

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

Retnla-exprimierende Immunzellen
in kardialen Entzündungsprozessen

von Julia Marie-Luise Clara Winterhalter
aus Freiburg im Breisgau

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: Prof. Dr. med. Christian Schulz

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

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

Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. Sven Reese

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Karin Weber
Prof. Dr. Gerhard Wess

Tag der Promotion: 12.02.2022

Meiner Familie und meinen Freunden

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Makrophagen	3
1.1.	Historischer Hintergrund	3
1.2.	Ursprung der Makrophagen	3
1.3.	Heterogenität und Funktion	4
1.3.1.	M1/ pro inflammatorische Polarisation	4
1.3.2.	M2/ anti-inflammatorische Polarisation	5
2.	Resistin-like Moleküle	6
2.1.	Genetische Regulation der RELM Expression	7
2.2.	Funktion von Retnla in der Wundheilung.....	8
3.	Myokardinfarkt.....	8
3.1.	Entstehung.....	8
3.2.	Rolle und Funktion der Makrophagen	8
3.3.	Rolle und Funktion der Neutrophilen Granulozyten	10
3.4.	Kardiales Remodeling.....	11
3.4.1.	Klinische Charakterisierung und Auswirkungen	11
III.	ZIELSETZUNG.....	13
1.	Charakterisierung der Retnla-exprimierenden Zellen unter Ruhebedingungen	13
2.	Stimulation der Retnla-exprimierenden Zellen durch Zytokine.....	13
3.	Charakterisierung der Retnla-exprimierenden Zellen in kardialer Inflammation.....	13
4.	Funktion der Retnla-exprimierenden Zellen im Modell des Myokardinfarktes	14
5.	Einfluss neutrophiler Granulozyten auf die Funktion der Retnla- exprimierenden Zellen.....	14
IV.	MATERIAL UND METHODEN	15
1.	Versuchstiere.....	15

1.1.	Mausstämme	15
1.1.1.	C57BL/6J	15
1.1.2.	RetnlaCreRosa26Tomato	15
1.1.3.	Cx3Cr1-GFPRosa26Tomato	15
1.1.4.	RetNlaCreRs26TomatoRs26DTR.....	16
1.2.	Tierhaltung, Zucht und Hygiene	16
1.3.	Terminierte Verpaarung.....	17
2.	Intravitalmikroskopie.....	18
2.1.	Narkose	18
2.2.	Sectio caesare.....	19
2.3.	Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie.....	20
3.	Durchflusszytometrie.....	20
3.1.	Prinzip der Durchflusszytometrie	20
3.2.	Probennahme und Aufbereitung	22
4.	Inflammationsmodelle	24
4.1.	Kardiale Fibrose.....	24
4.2.	Myokardinfarkt	25
5.	Gabe von Interleukin-4.....	27
6.	Positron-Emissions-Tomographie (PET).....	28
7.	Histologische Untersuchung.....	28
7.1.	Vorbereitung der Proben.....	28
7.2.	Gefrierschnitte.....	28
7.3.	Prinzip der Immunofluoreszenz.....	29
7.4.	Durchführung der Färbung	29
8.	Depletionsmodelle	32
8.1.	Depletion von neutrophilen Granulozyten.....	32
8.2.	Depletion von Retnla-exprimierenden Zellen mittels Diphtherie-Toxin.....	33
9.	Single-Zell-Sequenzierung	34
10.	Statistische Auswertung	34
V.	ERGEBNISSE	37
1.	Heterogenität kardialer Makrophagen.....	37

2.	Abwesenheit Retnla-exprimierender Zellen in der Embryonalentwicklung	39
2.1.	Pränatale Identifizierung von Retnla-exprimierenden Makrophagen.....	39
2.1.1.	Quantifizierung mit dem Durchflusszytometer	39
2.1.2.	In vivo Epifluoreszenzmikroskopie von Mäuseembryonen	41
3.	Identifikation und Lokalisation von Retnla- exprimierenden Zellen in kardialem Gewebe der adulten Maus unter Ruhebedingungen.....	43
3.1.	Identifizierung und Lokalisation von Retnla-exprimierenden Zellen im Herzgewebe	43
3.2.	Quantifizierung von Retnla-exprimierenden Zellen in Herz und Blut	44
3.3.	Markierungseffizienz von <i>Retnla</i> in Makrophagen aus adulten Herzen....	49
4.	Stimulation der Retnla-exprimierenden Zellen mit Interleukin 4	50
5.	Charakterisierung der Retnla-exprimierenden Zellen in kardialer Inflammation.....	51
5.1.	Charakterisierung von Retnla-exprimierenden Zellen im Myokardinfarkt	51
5.2.	Retnla-exprimierende Zellen im Modell der kardialen Fibrose.....	58
6.	Funktion der Retnla-expremierenden Zellen im Modell des Myokardinfarktes	59
6.1.	Depletion Retnla-exprimierender Zellen unter Ruhebedingungen.....	60
6.2.	Depletion Retnla-exprimierender Zellen im Myokardinfarkt.....	62
7.	Einfluss neutrophiler Granulozyten auf die Funktion der Retnla-exprimierenden Zellen.....	64
VI.	DISKUSSION.....	67
1.	Identifikation Retnla-exprimierender Zellen unter Ruhebedingungen	67
2.	Retnla-exprimierende Zellen werden durch IL-4 stimuliert	68
3.	Retnla-exprimierende Zellen im I/R Modell	68
4.	Verhalten der Retnla-exprimierenden Zellen in der chronischen Inflammation.....	69
5.	Einfluss der Depletion Retnla-exprimierender Zellen auf die Herzfunktion	70

6.	Retnla-exprimierende Zellen sind nicht abhängig von der Anwesenheit der Neutrophilenpopulation.....	71
7.	Ausblick	72
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	73
VIII.	SUMMARY	75
IX.	LITERATURVERZEICHNIS.....	77
X.	ABBILDUNGEN.....	89
XI.	TABELLENVERZEICHNIS.....	91
XII.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	93
XIII.	DANKSAGUNG.....	95

I. EINLEITUNG

Trotz Fortschritten in der Prävention und der Behandlung arterieller Blutgerinnsel (Atherothrombose) bleiben Herz-Kreislauf-Erkrankungen weltweit einer der häufigsten Todesursachen, mit einer steigenden Tendenz in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen [1]. Laut dem Bundesamt für Statistik starben, alleine im Jahr 2019, 44282 Menschen an einem akuten oder rezidivierenden Myokardinfarkt in Deutschland [2].

Ein akuter Myokardinfarkt (AMI) entsteht durch eine verminderte Durchblutung des Herzens (Ischämie) und führt zur Zellnekrose. Grund dafür ist meist eine Thrombusbildung in den Herzkranzgefäßen [3].

Durch die Ischämie kommt es zu einer initialen pro-inflammatorischen Immunantwort, die zu einem Abbau von nekrotischem Gewebe aus der Infarktzone führt. Die Reperfusion des Gewebes fördert das Absterben der Kardiomyozyten und eine Schädigung des Herzmuskels [4, 5]. Das nekrotische Myokard wird durch Narbengewebe ersetzt (Fibrose), um eine Ruptur zu verhindern. Allerdings kann progressives maladaptives ventrikuläres Remodeling Auswirkungen auf die Ventrikelgröße haben und die Herzfunktion beeinträchtigen. Daraus resultiert eine Herzinsuffizienz [6].

Immunzellen beseitigen abgestorbenes Gewebe und kreieren ein Milieu, welches essenziell für Migration, Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten und Endothelzellen ist [7]. Nach einem Myokardinfarkt kommt es zu einer massiven Infiltration von Monozyten und Makrophagen [8] [9]. Der initiale pro-inflammatorische Phänotyp dieser Populationen geht im Verlauf der Infarktheilung in einen überwiegend reparativen Phänotyp über [10]. Alternativ aktivierte Makrophagen spielen eine essenzielle Rolle im Wundheilungsprozess nach einem Myokardinfarkt [11]. Resistin-like alpha (Retnla) gehört zur Familie der Fizz/Resistin-like Moleküle [12] und wird von alternativ-aktivierten Makrophagen exprimiert. In dieser Dissertation sollen erstmals Retnla-exprimierende Zellen im Modell der Ischämie/Reperfusion mit Hilfe der Mauslinie *RetnlaCreRs26Tomato* *in vivo* charakterisiert werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Makrophagen

1.1. Historischer Hintergrund

Im 19. Jahrhundert wurden Makrophagen (gr. *makros* = groß, *phagein* = essen) als erstes vom russischen Zoologen Ilya Metchnikoff im Detail beschrieben. Er entdeckte ihre Fähigkeit, Zellbestandteile von lebenden und toten Zellen zu zerstören, aufzunehmen und dann zu verdauen [13, 14].

Der Begriff „reticulo-endotheliales System (RES)“ wurde 1924 geprägt. Er basiert auf der Beobachtung, dass Phagozyten oft retikuläre Netze um das Endothel bilden [15, 16]. Im Jahre 1969 beschlossen zu dieser Zeit bedeutende Immunologen, dass der Begriff „reticulo-endotheliales System“ nicht mehr ausreichte, um das System adäquat zu beschreiben. Daher wurde es fortan als „das mononukleäre Phagozytensystem (MPS)“ bezeichnet. Die Umbenennung sollte das gewonnene Wissen um die Funktion und Morphologie von Monozyten, dendritischen Zellen und Ableitungen dieser Zellen aus dem Knochenmark widerspiegeln [16, 17].

1.2. Ursprung der Makrophagen

Makrophagen sind Teil des angeborenen Immunsystems. Lange Zeit war man der Annahme, dass Gewebsmakrophagen ausschließlich durch im Blut zirkulierende Monozyten ersetzt werden. Mittlerweile gibt es Beweise, dass embryonale Vorläuferzellen den Ursprung der meisten gewebsständigen Makrophagen darstellen. Es findet hierbei eine primitive Hämatopoese im Dottersack statt. Die Gewebsmakrophagen haben die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und sind so unabhängig von Monozyten [18-20]. Jedes Organ hat eine einzigartige Kombination aus Makrophagen mit embryonalem und knochenmarksabhängigem Ursprung.

1.3. Heterogenität und Funktion

Makrophagen sind besonders plastische Zellen, welche von einem Phänotyp zum anderen wechseln können [21, 22]. Die Polarisation der Makrophagen richtet sich dabei immer an die Stimuli und Signale aus der Mikro-Umgebung [22]. Das lokale Zytokin-Milieu dient den Zellen dabei als Orientierung für ihre Polarisation. Daraus folgt eine Einteilung der humanen und murinen Makrophagen basierend auf der Expression ihrer Oberflächenproteine, der Produktion von Faktoren und ihren biologischen Aktivitäten. Zwei große Makrophagen-Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen werden so definiert. Es handelt sich um die klassisch aktivierten oder inflammatorischen (M1-ähnlichen) und die alternativ aktivierten oder anti-inflammatorischen (M2-ähnlichen) Makrophagen. Das Phänomen der zwei verschiedenen Phänotypen M1/M2 wird auch als „Makrophagenpolarisation“ bezeichnet [21, 23-27].

1.3.1. M1/ pro inflammatorische Polarisation

M1-ähnliche Makrophagen werden typischerweise durch T-Helfer-Zellen Typ 1(Th1) -Zytokine stimuliert, wie zum Beispiel Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), oder die Makrophage reagiert auf bakterielle Lipopolysaccharide (LPS). Diese Makrophagen produzieren und sekretieren eine Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen (darunter TNF- α , Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-23, Interleukin-6 (IL-6) und Cyclooxygenase-2 (COX-2) und geringe Mengen an Interleukin-10 (IL-10)). Pro-inflammatorische Makrophagen beteiligen sich an der Beseitigung von Pathogenen während einer Infektion. Sie aktivieren das Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP) Oxidasesystem, woraufhin reaktive Sauerstoffspezies (eng. *reactive oxygen species* (ROS)) freigesetzt werden. M1-ähnliche Makrophagen zeigen eine effektive anti-mikrobielle und anti-tumorale Aktivität und sind für einen durch ROS ausgelösten Gewebeschaden verantwortlich. Sie beeinträchtigen so die Geweberegeneration und die Wundheilung. Um eine übermäßige Gewebeschädigung zu verhindern, wird die chronische Immunantwort durch anti-inflammatorische M2-ähnliche Makrophagen reguliert [22-32].

1.3.2. M2/ anti-inflammatorische Polarisation

M2-ähnliche Makrophagen, oder auch alternativ aktivierte Makrophagen genannt, sind anti-inflammatorisch und werden von T-Helfer-Zellen Typ 2 (Th2) - Zytokine wie zum Beispiel Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) polarisiert.

STAT6 (eng. *signal transducer and activator of transcription 6*) wird dabei durch den IL-4 Rezeptor alpha (IL-4R α) aktiviert. Weitere Zytokine wie IL-10 sorgen auch für eine Polarisation in einen nicht inflammatorischen Phänotyp [32, 33]. Das Zytokin Interleukin-33 verstärkt die durch IL-13 ausgelöste Polarisation in den nicht-inflammatorischen Phänotyp. Dabei findet eine Hochregulation von Arginase-1 (Arg-1), den Chemokinen CCL17 und CCL24 statt, wodurch zum Beispiel Atemwegsentzündungen ausgelöst werden können [34]. Interleukin-21 ist ein weiteres Th2-assoziiertes Zytokin. M2-Makrophagen haben ein nicht-entzündliches Zytokinprofil, welches hauptsächlich durch den TGF- β (eng: *transforming growth factor beta*), einer geringen Produktion von IL-12 und einer hohen Produktion von IL-10 gekennzeichnet ist. Alternativ-aktivierte Makrophagen können effektiv phagozitieren, beseitigen Zellreste und apoptotische Zellen. Sie unterstützen die Wundheilung und Regeneration des betroffenen Gewebes durch ihre Förderung von Blutgefäßneubildung und ihren pro-fibrotischen Eigenschaften [29, 31, 32, 34-36]. Generell sind anti-inflammatorische Makrophagen an der Th2-Immunantwort und an der Parasitenbeseitigung beteiligt [37-39]. Zu ihren weiteren Aufgaben gehören das Auflösen der Entzündungsreaktion, das Initiieren eines Gewebeumbaus [21, 40], die Immunregulation und die Tumormutation [33, 41-44].

Die Einteilung in einen M1/M2-Phänotyp spiegelt allerdings nicht die vielen verschiedenen Subtypen von Makrophagen wider. M2-ähnliche Makrophagen können, je nach Stimulus, in vier weitere Untergruppen eingeteilt werden. Dazu gehören M2a, M2b, M2c und M2d [45, 46].

Die Untergruppe M2a wird von IL-4 und IL-13 induziert und produziert hohe Level an CD206, zudem den Attrappenrezeptor (eng. *decoy receptor*) Interleukin-1 II (IL1-RII) und den Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten (IL1Ra) [45],[47].

Der M2b-Subtyp wird durch Immunkomplexe, Toll-artiger-Rezeptor-Agonisten (TLR-Agonisten) und IL-1-Rezeptorliganden, stimuliert [45, 47]. Dabei produzieren M2b-Makrophagen eine Vielzahl an Zytokine (darunter IL-10, IL-6 und TNF- α) [47].

M2c wird von Glucokortikoiden und IL-10 aktiviert. Diese Untergruppe richtet sich vor allem gegen apoptotische Zellen, indem sie eine hohe Anzahl an IL-10 und TGF- β sezerniert [47, 48].

Der vierte Typ M2d wird von TLR-Agonisten durch den Adenosin-Rezeptor induziert [45]. Durch die Aktivierung des Adenosin-Rezeptors wird die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine unterdrückt und die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen vorangetrieben. Die Sekretion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (eng. *vascular endothelial growth factor* (VEGF)) regt die Gefäßneubildung an [45, 49, 50]. Je nach den vorhandenen Stimuli in ihrer Umgebung können M1/M2-Makrophagen in den jeweiligen Phänotyp „repolarisieren“. Diese Eigenschaft unterstreicht ihre Plastizität.

2. Resistin-like Moleküle

Die Resistin-like Moleküle (RELMs) sind Effektorproteine mit einer hohen immunmodulierenden Eigenschaft. Sie wurden vor weniger als 20 Jahren im Rahmen verschiedenster Krankheiten im Mausmodell identifiziert, woraus eine unterschiedliche Nomenklatur entstand [12, 51-54]. Resistin-like-molecule-alpha (RELM α) war das erste RELM Protein, das in einem Mausmodell für Asthma entdeckt wurde. Dort wurde es FIZZ1 (eng. *found in inflammatory zone*) genannt. Das murine Resistin (Retn/FIZZ3) wurde anschließend identifiziert und funktionell in einer Stoffwechselstörung charakterisiert, wo es eine Resistenz für Insulin zeigte, was zu der allgemeinen Bezeichnung „RELMs“ für die Proteinfamilie führte. RELM α wurde auch in Zusammenhang mit Hypoxie erforscht und dort als „*Hypoxia-Induced Mitogenic Factor* (HIMF)“ betitelt [54].

Während Mäuse und Ratten vier RELM Gene aufweisen, (*Retn*, *Retnla*, *Retnlb*, *Retnlg*) zählen nur *Retn* und *Retnlb* zu einer diversen taxonomischen Gruppe, zu der die Menschen, Primaten, Hunde, Katzen und Pferde gehören. In Mäusen und Ratten sind drei der Gene (*Retnla*, *Retnlb* und *Retnlg*) auf Chromosom 16 gebündelt [51]. Diese Gene teilen die größte Sequenzhomologie und zeigen ähnliche Transkriptionsregulation und Expressionsmuster.

2.1. Genetische Regulation der RELM Expression

RELM α , ursprünglich im Zusammenhang mit Bronchio-Alveolar-Lavage entdeckt, wird von Lungenepithelzellen und Typ2-Pneumozyten exprimiert [54-56]. Damit einhergehend ist die *Retnla* Transkription sehr von einer Th2-Zytokin Umgebung abhängig. Es sind Bindungsstellen für den Th2-Zytokin-induzierten Transkriptionsfaktor STAT6 am *Retnla*-Promotor vorhanden. Es wurde festgestellt, dass STAT6^{-/-} oder IL-4^{-/-} Mäuse eine reduzierte *Retnla* Expression aufweisen [57, 58]. Zusätzlich zur Genexpression von nicht-hämatopoetischen Zellen wird *Retnla* als ein Schlüsselgen im Zusammenhang mit alternativ aktivierten Makrophagen gesehen, die sich in chronisch TH2-Zytokin stimulierten Umgebungen, wie zum Beispiel bei einem Befall mit Helminthen oder anderen Parasiten, differenzieren [57, 59-61]. Es wurde zudem festgestellt, dass andere Immunzellen, wie dendritische Zellen und Eosinophile, eine Genexpression von *Retnla* aufweisen können [59,62]. Studien zur funktionellen Transkription haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) durch die Bindung an den *Retnla*-Promotor erst eine IL-4/STAT6- ausgelöste *Retnla* Expression möglich macht. Es liegt nahe, dass STAT6 und C/EBP das *Retnla* Gen zusammen aktivieren [58]. Die RELM Rezeptoren und Signalkaskaden sind noch zu großen Teilen unbekannt. Nur der Rezeptor von Resistin ist bis jetzt beschrieben worden [63].

2.2. Funktion von *Retnla* in der Wundheilung

Die Wundheilung und die Fibrose werden durch Th2-Zytokine stimuliert [64]. Auch RELM α wird durch Th2-Zytokine stimuliert, Martins *et al.* konnten dies in Verletzungen an Lunge und Haut belegen. Es wurde postuliert, dass RELM α als nachgeschalteter Mediator für Th2-Zytokin-induzierte Wundheilung fungiert. Darauf hinweisend sind Untersuchungen, bei denen RELM α die Differenzierung von Myofibroblasten forciert und es zu einer erhöhten Umsetzung von Typ1 Kollagen und *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) kommt, was mitunter zu einer verdickten fibrotischen Dermis führt [65]. Knipper *et al.* führten Hautbiopsien durch, die zeigten, dass RELM α , das durch IL-4 aktiviert wird, die Anordnung der Kollagenfibrillen steuert [66]. *Retnla* wird als Marker für alternativ-aktivierte Makrophagen gesehen [67].

3. Myokardinfarkt

3.1. Entstehung

Der Myokardinfarkt wird durch das Absterben von Kardiomyozyten in Folge einer Ischämie definiert [68]. Die Ischämie wird durch das Blockieren von sauerstoffversorgenden Koronararterien verursacht. Grund dafür sind erodierte und/oder rupturierte Arterienwände, die über die Jahre Lipide und Leukozyten angehäuft haben. Diesen Prozess bezeichnet man als Atherosklerose [69].

3.2. Rolle und Funktion der Makrophagen

Innerhalb der ersten vier Tage nach einem Myokardinfarkt beginnen Ly6C^{high} Monozyten in das ischämische Gewebe einzuwandern [8]. Eine hohe Expression des Oberflächenproteins Ly6C auf Monozyten wird mit einem Entzündungsgeschehen assoziiert. Auch neutrophile Granulozyten infiltrieren das Gewebe und erreichen nach etwa 24 Stunden ihren Höhepunkt, während die Monozyten ihren nach 3 Tagen erreichen [10]. Am Einsatzort angekommen, differenzieren sich die Monozyten zu pro-inflammatorischen Makrophagen. Monozyten und Makrophagen schütten Entzündungszytokine, Cathepsine und Matrix-Metalloproteasen aus. Monozyten und Makrophagen sammeln sich anfangs in der Infarktübergangszone. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, tote Myozyten, Zellschrott und apoptotische Neutrophile zu entfernen, um das

Gewebe für den Umbau und die Regeneration vorzubereiten [70]. Im Gegensatz zum ischämischen Gewebe gibt es im angrenzenden Myokardium noch eine intakte Vaskularisierung. Mit der Zeit migrieren die Makrophagen in die Infarktzone. Bei einer schnellen Reperfusion des Infarktgewebes und keiner Behinderung der Mikrovaskulatur, können die Monozyten direkt nach der ischämischen Verletzung in die Infarktzone einwandern [71].

Auf die initiale Entzündungsreaktion folgt eine Proliferationsphase, in der neue Matrix generiert wird und der linke Ventrikel wieder eine mechanische Stabilität erhält. Damit es nicht zu einer Ruptur der Infarktnarbe oder einer Dilatation des linken Ventrikels kommt, darf diese Phase nicht beeinträchtigt werden. Der Oberflächenmarker Ly6C wird zu diesem Zeitpunkt nicht mehr so hoch exprimiert [10]. Makrophagen, die in den Tagen 4-7 Tagen nach Infarkt aktiv sind, zeigen eine ähnliche Genexpression wie alternativ aktivierte Makrophagen [72]. Diese Zellen helfen bei der Konstruktion von neuem Gewebe, indem sie die Angiogenese mithilfe von VEGF unterstützen und die Myofibroblastenaktivität mittels von TGF-beta steuern [10]. Eine Ly6C^{high} und eine Ly6C^{low} Phase sind Voraussetzung für die Heilung des Infarkts [10, 73, 74]. Falls diese Phasen beeinträchtigt werden, kommt es zu einem langsameren Matrixaufbau, ungenügendem Entfernen von toten Myozyten und einem geringeren Ausbau von Mikrogefäßen [10].

In der Remotezone (das nicht ischämische Myokard) kommt es auch zu Veränderungen infolge des Infarkts. Die Neubildung von Kapillaren führt zu einer erhöhten Chemokinexpression, die das Rekrutieren von Monozyten begünstigt [9]. Die maximale Anzahl an Monozyten und Makrophagen im nicht-ischämischen Gewebe wird etwa 10 Tage nach der Koronarligatur erreicht [9]. Eine vermehrte Präsenz myeloider Zellen in der Remotezone scheint für die erhöhte Aktivität von Metalloproteinasen, Cathepsine und Proteasen verantwortlich zu sein [9, 75]. Letztere können die extrazelluläre Matrix angreifen und eine Dilatation des linken Ventrikels begünstigen.

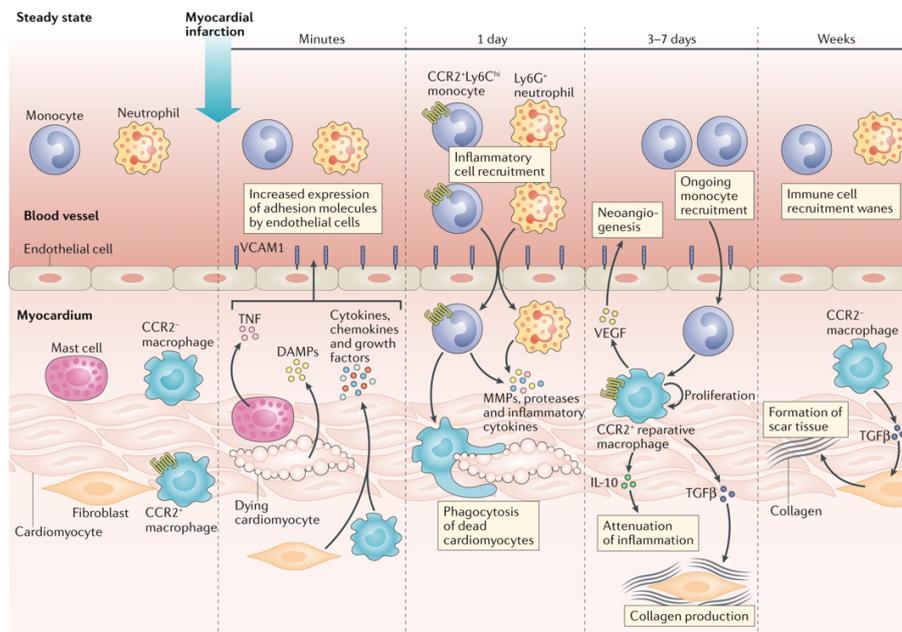


Abbildung 1: Immunzellaktivität im Verlauf eines Myokardinfarkts

Diese Abbildung beschreibt die Immunzellaktivität im Herzen während den Ruhebedingungen (linke Seite) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Ischämie im Bereich des Myokardinfarkts. Abbildung von Swirski, F. *et al.*, 2018 [69] Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center's Rights®

3.3. Rolle und Funktion der Neutrophilen Granulozyten

Durch die ischämische Verletzung wird im Herzinfarktgeschehen die Produktion von neutrophilen Granulozyten angekurbelt. Zusammen mit Monozyten werden sie hauptsächlich aus dem Knochenmark und zu kleinen Anteilen aus extramedullären Speichern der Milz rekrutiert [76, 77]. Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks und periphere B-Zellen setzen Chemokine wie CCL2 und CCL7 frei. Dadurch kommt es zu einer Ausschüttung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten ins Blut [78-81]. Neutrophile Granulozyten beteiligen sich am Beseitigen von toten und sterbenden Kardiomyozyten [79]. Sie halten sich nicht lange im Myokard auf und drei Tage nach dem Myokardinfarkt nimmt ihre Zahl stetig ab, bis sie an Tag 7 kaum noch im kardialen Gewebe vorhanden sind. Horckman *et al.* zeigten, dass neutrophile Granulozyten an der Polarisierung von Makrophagen in einen alternativ aktivierten Typ beteiligt sind. Die Freisetzung von neutrophil-abhängigem Lipocalin (eng. *neutrophil-derived lipocalin* (NGAL)), durch die neutrophilen Granulozyten spielt dabei eine wichtige Rolle [82].

