

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



# **Ontogenetische Herkunft und Bedeutung von Gewebemakrophagen im Herzinfarktmodell**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Sonja Christina Ablinger

aus  
München

Jahr  
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erster Gutachter: Prof. Dr. Christian Schulz  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Andreas Dendorfer  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Heiko Adler

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. vet. Denise Messerer  
Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen  
Prüfung: \_13.11.2024\_

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>Myokardinfarkt .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Gesellschaftliche Bedeutung der ischämischen Herzerkrankung.....	1
1.2.	Entstehung eines Myokardinfarkts .....	2
1.3.	Zelluläre Prozesse bei einem Myokardinfarkt.....	3
<b>2.</b>	<b>Ursprung und Funktion von Makrophagen.....</b>	<b>6</b>
2.1.	Ontogenetische Herkunft von Makrophagen.....	7
2.2.	Entwicklung der Makrophagen in überlappenden Wellen .....	8
2.3.	Erste Welle: Primitive Makrophagen .....	9
2.4.	Zweite Welle: Transiente definitive Makrophagen .....	10
2.5.	Dritte Welle: Definitive Makrophagen.....	12
<b>II.</b>	<b>ZIELSETZUNG.....</b>	<b>14</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>15</b>
<b>1.</b>	<b>Versuchstiere.....</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>Mauslinien .....</b>	<b>15</b>
2.1.	Rank <sup>Cre</sup> Rosa26 <sup>eYFP</sup> / Rank <sup>Cre</sup> Rosa26 <sup>RFP</sup> .....	15
2.2.	Flt3 <sup>Cre</sup> Rosa26 <sup>mTmG</sup> .....	16
2.3.	Csf1r <sup>FIRE</sup> und Csf1r <sup>FIRE</sup> Rank <sup>Cre</sup> Rosa26 <sup>YFP</sup> .....	16
2.4.	C57BL/6J.....	16
<b>3.</b>	<b>Inflammationsmodell Herzinfarkt .....</b>	<b>17</b>
<b>4.</b>	<b>Entnahme der Organe.....</b>	<b>18</b>
<b>5.</b>	<b>Durchflusszytometrie .....</b>	<b>19</b>
5.1.	Prinzip der Durchflusszytometrie .....	19
5.2.	Aufbereitung des Blutes .....	19
5.3.	Aufbereitung der Organe .....	20
5.4.	Färbung und Vorbereitung zur durchflusszytometrischen Analyse .....	21
5.5.	Gating und Auswertung.....	22
<b>6.</b>	<b>Histologie .....</b>	<b>23</b>
6.1.	Anfertigen von Gefrierschnitten.....	23
6.2.	Sirius Red/Fast Green .....	23
6.2.1.	Histologischer Hintergrund .....	23
6.2.2.	Durchführung der Sirius Red/Fast Green-Färbung.....	23

6.3.	Immunfluoreszenz .....	24
6.3.1.	Prinzip der Immunfluoreszenz.....	24
6.3.2.	Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung .....	25
6.4.	Aufnahme und histologische Auswertung.....	27
6.5.	Vergleich der Färbemethoden .....	29
<b>7.</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>29</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>30</b>
<b>1.</b>	<b>Verteilung kardialer Makrophagen unter Ruhebedingungen .....</b>	<b>30</b>
<b>2.</b>	<b>Verteilung Dottersack abstammender Makrophagen in kardialer Inflammation.....</b>	<b>32</b>
<b>3.</b>	<b>Verteilung Knochenmark abstammender Makrophagen in kardialer Inflammation.....</b>	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>Verteilung Knochenmark abstammender Makrophagen im Verlauf nach I/R.....</b>	<b>35</b>
<b>5.</b>	<b>Makrophagenpopulation im FIRE-Modell nach I/R .....</b>	<b>38</b>
<b>6.</b>	<b>Einfluss residenter Makrophagen auf die Infarktnarbe nach I/R .....</b>	<b>42</b>
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>46</b>
<b>1.</b>	<b>Kardiale Gewebemakrophagen stammen größtenteils aus dem Dottersack .....</b>	<b>46</b>
<b>2.</b>	<b>Nach akuter I/R wandern vermehrt Knochenmark-Makrophagen ein .....</b>	<b>48</b>
<b>3.</b>	<b>Knochenmark-Makrophagen dominieren die Infarktzone im Verlauf.....</b>	<b>49</b>
<b>4.</b>	<b>Im FIRE-Modell verändert sich die Makrophagenpopulation nach I/R .....</b>	<b>50</b>
<b>5.</b>	<b>Die Abwesenheit residenter Makrophagen hat keinen Einfluss auf die Infarktnarbengröße.....</b>	<b>52</b>
<b>6.</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>54</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>56</b>
<b>VII.</b>	<b>ABSTRACT (English) .....</b>	<b>58</b>
<b>VIII.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>59</b>
<b>IX.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>60</b>
<b>X.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>61</b>
<b>XI.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>63</b>
<b>XII.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>80</b>

<b>XIII. AFFIDAVIT .....</b>	<b>81</b>
<b>XIV. PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>82</b>

# I. EINLEITUNG

## 1. Myokardinfarkt

### 1.1. Gesellschaftliche Bedeutung der ischämischen Herzerkrankung

Die ischämische Herzkrankheit (IHK) und ihre Folgen verursachen mehr Tode und Morbidität in der westlichen Gesellschaft als jede andere Gruppe von Erkrankungen (1). Etwa sechzehn Prozent aller Todesfälle weltweit sind darauf zurückzuführen (2). Positiverweise konnte die altersadjustierte Inzidenz und Mortalität seit den 1980er Jahren durch verbesserte Prävention und Interventionsmöglichkeiten gesenkt werden (1, 3). Aufgrund einer stetig wachsenden Bevölkerung und eines alternden Patientenlientels steigen die absoluten Zahlen jedoch jährlich weiterhin an (3, 4) und stellen das Gesundheitssystem auch aus einer wirtschaftlichen Perspektive vor enorme Herausforderungen. In den USA wurde in den Jahren 2010 bis 2040 von einer Kostensteigerung von 41 % auf 126.2 Milliarden US-Dollar ausgegangen, verursacht durch die IHK (5). Ebenso folgte die damit verbundene Krankheitsbelastung der Bevölkerung einem steigenden Trend. Diese wird in sogenannten DALY's (*disability-adjusted life years*) angegeben, und ist ein Maß für verloren gegangene Lebensjahre durch vorzeitigen Tod oder Erkrankung beziehungsweise Behinderung (6, 7). Im Jahr 2019 wurde die sogenannte *Burden of Disease* weltweit auf 182 Millionen DALYs allein durch ischämische Herzkrankheiten geschätzt (4).

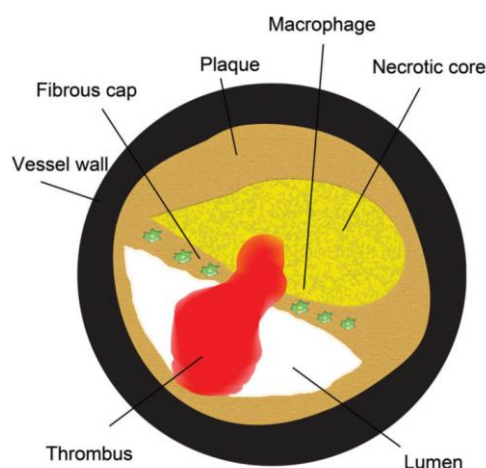
Die IHK, auch als koronare Herzkrankheit bezeichnet, schließt dabei eine Gruppe von Krankheiten ein, bei der es durch Ischämie zu einer Unterversorgung des Herzgewebes mit Sauerstoff kommt (8). Die klinisch relevanteste Form ist der Myokardinfarkt (MI), welcher meist eine akute Intervention erfordert. Mindestens ein Drittel der Patienten mit akutem MI sterben bereits vor Erreichen des Krankenhauses, weitere 5-10 % im Laufe der Behandlung (9). So verstarben im Jahr 2020 allein in Deutschland 44529 Personen unmittelbar an einem MI (10). Durch Koronarintervention mittels Ballondilatation und Stentimplantation konnte zwar die akute Mortalität gesenkt werden (3), die Langzeitfolgen sind jedoch oft schwer und können die Lebensqualität erheblich beeinträchtigen (11). Neben einem erhöhten Reinfarkt-Risiko treten beispielsweise

dyskinetische Störungen des Herzmuskels, ventrikuläre Aneurysmen bis hin zu kongestivem Herzversagen auf (12, 13).

Die steigende Prävalenz ischämischer Herzerkrankungen stellt eine erhebliche Herausforderung für das Gesundheitssystem dar. Neben der Umsetzung von Präventions- und Behandlungsmöglichkeiten ist ein tieferes Verständnis der grundlegenden Entzündungsprozesse essenziell, um wissenschaftliche Erkenntnisse zu vertiefen und neue Ansätze in der medizinischen Behandlung zu erlangen.

## 1.2. Entstehung eines Myokardinfarkts

Bei einem Myokardinfarkt werden ein oder mehrere Koronargefäße teilweise oder komplett verschlossen, wodurch es zu einer Minderversorgung des Gewebes mit sauerstoffreichem Blut kommt. Die universelle Definition eines MI wurde von der *European Society of Cardiology* festgelegt (14). In den meisten Fällen entsteht dieser durch thrombotische Komplikationen bei koronarer Atherosklerose (15). Durch eine Plaqueruptur in einem der Koronargefäße wird die Bildung eines Thrombus getriggert (siehe Abbildung 1) (16).



### Abbildung 1: Entstehung eines Myokardinfarkts

Die Ruptur einer vulnerablen Plaque bedingt die Bildung eines Thrombus, welcher das Koronargefäß ganz oder teilweise verschließen kann. Atherosklerotische Plaques werden dabei oft mit vasalen Entzündungsprozessen, Aktivierung der Makrophagen in der fibrösen Kappe sowie proteolytischem Abbau der Gefäßmatrix assoziiert. (17)

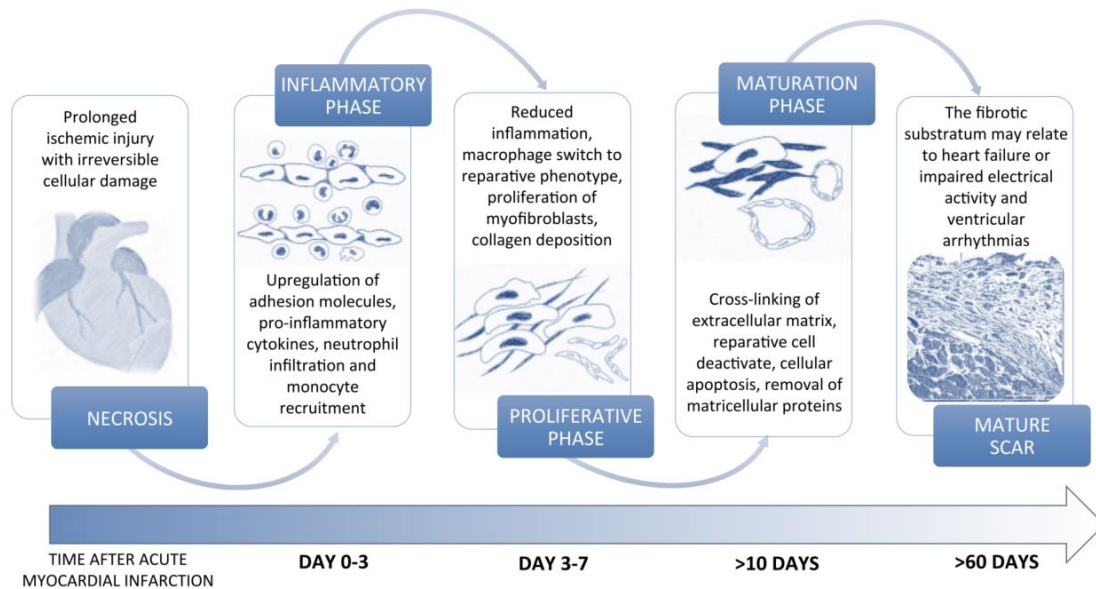
Mit freundlicher Genehmigung des Copyright Clearance Centers und John Wiley and Sons, Inc. Copyright © 2015

Der akute Sauerstoffmangel bedingt bereits nach wenigen Sekunden erhebliche Einschränkungen der systolischen Schlagfunktion (17), welche sich in typischen Symptomen (18) äußern können. Nach dem Prinzip „*time is muscle*“ ist das primäre Ziel demnach die schnellstmögliche Wiedereröffnung des thrombotischen Gefäßes. Eine rekanalisierende Intervention kann das Überleben sowie das Ausmaß der kardialen Nekrose nachweislich verbessern (19, 20). Aus pathologischer Sicht sind bereits nach wenigen Minuten ultrastrukturelle Veränderungen des Myokards erkennbar. Das Sauerstoffdefizit führt zu einem abrupten Absterben der Kardiomyozyten (17). Wird die Perfusion frühzeitig wieder hergestellt, gelangen Immunzellen aus dem Blut schnell an den Ort der Entstehung und können nekrotische Zellen zeitnah entfernen. Hält der Zustand des Sauerstoffmangels an, entstehen dagegen strukturelle Gewebeveränderungen in Form einer ischämischen Verletzung (21). Nachdem die kritische Phase der Ischämie von 20 Minuten überschritten ist, kommt es zu einem unumkehrbaren, transmuralen Zellverlust, welcher sich wie eine „Wellenfront“ subendokardial bis zum Epikard ausbreitet (22). Beim Menschen können bei einem großen Infarkt über eine Million Zellen zu Grunde gehen. In der Infarktregion sterben die meisten Kardiomyozyten innerhalb der ersten 24 Stunden durch Nekrose oder programmierten Zelltod, die Apoptose. Durch den biochemischen Stress kommt es zu späteren Zeitpunkten zu einer zweiten Welle an Zellsterben, wenn auch weniger intensiv als direkt nach MI (17). Die Zeit der Okklusion korreliert dabei mit der Infarktgröße (22). Eine Aktivierung von interstitiellen Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen und Immunzellen wird durch die höhere Toleranz an Sauerstoffmangel durch Mediatoren der abgestorbenen Myozyten suggeriert. Es entsteht eine intensive Entzündungsreaktion des kardialen Gewebes, welches im Anschluss verschiedene Stadien der Heilung durchläuft (17).

### **1.3. Zelluläre Prozesse bei einem Myokardinfarkt**

Nach einem Herzinfarkt unterzieht sich das Myokard komplexen pathologischen Veränderungen, welche Größe, Architektur und Funktion betreffen – dem sogenannten Remodeling (23, 24). Der Heilungsprozess lässt sich grob in drei Phasen einteilen: Inflammation, Reparatur und Ausreifung des Narbengewebes (siehe Abbildung 2). Das Ausmaß ist dabei von Art und Umfang des Infarkts abhängig.





### Abbildung 2: Heilungsphasen nach einem Myokardinfarkt

Nach einem ischämischen Ereignis wird der Heilungsprozess in drei Phasen unterteilt, bis ein ausgereiftes Narbengewebe entsteht: eine inflammatorische Phase (Tag 0-3), eine proliferative Phase (Tag 3-7) und eine Reifungsphase (>Tag 10). (25)

Mit freundlicher Genehmigung durch Creative Commons Attribution License (CC BY) und Lizenznehmer MDPI, Basel. Copyright © 2021 durch die Autoren.

Zu Beginn der Inflammation werden durch die nekrotischen Zellen und extrazelluläre Matrix (EZM) sogenannte *danger signals* ausgeschüttet, welche das angeborene Immunsystem aktivieren und die Entzündungsreaktion dadurch verstärken (26). Makrophagen und dendritische Zellen spielen in der Initiationsphase eine wichtige Rolle, indem sie diese aufnehmen und durch anschließende Antigenpräsentation weitere Immunzellen rekrutieren (27). Es folgt eine komplexe Antwort des Immunsystems, charakterisiert durch extensive Zellinfiltration sowie Degradation der EZM. Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und weitere Leukozyten schütten dabei eine Mischung aus proinflammatorischen Zytokinen aus, welche ihrerseits eine Inflammation amplifizieren und zur Zellaktivierung und weiteren Rekrutierung beitragen (28). Matrixproteine und Bestandteile des Fibrin-basierten, provisorisch gebildeten Gewebes stehen dabei in wechselseitiger Beziehung mit den Immun- und Endothelzellen (29). Neutrophile Granulozyten beseitigen Zelltrümmer, Bestandteile der EZM und schütten proteolytische Enzyme aus (30). Außerdem begünstigen sie einen Übergang in die nächste Phase der Heilung (25). Dabei können Neutrophile die Zytokinausschüttung von Makrophagen und Monozyten stimulieren und so reparative Prozesse fördern (30, 31).

Makrophagen, die sich aus den einströmenden Monozyten differenzieren, sind in zwei unterschiedlichen Phänotypen involviert: proinflammatorische M1-Makrophagen (Ly6C<sup>high</sup>) und M2-Makrophagen mit antiinflammatorischen Eigenschaften (Ly6C<sup>low</sup>), welche die Gewebefibrosierung unterstützen (32). In dieser ersten akuten Phase tragen Monozyten und M1-Makrophagen neben der Zellrekrutierung maßgeblich zum Abbau und Phagozytose von nekrotischem Zellmaterial bei (25, 28). Durch diese Abtragungsprozesse ebnen sie den Weg für Granulationsgewebe der folgenden Phase (25).

Nach etwa drei Tagen folgt der Übergang in die zweite, proliferative Phase, in der sich eine transiente Infarktnarbe bildet. Hier werden nun vermehrt antiinflammatorische Zytokine sezerniert, durch welche Gewebebildung fördernde Prozesse begünstigt werden. Die neutrophilen Granulozyten begehen Apoptose (17). Ly6C<sup>low</sup> Monozyten akkumulieren, M1-Makrophagen alternieren zu M2-Makrophagen und sezernieren reparative Mediatoren (33). Diese fördern die Fibroblastendifferenzierung, Kollagenproduktion und Transformation der EZM (32, 34). Auch Mastzellen, T-Zellen und Proteine der EZM nehmen Einfluss auf den Heilungsprozess und beeinflussen mit ihren Zytokinen die Bildung des Narbengewebes (25). Die vorerst Fibrin-basierte Verletzung wird durch eine provisorische Gewebsnarbe abgelöst. Fibroblasten proliferieren und synthetisieren vermehrt Bestandteile der Matrix (17, 29). Ein mikrovaskuläres Netzwerk wird gebildet (29). Durch dynamisch exprimierte Proteine der EZM sowie den *transforming growth factor* (TGF $\beta$ ) wird außerdem die Differenzierung der Fibroblasten in Myofibroblasten gefördert. Diese produzieren große Mengen an Kollagen, welche absolut notwendig für die Bildung einer stabilen Infarktnarbe sind (35). In der letzten Phase maturiert das transient gebildete Gewebe und ein Netzwerk aus strukturellen Matrixproteinen formt die definitive Infarktnarbe. Strukturen der EZM vernetzen sich und stabilisieren das Narbengewebe, die Immunzellen der zweiten Phase begehen Apoptose (25). Die Anzahl der aktivierten Myofibroblasten wird reduziert (36) und die matrizellulären Proteine entfernt (25). Die Fibrosebildung nach Myokardinfarkt kann neben der Bildung von Ersatzgewebe auch das zuvor nicht betroffene Herzgewebe befallen und wird dann als „reaktive Fibrose“ bezeichnet. Bei erhöhtem post-MI Stress kann sich die maladaptive Gewebeveränderung hier reaktiv in die umliegenden

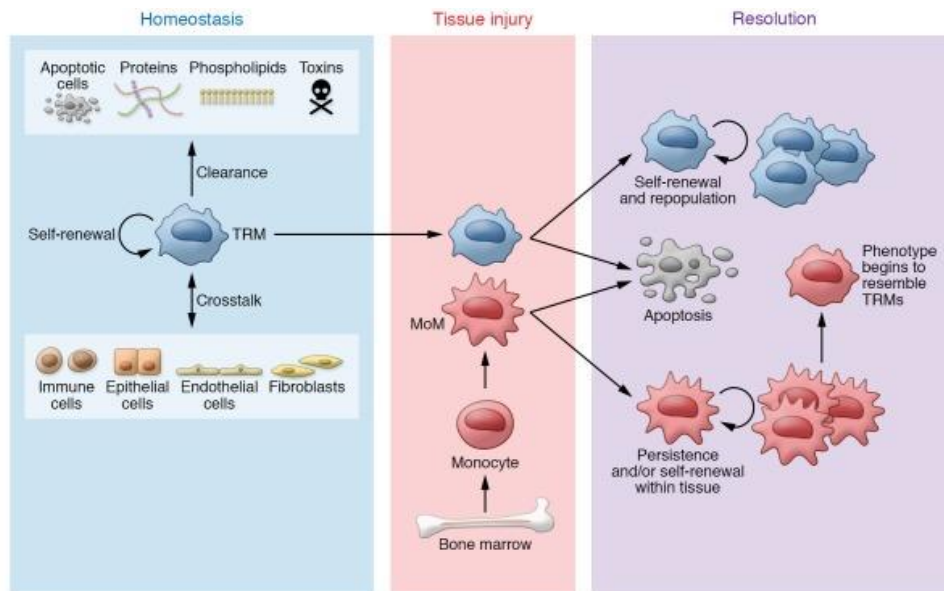
MI-Bereiche bis hin zu gesundem Myokard ausweiten, eine interstitielle Fibrose bilden und die kardiale Funktion stören (35).

Ein Ungleichgewicht der beteiligten Faktoren in allen Phasen kann dabei zu einem ungünstigen Ergebnis führen. Eine suffiziente Heilung hängt dabei maßgeblich von der Aktivierung der Matrix-Metalloproteasen, profibrotischen Faktoren und der Kollagenproduktion ab (24). Bei einem Ungleichgewicht der Zelleninteraktion durch Interleukine, beispielsweise IL-1, kann die Immunantwort und somit das Remodeling bedeutend beeinflusst werden (37). Ein verminderter Kollagenabbau führt zu einer steifen Infarkt Narbe, welche die Compliance und damit Funktion des Ventrikels limitiert (37). Im Gegensatz dazu kann eine insuffiziente Kollagenbildung, welche in direkter Korrelation mit der Makrophagenkonzentration steht (38), eine instabile Infarkt Narbe bilden und zu einer kompensierenden Ventrikeldilatation bis Wandruptur führen (39). Makrophagen scheinen hier eine Schlüsselrolle in der Wundheilung nach MI zu spielen. In Mausmodellen mit einer Makrophagendepletion konnte neben vermehrter Dilatation und ausgedünntem Myokard auch eine höhere Mortalitätsrate beobachtet werden (40). Im Folgenden soll nun genauer auf die allgemeine Funktion und den Ursprung der Makrophagen eingegangen werden.

## **2. Ursprung und Funktion von Makrophagen**

Makrophagen kommen in unterschiedlicher Anzahl in nahezu allen Geweben vor (41). In ihrer Relevanz für Homöostase und Immunabwehr wurden die amöboiden Zellen erstmals von Metchnikow (1845-1916) beschrieben (42-44), dem sogenannten „Vater der angeborenen und zellulären Immunität“ (42). Er bezeichnete die phagozytierenden Zellen als „große Fresser“ (von altgriechisch phagein = fressen, makros = groß) (44), wobei sich der Begriff Makrophage durchgesetzt und bis heute gehalten hat. Van Furth und Cohn klassifizierten in den 1970er Jahren Gewebemakrophagen als Teil des von ihnen etablierten „mononukleären Phagozytensystems“, zu dem auch die im Blut zirkulierenden Monozyten und deren Vorläuferzellen gehören (45). Makrophagen können durch Phagozytose mikrobielle Organismen, Zelltrümmer und ähnlich große Partikel aufnehmen und abbauen (46, 47). Sie sind Teil des angeborenen Immunsystems, erhalten die Gewebhomöostase und spielen eine Schlüsselrolle in der Bekämpfung von

Pathogenen und Reparaturmechanismen nach Verletzungen (siehe Abbildung 3) (48). Dabei zeigen sie eine bemerkenswerte Plastizität und passen sich durch ihr epigenetisches Repertoire an ihre jeweilige Mikroumgebung an (48, 49). Auch bereits in der Entwicklung spielen sie in vielen Organen bei Differenzierungsprozessen eine große Rolle, beispielweise bei der E nukleation von primitiven Erythrozyten in der fetalen Leber (50) oder Förderung der Spermiodifferenzierung im Mäusehoden (51).



