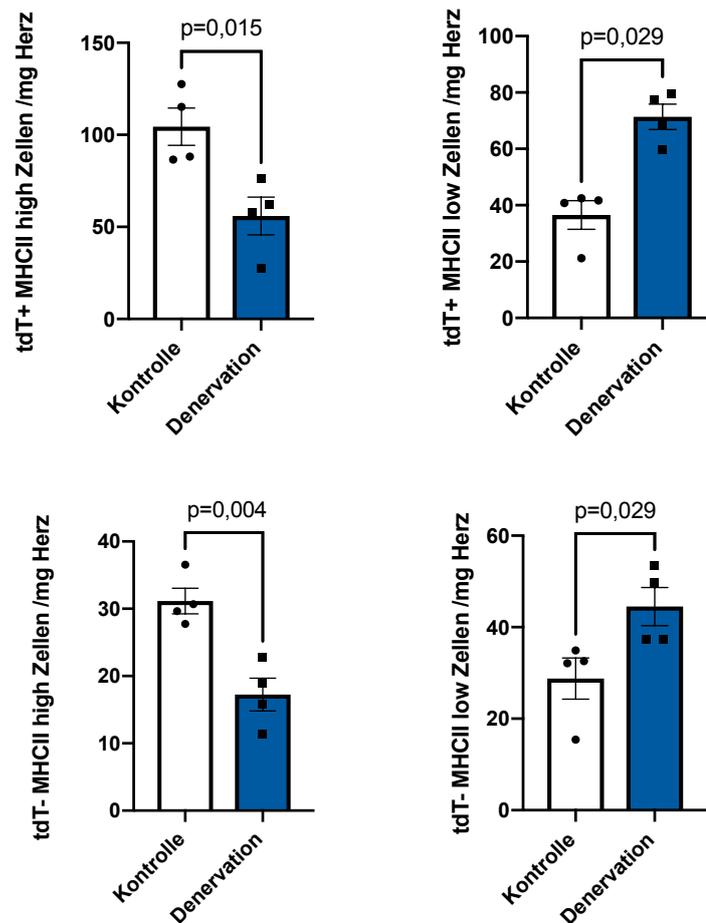


Abbildung 26: Absolutzahlen der tdTomato⁺ und tdTomato⁻ MHCII^{high} - und MHCII^{low} - Makrophagen im Herzen nach systemischer Denervation

Die Versuchsgruppe nach Denervation ist in blau, die Kontrollgruppe in weiß dargestellt. Schwarze Rechtecke bzw. Punkte kennzeichnen jeweils die Einzelwerte. Obere Reihe: Absolutzahlen der tdTomato⁺ MHCII^{high}- und MHCII^{low} - Makrophagen pro mg Herz. Untere Reihe: Absolutzahlen der tdTomato⁻ MHCII^{high}- und MHCII^{low} - Makrophagen pro mg Herz. Die statistische Auswertung erfolgte oben und unten links jeweils mittels t-Test, oben und unten rechts wurde jeweils der Mann-Whitney-Test angewendet. n=4 Mäuse pro Gruppe

Nachdem die Cx3cr1^{CreERT2} x Rosa26^{tdTomato} - Mäuse systemisch durch 6-OHDA denerviert wurden, konnte ein generelles Absinken der MHCII^{high} - Population und ein Anstieg der MHCII^{low} - Population in den denervierten Tieren festgestellt werden. Die ursprünglich vorhandenen tdTomato^{positiven} MHCII^{high} - Makrophagen nahmen signifikant (p=0,015) um fast die Hälfte ab, von 104,4 Zellen/mg Organ in der Kontrollgruppe auf 55,92 Zellen/mg Organ in der denervierten Gruppe. In der tdTomato^{positiven} MHCII^{low} - Population verdoppelten sich die Zellzahlen signifikant (p=0,029) nach Denervation von 36,54 Zellen/mg Organ auf 71,39 Zellen/mg Organ. Die tdTomato^{negativen} MHCII^{high} - Makrophagen nahmen in der denervierten Gruppe signifikant (p=0,004) um etwas weniger als die Hälfte von 31,16 Zellen/mg Organ in

der Kontrollgruppe auf 17,25 Zellen/mg Organ ab. Unter den tdTomato^{negativen} MHCII^{low} - Makrophagen stieg die Population nach Denervation signifikant ($p=0,029$) um mehr als die Hälfte von 28,77 Zellen/mg Organ auf 44,50 Zellen/mg Organ (Abb. 26).

VI. DISKUSSION

1. Makrophagen bilden Kontakte mit sympathischen Nervenfasern

Für eine orientierende Darstellung, wie häufig Makrophagen um Nerven bzw. Gefäße lokalisiert sind, wurden zunächst histologische Kryoschnitte von verschiedenen Organen angefertigt. Da Cx3cr1^{GFP}-Mäuse verwendet wurden, waren Makrophagen bereits durch ihr endogenes GFP-Signal grün markiert, weshalb nur noch Nerven, Gefäße bzw. das Gefäßendothel und Zellkerne angefärbt wurden. Auch wenn in Cx3cr1^{GFP}-Mäusen noch andere Zellarten, wie Monozyten, Unterarten von natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen oder der Mikroglia, unter Kontrolle des CX3CR1-Rezeptors GFP exprimieren [159], wird dieser Rezeptor vielfach genutzt, um Makrophagen mikroskopisch darzustellen [121, 127, 176].

Im Mesenterium, Herz und Magen hatten die CX3CR1^{positiven} Makrophagen deutlich häufiger Kontakt zu Nervenfasern als zu Gefäßen. Eine Ausnahme stellte die Lunge dar, bei der Makrophagen ähnlich viele Kontakte zu Nerven wie zu Gefäßen zeigten. Dies erklärt sich dadurch, dass aufgrund der Lungenbläschen, im Vergleich zu den anderen Organen, eine ausgeprägtere Mikrozirkulation vorhanden ist. Erwähnenswert ist, dass sich die Makrophagen-Nerv-Kontakte teilweise synapsenähnlich darstellten. Mit einer zweiten Färbung wurden in verschiedenen Organen, darunter Mesenterium, Herz, Lunge und Magenwand, die Kontakte zwischen Makrophagen und sympathischen Nervenfasern visualisiert.

Grundsätzlich ist die histologische Untersuchung von Gewebeschnitten, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt wurden, eine geeignete Methode, um Antigene nachzuweisen und zu lokalisieren [177]. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass mit dieser Methode nur eine zweidimensionale Analyse des Gewebes erfolgen kann. Komplexere Strukturen, die über mehrere Ebenen verlaufen, wie beispielsweise Nerven oder Gefäße, oder aber tiefer liegende Strukturen, können damit nur unzureichend analysiert werden. Somit wäre zu überlegen, ob man nicht ein 3D-Verfahren, wie beispielsweise iDISCO, verwenden könnte, um Makrophagen-Nerv-Kontakte genauer zu quantifizieren. Durch die optische Reinigung des Gewebes wird es lichtdurchlässig, wodurch immunmarkierte Strukturen auch in größeren Gewebevolumina präzise dargestellt und analysiert werden können [178]. Ein Nachteil

dabei ist allerdings, dass sich nicht alle Organe gleichermaßen gut optisch reinigen lassen, vor allem, wenn sie eine größere Menge an extrazellulärer Matrix besitzen [179]. Zudem wäre die Anwendung der iDISCO-Methode in der Lunge mit 7 bis 10 Tagen auch sehr zeitaufwendig [153]. Aus diesem Grund und weil wir zunächst eine orientierende Darstellung von der Verteilung der Makrophagen um Nerven und Gefäße erhalten wollten, wurden verschiedene Gesichtsfelder von mehreren histologischen Kryoschnitten analysiert.

Neben der Verwendung von Cx3cr1^{GFP}- Mäusen, bei denen nur die CX3CR1⁺ Zellen endogen markiert sind, könnte man für die Zukunft in Betracht ziehen, für weitere histologische Untersuchungen eine Th1-Cre x Rosa26-tdTomato x Cx3cr1^{GFP}- Maus zu züchten. In dieser Linie lassen sich Makrophagen durch ihr endogenes Signal in grün und sympathische Nervenfasern, nach Aktivierung der Cre-Rekombinase, in rot darstellen. Das hätte den Vorteil, dass die Sichtbarkeit der sympathischen Nervenfasern nicht von der Bindungsaffinität und der Spezifität eines Antikörpers abhängig wäre. Würde man bei dieser Mauslinie Gewebeschnitte zusätzlich mit Tubulin-3 anfärben, könnte man anhand der doppelt positiven sympathischen Nervenfasern relativ einfach eine Aussage darüber treffen, wie viel Prozent der Nerven, die mit Makrophagen assoziiert sind, auch einen sympathischen Ursprung haben. Damit hätte man die Möglichkeit zu zeigen, um welche Art von Nerv es sich bei den beobachteten Makrophagen-Nerv-Kontakten handelt. Gleichzeitig könnte man die Interaktionen zwischen Makrophagen und sympathischen Nerven bzw. Makrophagen und nicht-sympathischen Nerven konkret ins Verhältnis setzen.