3.4. Kardiales Remodeling

3.4.1. Klinische Charakterisierung und Auswirkungen

Um den Begriff „Remodeling“ einheitlich zu verwenden, wurde im Jahr 2000 eine Definition vom internationalen Forum des kardialen Remodelings festgelegt. Ab diesem Zeitpunkt wurde kardiales Remodeling wie folgt definiert: Unter kardialem Remodeling versteht man eine Ansammlung von molekularen, zellularen und interstitiellen Veränderungen, die sich klinisch als Veränderungen in der Größe, Form und Funktion des Herzens nach einer kardialen Verletzung äußern [83].

Die klinische Diagnose des Remodeling richtet sich nach morphologischen Veränderungen, dazu gehören unter anderem der Hohlraumdiаметer, das Gewebe an sich (Hypertrophie und Atrophie), die Geometrie (die Dicke der Herzwand und die Form), die Narbenareale nach einem Myokardinfarkt, die Fibrose und inflammatorische Infiltrate (z.B. bei Myokarditis) [83]. Um diese Veränderungen zu diagnostizieren, werden am Häufigsten Echokardiographie, Ventrikulographie und Kernspintomographie [84] verwendet. Durch den Expansionsprozess findet in der akuten Phase des Myokardinfarkts als sekundäre Komplikation eine Dilatation im infarzierten Bereich statt. In der chronischen Phase kann eine Hypertrophie im Infarktbereich auftreten [83, 84].

Die kardiale Dysfunktion ist die Hauptfolge eines kardialen Remodeling, gefolgt durch die ventrikuläre Dysfunktion. Durch die zellularen und molekularen Veränderungen, die nach einem Myokardinfarkt auftreten, kommt es zu einem progressiven Verlust der Ventrikelfunktion. Die Folge davon ist ein Herzversagen [83-86].

Ventrikuläre Arrhythmien stellen eine erhebliche Komplikation dar. Es kann zu einer anhaltenden ventrikulären Tachykardie und einem Ventrikelflimmern kommen. Der Myokardinfarkt verursacht Änderungen in den Ionenkanälen und der Kommunikation von interzellulären *Gap-Junctions*. Letzteres führt zu einer Verlängerung des QT-Intervalls und Arrhythmien [87, 88]. Auch stellt die Anhäufung von Kollagen im Gewebe (Fibrose) ein Problem dar. Durch die massive Anreicherung von Kollagen kann es zu einer Blockade der elektronischen Weiterleitung im Herzen kommen und Arrhythmien werden begünstigt [89].

In den ersten Stunden nach dem Verschluss einer Koronararterie kann der Zerfall des interfibrillaren Kollagens zusammen mit der Nekrose von Myofibrillen auftreten. Durch den Verlust des intakten Gewebes im infarzierten Bereich, ist die Region sehr anfällig für Deformation und Ausdehnung. Die Ausdünnung der Infarktregion und eine Vergrößerung der linken Herzkammer, die durch die Nekrose der Muskelzellen ausgelöst wird, ist die Folge [90].

III. ZIELSETZUNG

In dieser Dissertation soll erstmals die Retnla-exprimierende Makrophagenpopulation in der sterilen Inflammation im Herzen näher untersucht werden.

1. Charakterisierung der Retnla-exprimierenden Zellen unter Ruhebedingungen

Um Retnla-exprimierende Zellen *in vivo* verfolgen zu können, wird die Mauslinie *RetnlaCreRosa26Tomato* verwendet. Die Zellen sollen mit Hilfe von Durchflusszytometrie, Histologie und Epifluoreszenzmikroskopie unter Ruhebedingungen untersucht werden. Retnla-exprimierende Makrophagen sollen in der embryonalen Entwicklung und in der adulten Maus dargestellt werden.

2. Stimulation der Retnla-exprimierenden Zellen durch Zytokine

Es wird Mäusen der Linie *RetnlaCreRs26Tomato* Interleukin-4 injiziert. Alternativ-aktivierte Makrophagen werden durch Interleukin-4 stimuliert. Die Ergebnisse können Aufschlüsse über die Polarisierung der Retnla-exprimierenden Makrophagen geben.

3. Charakterisierung der Retnla-exprimierenden Zellen in kardialer Inflammation

Retnla-exprimierende Zellen werden im Modell der transienten LAD-Ligatur untersucht. Dabei handelt es sich um ein Ischämie/Reperusionsmodell des akuten Myokardinfarkts. Dabei werden die murinen Herzen histologisch und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Das Modell der Angiotensin-II Pumpe wird verwendet, um Retnla-exprimierende Zellen in der chronischen Inflammation zu charakterisieren. Die Quantifizierung soll mittels durchflusszytometrischer Analyse stattfinden. Beide Modelle ermöglichen uns, einen Einblick in das Verhalten und die phänotypischen Merkmale der Retnla-exprimierende Zellen in der Inflammation zu bekommen.

4. Funktion der Retnla-exprimierenden Zellen im Modell des Myokardinfarktes

Um die Rolle und Funktion von Retnla-exprimierenden Zellen in kardialen Entzündungsprozessen näher untersuchen zu können, wird der Mausstamm *Retnla^{Cre+}Rosa26^{tomato/+}Rosa26^{DTR}* verwendet. In dieser Mauslinie ist es möglich, Retnla-exprimierende Zellen durch Gabe von Diphtherie-Toxin gezielt zu depletieren. Mit Hilfe der Positron-Emissions-Tomographie (PET) soll die Auswirkung einer Depletion von Retnla-exprimierenden Zellen auf das kardiale Remodeling und den Krankheitsverlauf bestimmt werden.

5. Einfluss neutrophiler Granulozyten auf die Funktion der Retnla-exprimierenden Zellen

Es sollen neutrophile Granulozyten in Mäusen der Linie *RetnlaCreRosa26Tomato* depletiert werden. Auf diese Weise soll der Einfluss neutrophiler Granulozyten auf die Funktion der Retnla-exprimierenden Zellen im Modell des Ischämie/Reperfusionsschadens nach Myokardinfarkt untersucht werden. Die Tiere werden mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Für die vorliegende Arbeit wurde das Versuchstier Maus (*Mus musculus domesticus*) gewählt. Mäuse zeichnen sich durch ihre hohe Reproduktionsrate aus und sind in der Haltung kostengünstig und platzsparend.

Die Tierversuche wurden gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Fassung vom 18.5.2006, letzte Änderung am 19.06.2020 durch Artikel 280) und von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: 55.2.1.54-2532-183-16; 55.2-1-54-2532-001-19; 55.2-1-54-2532-17-19).

1.1. Mausstämme

Folgende Mausstämme wurden in dieser Dissertation verwendet und werden im Weiteren näher beschrieben.

1.1.1. C57BL/6J

Der Wildtypstamm *C57BL/6J* wurde für die Single-Zell-Sequenzierungen verwendet. Bei diesem Mausstamm handelt es sich um einen häufig genutzten Inzuchtstamm [91].

1.1.2. RetnlaCreRosa26Tomato

In dem Mausstamm „Retnla-Cre“ steht die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Promotors *Retnla*. In Verbindung mit dem Reporter *Rosa26Tomato* können Retnla-exprimierende Zellpopulationen *in vivo* verfolgt werden. Bei diesem Mausstamm handelt es sich um eine transgene Mauslinie, bei der das Retnla-Gen zufällig in das Genom eingebracht wurde.

1.1.3. Cx3Cr1-GFPRosa26Tomato

Der Fractaklinrezeptor *Cx3Cr1* wird insbesondere auf myeloiden Zellen exprimiert. In der Mauslinie *Cx3Cr1-GFP* wird das Fluoreszenzprotein GFP unter Kontrolle des endogenen *Cx3Cr1*-Lokus exprimiert (GFP *knockin*). Somit ist es möglich Makrophagen und Monozyten *in vivo* zu verfolgen.

1.1.4. RetNlaCreRs26TomatoRs26DTR

In der Mauslinie *RetnlaCreRs26TomatoRosa26-DTR* wird der Diphtherietoxin-Rezeptor nach Aktivierung der Cre-Rekombinase *Retnla*-abhängig exprimiert. Dadurch werden Cre-exprimierende Zellen sensitiv gegenüber DT. Durch DT-Gabe kann in dieser Mauslinie die *Retnla*-exprimierende Zellpopulation spezifisch depletiert werden.

1.2. Tierhaltung, Zucht und Hygiene

Der Mausstamm *RetnlaCreRosa26Tomato* wurde durch Prof. Vöhringer, Abteilung für Mikrobiologie der Universität Erlangen, erstellt [92]. Die Tiere wurden in der Tierhaltung des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP) gezüchtet und für die Versuche in den Tierstall des Walter-Brendel-Zentrums überführt.

Die Haltung und Züchtung der Mäuse in der Tierhaltung des ZNP (AAALAC-zertifiziert) erfolgt unter SPF-Bedingungen, mit geschlossenem Barriersystem (Personalschleuse, Materialschleuse, Durchreichautoclav, Wasserstoffperoxidschleuse, Überdruckbelüftung). Das Umsetzen der Tiere in einen neuen Käfig erfolgt einmal pro Woche, anschließend werden die benutzten Käfige mit 80 °C heißem Wasser gewaschen und anschließend bei 121 °C autoklaviert. Die Mäuse werden in einem IVC-System THKB-M2V-M Polysulfonkäfige (Typ M II, verlängert) mit max. 3 Tieren/Käfig gehalten. Die Käfige dürfen nur unter den Umsetzstationen geöffnet werden. Als Futter erhalten die Tiere Standardfutter für Labornager (Haltungsfutter V 1536) *ad libitum*, auch das Wasser steht den Tieren aus Tränkeflaschen unbegrenzt zur Verfügung. Zuchttiere erhalten ein hochkalorisches Zuchtfutter. Wasser, Futter und Einstreu werden in der Tierhaltung autoklaviert.

In den Haltungsräumen herrscht eine Raumtemperatur von 21 °C und eine Luftfeuchte von 68 %. Um einen geregelten Tag-Nacht Rhythmus zu garantieren, wird das Lichtprogramm über einen 12 Stunden-Zeitschalter geregelt. In der Hellphase werden 100 Lux erreicht. Um den SPF-Status der Tiere regelmäßig zu untersuchen, werden Sentinel Mäuse nach den FELASA Empfehlungen überprüft. Für das Enrichment der Tiere stehen Zellstoff und ABEDD-Baumaterialien (Ausleben des Nesttriebs, Graben) zur Verfügung und Ehret-Maushäuser dienen als Rückzugsmöglichkeit.

Im Walter-Brendel-Zentrum werden die Mäuse entsprechend den erforderlichen speziellen Hygienebedingungen (FELASA erweitert) in dafür eingerichteten Räumen gehalten. Bei den Käfigen handelt es sich um Standard Makrolon Käfige (Greenline IVC SealsavePLUS, Techniplast, Buguggiate, Italien). Die Besatzdichte, Raumtemperatur, Fütterung, Luftfeuchte und das Lichtprogramm entspricht der Haltung im ZNP.

Der Gesundheitsstatus der Tiere wird nach den FELASA Richtlinien vierteljährlich nach dem erweiterten FELASA-Protokoll überprüft. Daneben erfolgen situationsbedingt kleinere, stichprobenartige Untersuchungen nach dem kleinen FELASA-Protokoll.

1.3. Terminierte Verpaarung

Um die Fragestellung nach der ersten visuellen Genexpression des Markers *Retnla* beantworten zu können, ist es notwendig, die *Retnla*-exprimierenden Makrophagen in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Embryonalentwicklung zu untersuchen. Dafür werden die Embryonen zu einem bestimmten Zeitpunkt untersucht. Mit Hilfe einer terminierten Verpaarung der Elterntiere und der Trächtigkeitsfeststellung durch eine sonographische Untersuchung ist es möglich, gezielte Entwicklungsstadien der Embryonen zu gewährleisten. Zusätzlich wird das Entwicklungsstadium nach Theiler überprüft. Für die sonographische Untersuchung wurde ein portables Ultraschallgerät (MyLab One, Easote Biomedica Deutschland GmbH, Köln) verwendet.

Die Paarung findet in der Regel während der Dunkelphase statt [93]. Für die Versuche wurden ein bis zwei Weibchen des gewünschten Genotyps zu einem entsprechenden Männchen in den Käfig gesetzt. Start des Versuchs ist um 18:00 Uhr abends und die Trennung der Tiere erfolgt um 8:00 früh des folgenden

Tages. Die Weibchen werden dann wieder in ihren Käfig zurückgesetzt und anschließend auf einen Vaginalpfropf untersucht. Der Pfropf, der aus dem Sekret der Geschlechtsanhangsdrüsen des Männchens stammt, bleibt nach Bildung etwa 12-16 Stunden in der Vagina. Das Vorhandensein eines Vaginalpfropfes ist ein Anzeichen für eine stattgefundene Paarung, ist jedoch keine sichere Methode zur Bestimmung einer Trächtigkeit [93]. Der Zeitpunkt der Verpaarung wird auf 1:00 Uhr in der Nacht festgelegt. Damit spricht man von dem Entwicklungsstadium E 0.5 um 13 Uhr am Tag der Vaginalpfropfuntersuchung.

2. Intravitalmikroskopie

Für das Verfolgen der Retnla-exprimierenden Makrophagen im Embryomodelle wurde ein Intravitalmikroskop verwendet. Im Folgenden wird der Versuchsaufbau, die Operation und das Epifluoreszenzmikroskop näher beschrieben.

2.1. Narkose

Nachdem die Trächtigkeit festgestellt wurde, werden die Muttertiere für eine *Sectio Caesare* vorbereitet, um die Embryonen und den intakten Dottersack zu isolieren. Das Tier erhält dafür eine Allgemeinanästhesie, welche durch die Injektion einer Tripelnarkose aus verschiedenen Injektionsanästhetika (Midazolam, Medetomidin und Fentanyl) erreicht wird. Das angewandte Regime ist gut steuerbar und antagonistisierbar.

Midazolam ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der Benzodiazepine. Es besitzt angstlösende, dämpfende, schlaffördernde und krampflösende Eigenschaften. Die Wirkung tritt rasch ein und beruht auf der Bindung an GABA_A-Rezeptoren im Gehirn. Verwendet wurde das Midazolam (Midazolam, B. Braun, Melsungen) in der Dosierung 5,0 mg/kg [2].

Als zweiter Bestandteil der Tripelnarkose wurde Medetomidin (Dorbene vet, zoetis Deutschland GmbH, Berlin) verwendet. Es gehört zu den α_2 -Adrenozeptor-Agonisten und wirkt dosisabhängig sedativ und analgetisch. Es wurde in einer Dosierung von 0,5mg/kg eingesetzt [2].

Der dritte Bestandteil ist Fentanyl (Fentadon, Albrecht GmbH Aulendorf), dabei handelt es sich um ein synthetisches Opioid, das als Schmerzmittel eingesetzt wird. Es wirkt als Agonist am μ -Opioidrezeptor. Es hat eine circa 100-fach höhere Potenz als Morphin und eine Wirkungsdauer von 30-60 min. Die verwendete Dosierung betrug 0,05 mg/kg.

Bevor die Injektion der Tripelnarkose erfolgt, wird eine Narkoseeinleitung mit Isofluran (Isofluran CP, cp-pharma, Burgdorf) durchgeführt. Dafür wird das Tier in eine durchsichtige Plexiglasröhre gesetzt, die an einen Verdampfer (Datex-Ohmeda Isotec 5, UniVet Porta Fa. Groppler, Deggendorf) und an der anderen Seite an eine Absaugvorrichtung angeschlossen ist. In die Röhre wird so ein 5 %iges Isofluran-Sauerstoffgemisch eingeleitet.

Nach Ausfall des Stellreflexes wird die Maus aus der Röhre entnommen und bekommt mittels einer 30 G Kanüle (BD Mikrolance Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) intraperitoneal die oben genannte Tripelnarkose injiziert. Das Tier wird anschließend in eine Schlafbox gelegt, die auf einer Wärmematte platziert ist.

2.2. Sectio caesare

Zur Überprüfung der Narkosetiefe wird der Flexorreflex getestet, ist dieser verschwunden, kann das Tier auf den Rücken auf eine Wärmematte platziert werden. Der Zwischenzehenreflex muss in regelmäßigen Abständen kontrolliert werden, um rechtzeitig mit der Tripelnarkose nachzudosieren. Das Tier wird mit medizinischem Pflaster (Transpore, 3M Deutschland GmbH, Neuss) an den Vorder- und Hintergliedmaßen fixiert. Für die Operation wird ein Stereomikroskop (Stemi-2000- C, Zeiss, Jena) und eine Kaltlichtquelle (Schott-Kaltlichtquelle KI200, Zeiss, Jena) verwendet. Man eröffnet die Bauchdecke entlang der *Linea alba*, danach wird ein Uterushorn nach dem anderen vorverlagert und daraus werden die Embryonen mit intaktem Dottersack herausverlagert. Dafür wird mikrochirurgisches Besteck (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg) verwendet. Für die Überführung des Embryos, umgeben vom intakten Dottersack, steht eine 38 °C warme phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in einer 6-Kammer Keramikplatte auf

eine Heizplatte (Hot Plate 100 mit HP100 Hot Plate Controller, Labotect GmbH, Rosdorf) zur Verfügung.

2.3. Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Durchlicht-Hellfeldmikroskopie wird das Bild durch Licht erzeugt, welches das Präparat durchstrahlt. Dies ist bei der Fluoreszenzmikroskopie nicht der Fall. Hier wird das Bild durch Fluoreszenzlicht erzeugt, das erst im Präparat entsteht. Das Anregungslicht, welches das Präparat bestrahlt, wird dagegen durch spezielle Filter von der Bilderzeugung ausgeschlossen. Da sich Fluoreszenzlicht unter normalen Bedingungen gleichmäßig in alle Raumrichtungen ausbreitet, ist es daher grundsätzlich egal, ob das Anregungslicht von oben, von unten oder von der Seite kommt.

Bei der Epifluoreszenzmikroskopie wird ein Elektron des Fluorochroms durch die Absorption eines Photons einer Lichtquelle in einen höheren Energiezustand (Exzitation) versetzt und fällt dann aus diesem instabilen Zustand nach einer Konformationsänderung wieder in den Ursprungszustand zurück. Das Mikroskop detektiert (Emission) die Lichtenergie, welche durch die Energiedifferenz zwischen den Energiezuständen entsteht. Der Vorteil dieser Methode ist, dass man auf viele Fluorochrome zurückgreifen kann. Es ist allerdings darauf zu achten, dass die Spektren der verwendeten Fluorochrome sich nicht überlagern.

Für die Versuche wurde das Epifluoreszenzmikroskop (Axio Zoom V.16, Carl Zeiss, Jena) verwendet.

3. Durchflusszytometrie

3.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Um einzelne Zellpopulationen in Organen darzustellen, eignet sich besonders die Methode der Durchflusszytometrie. In diesem Zusammenhang wird oft der Begriff FACS (eng. *fluorescence-activated cell sorting*) genannt, dabei handelt es sich um ein eingetragenes Warenzeichen der Firma Becton Dickinson. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf einer Antigen-Antikörperreaktion. Die quantitative Bestimmung der Marker (z.B. Proteine) erfolgt durch das Verwenden von spezifischen Antikörpern, welche an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Die markierten Zellen werden

durch eine Kapillare gesaugt und in einer Durchflusszelle mit Laserlicht angeregt. Durch die Anregung entsteht einerseits Streulicht und zum anderen Fluoreszenzlicht, welches separat detektiert wird. Verschiedene Zelltypen streuen das Licht in unterschiedlicher Menge. Zellen mit hoher Granularität streuen das Licht mehr als nicht granulierten Zellen. Man unterscheidet allgemein zwischen Seitwärtsstreulicht (SSC= *sideward Scatter*) und Vorwärtsstreulicht (FSC= *forward Scatter*). Ersteres ist ein Maß für die Brechung im rechten Winkel, wodurch Rückschlüsse auf die Größe und Struktur des Zellkerns gezogen werden können. Das Vorwärtsstreulicht ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und ist abhängig vom Volumen der Zelle.

Die zu analysierenden Zellpopulationen werden mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern versetzt. Die Elektronen der Fluoreszenzfarbstoffe werden durch den Laserstrahl für kurze Zeit auf ein höheres Energieniveau gehoben. Bei der Rückkehr auf ihr ursprüngliches Energieniveau werden Photonen freigesetzt, welche durch Photodetektoren gemessen werden können. Die Anzahl freigesetzter Photonen korreliert mit der Anzahl der an die Oberflächenantigene gebundenen Antikörper.

In einer Messung können mehrere Marker beziehungsweise Antikörper detektiert werden, je nachdem wie viele Laser und Filter eingesetzt werden. Es müssen sich die Wellenlänge des emittierten Fluoreszenzlichts der eingesetzten Fluorophore aber unterscheiden. So genannte Tandem-Farbstoffe (z.B. APC-Cy7) besitzen den Vorteil, dass das emittierte Licht des ersten Fluorochroms den zweiten Farbstoff anregt. So können noch mehr verschiedene Antigene analysiert werden.

Die Fluorochrome strahlen meist ein Farbspektrum aus und keine bestimmte Farbe, wodurch mehrere Detektoren die Signale erfassen. Um die Überlappung in den Farbspektren zu korrigieren, werden vor einer Analyse die Emissionsmaxima der verwendeten Farbstoffe einzeln anhand von Einzelfärbungen bestimmt. Es handelt sich dabei um eine sogenannte Kompensation. Dafür werden *beads*, Mikropartikel aus Polystyrol, verwendet (Anti-Mouse/Anti-Rat/Anti-Hamster Ig κ /Negative Control Compensation Particles Set, Becton Dickson and Company, Franklin Lakes, USA). Die Oberfläche der *beads* ist an einen IgG Antikörper (z.B. anti-mouse IgG)

gekoppelt, so, dass sie nun mit Antikörpern der entsprechenden Spezies beladen und im Durchflusszytometer gemessen werden können.

Die erfassten Daten wurden mithilfe der Software FlowJo 10.7 analysiert.

3.2. Probennahme und Aufbereitung

Die zu untersuchenden Organe und das Blut werden entnommen und in ein mit PBS gefülltes 15ml Falcon (Polypropylene Conical Tube, Falcon®, Corning Science, Mexiko) überführt. Die Proben werden konstant auf Eis gehalten, um den Zelltod zu verlangsamen. Die Organe werden gewogen und mittels Skalpell (Einmal-Sicherheitsklingen, Aesculap AG, Tuttlingen) in kleine Stücke geschnitten. Um die einzelnen Zellen aus dem Zellverband zu lösen, werden die Proben mit speziellen Enzymen (siehe Tabelle 2) verdaut. Nach einer halben Stunde Inkubation bei 37 °C und 350 rpm wird die Zellsuspension aus dem Inkubator (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg) geholt und zur weiteren Prozessierung durch einen 70 µm Filter (Cell strainer: 70 µm Nylon, Falcon®, Corning, NY, USA) in eine 6 well Platte (Costar 6 Well Plate, flat bottom, Corning, New York, USA) gesiebt. Die Suspension wird in ein 15 ml Falcon überführt und bei 4 °C, 350G, 7 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810R). Der Überstand wird mittels Unterdruckmaschine abgesaugt und die Probe in eine 96 well Platte überführt. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wird die Probe mit Hilfe des FC-Block (CD16/32) geblockt. Pro well werden 50 µl veranschlagt. Nach 10 Minuten werden pro well 50 µl Antikörpermix dazugegeben und dieser dann für 20 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wird der Antikörpermix in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wird die 96-Well Platte bei 350 rpm bei 4 °C für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und die Proben mit 200 µl FACS Puffer resuspendiert. Direkt vor der Überführung in die FACS-Tubes werden die Proben durch ein 50 µm Sieb (Cell Trics50µm, Sysmex Partec, Görlitz) pipettiert. Der Cell Analyzer BD LSR Fortessa wurde für die Analyse aller Proben verwendet. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten FACS-Antikörper.

Tabelle 1: Verwendete FACS-Antikörper

Oberflächenmolekül	Fluorochrom	Klon	Hersteller
F4/80	PerCPCy5.5	BM8	Biolegend
Ly6G	BV 605	1A8	Biolegend
CD 11b	BV421	M1/70	Biolegend
Siglec F	AF 700	1RNM44N	Invitrogen
CD 64	APC	X54-5/7.1	Biolegend
CD 45	PE-Cy7	30-F11	Biolegend
CD 11c	BV 785	N418	Biolegend
CD 115	BV421	AFS98	Biolegend
CD 3	APC-Cy7	17A2	Biolegend
Ly6C	BV 510	HK 1.4	Biolegend
CD 19	FITC	1D3/CD19	Biolegend

Tabelle 2: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller	Cat.
Collagenase I	Sigma Aldrich	CO130
Collagenase XI	Sigma Aldrich	C7657
Collagenase D	Sigma Aldrich	11088882001
Hyaluronidase	Sigma Aldrich	H3506
Dispase	Thermo Fisher	17105-041
DNase I	Sigma Aldrich	D4527

4. Inflammationsmodelle

Um die Rolle der Retnla-exprimierender Makrophagen in der Inflammation zu untersuchen wurden zwei Modelle verwendet: die kardiale Fibrose und der Myokardinfarkt. Diese werden im Weiteren näher beschrieben.