### Abbildung 3: Funktion der Makrophagen

Gewebemakrophagen (TRM) haben die Fähigkeit der Selbsterneuerung und sind mit für die Homöostase verantwortlich. Sie beseitigen abgestorbene Zellen, Proteine, Phospholipide und reagieren auf Toxine und Pathogene in ihrer lokalen Mikroumgebung. Außerdem kommunizieren sie mit anderen Zellen. Durch Stimulationsfaktoren fördern sie die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung einer Reihe von Immun-, Epithel-, Endothelzellen und Fibroblasten, welche für die Regulation des Gewebes zuständig sind (linkes Feld). Bei einer Verletzung werden Makrophagen über das Blut vermehrt durch Monozyten aus dem Knochenmark rekrutiert (MoM = Monozyten abstammende Makrophagen), um zum Ort der Entzündung zu gelangen (mittleres Feld). Im Gewebe haben die MoM und TRM unterschiedliche Funktionen, können sich teilweise selbst erneuern oder begehen Apoptose. MoM können sich phänotypisch ebenfalls den residenten Gewebemakrophagen annähern (rechtes Feld). (52)

Mit freundlicher Genehmigung des Copyright Clearance Centers und American Society for Clinical Investigation, Copyright © 2019

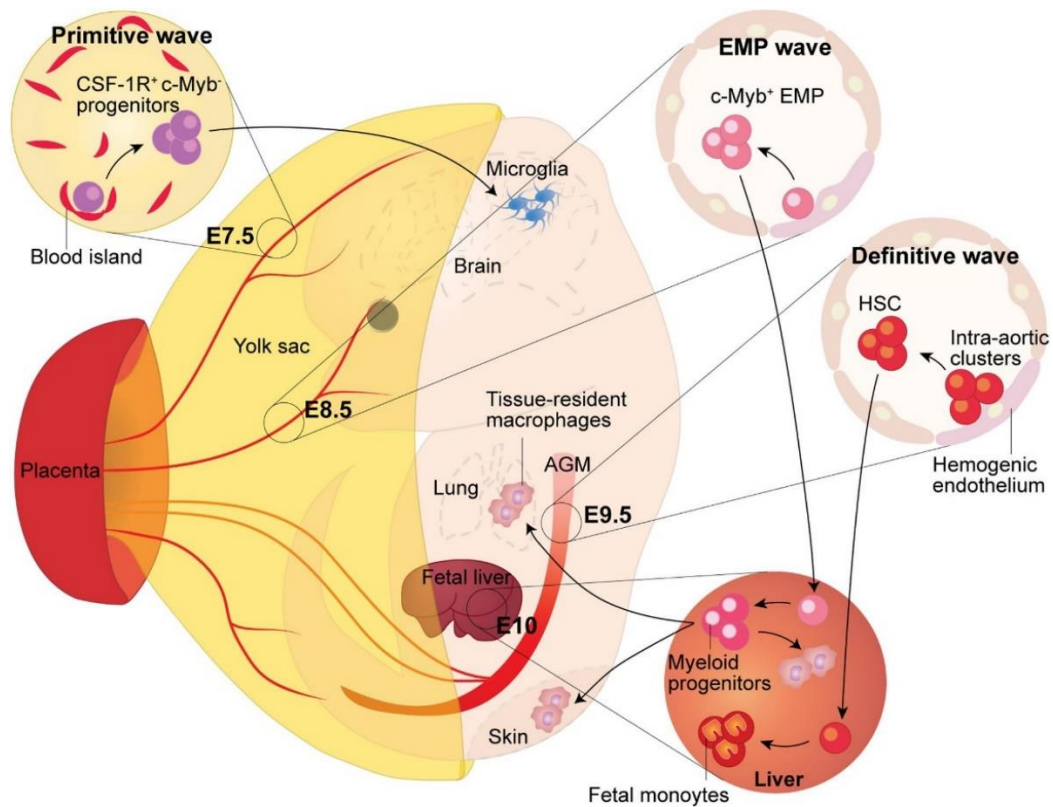
### 2.1. Ontogenetische Herkunft von Makrophagen

Bereits 1984 kamen Van Furth und Kollegen zu dem Schluss, dass Makrophagen in der Milz sich teilweise durch Proliferation selbst erneuerten oder teilweise direkt von im Blut

zirkulierenden Monozyten stammten, welche kurz zuvor das Knochenmark (KM) verlassen hatten (53). Alliot et al. berichteten 1999 von Makrophagen aus dem Dottersack (DS), in diesem Fall Mikroglia, welche sich bereits ab Tag 8 der embryonalen Entwicklung im Gehirn nachweisen ließen und *in situ* proliferierten (54). Dies ließ bereits eine zweigeteilte Herkunft der Makrophagen vermuten. Über die genaue Entwicklung herrschte jedoch lange Uneinigkeit. Primär wurde davon ausgegangen, dass Gewebemakrophagen sich durch gemeinsame Monozytenvorläufer aus dem blutbildenden Knochenmark entwickelten (55-57). Erst in der letzten Dekade konnte ein dualer Ursprung durch genetische Abstammungsanalyse, sogenannte *Fate mapping* und *Lineage tracing* Modelle, belegt werden (58-61). Hierbei wurde der embryonale Ursprung muriner Makrophagen sowie deren Entwicklung von Vorläuferzellen genauer analysiert. Während sich ein Teil der Makrophagen, wie zuvor angenommen, aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) aus dem Knochenmark entwickelt, stammt ein separater Teil aus dem Dottersack, wandert früh in der Entwicklung in die Zielgewebe ein und besteht durch Proliferation und Selbsterneuerung bis ins adulte Alter (59-62).

## **2.2. Entwicklung der Makrophagen in überlappenden Wellen**

Makrophagen sind hämatopoetische, myeloische Zellen und bilden sich simultan zu erythroiden Vorläufern, den potenziell blutbildenden Zellen des Embryos. Die Entwicklung von DS-Makrophagen war und ist Gegenstand intensiver Forschung und wird häufig in Form von sich überlappenden Wellen beschrieben (63-68). Durch räumliche und zeitliche Überschneidungen ist eine klare Abgrenzung oft nicht ganz eindeutig. Im Folgenden wird genauer auf die Entwicklung in drei definierten Wellen eingegangen, wobei sich die ersten beiden durch Vorläuferzellen aus dem Dottersack begründen. Makrophagen einer dritten Welle werden durch hämatopoetische Stammzellen generiert (siehe Abbildung 4).



#### Abbildung 4: Fetale Entwicklung von Makrophagen

Hier werden die drei Wege der murinen Makrophagenentwicklung dargestellt: Zuerst entsteht die primitive Welle der extraembryonalen *Blood Islands* im Dottersack ab Tag der Embryonalentwicklung (E)7.5. Die Vorläuferzellen sind hier  $CSF-1R^+ c-Myb^-$  und bilden die adulten Mikroglia des Gehirns. Es folgt die zweite Welle, ab E8.5 werden erythroide und myeloide Vorläuferzellen (EMPs) ebenfalls im hämogenen Endothel des Dottersacks gebildet, welche  $c-myb^+$  sind. Es entstehen lokale Dottersack-Makrophagen sowie, mit Beginn der Blutzirkulation, Populationen in der Leber und weiteren embryonalen Organen. Später bilden Makrophagen dieser Welle einen Teil der residenten Gewebemakrophagen. Vorläuferzellen der dritten Welle entwickeln sich von HSC aus der AGM-Region ab E9.5. Die HSC stellen den Hauptteil der fetalen Hämatopoese sowie die proliferativen Stammzellen des adulten Knochenmarks. (68)

Mit freundlicher Genehmigung durch Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0) und Lizenznehmer Frontiers in Cell and Developmental Biology. Copyright © 2021 durch die Autoren.

### 2.3. Erste Welle: Primitive Makrophagen

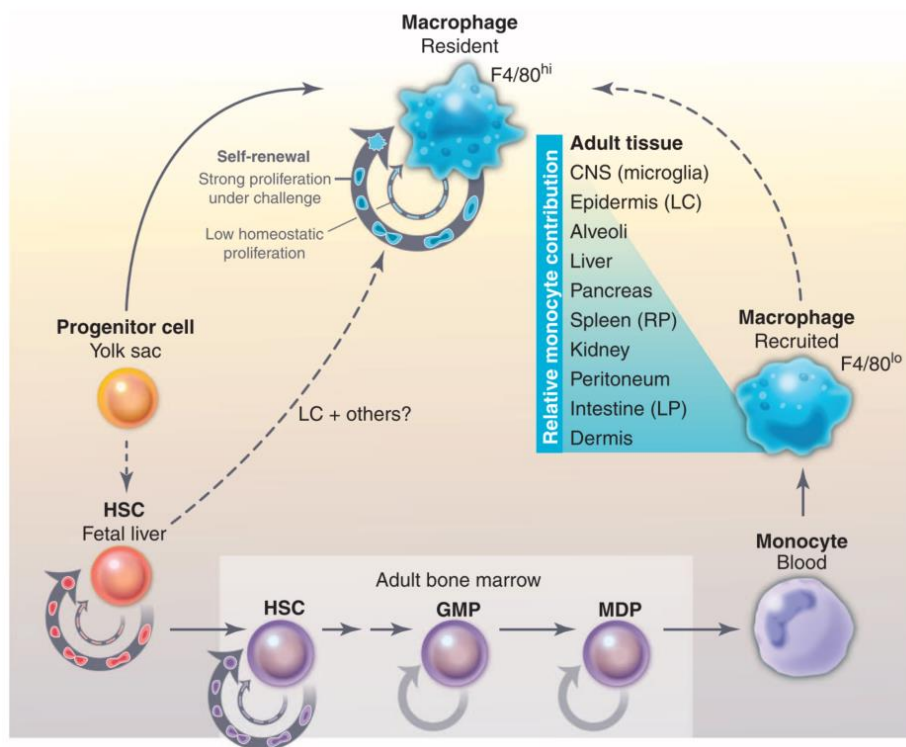
Die erste, primitive Welle beginnt in den sogenannten *Blood Islands*, Strukturen des extraembryonalen Dottersacks, welcher sich aus viszeralem Endoderm und einer Mesodermschicht entwickelt (69). Bereits ab Tag 7.25 der Embryonalentwicklung (E) sind dort bipotente, primitive Erythrozyten- und Megakaryozytenvorläufer (70) sowie myeloide, monopotente Makrophagenvorläufer zu finden (67). Bis zum Beginn der Blutzirkulation um E8.25 (71) verbleiben diese im Dottersack, proliferieren und verteilen

sich anschließend im embryonalen Gewebe (67). Die ersten ausgereiften Vorläuferzellen sind im Gehirn ab Tag 9.5 nachweisbar und differenzieren zu Mikroglia, wenige Zeit später besiedeln sie weitere Organe (58, 66, 72). Trotz ihres Proliferationspotenzials im Embryo sind die primitiven Makrophagen kurzlebig und werden größtenteils durch Makrophagen der folgenden Wellen ersetzt (66, 73, 74). Lediglich im Gehirn bestehen diese bis ins adulte Alter und proliferieren *in situ* (54, 58). In dieser Phase der Entwicklung wurden, im Gegensatz zu den folgenden Wellen, keine Monozytenvorläufer nachgewiesen (75, 76). Durch Zellmarker und Transkriptionsfaktoren lassen sich diese primitiven Makrophagen von ontogenetisch folgenden Wellen unterscheiden. So exprimieren diese beispielweise noch nicht den Transkriptionsfaktor *c-myb* (59), sind jedoch abhängig von dem *colony stimulating factor 1 receptor* (*Csf1r*) (77).

#### **2.4. Zweite Welle: Transiente definitive Makrophagen**

In der zweiten Welle ab E8.25 sind bereits definitive Erythrozyten- und Makrophagenvorläufer (EMPs) identifizierbar, wobei weitere zu den so bezeichneten Dottersack-Makrophagen reifen (63, 78). Diese stammen von spezialisierten Endothelzellen des Dottersacks und besitzen definitives hämatopoetischem Potenzial (79). An E10.5 wurde ein deutlicher Anstieg dieser potenten Vorläuferzellen in der Leber nachgewiesen (80), welche bis zur Geburt das dominante Organ für die fetale Hämatopoese darstellt. Die EMPs tragen hier zusammen mit Zellen der dritten Welle zur Blutbildung bei. Im Gegensatz zu den primitiven Makrophagen entstehen nicht mehr monopotente Progenitorzellen, sondern bipotente Granulozyten/Makrophagen-Vorläufer. Diese bilden auch die ersten zirkulierenden Monozyten (63, 80). Die EMPs tragen in der Leber jedoch nur kurzzeitig zur Hämatopoese bei und verlieren dann an Proliferationspotenzial (67). Aus diesem Grund wird die zweite Welle auch als „transiente definitive Welle“ bezeichnet (67, 68). Jedoch finden sich Nachfolger der EMPs als residente Gewebemakrophagen bis ins adulte Alter. Diese wandern während der embryonalen Entwicklung in die Organe ein, verbleiben bis zum Abschluss der Entwicklung und können ihre Population durch Selbsterneuerung aufrechterhalten (siehe Abbildung 5) (66, 67).





### Abbildung 5: Herkunft der Makrophagen und Fähigkeit zur Selbsterneuerung

Gewebemakrophagen (blau) können sich bereits früh aus dem embryonalen Dottersack (YS) entwickeln, über das Blut in die Organe gelangen und dort bis ins adulte Alter verbleiben, wo sie sich selbst erneuern. Die Proliferationsrate hängt dabei vom Zustand des Gewebes ab. Unter Inflammation, Depletion oder während der Entwicklung (großer zirkulärer Pfeil) ist diese beispielsweise stärker ausgeprägt als im Ruhezustand (kleiner zirkulärer Pfeil). Nachdem sich die Hämatopoese in der fetalen Leber und später im Knochenmark etabliert hat, entwickeln sich ebenfalls Makrophagen ausgehend von den hämatopoetischen Stammzellen (HSC) durch sich transient vermehrende Vorläuferzellen (große zirkuläre Pfeile) und nicht-proliferative Monozyten. Diese entstehen über GMP (Granulozyten-Makrophagen-Vorläufer) und MDP (Makrophagen-Dendritische-Vorläufer) und können unter bestimmten Bedingungen ebenfalls zum residenten Makrophagenpool beitragen. Der Anteil der vom Dottersack abstammenden Makrophagen ist vom jeweiligen Gewebe abhängig und hier in absteigender Beteiligung aufgereiht. Die aus dem Knochenmark rekrutierten Makrophagen exprimieren F4/80 in geringen Mengen ( $F4/80^{low}$ ), im Gegensatz zu den  $F4/80^{high}$  DS-Makrophagen. Langerhanszellen (LC), Rotes Mark (RP), Lamina propria (LP). (81)

Mit freundlicher Genehmigung des Copyright Clearance Centers und der American Association for the Advancement of Science (AAAS), Copyright © 2013

Die EMPs konnten hierbei durch die bereits erwähnten *Lineage tracing*-Modelle nachverfolgt werden. Progenitorzellen sind beispielsweise  $kit^+Cx3Cr1^+$  (63, 82, 83) und  $Rank^+$  (84), während ausgereifte Gewebemakrophagen zusätzlich F4/80 in größerer Menge exprimieren (59). Von EMPs abstammende Zellen zeigen ebenfalls eine



Expression von c-myb, scheinen aber im Gegensatz zu den Makrophagen der dritten Welle nicht von diesem Faktor abhängig zu sein (46, 59). Es wurde außerdem gezeigt, dass embryonale Zellen mit dem *colony stimulating factor 1 receptor* (Csf1r) später einen Großteil der Populationen an geweberesidenten Makrophagen stellen (59, 85). In *Knock-out*-Modellen, in denen dieser Rezeptor genetisch ausgeschaltet wurde, konnte sich keine normale Makrophagenpopulation bilden (86, 87). Auch die Mikroglia der ersten Welle waren davon betroffen (88).

### 2.5. Dritte Welle: Definitive Makrophagen

Mit der dritten Welle ab E9.5 entstehen aus der Aorta-Gonaden-Mesonephron-Region (AGM-Region) des Embryos hämatopoetische Vorläuferzellen mit mulithämatopoetischem Potential (89). Die AGM-Region umfasst hierbei die dorsale Aorta, das umgebende Mesenchym sowie die Urogenitalleiste (90). Wie auch die EMPs entstehen HSCs aus hämogenem Endothel (91, 92). Mit geringer zeitlicher Verzögerung wandern diese um E11.0 ebenfalls in die fetale Leber ein (93). Hier reifen sie, proliferieren massiv und stellen den Hauptteil der fetalen Blutbildung (93, 94). An E16.5 migrieren sie schließlich in das Knochenmark, wo sie als hämatopoetische Stammzellen bis ins adulte Alter verweilen und die Blutbildung übernehmen (95, 96). Wie bereits angedeutet, werden residente Gewebemakrophagen der zweiten Welle im adulten Alter mit der Zeit teilweise durch HSC abstammende Monozyten-Makrophagen ersetzt (74). Beobachtet wurde dies auch im Herzen (97). Die beiden Makrophagenpopulationen koexistieren daraufhin in den adulten Geweben und übernehmen gemeinsam die Homöostase. Dabei ist die Zusammensetzung je nach Organ sehr heterogen (siehe Abbildung 5). Unter Entzündungsbedingungen strömen über granulozytäre oder dendritische Monozyten-Zellvorläufer inflammatorische Ly6C<sup>high</sup> Monozyten über die Blutbahn ein (98). HSC abstammende Zellen lassen sich dabei anhand verschiedener Marker von aus dem Dottersack stammenden Zellen abgrenzen. Neben allgemeinen Makrophagen-Markern exprimieren diese unter anderem den Chemokinrezeptor CCR2 (99) und die Tyrosinkinase Flt3, welche alle hämatopoetischen Progenitorzellen besitzen (100).

Die Zusammensetzung residenter Gewebemakrophagen durch überlappende Wellen sowie die heterogene Verteilung sind kompliziert. Nach wie vor sind die distinkten

---

Funktionen und der Einfluss des ontogenetischen Ursprungs nicht eindeutig geklärt. Ein besseres Verständnis der Kolonisation, Entwicklung und Rolle der Gewebemakrophagen sind unbedingt notwendig und sollen im Herzen als Teil dieser Arbeit adressiert werden. Dies kann perspektivisch eine Grundlage für Behandlungsmethoden liefern, die sich auf immunologischen Aspekten von Herzerkrankungen gründen.

## II. ZIELSETZUNG

In den letzten Jahren wurde der Ursprung residenter Gewebemakrophagen genauer charakterisiert und zwischen der ontogenetischen Herkunft aus dem Dottersack beziehungsweise Knochenmark differenziert. Unklar bleibt jedoch die Verteilung und Funktion der jeweiligen Makrophagenpopulation in Ruhe sowie unter Inflammationsbedingungen. Langfristig kann ein tieferes Verständnis der zellulären Abläufe die Grundlage für neue Interventions- und Therapiemöglichkeiten bei Entzündungsprozessen liefern.

In dieser Arbeit soll das Verhalten von kardialen Makrophagen aus dem Dottersack sowie aus dem Knochenmark nach einem Myokardinfarkt und im Verlauf genauer untersucht werden. Zur Durchführung wurden hierbei verschiedene Mauslinien verwendet und durchflusszytometrisch sowie histologisch analysiert. Durch das genetische *Knock-out*-Modell  $Csf1r^{FIRE}$  sollten außerdem erste Rückschlüsse auf die Funktion der residenten Makrophagen gezogen werden. Folgende Fragestellungen standen hierbei im Zentrum der Arbeit:

- *Wie sind Makrophagenpopulationen unterschiedlichen ontogenetischen Ursprungs im Herzen zusammengesetzt?*
- *Wie verhalten sich vom Dottersack und Knochenmark abstammende Makrophagen in Myokardinfarkt und anschließender kardialer Inflammation?*
- *Welchen Einfluss hat die Abwesenheit residenter Makrophagen im  $Csf1r^{FIRE}$ -Modell auf die kardiale Population nach Myokardinfarkt?*
- *Welchen Einfluss hat die Abwesenheit residenter Makrophagen im  $Csf1r^{FIRE}$ -Modell auf die Ausbildung der Infarktnarbe?*

## III. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Versuchstiere

Als Grundlage dieser Arbeit wurden Experimente mit der Maus als Versuchstier durchgeführt. Die Tiere wurden von *The Jackson Laboratory* eingeführt und im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin untergebracht. Zu jeder Zeit wurden die Anforderungen der Tierschutz-Versuchstierverordnung der Regierung Oberbayern erfüllt (Aktenzeichen ROB-55.2-2532.Vet\_02-19-17). Die Mäuse wurden artgerecht gehalten und tierärztlich betreut. Das Alter zur Zeit der Versuche betrug in der Regel 10-16 Wochen.

### 2. Mauslinien

Folgende Mauslinien wurden verwendet

- **Rank<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>eYFP</sup> / Rank<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>RFP</sup>**
- **Flt3<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>mTmG</sup>**
- **Csf1r<sup>FIRE</sup> und Csf1r<sup>FIRE</sup>Rank<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>eYFP</sup>**
- **C57BL/6J**

#### 2.1. Rank<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>eYFP</sup> / Rank<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>RFP</sup>

Die Linie Rank<sup>Cre</sup> (auch bekannt als Tnfrsf11a<sup>Cre</sup>) ermöglicht eine spezifische Markierung von Makrophagen, die von Vorläuferzellen aus dem Dottersack abstammen (83, 84). Der Zytokinrezeptor Rank (Receptor Activator of NF-κB), Bestandteil der Tnf α-Rezeptor Superfamilie, spielt mit seinem Hauptliganden RANKL eine wesentliche Rolle bei Signalwegen zur Entwicklung und Differenzierung von Immunzellen sowie der Knochenhomöostase (101, 102). Durch Verpaarung von Rank<sup>Cre</sup>- mit Rosa26<sup>eYFP</sup>-Reporter-mäusen wird abhängig von der Cre-Rekombinase eine LoxP-flankierte STOP-Sequenz am ubiquitär vorkommenden Genlocus Rosa26 entfernt (103). In Rank-abhängigen Zellen wird daraufhin ein fluoreszierendes Protein (*enhanced Yellow Fluorescent Proteine* = eYFP) gebildet (103, 104), welches die durchflusszytometrische Detektion von Rank<sup>+</sup> Makrophagen ermöglicht. In einzelnen Versuchen wurde aufgrund der aktuellen Verfügbarkeit eine Mauslinie mit Rosa26<sup>RFP</sup>-Reporter verwendet (RFP = *Red Fluorescent Protein*).

## 2.2 Flt3<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>mTmG</sup>

Mithilfe der Mauslinie Flt3<sup>Cre</sup> können definitive, von Stammzellen aus dem Knochenmark stammende Makrophagen identifiziert werden (105). Bei Flt3 (*fms-like tyrosine kinase 3*, auch bekannt als *fetal liver kinase Flk-2*, CD135) handelt es sich um einen Tyrosinkinase-Rezeptor, der essenziell für das Überleben und die Proliferation in der frühen Phase der hämatopoetischen Entwicklung von HSC ist (106-108). Bei residenten Makrophagen aus embryonalen Vorläuferzellen wird er hingegen nicht exprimiert (59, 85). Durch Verpaarung mit Rosa26<sup>mTmG</sup>-Mäusen wird der fluoreszierende Reporter mTmG unter die Kontrolle von Flt3 gestellt. Nach Cre-abhängiger Exzision am Rosa26-Locus ändert dieser dauerhaft seine Expression von *membrane-targeted tandem dimer Tomato* (mT) zu *membrane-targeted Green Fluorescent Protein* (mG) (109). Diese Rekombination ermöglicht eine Unterscheidung von Flt3-abhängigen Makrophagen anhand ihres GFP-Signals.

## 2.3 Csf1r<sup>FIRE</sup> und Csf1r<sup>FIRE</sup>Rank<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>YFP</sup>

Der *Colony stimulation factor 1* (Csf1) und der zugehörige Rezeptor (Csf1r) kontrollieren die Differenzierung und das Überleben von residenten, vom Dottersack abstammenden Makrophagen (59, 85, 110). Das kodierende Proto-Onkogen *c-fms* steht dabei unter der Kontrolle eines Superenhancers, des intronischen regulatorischen Element FIRE (77, 111). In der Linie Csf1r<sup>FIRE</sup> entsteht durch einen *Knock-out* des FIRE-Elements ein selektives Defizit an residenten Gewebemakrophagen im Herzen, während die Anzahl Knochenmark abstammender Makrophagen sich nicht verändert (88). Heterozygote, Csf1r<sup>FIRE/+</sup> Tiere zeigen keinen Rückgang der Makrophagenpopulation (88) und können so gut mit homozygoten Csf1r<sup>FIRE/FIRE</sup>-Tieren verglichen werden.

In der Linie Csf1r<sup>FIRE</sup>Rank<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>YFP</sup> gelang die Kreuzung mit Rank-exprimierenden Tieren (siehe Kapitel III.2.1) und ermöglichte hiermit zusätzlich die ontogenetische Differenzierung der Makrophagen anhand ihrer YFP-Expression im FIRE-Modell.