Der Kontakt zwischen Makrophagen und Nerven hat bei genauerer Betrachtung zum Teil einen synapsenähnlichen Charakter. In der Literatur wird die Kommunikation zwischen Nerven- und Immunzellen kontrovers diskutiert: Auf der einen Seite ist beschrieben, dass sympathische Nervenfasern direkt mit Immunzellen assoziiert sind und Synapsen bilden [137, 139], auf der anderen Seite gibt es aber auch die Meinung, dass Neurotransmitter nicht-synaptisch in die Umgebung abgegeben werden [134-136]. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob es sich bei den Makrophagen-Nerv-Kontakten in unseren Gewebeschnitten um Synapsen, freie Nervenendigungen oder um einfache Nervenassoziationen handelt, wäre beispielsweise eine immunhistochemische Färbung mit einem Synaptophysin-Antikörper sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen hilfreich. Mittels Synaptophysin, das in präsynaptischen Vesikeln von Neuronen vorkommt [180], könnten die Vesikel angefärbt werden, wodurch man

einfache Nervenassoziationen ohne synaptische Vesikel abgrenzen könnte [181]. Durch anschließende Elektronenmikroskopie wäre eine noch detailliertere Unterscheidung zwischen Synapsen und freien Nervenendigungen möglich [182].

2. Einteilung der Makrophagen in eine CX3CR1^{high}MHCII^{high} und CX3CR1^{low}MHCII^{low} – Population

Nachdem wir zeigen konnten, dass viele der gewebsresidenten Makrophagen dicht um Nerven bzw. sympathische Nervenfasern lokalisiert waren, sollte das Oberflächenexpressionsprofil dieser Makrophagen im Grundzustand näher charakterisiert werden. In einer Publikation von Chakarov und Kollegen konnten zwei verschiedene Populationen von interstitiellen Makrophagen beschrieben werden: Zum einen LYVE1^{high}MHCII^{low}CX3CR1^{low}, die vor allem mit Blutgefäßen assoziiert waren und zum anderen LYVE1^{low}MHCII^{high}CX3CR1^{high}, die mit Nerven assoziierten [113].

Ausgehend von dieser Charakterisierung untersuchten wir mithilfe von durchflusszytometrischen Analysen das Expressionsprofil von Makrophagen in Herz, Lunge und Niere. Sowohl im Herzen als auch in der Lunge konnten wir nachweisen, dass CX3CR1^{high}-Makrophagen in der Tat viel MHCII exprimieren und CX3CR1^{low}-Makrophagen eine geringe MHCII-Expression aufweisen. In der Niere konnte ebenfalls zwischen CX3CR1^{high} und CX3CR1^{low} unterschieden werden, allerdings hatten beide Populationen eine hohe MHCII-Expression. Wie Lever *et. al.* nachweisen konnten, ändern Nierenmakrophagen mit fortschreitender Entwicklung ihren MHCII-Phänotypen. Am Tag 14,5 der Embryonalentwicklung zeigen sie nahezu gar keine MHCII-Expression, wohingegen ab dem 28. Tag nach der Geburt alle Nierenmakrophagen im Grundzustand eine hohe MHCII-Expression aufweisen, die auch in der adulten Maus unter physiologischen Bedingungen bestehen bleibt [183].

Neben der Charakterisierung der MHCII^{low}CX3CR1^{low} und der MHCII^{high}CX3CR1^{high} Population und deren Assoziation zu Gefäßen bzw. Nerven, konnten Chakarov *et. al.* auch funktionelle Unterschiede feststellen. Die RNA-Sequenzierung der beiden Populationen zeigte, dass das Transkriptom der MHCII^{low}CX3CR1^{low}-Makrophagen mehr Gene aufwies, die mit der Wundheilung in Zusammenhang stehen, wohingegen MHCII^{high}CX3CR1^{high}-Makrophagen höhere Expressionslevel an Genen besaßen, die mit der Antigenpräsentierung in Verbindung gebracht wurden [113].

Damit übereinstimmend, wird den MHCII^{low}-Makrophagen im Herzen auch in anderen Publikationen eine vermehrte phagozytotische Aktivität zugeschrieben. Auf der anderen

Seite wurde gezeigt, dass MHCII^{high}-Makrophagen neben ihrer hohen antigenpräsentierenden Funktion ebenfalls eine starke Phagozytose aufweisen, was anhand eines Phagozytose-Assays und anschließender durchflusszytometrischer Analysen nachgewiesen wurde [184, 185]. Aufgrund der MHCII-Expression in interstitiellen Makrophagen der Lunge, ist eine antigenpräsentierende Funktion denkbar [186]. Allerdings konnten Gong *et. al.* zeigen, dass interstitielle Makrophagen sehr stark phagozytotisch aktiv sind und selbst nach IFN- γ -Stimulation nur eine geringe antigenpräsentierende Fähigkeit besitzen [187]. Somit sind die funktionellen Eigenschaften der beiden Populationen zum jetzigen Zeitpunkt noch unzureichend geklärt und müssen weiter erforscht werden.

3. Veränderte Zusammensetzung der Makrophagenpopulation nach Denervation

Mithilfe von durchflusszytometrischen Analysen konnten wir die beiden durch Chakarov und Kollegen beschriebenen interstitiellen Makrophagenpopulationen bestätigen. Da in der Literatur bislang nur wenig darüber bekannt ist, inwieweit die Sympathikusaktivität einen Einfluss auf den Makrophagenphänotypen hat, wählten wir ein Modell zur Denervation, bei dem die Gabe des katecholaminergen Neurotoxins 6-OHDA zu einem Untergang der sympathischen Nervenfasern führt. Durch Hemmung der Komplexe I und IV der Atmungskette, der Bildung von freien Sauerstoffradikalen sowie der irreversiblen Modifikation der Dopaminaufnahmestelle, kommt es zu einer gestörten neuronalen Weiterleitung und einem Untergang der sympathischen Nervenfasern [166].

Um die Methodik der sympathischen Denervation zu validieren, wurden die NoradrenalinKonzentrationen in Herz, Lunge und Niere durch einen ELISA bestimmt. Im Herz war die Konzentration nach Denervation 17-fach niedriger als in der Kontrollgruppe. In der Lunge wurde ein 4-fach geringerer Noradrenalin Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen, und auch in der Niere betrug die Noradrenalin Konzentration weniger als 1/6 der Konzentrationen der Kontrolltiere. Somit konnten wir nachweisen, dass es durch die systemische Applikation von 6-OHDA zu einer deutlichen Reduktion des Noradrenalin Gehaltes kommt, was sehr wahrscheinlich auf die gestörte sympathische Innervation zurückzuführen ist.

Nach intraperitonealer Applikation des 6-OHDA, konnte sowohl im Herzen, der Lunge und der Niere bei Betrachtung der Makrophagenpopulationen ein signifikanter Abfall

der MHCII^{high} - Population beobachtet werden. Gleichzeitig stieg die MHCII^{low} - Population in Herz und Lunge signifikant und in der Niere annähernd signifikant ($p=0,052$) an. Die Monozytenzellzahlen im Blut veränderten sich nicht signifikant.

Ydens *et. al.* konnten nach einer Nervenquetschung des Ischiasnervs ebenfalls ein deutliches Absinken der MHCII-Expression in Ischiasnerv-Makrophagen beobachten, wobei die Expression mit fortschreitender Heilung fast wieder bis auf den Ursprungswert anstieg [117]. Dass die (sympathische) Innervation aber nicht nur einen Einfluss auf den Makrophagenphänotypen hat, sondern auch die Proliferation von Makrophagen-Vorläuferzellen beeinflusst, wurde in einer Arbeit von Vasamsetti *et. al.* gezeigt. Darin ist beschrieben, dass die Ausschaltung der sympathischen Innervation in der Milz zu einer verringerten Proliferation der Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen führt und zudem auch die Entwicklung myeloider Zellen hemmt [151].