4.1. Kardiale Fibrose

Bei diesem Modell wird der Maus eine Angiotensin-II-Pumpe subkutan implantiert. Angiotensin II ist ein Peptidhormon, welches im Körper eine Vasokonstriktion der Gefäße verursacht und damit eine Hypertonie im Gefäßsystem. Es wurde eine osmotische Pumpe (alzet micro-osmotic pump, Modell 1002, direct Corporation, Cupertino, USA) gewählt, die kontinuierlich eine bestimmte Menge an Angiotensin II (Angiotensin II human 10 mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) an das Tier abgibt. Dafür wird die Pumpe vor der Implantation mit Angiotensin II befüllt (Dosierung des Wirkstoffs ist $1,8\mu\text{g}/\text{kg KGW}/\text{min}$ und wird mit einem Volumen von $0,21\ \mu\text{l}/\text{h}$ abgegeben).

Für das Einsetzen der Pumpe wird das Tier über eine Kopfkammer mit Isofluran betäubt. Um die Augen vor dem Austrocknen zu schützen, wird Augensalbe auf beide Augen gegeben und das Tier auf eine Wärmematte gelegt. Der Maus wird eine 3-4 cm große Stelle im Nacken mit Enthaarungscreme (Enthaarungscreme asid-med, Asid Bonz, Herrenberg) enthaart und die kahle Haut wird mit Jod (Braunol, B.Braun AG, Melsungen) desinfiziert. Der Zwischenzehenreflex wird getestet, um eine chirurgische Toleranz zu gewährleisten. Es wird ein ungefähr 1-1,5 cm großer Hautschnitt quer zur Wirbelsäule gesetzt und unter der Haut mit einer Schere stumpf vorpräpariert, um die Unterhaut von der Muskulatur zu trennen. Dem Tier wird eine halbe Stunde vor dem Eingriff einmalig $100\ \mu\text{l}$ Buprenorphin subkutan appliziert. Nachdem die Pumpe subkutan eingeführt wurde, wird die Hautwunde mit drei Einzelknopfheften (7-0 Prolene) genäht und danach mit Braunol erneut desinfiziert. Das Tier wird aus der Kopfkammer genommen und es wird kurz gewartet, bis es wieder vollständig bei Bewusstsein ist, bevor es zurück in den Käfig gesetzt wird.

Nach 10 Tagen werden den Tieren die Organe entnommen und das Gewebe für die Durchflusszytometrie (wie bei Punkt 3 beschrieben) vorbereitet. Die Basis des Herzens wird für die weitere histologische Untersuchung eingebettet.

4.2. Myokardinfarkt

Das Modell der transienten LAD-Ligatur (Left anterior descending artery) wurde gewählt, um einen akuten Myokardinfarkt zu induzieren.

Für den Versuch wird den Tieren die bereits beschriebene Tripelnarkose intraperitoneal verabreicht. Rücklings auf eine Wärmematte gelegt, werden die Augen mit Salbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, 51368 Leverkusen, Deutschland) vor dem Austrocknen geschützt. Der Hals und die linke Thoraxhälfte werden enthaart und mit Jod desinfiziert. Die Extremitäten des Tieres werden mit Klebestreifen fixiert. Um den Kopf zu befestigen, bedient man sich eines Gummibandes, das an den Schneidezähnen eingehängt wird. Die chirurgische Toleranz des Tieres wird getestet und danach auf Höhe des Kehlkopfes ein circa 2 cm langer Hautschnitt nach kaudal gesetzt. Danach wird der Tubus (Metallkanüle 19G) unter freier Sicht auf die Trachea eingeführt. Um eine stabile Beatmung zu ermöglichen, ist das Tier an ein Intubationsgerät (MiniVent Type845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) bei einer Atemfrequenz von 150/min und einem Volumen von 200 µl angeschlossen. Der Hautschnitt wird nach erfolgter Intubation mit Einzelknopfheften (7-0 Prolene, Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt) verschlossen.

Die Temperatur des Tieres wird mittels Rektalsonde (TMF-3402 Rektaltemperatur Messfühler, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach) kontrolliert, die an ein Temperatur-Kontroll-System (TMF-0904, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach) gekoppelt ist. Die Körpertemperatur wird so konstant bei 37,5 °C gehalten.

Es wird ein Mikroskop (Stemi 2000-C, Carl Zeiss, Jena) mit Schwannenhalslampe (CL 6000 LED, Carl Zeiss, Jena) verwendet. Ein Hautschnitt auf Höhe des zweiten Interkostalraumes wird gesetzt. Der M. pectoralis und M. rectus thoracis werden durchtrennt, um Sicht auf die Zwischenrippenmuskulatur zu erlangen. Der zweite Zwischenrippenraum wird

mit einer Mikroschere eröffnet. Es werden Haltefäden angebracht. Dafür werden die zweite und dritte Rippe jeweils mit einem Faden (5-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt) zweifach umstochen und nach kaudal bzw. kranial aufgespannt. Die Haltefäden werden mittels Klebestreifen auf der Wärmplatte fixiert. Das Perikard wird eröffnet und der Herzbeutel wird über die Pleura gelegt, um die Lunge zu schützen. Ein mit Jod getränkten Tupfer (Sugi Eyespear pointed tip, Kettenbach, Eschenburg) wird genutzt, um den Herzbeutel zu manipulieren. Die LAD wird anschließend mit einem 8-0 Faden (8-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt) proximal umstochen und kurz nach ihrem Abgang ligiert. Zwischen Herzmuskel und vorgelegtem Doppelknoten wird ein Platzhalter, in Form eines circa 3 mm kleinen Stückes mit Polyetylen-schlauch umzogener 30G Kanüle, gelegt. Bei erfolgter Ligatur kann man ein deutliches Entfärben des Versorgungsgebietes der linken Herzkranzarterie beobachten. Die Haltefäden werden gelockert und der offene Brustkorb wird mit einer in Natriumchlorid getränkten Mullkomresse (Noba Verbandmittel Danz, Wetter) abgedeckt, um den eröffneten Thorax vor dem Austrocknen zu schützen.

Nach 60 min erfolgt eine Reperfusion des LAD-Versorgungsgebietes. Dafür werden Platzhalter und Ligatur entfernt. Die Haltefäden werden entfernt und die Zwischenrippenmuskulatur, so wie der M. pectoralis und M. rectus thoracis anschließend mit zwei bis drei Einzelknopfheften (5-0 Prolene bzw. 7-0 Prolene, Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt) verschlossen. Die Hautwunde wird fortlaufend mit einem 7-0 Faden vernäht. Um die Narkose zu beenden, werden die Wirkstoffe Atipamezol (Alzane, zoetis Deutschland GmbH, Ulm; Dosierung 2,5 mg/kg) und Flumazenil (Flumazenil, Hikma Pharma GmbH, Gräfelfing; Dosierung 0,5 mg/kg) verabreicht. Schon nach einigen Minuten zeigen die Tiere eine Eigenatmung und sobald es erste Abwehrreaktionen gibt, werden sie extubiert und in ihren Käfig auf eine Wärmeplatte gelegt. Um den post-operativen Verlauf zu dokumentieren, wird ein Score Sheet geführt. Für die Schmerzausschaltung wird zweimal täglich für drei Tage Buprenorphin subkutan injiziert.

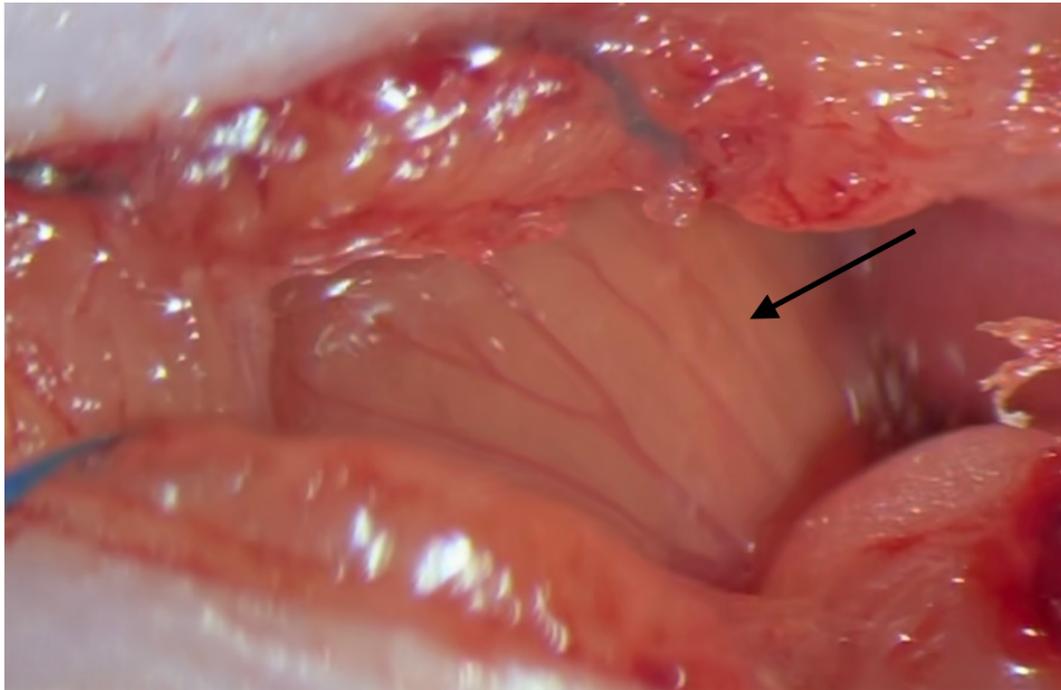


Abbildung 2: Übersicht über die linke Koronararterie

5. Gabe von Interleukin-4

Das Zytokin Interleukin-4 ist wichtig für die Homöostase des Immunsystems und fördert insbesondere anti-inflammatorische Eigenschaften von Makrophagen [94]. IL-4 ist nicht toxisch und kommt bei Mäusen natürlich im Körper vor. Um die Retnla-Regulation zu untersuchen, wird den Tieren jeweils 4 ng IL-4/g KGW (recombinant mouse IL-4 Protein, #cat:404-ML-010/CF, R&D systems) intraperitoneal injiziert. Zwölf Stunden nach der Injektion werden die Organe der Mäuse entnommen und mittels Durchflusszytometrie und Histologie untersucht.

6. Positron-Emissions-Tomographie (PET)

Bei dem verwendeten PET handelt es sich um das nanoScan PET-CT der Firma Mediso. Für die Messung werden die zu untersuchenden Tiere mit Isofluran betäubt und eine Augensalbe wird aufgetragen, um die Austrocknung der Hornhaut zu verhindern. 100 µl eines FDG (F-fluorodeoxyglucose) - Tracers wird über die Schwanzvene intravenös verabreicht. Nach einer halben Stunde erfolgt die Messung mit dem PET. Dafür werden die Tiere in gestreckter Bauchlage auf einer Wärmematte positioniert. Die Messungen werden Elektrokardiogramm (EKG) getriggert verfolgt. Für die EKG-Aufzeichnung werden Neugeborenen-Elektroden (3M, St.Paul, MN USA) an den Vorder- und Hintergliedmaßen angebracht.

7. Histologische Untersuchung

7.1. Vorbereitung der Proben

Die entnommenen Organe werden für jeweils eine halbe Stunde in 4 % PFA (ThermoFisher) gelegt und anschließend für 24 Stunden in 30 % Succhroselösung(Sigma-Aldrich, St.LoIs, USA) verbracht. Die Organteile werden in 24x25mm große Kyroeinbettformen (Tissue-tek Cryomold 25 x 20 x 5 mm, Sakura Finetek) mit Hilfe von Einbettmedium (Tissue-tek, Sakura Finetek Europe) auf Trockeneis eingefroren. Die Proben werden bei -80 °C gelagert.

7.2. Gefrierschnitte

Für das Schneiden des Gewebes wird ein Kryotom (CryoStar NX70, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Es werden pro Organ verschiedene Ebenen geschnitten. Ein Schnitt ist 10 µm dick und die Trimmschnitte zwischen den Ebenen betragen 50 µm. Es werden die Schnitte auf einen Objektträger (Menzel Gläser Superfrost Plus, Gerhard Menzel, Braunschweig) übertragen. Die Gefrierschnitte werden bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 3: Verwendete Einstellungen für Gefrierschnitte am Kryotom

Specimen Type	Knife/Blade Temp	Specimen Temp
Gehirn	-20°C	-12°C
Herz	-25°C	-18°C

7.3. Prinzip der Immunfluoreszenz

Um Oberflächenantigene darzustellen, nutzt man die Methode der Immunofluoreszenz. Man verwendet dafür Fluoreszenz-markierte Antikörper, die durch eine spezifische Antikörper-Bindung an Epitope binden. Unter dem Mikroskop wird so eine Kopplung des Fluorochroms an den Primärantikörper oder indirekt durch die Kopplung an einen Sekundärantikörper sichtbar.

7.4. Durchführung der Färbung

Die Gefrierschnitte werden bei Raumtemperatur für 30 Minuten aufgetaut und in eine Färbebox gelegt, die mit einem Deckel verschlossen werden kann. Die Schnitte werden für 10 min mit einer 4 % PFA-Lösung fixiert und anschließend dreimal für 5 Minuten mit einer Waschlösung in einer Plastikkuvette gewaschen. Die Waschlösung besteht aus PBS (Dulbecco's Phosphatebuffered saline, Sigma-Aldrich, Steinheim), 0,1% (V/V) Tween20 (Tween20, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 0,5 % BSA (Albumin Fraktion V, Roth, Karlsruhe).

Anschließend werden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet (Liquid Blocker, Science Service, Japan). Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wird auf jeden Schnitt 50 µl Blocklösung pipettiert.

Die Blocklösung besteht aus 50 ml der Waschlösung und 0,5 % Saponin (Sigma-Aldrich). Dieser sogenannte Stocklösung werden 4,5 ml entnommen und mit 0,5 ml 100 % Ziegenserum versetzt, so erhält man eine 10 % Ziegenserum-Blocklösung.

Die Blocklösung wird nach einer Stunde abgeklopft und es werden 50 μ l des Primärantikörpers auf die Schnitte pipettiert. Der Primärantikörper wird in der Blocklösung verdünnt. Die Protokolle für die Inkubationszeiten und Verdünnungen sind der Abbildung 3 zu entnehmen.

Als Nächstes folgt ein Waschschriff und anschließend wird pro Schnitt 50 μ l des sekundären Antikörpers in einer 1:200 Verdünnung in Stocklösung aufgetragen.

Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wird dieser abgeklopft und der Zellkernfarbstoff HOECHST (HOECHST 33342, invitrogen, Thermo Fisher), 1:1000 in Stocklösung verdünnt auf die Schnitte gegeben.

Die Schnitte werden nach 5 min gewaschen und mithilfe von einem Tropfen Eindeckmedium (Dako Fluorescence Mounting Medium, Dako North America Inc., USA) und Deckgläschen (Menzel Gläser, Thermo Scientific) eingedeckelt. Bei Raumtemperatur werden die Schnitte über Nacht getrocknet und anschließend bei - 20 °C gelagert.

Für die Aufnahmen wurde das Zeiss Konfokalmikroskop (Zeiss LSM 88 mit Airyscan, Carl Zeiss, Jena) verwendet.

Struktur	primärer Antikörper/Klon/Hersteller	Verdünnung/Konzentration	Inkubationszeit	sekundärer Antikörper/Fluorochrom/Hersteller	Verdünnung	Inkubationszeit
Makrophagen	CD68 rat anti-mouse Klon FA-11 BioRad	1:100	2h	Goat anti-rat AlexaFluor 488 Life Technologies, ThermoFisher	1:200	1h
Isotypkontrolle	Rat IgG2a eBioscience	1:50	2h	Goat anti-rat AlexaFluor 488 Life Technologies, ThermoFisher	1:200	1h
ReALIM-exprimierende Zellen	Dsred polyclonal antibody rabbit anti-mouse Cat.632496 Takara	1:100	2h	Goat anti-rabbit AlexaFluor 594 Life Technologies, ThermoFisher	1:200	1h
Isotypkontrolle	Rabbit IgG ThermoFisher Scientific	1:100	2h	Goat anti-rabbit AlexaFluor 594 Life Technologies, ThermoFisher	1:200	1h
Fibrose				Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor 647 Conjugate, invitrogen	1:100	1h
Nukleus				HOECHST 3342 invitrogen, ThermoFisher	1:1000	5 min

Abbildung 3: Färbeprotokoll der histologischen Schnitte

8. Depletionsmodelle

8.1. Depletion von neutrophilen Granulozyten

Um die neutrophilen Granulozyten zu depletieren, wurde ein 1A8 Klon (InVivoMAB anti-mouse Ly6G Cat. BE0075-1) verwendet. Den Tieren wurden pro Injektion 50 µg des Antikörpers intraperitoneal injiziert. Die Tiere werden insgesamt 5-mal injiziert und am 7. Tag nach dem Myokardinfarkt werden die Organe entnommen, um die Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie zu analysieren. Durch die Depletion soll der Einfluss von neutrophilen Granulozyten auf die Retnla-exprimierende Makrophagenpopulation näher untersucht werden.

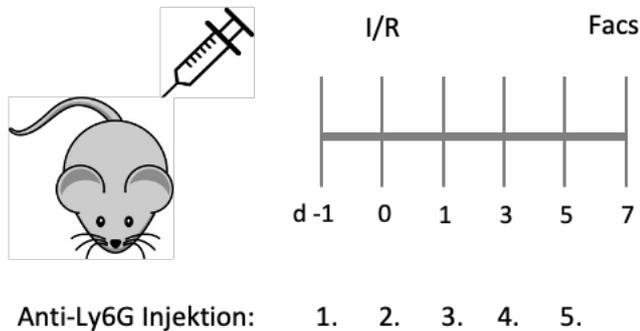


Abbildung 4 : Injektionsregime Neutrophilendepletion

8.2. Depletion von Retnla-exprimierenden Zellen mittels Diphtherie-Toxin

Durch die Gabe von Diphtherie-Toxin (DT) kann in der Mauslinie *Retnla-CreRs26TomatoRs26DTR* die Retnla-exprimierende Zellpopulation spezifisch depletiert werden. Das Diphtherie-Toxin ist für Mäuse nicht toxisch. Den Mäusen werden 25 ng DT/g KGW Diphtherie-Toxin intraperitoneal injiziert. Die PET-Messung erfolgt jeweils dann an Tag 6 und 30 nach dem Myokardinfarkt. Die PET-Messung erfolgt jeweils dann an Tag 6 und 30 nach dem Myokardinfarkt.

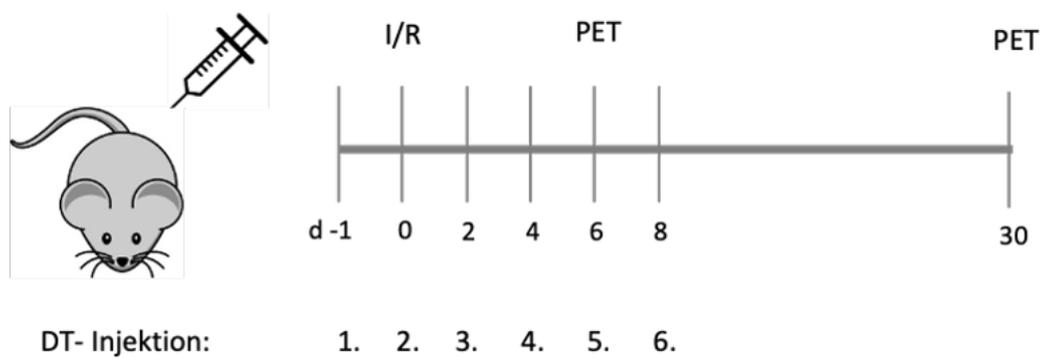


Abbildung 5: Injektionsregime Diphtherie-Toxin Gabe

9. Single-Zell-Sequenzierung

Um eine reine kardiale Immunzellpopulation für die Single-Zell-Sequenzierung zu erhalten, wurde der MoFlo Astrios (Beckman Coulter) Zellsorter verwendet. Die CD45⁺ Zellen wurden durch magnetische Beads und MS columns (CD45 MicroBeads; Miltenyi Biotec) angereichert. Die Zellen wurden dann nach einzelnen/ lebenden und CD45⁺ Zellen sortiert. Tote Zellen wurden mit Sytox Orange Dead Cell Stain identifiziert. Nach dem Anreichern der Zellpopulation wurden die kardialen CD45⁺ Zellen für das Einfangen der Einzelzellen, das Barcoding und die Bibliothekserstellung vorbereitet. Dazu wurde das Chromium Next GEM single cell (v3.1, 10x Genomics) nach den Anleitungen des Herstellers verwendet. Darauffolgend wurden die gepoolten Bibliotheken mit Hilfe von Illumina HiSeq1500 sequencer (Illumina, San Diego, USA) in paired-end mode mit asymmetrischer Leselänge von 28+91 bp sequenziert. Um die Datensätze zu visualisieren, wird UMAP (eng. *uniform Manifold Approximation and Projection*) genutzt.

10. Statistische Auswertung

In der vorliegenden Arbeit sollen erstmals Retnla-exprimierende Zellen im Modell der Ischämie/Reperfusion mit Hilfe der Mauslinie *RetnlaCreRs26Tomato* *in vivo* charakterisiert werden. Es handelt sich deshalb um eine explorative Studie mit entsprechenden geringen Größen der Versuchsgruppen n= 2–12.

Die erhobenen Daten wurden mit Graph Pad Prism 8 Software (GraphPad Software, Inc., Jolla USA) analysiert.

Die Gruppen wurden zuerst mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Im Falle von zu kleinen Stichprobenzahlen wurde keine Normalverteilung angenommen.

Bei einer Normalverteilung wurde beim Vergleich zweier Gruppen mit unabhängigen Stichproben der ungepaarte t-Test angewendet. Bei nicht-parametrischen Stichproben wurde ein Mann-Whitney-U-Test genutzt.

Bei einem Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (*one way ANOVA*) verwendet und die Stichproben untereinander mit einer Bonferroni-Mehrfach-Testung verglichen. Bei nicht-parametrischen Stichproben wurde ein Kruskal-Wallis-Test angewendet und die Stichproben untereinander mit Hilfe Dunn`s multipler Testung verglichen. Bei einem p-Wert $\leq 0,050$ wurde eine statistische Signifikanz angenommen.

Die Mittelwerte in den Graphen wurden zusammen mit der Standardabweichung angegeben.

V. ERGEBNISSE

1. Heterogenität kardialer Makrophagen

Um die Heterogenität der Leukozytenpopulationen im Infarktgeschehen näher zu bestimmen, wurde eine Single-Zell-Sequenzierung von nicht infarzierten und infarzierten (Tag 30) CRC57/BL6 Mäuseherzen durchgeführt (siehe Kapitel IV Abs. 9.). Die Analyse zeigte eine hohe Genexpression des Markers *Retnla* im Cluster der Homöostasemakrophagen.

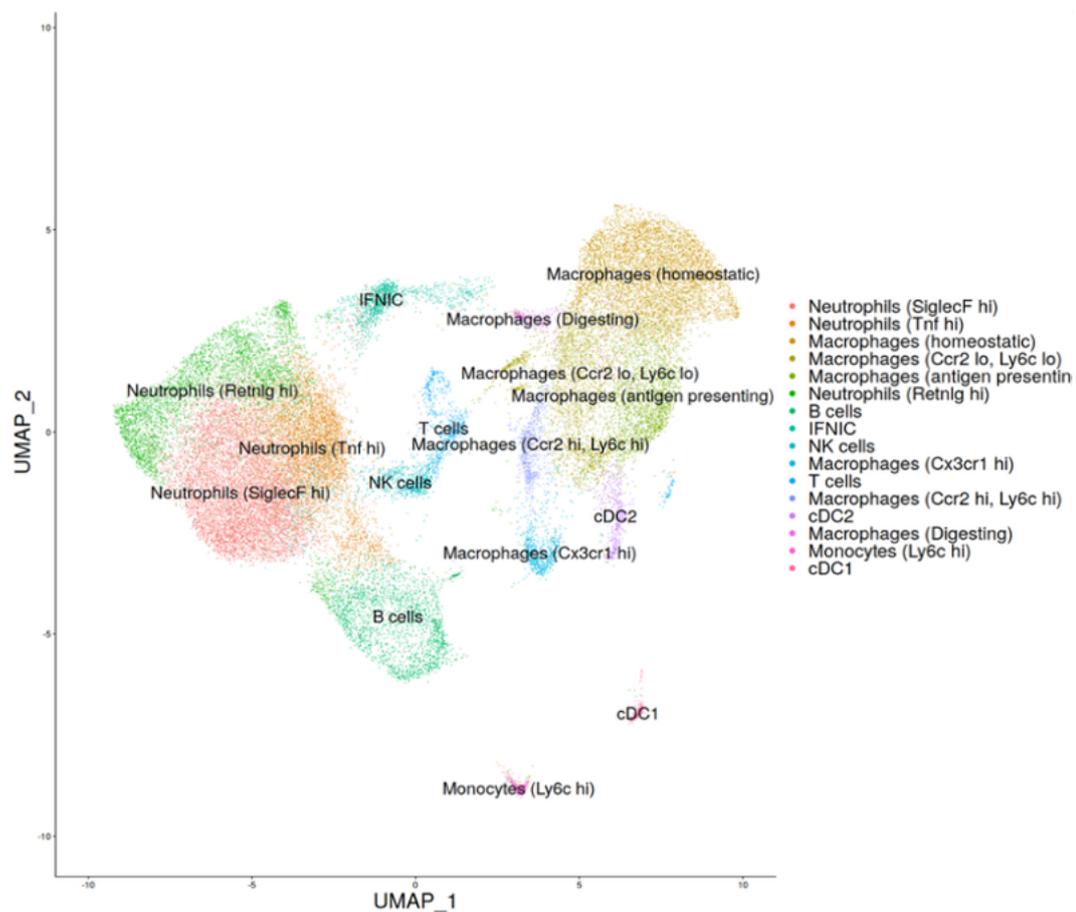


Abbildung 6: Zellcluster von kardialen Immunzellen in der Single-Zell-RNA-Analyse

Diese Abbildung zeigt ein UMAP von Zellpopulationen in murinen Herzen. Dabei wurde das Datenset eines infarzierten Herzens mit dem eines nicht infarzierten Herzens überlappend dargestellt.