## 2.4 C57BL/6J

C57BL/6J ist der meistverwendete Inzuchtstamm (112) und wird bei vielen Mauslinien als genetischer Hintergrund eingesetzt. In dieser Arbeit dienten Tiere dieses Wildtypstammes dem Vergleich zweier Färbemethoden (siehe Kapitel III.6.5).

### 3. Inflammationsmodell Herzinfarkt

Das Herzinfarktmodell wurde nach dem Prinzip der Ischämie/Reperfusion (I/R) durchgeführt. Bei drei Monate alten Mäusen wurde für eine Stunde der absteigende Ast der linken Koronararterie (left anterior descending artery=LAD) ligiert und eine Ischämie im Versorgungsgebiet des linken Ventrikels erzeugt. Nach einer Stunde wurde die Ligation gelöst und das betroffene Areal reperfundiert.

Zur Narkotisierung der Mäuse wurden inhalativ fünfprozentiges Isofluran und eine intraperitoneale Injektion von Fentanyl (0,05 Milligramm/Kilogramm [mg/kg]), Midazolam (5,0 mg/kg) und Medetomidin (0,5 mg/kg) verwendet. In Rückenlage wurden die Mäuse auf einer Wärmeplatte fixiert und mit einer 19G (Gauche) Metallkanüle intubiert und beatmet (MiniVent Type845, Hugo Sachs Elektronik, Atemvolumen 200 Mikroliter ( $\mu$ l) bei einer Frequenz von 150 Schlägen/Minute). Die Körpertemperatur wurde während des Eingriffs mit einer rektalen Temperatursonde (TMF-3402 Messfühler, FMI Föhr Medical Instruments GmbH) überwacht. Die linke Thoraxseite wurde enthaart und desinfiziert. Unter Verwendung eines Mikroskops (Stereomikroskop Stemi 2000-C, Carl Zeiss) und separater Lichtquelle (CL 6000 LED, Carl Zeiss) wurden die Muskelschichten des Thorax auf Höhe des zweiten Interkostalraumes bis zur Zwischenrippenmuskulatur durchtrennt und das darunter liegende Perikard eröffnet. Die LAD wurde mit einem Faden (8-0 Prolene, Ethicon) um einen Platzhalter verschlossen. Der erfolgreiche Gefäßverschluss konnte durch eine Blickprobe auf das durch die Minderdurchblutung deutlich hellere Myokardareal sichergestellt werden. Nach einer Ischämiedauer von einer Stunde wurde der Faden entfernt und ein erneuter Farbwechsel diente zur Kontrolle der Reperfusion. Die durchtrennten Muskeln wurden mit Einzelknopfnähten und die Hautspalte fortlaufend mit einem Faden (5-0 Prolene bzw. 7-0 Prolene, Ethicon) verschlossen und mit Jod desinfiziert. Insgesamt dauerte der Eingriff etwa 90 Minuten. Nach Verschluss wurde die Narkose antagonisiert, die Tiere wurden extubiert und erhielten anschließend eine weiterführende Überwachung sowie Schmerztherapie mit Buprenorphin (0,1 mg/kg) dreimal täglich über 3 Tage.

#### 4. Entnahme der Organe

Zuerst wurde die Maus in einer Narkosebox mit zweiprozentigem Isofluran narkotisiert. Nach Entfernung des Hautlappens wurde durch den frei liegenden Brustkorb durch den zweiten Interkostalraum mit einer Spritze (2 Milliliter [ml], BD Discardit II, Becton Dickson), die mit 5 µl Heparin (Heparin-Natrium-25000, Ratiopharm) präpariert war, und einer Kanüle (27G, BD Mikrolance, Becton Dickson) das Herz punktiert, um Blut aus dem linken Ventrikel zu entnehmen. Im Anschluss an die sichere Tötung des Tieres durch eine zervikale Dislokation erfolgte eine zügige Eröffnung des Bauchraums mithilfe einer Schere. Nach einem Leberschnitt wurde mit einer 10-ml-Spritze mit aufgesetzter Kanüle durch erneute Punktion des linken Ventrikels das Gefäßsystem mit PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich) perfundiert. Anschließend konnten die Organe von Interesse entnommen werden. Nach kaudaler Eröffnung des Mediastinums wurde das Herz vom umliegenden Gewebe und Gefäßen abgetrennt und in einen mit PBS gefüllten 15-ml-Falcon (Falcon® Conical Centrifuge Tube, Corning) auf Eis gelegt. Die Entnahme des Gehirns erfolgte von dorsal. Nach einem Hautschnitt direkt oberhalb des Schädelknochens konnte, beginnend am Foramen magnum, die Schädelkalotte in der Sagitalebene geteilt und zur Seite geöffnet werden. Mit einer stumpfen Pinzette wurde das Gehirn von seinen weiterführenden kaudalen Strukturen getrennt und als Ganzes entnommen. Dieses wurde ebenfalls in PBS gekühlt und es wurde zeitnah mit der Aufbereitung der Proben begonnen.

Für die histologische Untersuchung wurden die Mausherzen für 30 Minuten in 4%igem PFA (Paraformaldehyd, Methanol-freie Lösung, Thermofisher Scientific) fixiert und anschließend über 24 Stunden in 30%iger Sucrose-Lösung (Sigma-Aldrich) entwässert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4 Grad Celsius (°C) gelagert. Daraufhin wurden die Proben wie in Kapitel III.6.1 beschrieben aufbereitet.

## 5. Durchflusszytometrie

### 5.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine quantitative Bestimmung von Zellen und Zellbestandteilen. Partikel einer Zellsuspension fließen dabei einzeln durch das kapilläre System eines Durchflusszytometers. An einem Fokuspunkt werden diese von einem geeigneten Laser detektiert und nach ihrer Lichtstreuung und Fluoreszenz unterschieden. Das Streulicht entlang der Achse des einfallenden Lichts wird auch als *Forward Scatter Signal* (FSC) bezeichnet und korreliert in dessen Intensität mit der Größe der detektierten Zellen. Die schwächeren Signale des *Side Scatter Signals* (SSC) und der Fluoreszenzen werden im rechten Winkel zum einfallenden Licht gemessen und zeigen die Granularität sowie Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlängen an. Fluorochrome (=Fluoreszenzfarbstoffe) nehmen dabei Photonen auf und emittieren Licht in einem bestimmten Spektrum, welches durch verschiedene Spiegel und Filter an ihre jeweiligen Detektoren geleitet wird. Dabei können Zellen intrinsisch oder durch einen zugefügten Antikörper fluoreszieren, welcher an ein spezifisches Protein bindet. Der Einsatz mehrerer Fluorochrome ermöglicht hierbei viele Kombinationen mit einer hohen Dichte an Informationen. Die Überlappungen der Emissionsspektren werden zur korrekten Darstellung vor Durchführung des Versuches anhand der Computersoftware verrechnet (=kompensiert). Hierfür werden Ausrichtungspartikel, sogenannte Beads, verwendet, welche mit beliebigen Antikörpern beladen werden können. Die graphische Darstellung erfolgt anschließend am Computer anhand von Histogrammen oder Dot-Plots. (113)

### 5.2. Aufbereitung des Blutes

Für eine aussagekräftige Analyse des Blutes wurden im ersten Schritt die Erythrozyten lysiert. Dafür wurden je 100 µl in einen 15-ml-Falcon mit 3 ml Ammoniumchloridlysepuffer (155 Millimolar [mM] NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA, Sigma-Aldrich) überführt und für 5 Minuten dunkel bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden anschließend 3 ml PBS hinzugegeben. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 350 RCF (Relative Centrifugal Force) konnte der Überstand mithilfe eines Förderaggregats (FTA-1, Absauggerät mit Verschlusskolben, bioSan) abgesaugt werden. Die weitere Verarbeitung erfolgte gemeinsam mit den aufbereiteten Organen.



### 5.3. Aufbereitung der Organe

Die Mausherzen wurden zunächst halbiert, um einen Teil des Gewebes für die histologische Analyse verwenden zu können. Bei operativer I/R wurde zwischen einem apikalen Infarktbereich und einem basalen Remotebereich (=kein sichtbares und erwartbares Infarktgewebe) unterschieden. Daraufhin wurde ein repräsentativer Teil des zu untersuchenden Gewebes abgetrennt und gewogen. Auf Petrischalen (Standard Zellkulturschale, 35 x 10 mm, Sarstedt) wurde dieses mithilfe einer Klinge (Einmal-Sicherheitskalpell, Aesculap AG) in möglichst feine Gewebeteile zerkleinert und in einen 50-ml-Falcon mit bereits vorbereitetem Enzymmix gegeben (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2). Bei einer Temperatur von 37 °C wurde der Mix bei 150 Umdrehungen pro Minute für 30 Minuten inkubiert und hierbei einzelne Zellen aus dem Gewebeverband gelöst. Im Anschluss daran wurde der Organ-Enzym-Mix in eine 6-Well-Platte (Costar® 6-well Plate, not treated, flat bottom, Corning) mit 6 ml vorgelegtem FACS-Puffer (PBS; 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung, Sigma-Aldrich; 0,5 % BSA, bovines Serumalbumin, Albumin Fraktion V, Carl Roth) durch ein Sieb (Falcon® 70 Mikrometer [µm] Cellstrainer Nylon, Corning) gefiltert. Die festen Bestandteile wurden dabei mit dem Kolben einer 2-ml-Spritze möglichst vollständig durch das Sieb gedrückt, um den Zellverlust zu minimieren. Im Anschluss erfolgte ein Umfüllen in einen 15-ml-Falcon und ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 4 °C und 350 Umdrehungen pro Minute. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde simultan zu den Blutproben mithilfe einer Pumpvorrichtung abgesaugt und das überbleibende Zellsediment wie im Folgenden beschrieben weiterverarbeitet.

Enzym	Konzentration	Hersteller
Collagenase I	10 mg/ml	Sigma-Aldrich
Collagenase XI	10 mg/ml	Sigma-Aldrich
DNase I	60 U/ml	Sigma-Aldrich
Hyaluronidase	10 mg/ml	Sigma-Aldrich

**Tabelle 1: Enzymmix Herz**

Darstellung der verwendeten Enzyme zur Zellisolierung eines Herzens.

<b>Enzym</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Dispase	10 mg/ml	Sigma-Aldrich
Collagenase D	120 mg/ml	Sigma-Aldrich
DNase I	50 mg/ml	Sigma-Aldrich

**Tabelle 2: Enzymmix Gehirn**

Darstellung der verwendeten Enzyme zur Zellisolierung eines Gehirns.

#### 5.4. Färbung und Vorbereitung zur durchflusszytometrischen Analyse

Die sedimentierten Zellen wurden im Anschluss mit 50 µl FC-Block (Purified rat anti mouse CD16/CD32, BD Pharmingen, Becton Dickson) suspendiert und je 50 Mikroliter in ein oder mehrere Wells einer 96-Well-Platte (Falcon® 96-well Plate, not treated, U-Bottom, Corning) überführt und für 5 Minuten auf Eis gelagert. Hierdurch sollten unspezifische Bindungen der Antikörper verhindert werden. Anschließend wurde der vorbereitete Antikörpermix (siehe Tabelle 3) hinzugefügt und 20 Minuten dunkel und kühl inkubiert. Zum Entfernen der ungebundenen Antikörper wurden 100 µl FACS-Pufferlösung hinzugegeben und es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei den oben genannten Einstellungen. Nach Dekantieren des Überstands, erneutem Resuspendieren mit 200 µl Pufferlösung und einer weiteren Filtration durch ein 50-µm-Sieb (CellTrics® 50 µm Filter, Sysmex Partec), wurde die Probe in ein Röhrchen überführt (Falcon® 5 ml Round Bottom Polystyrene Test Tube, Corning) und es konnte mit der Analyse am Durchflusszytometer begonnen werden.

Zur Kompensation wurden Beads verwendet. Dabei wurden jeweils ein Tropfen der Negativkontrolle und des passenden Zellrezipienten mit einem Mikroliter Antikörper beladen (BD CompBeads Anti-Mouse/Anti-Rat/Anti-Hamster Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set, Becton Dickson).

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Proben wurde mit dem BD LSRFortessa™ Cell Analyzer durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FlowJo, Version 10.3.

Oberflächenmolekül	Fluorchrom	Klon	Hersteller	Verdünnung
CD45	PerCP/Cy5.5	30-F11	BioLegend	1:100
TER119	PE	TER-119	eBioscience	1:100
TCR $\beta$	PE	H57-597	BioLegend	1:100
NK1.1	PE	PK136	BioLegend	1:100
CD11c	PE	HL3	BD Pharmingen	1:100
CD11b	APC-Cy7	M1/70	BioLegend	1:100
CD64	APC	X54-	BioLegend	1:100
F4/80	BV421	BM8	BioLegend	1:50
Ly6G	BV605	1A8	BioLegend	1:100
Ly6C	BV510	HK1.4	BioLegend	1:100
CD3	APC-Cy7	17A2	BioLegend	1:100
CD19	FITC	1D3/CD	BioLegend	1:100
CD115	BV421	AFS98	BioLegend	1:100
SYTOX <sup>TM</sup> Orange dead cell stain			Invitrogen	1:100

### **Tabelle 3: Antikörper der durchflusszytometrischen Analyse**

Darstellung der zur Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper im Herzen und im Blut, sowie der Antikörper zur Markierung viabler Zellen in den jeweiligen Protokollen (unterer Tabellenabschnitt).

#### **5.5. Gating und Auswertung**

Mit der Software FlowJo ließen sich die erhobenen Daten als Histogramme oder Dot-Plots darstellen und auswerten. Bei Letzteren konnten FSC, SSC beziehungsweise die jeweiligen Fluorochrome gegeneinander aufgetragen und so die Zellpopulationen des Interesses anhand ihrer Beschaffenheit und Signalintensität eingegrenzt werden (=Gating). Das Gating funktioniert dabei sowohl vorwärts als auch rückwärts, das heißt, identifizierte Populationen lassen sich näher in Subpopulationen eingrenzen sowie ebenfalls in weiter gefassten Darstellungen zurückverfolgen (Back-Gating). Die hier angewendete Gating-Strategie des Herzens wird in Kapitel IV.1 erläutert. Im Blut wurden die Oberflächenmoleküle CD3, CD19, CD115, Ly6C und Ly6G zur Differenzierung der Monozyten genutzt.

## **6. Histologie**

### **6.1. Anfertigen von Gefrierschnitten**

Die Organe wurden wie in Kapitel III.4 beschrieben entnommen und fixiert. Durch die Entwässerung mit dreißigprozentiger Sucroslösung ließ sich im nun folgenden Gefriervorgang die Bildung von Eiskristallen verhindern. Mithilfe einer Schneidevorrichtung wurden die Herzen in jeweils 2 Millimeter (mm) Abständen horizontal in 3 Teile geteilt. Dadurch konnte zwischen Herzbasis, Mittelteil und Apex unterschieden werden. Diese wurden in einem Medium (Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura Finetek) eingefasst in Einbettförmchen (Tissue-Tek® Kryoeinbettformen 25 x 20 x 5 mm, Sakura Finetek) platziert, auf Trockeneis gefroren und im Gefrierschrank bei -80 °C aufbewahrt. Bei I/R wurde der Apex sowie der apikale Teil des Mittelteils untersucht, da hier die größte Ausdehnung der Fibrose zu erwarten war. Am Kryotom (CryoStar NX70 Kryostat, Thermo Fisher Scientific) wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von 12 µm angefertigt. Die Schneideklinge war auf -25 °C und die Innenraumtemperatur auf -18 °C temperiert. Geschnittene Gewebeproben wurden mit vorgewärmten Objektträgern (Superfrost Plus Menzel Gläser, Gerhard Menzel) auf Glas gezogen und im Gefrierschrank bei -20°C bis zur histologischen Weiterverarbeitung gelagert.

### **6.2. Sirius Red/Fast Green**

#### **6.2.1. Histologischer Hintergrund**

Sirius Red ist ein roter, anionischer Farbstoff, der mit einem Metallkomplex-Farbstoff kombiniert ist und zusammen mit gelber Pikrinsäure häufig für die Färbung von Kollagenfasern und assoziierten Geweben verwendet wird (114, 115). In Kombination mit dem Farbstoff Fast Green erfolgt eine gezielte Abgrenzung von nicht kollagenem Protein (116) und damit ebenfalls von fibrotisch umgebauten Gewebe nach kardialer Inflammation (117).

#### **6.2.2. Durchführung der Sirius Red/Fast Green-Färbung**

Die Verdünnung der im Folgenden verwendeten Lösungen erfolgte jeweils mit destilliertem Wasser.

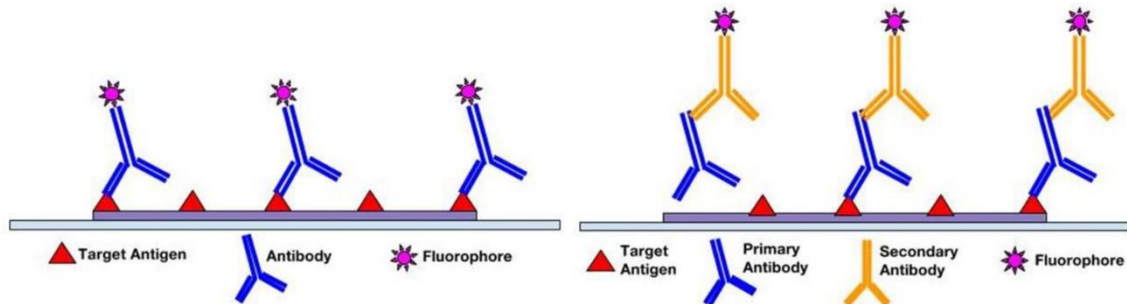
Objektträger mit Gefrierschnitten wurden für 15 Minuten in einer abgedunkelten und feuchten Kammer (M920 – Staintray, 20 Slides Staining System, Simport Scientific) auf Raumtemperatur gebracht. Es folgte ein Fixationsschritt mit bereits erwärmtem Bouin-Fixiergemisch (Carl Roth) in einer Glasküvette bei 58 °C in einem Inkubator (Ecotron, Infors HT) für 60 Minuten. Der anschließende Waschvorgang erfolgte unter fließendem Leitungswasser für 15 Minuten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Proben nicht direkt den Scherkräften des Wasserstrahls ausgesetzt waren und das Wasser langsam über die Küvette abfließen konnte. Die Färbung bestand im ersten Schritt aus Einfüllen von 0,1%igem Fast Green (Sigma-Aldrich) bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Objektträger mit 1%iger Essigsäure (Carl Roth) für 1 Minute gewaschen und erneut unter fließendem Leitungswasser für 5 Minuten gespült. Im zweiten Schritt wurden die Proben mit einer Lösung aus 0,1%igem Sirius Red (Sigma-Aldrich) und 1,3%iger Pikrinsäure-Lösung (Sigma-Aldrich) bedeckt. Die Einwirkzeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur, danach wurde die Küvette geleert. Dehydriert wurde unter Schüttelbewegungen in drei direkt aufeinanderfolgenden Schritten mit 70%igem Ethanol (Carl Roth) für 10 Sekunden, 100%igem Ethanol für 1 Minute und 100%igem Toloul (Toluene Emplura<sup>®</sup>, Merck) für 3 Minuten. Die gefärbten Schnitte wurden mit jeweils 50 µl DePex (Serva Electrophoresis GmbH) benetzt, mit einem Deckglas bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Daraufhin konnten die Präparate in der Hellfeldmikroskopie weiter beurteilt werden.

### **6.3. Immunfluoreszenz**

#### **6.3.1. Prinzip der Immunfluoreszenz**

Bei der Immunfluoreszenz (IF) erfolgt nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip eine Markierung von spezifischen Strukturen an Gewebeschnitten. Dabei können sowohl extra- als auch intrazelluläre Proteine sichtbar gemacht werden. Die Detektion der Fluoreszenz wird durch mit einem Fluorchrom konjugierte Antikörper ermöglicht. An einem Immunfluoreszenzmikroskop werden die Fluochrome durch Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt. Das daraufhin emittierte Licht wird durch einen für das Spektrum spezifischen Filter am Mikroskop gefiltert und schließlich im Okular sichtbar gemacht. So können Lokalisation und Signalintensität des Zielproteins bestimmt werden. Unterschieden wird zwischen direkter und indirekter IF. Bei der direkten IF

bindet ein mit einem Fluorchrom gekoppelter Antikörper direkt an die Zielstruktur, bei der indirekten IF ist ein weiterer, sogenannter primärer Antikörper zwischengeschaltet. An diesen bindet der konjugierte Sekundärantikörper (siehe Abbildung 6).



### Abbildung 6: Prinzip der direkten und indirekten Immunfluoreszenz

(A) Bei der direkten Immunfluoreszenz binden mit einem Fluorchrom (Fluorophor) gekoppelte, primäre Antikörper (blau) direkt an ihre Zielstruktur (Target Antigen). (B) Bei der indirekten Immunfluoreszenz binden im ersten Schritt primäre Antikörper ohne Fluorchrom an das Zielantigen. Anschließend binden gekoppelte, sekundäre Antikörper (gelb) an den Primärantikörper und erlauben so eine Detektion des Signals ausgehend von ihrem Zielprotein. (118)

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center und Lizenznehmer Springer Science+Business Media, LLC, Teil von Springer Nature. Copyright © 2019

Die Verwendung von Primär- und Sekundärantikörpern ermöglicht dabei viele Kombinationen der Fluorochrome. Durch den Einsatz unterschiedlicher Filtersets am Mikroskop können verschiedene Proteine einer Zelle oder Struktur in derselben Probe sichtbar gemacht werden. Zur Erhöhung der Spezifität der IF können mithilfe von Isotypkontrollen fälschlicherweise bindende Antikörper identifiziert werden.

#### 6.3.2. Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung

Zuerst wurden die Objektträger in einer feuchten und dunklen Kammer 15 Minuten aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht. Während des gesamten Vorgangs wurde darauf geachtet, dass die Proben nicht austrockneten und vor Licht geschützt waren. Die Proben wurden 10 Minuten mit vierprozentigem PFA fixiert. Danach erfolgten drei Waschgänge je 5 Minuten in einer mit Waschlösung (siehe Tabelle 4) befüllten Küvette. Mit einem hydrophoben Stift (Pen Liquid Blocker, Science Service) wurden die einzelnen Gefrierschnitte umrandet und eine Blocklösung (siehe Tabelle 4) appliziert, um unspezifische Antikörperbindungen zu hemmen. Das enthaltene Saponin diente der

Permeabilization. Die Proben wurden bei Raumtemperatur für mindestens 60 Minuten inkubiert. Nach Abklopfen der Flüssigkeit wurden je 50 µl des primären Antikörpers in Blocklösung aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für eine Dauer von 90-120 Minuten erneut bei Raumtemperatur. Anschließend wurden bei einem weiteren Waschgang, wie oben beschrieben, überschüssige Antikörper entfernt. Je 50 µl des sekundären Antikörpers (siehe Tabelle 5), gelöst in Saponinlösung (siehe Tabelle 4), wurden aufgebracht und für weitere 40-60 Minuten auf den Proben belassen. Zur Darstellung fibrotischer Bereiche wurde dem sekundären Antikörper das Lectin WGA (Wheat germ agglutinin), das bereits an ein Fluorchrom gebunden war, hinzugefügt und zusammen mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Die Färbung des Zellkerns erfolgte in den letzten fünf Minuten durch die Zugabe von Hoechst (siehe Tabelle 5). Nach dem letzten Waschgang mit PBS wurden die Proben mit Mounting Medium (Fluorescence Mounting Medium, Dako North America Inc.) und Deckgläsern (Menzel, Thermo Scientific) bedeckt, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und bei 4 °C gelagert.

Zur Kontrolle der Spezifität wurden Isotypkontrollen durchgeführt (siehe Tabelle 6).

<b>Waschlösung:</b>	PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich), 0,5 % BSA (Albumin Fraktion V, Carl Roth), 0,1 % Tween20 (Sigma-Aldrich)
<b>Saponinlösung:</b>	Waschlösung (PBS, 0,5 % BSA 0,1 % Tween20) + 0,5 % Saponin (Sigma-Aldrich)
<b>Blocklösung:</b>	Saponinlösung (PBS, 0,5 % BSA 0,1 % Tween20, 0,5 % Saponin) + 10 % Ziegen Serum (Sigma-Aldrich)

**Tabelle 4: Verwendete Lösungen in der Immunfluoreszenzfärbung**

Die aufgelisteten Lösungen wurden jeweils für die IF angemischt.