Es stellt sich an diesem Punkt die Frage, wie sich diese Veränderungen auf die Abwehrfunktion des Körpers auswirken könnten. Über den MHCII - Komplex präsentieren Makrophagen auf ihrer Zelloberfläche Bestandteile von zuvor phagozytierten Antigenen an CD4+ T-Zellen, wodurch diese aktiviert werden und eine Immunantwort vermitteln [107, 108, 112]. Bedeutet also das Absinken der MHCII-Expression nach Denervation insgesamt eine schlechtere Antigenpräsentation mit geringerer T-Zellaktivierung? Hat die Denervation in gewisser Weise eine immunsupprimierende bzw. entzündungshemmende Wirkung, oder wird die reduzierte antigenpräsentierende Funktion der Makrophagen durch andere „professionelle“ antigenpräsentierende Zellen wie B-Zellen und dendritische Zellen kompensiert [107-109]?

Des Weiteren gibt es neben diesen Zellen noch andere Immunzellen, wie basophile und neutrophile Granulozyten oder Mastzellen, die sich in gewissem Umfang an der Antigenpräsentation beteiligen könnten [188]. Und auch nicht-Immunzellen wie Typ 2 Pneumozyten exprimieren hohe Mengen an MHCII, wobei allerdings darauf hingewiesen werden muss, dass die antigenpräsentierende Kapazität im Vergleich zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen deutlich geringer ausfällt [189].

In einer Publikation von Liu und Kollegen konnte hingegen gezeigt werden, dass die sympathische Denervation der Lunge zu einer gesteigerten Immunantwort nach LPS-Gabe führte und die Gabe von Noradrenalin immunsupprimierend wirkte [153].

Damit bleibt weiterhin unklar, wie sich die sympathische Denervation und damit verbundene Reduktion der MHCII-Expression auf die breite Facette der Immunfunktionen des Körpers auswirkt und bedarf der weiteren Erforschung.

3.1. Kommunikation zwischen Sympathikus und Makrophagen

Da wir zeigen konnten, dass die Ausschaltung der sympathischen Signalübertragung zu einer Veränderung des Makrophagenphänotyps führt, stellt sich die Frage, wie die Kommunikation zwischen Sympathikus und Makrophagen vermittelt wird, die diese Veränderung auslöst. In der Literatur ist beschrieben, dass die Signalübertragung zwischen dem sympathischen Nervensystem und Makrophagen über β - Adrenorezeptoren, vor allem Adrenorezeptor $\beta 2$ (Adrb2) stattfindet [190-192]. Wenn man von diesem Weg der Signalübertragung ausgeht, müsste man in Adrb2 - Knock-out Mäusen oder durch die Gabe von Adrb2-Antagonisten ebenfalls einen Abfall der MHCII^{high} - Population beobachten. Auf der anderen Seite kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Aufrechterhaltung der MHCII^{high} - Population durch andere β - Adrenorezeptoren vermittelt wird, weshalb neben einer einfachen Adrb2^{-/-} - Maus beispielsweise auch eine Adrb1^{-/-} Adrb2^{-/-} Doppel-Knock-out-Maus hilfreich wäre, um genauer erforschen zu können, wie es zu den Veränderungen im Makrophagenphänotyp kommt.

Es wäre darüber hinaus zu überlegen, ob die MHCII^{high} - Population überhaupt durch die direkte Kommunikation zwischen Sympathikus und Makrophagen aufrechterhalten wird und nicht die Nische selbst das Überleben der Population bedingt. Ähnlich wie Zytokine und Wachstumsfaktoren zum Überleben der gesamten Makrophagenpopulation beitragen [193], könnten diese in kleinerer Menge, sowie Matrixkomponenten des Gewebes und andere Zellen [194], die sich nischenspezifisch um sympathische Nervenfasern aufhalten, zur Aufrechterhaltung der MHCII^{high} - Population beitragen. Des Weiteren stellt sich auch die Frage, ob nur die vermehrte MHCII-Expression oder die gesamte MHCII^{high} - Population aufrecht bzw. am Leben erhalten wird, was wir an *Fate Mapping* Mäusen untersuchten.

3.2. Auswirkungen einer erhöhten Sympathikusaktivität auf den Makrophagenphänotyp

Ausgehend von unseren Daten, wäre es auch interessant zu untersuchen, wie sich die Stimulation des Sympathikus auf den Makrophagenphänotyp auswirkt. In einer Arbeit von Chelmicka-Schorr *et. al.* konnte nachgewiesen werden, dass die

Sympathikusaktivität einen Einfluss auf die Funktion der Makrophagen hat. Makrophagen von sympathisch denervierten Mäusen wiesen *in vitro*, nach Inkubation mit LPS, eine mehr als doppelt so TNF- α Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Umgekehrt halbierte sich die TNF- α Produktion von Makrophagen, die vor der LPS-Stimulation mit einem β 2-Agonisten behandelt wurden [9]. Vergleichend mit unseren Daten könnte man erwarten, dass eine vermehrte Stimulation des Sympathikus zu einer erhöhten MHCII-Expression führt, wenn die Denervation eine Reduktion bewirkt. Auf der anderen Seite könnte eine vermehrte Stimulation des Sympathikus auch in einem Abfall der MHCII^{high}-Population mit verminderter Antigenpräsentation und reduzierter Immunantwort resultieren. Somit würden Makrophagen nicht nur funktionell, wie durch Chelmicka-Schorr und Kollegen gezeigt, sondern auch durch die geringere MHCII-Expression ein eher anti-inflammatorisches Makrophagenprofil annehmen.

3.3. Lokale Denervation der Lunge reproduziert Befunde der systemischen Denervation

Nach systemischer Denervation mittels 6-OHDA konnten wir ein Absinken der MHCII^{high}-Makrophagen feststellen. Um ausschließen zu können, dass 6-OHDA neben der systemischen Denervation noch weitere Effekte verursacht, die letztendlich zum Absinken der MHCII^{high}-Population geführt haben, wurde 6-OHDA in einem weiteren Versuch intranasal verabreicht, um eine lokale Denervation der Lunge herbeizuführen. Mit diesem Versuch konnten wir analog zu den vorherigen Ergebnissen ein Absinken der MHCII^{high}-Population und einen Anstieg MHCII^{low}-Population beobachten. Dieses Ergebnis macht es demnach wahrscheinlicher, dass die beobachteten Veränderungen in der MHCII-Expression tatsächlich auf die Denervation und weniger auf durch 6-OHDA ausgelöste systemische Störfaktoren zurückzuführen sind. Um allerdings endgültig zeigen zu können, dass die sympathische Denervation der Grund für den MHCII^{high}-Abfall ist, müsste man zusätzlich durchflusszytometrische Analysen von Herz, Lunge und Niere nach genetischer [151, 153, 195] sowie chirurgischer [153, 196] Denervation durchführen.

Neben dem MHCII^{high}-Abfall und dem MHCII^{low}-Anstieg nach lokaler 6-OHDA-Gabe, konnte in diesem Versuch darüber hinaus festgestellt werden, dass sich auch der Phänotyp der MHCII^{low}-Makrophagen zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe unterschied. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von CD45

und CD11c der MHCII^{low} - Makrophagen waren in der denervierten Gruppe um 27 % bzw. fast 50 % reduziert, was für eine Repolarisierung der Makrophagen sprechen könnte.

4. Repolarisierung der MHCII^{high} - Makrophagen zu MHCII^{low} - Makrophagen nach sympathischer Denervation

Durch die vorangegangenen Beobachtungen stellte sich die Frage, wie die Verschiebung zwischen MHCII^{high} und MHCII^{low} zustande kommt. Neben der Umwandlung von MHCII^{high} zu MHCII^{low} - Makrophagen (Repolarisierung), wäre auch denkbar, dass es zu einer vermehrten Rekrutierung von MHCII^{low} - Makrophagen kommt, wodurch relativ gesehen weniger MHCII^{high} - Makrophagen im Gewebe zu sein scheinen. Umgekehrt könnten bei gleichbleibender Rekrutierung von MHCII^{low} - Makrophagen, weniger MHCII^{high} - Makrophagen einwandern, wodurch es im relativen Verhältnis ebenfalls den Anschein macht, als würde MHCII^{high} absinken. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass MHCII^{high} - Makrophagen absterben, wodurch es zu einem absoluten Absinken dieser Population kommt.