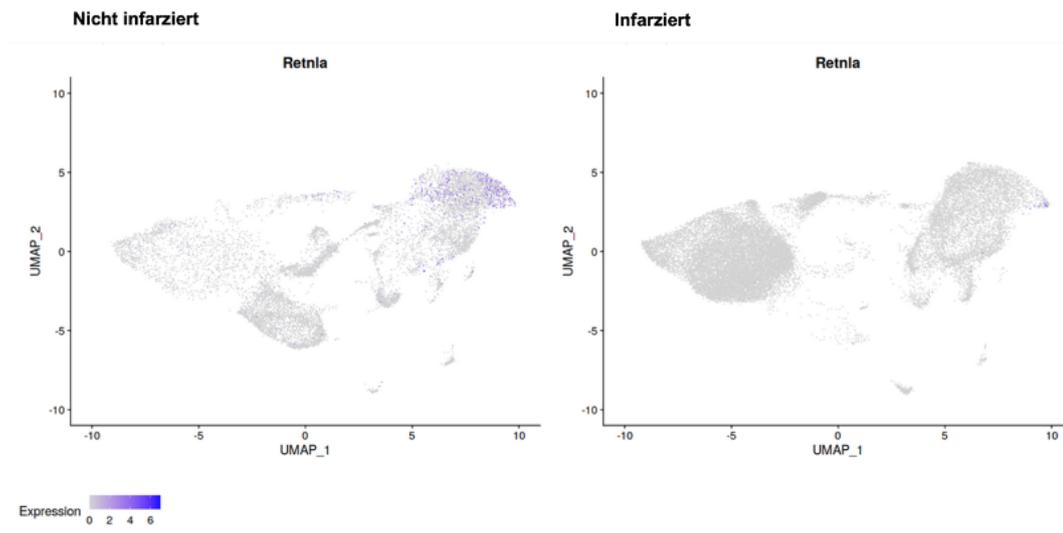


Abbildung 7: Lokalisation der Genexpression von *Retnla* in den Zellclustern

Auf dieser Abbildung wird das Expressionslevel von *Retnla* in nicht infarzierten und infarzierten Mäuseherzen mit einer violetten Markierung veranschaulicht.

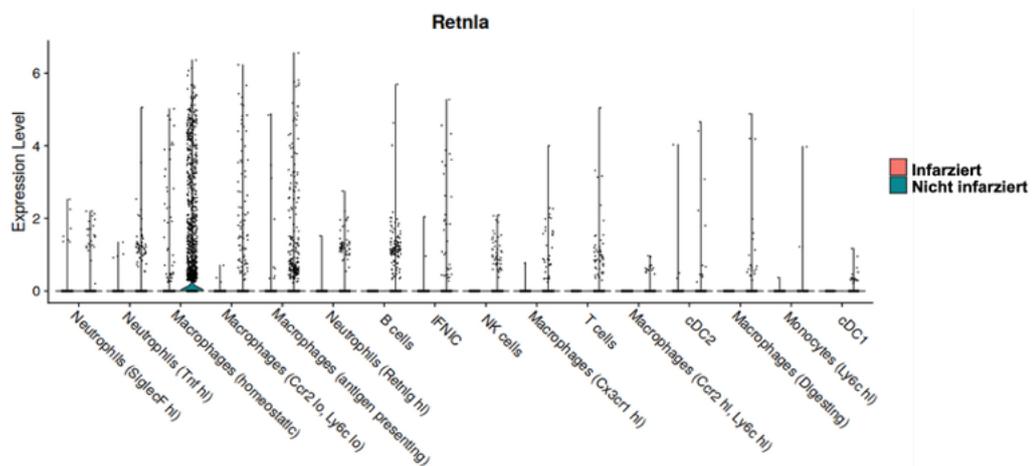


Abbildung 8: Genexpressionslevel von *Retnla* in den verschiedenen Zellpopulationen in infarzierten und nicht infarzierten Mäuseherzen

Diese Abbildung zeigt die Expressionslevel von *Retnla*. Pro Zellpopulation gibt es eine Gegenüberstellung von infarziert und nicht-infarziert.

Die Abbildung 6 zeigt die Heterogenität der CD 45-positiven Zellpopulationen in Mäuseherzen. Wie in der Abbildung 7 zu erkennen ist, zeigt sich eine erhöhte Genexpression vor allem im Cluster der homöostatischen Makrophagen. Das Genexpressionslevel ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Expression ist unter Ruhebedingungen nachweisbar und im Infarkt wesentlich reduziert.

2. Abwesenheit Retnla-exprimierender Zellen in der Embryonalentwicklung

2.1. Pränatale Identifizierung von Retnla-exprimierenden Makrophagen

Zur Identifizierung und Lokalisierung von Retnla-exprimierenden Makrophagen wurde der Mausstamm *RetnlaCreRosa26Tomato* verwendet. Verpaarungen von *RetnlaCre* mit dem Reporterstamm *Rosa26TomatoCx3Cr-GFP* erlauben es, Makrophagen und zirkulierende Monozyten fluoreszenzmikroskopisch im Embryo zu visualisieren. Es wurden Embryonen am Tag 14 mit dem Durchflusszytometer untersucht. Eine Analyse mit dem Epifluoreszenzmikroskop an Tag 16 diente der Identifizierung der Retnla-exprimierenden Zellen im embryonalen Gewebe.

2.1.1. Quantifizierung mit dem Durchflusszytometer

Um die tdTomato-positiven (Retnla-exprimierenden) Zellen im embryonalen Gewebe zu quantifizieren, wurden Embryonen im Alter von 14 Tagen mit Hilfe des Durchflusszytometers untersucht.

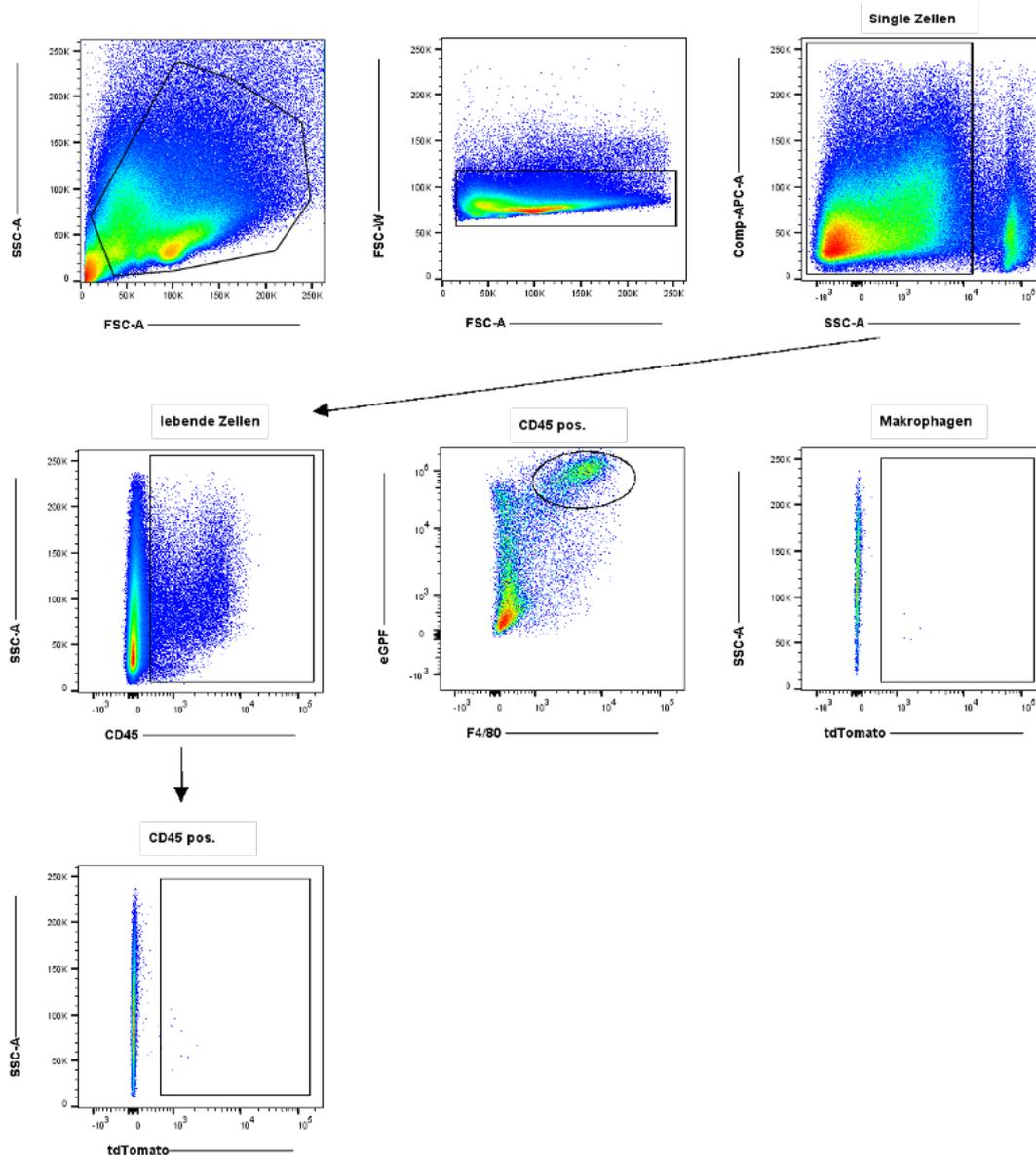


Abbildung 9: Gating Strategie für die durchflusszytometrische Analyse des embryonalen Gewebes

Durchflusszytometrie von embryonalem Gewebe. Ausschluss von Doubletten anhand des FSC-A und FSC-W, Erfassen der lebenden Zellen, Identifikation von Leukozyten (CD45 pos.) myeloiden Zellen (CD11b pos.) und Makrophagen (GFP (CX3CR1) und F4/80 pos.).

Um die Retnla-exprimierenden Makrophagen zu identifizieren, wurden zuerst die Doubletten ausgeschlossen und die lebenden Zellen erfasst. Die Leukozyten wurden mit einem CD45 Marker identifiziert und die myeloiden Zellen mit CD11b angefärbt. Um final die Makrophagenpopulation zu identifizieren, wurden die Oberflächenmarker CX3CR1 und F4/80 verwendet.

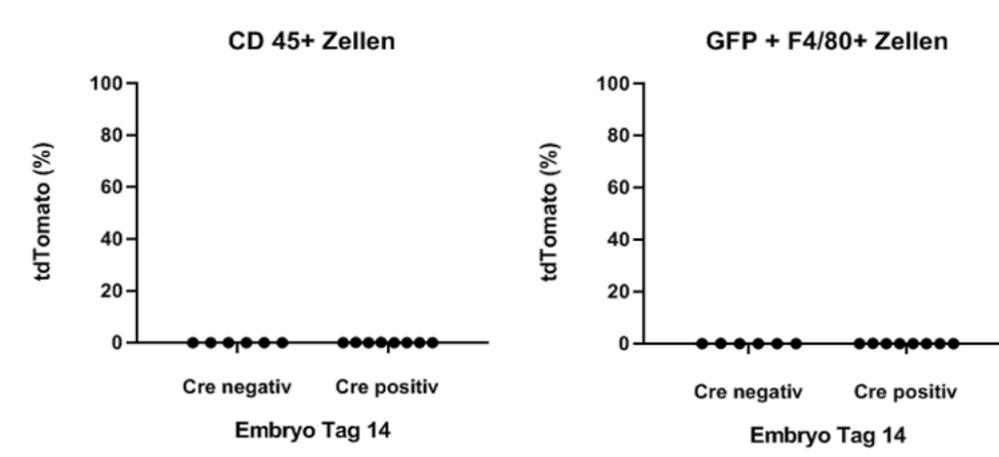


Abbildung 10: Durchflusszytometrie von embryonalem Gewebe an Tag 14

Prozentuale Verteilung von tdTomato-positiven Zellen in Cre⁺ und Cre⁻ Mäuseembryonen. Cre-negativ n=6 und Cre-positiv n=8; Genotyp: *Retnla*^{Cre⁺Rs26}*tdTomato^{+/+}Cx3Cr1^{GFP/+}*; Mittelwert \pm SD

Die Analyse mit dem Durchflusszytometer zeigte kein tdTomato-Signal von Embryonen an Tag 14. Weder in der CD45-positiven Zellpopulation, noch in der CX3CR1-GFP+F4/80+ Makrophagenpopulation gab es einen Unterschied in der prozentualen Anzahl an tdTomato-positiven Zellen. Damit ist in diesem Abschnitt der embryonalen Entwicklung keine Expression von *Retnla* nachzuweisen.

2.1.2. In vivo Epifluoreszenzmikroskopie von Mäuseembryonen

Um die Lokalisation und Expression in verschiedenen Organen zu bestimmen, wurde die Epifluoreszenz verwendet. Diese erlaubt es, die *Retnla*-exprimierenden Zellen (tdTomato-Signal) *in vivo* zu verfolgen. Es wurden Embryonen und deren Organe an Tag 16 in verschiedenen Vergrößerungen untersucht.

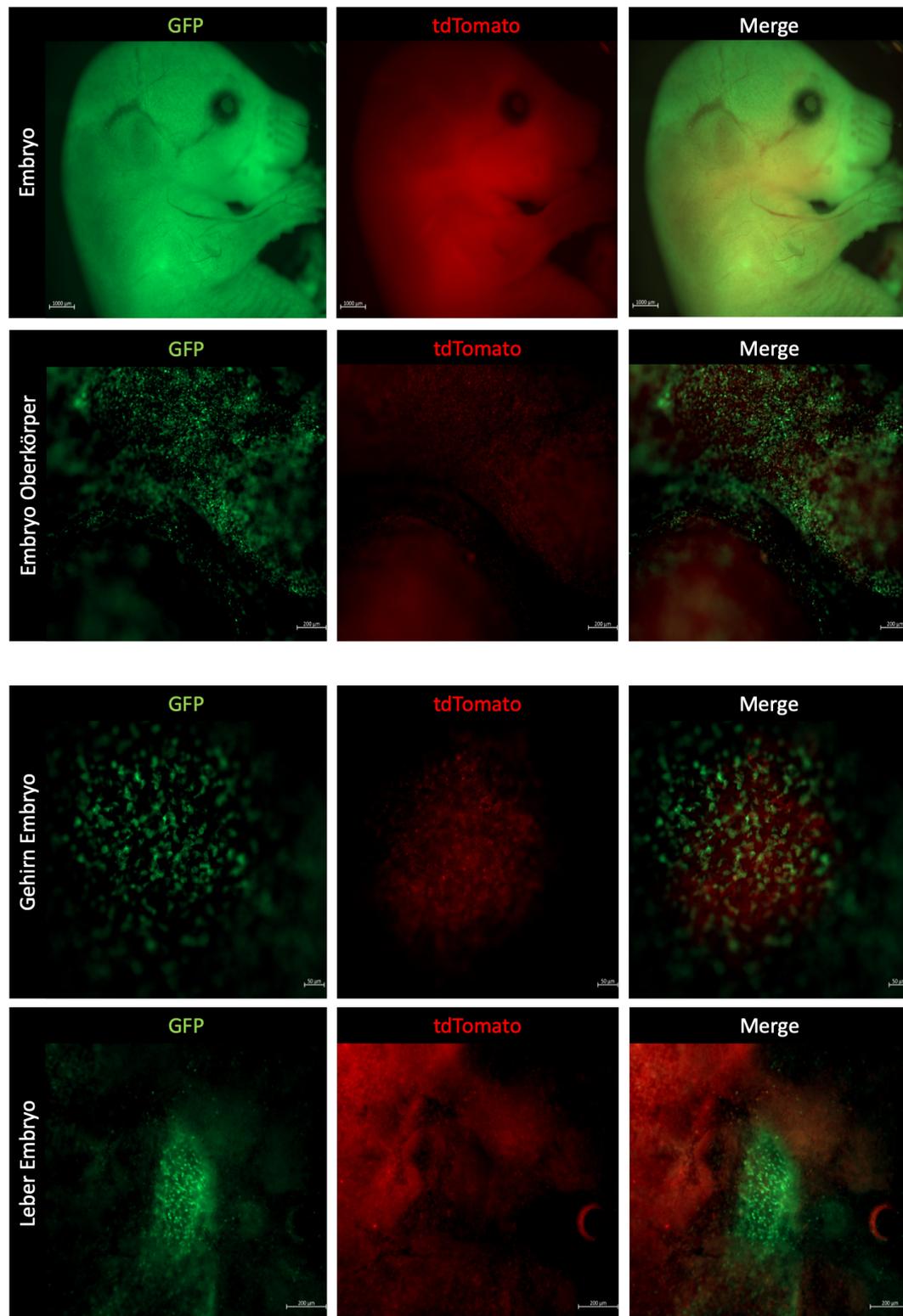


Abbildung 11: *In vivo* Aufnahmen eines Embryos an Tag 16

Epifluoreszenzaufnahmen; obere Reihe: Vergrößerung 16,8, Maßstab: 1000 µm; 2. Reihe: Vergrößerung 97,3 Maßstab: 200 µm; 3.Reihe: Vergrößerung 268,8, Maßstab: 50 µm, 4.Reihe: Vergrößerung 132,6, Maßstab: 200 µm. Jeweils dargestellt in den Kanälen GFP ((CX3CR1) grün), tdTomato ((Retnla) rot) und einer überlappenden Darstellung.

Die *in vivo* Epifluoreszenzmikroskopie von Embryonen (Genotyp: *Retnla*^{Cre+}*Rs26*^{tdTomato/+}*Cx3Cr1*^{GFP/+}) an Tag 16 zeigte kein Doppelsignal von *Cx3Cr1*-GFP-exprimierenden Zellen und tdTomato-positive (*Retnla*-exprimierenden Zellen). Die Oberfläche des Embryos sowie die Organe Leber und Gehirn wiesen kein tdTomato-Signal auf. Es ist keine Expression von *Retnla* in den *Cx3Cr1*-GFP-exprimierenden Zellen zu diesem Abschnitt in der embryonalen Entwicklung nachweisbar.

3. Identifikation und Lokalisation von *Retnla*-exprimierenden Zellen in kardialem Gewebe der adulten Maus unter Ruhebedingungen

3.1. Identifizierung und Lokalisation von *Retnla*-exprimierenden Zellen im Herzgewebe

Für die Lokalisation und Identifikation von *Retnla*-exprimierenden Zellen (tdTomato-Signal) im Herzen, wurde die Herzbasis von adulten Mäusen der Mauslinie *Retnla*^{Cre}*Rosa26*^{Tomato} mit einer 3-fach Färbung histologisch untersucht.

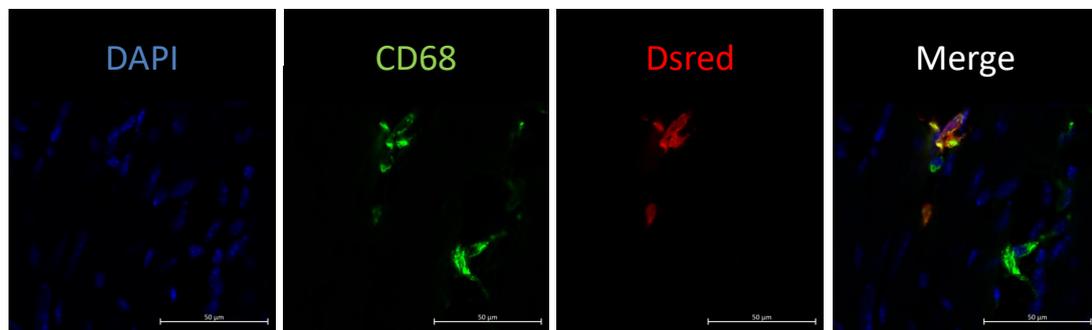


Abbildung 12: Nachweis von *Retnla*-exprimierenden Zellen im kardialen Gewebe

Konfokale Aufnahmen von einem Mäuseherz; Zellkerne (blau, Hoechst, links), CD68 positive Makrophagen (grün, 2. Reihe von links), *Retnla*-exprimierende Zellen (rot, 3. Reihe von links), Merge (rechts), Maßstab 50 µm. Genotyp: *Retnla*^{Cre+}*Rs26*^{tdTomato/+}

Es wurden zahlreiche Gewebemakrophagen (CD 68 Expression) im kardialen Gewebe gefunden. Darunter befanden sich auch Zellen, welche eine Kolokalisation mit tdTomato-Signal (rot, als Indikator einer *Retnla*-abhängigen Rekombination) zeigten. Die Zellen waren zudem gleichmäßig im Herzgewebe verteilt.

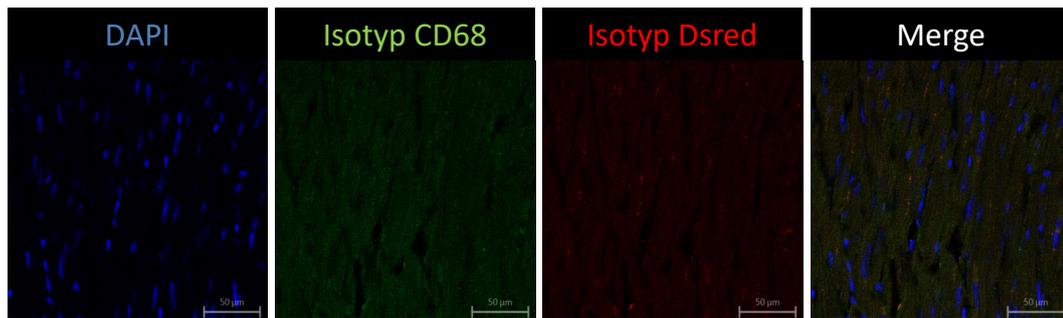


Abbildung 13: Isotypenkontrolle der Antikörper in der histologischen Analyse

Um die Spezifität der Antikörper zu gewährleisten, wurde eine Isotypenkontrolle für CD68 und Dsred angefertigt (Maßstab entspricht 50 µm).

Die Isotypenkontrolle konnte die Spezifität der Färbungen bestätigen (s.Abb. 13).

3.2. Quantifizierung von *Retnla*-exprimierenden Zellen in Herz und Blut

Es wurde das Blut und Herzgewebe von adulten *RetnlaCreRosa26Tomato* Mäusen mithilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert. Zunächst wurde die Makrophagenpopulation mit den Markern CD45+CD11b+CD64+F4/80+ definiert (wie in Abbildung 14 dargestellt) und danach die *Retnla*-exprimierenden Zellen (tdTomato-Signal) in dieser Population identifiziert.

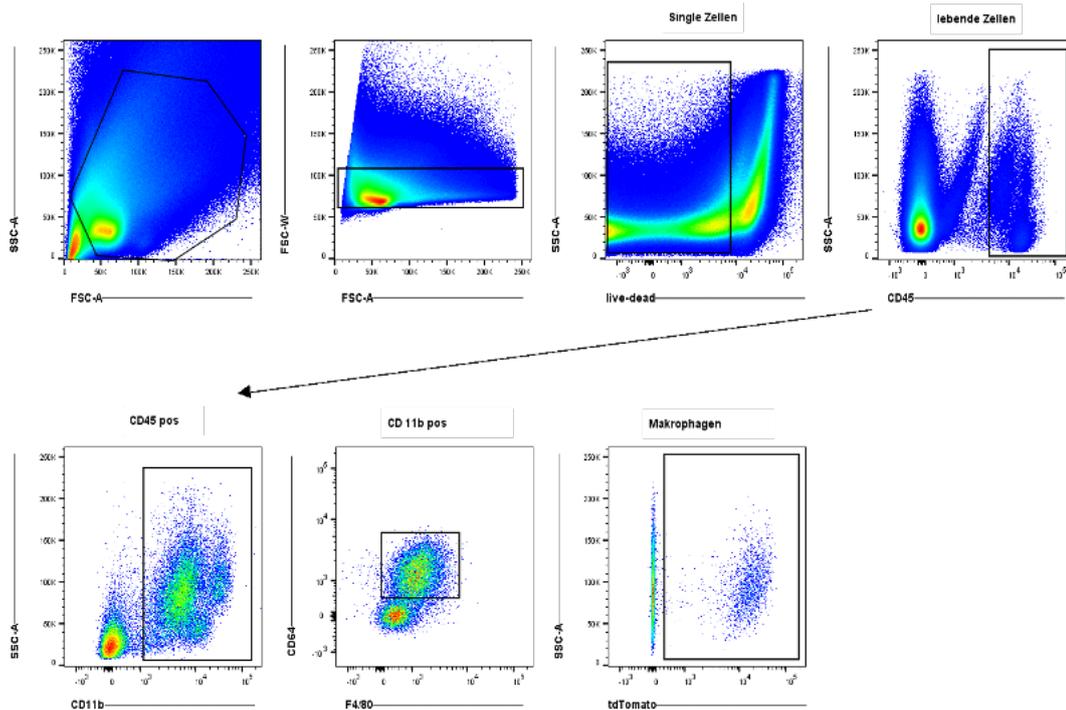


Abbildung 14: Gating Strategie für kardiale Makrophagen

Durchflusszytometrie von Mäuseherzen. Ausschluss von Doubletten anhand des FSC-A und FSC-W (41,9), Erfassen der lebenden Zellen (1,83%), Identifikation von Leukozyten (CD45 pos., 56,9), myeloiden Zellen (CD11b pos., 64,5%), Makrophagen (CD64 pos. und F4/80 pos.), Expression von *Retnla* (tdTomato) in der Makrophagenpopulation (15,5%).