Antikörper	Klon, Hersteller	Verdünnung
CD68 rat anti mouse	FA-11, Bio-Rad	1:100
F4/80 rat anti mouse	M8, eBioscience	1:50
Anti GFP rabbit anti mouse	A11122, Life Technologies	1:100
WGA (konjugiert, AF647)	W32466, Life Technologies	1:100
Hoechst	33342, Invitrogen	1:1000
AF555 goat anti-rat	Polyklonal, Life Technologies	1:200
AF488 goat anti-rabbit	Polyklonal, Life Technologies	1:200

**Tabelle 5: Antikörper in der Immunfluoreszenz**

Aufgelistete primäre (oberer Tabellenabschnitt) und sekundäre (unterer Tabellenabschnitt) Antikörper wurden in der IF verwendet.

Antikörper	Isotypkontrolle	Klon, Hersteller	Verdünnung
CD68 rat anti mouse	rat IgG2a isotype control	2A3, InVivoMAb	1:100
Anti GFP rabbit anti mouse	Negative Control, Rabbit Immunoglobulin Fraction	Polyklonal, Agilent Dako	1:100
F4/80 rat anti mouse	Rat IgG2a kappa Isotype Control	eBR2A, eBioscience	1:100

**Tabelle 6: Isotypkontrollen in der Immunfluoreszenz**

Die aufgelisteten Isotypkontrollen wurden jeweils zur Kontrolle der verwendeten primären Antikörper (1. Spalte) eingesetzt.

#### 6.4. Aufnahme und histologische Auswertung

Für die Aufnahme der gefärbten Proben wurde ein Epifluoreszenzmikroskop (Axio Imager.M2, Carl Zeiss) mit einer Kamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss) verwendet. Die mit Sirius Red/Fast Green gefärbten Schnitte wurden in der Hellfeldmikroskopie erfasst. Zur Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung wurden die in Tabelle 7 abgebildeten Filtersets eingesetzt. Übersichtsaufnahmen wurden mit 20-facher Vergrößerung durchgeführt und die Einzelbilder anschließend automatisch zusammengeführt (=Stitching). Für die Aufnahme von Zellen wurde eine 40-fache Vergrößerung genutzt.



Es wurde zwischen Infarktzone (IZ), einem Grenzbereich (*border zone* = BZ) von 500 Mikrometer und nicht infarziertem Gewebe (*remote zone* = RZ) unterschieden. Für eine Zellzahlanalyse wurden dabei aus jedem Bereich jeweils zwei Aufnahmen pro Zone von jeweils drei Gefrierschnitten je Tier ausgewertet. Bei der Mauslinie  $Flt3^{Cre}Rosa26^{mTmG}$  und  $Csf1r^{FIRE}$  wurden alle sichtbaren Zellen mit Zellkern des jeweiligen *Z-Stacks* gezählt. Zellfragmente ohne Zellkern und Artefakte wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Zur Bestimmung der Fibrosefläche wurden Übersichtsaufnahmen mithilfe der Zeiss-Software (AxioVision SE64 Rel. 4.9.1, *Program Wizard*) analysiert.

Um repräsentative und qualitativ hochwertige Abbildungen der Zellen zu erhalten, wurden ergänzend Aufnahmen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM-880, Airyscan and fast mode, Zeiss) durchgeführt. Im Unterschied zur konventionellen Mikroskopie werden hierbei kleine, einzelne Teilstücke des Präparates nacheinander beleuchtet und anschließend ein Gesamtbild konstruiert. Dadurch können Bilder mit hoher Schärfe und Kontrast aufgenommen werden (119). Zur Darstellung wurde die Funktion *Maximum Intensity Projection* genutzt, mit der die Zellen eines Gewebeschnittes auf eine Ebene gebracht und somit ein 2D-Bild der Probe erzeugt wurde.

Hellfeldmikroskopische Aufnahmen wurden mit der Analyse-Software Fiji (ImageJ, Version 2.3.0/1.53q) ausgewertet.

<b>Filtersatz</b>	<b>Anregung</b>	<b>Emission</b>
DsRed/Zeiss Filterset 43	BP 545/25	BP 605/70
GFP/Zeiss Filterset 38	BP 470/40	BP 525/50
Cy5/ Zeiss Filterset 50	BP 640/30	BP 690/50
DAPI/Zeiss Filterset 49	G 365	BP 445/50

**Tabelle 7: Verwendete Filtersets in der Immunfluoreszenzmikroskopie**

Darstellung des verwendeten Filtersets und der Bandbreite (BP) mit Mittelwert/Abweichung. G 365 zeigt die Anregung durch einen dichroitischen Spiegel (=Kaltlichtspiegel).

### **6.5. Vergleich der Färbemethoden**

Für den Vergleich der Färbungen Sirius Red/Fast Green und Immunfluoreszenz wurden zwei direkt aufeinander folgende Gefrierschnitte eines Herzens 30 Tage nach Einsetzen einer Angiotensin-II-Pumpe mit jeweils einer der beiden Methoden gefärbt. Übersichtsaufnahmen wurden in 20-facher Vergrößerung aufgenommen und analysiert. Insgesamt wurden drei Tiere mit je sechs Schnitten ausgewertet.

## **7. Statistische Auswertung**

Für die statistische Analyse und graphische Darstellung der Daten wurde GraphPad Prism, Version 8.4.2, verwendet.

Zum Vergleich zweier unabhängiger Gruppen wurde ein unverbundener t-Test („Student's t-test“) durchgeführt. Zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte ein ein- oder zweiseitiger ANOVA-Test. Um Mittelwerte unterschiedlicher Gruppen untereinander zu vergleichen, wurde der Fisher's LSD Test (LSD = Least Significant Difference) verwendet. Gegebenenfalls wurde die Welch'sche Korrektur für ungleiche Varianzen angewandt. Zum Vergleich von zwei abhängigen Gruppen wurde ein verbundener t-Test durchgeführt, der Determinationskoeffizient  $r^2$  wurde als Maß der Streuung bei linearer Regression angegeben. Die dargestellten Graphen bilden jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung (SD) ab. Ein separater Punkt entspricht einem individuellen Experiment. Der errechnete p-Wert wird jeweils direkt über den Balken des Diagramms angezeigt. Ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde dabei als signifikant angenommen. Die Größe der Versuchsgruppen mit  $n =$  „Anzahl der Versuchstiere“ wird jeweils gesondert angegeben.

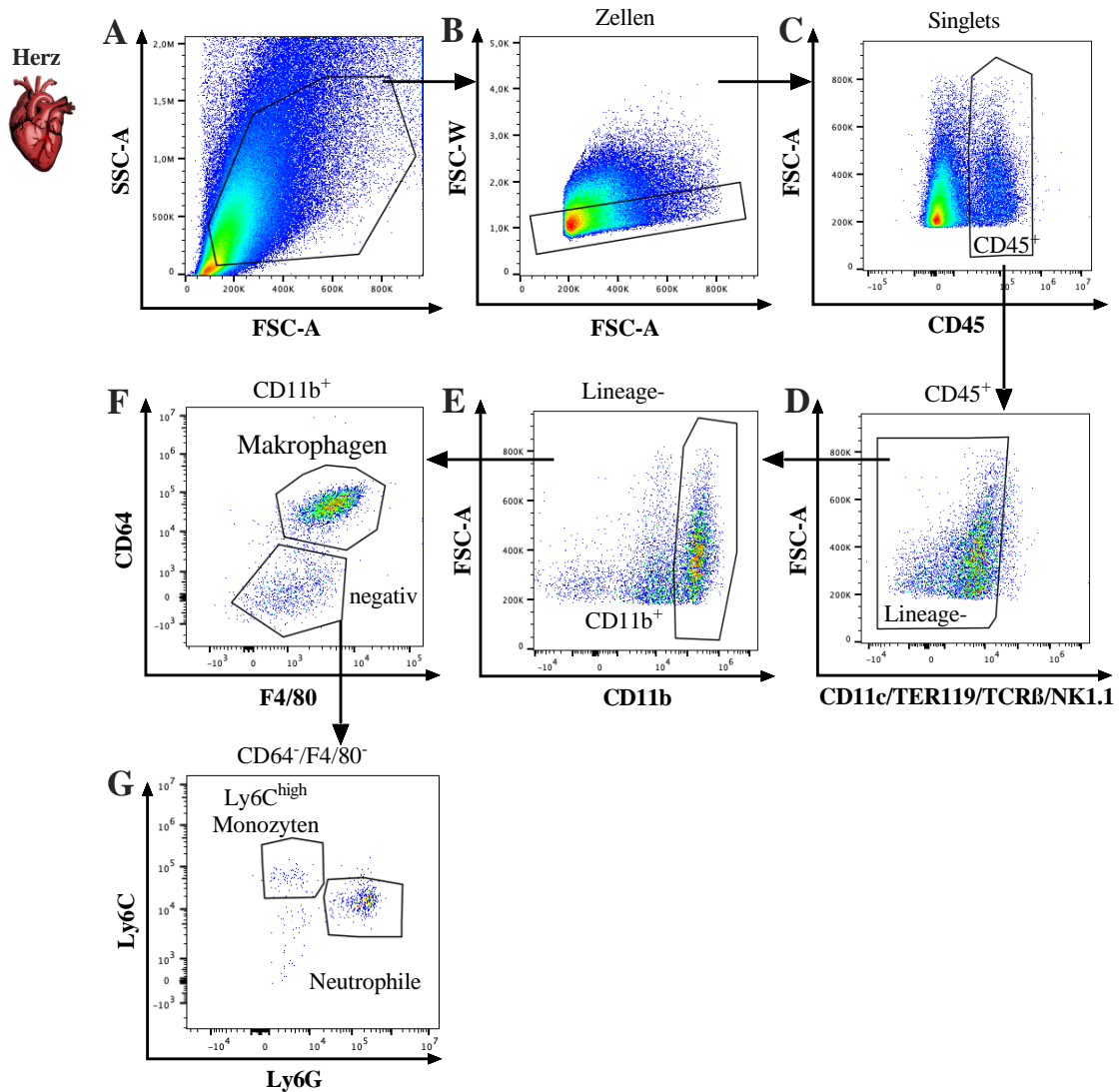
## IV. ERGEBNISSE

### 1. Verteilung kardialer Makrophagen unter Ruhebedingungen

Zuerst wurde die Verteilung der Makrophagen im gesunden Myokard erfasst. Mithilfe der Linie Rank<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>eYFP</sup> konnten hierbei Dottersack abstammende Makrophagen durch eYFP-Expression identifiziert werden (siehe Kapitel III.2.1). Bei der durchflusszytometrischen Analyse von 12 Wochen alten Mäusen wurde die in Abbildung 7 dargestellte Gating-Strategie verwendet. Es ergab sich ein Anteil von 80-85 % eYFP<sup>+</sup> Makrophagen (120)<sup>1</sup>. Mikroglia, die fast vollständig von Vorläufern aus dem Dottersack abstammen (54, 58), dienten als Kontrollorgan. Hier waren ~98 % der Zellen positiv und deuteten somit auf eine dauerhaft effiziente Markierung durch die Cre-Rekombinase hin (120). Blutmonozyten dagegen exprimierten kein eYFP (siehe Abbildung 8) (120). Diese Ergebnisse demonstrierten, dass ein Großteil der residenten Makrophagen unter Ruhebedingungen ursprünglich aus dem Dottersack stammte. Es kann davon ausgegangen werden, dass eYFP<sup>+</sup> Makrophagen sich dagegen größtenteils aus hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark entwickelten. Diese Population machte mit 15-20 % den deutlich kleineren Anteil der myokardialen Makrophagen aus.

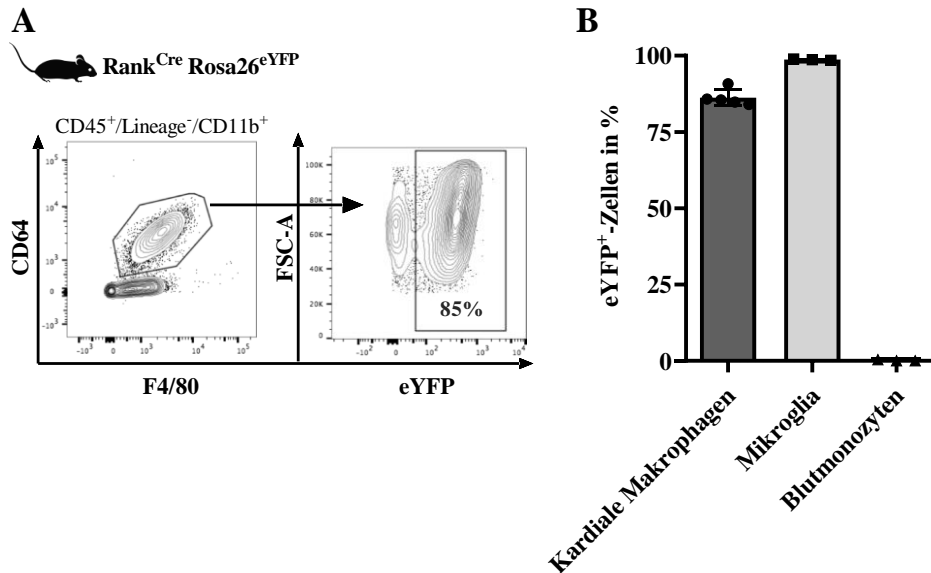
---

<sup>1</sup> Teile der hier gezeigten Ergebnisse wurden in einem gemeinsamen Paper der Arbeitsgruppe publiziert. Die Zitation im Fließtext und in der Legende zu den Abbildungen bezieht sich auf den im Mai 2024 von eLife veröffentlichten Artikel.



### Abbildung 7: Gating-Strategie in der durchflusszytometrischen Analyse

- A:** SSC-A (Side Scatter-Area) und FSC-A (Forward Scatter-Area) wurden gegeneinander aufgetragen und die Zellen im Bereich der gesuchten Granularität und Größe eingeschlossen. Jeder Punkt stellt eine Zelle dar.
- B:** Durch Auftragen von FSC-W (Forward Scatter-Width) gegen FSC-A wurden zunächst Zell-Dubletten anhand ihres Verhältnisses A/W von der Zellanalyse ausgeschlossen.
- C:** Aus den Singlets (= einzelne Zellen) wurden  $CD45^+$  Leukozyten und hämatopoetische Zellen eingegrenzt.
- D:** Ein weiterer Teil der Zellpopulationen wurde anhand ihrer Molekülexpression ausgeschlossen und als Lineage bezeichnet ( $CD11c^+$  dendritische Zellen,  $TER119^+$  erythroide Zellen,  $TCR\beta^+$  T-Zellen,  $NK1.1^+$  Natürliche Killerzellen).
- E:** Aus den verbleibenden Zellen wurden  $CD11b^+$  myeloide Zellen eingeschlossen.
- F:** Makrophagen wurden als  $CD64^+F4/80^+$  Population definiert.
- G:** Monozyten wurden aus den  $CD11b^+$ -Zellen als  $CD64^-F4/80^-Ly6G^-Ly6C^{high}$  abgegrenzt, Neutrophile als  $Ly6G^+Ly6C^+$  Zellen. (120)

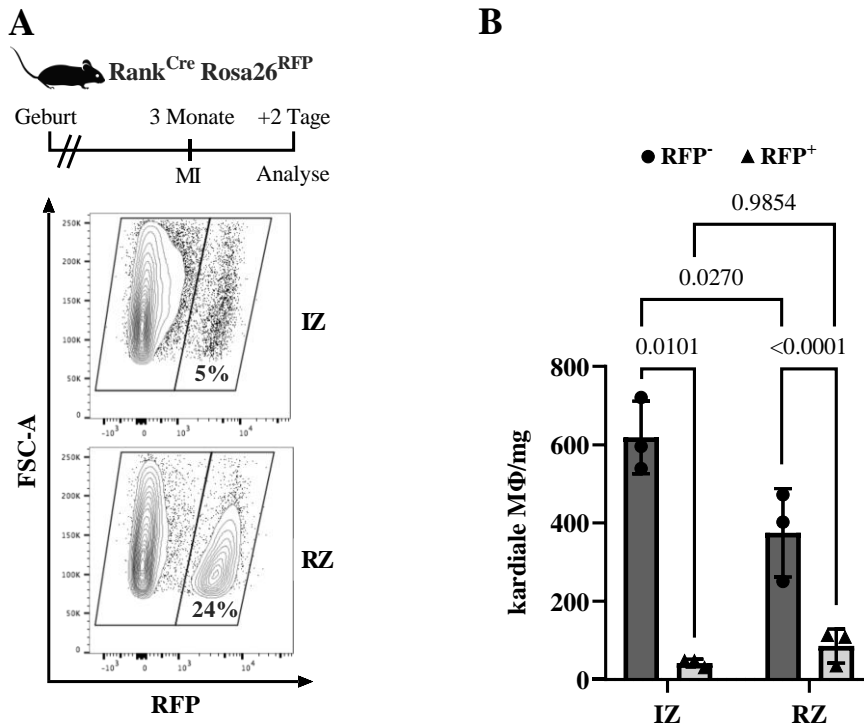


### Abbildung 8: Kardiale Makrophagen unter Ruhebedingungen

Durchflusszytometrische Analyse von Mäuseherzen der Linie  $\text{Rank}^{\text{Cre}}\text{Rosa26}^{\text{eYFP}}$ . (A) Anteil der eYFP-exprimierenden Dottersack-Makrophagen an der eingegrenzten Makrophagenpopulation. (B) Im Vergleich Anteil der eYFP-Expression in Mikroglia und Blutmonozyten. Gezeigt wird jeweils der Mittelwert  $\pm$  SD. (n = 3-5) (120)

## 2. Verteilung Dottersack abstammender Makrophagen in kardialer Inflammation

Als Nächstes wurde die Verteilung der DS-Makrophagen in der akuten Inflammation bestimmt. Hierbei wurde durch das Modell der Ischämie/Reperfusion (I/R, siehe Kapitel III.3) ein transienter Myokardinfarkt simuliert. An Tag 2 nach I/R wurde die Verteilung in  $\text{Rank}^{\text{Cre}}\text{Rosa26}^{\text{RFP}}$ -Mäusen im Herzen durchflusszytometrisch untersucht. Es wurde zwischen Infarktzone (IZ) und umliegenden, nicht betroffenen Myokard (Remotezone = RZ) unterschieden. Dabei waren in der RZ nur noch ~25 % der Makrophagen Rank-positiv, im Infarktbereich sogar nur um die 5 % (siehe Abbildung 9) (120).



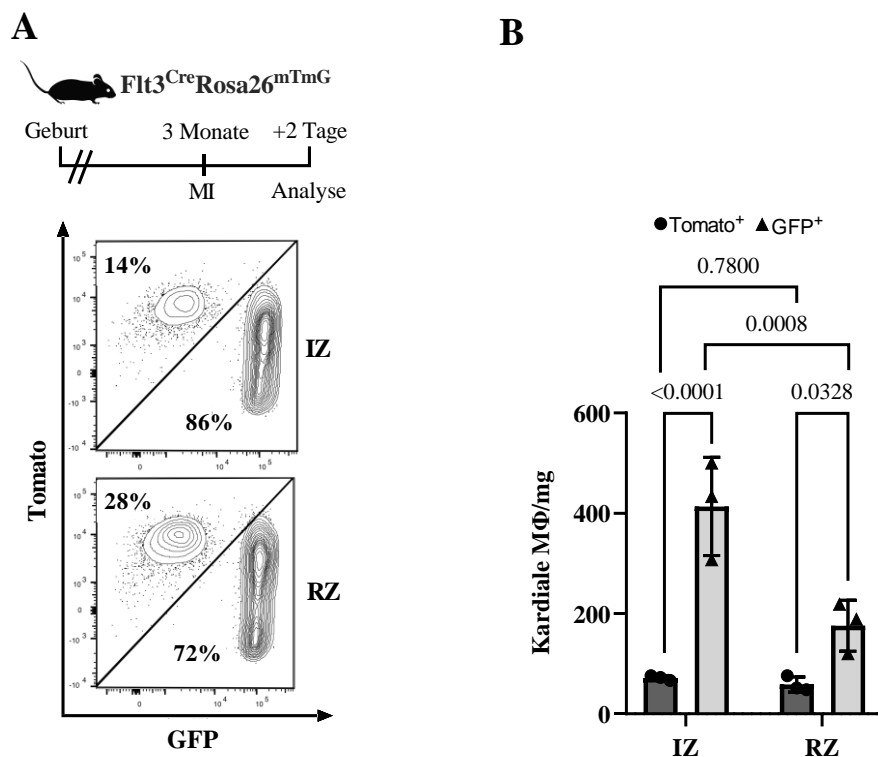
### Abbildung 9: Anteil der DS-Makrophagen in der kardialen Inflammation

Mäuse der Linie Rank<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>RFP</sup> wurden 2 Tage nach I/R durchflusszytometrisch untersucht. **(A)** Anteil an RFP<sup>+</sup> Dottersack-Makrophagen in Infarkt (IZ)- und Remotezone (RZ) sowie **(B)** Anzahl kardialer Makrophagen pro Milligramm Gewebe, abhängig von ihrer RFP-Expression. RFP<sup>-</sup> Zellen exprimierten kein Dottersack-spezifisches Rank-Signal. Der Fisher's LSD-Test wurde in allen Experimenten angewandt. Gezeigt wird jeweils der Mittelwert ± SD, der p-Wert wird numerisch angegeben. (n = 3) (120)

Nach MI machten vom Dottersack abstammende Makrophagen, im Vergleich zur hohen Dichte unter Ruhebedingungen, also nur einen kleinen Anteil der ansässigen Makrophagenpopulation aus. Dies zeigte sich besonders deutlich im Infarktbereich. Die Mehrheit an Zellen schien während des Entzündungsprozesses über das Blut in das Herz einzuwandern. Um eine bessere Aussage über die Zusammensetzung der beiden Populationen zu erhalten, wurde im nächsten Versuch der Fokus auf die des Knochenmarks abstammenden Makrophagen gelegt.

### 3. Verteilung Knochenmark abstammender Makrophagen in kardialer Inflammation

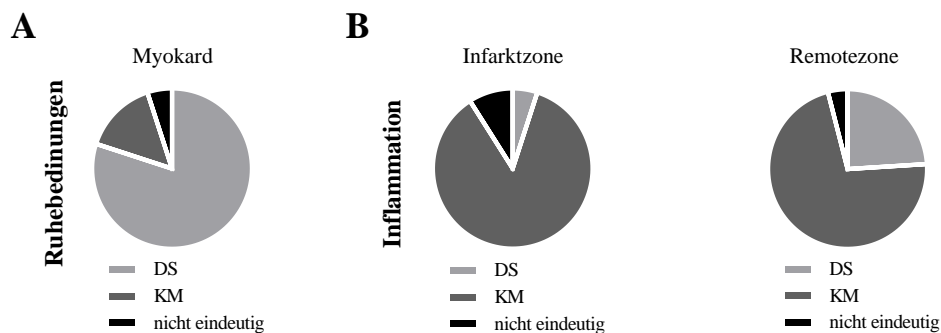
Zur Differenzierung von KM-Makrophagen wurde das in Kapitel III.2.2 beschriebene Mausmodell  $Flt3^{Cre}Rosa26^{mTmG}$  verwendet und durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei wurden definitiv hämatopoetische, Flt3-abhängige Zellen aus dem Knochenmark GFP-positiv markiert. Nicht Flt3-abhängige Zellen dagegen blieben Tomato-positiv. Der Versuchsaufbau glich dabei dem Modell der  $Rank^{Cre}Rosa26^{RFP}$ -Mausversuche in Kapitel IV.2. Bei der Analyse des Myokards konnte zwei Tage nach I/R eine hohe Anzahl an  $GFP^{+}$  Makrophagen beobachtet werden. In der IZ waren die KM-Makrophagen mit ~85 % deutlich erhöht, aber auch in der RZ repräsentierten diese mit ~70 % die absolute Mehrheit ansässiger Makrophagen (siehe Abbildung 10) (120).



#### Abbildung 10: Anteil der KM-Makrophagen in der kardialer Inflammation

Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von  $Flt3^{Cre}Rosa26^{mTmG}$ -Mäusen zwei Tage nach I/R. (A) Anteil der  $GFP^{+}$  Knochenmark-Makrophagen an der Gesamtmakrophagenpopulation. Makrophagen mit exprimiertem Tomato-Signal entwickelten sich Flt3-unabhängig. (B) Verteilung der GFP-positiven und Tomato-positiven Makrophagen pro Milligramm Gewebe in Infarkt (IZ)- und Remotezone (RZ). Der Fisher's LSD-Test wurde in allen Experimenten angewandt. Gezeigt wird jeweils der Mittelwert  $\pm$  SD, der p-Wert wird numerisch angegeben. (n = 3) (120)

Die Einwanderung von KM-Makrophagen in das Herz während der akuten Entzündungsphase konnte hiermit bestätigt werden. Besonders deutlich erwies sich die Zunahme im Infarktbereich. Diese Ergebnisse ergänzten sich gut mit der Analyse des Rank<sup>Cre</sup>-Modells (siehe Abbildung 9). Tomato-positive und damit Knochenmark unabhängige Makrophagen blieben in dieser akuten Phase in ähnlichen Zahlen in beiden Zonen des Myokards präsent. In Abbildung 11 wurden die relativen Anteile der jeweiligen Makrophagenpopulation zur Übersichtlichkeit noch einmal dargestellt.