Zur Klärung dieser Frage züchteten wir Cx3cr1^{CreERT2} x Rosa26^{tdTomato} *Fate Mapping* – Mäuse. Um sicherzugehen, dass fast alle tdTomato⁺ Monozyten im Blut durch unmarkierte Monozyten ausgetauscht worden waren, wurde mit der Denervation erst drei Wochen nach Aktivierung der Cre-Rekombinase mittels Tamoxifeninjektion begonnen. Somit waren zum Zeitpunkt der Denervation nur noch CX3CR1⁺ Immunzellen im Gewebe rot markiert. Anschließend wurden die Mäuse, wie in den Versuchen zuvor, denerviert und das Herz durchflusszytometrisch analysiert. Im Unterschied zu den anderen Versuchen wurden in diesem Versuch Zähl-Beads verwendet und die Herzen nach der Entnahme gewogen, was eine Aussage über die absoluten Zellzahlen ermöglichte. Anhand des tdTomato-Signals konnten Makrophagen identifiziert werden, die sich bereits vor der Denervation im Gewebe befanden und durch ihr endogenes Signal rot markiert waren (tdTomato^{positiv}). Bei den tdTomato^{negativen} Makrophagen handelte es sich in diesem Modell entweder um Makrophagen, die sich ebenfalls bereits vor der Denervation im Gewebe befanden, aber aufgrund der fehlenden „Labeling-Effizienz“ kein tdTomato-Signal aufwiesen, oder um Makrophagen, die nach der Denervation durch nicht markierte Monozyten ersetzt wurden [175].

Nach der Denervation konnte sowohl in den relativen als auch in den absoluten Zellzahlen ein Abfall der MHCII^{high} - und ein Anstieg der MHCII^{low} - Population beobachtet werden. In der denervierten Gruppe sanken die tdTomato⁺ MHCII^{high} - Makrophagen um fast die Hälfte ab, wohingegen sich die tdTomato⁺ MHCII^{low} - Makrophagen verdoppelten.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die sympathische Innervation für die Aufrechterhaltung des MHCII^{high} - Makrophagenphänotyps relevant sein könnte, was das robuste Absinken der MHCII^{high} - Population und die Zunahme der MHCII^{low} - Population nach sympathischer Denervation erklärt.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

In der hier vorliegenden Doktorarbeit wurde das Zusammenspiel von Makrophagen und sympathischen Nervenfasern anatomisch und funktionell untersucht. Zunächst wurde histologisch analysiert, wie Makrophagen in verschiedenen Geweben um Nerven bzw. Gefäße verteilt sind. Anschließend wurden die visualisierten Kontakte quantifiziert. Dabei wurde gezeigt, dass CX3CR1^{positive} - Makrophagen deutlich häufiger mit Nerven als mit Gefäßen assoziierten. Weiterhin wurden die Kontakte zwischen Makrophagen und sympathischen Nervenfasern visualisiert. In Herz und Lunge zeigten die Kontakte teilweise einen synapsenähnlichen Charakter. Ausgehend von Chakarov *et. al.* [113] wurden Herz, Lunge und Niere einer Cx3cr1^{GFP} - Maus unter „Steady-state“ - Bedingungen durchflusszytometrisch analysiert. Wie auch Chakarov und Kollegen, konnten wir die interstitiellen Makrophagen von Herz und Lunge in zwei verschiedene Populationen einteilen. Die vorher histologisch untersuchte CX3CR1^{high} - Population wurde gleichzeitig als MHCII^{high} identifiziert, wobei CX3CR1^{low} - Makrophagen auch MHCII^{low} waren. In der Niere konnten die Makrophagen ebenfalls in eine CX3CR1^{high} - und eine CX3CR1^{low} - Population eingeteilt werden, allerdings exprimierten beide Populationen hohe Mengen an MHCII. Um das funktionelle Zusammenspiel von Makrophagen und sympathischen Nerven zu charakterisieren, wurde anschließend durch Applikation des Neurotoxins 6-OHDA eine sympathische Denervation herbeigeführt, welche mit Hilfe eines Noradrenalin-ELISAs validiert wurde. Nach Denervation wurden das Herz, die Lunge und die Niere durchflusszytometrisch analysiert. In allen drei Organen nahm die MHCII^{high} - Makrophagenpopulation signifikant ab, wohingegen die MHCII^{low} - Population signifikant, bzw. in der Niere annähernd signifikant, anstieg. Die lokale Denervation der Lunge durch intranasale Applikation des 6-OHDAs zeigte einen ähnlichen Befund. Cx3cr1^{CreERT2} x Rosa26^{tdTomato} - *Fate Mapping* Mäuse ermöglichten die Unterscheidung zwischen geweberesidenten und neu eingewanderten Makrophagen. Nach systemischer Denervation dieser Mauslinie nahmen die Absolutzahlen der tdTomato⁺ MHCII^{high} - Makrophagen signifikant ab und die Absolutzahlen der tdTomato⁺ MHCII^{low} - Makrophagen signifikant zu. Dieses Ergebnis deutet vor allem auf eine Repolarisierung der MHCII^{high}- zu MHCII^{low}- Makrophagen nach sympathischer Denervation hin. Daher könnte die sympathische Innervation zur Aufrechterhaltung des MHCII^{high}- Makrophagenphänotyps beitragen.

VIII. SUMMARY

In this thesis the anatomical und functional interplay between macrophages and sympathetic nerves was investigated. First, the distribution of macrophages around nerves or vessels was histologically analyzed across different tissues. Subsequently, the visualized contacts were quantified. It was observed that CX3CR1^{positive} - macrophages were more frequently associated with nerves than with vessels. Furthermore, the contacts between macrophages and sympathetic nerves were visualized. In heart and lung tissue these contacts seemed synapse-like. Based on a publication by Chakarov *et al.* flowcytometric analysis of heart, lung and kidney of a Cx3cr1^{GFP}- mouse was performed under “steady-state” conditions. Like Chakarov and colleagues we could differentiate two distinct interstitial macrophage populations in heart and lung. The histologically characterized CX3CR1^{high} - population was at the same time MHCII^{high} and CX3CR1^{low} - macrophages were MHCII^{low}. The kidney showed a CX3CR1^{high}- and CX3CR1^{low}- population but MHCII was highly expressed in both populations. To characterize the functional interplay between macrophages and sympathetic nerves, a sympathetic denervation using the neurotoxin 6-OHDA was employed and validated with a Norepinephrine-ELISA. After denervation flowcytometry of heart, lung and kidney was performed. We found a significant drop in MHCII^{high} in all three organs and a significant rise in MHCII^{low} in heart and lung and an almost significant rise in the kidney. Local denervation of the lung by intranasal 6-OHDA application showed similar results.

Cx3cr1^{CreERT2} x Rosa26^{tdTomato} - *fate mapping* mice allowed for the distinction between tissue resident and newly recruited macrophages. After sympathetic denervation absolute counts of tissue resident tdTomato⁺ MHCII^{high} - macrophages decreased significantly, whereas absolute counts of tissue resident tdTomato⁺ MHCII^{low} - macrophages increased significantly. This result implicates a repolarization of MHCII^{high}- to MHCII^{low}- macrophages after sympathetic denervation. Therefore, sympathetic innervation likely contributes to the maintenance of a MHCII^{high} macrophage phenotype.

IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
3D	dreidimensional
6-OHDA	6-Hydroxydopamin hydrochlorid
Abb.	Abbildung
Adrb2	Adrenorezeptor beta 2
ApoE	Apolipoprotein E
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
COX-2	Cyclooxygenase 2
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FOLR	Folate receptor beta
FSC	Forward Scatter
G	Gauge
g	g-Kraft
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GMP	Granulocyte macrophage progenitor
h	hours
HCL	Chlowsasserstoffsäure/Salzsäure
HLA	Humanes - Leukozyten - Antigen
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM-4	Intercellular Adhesion Molecule 4
IFN-γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin

kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
L/D	Life/Dead
LPS	Lipopolysaccharid
Lux	Beleuchtungsstärke
M	Mol
MFI	Mean Fluorescence Intensity
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteasen
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
PBS	Phosphate-buffered saline
pg	Pikogramm
pH	pH-Wert
rcf	Relative centrifugal force
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SEM	standard error of mean
SSC	Side Scatter
symp.	sympathisch
Tab.	Tabelle
tdT	tdTomato
TGF-β	Transforming growth factor beta
Th	Tyrosinhydroxylase
Th1	Typ-1-T-Helferzelle
Th2	Typ-2-T-Helferzelle

TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
Tub3	Tubulin 3
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Beispiele der Wirkungsweisen des Sympathikus und Parasympathikus ...	17
Tabelle 2: Herstellung von 6 ml Enzymmix	33
Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die FACS-Analyse der Organe	34
Tabelle 4: Verwendete Antikörper für die FACS-Analyse des Blutes	35
Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung	37