Um die *Retnla*-exprimierenden Makrophagen zu identifizieren, wurden zuerst die Doubletten ausgeschlossen und die lebenden Zellen erfasst. Die Leukozyten wurden mit einem CD45 Marker identifiziert und die myeloiden Zellen mit CD11b angefärbt. Die Makrophagenpopulation wurde mit Hilfe der Oberflächenmarker F4/80 und CD 64 identifiziert.

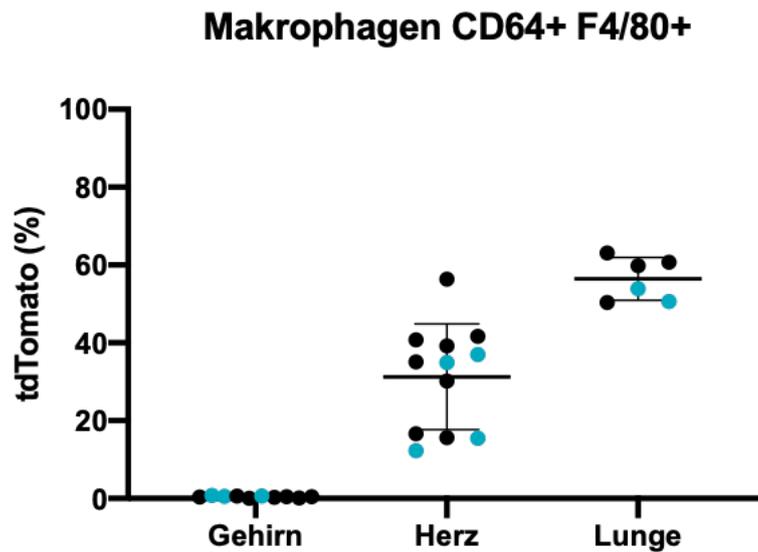


Abbildung 15: tdTomato-positive Zellen in unterschiedlichen Organen

Die prozentuale Verteilung der tdTomato-positiven Zellen der Makrophagenpopulation (CD64+ F4/80+) in den Organen Gehirn (Mikroglia) (n=10), Herz (kardiale Makrophagen) (n=12) und Lunge (interstitielle Makrophagen) (n=6), Genotyp schwarz: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/tdTomato}$; Genotyp petrol: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+}$; Mittelwert \pm SD

Um eine weitere Charakterisierung der Retnla-exprimierenden Zellen vorzunehmen, wurden die Organe Gehirn, Herz und Lunge mit dem Durchflusszytometer untersucht. Dazu wurden in allen Organen die Makrophagenpopulation (CD64+F4/80+) identifiziert und die tdTomato-positiven Zellen in dieser Population bestimmt. Die prozentuale Markierung in den Mikrogliazellen des Gehirns beträgt dabei zwischen 0-0,79%, die Markierung in den kardialen Makrophagen 12,3-56,4% und die Markierung der interstitiellen Makrophagen in der Lunge liegt zwischen 50,4-63,1%.

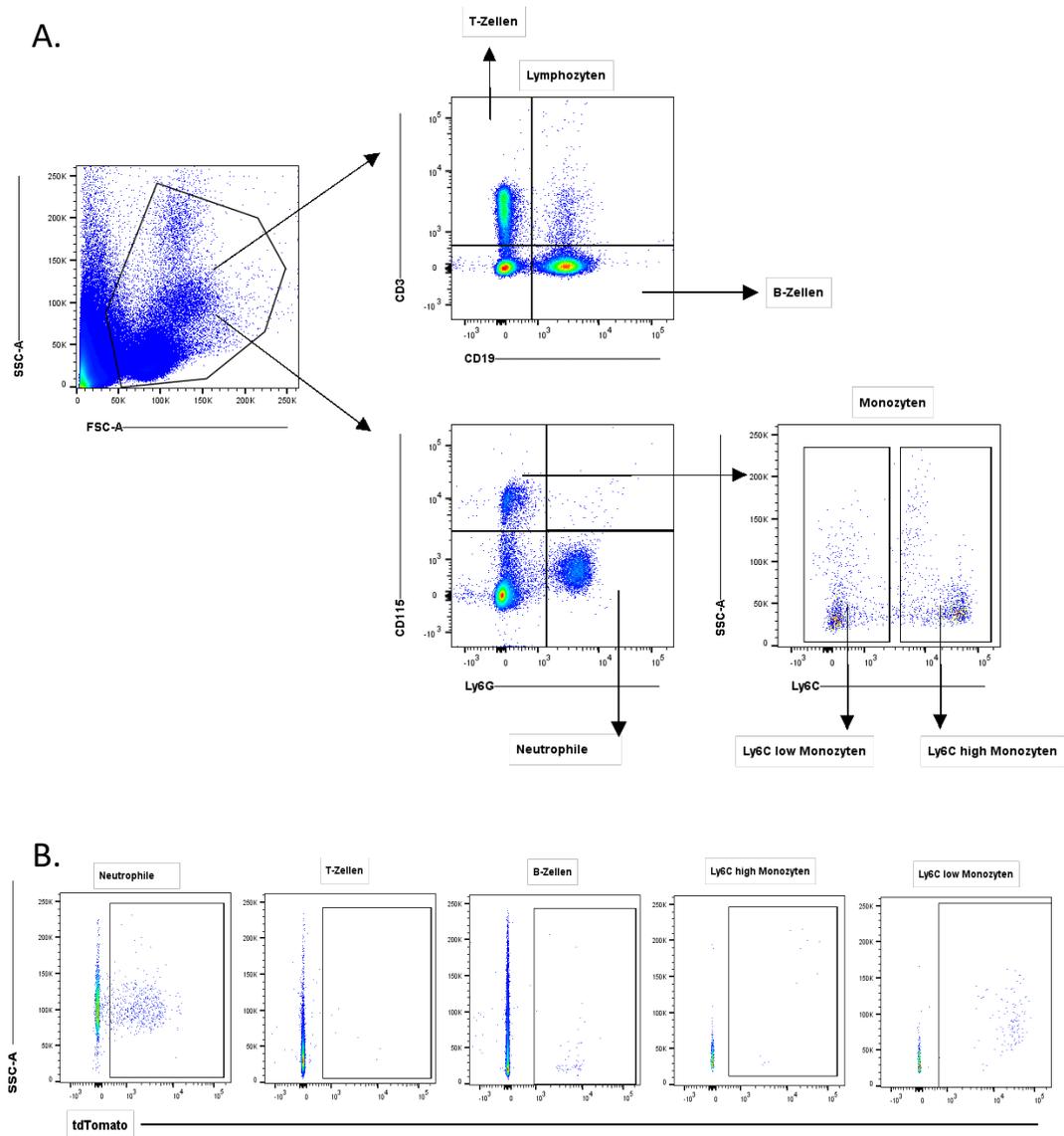


Abbildung 16: Gating Strategie des Blutes

A: Durchflusszytometrie von Mäuseblut. Ausschluss von Zellfragmenten anhand des FSC und SSC, Identifikation von B-Zellen (CD19 pos.) / T-Zellen (CD3 pos.) und neutrophilen Granulozyten (Ly6G pos.) / Monozyten (CD115 pos.). Die Monozytenpopulation wird weiter in Ly6C^{high} und Ly6C^{low} unterteilt, weiter wird nach der Expression von *Retnla* (tdTomato) in den jeweiligen Populationen gated.

B: Vergleich der tdTomato-Expression in den B-Zellen, T-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten.

Um eine Quantifizierung *Retnla*-exprimierender Zellen im Blut der Mäuse durchführen zu können, fand eine kardiale Blutentnahme statt. Die Blutproben wurden anschließend mit dem Durchflusszytometer untersucht und die Blutzellen mit Hilfe der in Abbildung 16 dargestellten Gating Strategie analysiert. Es wurden dabei neutrophile Granulozyten, Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten, T-Zellen und B-Zellen untersucht.

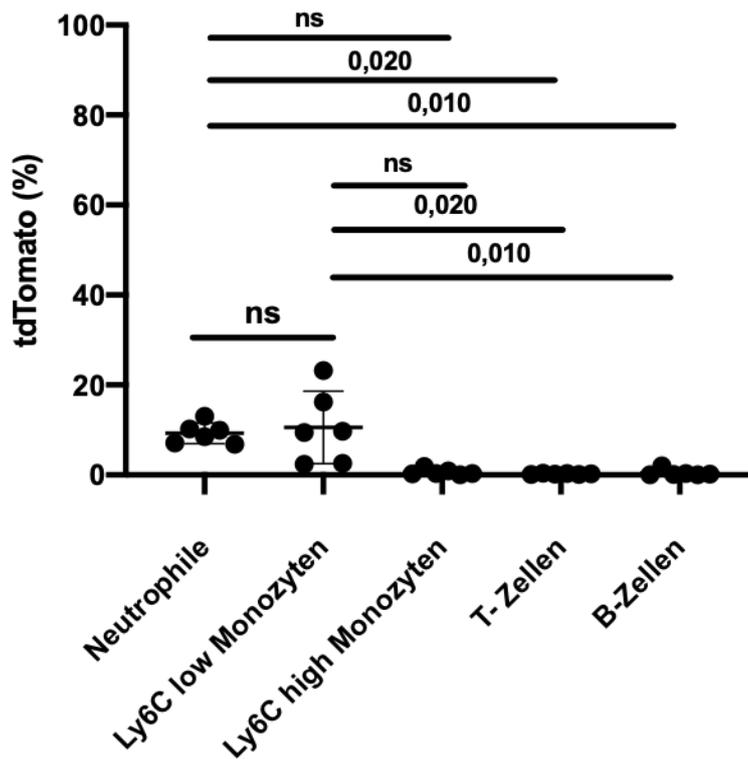


Abbildung 17: Zellpopulationen im Blut unter Ruhebedingungen

Durchflusszytometrie von homozygoten Mäuseblut; Prozentuale Verteilung tdTomato-positiver Zellen in den verschiedenen Blutpopulationen. Genotyp: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/tdTomato}$. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multipler Testung, adjustierte p-Werte, Mittelwert \pm SD

Die Analyse des Mäuseblutes mit dem Durchflusszytometer ergab eine Expression von *Retnla* in den neutrophilen Granulozyten (5-13%) und Ly6C^{low} Monozyten (3-23%). T-Zellen, B-Zellen und Ly6C^{high} Monozyten zeigten keine Expression von *Retnla*.

3.3. Markierungseffizienz von *Retnla* in Makrophagen aus adulten Herzen

Um die Markierungseffizienz von *Retnla* in der Mauslinie *RetnlaCreRosa26Tomato* zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen von Mäuseherzen in verschiedenen Altersstufen vorgenommen.

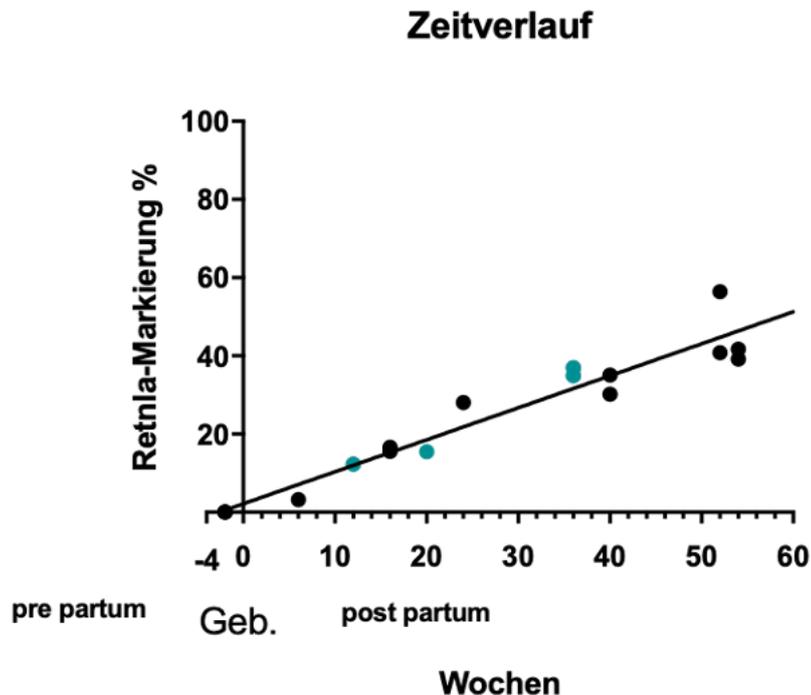


Abbildung 18: Zeitverlaufskurve

Durchflusszytometrische Analyse von Mäuseherzen in verschiedenen Altersgruppen der Tiere, tdTomato-positive Zellen in der Makrophagenpopulation ergeben die prozentuale *Retnla*-Markierung, Altersgruppen zwischen Embryonen Tag 14 und Tieren mit einem maximalen Alter von 54 Wochen, n=2 in Woche 16, 36, 40, 52 und 54.

Alle anderen Zeitpunkte n=1,

Genotyp: schwarz: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/tdTomato}$; Genotyp petrol: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+}$

Regressionsformel: $Y = 0.8185 * X + 2.156$; Korrelationskoeffizient: 0,9706

Eine Untersuchung der Tiere in verschiedenen Altersgruppen ergab einen Anstieg der prozentualen *Retnla*-Markierung in der Makrophagenpopulation des Herzens von 3,2% im Alter von 6 Wochen bis zu 56,40% mit 52 Wochen.

4. Stimulation der Retnla-exprimierenden Zellen mit Interleukin 4

Das Zytokin Interleukin-4 wird mit der Polarisation von Makrophagen in einen alternativ aktivierten Typ assoziiert. Es fördert die nicht-inflammatorischen Eigenschaften von Makrophagen und trägt damit zur Homöostase des Immunsystems bei. Um eine Stimulation der Retnla-exprimierenden Zellen auszulösen, wurde den Mäusen IL-4 peritoneal appliziert (siehe Kapitel IV Absatz 5.) und nach zwölf Stunden die Herzen mit Hilfe des Durchflusszytometers untersucht.

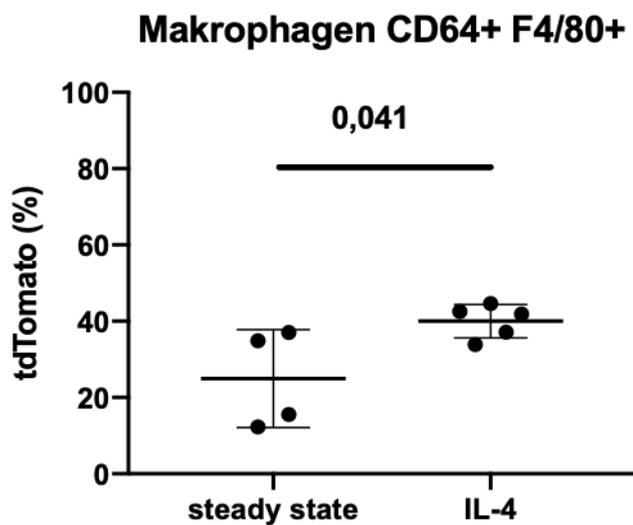


Abbildung 19: Stimulation von Mäusen mit Interleukin-4

Durchflusszytometrie von Mäuseherzen, Prozentuale Verteilung der tdTomato-positiven Zellen in den kardialen Makrophagen (CD64+F4/80+) nach einer Stimulation mit IL-4; steady state Gruppe: (n=7; Altersdurchschnitt: 6,5 Monate)

Interleukin-4 Gruppe: (n=5; Altersdurchschnitt: 11,8 Monate).

Genotyp: Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+}

ungepaarter t-Test, Mittelwert \pm SD

Die Analyse der Mäuseherzen mit dem Durchflusszytometer ergab einen Anstieg der tdTomato-positiven Zellen von einer durchschnittlichen Labelingeffizienz von 25% zu einem Labeling von 40% der tdTomato-positiven Zellen im kardialen Gewebe. Beim Vergleich der Gruppe unter Ruhebedingungen (*steady state*) und der IL-4 Gruppe war der Unterschied signifikant ($p \leq 0,041$).

5. Charakterisierung der *Retnla*-exprimierenden Zellen in kardialer Inflammation

5.1. Charakterisierung von *Retnla*-exprimierenden Zellen im Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt führt zu einem hohen Einstrom von Immunzellen in das betroffene kardiale Gewebsareal. Durch die Ischämie kommt es zu einem Absterben von Kardiomyozyten und eine starke Entzündungsreaktion ist die Folge. In der frühen Phase infiltrieren neutrophile Granulozyten das Infarktgewebe. Ly6C^{high} Monozyten werden rekrutiert und differenzieren sich im kardialen Gewebe zu Makrophagen. Der ursprünglich pro-inflammatorische Phänotyp der Makrophagen ändert sich in der späten Phase zu einem anti-inflammatorischen Typ. Um die Expression von *Retnla* im Herzinfarktgeschehen zu untersuchen, wurden Mäuseherzen zu den Zeitpunkten Tag 2, 7 und 30 nach einer transienten LAD-Ligatur mit dem Durchflusszytometer untersucht (siehe Kapitel IX Abs 4.2).

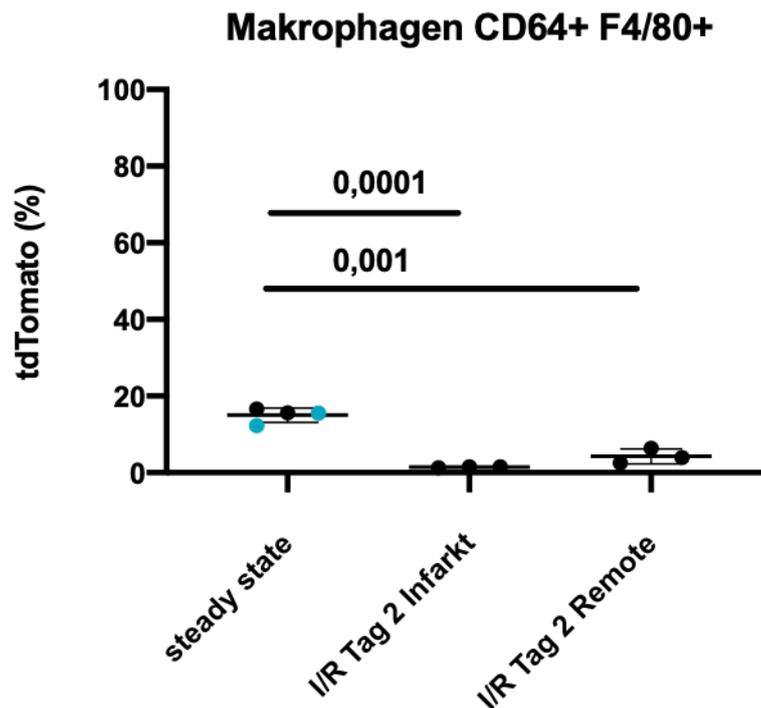


Abbildung 20: Charakterisierung der tdTomato-positiven Zellen im Myokardinfarkt an Tag 2 nach LAD-Ligatur

Durchflusszytometrie von Mäuseherzen; Prozentuale Verteilung tdTomato-positiver Makrophagen (CD64+ F4/80+) an Tag 2 nach LAD-Ligatur. Links *steady state* Gruppe (n=4), Mitte Infarktzone (n=3); Rechts Remotezone (n=3). Genotyp schwarz: Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/tdTomato}; Genotyp petrol: Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+}. Ungepaarter t-Test, Mittelwert ± SD

Eine Analyse mit dem Durchflusszytometer an Tag 2 ergab eine prozentuale Verteilung von 1,3-1,5 % in der Infarktzone und 2,51-6,39 % in der Remotezone. Die Vergleichsgruppe unter Ruhebedingungen (*steady state*) beläuft sich auf eine durchschnittliche Labeling-Effizienz von 15%. Dabei zeigte der ungepaarte t-Test beim Vergleich der *steady state* Gruppe mit der Tag 2 Infarktzone eine Signifikanz von $p \leq 0,0001$ und beim Vergleich mit der Tag 2 Remotezone eine Signifikanz von $p \leq 0,001$. Daraus ergibt sich eine prozentuale Abnahme der Retnla-exprimierenden Makrophagen an Tag 2 nach einem Myokardinfarkt im Vergleich zur Gruppe unter Ruhebedingungen.

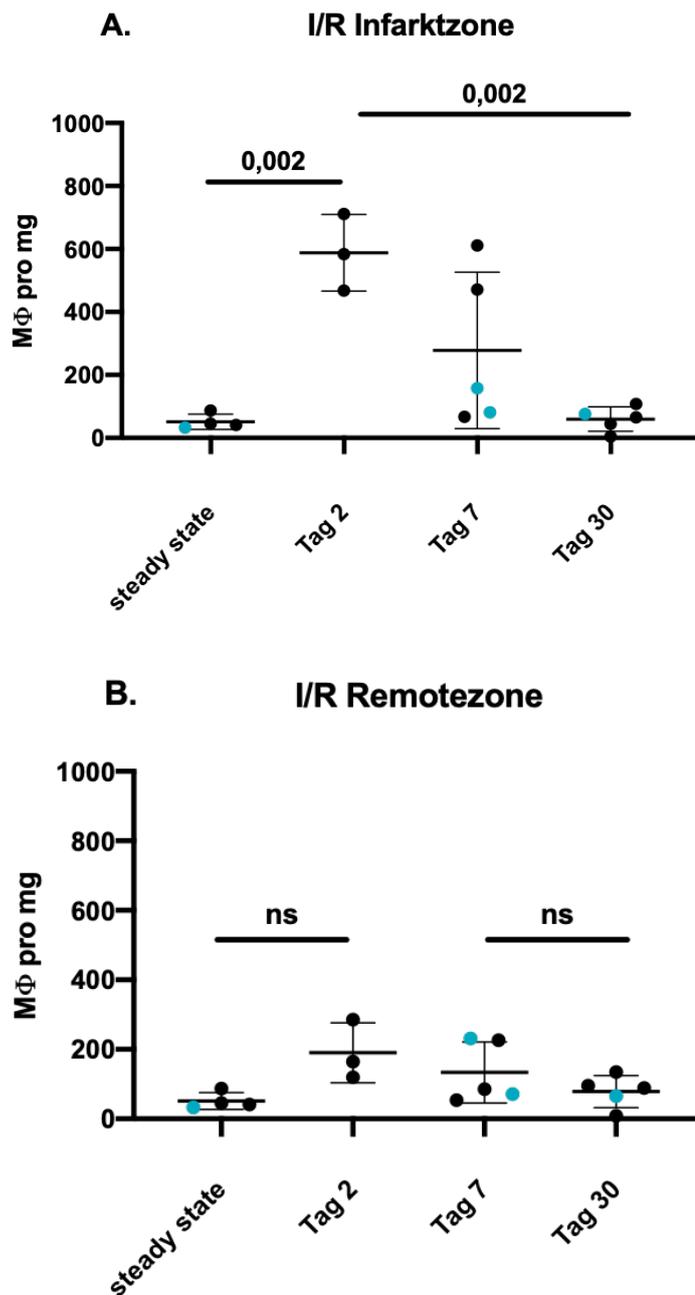


Abbildung 21: Absolute Zellzahl pro mg Herzgewebe der CD64+F4/80+ Makrophagenpopulation an Tag 2, 7 und 30 nach Myokardinfarkt

A. Infarktzone des Herzens; Von links nach rechts: steady state n=4, I/F Tag 2 Infarktzone n=3, I/F Tag 7 Infarktzone n=5, I/F Tag 30 Infarktzone n=5; Altersdurchschnitt Tag 7: 25,6 Wochen; Durchschnitt Tag 30: 18,4 Wochen; Genotyp schwarz: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/tdTomato}$; Genotyp petrol: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+}$; einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur, adjustierte p-Werte; Mittelwerte \pm SD

B. Remotezone des Herzens, von links nach rechts steady state n=4, I/F Tag 2 Remotezone n=3, I/F Tag 7 Remotezone n=5, I/F Tag 30 Remotezone n=5; Altersdurchschnitt Tag 7: 25,6 Wochen; Durchschnitt Tag 30: 18,4 Wochen; Genotyp schwarz: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/tdTomato}$; Genotyp: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+}$; einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur, adjustierte p-Werte; Mittelwerte \pm SD

Die Makrophagenanzahl pro mg (Herzgewebe) unterscheidet sich innerhalb der verschiedenen Zeitpunkte des Myokardinfarkts. In der Infarktzone ist die höchste Zellzahl am Tag 2 des Myokardinfarkts erreicht und fällt bis Tag 30 wieder auf die Zellzahl unter Ruhebedingungen zurück. Die Zellzahl in der Remotezone erfährt einen leichten Anstieg an Tag 2. Die Zellzahlen an Tag 7 und 30 gleichen denen der *steady state* Gruppe. In der Infarktzone ist dabei der Unterschied beim Vergleich von Tag 2 und der *steady state* Gruppe signifikant ($p \leq 0,002$), sowie der Unterschied von Tag 2 auf Tag 30 ($p \leq 0,002$).