**Abbildung 11: Übersicht der Makrophagenpopulationen in Ruhe und nach I/R**  
Schematische Darstellung der relativen Makrophagenpopulationen im Myokard in Zusammenschau der Mauslinien Rank<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>eYFP/RFP</sup> und Flt3<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>mTmG</sup> (A) unter Ruhebedingungen und (B) zwei Tage nach I/R in der Remote- und Infarktzone.

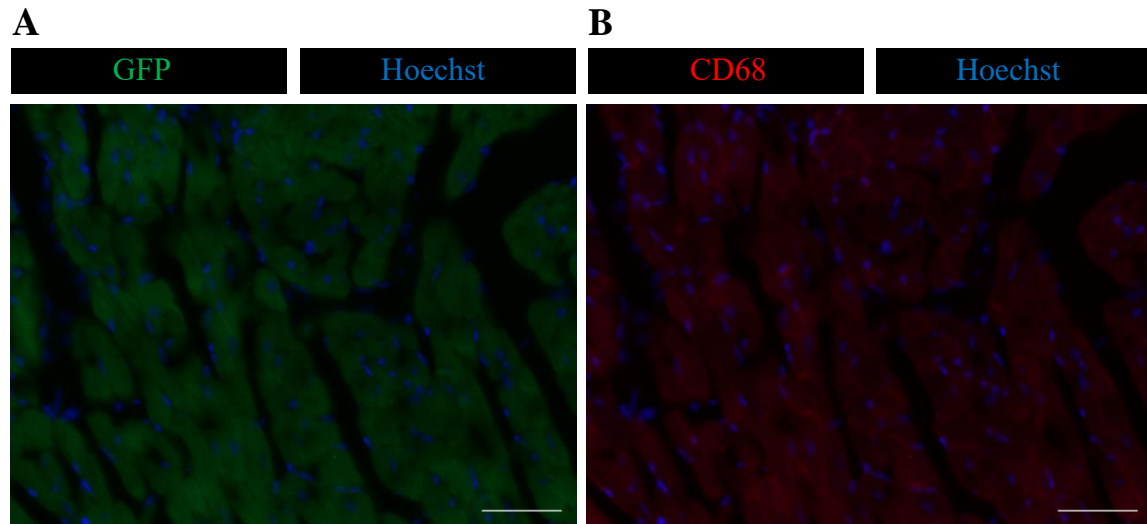
#### 4. Verteilung Knochenmark abstammender Makrophagen im Verlauf nach I/R

Als nächstes wurde die Verteilung der Makrophagenpopulationen in der chronischen Phase nach Myokardinfarkt analysiert. Dreißig Tage nach I/R wurde eine histologische Untersuchung der Linie Flt3<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>mTmG</sup> wie in Kapitel III.6.3.2 beschrieben durchgeführt.

Eine Verfälschung der CD68<sup>+</sup> Makrophagenanzahl durch das zelleigene Tomato-Signal des Reporters mTmG konnte durch einen histologischen Vergleich ohne Immunfluoreszenzfärbung ausgeschlossen werden. Auch wenn beide Signale Licht in einem ähnlichen Spektrum emittieren, zeigte Tomato ohne die Verstärkung durch einen Antikörper eine deutlich schwächere Signalintensität und spielte somit in der Auswertung



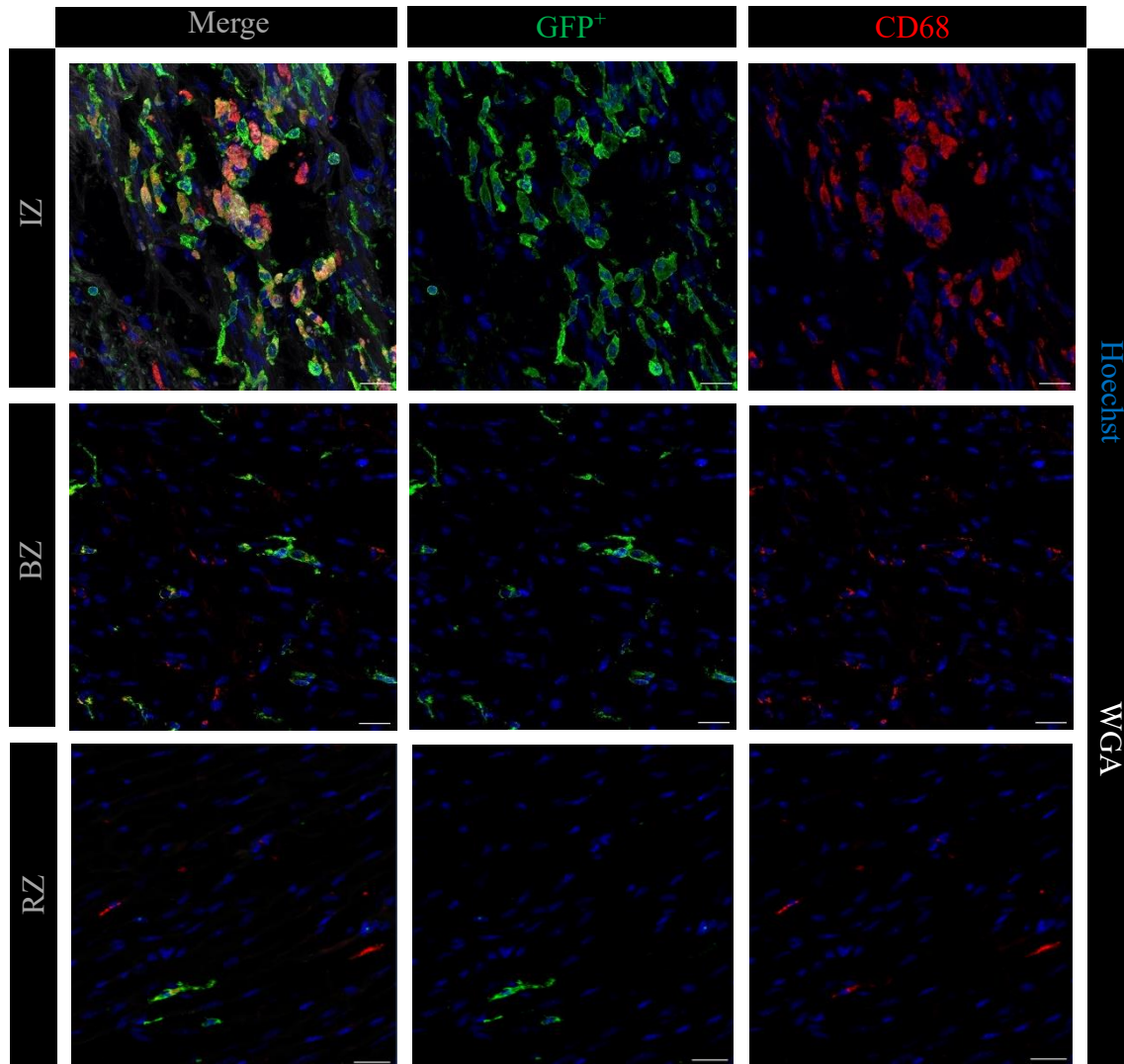
keine Rolle. Zur Kontrolle der Antikörperspezifität diente eine Isotypfärbung (siehe Abbildung 12).



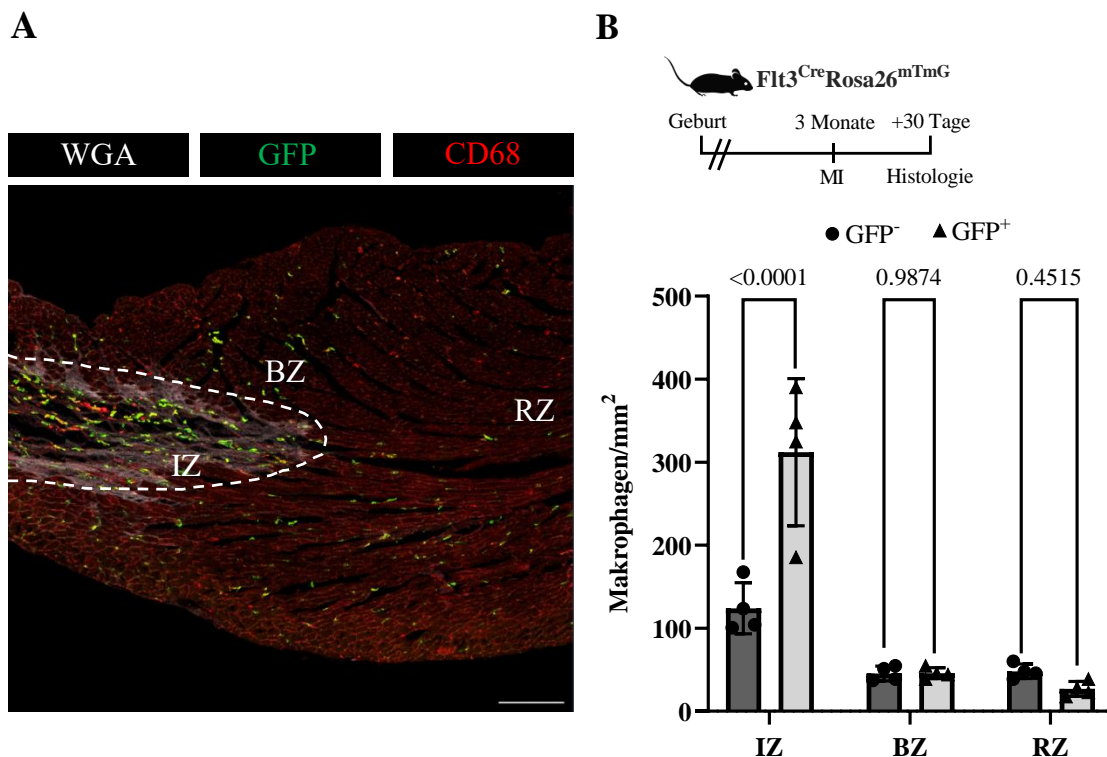
#### Abbildung 12 : Spezifität in der histologischen Analyse

Immunfluoreszenzfärbung von Herzen der Mauslinie  $Flt3^{Cre}Rosa26^{mTmG}$  zeigten keine spezifische Zellbindung unter der Verwendung von Isotypkontrollen der Antikörper anti-GFP (A) und CD68 (B). Der Maßstab  $\cong 20 \mu\text{m}$ .

In die Analyse der Mauserzen wurden neben der Infarkt- und Remotezone der direkt an das Infarktgebiet angrenzende Bereich BZ (border zone, entspricht  $500 \mu\text{m}$ ) miteingeschlossen. Bei der Auswertung zeigte sich eine sichtliche Veränderung der ansässigen Makrophagenpopulationen (siehe Abbildung 13). Während sich in der RZ mit  $\sim 65 \%$  und auch in der BZ mit  $\sim 50 \%$  das Verhältnis 30 Tage nach MI wieder dem Ausgangsniveau annäherte, dominierte in der IZ der Anteil Knochenmark abstammender Makrophagen weiterhin mit  $\sim 75 \%$  (siehe Abbildung 14) (120). Dabei zeigte sich hier im Vergleich weiterhin eine deutlich erhöhte Zellzahl in der IZ mit Werten um die  $436 \text{ Makrophagen}/\text{mm}^2$ , während die Anzahl in der BZ und RZ bedeutend sank (120). Eine signifikante Veränderung der Makrophagenpopulationen nach I/R beschränkte sich in der chronischen Phase also vor allem auf die Infarktzone.



**Abbildung 13: Verteilung der Knochenmark-Makrophagen nach I/R im Verlauf**  
 Konfokalmikroskopische Aufnahmen von gefärbten Mausherzen der Linie  $Flt3^{Cre}Rosa26^{mTmG}$  30 Tage nach MI mit repräsentativer Darstellung der einzelnen Zonen. In der IZ ist im Gegensatz zur BZ und RZ weiterhin eine deutlich erhöhte Zellzahl zu erkennen. Makrophagen sind  $CD68^+$  markiert,  $CD68^+GFP^+$  doppelt positive Zellen sind  $Flt3$ -abhängig und stammen aus dem Knochenmark. Der Maßstab  $\cong 20 \mu m$ . (n = 4)



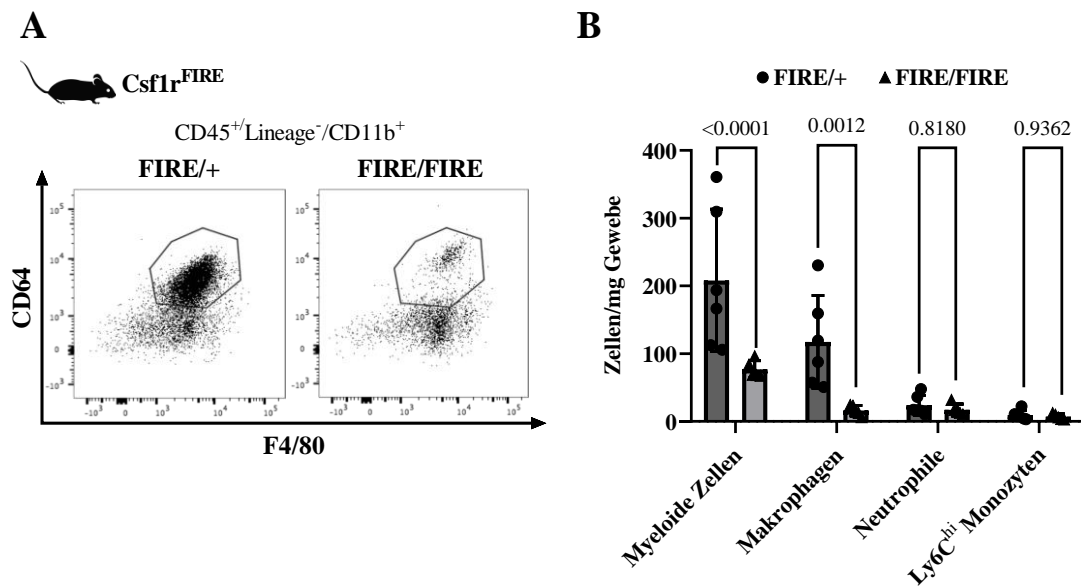
#### Abbildung 14: Anteil der KM-Makrophagen nach I/R im Verlauf

Histologische Untersuchung der Linie Flt3<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>mTmG</sup> 30 Tage nach MI. (A) Konfokalmikroskopische Übersichtsaufnahme mit Darstellung von IZ, BZ und RZ. Die Infarkt Narbe (gestrichelte Linie) ist anhand der Färbung mit WGA (weiß) erkennbar. Der Maßstab  $\cong 200 \mu\text{m}$ . (B) Histologische Auswertung der kardialen Makrophagen pro mm<sup>2</sup> Gewebe. Darstellung der Anzahl GFP<sup>-</sup> Dottersack-Makrophagen und GFP<sup>+</sup> Knochenmark-Makrophagen im zeitlichen Verlauf nach Myokardinfarkt. Der Fisher's LSD-Test wurde in allen Experimenten angewandt. Gezeigt wird jeweils der Mittelwert  $\pm$  SD, der p-Wert wird numerisch angegeben. (n = 4) (120)

### 5. Makrophagenpopulation im FIRE-Modell nach I/R

Mithilfe des FIRE-Modells wird die Expression von Csf1r stark reduziert und somit gezielt residente Makrophagen im Herzen depletiert. Durch einen genetischen *Knock-out* des Superenhancers FIRE wurde dabei die Transkription des Csf1-Rezeptors unterdrückt, welcher essenziell für die Reifung und das Überleben der Gewebemakrophagen ist (siehe Kapitel III.2.3). Im ersten Schritt wurden hierbei Herzen homozygoter (reduzierte Csf1r-Expression) und heterozygoter (normale Csf1r-Expression) Tiere in der durchflusszytometrischen Analyse verglichen (siehe Abbildung 15A). Dabei zeigte sich bei den homozygoten Proben eine deutliche Reduktion der Makrophagen um ~80 %, bei den heterozygoten Tieren blieb die Anzahl annähernd im Normbereich (120), wie es

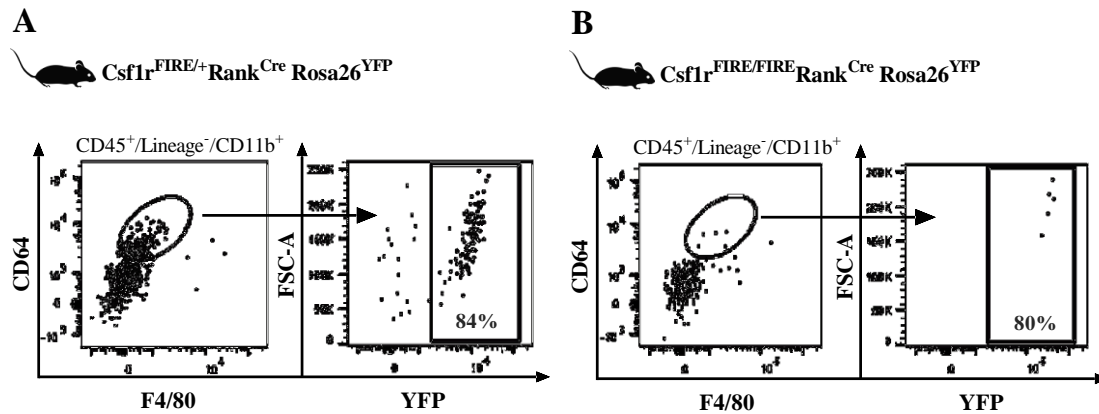
bereits von R. Rojo et al. (88) beschrieben wurde. Andere myeloide Zellen waren dabei nicht betroffen (siehe Abbildung 15B) (120). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die residenten Makrophagen bei einem *Knock-out* in  $Csf1r^{FIRE/FIRE}$ -Mäusen hauptsächlich aus dem Dottersack stammten.



**Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der Linie  $Csf1r^{FIRE}$**

Repräsentative durchflusszytometrische Analyse heterozygoter und homozygoter Tiere der  $Csf1r^{FIRE}$ -Mauslinie. (A) Die Makrophagenpopulation im Herzen zeigte sich bei  $Csf1r^{FIRE/FIRE}$  im Vergleich zu  $Csf1r^{FIRE/+}$  deutlich reduziert. (B) Im Vergleich waren andere myeloide Zellen kaum betroffen. Der Fisher's LSD-Test wurde in allen Experimenten angewandt. Gezeigt wird jeweils der Mittelwert  $\pm$  SD, der p-Wert wird numerisch angegeben. (n = 5) (120)

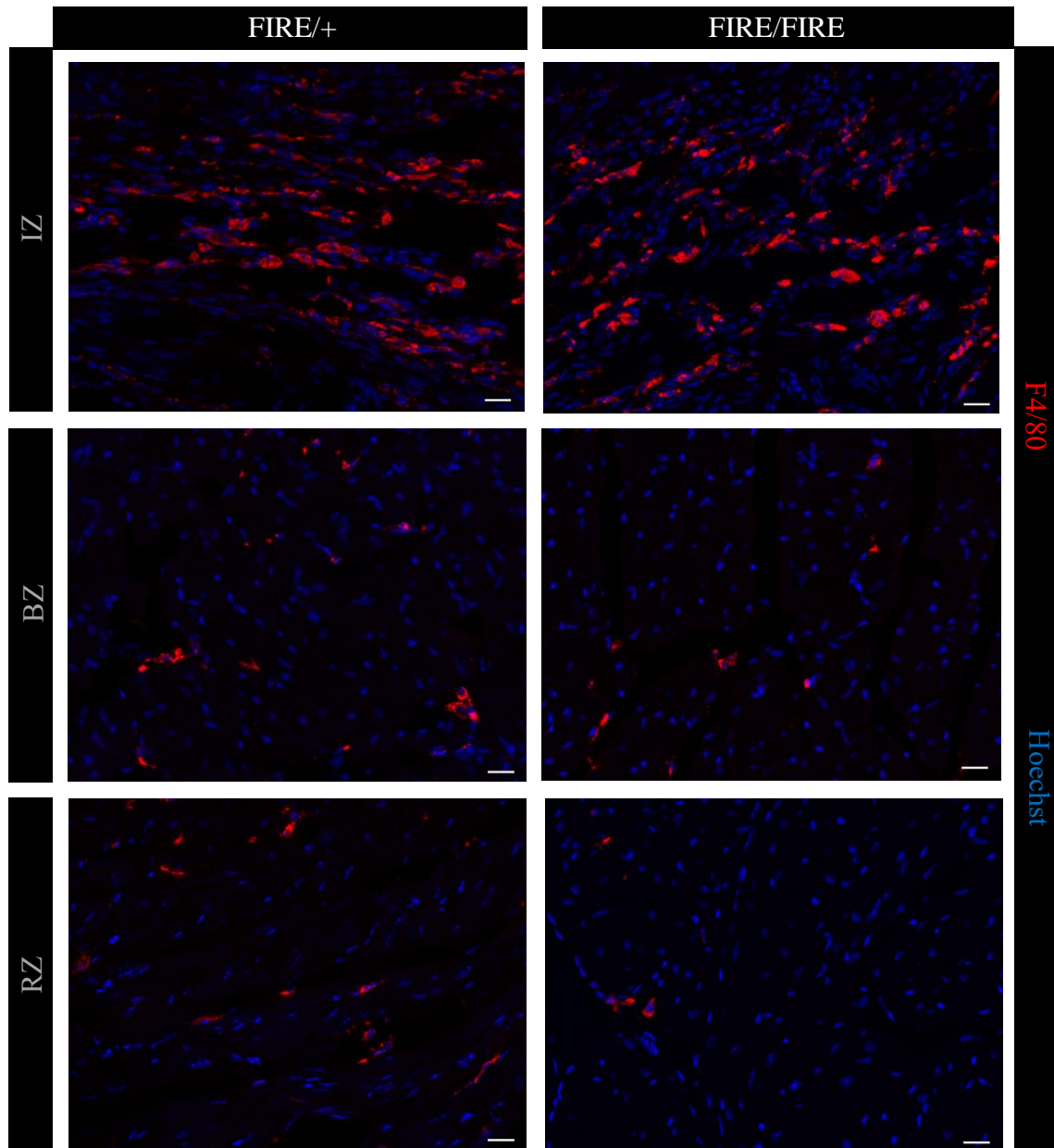
Um diese Annahme zu bestätigen, wurde ein weiterer Versuch mit der Mauslinie  $Csf1r^{FIRE}Rank^{Cre}Rosa26^{YFP}$  durchgeführt (120). Die Kreuzung mit Rank-exprimierenden Tieren ermöglichte hierbei die ontogenetische Differenzierung der Makrophagen im FIRE-Modell. Durchflusszytometrisch zeigten sich hier bei  $Csf1r^{FIRE/FIRE}$  und  $Csf1r^{FIRE/+}$  im Vergleich mit der Linie  $Rank^{Cre}Rosa26^{YFP}$  (siehe Kapitel IV.1) nahezu gleiche Werte für YFP-positive Makrophagen um die 80 % (siehe Abbildung 16). Die Reduktion der Makrophagen war dabei im mit  $Rank^{Cre}Rosa26^{YFP}$  gekreuzten *Knock-out*-Modell mit ~80 % konstant.