XI. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Ursprung und Selbsterneuerung von Makrophagen	5
Abbildung 2: Verschieden aktivierte Makrophagen und ihre funktionellen Eigenschaften	7
Abbildung 3: Der klassische Weg der MHC-Klasse-II - Antigenpräsentation	13
Abbildung 4: Zwei voneinander unabhängige Makrophagenpopulationen mit nischen-spezifischem Phänotyp.....	14
Abbildung 5: Beispiel eines Scoresheets zur Beurteilung des Allgemeinbefindens nach Denervation	29
Abbildung 6: Bestimmung von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten anhand von FSC und SSC.....	31
Abbildung 7: Qualitative Darstellung von Makrophagen im Gewebe und deren Verteilung um Nerven und Gefäße mittels Epifluoreszenzmikroskopie	42
Abbildung 8: Qualitative Darstellung der synapsen-ähnlichen Interaktionen zwischen Makrophagen und Nerven in Herz und Lunge.....	43
Abbildung 9: CX3CR1 ⁺ Makrophagen assoziieren häufiger mit Nerven als mit Gefäßen	44
Abbildung 10: Qualitative Darstellung von Makrophagen und sympathischen Nerven in Mesenterium und Herz.....	45
Abbildung 11: Qualitative Darstellung von Makrophagen und sympathischen Nerven in Lunge und Magen	46
Abbildung 12: Gating-Strategie der FACS-Analyse vom Herz, dargestellt in Dot Plots und Histogrammen	47
Abbildung 13: Gating-Strategie der FACS-Analyse der Lunge, dargestellt in Dot Plots und Histogrammen	48

Abbildung 14: Gating-Strategie der FACS-Analyse der Niere, dargestellt in Dot Plots und Histogrammen	49
Abbildung 15: Absinken des Noradrenalinpiegels im Gewebe verschiedener Organe nach sympathischer Denervation	51
Abbildung 16: Gleichbleibende Monozytenzahl im Blut nach systemischer Denervation	52
Abbildung 17: MHCII ^{high} - Abnahme und MHCII ^{low} - Zunahme im Herzen nach systemischer Denervation	53
Abbildung 18: MHCII ^{high} - Abnahme und MHCII ^{low} - Zunahme in der Lunge nach systemischer Denervation	54
Abbildung 19: MHCII ^{high} - Abnahme und MHCII ^{low} - Zunahme in der Niere nach systemischer Denervation	56
Abbildung 20: MHCII ^{high} - Abnahme und MHCII ^{low} - Zunahme in der Lunge nach lokaler Denervation	58
Abbildung 21: t-SNE - basierte Darstellung der Makrophagenpopulationen nach lokaler Denervation der Lunge.....	60
Abbildung 22: Relative MFIs verschiedener Oberflächenmarker der MHCII ^{high} - Population	61
Abbildung 23: Relative MFIs von CD45 und CD11c nehmen nach lokaler Denervation der Lunge auf der MHCII ^{low} - Population ab	62
Abbildung 24: Abnahme der tdTomato ⁺ Blutmonozyten im Verlauf bis drei Wochen nach der letzten Tamoxifengabe, dargestellt in Dot Plots nach FACS-Analyse.....	64
Abbildung 25: Gatingstrategie des <i>Fate Mapping</i> -Versuchs im Herzen, dargestellt in Dot Plots.....	65
Abbildung 26: Absolutzahlen der tdTomato ⁺ und tdTomato ⁻ MHCII ^{high} - und MHCII ^{low} - Makrophagen im Herzen nach systemischer Denervation.....	66

XII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Davies, L.C., et al., *Tissue-resident macrophages*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 986-95.
2. Bernareggi, D., et al., *Development of innate immune cells from human pluripotent stem cells*. Exp Hematol, 2019. **71**: p. 13-23.
3. Naito, M., *Macrophage differentiation and function in health and disease*. Pathol Int, 2008. **58**(3): p. 143-55.
4. Underhill, D.M., et al., *Élie Metchnikoff (1845-1916): celebrating 100 years of cellular immunology and beyond*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(10): p. 651-6.
5. Artyomov, M.N., et al., *Integrating immunometabolism and macrophage diversity*. Semin Immunol, 2016. **28**(5): p. 417-424.
6. Gordon, S., et al., *Tissue macrophages: heterogeneity and functions*. BMC Biol, 2017. **15**(1): p. 53.
7. Liu, P., et al., *Role of macrophages in peripheral nerve injury and repair*. Neural Regen Res, 2019. **14**(8): p. 1335-1342.
8. Kolter, J., et al., *Origin and Differentiation of Nerve-Associated Macrophages*. J Immunol, 2020. **204**(2): p. 271-279.
9. Chelmicka-Schorr, E., et al., *Sympathetic nervous system modulates macrophage function*. Int J Immunopharmacol, 1992. **14**(5): p. 841-6.
10. Ginhoux, F., et al., *Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis*. Immunity, 2016. **44**(3): p. 439-449.
11. Shapouri-Moghaddam, A., et al., *Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease*. J Cell Physiol, 2018. **233**(9): p. 6425-6440.
12. Epelman, S., et al., *Origin and functions of tissue macrophages*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 21-35.
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. 755-68.
14. Kissa, K., et al., *Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 112-5.

15. Ginhoux, F., et al., *Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(6): p. 392-404.
16. Gomez Perdiguero, E., et al., *Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors*. Nature, 2015. **518**(7540): p. 547-51.
17. Christensen, J.L., et al., *Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells*. PLoS Biol, 2004. **2**(3): p. E75.
18. Hoeffel, G., et al., *C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages*. Immunity, 2015. **42**(4): p. 665-78.
19. O'Neill, H.C., et al., *Spleen as a site for hematopoiesis of a distinct antigen presenting cell type*. Stem Cells Int, 2011. **2011**: p. 954275.
20. Sreejit, G., et al., *Origins and diversity of macrophages in health and disease*. Clin Transl Immunology, 2020. **9**(12): p. e1222.
21. Kotton, D.N., et al., *A novel stem-cell population in adult liver with potent hematopoietic-reconstitution activity*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1574-80.
22. Schulz, C., et al., *A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells*. Science, 2012. **336**(6077): p. 86-90.
23. Stremmel, C., et al., *Yolk sac macrophage progenitors traffic to the embryo during defined stages of development*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 75.
24. Ide, S., et al., *Yolk-sac-derived macrophages progressively expand in the mouse kidney with age*. Elife, 2020. **9**: p. e51756.
25. Ginhoux, F., et al., *Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages*. Science, 2010. **330**(6005): p. 841-5.
26. Bain, C.C., et al., *Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice*. Nat Immunol, 2014. **15**(10): p. 929-937.
27. De Schepper, S., et al., *Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis*. Cell, 2018. **175**(2): p. 400-415.e13.
28. Bain, C.C., et al., *Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation*. Immunol Rev, 2014. **260**(1): p. 102-17.
29. Zhu, Y., et al., *Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression*. Immunity, 2017. **47**(2): p. 323-338 e6.

30. Wynn, T.A., et al., *Macrophage biology in development, homeostasis and disease*. Nature, 2013. **496**(7446): p. 445-55.
31. 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.
32. Fan, X., et al., *Double Roles of Macrophages in Human Neuroimmune Diseases and Their Animal Models*. Mediators Inflamm, 2016. **2016**: p. 8489251.
33. McWhorter, F.Y., et al., *Physical and mechanical regulation of macrophage phenotype and function*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(7): p. 1303-16.
34. Mosser, D.M., et al., *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
35. Wynn, T.A., et al., *Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis*. Immunity, 2016. **44**(3): p. 450-462.
36. Das, A., et al., *Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration*. Am J Pathol, 2015. **185**(10): p. 2596-606.
37. Wynn, T.A., et al., *Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease*. Nat Med, 2012. **18**(7): p. 1028-40.
38. Cassetta, L., et al., *Macrophage polarization in health and disease*. ScientificWorldJournal, 2011. **11**: p. 2391-402.
39. Biswas, S.K., et al., *Macrophage polarization and plasticity in health and disease*. Immunol Res, 2012. **53**(1-3): p. 11-24.
40. Locati, M., et al., *Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity*. Adv Immunol, 2013. **120**: p. 163-84.
41. Murray, P.J., et al., *Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(4): p. 557-63.
42. Sica, A., et al., *Macrophage polarization in pathology*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(21): p. 4111-26.
43. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
44. Giordano, N.P., et al., *Outer Membrane Lipid Secretion and the Innate Immune Response to Gram-Negative Bacteria*. Infection and Immunity, 2020. **88**(7): p. e00920-19.