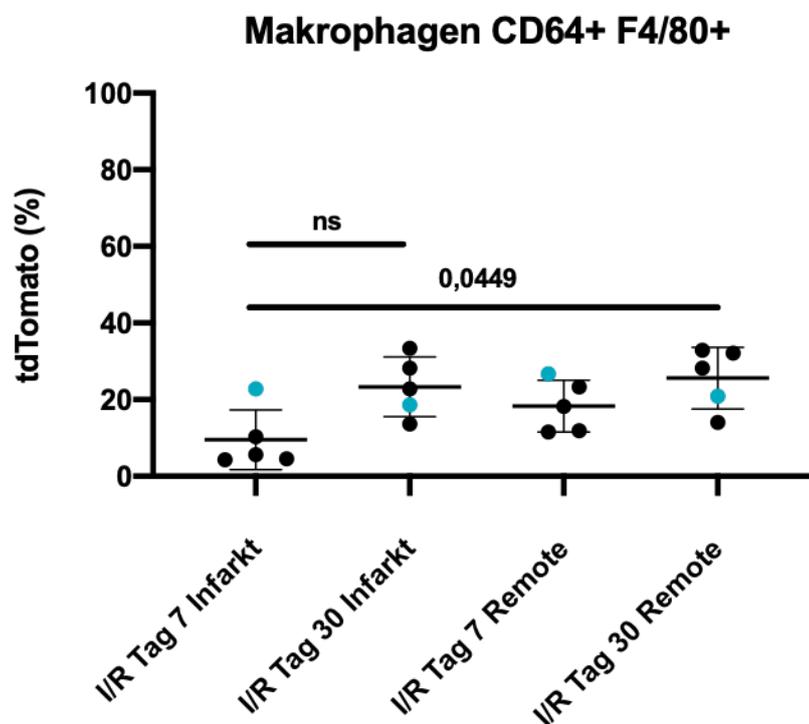


Abbildung 22: Charakterisierung der tdTomato-positiven Zellen im Myokardinfarkt an Tag 7 und 30 nach LAD-Ligatur

Durchflusszytometrie von Mäuseherzen; Prozentuale Verteilung von tdTomato-positiven Makrophagen (CD64+ F4/80+) an Tag 7 und Tag 30 nach LAD-Ligatur. Vergleich der Infarktzone an Tag 7/ Tag 30 nach Myokardinfarkt und der Remotezone an Tag 7/ Tag 30 nach Myokardinfarkt. Jeweils $n=5$. Altersdurchschnitt der Tag 7 Gruppe ist 25,6 Wochen und der Durchschnitt der Tag 30 Gruppe ist 18,4 Wochen. Genotyp schwarz: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/tdTomato+}$; Genotyp: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+}$ Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multipler Testung, adjustierte p-Werte, Mittelwert \pm SD

Die Analyse mit dem Durchflusszytometer an Tag 7 nach der LAD-Ligatur ergab eine prozentuale Verteilung von 4,3-22,8% in der Infarktzone und 11,5-26,7% in der Remotezone. Die Gruppe an Tag 30 nach Myokardinfarkt beläuft sich auf eine Labeling-Effizienz von 13,6-33,4% in der Infarktzone und 14-32,9% in der Remotezone.

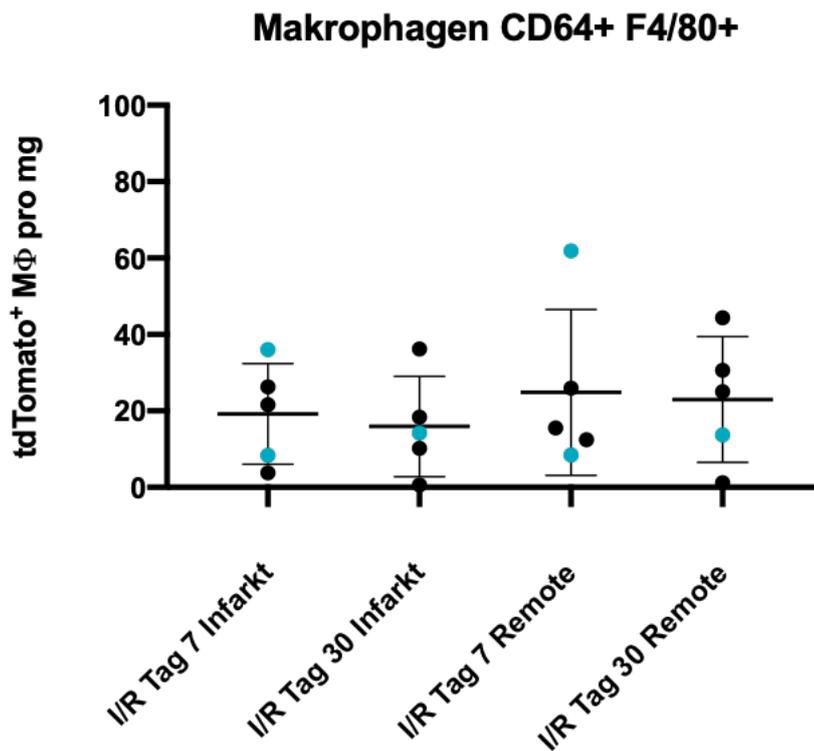


Abbildung 23: Absolute Zahlen der tdTomato-positiven Zellen in der Makrophagenpopulation an Tag 7 und 30 nach Myokardinfarkt

Durchflusszytometrie von Mäuseherzen; Absolute Zellzahl von tdTomato-positiven Makrophagen (CD64+F4/80+) pro mg.

Vergleich der Infarktzone an Tag 7 und Tag 30 nach Myokardinfarkt und der Remotezone an Tag 7 und Tag 30 nach Myokardinfarkt. Jeweils n=5. Altersdurchschnitt Tag 7 Gruppe: 25,6 Wochen;

Altersdurchschnitt Tag 30 Gruppe 18,4 Wochen.

Genotyp schwarz: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/tdTomato}$; Genotyp petrol: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+}$
 einfaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur, adjustierte p-Werte;
 Mittelwerte \pm SD

Die absolute Zellzahl von tdTomato-positiven Makrophagen pro mg beträgt in der Infarktzone 0,6-44 Zellen und in der Remotezone 1,19-61,84 Zellen. Es gibt keine Unterschiede in der Verteilung der Zellen in den einzelnen Gruppen.

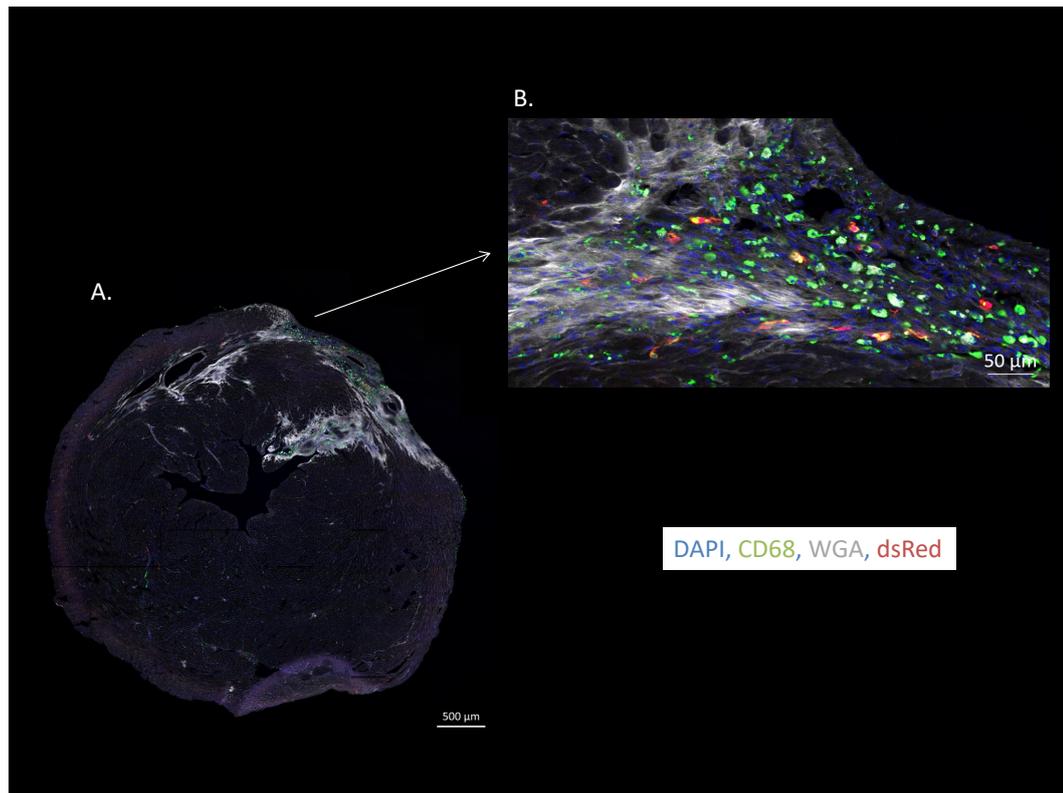


Abbildung 24: Konfokale Aufnahme eines $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+}$ Herzens an Tag 30 nach Myokardinfarkt

Zellkerne (blau (Hoechst)); CD68 positive Makrophagen (grün);
Retnla-exprimierende Zellen (rot); die Fibrose mit WGA (weiß)

A: Fibrose im Infarktgebiet, Maßstab 500 µm

B: Infiltration des Infarktgebiets mit Entzündungszellen, darunter auch tdTomato-positive Zellen; Maßstab 50 µm

Konfokale Aufnahmen von Herzen an Tag 30 des Myokardinfarkts zeigen eine Infiltration von doppelpositiven ($CD68^+ tdTomato^+$) Zellen an Tag 30 nach LAD-Ligatur.

In der Abbildung 24 ist die Fibrose im Herzgewebe an Tag 30 nach einem Myokardinfarkt zu sehen. Es wurden zahlreiche Gewebemakrophagen (CD 68 Expression) im fibrotischen kardialen Gewebe gefunden. Darunter befanden sich auch Zellen, welche eine Kolokalisation mit tdTomato-Signal (rot, als Indikator einer Retnla-abhängigen Rekombination) zeigten.

Um die prozentuale Verteilung der Retnla-exprimierenden Zellen im Verlauf des Myokardinfarkts im Blut zu untersuchen, fand eine kardiale Blutentnahme statt. Das Mäuseblut wurde danach mit dem Durchflusszytometer analysiert.

Die Analyse mit dem Durchflusszytometer zeigte keine Veränderung in der Expression der *Retnla*-positiven Zellen in den Populationen der $Ly6C^{high}$ Monozyten und der T- und B-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach einem Myokardinfarkt. Die $Ly6C^{low}$ Monozyten haben ein durchschnittliches Labeling von 7 % an Tag 2, 9,5% an Tag 7 und 25 % an Tag 30. Damit ist ein eindeutiger Anstieg der Expression von *Retnla* von Tag 2 zu Tag 30 in dieser Population erkennbar. Neutrophile Granulozyten zeigten durchschnittlich ein Labeling von 29,4 % an Tag 2, 12,43 % an Tag 7 und 12 % an Tag 30 nach einem Myokardinfarkt.

5.2. *Retnla*-exprimierende Zellen im Modell der kardialen Fibrose

In diesem Modell soll das Verhalten von *Retnla*-exprimierenden Makrophagen in einer chronischen Entzündung untersucht werden. Dazu wurde Mäusen der Linie *RetnlaCreRosa26Tomato* eine osmotische Pumpe, die mit Angiotensin-II befüllt war, eingesetzt. Es entsteht so eine Hypertonie im Gefäßsystem, die zu einer dauerhaften Belastung des kardialen Gewebes führt. Nach 10 Tagen wurden die Herzen der Mäuse mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert.

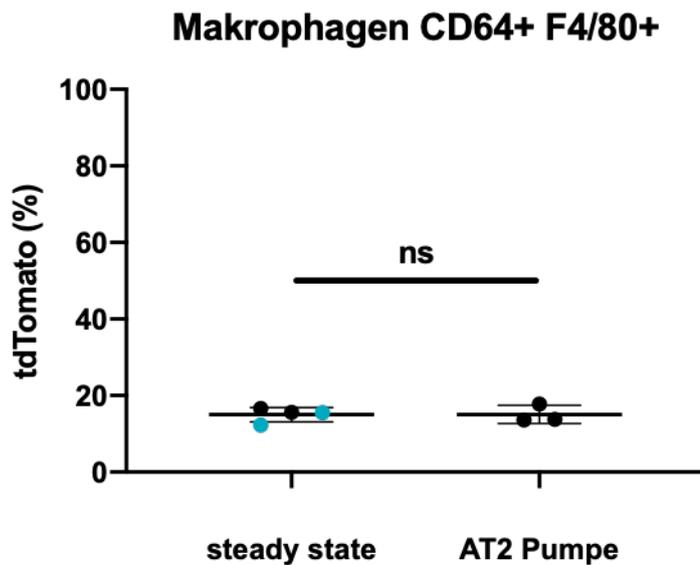


Abbildung 26: Quantifizierung der Retnla-exprimierenden Makrophagen (CD64+F4/80+) im Modell der AT2-Pumpe

Durchflusszytometrie von Mäuseherzen 10 Tage nach Implantation einer AT2-Pumpe, links *steady state* Gruppe (n=4, Durchschnittsalter: 16 Wochen), rechts AT2-behandelte Gruppe (n=3, Alter: 12 Wochen); Genotyp schwarz: Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/tdTomato}; Genotyp petrol: Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+} Ungepaarter t-Test, Mittelwert ± SD

Die Analyse mit dem Durchflusszytometer ergab keinen Unterschied in der prozentualen Verteilung von tdTomato-positiven Makrophagen im kardialen Gewebe der AT2 behandelten Tiere im Gegensatz zu Tieren unter Ruhebedingungen.

6. Funktion der Retnla-exprimierenden Zellen im Modell des Myokardinfarktes

Um die Rolle und Funktion der Retnla-exprimierenden Zellen im Myokardinfarkt zu untersuchen, wurde die Mauslinie Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+}Rs26^{DTR/+} verwendet. Durch Diphterie-Toxin (DT) wird die Retnla-exprimierende Zellpopulation spezifisch depletiert. Als Kontrollgruppe werden Cre-negative Tiere aus derselben Linie verwendet.

6.1. Depletion Retnla-exprimierender Zellen unter Ruhebedingungen

Den Tieren wurde insgesamt 6-mal Diphtherie-Toxin unter Ruhebedingungen verabreicht (siehe Kapitel IV. Abs. 8.2) um die Funktionalität dieses Depletions-Modells zu überprüfen. Am Tag der letzten Injektion wurden die Tiere mit Hilfe des Durchflusszytometers untersucht. Tiere dieser Mauslinie exprimieren am *Rosa26*-Locus auch tdTomato. Nicht-depletierte Zellen können so anhand der Labeling-Effizienz identifiziert werden.

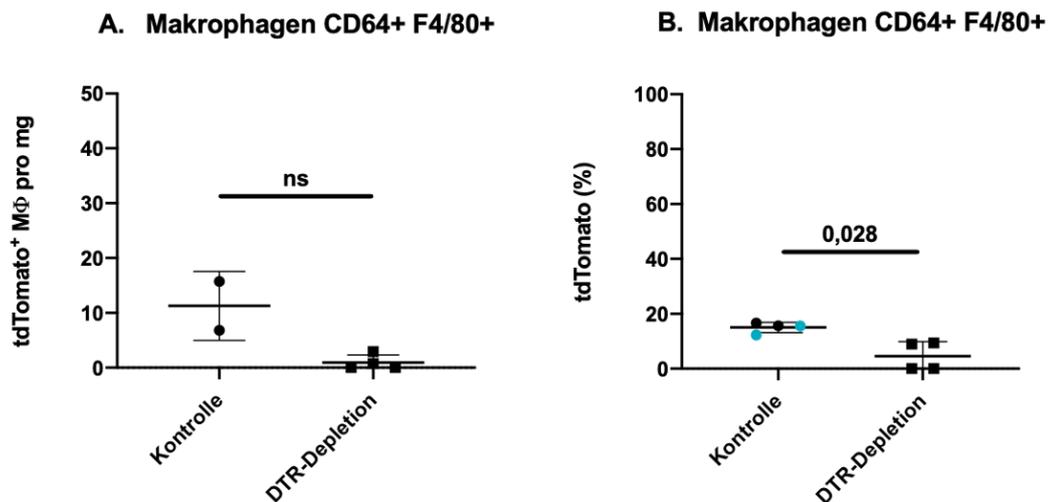


Abbildung 27: Effizienz der DTR-Depletion unter Ruhebedingungen

A. Absolute Zahlen der tdTomato-positiven Makrophagen in Mäuseherzen; Kontrollgruppe (n=2, Genotyp: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/tdTomato}$); DTR-Depletionsgruppe (n=4, Genotyp: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+}Rs26^{DTR/+}$); Mann-Whitney-U-Test; Mittelwert \pm SD

B. Prozentuale Verteilung von tdTomato-positiven Makrophagen in Mäuseherzen; Kontrollgruppe (n=4; Genotyp schwarz: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/tdTomato}$; Genotyp petrol: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+}$); DTR-Depletionsgruppe (n=4; Genotyp: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+}Rs26^{DTR/+}$); Mann-Whitney-U-Test; Mittelwert \pm SD

Die Hälfte der DTR-depletierten Tiere unter Ruhebedingungen zeigten in der durchflusszytometrischen Analyse der Herzmakrophagen eine vollständige Depletion. Die andere Hälfte wies eine Depletion der tdTomato-positiven Makrophagen im kardialen Gewebe um 50 % auf. Als Kontrollgruppe dienten Cre-positive Tiere der Mauslinie *RetnlaCreRs26Tomato* unter Ruhebedingungen.

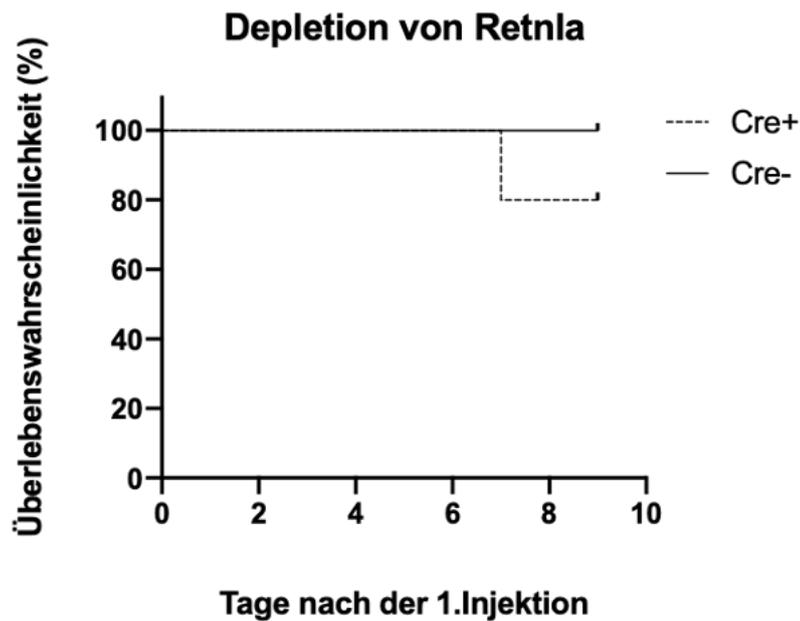


Abbildung 28: Überlebenswahrscheinlichkeit von Mäusen mit Depletion Retnla-exprimierender Zellen unter Ruhebedingungen

Cre-positive Gruppe n=5; Cre-negative Gruppe n=5;

Genotyp: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+}Rs26^{DTR/+}$

Nach der 2. Injektion zeigte die Depletionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein reduziertes Allgemeinbefinden. In diesem Versuchsaufbau handelte es sich bei der Kontrollgruppe um Cre-negative Tiere derselben Mauslinie *RetnlaCreRs26TomatoRs26DTR*. Ein Cre-positives Tier musste aufgrund schlechten Allgemeinbefindens vorzeitig aus dem Versuch genommen werden.

6.2. Depletion Retnla-exprimierender Zellen im Myokardinfarkt

Mit Hilfe der Depletion der Retnla-exprimierenden Zellen im Myokardinfarkt kann deren Rolle und Funktion im Heilungsprozess nach Ischämie/Reperfusionsschaden untersucht werden. Die Auswirkungen auf das kardiale Remodeling wurden mit dem Positronen-Emissions-Tomographie (PET) bestimmt. Das Injektionsschema wurde gleich mit der Gruppe unter Ruhebedingungen durchgeführt. Die PET-Analysen fanden an Tag 6 und 30 post LAD-Ligatur statt. Die Defekte in der Perfusion wurden prozentual bestimmt und geben Hinweise auf die Größe des Infarktareals.

Das linksventrikuläre metabolische Volumen (LVMV) wurde für das Ausmaß der kardialen Fibrose und Hypertrophie bestimmt.

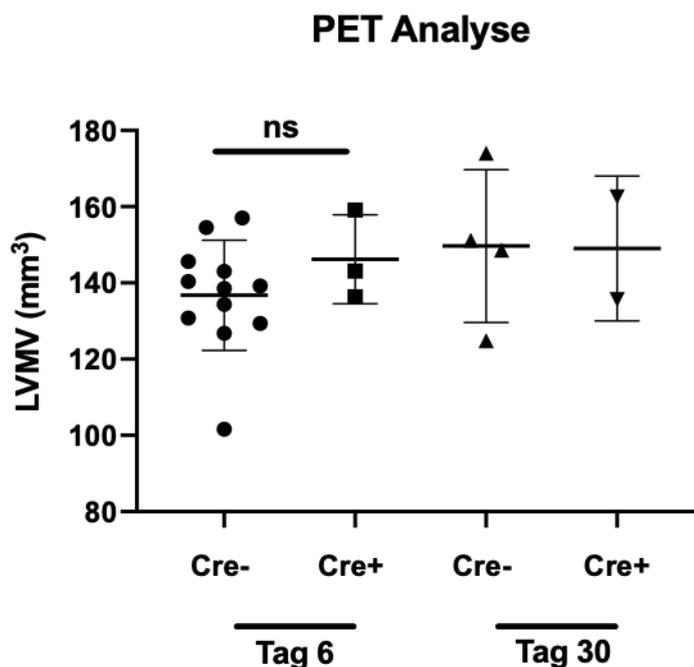


Abbildung 29: Linksventrikuläres metabolisches Volumen (LVMV) in Mäusen mit Depletion Retnla-exprimierender Zellen

Auswertung der PET-Daten. Die Messungen der Kontroll- und Versuchsgruppe fanden am Tag 6 (Cre neg. n=12, Cre pos. n=3) und 30 (Cre neg. n=4, Cre pos. n=2) nach Myokardinfarkt statt. Um die Hypertrophie und die Fibrose zu ermitteln, wurde das linksventrikuläre metabolische Volumen bestimmt. Genotyp: Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+}Rs26^{DTR}. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multipler Testung, adjustierte p-Werte, Mittelwert \pm SD; Tag 6 Gruppe Cre- vs. Tag 6 Gruppe Cre+ : paariger t-Test

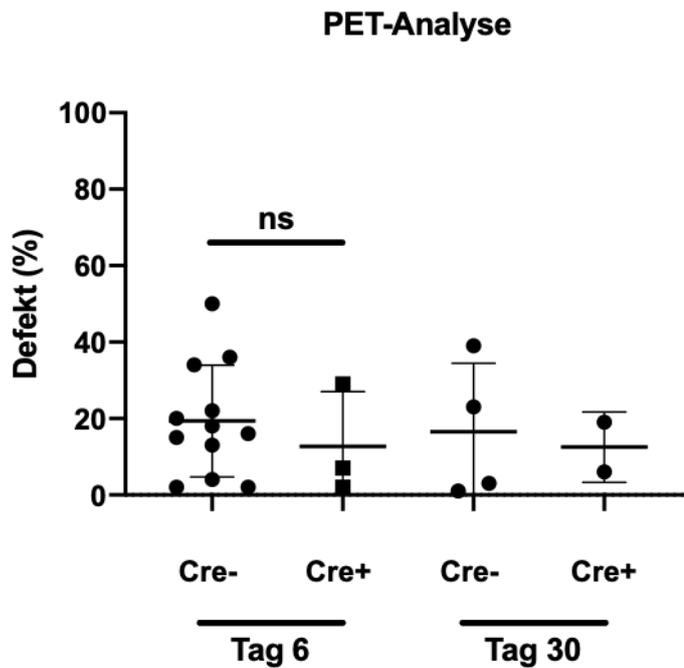


Abbildung 30: Größe des Infarktareals in Mäusen mit Depletion der Retnla-exprimierenden Zellen

Auswertung der PET-Daten. Die Messungen der Kontroll- und Versuchsgruppe fanden am Tag 6 (Cre neg. n=12, Cre pos. n=3) und 30 (Cre neg. n=4, Cre pos. n=2) nach Myokardinfarkt statt. Um die Größe des Infarktgebietes zu ermitteln, wurde der Defekt analysiert. Genotyp: $Retnla^{Cre+}Rs26^{Tdtomato/+}Rs26^{DTR/+}$
 Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multipler Testung, adjustierte p-Werte; Mittelwert \pm SD
 Tag 6 Gruppe Cre- vs. Tag 6 Gruppe Cre+: paariger t-Test

Bei der Analyse des Defekts und der Bestimmung der LVMV zeigte sich keine Veränderung zwischen der Kontrollgruppe und der depletierten Gruppe.

Tiere der Depletionsgruppe zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe ein deutlich schlechteres Allgemeinbefinden. Drei Viertel aller Tiere verstarb in den ersten zwei Tagen nach der LAD-Ligatur oder musste, aufgrund rapiden Gewichtsverlustes und schlechtem Allgemeinbefindens, vorzeitig aus dem Versuch genommen werden.