**Abbildung 16: Makrophagenpopulationen der Linie  $Csf1r^{FIRE}Rank^{Cre}Rosa26^{YFP}$**   
 Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Mauslinie  $Csf1r^{FIRE}Rank^{Cre}Rosa26^{YFP}$  im Herzen. (A) Der Anteil YFP<sup>+</sup> Dottersack-Makrophagen des heterozygoten Tieres entspricht in etwa dem, des in (B) dargestellten homozygoten Tieres bei reduzierter Makrophagenanzahl im FIRE-Modell. (n = 1)

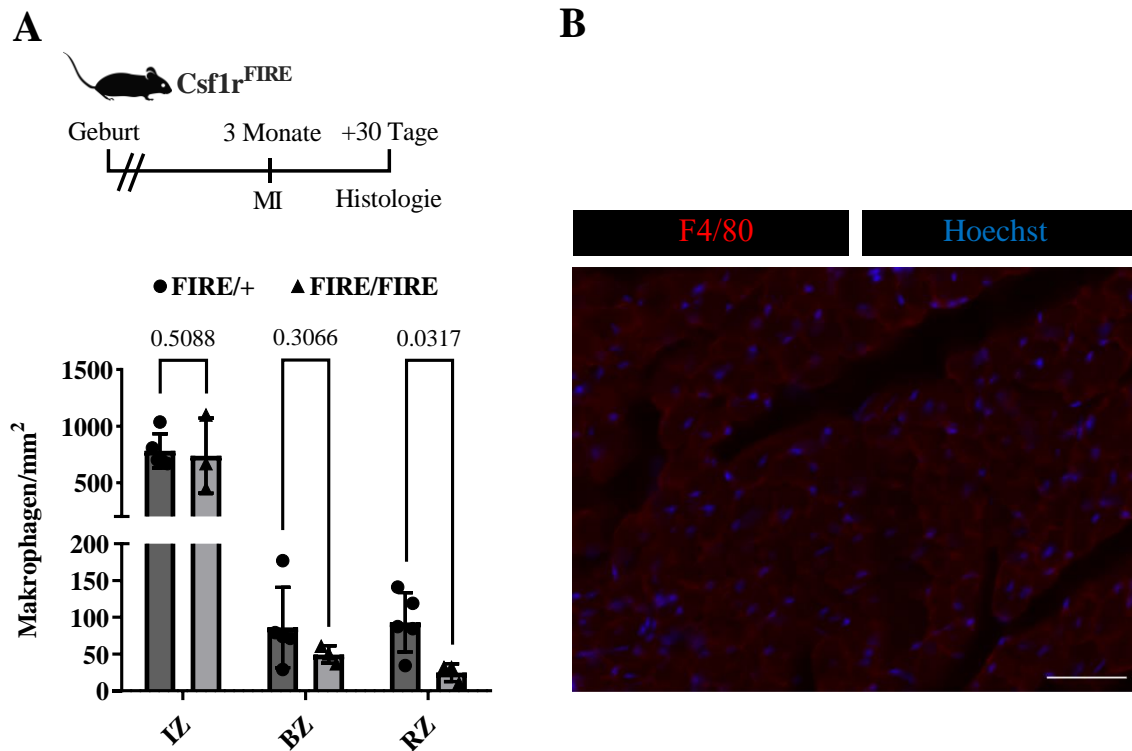
Die  $Csf1r^{FIRE}$ -Linie stellte damit ein geeignetes Modell zur weiteren Definition der residenten, mehrenteils des Dottersacks abstammenden Makrophagen dar. Daraufhin wurde bei Versuchstieren dieser Linie ebenfalls ein Herzinfarkt nach dem Modell der I/R durchgeführt und nach 30 Tagen histologisch untersucht. In der RZ von  $Csf1r^{FIRE/FIRE}$ -Mäusen zeigte sich eine deutliche Verminderung residenter Makrophagen im Vergleich zu heterozygoten Versuchstieren. In der BZ war ebenfalls eine, wenn auch weniger deutliche Verminderung erkennbar, während sich im Infarktbereich kein Unterschied in der Zellzahl zeigte (siehe Abbildung 17 und 18) (120).





**Abbildung 17: Repräsentative Aufnahmen der Makrophagenpopulation im FIRE-Modell nach I/R**

Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen 30 Tage nach I/R in  $Csf1r^{FIRE/+}$ - und  $Csf1r^{FIRE/FIRE}$ -Tieren. Die Infarktzone zeigt im Gegensatz zur Border- und Remotезone keinen Rückgang der  $F4/80^+$  Makrophagenpopulation. Der Maßstab  $\cong 20 \mu\text{m}$ .



**Abbildung 18: Histologische Auswertung der Makrophagen im FIRE-Modell nach I/R**

(A) Makrophagenanzahl homozygoter und heterozygoter Tiere der Linie  $Csf1r^{FIRE}$  30 Tage nach I/R. Der Fisher's LSD-Test wurde in allen Experimenten angewandt. Gezeigt wird jeweils der Mittelwert  $\pm$  SD, der p-Wert wird numerisch angegeben. ( $n = 5$  für  $Csf1r^{FIRE/+}$  und  $n = 3$  für  $Csf1r^{FIRE/FIRE}$ ) (120) (B) Die Isotypkontrolle des Antikörpers F4/80 zeigte keine spezifische Zellbindung im Herzen. Der Maßstab  $\cong 20 \mu\text{m}$ .

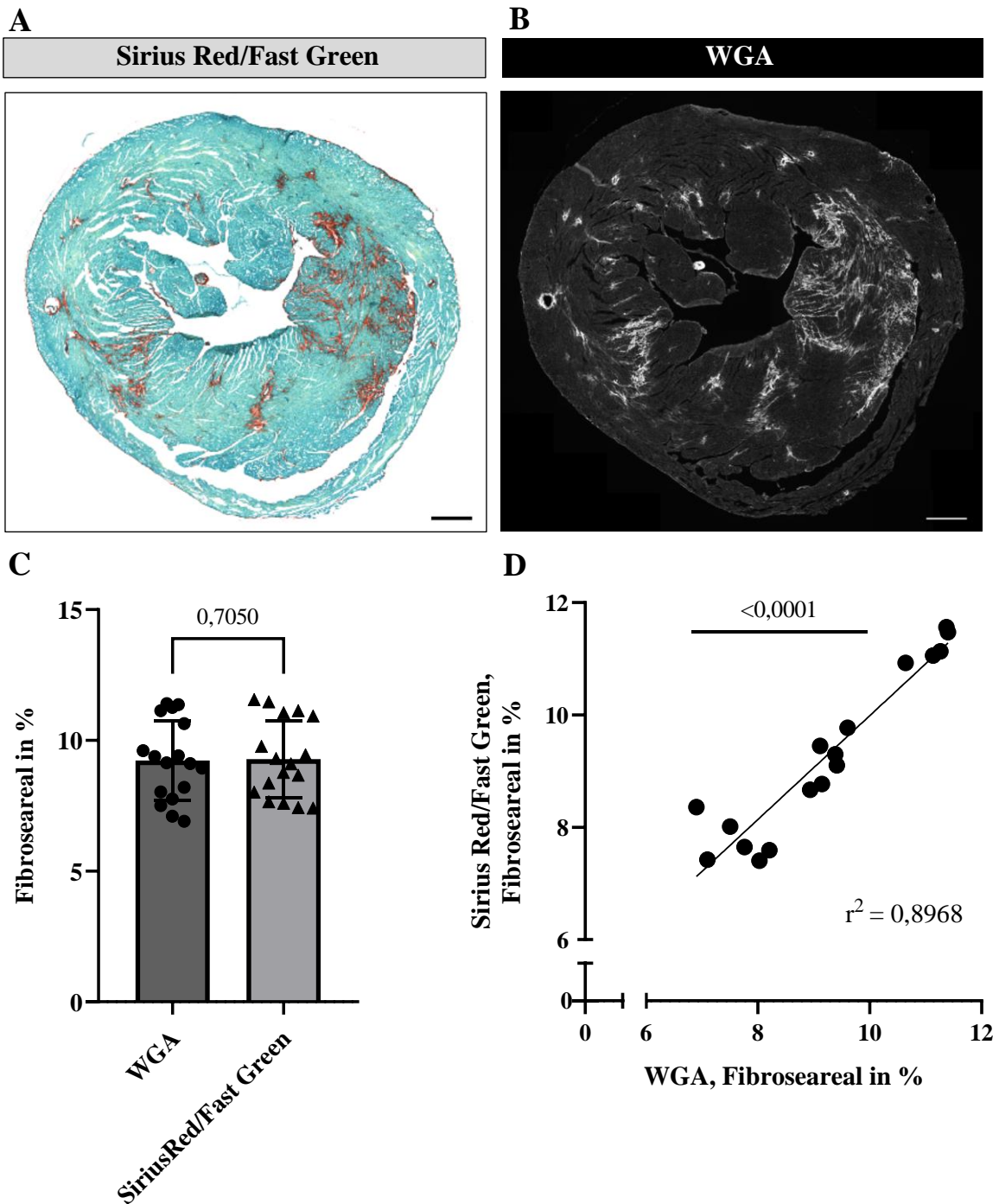
## 6. Einfluss residenter Makrophagen auf die Infarktnarbe nach I/R

Die Abwesenheit von residenten Gewebemakrophagen veränderte in unseren Versuchen mit dem FIRE-Modell die Makrophagenpopulationen nach Myokardinfarkt. Im Folgenden sollte nun der Einfluss der residenten Gewebemakrophagen auf die Ausbildung einer fibrotischen Infarktscarre histologisch untersucht werden.

Die Färbung mit Sirius Red/Fast Green ist eine etablierte Methode, um histologisch Fibroseareale darzustellen (114, 117, 121). Bei einer Immunfluoreszenzfärbung mit WGA können jedoch zusätzlich zielgerichtet Zellen in der myokardialen Fibrose markiert werden, wie bereits in den vorherigen Versuchen dargestellt. In einem Vergleich der

beiden Färbemethoden (siehe Kapitel III.6.5) zeigte der t-Test mit  $p = 0.7050$ , dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen vorlag (siehe Abbildung 19). Der Mittelwert der Abweichung unter den verbundenen Proben betrug lediglich 0,0458. Der berechnete Korrelationskoeffizient  $r = 0,9470$  ( $p < 0,0001$ ) und Determinationskoeffizient  $r^2 = 0,8968$  ( $p < 0,0001$ ) weisen indessen auf einen hohen linearen Zusammenhang hin. Somit bestätigte die Analyse, dass sich die Ergebnisse der beiden Methoden nur in sehr geringem Maße unterscheiden. Im Folgenden wurde aufgrund der Vorzüge die Immunfluoreszenzfärbung mit WGA zur Analyse des Fibroseareals bevorzugt.

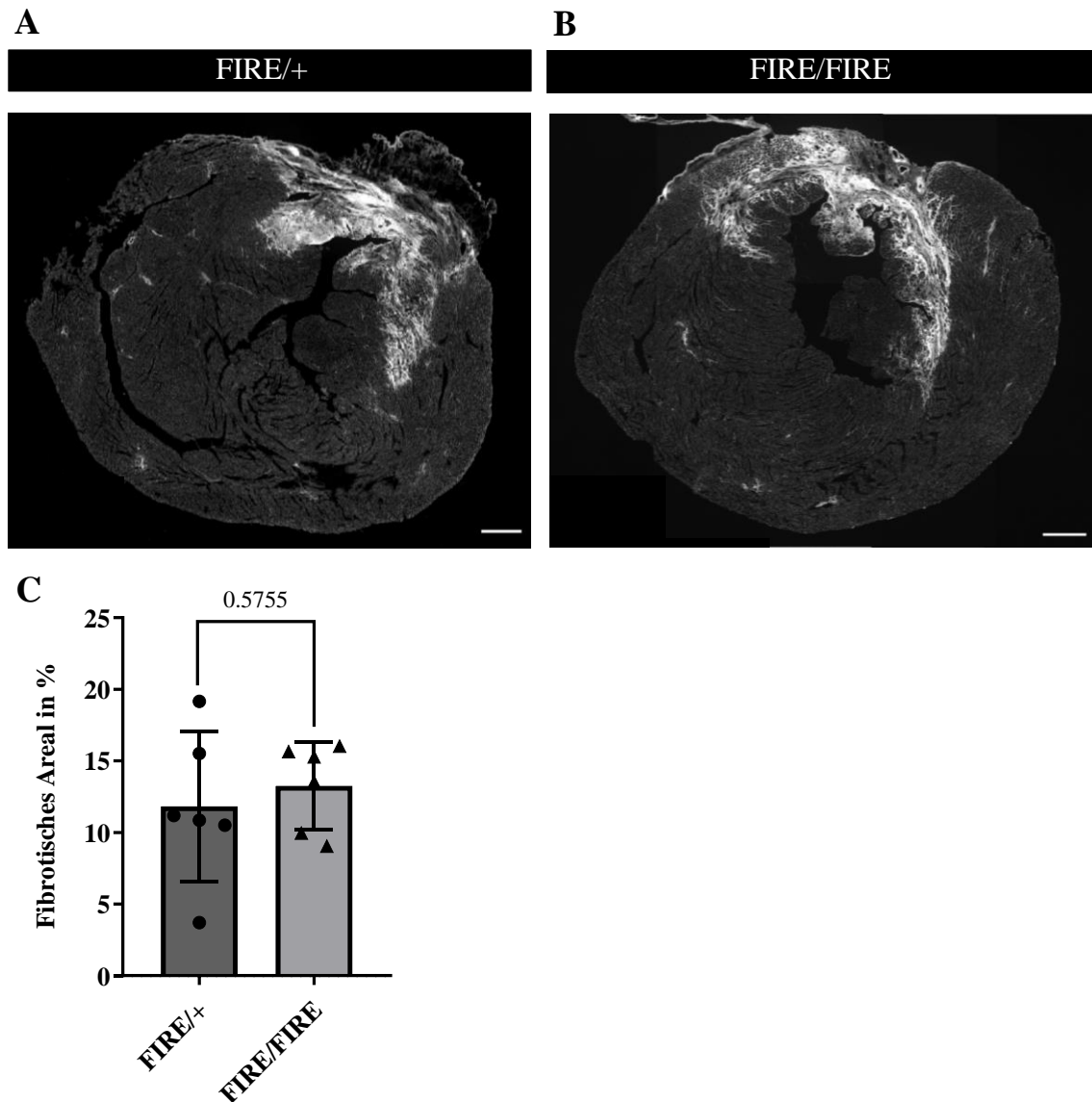




### Abbildung 19: Vergleich der Färbemethoden

Färbung von C57BL/6J-Mäusen 30 Tage nach Einsetzen einer Angiotensin-II-Pumpe, welche zur Ausbildung eines Fibroseareals im Herzen führt. (A) Färbung mit Sirius Red/Fast Green, Fibroseareal in Rot und (B) Immunfluoreszenzfärbung mit WGA, Fibroseareal in Weiß. Der Maßstab  $\cong 500 \mu\text{m}$ . (C) Prozentualer Anteil der Fibrose am Myokard im Vergleich. Es wurde ein verbundener t-Test durchgeführt, jeder Punkt zeigt eine gefärbte Probe. (D) Streuung der verbundenen Probenpaare mit Angabe des Determinationskoeffizienten  $r^2$ . Es wird jeweils der Mittelwert  $\pm$  SD gezeigt, der p-Wert wird numerisch angegeben. ( $n = 3$ )

Dreißig Tage nach I/R wurde daraufhin eine histologische Färbung wie in Kapitel III.6.3 beschrieben durchgeführt und die Größe des infarzierten Bereichs in Relation zum Myokard bei  $Csf1r^{FIRE/FIRE}$  und  $Csf1r^{FIRE/+}$ -Tieren gemessen (siehe Abbildung 20). Bei einer Abwesenheit residenter Makrophagen bei  $Csf1r^{FIRE/FIRE}$  zeigte sich jedoch kein Unterschied im Vergleich zu heterozygoten Tieren (120). Die Ergebnisse lieferten zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Abweichung in der Infarktgröße.



**Abbildung 20: Einfluss residenter Makrophagen auf die Infarktnarbe nach I/R**

Histologische Analyse von Herzen der Linie  $Csf1r^{FIRE}$  30 Tage nach Infarkt. (A) Repräsentative Aufnahmen nach Immunfluoreszenzfärbung mit WGA zeigen eine deutlich ausgebildete Infarktnarbe (weiß) in  $Csf1r^{FIRE/+}$ - und  $Csf1r^{FIRE/FIRE}$ -Tieren. Der Maßstab  $\cong 500 \mu\text{m}$ . (B) Prozentualer Anteil des fibrotischen Areals am Myokard im Vergleich (120), jeder Punkt entspricht einem Einzelexperiment. Der Student's t-Test wurde in allen Experimenten angewandt. Gezeigt wird jeweils der Mittelwert  $\pm$  SD, der p-Wert wird numerisch angegeben. (n = 6 je Gruppe)

## V. DISKUSSION

Makrophagen sind maßgeblich an Entzündungs- und Heilungsprozessen beteiligt. Erst in den letzten Jahren konnte eine divergierende ontogenetische Herkunft von Gewebemakrophagen aus dem Dottersack und dem Knochenmark differenziert werden. Ein besseres Verständnis der kardialen Makrophagenpopulationen und deren Verhalten bei einem Myokardinfarkt birgt die Möglichkeit potenter neuer Therapieansätze bei kardialen Erkrankungen. Ziel dieser Arbeit war es, die Verteilung der Makrophagen in Anbetracht ihres Ursprunges im Modell der I/R zu analysieren und das Verhalten der residenten Makrophagen durch ein genetisches *Knock-out*-Modell genauer zu definieren. Dabei sollten die in Kapitel II formulierten Fragestellungen beantwortet werden.

### 1. Kardiale Gewebemakrophagen stammen größtenteils aus dem Dottersack

DS-Makrophagen wandern während der embryonalen Entwicklung ins Gewebe ein und können durch Selbsterneuerung bis ins adulte Alter persistieren (122). Je nach Gewebe unterscheidet sich ihr Anteil an der Makrophagenpopulation erheblich (81) und ist noch nicht abschließend geklärt. Im Herzen machen Makrophagen etwa 5-10 % der Nicht-Myozyten aus und sind damit die größte Immunzellpopulation (123, 124). Um Veränderungen während einer Inflammation detektieren zu können, ist das Wissen um die ontogenetische Verteilung der Makrophagenpopulation unter Ruhebedingungen essenziell. Im Mausmodell  $\text{Ran}^{\text{Cre}}\text{Rosa26}^{\text{eYFP}}$  ergab die durchflusszytometrische Analyse einen Anteil von 80-85 % Dottersack abstammender, residenter Makrophagen (120) und steht dabei in Einklang mit bereits bestehenden Studien (123, 125, 126). Eine nahezu vollständige Markierung der Mikroglia bestätigte die Effizienz des Modells und lieferte die Basis für Versuche bei Myokardinfarkt.

Die Durchflusszytometrie ist eine in hohem Maße etablierte und viel genutzte Labormethode, die es seit den 1960er Jahren erlaubt, Leukozyten und andere Zellgruppen zu differenzieren und charakterisieren (127, 128). In diesem Versuch ließen sich mithilfe der häufig verwendeten Makrophagen-Marker F4/80 (129, 130) und CD64 (123, 131, 132) doppelt positive Zellen als Makrophagenpopulation identifizieren. Andere Zellen,

welche ebenfalls diese Marker exprimieren können, wie beispielsweise dendritische Zellen (133) und Monozyten (134), wurden durch die verwendete Gating-Strategie weitestgehend ausgeschlossen.

Um einen Myokardinfarkt zu simulieren, wurde bei den Versuchstieren die linke deszendierende Koronararterie für 60 Minuten abgebunden und anschließend reperfundiert. In anderen Studien wurde häufig auf Verfahren mit einem dauerhaften Verschluss zurückgegriffen (135-138). Bei einer permanenten Ligatur wird von einem erhöhtem nekrotischen Myozytenuntergang durch ischämische Entzündungsprozesse im Vergleich zu I/R ausgegangen (139). Allerdings kann auch die Wiedereröffnung des Gefäßes zu einem Reperfusionsschaden des Gewebes und zur Apoptose der Zellen führen (139). Pathogenetisch differieren diese beiden Mechanismen auf molekularer und enzymatischer Ebene teilweise deutlich (139) und sind somit nicht miteinander gleichzusetzen. Bei einer dauerhaften Ligatur wurde eine abgeschwächte Entzündungsreaktion und reduzierter Makrophageneinstrom nachgewiesen (140). Das Modell der I/R mit Wiedereröffnung des Gefäßes imitiert jedoch einen Herzinfarkt mit rekanalisierender Intervention, welche in der Humanmedizin im Normalfall zeitnah angestrebt wird und das Therapieergebnis deutlich verbessert (3). Durch eine hohe Varianz der Infarktmuster in der Humanmedizin mit unterschiedlichsten Ausprägungen sind genauere Zeitangaben nicht direkt auf Mausmodelle übertragbar. Das hier angewendete I/R-Modell bietet jedoch einen guten Einblick in die Mechanismen eines großen, bis epikardial reichenden Infarkts des linken Ventrikels.

Die differente Herkunft der Makrophagen aus Dottersack und Knochenmark wurde mehrfach belegt (58-61). Kontroversen bestehen jedoch bezüglich Populationen im adulten Herzen. Molawi und Kollegen legten nahe, dass die Proliferationsfähigkeit postnatal rasch abnimmt und die Population im Verlauf vermehrt durch Makrophagen aus dem Knochenmark ersetzt wird (97). Andere Daten unterstützen die Hypothese, dass der Großteil der residenten Makrophagen langfristig und weitgehend unabhängig bestehen bleibt (123, 135, 141). Heidt et al. zeigten in einem Chimären-Modell, dass Monozyten im Blut nach 18 Wochen weitestgehend, kardiale Makrophagen nur etwa zu 10 % durch KM-Zellen ausgetauscht wurden (135). Der hohe Anteil an DS-Makrophagen in den hier durchgeführten Versuchen stützt die letztere These. Messungen mit Tieren

unterschiedlicher Altersgruppen könnten dabei weitere Erkenntnisse zu möglichen Veränderungen der Makrophagenpopulation über die Lebenszeit liefern.

## **2. Nach akuter I/R wandern vermehrt Knochenmark-Makrophagen ein**

In gesunden Mauserzen finden sich schätzungsweise 200-250 Makrophagen pro mg Herzgewebe (142), abhängig von dem Alter des Versuchstieres (143), den untersuchten Gewebeabschnitten (144) sowie Umgebungsfaktoren. Zwei Tage nach durchgeführter I/R war die Anzahl kardialer Makrophagen im Herzen der Linie Rank<sup>Cre</sup> mit über 600 Makrophagen pro mg Gewebe in der IZ deutlich erhöht (120). Dabei sank der Anteil der Dottersack-Makrophagen in der durchflusszytometrischen Analyse von zuvor 80-85 % im Infarktgebiet auf ~5 %, im umliegenden Gewebe auf ~25 % ab (120). Dies legte die Vermutung nahe, dass die absolute Mehrheit an ansässigen Makrophagen aus dem Knochenmark einwanderte. Zur Bestätigung wurden Mäuse der Linie Flt3<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>mTmG</sup> im gleichen Versuchsaufbau gegenübergestellt. Hier ergab sich ein Anteil von ~85 % GFP<sup>+</sup> KM-Makrophagen in der IZ und ~70 % in der RZ (120). Die Ergebnisse sind somit gut mit den Ergebnissen der Rank<sup>Cre</sup>-Linie vereinbar, wobei im Infarktbereich durch eine geringe Diskrepanz der Werte bei schätzungsweise 10 % der Makrophagen keine eindeutige Zugehörigkeit erörtert werden konnte.

Die vermehrte Einwanderung von Makrophagen aus dem Knochenmark in der akuten Inflammation ließ sich hiermit eindeutig bestätigen und steht im Einklang mit weiteren Forschungsergebnissen (135, 137, 138, 141). In Ergänzung bewiesen einige Studien die direkte Entwicklung der Makrophagen im Infarktgebiet aus inflammatorischen Ly6C<sup>high</sup> Monozyten (135, 141). Während bei einer Veröffentlichung von Heidt et al. von einem gänzlichen Verlust der residenten Makrophagen 24 Stunden nach permanenter Ligatur berichtet wurde (135), bestanden in unserem I/R-Modell residente Makrophagen in jeder Zone fort, wenn auch in der IZ in geringer Menge.

In der durchflusszytometrischen Analyse konnte der Einstrom von Makrophagen aus dem KM gezeigt werden, allerdings ließen sich dabei keine Rückschlüsse auf phänotypische Veränderungen der kardialen Populationen in Antwort auf den Infarkt ziehen. Unter

Ruhebedingungen wurden in mehreren Studien bisher vier Makrophagenpopulationen im Herzen beschrieben, abhängig von der Expression von Ly6C, CCR2 und MHCII (123, 125, 126). Bajpai et al. unterschieden durch eine RNA-Sequenzierung in der myokardialen Inflammation mindestens sieben Populationen (141). Auch Dick et al. betonten das Potenzial der Transkriptomanalyse bei Abwesenheit von *Fate mapping* zur Unterscheidung von residenten Makrophagen, z.B. durch TIMD4 (137). Durch derartige Untersuchungsmethoden könnten die Makrophagen in Zukunft weiterführend auf molekularer Ebene charakterisiert werden.

### **3. Knochenmark-Makrophagen dominieren die Infarktzone im Verlauf**

Nach akuter I/R wurde die Makrophagenpopulation auch im weiteren Verlauf untersucht. In der histologischen Analyse war die Anzahl der GFP<sup>+</sup> KM-Makrophagen in der Infarktzone nach 30 Tagen mit ~75 % immer noch deutlich erhöht (120). Die Anzahl und Verteilung in der BZ und RZ näherte sich dagegen wieder Ausgangswerten unter Ruhebedingungen an (120).