45. Sica, A., et al., *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
46. Steevens, T.A., et al., *Immune inhibitory receptors: essential regulators of phagocyte function*. Eur J Immunol, 2011. **41**(3): p. 575-87.
47. Gordon, S., et al., *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 593-604.
48. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 453-61.
49. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 209-12.
50. Mantovani, A., et al., *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling*. J Pathol, 2013. **229**(2): p. 176-85.
51. Edholm, E.S., et al., *Evolutionary Aspects of Macrophages Polarization*. Results Probl Cell Differ, 2017. **62**: p. 3-22.
52. Murray, P.J., et al., *Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 14-20.
53. Wang, N., et al., *Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 614.
54. Bashir, S., et al., *Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases*. Inflamm Res, 2016. **65**(1): p. 1-11.
55. Rheinländer, A., et al., *CD45 in human physiology and clinical medicine*. Immunol Lett, 2018. **196**: p. 22-32.
56. Woodford-Thomas, T., et al., *The leukocyte common antigen, CD45 and other protein tyrosine phosphatases in hematopoietic cells*. Semin Cell Biol, 1993. **4**(6): p. 409-18.
57. Thomas, M.L., *The leukocyte common antigen family*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 339-69.
58. Hermiston, M.L., et al., *CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 107-37.
59. St-Pierre, J., et al., *A role for the protein tyrosine phosphatase CD45 in macrophage adhesion through the regulation of paxillin degradation*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e71531.

60. Basu, S., et al., *Differential representation of B cell subsets in mixed bone marrow chimera mice due to expression of allelic variants of CD45 (CD45.1/CD45.2)*. J Immunol Methods, 2013. **396**(1-2): p. 163-7.
61. Ross, G.D., *Role of the lectin domain of Mac-1/CR3 (CD11b/CD18) in regulating intercellular adhesion*. Immunol Res, 2002. **25**(3): p. 219-27.
62. Zhou, H., et al., *CD11b/CD18 (Mac-1) is a novel surface receptor for extracellular double-stranded RNA to mediate cellular inflammatory responses*. J Immunol, 2013. **190**(1): p. 115-25.
63. Tan, S.M., *The leucocyte $\beta 2$ (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties*. Biosci Rep, 2012. **32**(3): p. 241-69.
64. Schmid, M.C., et al., *Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 5379.
65. Misharin, A.V., et al., *Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013. **49**(4): p. 503-10.
66. Lin, H.H., et al., *The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance*. J Exp Med, 2005. **201**(10): p. 1615-25.
67. McKnight, A.J., et al., *Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family*. J Biol Chem, 1996. **271**(1): p. 486-9.
68. van den Berg, T.K., et al., *A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction*. Trends Immunol, 2005. **26**(10): p. 506-9.
69. Austyn, J.M., et al., *F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage*. Eur J Immunol, 1981. **11**(10): p. 805-15.
70. Hume, D.A., et al., *The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells, and dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs*. J Exp Med, 1983. **158**(5): p. 1522-36.
71. McGarry, M.P., et al., *Murine eosinophil granulocytes bind the murine macrophage-monocyte specific monoclonal antibody F4/80*. J Leukoc Biol, 1991. **50**(5): p. 471-8.
72. Dos Anjos Cassado, A., *F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen*. Results Probl Cell Differ, 2017. **62**: p. 161-179.
73. Nimmerjahn, F., et al., *Fc γ receptors as regulators of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 34-47.

74. Hristodorov, D., et al., *Macrophage-targeted therapy: CD64-based immunotoxins for treatment of chronic inflammatory diseases*. Toxins (Basel), 2012. **4**(9): p. 676-94.
75. van der Poel, C.E., et al., *Functional characteristics of the high affinity IgG receptor, FcγRI*. J Immunol, 2011. **186**(5): p. 2699-704.
76. Pearce, R.N., et al., *Characterization of the promoter of the human gene encoding the high-affinity IgG receptor: transcriptional induction by gamma-interferon is mediated through common DNA response elements*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11305-9.
77. Ravetch, J.V., et al., *Fc receptors*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 457-92.
78. Ioan-Facsinay, A., et al., *FcγRI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection*. Immunity, 2002. **16**(3): p. 391-402.
79. Cai, B., et al., *MerTK signaling in macrophages promotes the synthesis of inflammation resolution mediators by suppressing CaMKII activity*. Science Signaling, 2018. **11**(549): p. eaar3721.
80. Scott, R.S., et al., *Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER*. Nature, 2001. **411**(6834): p. 207-11.
81. Lemke, G., et al., *TAM receptors and the clearance of apoptotic cells*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1209**: p. 23-9.
82. Ravichandran, K.S., *Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums*. J Exp Med, 2010. **207**(9): p. 1807-17.
83. Dransfield, I., et al., *Mer receptor tyrosine kinase mediates both tethering and phagocytosis of apoptotic cells*. Cell Death Dis, 2015. **6**(2): p. e1646.
84. Cai, B., et al., *Macrophage MerTK Promotes Liver Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis*. Cell Metab, 2020. **31**(2): p. 406-421.e7.
85. Gautier, E.L., et al., *Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages*. Nat Immunol, 2012. **13**(11): p. 1118-28.
86. Luo, B.H., et al., *Structural basis of integrin regulation and signaling*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 619-47.
87. Uotila, L.M., et al., *Integrin CD11c/CD18 α-chain phosphorylation is functionally important*. J Biol Chem, 2013. **288**(46): p. 33494-9.

88. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
89. Wu, H., et al., *Functional role of CD11c⁺ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia*. Circulation, 2009. **119**(20): p. 2708-17.
90. Ihanus, E., et al., *Red-cell ICAM-4 is a ligand for the monocyte/macrophage integrin CD11c/CD18: characterization of the binding sites on ICAM-4*. Blood, 2007. **109**(2): p. 802-10.
91. Yamaguchi, T., et al., *Major Histocompatibility Complex (MHC) Genes and Disease Resistance in Fish*. Cells, 2019. **8**(4): p. 378.
92. Heijmans, C.M.C., et al., *Comparative genetics of the major histocompatibility complex in humans and nonhuman primates*. Int J Immunogenet, 2020. **47**(3): p. 243-260.
93. Nakamura, T., et al., *The Role of Major Histocompatibility Complex in Organ Transplantation-Donor Specific Anti-Major Histocompatibility Complex Antibodies Analysis Goes to the Next Stage*. International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(18): p. 4544.
94. Kimura, M., et al., *The Average Number of Generations until Fixation of a Mutant Gene in a Finite Population*. Genetics, 1969. **61**(3): p. 763-71.
95. Hughes, A.L., et al., *Natural selection and the evolutionary history of major histocompatibility complex loci*. Front Biosci, 1998. **3**: p. d509-16.
96. Kelly, A., et al., *Introduction: MHC/KIR and governance of specificity*. Immunogenetics, 2017. **69**(8-9): p. 481-488.
97. Kaufman, J., *Generalists and Specialists: A New View of How MHC Class I Molecules Fight Infectious Pathogens*. Trends Immunol, 2018. **39**(5): p. 367-379.
98. Matzaraki, V., et al., *The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases*. Genome Biol, 2017. **18**(1): p. 76.
99. Cozzi, E., et al., *The mechanisms of rejection in solid organ transplantation*. Transfus Apher Sci, 2017. **56**(4): p. 498-505.
100. Vandiedonck, C., et al., *The human Major Histocompatibility Complex as a paradigm in genomics research*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2009. **8**(5): p. 379-94.
101. Gorer, P.A., *The genetic and antigenic basis of tumor transplantation* The Journal of Pathology and Bacteriology 1937. **44**(3): p. 691-697.
102. Snell, G.D., *Some recollections of Peter Gorer and his work on this fiftieth anniversary of his discovery of H-2*. Immunogenetics, 1986. **24**(6): p. 339-40.