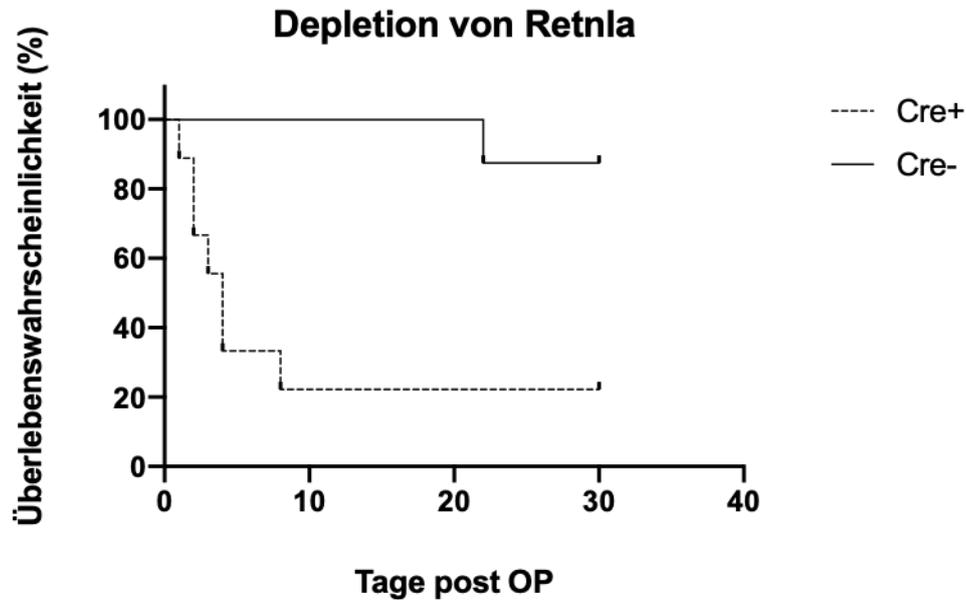


Abbildung 31: Überlebendwahrscheinlichkeit in Mäusen mit Depletion der Retnla-exprimierenden Zellen bis 30 Tage nach der LAD-Ligatur

Cre-positive Gruppe n=6; Cre-negative Gruppe n=8;

Genotyp: $Retnla^{Cre+}Rs26^{tdTomato/+}Rs26^{DTR/+}$

7. Einfluss neutrophiler Granulozyten auf die Funktion der Retnla-exprimierenden Zellen

Durch die Freisetzung von Lipocalin begünstigen neutrophile Granulozyten die Polarisierung der Makrophagen in einen alternativ-aktivierten Phänotyp. *Retnla* gilt als Marker für diese Makrophagen. Durch die Depletion neutrophiler Granulozyten soll deren Einfluss auf die Retnla-exprimierenden Zellen näher untersucht werden. Dafür wurde Tieren der Mauslinie *RetnlaCreRs26Tomato* ein Anti-Ly6G Antikörper injiziert (s. Abschnitt 8.1 im Kapitel IV.). Die Analyse der Tiere mit dem Durchflusszytometer fand zwei Tage nach der letzten Injektion statt.

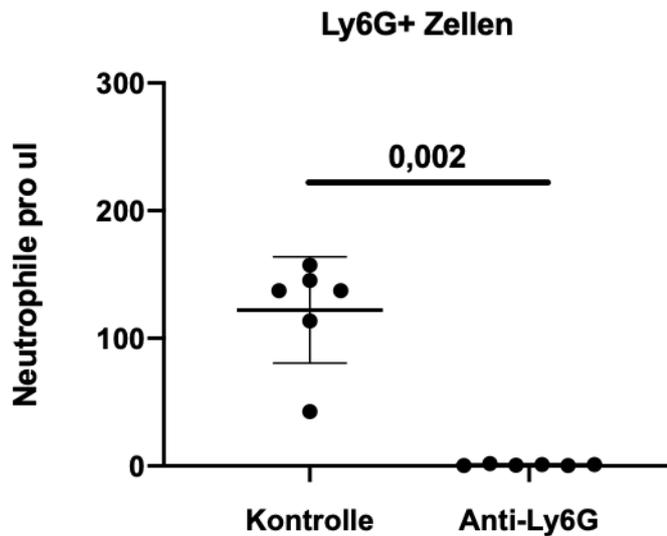


Abbildung 32: Effizienz der Anti-Ly6G Depletion in der Neutrophilenpopulation

Absolute Anzahl der neutrophilen Granulozyten pro μl im Blut; Kontrolle (n=6), Anti-Ly6G (n=6); Genotyp: $\text{Retnla}^{\text{Cre}^+}\text{Rs26}^{\text{tdTomato/tdTomato}}$; Mann-Whitney-U-Test; Mittelwert \pm SD

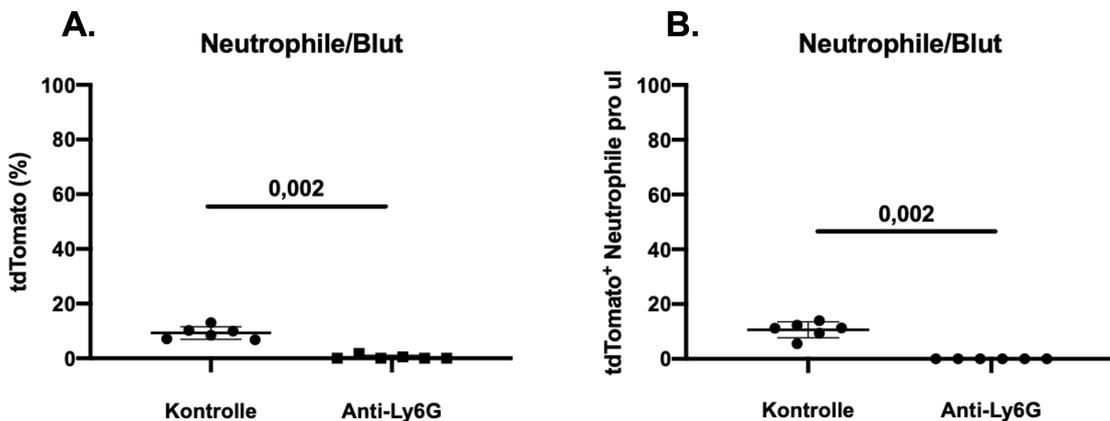


Abbildung 33: Effizienz der Anti-Ly6G-Depletion in der tdTomato-positiven Neutrophilenpopulation

Durchflusszytometrie im Mäuseblut; Kontrolle (n=6), Anti-Ly6G (n=6) Genotyp: $\text{Retnla}^{\text{Cre}^+}\text{Rs26}^{\text{tdTomato/tdTomato}}$

A: Prozentuale Verteilung tdTomato-positiver Zellen in der Population der neutrophilen Granulozyten im Blut; Mann-Whitney-U-Test; Mittelwert \pm SD

B: Absolute Zahlen von tdTomato-positiven neutrophilen Granulozyten pro μl im Blut; Mann-Whitney-U-Test; Mittelwert \pm SD

Es war eine eindeutige Reduktion der neutrophilen Granulozyten pro μl im Blut, wie in Abbildung 32 zu sehen ist, erkennbar. Beim Vergleich der Kontrollgruppe und der Anti-Ly6G behandelten Gruppe ergab sich ein signifikanter Unterschied von $p \leq 0,002$. Auch tdTomato-positive neutrophile Granulozyten wurden effizient depletiert. Die absolute Anzahl und die prozentuale Verteilung von tdTomato-positiven Neutrophilen zeigte nach einer Anti-Ly6G Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,002$) auf.

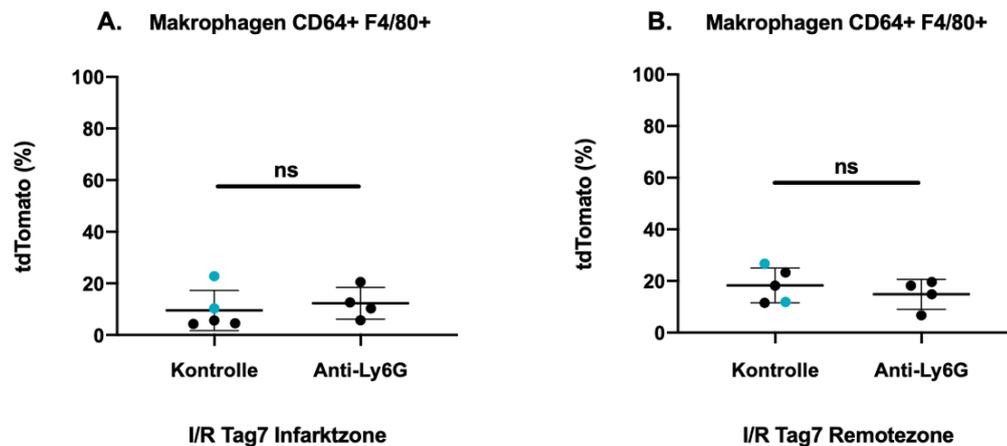


Abbildung 34: Quantifizierung tdTomato-positiver Makrophagen im Myokardinfarkt von Ly6G-depletierten Tieren

Durchflusszytometrie von Mäuseherzen; Kontrolle (n=5) Anti-Ly6G (n=4)
 Genotyp: schwarz ($\text{Retnla}^{\text{Cre}+}\text{Rs26}^{\text{tdTomato/tdTomato}}$), petrol ($\text{Retnla}^{\text{Cre}+}\text{Rs26}^{\text{tdTomato/+}}$),
 A: Prozentuale Verteilung der tdTomato-positiven Makrophagen in der Infarktzone 7 Tage nach der LAD-Ligatur; Mann-Whitney-U-Test; Mittelwert \pm SD
 B: Prozentuale Verteilung der tdTomato-positiven Makrophagen in der Remotezone 7 Tage nach der LAD-Ligatur; Unpaariger t-test; Mittelwert \pm SD

Es gab keinen Unterschied der prozentualen Verteilung tdTomato-positiver Makrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Infarktzone oder der Remotezone. Die Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten scheint keinen Einfluss auf die prozentuale Verteilung von tdTomato-positiven (Retnla-exprimierenden) Makrophagen in der frühen Phase des Ischämie/Perfusionsschadens zu haben.

VI. DISKUSSION

Makrophagen gehören als mononukleare Phagozyten zum angeborenen Immunsystem und zeichnen sich durch hohe Plastizität aus. Im Entzündungsgeschehen reagieren Makrophagen mit einem koordinierten Ablauf von Prozessen, um Pathogene zu beseitigen. Die gewebständigen Makrophagen setzen Chemokine und Zytokine frei, die wiederum neutrophile Granulozyten zum Entzündungsort rekrutieren. Die Genexpression von Makrophagen am Entzündungsort zeigt eine Hochregulation von *Retnla*, *Chil3* und *Arg1*, welche nicht-inflammatorische und Wundheilungsfunktionen haben [21, 27]. Makrophagen sind ein relevanter Therapieansatz in kardiovaskulären Erkrankungen. Allerdings müssen die einzelnen Subpopulationen und deren Funktion im Entzündungsprozess erst genauer untersucht werden. Ziel dieser Arbeit war es daher, *Retnla*-exprimierende Immunzellen anhand der Mauslinie *RetnlaCreRs26Tomato* zu charakterisieren und ihre mögliche Bedeutung in Entzündungsprozessen des Herzens zu untersuchen. Die Ergebnisse sollen dem besseren Verständnis dieser Zellen dienen und mögliche Therapiemöglichkeiten aufzeigen.

1. Identifikation *Retnla*-exprimierender Zellen unter Ruhebedingungen

Unsere Ergebnisse der Single-Zell-Sequenzierung von murinen Wildtyp-Herzen zeigten, dass *Retnla* von residenten Makrophagen mit homöostatischer Funktion exprimiert wird. Die verwendete Mauslinie *RetnlaCreRs26Tomato* ermöglichte es, *Retnla*-exprimierende Zellen *in vivo* zu verfolgen. Ein kleiner Teil der neutrophilen Granulozyten im Blut wies ebenfalls ein positives tdTomato-Signal auf.

Spezielle Zellmarker für Makrophagen wurden verwendet, um die Population der *Retnla*-exprimierenden Makrophagen zu differenzieren. In histologischen Untersuchungen an adulten murinen Herzen war die Expression des tdTomato-Signals (als Indikator einer *Retnla*-abhängigen Rekombination) kolokalisiert mit Gewebemakrophagen (CD68-Expression). Durchflusszytometrische Untersuchungen des Gehirns zeigten kein tdTomato-Signal in den Mikrogliazellen. In der Lunge sahen wir dagegen eine Labeling-Effizienz von

ca. 55% in den interstitiellen Makrophagen. Es ist anzumerken, dass *Retnla* häufig im Zusammenhang mit Entzündungen der Atemwege untersucht wird [55]. In dieser Arbeit wurde nicht weiter auf die interstitiellen Makrophagen eingegangen. Im Vergleich zu adulten Tieren ergaben unsere FACS-Analysen von 14 Tage alten Embryonen noch keine Promotoraktivität. *Retnla* scheint in diesem Abschnitt der embryonalen Entwicklung noch nicht exprimiert zu werden.

In der Mauslinie *RetnlaCreRs26Tomato* wird Cre konstitutiv exprimiert, das heißt, das tdTomato-Signal korreliert nicht notwendigerweise mit der aktuellen Promotoraktivität. Wir haben hierbei nicht differenziert, ob die Expression des tdTomato-Signals eine aktuelle oder historische Rekombination zeigt.

2. *Retnla*-exprimierende Zellen werden durch IL-4 stimuliert

Krljanac *et al.* [92] zeigten im Jahr 2019, dass eine Stimulation mit Interleukin-4 zu einem Anstieg an tdTomato-positiven knochenmarksabhängigen Makrophagen (isoliert aus *RetnlaCreRs26Tomato* Mäusen) führte. Wie in Abbildung 19 dargestellt, konnte die Expression von *Retnla* in kardialen Makrophagen mittels IL-4 Gabe stimuliert werden. Bei IL-4 handelt es sich um ein Zytokin, welches eine stimulierende Wirkung auf alternativ-aktivierte Makrophagen hat. IL-4 wird als potenzieller Therapieansatz nach einem akuten Myokardinfarkt diskutiert. Shintani *et al.* [95] führten eine Studie durch, bei der die Injektion von IL-4 die Herzfunktion nach einem akuten Myokardinfarkt in der Maus verbessern konnte. Durch die Behandlung erhöhte sich die Anzahl an alternativ-aktivierten Makrophagen, welche für eine Angiogenese und erhöhte Stabilität des infarzierten Gewebes sorgten.

3. *Retnla*-exprimierende Zellen im I/R Modell

In dieser Arbeit wurde das Modell der I/R für den akuten Myokardinfarkt verwendet. Im Gegensatz zur permanenten Ligatur wurde hier eine transiente Ligatur angewendet, bei der die LAD (Left anterior descending artery) für eine Stunde verschlossen wird. Es soll so eine höhere Vergleichbarkeit zu den klinischen Bedingungen im menschlichen Patienten möglich sein, bei der es auch Ziel ist, eine Reperfusion des kardialen Gewebes zu erreichen. Die Analyse mit dem Durchflusszytometer zu verschiedenen Zeitpunkten des Myokardinfarkts

ergab einen leichten prozentualen Anstieg der tdTomato-positiven Makrophagen in der Infarktzone an Tag 30. Gleichzeitig blieb die absolute Anzahl der tdTomato-positiven Makrophagen im infarzierten Gewebe über alle Zeitpunkte hinweg konstant. Dieses Phänomen könnte durch die absolute Anzahl an Makrophagen im Verlauf des Myokardinfarkts erklärt werden. In der frühen Phase des Myokardinfarkts kommt es zu einem Anstieg der Makrophagenanzahl, da Ly6C^{high} Monozyten beginnen, das infarzierte Gewebe zu infiltrieren. Im Gewebe angekommen, differenzieren sie sich zu pro-inflammatorischen Makrophagen. Durch die Ischämie kommt es zu einem Absterben von kardialen Gewebemakrophagen. Die Population erholt sich ab dem 4. Tag nach Infarkt und kann durch lokale Proliferation erhalten werden [96, 97]. Die Gesamtzahl der tdTomato-positiven Makrophagen bleibt konstant, wodurch sich der prozentuale Anteil je nach Anzahl an Makrophagen verändert. Die Analyse der Single-Zell-Sequenzierung ordnete die Retnla-exprimierenden Makrophagen zu den homöostatischen Makrophagen, die embryonalen Ursprungs sind und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen. Es bleibt zu untersuchen, warum die Anzahl Retnla-exprimierenden Makrophagen zu den verschiedenen Zeitpunkten des Myokardinfarkts konstant bleibt. Eine Behandlung der Tiere mit einem CCR2-Antikörper blockiert die Rekrutierung der Monozyten aus dem Knochenmark und könnte so den Beitrag von Blutmonozyten an der Retnla-exprimierenden Makrophagenpopulation erklären.

4. Verhalten der Retnla-exprimierenden Zellen in der chronischen Inflammation

Im Modell der Angiotensin-II Pumpe wird durch eine osmotisch aktive Pumpe langsam das Peptidhormon Angiotensin-II (AT-2) in den Körper der Maus freigesetzt. Durch AT-2 wird eine Hypertonie im Gefäßsystem ausgelöst und die Nachlast im Herzen erhöht. Die chronische Inflammation führt zur Bildung einer Fibrose im kardialen Gewebe. Unsere durchflusszytometrische Analyse von *RetnlaCreRs26Tomato* Mäusen zeigte keinen Anstieg in der prozentualen Verteilung von tdTomato-positiven Makrophagen 10 Tage nach der Implantation. Bei der Behandlung mit AT-2 kommt es zu einem Einstrom von knochenmarksabhängigen Makrophagen in der akuten Phase der

Entzündung [98]. Das Ausbleiben eines Anstiegs in der prozentualen Verteilung der tdTomato-positiven Makrophagen spricht dafür, dass die Population nicht durch die infiltrierenden Monozyten beeinflusst wird. Es ist allerdings bekannt, dass Retnla-exprimierende interstitielle Makrophagen der Lunge auch von Monozyten, welche das Lungengewebe infiltrieren, abstammen können [92]. Es sollte daher zusätzlich zur FACS-Analyse in der Zukunft eine histologische Quantifizierung der mit AT-2 behandelten Tiere erfolgen. Damit kann die Verteilung der tdTomato-positiven Makrophagen im kardialen Gewebe bestimmt werden. Dies ist relevant, um ihren Einfluss auf die fibrotischen Veränderungen zu ermitteln.

5. Einfluss der Depletion Retnla-exprimierender Zellen auf die Herzfunktion

Die Mauslinie *Retnla^{Cre+}Rs26^{Tdtomato/+}Rs26^{DTR/+}* ermöglicht es, Retnla-exprimierende Zellen mit Hilfe von Diphtherie-Toxin gezielt zu depletieren. Unter Ruhebedingungen zeigte sich ein reduziertes Allgemeinbefinden der Tiere mit aktiver Cre-Rekombinase. Die Kontrollgruppe zeigte keine Veränderung im Allgemeinbefinden. Dreiviertel aller depletierten Tiere, die zusätzlich einer transienten LAD-Ligatur unterzogen wurden, starben spontan oder mussten wenige Tage nach dem Eingriff aufgrund schlechten Allgemeinbefindens vorzeitig aus dem Versuch genommen werden. Eine Erklärung für die schlechte Kondition der Tiere könnte ein durch die Depletion entstandener Untergang von Retnla-exprimierenden Zellen im gesamten Körper sein. Neben dem Herzen finden sich tdTomato-positive Makrophagen auch im weißen Fettgewebe und dem Magen-Darm-Trakt der *Retnla^{Cre}Rs26^{Tomato}Rs26^{DTR}* Mäuse [92]. Durch das Absterben dieser Zellen könnte es neben dem Anfallen von Zellfragmenten auch zu einer nicht mehr intakten Immunabwehr kommen. Zusätzlich dazu besteht die Möglichkeit einer Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen in Folge des Zelluntergangs. Es gibt Untersuchungen, bei denen eine parasitäre Infektion der Mäuselunge zeigte, dass die Depletion von Retnla-exprimierenden Makrophagen die Überlebenschancen der Mäuse minderte, da diese Zellpopulation essenziell für das Abklingen der Entzündung in der Lunge ist [92]. Die akute Depletion von Retnla-exprimierenden Makrophagen in der Frühphase des Myokardinfarkts,

zeigte keine Unterschiede zwischen der Kontroll- und der depletierten Gruppe in den Parametern LVMV und Größe des Infarktareals. Daher ist es denkbar, dass die Depletion der Retnla-exprimierenden Zellen in dieser Phase nach Myokardinfarkt keinen großen Effekt auf die Funktion des Herzens hat. Weitere Untersuchungen müssen unternommen werden, um die Infiltration von Monozyten und neutrophilen Granulozyten, sowie die Anwesenheit pro-inflammatorischer Zytokine im kardialen Gewebe in der Depletion zu klären. Modelle mit Retnla-KO Mäusen zeigten, dass Tiere mit dieser genetischen Modifikation generell lebensfähig sind. Allerdings sahen Kim *et al.* keine Unterschiede in der Makrophagenpolarisation zwischen KO und WT-Tieren [99]. Generell scheint das Modell der Depletion mittels Diphtherie-Toxin in der Mauslinie *RetnlaCreRs26TomatoRs26DTR* nicht geeignet, um die Fragestellung abschließend zu klären: Denn zu viele Tiere müssen vorzeitig aus dem Versuch genommen werden, wodurch eine Langzeitauswirkung der Depletion in Hinsicht auf das kardiale Remodeling nicht untersucht werden kann.

6. Retnla-exprimierende Zellen sind nicht abhängig von der Anwesenheit der Neutrophilenpopulation

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen, die nach einem Myokardinfarkt in das beschädigte Gewebe einwandern und erreichen ihren Peak einen Tag nach der Ischämie [100]. Ly6C^{high} Monozyten dominieren das infarzierte Gewebe ab Tag 1 bis 4 und werden hauptsächlich aus der Milz rekrutiert [77]. Neutrophile Granulozyten unterstützen dabei die Mobilisation und Aktivierung der Ly6C^{high} Monozyten [101]. Alternativ aktivierte Makrophagen sind für die Gewebshomöostase unabdingbar. Die bi-phasische Immunantwort von Monozyten und Makrophagen nach einem Myokardinfarkt darf daher nicht gestört werden, um eine Heilung des Myokardgewebes zu gewährleisten. Eine Unterbrechung der inflammatorischen Phase resultiert in einem unvollständigen Abbau von Zellschrott, während eine Beeinträchtigung der reparativen Phase eine ineffiziente Fibrose und geminderte Gefäßneubildung nach sich zieht [76]. Horckmans *et al.* konnten zeigen, dass neutrophile Granulozyten den Monozyten/Makrophagen Phänotyp nach einem Myokardinfarkt beeinflussen können. Durch die Depletion von neutrophilen Granulozyten mit einem

Anti-Ly6G Antikörper nach einer permanenten LAD Ligatur kam es zu einem Mangel an Ly6C^{high} Monozyten im Infarktbereich. Durch das Fehlen der neutrophilen Granulozyten zeigten die Makrophagen gehäuft einen nicht-inflammatorischen Phänotyp. Die erhöhte Anzahl an alternativ aktivierten Makrophagen hatte eine Ablagerung von Kollagen und einen Anstieg von Myofibroblasten zur Folge. Es trat eine verschlechterte Herzfunktion und Versteifung des Herzmuskels durch eine Ausweitung der Fibrose auf [82]. Die durchflusszytometrische Analyse von *RetnlaCreRsTomato* Mäusen ergab keinen Unterschied im prozentualen Anteil der Tdtomato-positiven Makrophagen in der Infarktzone nach einer Neutrophilendepletion. Die (vorbeschriebene) reduzierte Monozytenrekrutierung durch die Anti-Ly6G Behandlung hat keinen Einfluss auf die *Retnla*-exprimierende Makrophagenpopulation. Horckman *et al.* identifizierten Neutrophil-abstammendes Lipocalin (eng. *neutrophil-derived lipocalin (NGAL)*) als Mediator für die Mobilisation der Ly6C^{high} Monozyten aus der Milz. Ein Fehlen von NGAL hatte Auswirkungen auf die Expression des Markers Mer-TK (myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase) [82]. Dieser Marker wird auf Makrophagen exprimiert, die für das Entfernen von apoptotischen Zellen zuständig sind [102].

7. Ausblick

Die Mauslinie *RetnlaCreRs26Tomato* ermöglicht uns, einen Einblick in die Funktion und Rolle von *Retnla*-exprimierenden Zellen in verschiedenen Inflammationsmodellen zu bekommen, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Die Depletion der *Retnla*-exprimierenden Zellen mit Diphtherie-Toxin in der Mauslinie *RetnlaCreRs26TomatoRs26DTR* erwies sich als nicht umsetzbar, da es zu einem frühen Versuchsabbruch mit diesen Tiere kam. Um die Frage der Funktion der *Retnla*-exprimierenden Zellen im akuten Myokardinfarkt beantworten zu können, muss daher ein anderes Tiermodell verwendet werden. Bei PU.1 handelt es sich um einen „Master-Transkriptionsfaktor“ für myeloide Zellen [103]. Durch die Verwendung gefloxter Allele kann in Kombination mit dem *Retnla-Cre* Modell eine spezifische, dauerhafte Depletion dieser Population erreicht werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war es, *Retnla*-exprimierende Immunzellen anhand der Mauslinie *RetnlaCreRs26Tomato* zu charakterisieren und ihre mögliche Bedeutung in Entzündungsprozessen des Herzens zu untersuchen.

Mittels Single-Zell-Sequenzierung von kardialen Immunzellen konnte die Genexpression von *Retnla* einer Population von homöostatischen Gewebemakrophagen zugordnet werden. Um die Bedeutung von *Retnla*-exprimierenden Makrophagen zu charakterisieren, verwendeten wir die Mauslinie *RetnlaCreRs26Tomato*. Wir identifizierten ein tdTomato-Signal in den interstitiellen Makrophagen der Lunge und den kardialen Makrophagen des Herzens. Die Mikroglia des Gehirns wiesen kein tdTomato-Signal auf. Die Expression von *Retnla* in kardialen Makrophagen konnte durch die Gabe von Interleukin-4 stimuliert werden. Eine durchflusszytometrische Analyse von 14 Tage alten Embryonen zeigte noch keine Promotoraktivität. Dies legt nahe, dass das *Retnla* während dieser Phase der Embryonalentwicklung noch nicht exprimiert wird.