Da die Histologie im Gegensatz zur Durchflusszytometrie Rückschlüsse auf die örtliche Verteilung der Zellen zuließ, war die Methode für diesen Zweck besonders geeignet. Es konnte neben der IZ und RZ außerdem der Grenzbereich (BZ) miteingeschlossen und so zusätzliche Informationen über das der IZ direkt anliegende Gewebe gewonnen werden. Durch den verwendeten Antikörper CD68 und die Verstärkung des intrinsischen GFP-Signals ließen sich Makrophagen und Monozyten von anderen Immunzellpopulationen abgrenzen (145).

Es konnte davon ausgegangen werden, dass 30 Tage nach Infarkt die Restitution des Gewebes weitestgehend abgeschlossen war. Die große Anzahl an Monozyten, die in der akuten Phase eingewandert war, veränderte die Zusammensetzung von residenten und rekrutierten Makrophagen im Verlauf dynamisch. Es ließ sich jedoch keine differenzierte Aussage über Repopulationsmechanismen oder langfristige phänotypische Veränderungen treffen. Heidt et al. konnten in einem Parabiose-Modell ergänzend den Beitrag von Monozyten an der kardialen Makrophagenpopulation nach Infarkt

beurteilen (135). Interessanterweise sank die Aktivität des Chimärismus in der Parabiose nach 2 Wochen deutlich ab und ließ somit auf eine relative Unabhängigkeit der neuen ansässigen Makrophagen mit Fähigkeit zur Selbsterneuerung schließen (135), wie unter Ruhebedingungen beschrieben. Derartig komplexe Modelle sind jedoch anfällig für Verzerrung. Die durch die Bestrahlung induzierten Entzündungsprozesse (146, 147) können die Populationen verändern (123) und sollten somit kritisch betrachtet werden.

Neben der Bildung einer fibrotischen Narbe kann das Herz nach MI auch langfristig noch von *adversem Remodeling* betroffen sein, welches sich nicht nur auf die IZ begrenzt, sondern auch die BZ und RZ betrifft (137, 148). Das nicht-infarzierte Gewebe ist dabei in der Bedeutung für die Herzfunktion nicht zu vernachlässigen (138, 149). Sager et al. zeigten durch eine gehemmte Zelladhäsion, dass eine Woche nach Infarkt die Rekrutierung von Makrophagen und Monozyten aus dem Knochenmark in die Remotezone vermindert und somit die Herzfunktion langfristig verbessert wurde (138). Ebenfalls konnte in permanenter Ligatur nach 28 Tagen in der Remotezone eine höhere Entzündungsaktivität als in der Infarktzone festgestellt werden (136). In unserem I/R-Modell näherten sich die Makrophagenpopulationen in der RZ und BZ wieder den ursprünglichen Werten an und deuteten auf einen rückläufigen Entzündungsprozess hin. Weitere Untersuchungen zu den funktionellen Eigenschaften der residenten Makrophagen könnten das Verständnis des Remodelings auch im nicht infarzierten Myokard vertiefen.

#### **4. Im FIRE-Modell verändert sich die Makrophagenpopulation nach I/R**

Der *colony stimulation factor 1 receptor* *Csf1r* ist essenziell für die Entwicklung der Makrophagen aus dem Dottersack (88). Mithilfe des Superenhancers FIRE, welcher als regulierendes Element in der *Csf1r*-Transkription fungiert (77), konnte die Expression selektiv unterdrückt und damit eine weitgehende Abwesenheit von Makrophagen erzielt werden. In *Csf1r<sup>FIRE/FIRE</sup>*-Tieren zeigte sich durchflusszytometrisch ein Rückgang der residenten Population im Herzen um ~80 % (120). In einem Folgeversuch, bei Kreuzung mit der Mauslinie *Rank<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>YFP</sup>*, präsentierte sich die Reduktion bei *Csf1r<sup>FIRE/FIRE</sup>Rank<sup>Cre</sup>Rosa26<sup>YFP</sup>* proportional zur initialen Makrophagenpopulation. Dies

bestätigte die Annahme, dass durch einen FIRE-*Knock-out* hauptsächlich eine Absenz an DS-Makrophagen erzeugt wurde (120).

Dreißig Tage nach I/R zeigte sich in der histologischen Analyse im FIRE-Modell in RZ und BZ insgesamt eine deutlich verminderte Zellzahl, während in der Infarktzone kein Unterschied zwischen  $Csf1r^{FIRE}$  und  $Csf1r^{FIRE/FIRE}$  zu erkennen war (120). Dies deutete darauf hin, dass Makrophagen hier vollständig durch rekrutierte Knochenmark-Makrophagen kompensiert wurden. Bei verminderter Zahl der residenten DS-Makrophagen erwiesen sich die eingewanderten Monozyten während des Infarkts nicht durch den *Knock-out* betroffen.

Während in der ersten Entwicklungswelle eine Abhängigkeit von  $Csf1r$  bei den Mikroglia nachgewiesen wurde (58), scheint die Welle der EMP-abstammenden Makrophagen jedoch nicht direkt auf den Rezeptor angewiesen zu sein (68). Hoeffel et al. zeigten beispielsweise, dass die Rekrutierung von Monozyten aus der fetalen Leber in die Haut  $Csf1r$ -unabhängig erfolgte (150). Dies lässt vermuten, dass die Rekrutierung der DS-Makrophagen durch ein  $Csf1r$ -*Knock-out* nicht beeinträchtigt wird, die Expression des Rezeptors jedoch essenziell für die Proliferation und das Überleben der Zellen ist (150). Interessanterweise konnte ebenfalls gezeigt werden, dass  $Ly6C^{low}$  Monozyten  $Csf1r$ -abhängig, inflammatorische  $Ly6C^{high}$  Monozyten jedoch  $Csf1r$ -unabhängig präsentierten (60, 151). Dies könnte ebenfalls zu einer alternierenden Population im Herzen beitragen, da sich  $Ly6C^{low}$ -Monozyten zumindest teilweise aus der  $Ly6C^{high}$ -Monozytenpopulation entwickeln (152) und sich vorzugsweise in reparative M2-Monozyten zu differenzieren scheinen (153).

Das hier verwendete FIRE-Modell bietet außerdem den Vorteil, dass keine Entwicklungsdefizite oder verminderte Phagozytenfunktion auftraten, wie sie in  $Csf1r^{-/-}$  defizienten Mäusen beschrieben wurden (86). Im Gegensatz zu diesem Modell wurde die Entwicklung, Fertilität und das Überleben durch FIRE nicht nachweislich beeinträchtigt (88). Damit bietet sich hiermit eine interessante Möglichkeit, das Verhalten von residenten Makrophagen im Herzen zu adressieren.



Es gibt bereits mehrere Ansätze zu einer medikamentösen Therapie mit anti-Csf1r (154-157), welche gezielt auf residente Makrophagen wirken. Meziani et al. demonstrieren in einem präklinischen Konzept den positiven Einfluss von Csf1r-Inhibitoren auf den fibrotischen Umbau der Lunge nach Bestrahlung (156). Ebenfalls wurde im murinen Gehirn unter Therapie eine verbesserte kognitive Funktion nach Bestrahlung festgestellt (157). Lei et al. weisen jedoch auf Limitationen derartiger Inhibitoren hin (158). Die Entwicklung steht hier noch am Anfang. Ein besseres Verständnis der Csf1r-abhängigen Mechanismen könnte jedoch neue Möglichkeiten für einen gezielten Einsatz in der Therapie des Myokardinfarktes und anderen Entzündungsprozessen eröffnen.

## **5. Die Abwesenheit residenter Makrophagen hat keinen Einfluss auf die Infarktnarbengröße**

Mit dem Csf1r<sup>FIRE</sup> Modell sollte ebenfalls der Einfluss residenter Makrophagen auf die Bildung einer fibrotischen Infarktnarbe nach I/R untersucht werden. In hetero- und homozygoten Csf1r<sup>FIRE</sup>-Tieren konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (120).

Anstelle der gut etablierten Färbemethode mit Sirius Red/Fast Green wurde eine immunfluoreszierende WGA-Färbung durchgeführt. Hierdurch wurden präzisere Ergebnisse mit einer höheren Dichte an Informationen pro Gewebeschnitt erzielt, ohne erkennbare Nachteile in der Analyse. Diese Methode stellte dementsprechend eine gute Möglichkeit dar, Zellen im Myokardinfarkt und anderen fibrotischen Gewebe zu untersuchen. Trotz einer einheitlichen Vorgehensweise in der Aufbereitung, haben individuelle Faktoren wie die Größe des Herzens, Ausdehnung des Infarkts und Schnittebene einen Einfluss auf die Auswertung der Infarktnarbe. Methodische Ungenauigkeiten können hier nicht sicher ausgeschlossen werden, die Aussagekraft könnte durch Erhöhung der Versuchstierzahl auf  $n > 6$  genauere Daten liefern. Jedoch gibt es zum jetzigen Zeitpunkt keinen Anhaltspunkt für ein signifikant unterschiedliches Ergebnis.

Dick et al. zeigten in einem Cx3Cr1-Modell bei permanenter Ligatur, dass sich die Abwesenheit residenter Makrophagen negativ sowohl auf die Herzfunktion und

Gewebetransformation im Infarkt- und Grenzbereich auswirkte (137). Bei der Depletion von CCR2<sup>+</sup> KM-Makrophagen nach I/R in einem Herztransplantationsmodell konnte außerdem eine verminderte Entzündungsreaktion und reduzierte interstitielle Fibrose gezeigt werden (141). In den genannten Studien wurde eine gezielte Zellablation durch ein Modell mit dem Diphtherie-Toxin-Rezeptor (DTR) induziert, indem *in vivo* Diphtherie Toxin appliziert und DTR-sensitive Makrophagen gezielt eliminiert werden. Anzumerken ist jedoch, dass der durch DTR vermittelte Zelltod für sich genommen Entzündungsprozesse auslösen und so zu einer erheblichen Verzerrung führen könnte (141, 159-161). Insgesamt deuten die Ergebnisse jedoch darauf hin, dass KM-Makrophagen die Entzündungsprozesse beschleunigen sowie maßgeblich zur Bildung der Infarktnarbe beitragen. Damit bilden rekrutierte Blutmonozyten ebenfalls einen spannenden Ansatzpunkt, um therapeutisch die Infarktgröße und -narbe nach MI zu adressieren.

Obwohl es einige Anhaltspunkte für einen günstigen Einfluss der residenten Makrophagen auf die Infarktnarbe nach MI gibt (137, 141), zeigte sich in unserer Analyse interessanterweise keine erkennbare Abweichung. Hinzuzufügen sei jedoch, dass die Narbengröße allein nicht mit einer erhaltenen Herzfunktion gleichzusetzen ist. In einer Positronen-Emissions-Tomografie des Csf1r<sup>FIRE</sup>-Modells wurde hierzu der Einfluss residenter Makrophagen auf unterschiedliche Funktionsparameter des Herzens an Tag 6 und Tag 30 untersucht (120). Dabei schien die linksventrikuläre Auswurfraction nach I/R bei Makrophagenabsenz zunächst besser als in der Kontrollgruppe, über den zeitlichen Verlauf zeigte sich jedoch insgesamt ein negativer Effekt (120). Schlagvolumen und enddiastolisches Volumen wiesen in den Untersuchungen ähnliche Werte auf. Während jedoch bei Csf1r<sup>FIRE/+</sup> Tieren bis Tag 30 eine positive Tendenz zu beobachten war, verringerten sich die Werte bei Csf1r<sup>FIRE/FIRE</sup> leicht (120). Der Viabilitäts-Defekt unterschied sich nach 30 Tagen hingegen nicht signifikant (120), passend zu der hier durchgeführten histologischen Analyse der Infarktnarbe. Die residente Makrophagenpopulation scheint dementsprechend keinen Einfluss auf die Größe des fibrotischen Gewebeareals zu haben, jedoch nach I/R in der Homöostase von Bedeutung zu sein. Zur Bestätigung etwaiger Eigenschaften sollte die Rolle und Funktion der residenten Population in Zukunft noch tiefergehend definiert werden. Therapeutisch könnte gegebenenfalls auf eine schnelle Erholung der residenten Makrophagenpopulation

abgezielt werden und negative Aspekte der Inflammation durch Monozytenrekrutierung verringert werden.

Nicht zuletzt muss die Übertragbarkeit von Eigenschaften muriner auf humane Makrophagen validiert werden, um damit potenzielle immunologische Ansätze realisieren zu können. Die große Diversität und Formbarkeit der Gewebemakrophagen erschweren hier verlässliche Daten. Ebenso werden in Mausmodellen häufig *in vivo* Versuche durchgeführt, während sich Untersuchungen beim Menschen meist auf punktuelle *ex vivo* oder *in vitro* Untersuchungen beschränken. Die hämatopoetische Entwicklung ist in der Maus und im Menschen jedoch gleichermaßen konserviert (162). Auch bei der humanen Hämatopoese dient der Dottersack als initialer Ort der Blutbildung, inklusive Makrophagen-Vorläufern (163). Der Erhalt von dermalen Makrophagen bei Patienten mit autosomal dominant oder sporadisch entwickelter Monozytopenie (164) unterstützt ebenfalls die These eines unabhängigen, residenten Makrophagenpools beim Menschen. Transkriptom-basierte Analysen zeigten außerdem eine weitestgehende Übereinstimmung der phänotypischen Eigenschaften der hämatopoetischen Linien, heben jedoch auch einige spezifische Unterschiede hervor (165). Die hier beschriebenen Antigene CD64, F4/80, CD68 und CSF1R wurden in beiden Spezies nachgewiesen (166, 167), wobei F4/80 beim Menschen dominant von eosinophilen Granulozyten exprimiert wird (168). Unter Einbezug neuer Genomik- und Proteomik-Technologien wird dabei die Analyse relevanter Zellpopulationen und der Vergleich von Antigenexpressionsprofilen erleichtert.

## 6. Ausblick

In dieser Arbeit wurde das Verhalten von residenten Makrophagen unterschiedlichen ontogenetischen Ursprungs im Modell der Ischämie/Reperfusion genauer charakterisiert. Mithilfe des  $Csf1r^{FIRE}$ -Modells konnten neben der Verteilung auch erste Erkenntnisse über die Funktion der Populationen berücksichtigt werden.

Neuere biochemische Untersuchungsmethoden stehen zunehmend zur Verfügung. Neben den verwendeten *Lineage tracing* und *Knock-out*-Modellen erlaubt eine Untersuchung des Transkriptoms, die Genexpression auf molekularer Ebene zu ermitteln.

Beispielsweise können bei Einzelzell-RNA-Sequenzierung hunderte Gene von spezifischen Zellen gleichzeitig identifiziert (169) und ein genetischer Fingerabdruck generiert werden. Makrophagen können hierdurch hinsichtlich ihrer Eigenschaften genauer definiert und Rückschlüsse auf ihre Funktion gezogen werden. Erste Auswertungen weisen auf einen antiinflammatorischen Phänotyp der residenten Makrophagen hin und eröffnen außerdem neue Möglichkeiten in der Populationsdifferenzierung (120, 137, 141).

In Zukunft könnten den ontogenetisch unterschiedlichen Makrophagenpopulationen spezifisches Verhalten oder unterschiedliche inflammatorische Programme zugewiesen werden, welche mit differentiellen Funktionen in Entzündungsprozessen des Herzens und anderen Geweben assoziiert sein könnten. Individuelle Eigenschaften, wie beispielsweise die Csf1r-Abhängigkeit residenter Makrophagen, bieten dabei ein potenzielles Ziel zur therapeutischen Beeinflussung in Entzündungsprozessen. Erste interventionelle Ansätze, welche auf Makrophagen abzielen, scheinen vielversprechend (156) und lassen mit Spannung auf zukünftige Studien blicken.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Makrophagen kommen in nahezu allen Geweben vor und spielen eine essenzielle Rolle in der Homöostase sowie Entzündungsprozessen. Lange Zeit wurde angenommen, dass diese sich ausschließlich von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark entwickeln. In den letzten Jahren konnte jedoch eine zweigeteilte Herkunft nachgewiesen werden. Ein Teil der Makrophagen wandert bereits früh in der Entwicklung aus dem Dottersack in das Zielgewebe ein und kann sich durch Proliferation bis ins adulte Alter als residente Gewebemakrophagen erhalten. Ziel dieser Arbeit war es, die Makrophagenpopulation im Herzen nach Myokardinfarkt gemäß ihrer ontogenetischen Herkunft genauer zu charakterisieren.

In verschiedenen Mausmodellen wurde nach dem Prinzip der Ischämie/Reperfusion ein Myokardinfarkt simuliert. Die Anzahl und Verteilung der kardialen Makrophagen wurden dabei in Ruhe, im akuten Infarktgeschehen und weiteren Verlauf untersucht. Durchflusszytometrische und histologische Untersuchungen zeigten, dass Dottersack abstammende Makrophagen in Ruhe mit 80-85 % den Großteil der ansässigen Makrophagenpopulation darstellten. Bei einem Myokardinfarkt wanderten vermehrt Makrophagen aus dem Knochenmark ein und senkten den Anteil auf ~5 % ab. Auch im umliegenden, nicht direkt betroffenen Gewebe zeigte sich ein deutlicher Abfall auf ~25 %. Im Verlauf näherten sich die Werte im nicht infarzierten Myokard wieder den Ausgangswerten an, im Infarktbereich schienen die rekrutierten Makrophagen aus dem Knochenmark jedoch die ursprüngliche Population zu ersetzen. Bei einer Abwesenheit der residenten Makrophagen durch einen genetischen *Knock-out* im *Csf1r<sup>Fire</sup>*-Modell sollten erste Rückschlüsse auf den funktionellen Einfluss gewonnen werden. Hier zeigte sich nach Ischämie/Reperfusion keine Änderung der Makrophagenanzahl im direkt betroffenen Infarktreal, was darauf hinweist, dass diese Makrophagenpopulation aus eingewanderten Monozyten entstand. Im Remotebereich blieb die Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe dagegen deutlich reduziert. Auf die Ausbildung der Infarktnarbe zeigte die Abwesenheit residenter Makrophagen indessen keinen signifikanten Effekt.

Durch seine hohe Prävalenz ist der Myokardinfarkt von großer epidemiologischer Bedeutung. In der myokardialen Inflammation unterscheiden sich die Makrophagen distinkten ontogenetischen Ursprungs in ihrer Zusammensetzung. Die hier erfolgte

---

Analyse der Populationen trägt dabei zur Charakterisierung und präziseren Definition der Makrophagen bei. Langfristig könnten dadurch Ansatzpunkte für therapeutische Optionen nach Myokardinfarkt aufgezeigt werden.

## VII. ABSTRACT (English)

Macrophages are abundant in all tissues and play an essential role in homeostasis as well as inflammatory processes. While it was traditionally believed that they derive exclusively from hematopoietic stem cells in the bone marrow, in recent years a dual origin has been demonstrated. Some macrophages migrate from the yolk sac into their target tissue early in embryonic development and can maintain themselves through proliferation into adulthood as resident tissue macrophages. This thesis aimed to investigate the origin and behaviour of macrophages in the heart following myocardial infarction.

Mouse models simulating myocardial infarction were utilized through ischemia/reperfusion protocols. The number and distribution of resident macrophages were assessed by flow cytometry and histology at steady state, during infarction and in the chronic phase. Yolk sac-derived macrophages were shown to constitute a major part of the resident macrophage population with ~80-85 % at steady state. However, during myocardial infarction, there was a substantial influx of macrophages from the bone marrow, leading to a decrease in the proportion of yolk sac-derived macrophages to ~5 %. The remote tissue also displayed a remarkable reduction to ~25 %. In the chronic phase, macrophage levels in the healthy myocardium approached initial numbers, whereas in the infarcted area, bone marrow-derived macrophages seemed to replace the original population. The absence of resident macrophages due to a genetic knockout in the  $Csf1r^{Fire}$  model was employed to gain initial insights into the functional impact of the different macrophage populations. Interestingly, following ischemia/reperfusion, the absence did not result in decreased macrophage numbers in the infarcted area, indicating that the latter population was derived from blood monocytes. However, a significant reduction in cell number persisted in the remote area. Notably, the absence of resident macrophages did not significantly affect the formation of a fibrotic scar.

Given the high prevalence, myocardial infarction is of great epidemiological importance. Macrophages of distinct ontogenetic origins exhibit differences in their composition during myocardial inflammation. The comprehensive analysis of macrophage populations performed here contributes to their characterization and provides a more precise definition. In the long term, these findings may unveil potential therapeutic targets for post-myocardial infarction interventions.

**VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Entstehung eines Myokardinfarkts.....	2
Abbildung 2: Heilungsphasen nach einem Myokardinfarkt.....	4
Abbildung 3: Funktion der Makrophagen .....	7
Abbildung 4: Fetale Entwicklung von Makrophagen.....	9
Abbildung 5: Herkunft der Makrophagen und Fähigkeit zur Selbsterneuerung .....	11
Abbildung 6: Prinzip der direkten und indirekten Immunfluoreszenz .....	25
Abbildung 7: Gating-Strategie in der durchflusszytometrischen Analyse .....	31
Abbildung 8: Kardiale Makrophagen unter Ruhebedingungen.....	32
Abbildung 9: Anteil der DS-Makrophagen in der kardialen Inflammation .....	33
Abbildung 10: Anteil der KM-Makrophagen in der kardialer Inflammation.....	34
Abbildung 11: Übersicht der Makrophagenpopulationen in Ruhe und nach I/R .....	35
Abbildung 12 : Spezifität in der histologischen Analyse .....	36
Abbildung 13: Verteilung der Knochenmark-Makrophagen nach I/R im Verlauf .....	37
Abbildung 14: Anteil der KM-Makrophagen nach I/R im Verlauf.....	38
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der Linie Csf1r <sup>FIRE</sup> .....	39
Abbildung 16: Makrophagenpopulationen der Linie Csf1r <sup>FIRE</sup> Rank <sup>Cre</sup> Rosa26 <sup>YFP</sup> .....	40
Abbildung 17: Repräsentative Aufnahmen der Makrophagenpopulation im FIRE-Modell nach I/R .....	41
Abbildung 18: Histologische Auswertung der Makrophagen im FIRE-Modell nach I/R .....	42
Abbildung 19: Vergleich der Färbemethoden .....	44
Abbildung 20: Einfluss residenter Makrophagen auf die Infarkt Narbe nach I/R .....	45



---

**IX. TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Enzymmix Herz.....	20
Tabelle 2: Enzymmix Gehirn .....	21
Tabelle 3: Antikörper der durchflusszytometrischen Analyse .....	22
Tabelle 4: Verwendete Lösungen in der Immunfluoreszenzfärbung .....	26
Tabelle 5: Antikörper in der Immunfluoreszenz .....	27
Tabelle 6: Isotypkontrollen in der Immunfluoreszenz .....	27
Tabelle 7: Verwendete Filtersets in der Immunfluoreszenzmikroskopie .....	28

**X. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

°C	Grad Celsius
≅	entspricht
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
AGM-Region	Aorta-Gonaden-Mesonephron-Region
BSA	bovines Serumalbumin
BZ	<i>Border zone</i> , Grenzbereich
Csf1	<i>Colony stimulation factor 1</i>
Csf1r	<i>Colony stimulation factor 1 receptor</i>
DS	Dottersack
DTR	Diphtherie-Toxin-Rezeptor
E(Zeitpunkt)	Tag der Embryonalentwicklung
EMPs	erythroid-myeloide Vorläuferzellen
eYFP	<i>enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FIRE	<i>Fms intronic regulatory element</i>
FSC	<i>Forward Scatter Signal</i>
FSC-W	<i>Forward Scatter Signal-Width</i>
Flt3	<i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>
G	Gauche
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
I/R	Ischämie/Reperfusion
IF	Immunfluoreszenz

---

IZ	Infarktzone
IHK	Ischämische Herzkrankheit
kg	Kilogramm
KM	Knochenmark
LAD	<i>Left anterior descending artery</i>
LSD	<i>Least Significant Difference</i>
mG	<i>membrane-targeted Green Fluorescent Protein</i>
mg	Milligramm
MI	Myokardinfarkt
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mT	<i>membrane-targeted tandem dimer Tomato</i>
n	Anzahl
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
Rank	<i>Receptor Activator of NF-<math>\kappa</math>B</i>
RCF	<i>Relative Centrifugal Force</i>
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RZ	<i>Remote zone</i>
SSC	<i>Side Scatter Singal</i>
SD	Standardabweichung
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i>

## XI. LITERATURVEREZEICHNIS

1. Khan M.A., Hashim M.J., Mustafa H., Baniyas M.Y., Al Suwaidi S.K.B.M., Alkatheeri R., Alblooshi F.M.K., Almatrooshi M.E.A.H., Alzaabi M.E.H., Al Darmaki R.S., et al., *Global epidemiology of ischemic heart disease: Results from the global burden of disease study*. Cureus. 2020.
2. WHO, *The top 10 causes of death* [Zugriff am 11.06.2022]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
3. Moran A.E., Forouzanfar M.H., Roth G.A., Mensah G.A., Ezzati M., Murray C.J.L., Naghavi M., *Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010*. Circulation. 2014;**129**(14): p. 1483-92.
4. Roth G.A., Mensah G.A., Johnson C.O., Addolorato G., Ammirati E., Baddour L.M., Barengo N.C., Beaton A.Z., Benjamin E.J., Benziger C.P., et al., *Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: Update from the gbd 2019 study*. Journal of the American College of Cardiology. 2020;**76**(25): p. 2982-3021.
5. Odden M.C., Coxson P.G., Moran A., Lightwood J.M., Goldman L., Bibbins-Domingo K., *The impact of the aging population on coronary heart disease in the united states*. The American Journal of Medicine. 2011;**124**(9): p. 827-33.e5.
6. World Bank Group, *World development report 1993: Investing in health* [Zugriff am 17.06.22]. Verfügbar unter: <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/5976>
7. Murray C.J., Acharya A.K., *Understanding dalys (disability-adjusted life years)*. J Health Econ. 1997;**16**(6): p. 703-30.
8. Steenbergen C., Frangogiannis N., *Ischemic heart disease*. Muscle. 2012;**1**: p. 495-521.
9. Mechanic O.J., Gavin M., Grossman S.A., *Acute myocardial infarction*. Statpearls. Treasure Island (FL)2022.
10. Statistisches Bundesamt (DESTATIS), *Todesursachenstatistik 2020: Zahl der todesfälle um 4,9% gestiegen 2021* [Zugriff am 15.06.2022]. Verfügbar unter: [https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/11/PD21\\_505\\_23211.html](https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/11/PD21_505_23211.html).