103. Roopenian, D., *A methods paper that led to much more*. J Immunol, 2014. **192**(1): p. 3-4.
104. Kulski, J.K., et al., *Genomic Diversity of the Major Histocompatibility Complex in Health and Disease*. Cells, 2019. **8**(10): p. 1270.
105. Kelly, A., et al., *Genetics of antigen processing and presentation*. Immunogenetics, 2019. **71**(3): p. 161-170.
106. Germain, R.N., *MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation*. Cell, 1994. **76**(2): p. 287-99.
107. Neefjes, J., et al., *Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(12): p. 823-36.
108. Berger, A.C., et al., *MHC class II transport at a glance*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 1): p. 1-4.
109. Wolf, P.R., et al., *How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: p. 267-306.
110. Peters, P.J., et al., *Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments*. Nature, 1991. **349**(6311): p. 669-76.
111. Hiltbold, E.M., et al., *Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(1): p. 30-5.
112. Denzin, L.K., et al., *Right place, right time, right peptide: DO keeps DM focused*. Immunol Rev, 2005. **207**: p. 279-92.
113. Chakarov, S., et al., *Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches*. Science, 2019. **363**(6432): p. eaau0964.
114. Arvidson, B., *Cellular uptake of exogenous horseradish peroxidase in mouse peripheral nerve*. Acta Neuropathol, 1977. **37**(1): p. 35-41.
115. Oldfors, A., *Macrophages in peripheral nerves. An ultrastructural and enzyme histochemical study on rats*. Acta Neuropathol, 1980. **49**(1): p. 43-9.
116. Kiefer, R., et al., *The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system*. Prog Neurobiol, 2001. **64**(2): p. 109-27.
117. Ydens, E., et al., *Profiling peripheral nerve macrophages reveals two macrophage subsets with distinct localization, transcriptome and response to injury*. Nat Neurosci, 2020. **23**(5): p. 676-689.
118. Griffin, J.W., et al., *Macrophage systems in peripheral nerves. A review*. J Neuropathol Exp Neurol, 1993. **52**(6): p. 553-60.

119. Perry, V.H., et al., *Role of macrophages in peripheral nerve degeneration and repair*. Bioessays, 1992. **14**(6): p. 401-6.
120. Stolz, B., et al., *Macrophages direct process elongation from adult frog motoneurons in culture*. Proc Biol Sci, 1991. **244**(1311): p. 227-31.
121. Kolter, J., et al., *A Subset of Skin Macrophages Contributes to the Surveillance and Regeneration of Local Nerves*. Immunity, 2019. **50**(6): p. 1482-1497 e7.
122. Seyed-Razavi, Y., et al., *A novel association between resident tissue macrophages and nerves in the peripheral stroma of the murine cornea*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(3): p. 1313-20.
123. Ural, B.B., et al., *Identification of a nerve-associated, lung-resident interstitial macrophage subset with distinct localization and immunoregulatory properties*. Science Immunology, 2020. **5**(45): p. eaax8756.
124. Phillips, R.J., et al., *Macrophages associated with the intrinsic and extrinsic autonomic innervation of the rat gastrointestinal tract*. Auton Neurosci, 2012. **169**(1): p. 12-27.
125. Kinoshita, K., et al., *Possible involvement of muscularis resident macrophages in impairment of interstitial cells of Cajal and myenteric nerve systems in rat models of TNBS-induced colitis*. Histochem Cell Biol, 2007. **127**(1): p. 41-53.
126. Muller, P.A., et al., *Crosstalk between Muscularis Macrophages and Enteric Neurons Regulates Gastrointestinal Motility*. Cell, 2014. **158**(5): p. 1210.
127. Pirzalska, R.M., et al., *Sympathetic neuron-associated macrophages contribute to obesity by importing and metabolizing norepinephrine*. Nat Med, 2017. **23**(11): p. 1309-1318.
128. Chalazonitis, A., et al., *Enteric nervous system manifestations of neurodegenerative disease*. Brain Res, 2018. **1693**(Pt B): p. 207-213.
129. Wehrwein, E.A., et al., *Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System*. Compr Physiol, 2016. **6**(3): p. 1239-78.
130. Gibbons, C.H., *Basics of autonomic nervous system function*. Handb Clin Neurol, 2019. **160**: p. 407-418.
131. in G. Böhme, in Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E., *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band 4 Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen* 4. unveränderte Auflage 2004: Parey in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG. p. 353.
132. Kenney, M.J., et al., *Autonomic nervous system and immune system interactions*. Compr Physiol, 2014. **4**(3): p. 1177-200.

133. Shields, R.W., Jr., *Functional anatomy of the autonomic nervous system*. J Clin Neurophysiol, 1993. **10**(1): p. 2-13.
134. Miksa, M., et al., *Sympathetic excitotoxicity in sepsis: pro-inflammatory priming of macrophages by norepinephrine*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 2217-29.
135. Vizi, E.S., et al., *Nonsynaptic noradrenaline release in neuro-immune responses*. Acta Biol Hung, 2002. **53**(1-2): p. 229-44.
136. Selmeczy, Z., et al., *Role of nonsynaptic communication in regulating the immune response*. Neurochem Int, 2008. **52**(1-2): p. 52-9.
137. Benarroch, E.E., *Autonomic nervous system and neuroimmune interactions: New insights and clinical implications*. Neurology, 2019. **92**(8): p. 377-385.
138. Rosas-Ballina, M., et al., *Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit*. Science, 2011. **334**(6052): p. 98-101.
139. Felten, S.Y., et al., *Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: II. Tyrosine hydroxylase (TH)-positive nerve terminals form synaptictlike contacts on lymphocytes in the splenic white pulp*. J Neurosci Res, 1987. **18**(1): p. 37-48.
140. Hu, D., et al., *Distribution of nerve fibers and nerve-immune cell association in mouse spleen revealed by immunofluorescent staining*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 9850.
141. Payan, D.G., et al., *Neuroimmunology*. Adv Immunol, 1986. **39**: p. 299-323.
142. Besedovsky, H., et al., *Hypothalamic changes during the immune response*. Eur J Immunol, 1977. **7**(5): p. 323-5.
143. Maier, S.F., et al., *Immune-to-central nervous system communication and its role in modulating pain and cognition: Implications for cancer and cancer treatment*. Brain Behav Immun, 2003. **17 Suppl** (1): p. S125-31.
144. Godinho-Silva, C., et al., *Neuro-Immune Cell Units: A New Paradigm in Physiology*. Annu Rev Immunol, 2019. **37**: p. 19-46.
145. Blalock, J.E., *Shared ligands and receptors as a molecular mechanism for communication between the immune and neuroendocrine systems*. Ann N Y Acad Sci, 1994. **741**: p. 292-8.
146. Taams, L.S., *Neuroimmune interactions: how the nervous and immune systems influence each other*. Clin Exp Immunol, 2019. **197**(3): p. 276-277.
147. Sun, J., et al., *Pathophysiological Effects of Pancreatic Sympathetic Denervation in Acute Necrotizing Pancreatitis in Dogs*. Pancreas, 2015. **44**(7): p. 1083-8.

148. Steinman, L., *Elaborate interactions between the immune and nervous systems*. Nat Immunol, 2004. **5**(6): p. 575-81.
149. Bellinger, D.L., et al., *Sympathetic modulation of immunity: relevance to disease*. Cell Immunol, 2008. **252**(1-2): p. 27-56.
150. Schiller, M., et al., *Neuronal regulation of immunity: why, how and where?* Nat Rev Immunol, 2021. **21**(1): p. 20-36.
151. Vasamsetti, S.B., et al., *Sympathetic Neuronal Activation Triggers Myeloid Progenitor Proliferation and Differentiation*. Immunity, 2018. **49**(1): p. 93-106 e7.
152. Heidt, T., et al., *Chronic variable stress activates hematopoietic stem cells*. Nat Med, 2014. **20**(7): p. 754-758.
153. Liu, T., et al., *Local sympathetic innervations modulate the lung innate immune responses*. Sci Adv, 2020. **6**(20): p. eaay1497.
154. Willemze, R.A., et al., *Loss of intestinal sympathetic innervation elicits an innate immune driven colitis*. Mol Med, 2019. **25**(1): p. 1.
155. Fujii, K., et al., *A heart-brain-kidney network controls adaptation to cardiac stress through tissue macrophage activation*. Nat Med, 2017. **23**(5): p. 611-622.
156. The Jackson Laboratory. *Why are mice considered excellent models for humans?* [cited 22.06.2021]; Available from: <https://www.jax.org/why-the-mouse/excellent-models#>.
157. *The Jackson Laboratory-mouse strain datasheet 000664 C57BL/6J*. [cited 30.03.2020]; Available from: <https://www.jax.org/strain/000664>.
158. Ahlgren, J., et al., *Experiments done in Black-6 mice: what does it mean?* Lab Anim (NY), 2019. **48**(6): p. 171-180.
159. Jung, S., et al., *Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(11): p. 4106-14.
160. Sandlesh, P., et al., *Uncovering the fine print of the CreERT2-LoxP system while generating a conditional knockout mouse model of Ssrp1 gene*. PLoS One, 2018. **13**(6): p. e0199785.
161. in Frey, H.-H., Löscher, W., *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. 3. vollständig überarbeitete Auflage. 2010, Stuttgart: Enke Verlag.
162. in Löscher, W., Richter, A., *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. 4. vollständig überarbeitete Auflage. 2016, Stuttgart: Enke Verlag.