Im Herzinfarktmodell der transienten Ligatur der LAD, zeigten *Retnla*-exprimierende Makrophagen einen leichten Anstieg in der prozentualen Verteilung in der Infarktzone an Tag 30. Dagegen war zu den verschiedenen Zeitpunkten des Myokardinfarkts kein Unterschied in der absoluten Zellzahl zu sehen. In der chronischen Inflammation zeigte sich keine Veränderung in der prozentualen Verteilung der *Retnla*-exprimierenden Makrophagenpopulation. Es gab keinen Unterschied zwischen der AT-2 behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe unter Ruhebedingungen.

Für die Depletion von *Retnla*-exprimierenden Zellen wurde die Mauslinie *RetnlaCreRs26TomatoRs26DTR* verwendet. Die Depletion von *Retnla*-exprimierenden Zellen zusätzlich zu einer LAD-Ligatur führte bei den Cre-positiven Mäusen zu einem schlechten Allgemeinbefinden. Daraufhin musste der Versuch mit diesen Tieren frühzeitig abgebrochen werden. Im Positronen-Emissions-Tomographie zeigten Cre-negative und Cre-positive Tiere keine Unterschiede in der Größe des Infarktareals und im linksventrikulären metabolischen Volumen. Der Einfluss *Retnla*-exprimierender Zellen kann daher im DT-Modell nicht abschließend geklärt werden.

Die Depletion neutrophiler Granulozyten scheint keinen Einfluss auf die Population der Retnla-exprimierenden Makrophagen zu haben. Eine Analyse mit dem Durchflusszytometer ergab keine Unterschiede in der prozentualen Verteilung Retnla-exprimierender Makrophagen nach einer transienten LAD-Ligatur im Herzinfarktmodell.

Um die Funktion der Retnla-exprimierenden Makrophagen im Herzinfarkt eindeutig klären zu können, soll in der Zukunft die Mauslinie *Retnla-CreRs26TomatoPu.1^{flox/flox}* verwendet werden.

Die Klärung der Bedeutung spezifischer Makrophagenpopulationen könnte zu einem tieferen Verständnis kardialer Entzündungsprozesse beitragen und zur Entwicklung von zielgerichteten anti-inflammatorischen Therapien führen.

VIII. SUMMARY

The aim of our work was to characterize the role and function of *Retnla*-expressing immune cells in the inflammatory processes of the heart, by employing the *RetnlaCreRs26Tomato* mouse line.

By means of single-cell sequencing of cardiac immune cells, the gene expression of *Retnla* could be assigned to a population of homeostatic tissue macrophages. To characterize the importance of *Retnla*-expressing macrophages, we used the *RetnlaCreRs26Tomato* mouse line. We observed a tdTomato signal in the interstitial macrophages of the lung and the cardiac macrophages of the heart. The microglia of the brain showed no tdTomato signal. The expression of *Retnla* in cardiac macrophages could be stimulated by the administration of interleukin-4. Additionally, flow cytometric analysis of 14 day old embryos showed no promoter activity. This suggests that *Retnla* is not expressed in embryonic development at this timepoint.

In the myocardial infarction model, which employs a transient ligation of the LAD, *Retnla*-expressing macrophages showed a slight percentage increase in prevalence in the infarcted zone on day 30. Interestingly, no difference in the absolute cell numbers was observed at any timepoint following myocardial infarction. In chronic inflammation there was no change in the percentage of the *Retnla*-expressing macrophage population. There was no difference between the AT-2 treated group and the steady-state control group.

The *RetnlaCreRs26TomatoRs26DTR* mouse line was used to selectively deplete *Retnla*-expressing cells. This depletion, in addition to a LAD ligation, led to a poor condition in the Cre-positive mice. As a result, the experiment on these animals had to be terminated prematurely. The PET analysis of Cre-negative and Cre-positive animals showed no differences in the size of the infarct area and in the left ventricular metabolic volume. Therefore, the role of *Retnla*-expressing cells could not be conclusively explained in the DT model.

The depletion of neutrophil granulocytes does not appear to have any influence on the population of *Retnla*-expressing macrophages. An analysis with the flow cytometer revealed no differences in the percentage distribution of *Retnla*-expressing macrophages after transient LAD ligation in the myocardial infarction model.

In order to clearly clarify the function of the Retnla-expressing macrophages in myocardial infarction, the mouse line Retnla-CreRs26TomatoPu.1^{flox / flox} should be used in the future.

Clarifying the importance of specific macrophage populations could contribute to a deeper understanding of cardiac inflammatory processes and lead to the development of targeted anti-inflammatory therapies.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. Bansilal, S., J.M. Castellano, and V. Fuster, *Global burden of CVD: focus on secondary prevention of cardiovascular disease*. *Int J Cardiol*, 2015. **201 Suppl 1**: p. S1-7.
2. Bundesamt, S. 2019 [cited 2021 06.06.2021]; Available from: <https://www.genesis.destatis.de/genesis/online?sequenz=tabelleErgebnis&selectio nname=23211-0002#abreadcrumb>.
3. Boateng, S. and T. Sanborn, *Acute myocardial infarction*. *Dis Mon*, 2013. **59(3)**: p. 83-96.
4. Zhao, Z.Q., et al., *Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death*. *Cardiovasc Res*, 2000. **45(3)**: p. 651-60.
5. Zhao, Z.Q., et al., *Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion*. *Apoptosis*, 2001. **6(4)**: p. 279-90.
6. Sutton, M.G. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy*. *Circulation*, 2000. **101(25)**: p. 2981-8.
7. Frangogiannis, N.G., *The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodeling*. *Nat Rev Cardiol*, 2014. **11(5)**: p. 255-65.
8. Jung, K., et al., *Endoscopic time-lapse imaging of immune cells in infarcted mouse hearts*. *Circ Res*, 2013. **112(6)**: p. 891-9.
9. Lee, W.W., et al., *PET/MRI of inflammation in myocardial infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 2012. **59(2)**: p. 153-63.

10. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 3037-47.
11. Shiraishi, M., et al., *Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart*. J Clin Invest, 2016. **126**(6): p. 2151-66.
12. Steppan, C.M., et al., *A family of tissue-specific resistin-like molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(2): p. 502-6.
13. Metchnikoff, E., *Immunity in Infective Diseases (Transl. from the French by Francis G. Binnie)*. Cambridge University Press, 1905.
14. Gordon, S., *Elie Metchnikoff: father of natural immunity*. Eur J Immunol, 2008. **38**(12): p. 3257-64.
15. L., A., *Das reticulo-endotheliale System*. Kraus F. et al. (eds) Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde. Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde. Vol. 26. 1924: Springer, Berlin, Heidelberg.
16. Yona, S. and S. Gordon, *From the Reticuloendothelial to Mononuclear Phagocyte System - The Unaccounted Years*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 328.
17. van Furth, R., et al., *The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells*. Bull World Health Organ, 1972. **46**(6): p. 845-52.
18. 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.

19. 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.
20. Schulz, C., et al., *A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells*. *Science*, 2012. **336**(6077): p. 86-90.
21. Mantovani, A., et al., *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling*. *J Pathol*, 2013. **229**(2): p. 176-85.
22. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. *Trends Immunol*, 2004. **25**(12): p. 677-86.
23. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Orchestration of metabolism by macrophages*. *Cell Metab*, 2012. **15**(4): p. 432-7.
24. Cassetta, L., E. Cassol, and G. Poli, *Macrophage polarization in health and disease*. *ScientificWorldJournal*, 2011. **11**: p. 2391-402.
25. Locati, M., A. Mantovani, and A. Sica, *Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity*. *Adv Immunol*, 2013. **120**: p. 163-84.
26. Murray, P.J., *Macrophage Polarization*. *Annu Rev Physiol*, 2017. **79**: p. 541-566.
27. Murray, P.J., et al., *Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines*. *Immunity*, 2014. **41**(1): p. 14-20.
28. Bashir, S., et al., *Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases*. *Inflamm Res*, 2016. **65**(1): p. 1-11.

29. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(4): p. 557-63.
30. Sica, A., et al., *Macrophage polarization in pathology*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(21): p. 4111-26.
31. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
32. Wang, N., H. Liang, and K. Zen, *Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 614.
33. Porta, C., et al., *Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation*. Semin Immunol, 2015. **27**(4): p. 237-48.
34. Kurowska-Stolarska, M., et al., *IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation*. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6469-77.
35. Braga, T.T., J.S. Agudelo, and N.O. Camara, *Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 602.
36. Jetten, N., et al., *Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo*. Angiogenesis, 2014. **17**(1): p. 109-18.
37. Chua, C.L., et al., *Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology?* Trends Parasitol, 2013. **29**(1): p. 26-34.
38. Beschin, A., P. De Baetselier, and J.A. Van Ginderachter, *Contribution of myeloid cell subsets to liver fibrosis in parasite infection*. J Pathol, 2013. **229**(2): p. 186-97.

39. Tundup, S., L. Srivastava, and D.A. Harn, Jr., *Polarization of host immune responses by helminth-expressed glycans*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1253**: p. E1-E13.
40. Hinz, B., et al., *Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling*. Am J Pathol, 2012. **180**(4): p. 1340-55.
41. Belgiovine, C., et al., *Tumor-associated macrophages and anti-tumor therapies: complex links*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(13): p. 2411-24.
42. Qian, B.Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. Cell, 2010. **141**(1): p. 39-51.
43. Ruffell, B. and L.M. Coussens, *Macrophages and therapeutic resistance in cancer*. Cancer Cell, 2015. **27**(4): p. 462-72.
44. Schultze, J.L. and S.V. Schmidt, *Molecular features of macrophage activation*. Semin Immunol, 2015. **27**(6): p. 416-23.
45. Chistiakov, D.A., Y.V. Bobryshev, and A.N. Orekhov, *Changes in transcriptome of macrophages in atherosclerosis*. J Cell Mol Med, 2015. **19**(6): p. 1163-73.
46. Sica, A., et al., *Macrophage polarization in tumour progression*. Semin Cancer Biol, 2008. **18**(5): p. 349-55.
47. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 453-61.
48. Zizzo, G., et al., *Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction*. J Immunol, 2012. **189**(7): p. 3508-20.

49. Haskó, G., et al., *Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors*. *Pharmacol Ther*, 2007. **113**(2): p. 264-75.
50. Pinhal-Enfield, G., et al., *An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors*. *Am J Pathol*, 2003. **163**(2): p. 711-21.
51. Gerstmayer, B., et al., *Identification of RELMgamma, a novel resistin-like molecule with a distinct expression pattern*. *Genomics*, 2003. **81**(6): p. 588-95.
52. Ghosh, S., et al., *The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin: functional implications*. *Gene*, 2003. **305**(1): p. 27-34.
53. Horsnell, W.G.C. and B.G. Dewals, *RELMs in the Realm of Helminths*. *Trends Parasitol*, 2016. **32**(7): p. 512-514.
54. Teng, X., et al., *FIZZI/RELMalpha, a novel hypoxia-induced mitogenic factor in lung with vasoconstrictive and angiogenic properties*. *Circ Res*, 2003. **92**(10): p. 1065-7.
55. Lee, M.R., et al., *Retnla overexpression attenuates allergic inflammation of the airway*. *PLoS One*, 2014. **9**(11): p. e112666.
56. Holcomb, I.N., et al., *FIZZI, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family*. *EMBO J*, 2000. **19**(15): p. 4046-55.
57. Loke, P., et al., *IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype*. *BMC Immunol*, 2002. **3**: p. 7.
58. Stutz, A.M., et al., *The Th2 cell cytokines IL-4 and IL-13 regulate found in inflammatory zone 1/resistin-like molecule alpha gene expression by a STAT6 and*

CCAAT/enhancer-binding protein-dependent mechanism. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 1789-96.

59. Nair, M.G., et al., *Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 385-94.

60. Raes, G., et al., *Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(4): p. 597-602.

61. Jenkins, S.J., et al., *Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation*. Science, 2011. **332**(6035): p. 1284-8.

62. Cook, P.C., et al., *Alternatively activated dendritic cells regulate CD4+ T-cell polarization in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(25): p. 9977-82.

63. Pine, G.M., H.M. Batugedara, and M.G. Nair, *Here, there and everywhere: Resistin-like molecules in infection, inflammation, and metabolic disorders*. Cytokine, 2018. **110**: p. 442-451.

64. Gieseck, R.L., 3rd, M.S. Wilson, and T.A. Wynn, *Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(1): p. 62-76.

65. Martins, V., et al., *FIZZ1-induced myofibroblast transdifferentiation from adipocytes and its potential role in dermal fibrosis and lipoatrophy*. Am J Pathol, 2015. **185**(10): p. 2768-76.

66. Knipper, J.A., et al., *Interleukin-4 Receptor alpha Signaling in Myeloid Cells Controls Collagen Fibril Assembly in Skin Repair*. Immunity, 2015. **43**(4): p. 803-16.

67. Raes, G., et al., *FIZZ1 and Ym as tools to discriminate between differentially activated macrophages*. Dev Immunol, 2002. **9**(3): p. 151-9.
68. Alpert, J.S., et al., *Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(3): p. 959-69.
69. Swirski, F.K. and M. Nahrendorf, *Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(12): p. 733-744.
70. van der Laan, A.M., et al., *Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir*. Eur Heart J, 2014. **35**(6): p. 376-85.
71. Ye, Y.X., et al., *Monitoring of monocyte recruitment in reperfused myocardial infarction with intramyocardial hemorrhage and microvascular obstruction by combined fluorine 19 and proton cardiac magnetic resonance imaging*. Circulation, 2013. **128**(17): p. 1878-88.
72. Troidl, C., et al., *Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(9b): p. 3485-96.
73. van Amerongen, M.J., et al., *Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice*. Am J Pathol, 2007. **170**(3): p. 818-29.
74. Frantz, S., et al., *Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction*. Faseb j, 2013. **27**(3): p. 871-81.

75. Sahul, Z.H., et al., *Targeted imaging of the spatial and temporal variation of matrix metalloproteinase activity in a porcine model of postinfarct remodeling: relationship to myocardial dysfunction*. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2011. **4**(4): p. 381-91.
76. Swirski, F.K. and M. Nahrendorf, *Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure*. *Science*, 2013. **339**(6116): p. 161-6.
77. Swirski, F.K., et al., *Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites*. *Science*, 2009. **325**(5940): p. 612-6.
78. Dewald, O., et al., *CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts*. *Circ Res*, 2005. **96**(8): p. 881-9.
79. Frangogiannis, N.G., *Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis*. *Inflamm Res*, 2004. **53**(11): p. 585-95.
80. Shi, C., et al., *Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands*. *Immunity*, 2011. **34**(4): p. 590-601.
81. Zougari, Y., et al., *B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction*. *Nat Med*, 2013. **19**(10): p. 1273-80.
82. Horckmans, M., et al., *Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype*. *Eur Heart J*, 2017. **38**(3): p. 187-197.
83. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac*

remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(3): p. 569-82.

84. Anand, I.S., et al., *Noninvasive assessment of left ventricular remodeling: concepts, techniques, and implications for clinical trials. J Card Fail*, 2002. **8**(6 Suppl): p. S452-64.

85. Heusch, G., et al., *Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. Lancet*, 2014. **383**(9932): p. 1933-43.

86. Zornoff, L.A., et al., *Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. Arq Bras Cardiol*, 2009. **92**(2): p. 150-64.

87. Wang, Y. and J.A. Hill, *Electrophysiological remodeling in heart failure. J Mol Cell Cardiol*, 2010. **48**(4): p. 619-32.

88. Coronel, R., et al., *Electrophysiological changes in heart failure and their implications for arrhythmogenesis. Biochim Biophys Acta*, 2013. **1832**(12): p. 2432-41.

89. de Jong, S., et al., *Biomarkers of myocardial fibrosis. J Cardiovasc Pharmacol*, 2011. **57**(5): p. 522-35.

90. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. Circulation*, 1990. **81**(4): p. 1161-72.

91. Laboratory, T.J. *Profile: C57BL/6J*. 03.09.2021]; Available from: <https://www.jax.org/strain/000664>.

92. Krljanac, B., et al., *RELMalpha-expressing macrophages protect against fatal lung damage and reduce parasite burden during helminth infection. Sci Immunol*, 2019. **4**(35).

93. Weiss, M., Nebendahl, *Haus- und Versuchstierpflege*. 2. Auflage ed. 2003, Stuttgart: Enke-Verlag.
94. Stein, M., et al., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 287-92.
95. Shintani, Y., et al., *IL-4 as a Repurposed Biological Drug for Myocardial Infarction through Augmentation of Reparative Cardiac Macrophages: Proof-of-Concept Data in Mice*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 6877.
96. Heidt, T., et al., *Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction*. Circ Res, 2014. **115**(2): p. 284-95.
97. Dick, S.A., et al., *Self-renewing resident cardiac macrophages limit adverse remodeling following myocardial infarction*. Nat Immunol, 2019. **20**(1): p. 29-39.
98. Weinberger, T., et al., *Ontogeny of arterial macrophages defines their functions in homeostasis and inflammation*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 4549.
99. Kim, Y.S., et al., *The adipokine Retnla deficiency increases responsiveness to cardiac repair through adiponectin-rich bone marrow cells*. Cell Death Dis, 2021. **12**(4): p. 307.
100. Carbone, F., et al., *Pathophysiological role of neutrophils in acute myocardial infarction*. Thromb Haemost, 2013. **110**(3): p. 501-14.
101. Soehnlein, O., et al., *Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1461-71.

-
102. Wan, E., et al., *Enhanced efferocytosis of apoptotic cardiomyocytes through myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase links acute inflammation resolution to cardiac repair after infarction*. *Circ Res*, 2013. **113**(8): p. 1004-12.
103. Fischer, J., et al., *Safeguard function of PU.1 shapes the inflammatory epigenome of neutrophils*. *Nat Immunol*, 2019. **20**(5): p. 546-558.

X. ABBILDUNGEN

<i>Abbildung 1: Immunzellaktivität im Verlauf eines Myokardinfarkts</i>	10
<i>Abbildung 2: Übersicht über die linke Koronararterie</i>	27
<i>Abbildung 3: Färbeprotokoll der histologischen Schnitte</i>	31
<i>Abbildung 4 : Injektionsregime Neutrophilendepletion</i>	32
<i>Abbildung 5: Injektionsregime Diphtherie-Toxin Gabe</i>	33
<i>Abbildung 6: Zellcluster von kardialen Immunzellen in der Single-Zell-RNA-Analyse</i>	37
<i>Abbildung 7: Lokalisation der Genexpression von Retnla in den Zellclustern</i> .	38
<i>Abbildung 8: Genexpressionslevel von Retnla in den verschiedenen Zellpopulationen in infarzierten und nicht infarzierten Mäuseherzen</i>	38
<i>Abbildung 9: Gating Strategie für die durchflusszytometrische Analyse des embryonalen Gewebes</i>	40
<i>Abbildung 10: Durchflusszytometrie von embryonalem Gewebe an Tag 14</i>	41
<i>Abbildung 11: In vivo Aufnahmen eines Embryos an Tag 16</i>	42
<i>Abbildung 12: Nachweis von Retnla-exprimierenden Zellen im kardialen Gewebe</i>	43
<i>Abbildung 13: Isotypenkontrolle der Antikörper in der histologischen Analyse</i>	44
<i>Abbildung 14: Gating Strategie für kardiale Makrophagen</i>	45
<i>Abbildung 15: tdTomato-positive Zellen in unterschiedlichen Organen</i>	46
<i>Abbildung 16: Gating Strategie des Blutes</i>	47
<i>Abbildung 17: Zellpopulationen im Blut unter Ruhebedingungen</i>	48
<i>Abbildung 18: Zeitverlaufskurve</i>	49
<i>Abbildung 19: Stimulation von Mäusen mit Interleukin-4</i>	50
<i>Abbildung 20: Charakterisierung der tdTomato-positiven Zellen im Myokardinfarkt an Tag 2 nach LAD-Ligatur</i>	52
<i>Abbildung 21: Absolute Zellzahl pro mg Herzgewebe der CD64+F4/80+ Makrophagenpopulation an Tag 2, 7 und 30 nach Myokardinfarkt</i>	53
<i>Abbildung 22: Charakterisierung der tdTomato-positiven Zellen im Myokardinfarkt an Tag 7 und 30 nach LAD-Ligatur</i>	54
<i>Abbildung 23: Absolute Zahlen der tdTomato-positiven Zellen in der Makrophagenpopulation an Tag 7 und 30 nach Myokardinfarkt</i>	55

Abbildung 24: Konfokale Aufnahme eines <i>Retnla</i>^{Cre+}<i>Rs26</i>^{tdTomato/+} Herzens an Tag 30 nach Myokardinfarkt.....	56
Abbildung 25: Blutpopulationen an Tag 2, 7 und 30 nach Myokardinfarkt	57
Abbildung 26: Quantifizierung der <i>Retnla</i>-exprimierenden Makrophagen (<i>CD64</i>+<i>F4/80</i>+) im Modell der AT2-Pumpe.....	59
Abbildung 27: Effizienz der DTR-Depletion unter Ruhebedingungen	60
Abbildung 28: Überlebenswahrscheinlichkeit von Mäusen mit Depletion <i>Retnla</i>-exprimierender Zellen unter Ruhebedingungen	61
Abbildung 29: Linksventrikuläres metabolisches Volumen (LVMV) in Mäusen mit Depletion <i>Retnla</i>-exprimierender Zellen	62
Abbildung 30: Größe des Infarktareals in Mäusen mit Depletion der <i>Retnla</i>-exprimierenden Zellen	63
Abbildung 31: Überlebenswahrscheinlichkeit in Mäusen mit Depletion der <i>Retnla</i>-exprimierenden Zellen bis 30 Tage nach der LAD-Ligatur.....	64
Abbildung 32: Effizienz der Anti-Ly6G Depletion in der Neutrophilenpopulation.....	65
Abbildung 33: Effizienz der Anti-Ly6G-Depletion in der <i>tdTomato</i>-positiven Neutrophilenpopulation.....	65
Abbildung 34: Quantifizierung <i>tdTomato</i>-positiver Makrophagen im Myokardinfarkt von Ly6G-depletierten Tieren.....	66

XI. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Verwendete FACS-Antikörper</i>	23
<i>Tabelle 2: Verwendete Enzyme</i>	23
<i>Tabelle 3: Verwendete Einstellungen für Gefrierschnitte am Kryotom</i>	29

XII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMI	akuter Myokardinfarkt
Retnla	Resistin-like alpha
RES	reticulo-endotheliales System
Th1	T-Helfer-Zellen Typ 1
IFN- γ	Interferon- γ
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
LPS	Lipopolysaccharide
IL-12	Interleukin-12
IL-6	Interleukin-6
COX-2	Cyclooxygenase-2
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin- Dinukleotid-Phospat
ROS	reactive oxygen species
Th2	T-Helfer-Zellen Typ 2
IL-4	Interleukin-4
IL-13	Interleukin-13
STAT6	signal transducer and activator of transcription 6
IL-4R α	IL-4 Rezeptor alpha
IL-10	Interleukin-10
Arg-1	Arginase-1
TGF- β	transforming growth factor beta
IL1-RII	Interleukin-1 II
IL1Ra	Interleukin-1 Rezeptor- Antagonisten
TLR- Agoniste n	Toll-artiger-Rezeptor- Agonisten
VEGF	vascular endothelial growth factor
RELM α	Resistin-like-molecule-alpha
FIZZ1	found in inflammatory zone

HIMF	Hypoxia-Induced Mitogenic Factor
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
α -SMA	alpha-smooth muscle actin
NGAL	neutrophil-derived lipocalin
PET	Positron-Emissions-Tomographie
FACS	fluorescence-activated cell sorting
SSC	sideward Scatter
FSC	forward Scatter
LAD	Left anterior descending artery
FDG	F-fluorodeoxyglucose
EKG	Elektrokardiogramm
DT	Diphtherie-Toxin
LVMV	linksventrikuläre metabolische Volumen
Mer-TK	myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase
AT-2	Angiotensin-II

XIII. DANKSAGUNG

Als Erstes möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Christian Schulz bedanken, der mir als Mentor stets unterstützend und beratend zur Seite stand und mir die Möglichkeit gegeben hat, in dieser Arbeitsgruppe forschen zu können.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. vet. Sven Reese für die Durchsicht und Einreichung dieser Doktorarbeit an der Tierärztlichen Fakultät.

Ich schätze mich glücklich, in dieser Arbeitsgruppe mitunter Freunde fürs Leben gefunden zu haben und möchte mich für die großartige Zusammenarbeit bedanken.

Ein besonderer Dank geht dabei an Dr. med. vet. Denise Messerer für ihre Motivation und aufbauenden Worte, sowie ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Larissa Belz bedanken, deren leckeres Essen (sponsored by Satendra thank you for that) und ausgleichende Art wesentlich zu meiner Motivation beigetragen haben.

Ich möchte mich auch herzlich bei Dr. med. vet. Susanne Sauer bedanken, die mir mit ihrer fachlichen Kompetenz und weisen Worten stets wegweisend war. Besonders möchte ich mich auch bei Dr. med. vet. Vanessa Wimmeler und Lulu Liu für die großartige Zusammenarbeit bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meine Lieblingsmedizinstudenten Inas Saleh und Larissa Mantoan für ihre aufmunternden Worte und sarkastischen Kommentare.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an Wanda Wendler, Filip Prica, Dominic van den Heuvel, Sara Elhag, Badr Kilani, Patrick Tanribil, Zeljka Sisic, Michael Lorenz und Anna Titova.

Außerhalb des Labors geht mein besonders herzlicher Dank an meine Eltern und meinen Bruder Felix für deren stetige Unterstützung und Liebe. Danke, dass ihr bei allem immer hinter mir steht.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mitbewohnerin Vanessa Alf, die des Öfteren meine Stimme der Vernunft war und ohne die meine Zeit in Großhadern nur halb so schön gewesen wäre.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen langjährigen Freunden Katrin von Schenkendorff, Ann-Kathrin Grüber, To-Nga Pham Thi, Stefan Drechsler, Betina Schmid, Jenny Schunck und Sigena Junker für ihre konstante Unterstützung bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an Julia Beischer, die mich stets aus der Ferne motiviert hat und mein SHINee Buddy in crime ist.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Versuchstieren bedanken, ohne die diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.