163. in Eberspächer-Schweda, E., *AnästhesieSkills*. Perioperatives Management bei Klein-, Heim- und Großtieren. 2. aktualisierte und erweiterte Auflage. 2020, Thieme Stuttgart.
164. Baier, N., *Untersuchung der Belastung von Mäusen durch unterschiedliche Applikationsmethoden mit Hilfe telemetrischer Bestimmung physiologischer Reaktionen sowie mittels Corticosteronanalysen*. Dissertation., in *Tierärztliche Fakultät*. 2017, Ludwig-Maximilians-Universität. p. 21.
165. Dülsner, A., Hack, R., Krüger, C., Pils, M., Scherer, K., Schmelting, B., Schmidt, M., Weinert, H., Jourdan, T., *Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren*, in *Fachinformation aus dem Ausschuss für Tierschutzbeauftragte und dem Arbeitskreis 4 in der TVT*. 2017, GV-Solas. p. 7.
166. Glinka, Y., et al., *Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity*. J Neural Transm Suppl, 1997. **50**: p. 55-66.
167. in Salomon, F.-V., Geyer, H., Gille, U., *Anatomie für die Tiermedizin*. 2015, Thieme Stuttgart, p. 753.
168. FACS and Array Core Facility. *Prinzip der Durchflußzytometrie* [cited 20.06.2021]; Available from: <https://www.unimedizin-mainz.de/facs/durchflusszytometrie/prinzip-der-durchflusszytometrie.html>.
169. BD Biosciences. *Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung*. [cited 20.06.2021]; Available from: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=31055>.
170. Rothe, G. *Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie*. [cited 20.06.2021]; Available from: <https://www.facs-core-erlangen.de/files/2018/10/Technische-und-methodische-Grundlagen-der-Durchflusszytometrie.pdf>.
171. Daubner, S.C., et al., *Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis*. Arch Biochem Biophys, 2011. **508**(1): p. 1-12.
172. Berthold Technologies GmbH & Co.KG. *Das Elisa Grundprinzip* [cited 26.06.2021]; Available from: <https://www.berthold.com/de/bioanalytik/anwendungen/elisa/grundprinzip/>.
173. antibodies-online GmbH. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. [cited 26.06.2021]; Available from: <https://www.antikoerper-online.de/resources/17/1246/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa/>.
174. v.d.Maaten, L., Hinton, G., *Visualizing Data using t-SNE*. Journal of Machine Learning Research, 2008. **9**: p. 2579-2605.
175. Honold, L., et al., *Resident and Monocyte-Derived Macrophages in Cardiovascular Disease*. Circ Res, 2018. **122**(1): p. 113-127.

176. Frantz, S., et al., *Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease*. Cardiovasc Res, 2014. **102**(2): p. 240-8.
177. Im, K., et al., *An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining*. Methods Mol Biol, 2019. **1897**: p. 299-311.
178. Renier, N., et al., *iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging*. Cell, 2014. **159**(4): p. 896-910.
179. Azaripour, A., et al., *A survey of clearing techniques for 3D imaging of tissues with special reference to connective tissue*. Prog Histochem Cytochem, 2016. **51**(2): p. 9-23.
180. Wiedenmann, B., et al., *Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(10): p. 3500-4.
181. Trueta, C., et al., *Extrasynaptic exocytosis and its mechanisms: a source of molecules mediating volume transmission in the nervous system*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 319.
182. Gray, E.G., *Electron microscopy of excitatory and inhibitory synapses: a brief review*. Prog Brain Res, 1969. **31**: p. 141-55.
183. Lever, J.M., et al., *Resident macrophages reprogram toward a developmental state after acute kidney injury*. JCI Insight, 2019. **4**(2): p. e125503.
184. Weinberger, T., et al., *Differential MHC-II expression and phagocytic functions of embryo-derived cardiac macrophages in the course of myocardial infarction in mice*. Eur J Immunol, 2021. **51**(1): p. 250-252.
185. Ma, Y., et al., *Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction*. Transl Res, 2018. **191**: p. 15-28.
186. Schyns, J., et al., *Lung Interstitial Macrophages: Past, Present, and Future*. J Immunol Res, 2018. **2018**: p. 5160794.
187. Gong, J.L., et al., *Interstitial lung macrophages interact with dendritic cells to present antigenic peptides derived from particulate antigens to T cells*. Immunology, 1994. **81**(3): p. 343-51.
188. Schuijs, M.J., et al., *Professional and 'Amateur' Antigen-Presenting Cells In Type 2 Immunity*. Trends Immunol, 2019. **40**(1): p. 22-34.
189. Toulmin, S.A., et al., *Type II alveolar cell MHCII improves respiratory viral disease outcomes while exhibiting limited antigen presentation*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 3993.
190. Wu, L., et al., *Bidirectional Role of beta2-Adrenergic Receptor in Autoimmune Diseases*. Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 1313.

191. Petkevicius, K., et al., *Norepinephrine promotes triglyceride storage in macrophages via beta2-adrenergic receptor activation*. FASEB J, 2021. **35**(2): p. e21266.
192. Hasegawa, S., et al., *Activation of Sympathetic Signaling in Macrophages Blocks Systemic Inflammation and Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury*. Journal of the American Society of Nephrology, 2021. **32**(7): p. 1599-1615.
193. Xaus, J., et al., *Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis*. Immunobiology, 2001. **204**(5): p. 543-50.
194. Hunter, M., et al., *Survival of monocytes and macrophages and their role in health and disease*. Front Biosci (Landmark Ed), 2009. **14**: p. 4079-102.
195. Miyajima, K., et al., *Tyrosine hydroxylase conditional KO mice reveal peripheral tissue-dependent differences in dopamine biosynthetic pathways*. J Biol Chem, 2021. **296**: p. 100544.
196. Ziegler, K.A., et al., *Local sympathetic denervation attenuates myocardial inflammation and improves cardiac function after myocardial infarction in mice*. Cardiovasc Res, 2018. **114**(2): p. 291-299.

XIII. DANKSAGUNG

Als Erstes möchte ich mich herzlich bei PD Dr. med. Konstantin Stark für die kompetente und fundierte Betreuung und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, bedanken.

Herrn PD Dr. med. vet. Sven Reese danke ich ganz herzlich für die Übernahme, Durchsicht, Korrektur und Einreichung meiner Doktorarbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Kami Pekayvaz für die hervorragende Betreuung. Er stand mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite und hat mich für mein Projekt begeistern können. Mit seinem Enthusiasmus und seinen vielen konstruktiven Ideen hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich möchte mich bei der gesamten AG Massberg für die tolle Arbeitsatmosphäre bedanken. Vor allem danke ich Marie-Louise Hoffknecht für ihre Unterstützung, ihre aufmunternden Worte und dass wir den Laboralltag gemeinsam mit viel Humor und guter Laune gemeistert haben. Ein weiterer Dank gilt Anouk Engel, Sophia Brambs und Viktoria Knottenberg für die großartige Hilfe bei meinen Experimenten und den Zusammenhalt im Team. Außerdem möchte ich mich bei Christoph Gold, Dr. med. Rainer Kaiser und Luke Eivers bedanken. Mit Euch allen haben selbst die längsten und anstrengendsten Versuchstage immer viel Spaß gemacht, nach dem Motto: „LMU Klinikum. Gemeinsam. Fürsorglich. Wegweisend“.

Ein weiteres Dankeschön geht an Michael Lorenz und Anna Titova für die Einbringung ihres umfangreichen biologischen Fachwissens und dass sie stets ein offenes Ohr für mich hatten, Elisabeth Raatz für die Einarbeitung in das Forschungslabor B und ihre Hilfe mit dem ELISA und Zeljka Sisic für ihre Unterstützung am FACS. Dominic van den Heuvel hat mir jederzeit bei technischen Problemen mit dem Epifluoreszenzmikroskop und dem PC weitergeholfen, weshalb ich mich auch bei ihm herzlich bedanken möchte.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und Freunden, die mir immer den Rücken freigehalten, mich unterstützt und motiviert haben. Danke für Eure Geduld und dass Ihr immer an mich geglaubt habt.