11. Mollon L., Bhattacharjee S., *Health related quality of life among myocardial infarction survivors in the united states: A propensity score matched analysis*. Health and Quality of Life Outcomes. 2017;**15**(1).
12. Cosby R.S., Giddings J.A., See J.R., Mayo M., *Late complications of myocardial infarction*. Jama. 1976;**236**(15): p. 1717-20.
13. Kannel W.B., Sorlie P., McNamara P.M., *Prognosis after initial myocardial infarction: The framingham study*. Am J Cardiol. 1979;**44**(1): p. 53-9.
14. Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S., Chaitman B.R., Bax J.J., Morrow D.A., White H.D., Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S., et al., *Fourth universal definition of myocardial infarction (2018)*. European Heart Journal. 2019;**40**(3): p. 237-69.
15. DeWood M.A., Spores J., Notske R., Mouser L.T., Burroughs R., Golden M.S., Lang H.T., *Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction*. N Engl J Med. 1980;**303**(16): p. 897-902.
16. Bentzon J.F., Otsuka F., Virmani R., Falk E., *Mechanisms of plaque formation and rupture*. Circulation Research. 2014;**114**(12): p. 1852-66.
17. Frangogiannis N.G., *Pathophysiology of myocardial infarction*. Compr Physiol. 2015;**5**(4): p. 1841-75.
18. Lu L., Liu M., Sun R., Zheng Y., Zhang P., *Myocardial infarction: Symptoms and treatments*. Cell Biochem Biophys. 2015;**72**(3): p. 865-7.
19. Boersma E., Maas A.C., Deckers J.W., Simoons M.L., *Early thrombolytic treatment in acute myocardial infarction: Reappraisal of the golden hour*. The Lancet. 1996;**348**(9030): p. 771-75.
20. Burke A.P., Virmani R., *Pathophysiology of acute myocardial infarction*. Med Clin North Am. 2007;**91**(4): p. 553-72; ix.
21. Jennings R.B., Schaper J., Hill M.L., Steenbergen C., Reimer K.A., *Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure*. Circulation Research. 1985;**56**(2): p. 262-78.
22. Reimer K.A., Lowe J.E., Rasmussen M.M., Jennings R.B., *The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs*. Circulation. 1977;**56**(5): p. 786-94.

23. Swynghedauw B., *Molecular mechanisms of myocardial remodeling*. *Physiol Rev.* 1999;**79**(1): p. 215-62.
24. Sutton M.G.S.J., Sharpe N., *Left ventricular remodeling after myocardial infarction*. *Circulation.* 2000;**101**(25): p. 2981-88.
25. Scalise R.F.M., De Sarro R., Caracciolo A., Lauro R., Squadrito F., Carerj S., Bitto A., Micari A., Bella G.D., Costa F., et al., *Fibrosis after myocardial infarction: An overview on cellular processes, molecular pathways, clinical evaluation and prognostic value*. *Medical Sciences.* 2021;**9**(1): p. 16.
26. De Haan J.J., Smeets M.B., Pasterkamp G., Arslan F., *Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction*. *Mediators of Inflammation.* 2013;**2013**: p. 1-13.
27. Van der Borght K., Lambrecht B.N., *Heart macrophages and dendritic cells in sickness and in health: A tale of a complicated marriage*. *Cellular Immunology.* 2018;**330**: p. 105-13.
28. Frangogiannis N.G., *Regulation of the inflammatory response in cardiac repair*. *Circulation Research.* 2012;**110**(1): p. 159-73.
29. Dobaczewski M., Bujak M., Zymek P., Ren G., Entman M.L., Frangogiannis N.G., *Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts*. *Cell and Tissue Research.* 2006;**324**(3): p. 475-88.
30. Geering B., Stoeckle C., Conus S., Simon H.U., *Living and dying for inflammation: Neutrophils, eosinophils, basophils*. *Trends Immunol.* 2013;**34**(8): p. 398-409.
31. Soehnlein O., Weber C., Lindbom L., *Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function*. *Trends Immunol.* 2009;**30**(11): p. 538-46.
32. Prabhu S.D., *It takes two to tango*. *Circulation Research.* 2014;**114**(10): p. 1558-60.
33. Yap J., Cabrera-Fuentes H.A., Irei J., Hausenloy D.J., Boisvert W.A., *Role of macrophages in cardioprotection*. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019;**20**(10): p. 2474.

34. Ducharme A., Frantz S., Aikawa M., Rabkin E., Lindsey M., Rohde L.E., Schoen F.J., Kelly R.A., Werb Z., Libby P., et al., *Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction*. Journal of Clinical Investigation. 2000;**106**(1): p. 55-62.
35. Talman V., Ruskoaho H., *Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration*. Cell and Tissue Research. 2016;**365**(3): p. 563-81.
36. Ren G., Michael L.H., Entman M.L., Frangogiannis N.G., *Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2002;**50**(1): p. 71-79.
37. Bujak M., Dobaczewski M., Chatila K., Mendoza L.H., Li N., Reddy A., Frangogiannis N.G., *Interleukin-1 receptor type 1 signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling*. The American Journal of Pathology. 2008;**173**(1): p. 57-67.
38. Mouton A.J., Deleon-Pennell K.Y., Rivera Gonzalez O.J., Flynn E.R., Freeman T.C., Saucerman J.J., Garrett M.R., Ma Y., Harmancey R., Lindsey M.L., *Mapping macrophage polarization over the myocardial infarction time continuum*. Basic Research in Cardiology. 2018;**113**(4).
39. Weber K.T., Sun Y., Bhattacharya S.K., Ahokas R.A., Gerling I.C., *Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodeling of the heart*. Nat Rev Cardiol. 2013;**10**(1): p. 15-26.
40. Van Amerongen M.J., Harmsen M.C., Van Rooijen N., Petersen A.H., Van Luyn M.J.A., *Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice*. The American Journal of Pathology. 2007;**170**(3): p. 818-29.
41. Ovchinnikov D.A., *Macrophages in the embryo and beyond: Much more than just giant phagocytes*. Genesis. 2008;**46**(9): p. 447-62.
42. Cavillon J.-M., *The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by elie metchnikoff*. Journal of Leukocyte Biology. 2011;**90**(3): p. 413-24.
43. Gordon S., *Elie metchnikoff, the man and the myth*. Journal of Innate Immunity. 2016;**8**(3): p. 223-27.

44. Gordon S., *Phagocytosis: The legacy of metchnikoff*. Cell. 2016;**166**(5): p. 1065-68.
45. van Furth R., Cohn Z.A., Hirsch J.G., Humphrey J.H., Spector W.G., Langevoort H.L., *The mononuclear phagocyte system: A new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells*. Bull World Health Organ. 1972;**46**(6): p. 845-52.
46. Rosales C., Uribe-Querol E., *Phagocytosis: A fundamental process in immunity*. BioMed Research International. 2017;**2017**: p. 1-18.
47. Stuart L.M., Ezekowitz R.A.B., *Phagocytosis*. Immunity. 2005;**22**(5): p. 539-50.
48. Wynn T.A., Chawla A., Pollard J.W., *Macrophage biology in development, homeostasis and disease*. Nature. 2013;**496**(7446): p. 445-55.
49. Lavin Y., Winter D., Blecher-Gonen R., David E., Keren-Shaul H., Merad M., Jung S., Amit I., *Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment*. Cell. 2014;**159**(6): p. 1312-26.
50. Hom J., Dulmovits B.M., Mohandas N., Blanc L., *The erythroblastic island as an emerging paradigm in the anemia of inflammation*. Immunologic Research. 2015;**63**(1-3): p. 75-89.
51. Defalco T., Bhattacharya I., Williams A.V., Sams D.M., Capel B., *Yolk-sac-derived macrophages regulate fetal testis vascularization and morphogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014;**111**(23): p. E2384-E93.
52. Watanabe S., Alexander M., Misharin A.V., Budinger G.R.S., *The role of macrophages in the resolution of inflammation*. Journal of Clinical Investigation. 2019;**129**(7): p. 2619-28.
53. Van Furth R., Diesselhoff-Den Dulk M.M., *Dual origin of mouse spleen macrophages*. Journal of Experimental Medicine. 1984;**160**(5): p. 1273-83.
54. Alliot F., Godin I., Pessac B., *Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain*. Brain Res Dev Brain Res. 1999;**117**(2): p. 145-52; p. 3-4.
55. Van Furth R., Cohn Z.A., *The origin and kinetics of mononuclear phagocytes*. Journal of Experimental Medicine. 1968;**128**(3): p. 415-35.



56. Douglas S.D., Musson R.A., *Phagocytic defects--monocytes/macrophages*. Clin Immunol Immunopathol. 1986;**40**(1): p. 62-8.
57. Virolainen M., *Hematopoietic origin of macrophages as studied by chromosome markers in mice*. Journal of Experimental Medicine. 1968;**127**(5): p. 943-52.
58. Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M., Nandi S., See P., Gokhan S., Mehler M.F., Conway S.J., Ng L.G., Stanley E.R., et al., *Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages*. Science. 2010;**330**(6005): p. 841-5.
59. Schulz C., Gomez P., Elisa, Chorro L., Szabo-Rogers H., Cagnard N., Kierdorf K., Prinz M., Wu B., Jacobsen S.E.W., Pollard J.W., et al., *A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells*. Science. 2012;**366**(6077): p. p. 86-90.
60. Yona S., Kim K.-W., Wolf Y., Mildner A., Varol D., Breker M., Strauss-Ayali D., Viukov S., Williams M., Misharin A., et al., *Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis*. Immunity. 2013;**38**(1): p. 79-91.
61. Williams M., De Kleer I., Henri S., Post S., Vanhoutte L., De Prijck S., Deswarte K., Malissen B., Hammad H., Lambrecht B.N., *Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via gm-csf*. Journal of Experimental Medicine. 2013;**210**(10): p. 1977-92.
62. Hashimoto D., Chow A., Noizat C., Teo P., Beasley B., Mary, Leboeuf M., Becker D., Christian, See P., Price J., Lucas D., et al., *Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes*. Immunity. 2013;**38**(4): p. 792-804.
63. Bertrand J.Y., Jalil A., Klaine M.L., Jung S., Cumano A., Godin I., *Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac*. Blood. 2005;**106**(9): p. 3004-11.
64. Epelman S., Lavine J., Kory, Randolph J., Gwendalyn, *Origin and functions of tissue macrophages*. Immunity. 2014;**41**(1): p. 21-35.
65. Varol C., Mildner A., Jung S., *Macrophages: Development and tissue specialization*. Annu Rev Immunol. 2015;**33**: p. 643-75.
66. McGrath K.E., Frame J.M., Palis J., *Early hematopoiesis and macrophage development*. Semin Immunol. 2015;**27**(6): p. 379-87.

67. Hoeffel G., Ginhoux F., *Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages*. Cell Immunol. 2018;**330**: p. 5-15.
68. Wu Y., Hirschi K.K., *Tissue-resident macrophage development and function*. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021;**8**.
69. Yamane T., *Mouse yolk sac hematopoiesis*. Front Cell Dev Biol. 2018;**6**: p. 80.
70. Tober J., Koniski A., McGrath K.E., Vemishetti R., Emerson R., de Mesy-Bentley K.K.L., Waugh R., Palis J., *The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis*. Blood. 2007;**109**(4): p. 1433-41.
71. Mcgrath K.E., Koniski A.D., Malik J., Palis J., *Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo*. Blood. 2003;**101**(5): p. 1669-75.
72. Chan W.Y., Kohsaka S., Rezaie P., *The origin and cell lineage of microglia: New concepts*. Brain Res Rev. 2007;**53**(2): p. 344-54.
73. Palis J., *Hematopoietic stem cell-independent hematopoiesis: Emergence of erythroid, megakaryocyte, and myeloid potential in the mammalian embryo*. FEBS Letters. 2016;**590**(22): p. 3965-74.
74. Hoeffel G., Chen J., Lavin Y., Low D., Almeida F., Francisca, See P., Beaudin E., Anna, Lum J., Low I., Forsberg C., E., et al., *C-myb+ erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages*. Immunity. 2015;**42**(4): p. 665-78.
75. Takahashi K., Yamamura F., Naito M., *Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: A light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study*. J Leukoc Biol. 1989;**45**(2): p. 87-96.
76. Naito M., Yamamura F., Nishikawa S., Takahashi K., *Development, differentiation, and maturation of fetal mouse yolk sac macrophages in cultures*. J Leukoc Biol. 1989;**46**(1): p. 1-10.
77. Rojo R., Pridans C., Langlais D., Hume D.A., *Transcriptional mechanisms that control expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor locus*. Clin Sci (Lond). 2017;**131**(16): p. 2161-82.

78. Palis J., Chan R.J., Koniski A., Patel R., Starr M., Yoder M.C., *Spatial and temporal emergence of high proliferative potential hematopoietic precursors during murine embryogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001;**98**(8): p. 4528-33.
79. Gritz E., Hirschi K.K., *Specification and function of hemogenic endothelium during embryogenesis*. Cellular and Molecular Life Sciences. 2016;**73**(8): p. 1547-67.
80. Palis J., Robertson S., Kennedy M., Wall C., Keller G., *Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse*. Development. 1999;**126**(22): p. 5073-84.
81. Sieweke M.H., Allen J.E., *Beyond stem cells: Self-renewal of differentiated macrophages*. Science. 2013;**342**(6161): p. 1242974.
82. McGrath K.E., Frame J.M., Fegan K.H., Bowen J.R., Conway S.J., Catherman S.C., Kingsley P.D., Koniski A.D., Palis J., *Distinct sources of hematopoietic progenitors emerge before hscs and provide functional blood cells in the mammalian embryo*. Cell Rep. 2015;**11**(12): p. 1892-904.
83. Mass E., Ballesteros I., Farlik M., Halbritter F., Günther P., Crozet L., Jacome-Galarza C.E., Händler K., Klughammer J., Kobayashi Y., et al., *Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis*. Science. 2016;**353**(6304): p. aaf4238-aaf38.
84. Percin G.I., Eitler J., Kranz A., Fu J., Pollard J.W., Naumann R., Waskow C., *Csf1r regulates the dendritic cell pool size in adult mice via embryo-derived tissue-resident macrophages*. Nature Communications. 2018;**9**(1).
85. Gomez Perdiguero E., Klapproth K., Schulz C., Busch K., Azzoni E., Crozet L., Garner H., Trouillet C., De Bruijn M.F., Geissmann F., et al., *Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors*. Nature. 2015;**518**(7540): p. 547-51; p.3-4.
86. Dai X.-M., Ryan G.R., Hapel A.J., Dominguez M.G., Russell R.G., Kapp S., Sylvestre V., Stanley E.R., *Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects*. Blood. 2002;**99**(1): p. 111-20.

87. Pridans C., Raper A., Davis G.M., Alves J., Sauter K.A., Lefevre L., Regan T., Meek S., Sutherland L., Thomson A.J., et al., *Pleiotropic impacts of macrophage and microglial deficiency on development in rats with targeted mutation of the *csf1r* locus*. The Journal of Immunology. 2018;**201**(9): p. 2683-99.
88. Rojo R., Raper A., Ozdemir D.D., Lefevre L., Grabert K., Wollscheid-Lengeling E., Bradford B., Caruso M., Gazova I., Sánchez A., et al., *Deletion of a *csf1r* enhancer selectively impacts *csf1r* expression and development of tissue macrophage populations*. Nature Communications. 2019;**10**(1).
89. Medvinsky A., Dzierzak E., *Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the *agm* region*. Cell. 1996;**86**(6): p. 897-906.
90. Mikkola H.K.A., Orkin S.H., *The journey of developing hematopoietic stem cells*. Development. 2006;**133**(19): p. 3733-44.
91. Boisset J.-C., Van Cappellen W., Andrieu-Soler C., Galjart N., Dzierzak E., Robin C., *In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium*. Nature. 2010;**464**(7285): p. 116-20.
92. Zovein A.C., Hofmann J.J., Lynch M., French W.J., Turlo K.A., Yang Y., Becker M.S., Zanetta L., Dejana E., Gasson J.C., et al., *Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells*. Cell Stem Cell. 2008;**3**(6): p. 625-36.
93. Kumaravelu P., Hook L., Morrison A.M., Ure J., Zhao S., Zuyev S., Ansell J., Medvinsky A., *Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (*hsc/rus*): Role of the aorta-gonad-mesonephros (*agm*) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver*. Development. 2002;**129**(21): p. 4891-99.
94. Yamane T., *Cellular basis of embryonic hematopoiesis and its implications in prenatal erythropoiesis*. International Journal of Molecular Sciences. 2020;**21**(24): p. 9346.
95. Coşkun S., Chao H., Vasavada H., Heydari K., Gonzales N., Zhou X., de Crombrughe B., Hirschi K.K., *Development of the fetal bone marrow niche and regulation of *hsc* quiescence and homing ability by emerging osteolineage cells*. Cell Rep. 2014;**9**(2): p. 581-90.
96. Dzierzak E., Speck N.A., *Of lineage and legacy: The development of mammalian hematopoietic stem cells*. Nature Immunology. 2008;**9**(2): p. 129-36.

97. Molawi K., Wolf Y., Kandalla P.K., Favret J., Hagemeyer N., Frenzel K., Pinto A.R., Klapproth K., Henri S., Malissen B., et al., *Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age*. Journal of Experimental Medicine. 2014;**211**(11): p. 2151-58.
98. Yáñez A., Coetzee S.G., Olsson A., Muench D.E., Berman B.P., Hazelett D.J., Salomonis N., Grimes H.L., Goodridge H.S., *Granulocyte-monocyte progenitors and monocyte-dendritic cell progenitors independently produce functionally distinct monocytes*. Immunity. 2017;**47**(5): p. 890-902.e4.
99. Leid J., Carrelha J., Boukarabila H., Epelman S., Jacobsen S.E.W., Lavine K.J., *Primitive embryonic macrophages are required for coronary development and maturation*. Circulation Research. 2016;**118**(10): p. 1498-511.
100. Boyer S.W., Schroeder A.V., Smith-Berdan S., Forsberg E.C., *All hematopoietic cells develop from hematopoietic stem cells through flk2/flt3-positive progenitor cells*. Cell Stem Cell. 2011;**9**(1): p. 64-73.
101. Anderson D.M., Maraskovsky E., Billingsley W.L., Dougall W.C., Tometsko M.E., Roux E.R., Teepe M.C., Dubose R.F., Cosman D., Galibert L., *A homologue of the tnfr receptor and its ligand enhance t-cell growth and dendritic-cell function*. Nature. 1997;**390**(6656): p. 175-79.
102. Lacey D.L., Timms E., Tan H.-L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., et al., *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell. 1998;**93**(2): p. 165-76.
103. Soriano P., *Generalized lacz expression with the rosa26 cre reporter strain*. Nature Genetics. 1999;**21**(1): p. 70-71.
104. Srinivas S., Watanabe T., Lin C.-S., Williams C.M., Tanabe Y., Jessell T.M., Costantini F. BMC Developmental Biology. 2001;**1**(1): p. 4.
105. Benz C., Martins V.C., Radtke F., Bleul C.C., *The stream of precursors that colonizes the thymus proceeds selectively through the early t lineage precursor stage of t cell development*. Journal of Experimental Medicine. 2008;**205**(5): p. 1187-99.
106. Böiers C., Buza-Vidas N., Jensen C.T., Pronk C.J.H., Kharazi S., Wittmann L., Sitnicka E., Hultquist A., Jacobsen S.E.W., *Expression and role of flt3 in regulation of the earliest stage of normal granulocyte-monocyte progenitor development*. Blood. 2010;**115**(24): p. 5061-68.

107. Christensen J.L., Weissman I.L., *Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: A simple method to isolate long-term stem cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001;**98**(25): p. 14541-46.
108. Adolfsson J., Borge O.J., Bryder D., Theilgaard-Mönch K., Åstrand-Grundström L., Sitnicka E., Sasaki Y., Jacobsen S.E.W., *Upregulation of flt3 expression within the bone marrow lin<sup>-</sup>sca1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup> stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity*. Immunity. 2001;**15**(4): p. 659-69.
109. Muzumdar M.D., Tasic B., Miyamichi K., Li L., Luo L., *A global double-fluorescent cre reporter mouse*. Genesis. 2007;**45**(9): p. 593-605.
110. Sherr C.J., Rettenmier C.W., Sacca R., Roussel M.F., Look A.T., Stanley E.R., *The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, csf-1*. Cell. 1985;**41**(3): p. 665-76.
111. Sherr C.J., Rettenmier C.W., Sacca R., Roussel M.F., Look A.T., Stanley E.R., *The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, csf-1*. Cells Tissues Organs. 1985;**Jul**;**41**(3):**665-76**.
112. Laboratory T.J., *Mouse strain datasheet - 000664 c57bl/6j* [Zugriff am 05.09.22]. Verfügbar unter: <https://www.jax.org/strain/000664>.
113. Gompf A., *1. Grundlagen der durchflusszytometrie*. In: Ulrich S., Zelluläre diagnostik und therapie: De Gruyter; 2015. p. 1-28.
114. Junqueira L.C.U., Bignolas G., Brentani R.R., *Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections*. The Histochemical Journal. 1979;**11**(4): p. 447-55.
115. L. R., Whittaker P., *Collagen and picrosirius red staining: A polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution*. Brazilian Journal of Morphological Sciences. 2005;**2297-104**.
116. López-De León A., Rojkind M., *A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 1985;**33**(8): p. 737-43.
117. Whittaker P., Kloner R.A., Boughner D.R., Pickering J.G., *Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light*. Basic Research in Cardiology. 1994;**89**(5): p. 397-410.

118. Im K., Mareninov S., Diaz M.F.P., Yong W.H., *An introduction to performing immunofluorescence staining*. Methods in molecular biology: Springer New York; 2019. p. 299-311.
119. Baliyan A., Imai H., Kumar V., *Chapter 7 - microscopy*. In: Misra G., *Data processing handbook for complex biological data sources*: Academic Press; 2019. p. 113-14.
120. Weinberger T., Messerer D., Joppich M., Fischer M., Garcia C., Kumaraswami K., Wimmeler V., Ablinger S., Räuber S., Fang J., et al., *Resident and recruited macrophages differentially contribute to cardiac healing after myocardial ischemia*. eLife. 2024;**12**: p. RP89377. DOI: 10.7554/eLife.89377.
121. Segnani C., Ippolito C., Antonioli L., Pellegrini C., Blandizzi C., Dolfi A., Bernardini N., *Histochemical detection of collagen fibers by sirius red/fast green is more sensitive than van gieson or sirius red alone in normal and inflamed rat colon*. PLOS ONE. 2015;**10**(12): p. e0144630.
122. Hoeffel G., Ginhoux F., *Ontogeny of tissue-resident macrophages*. Frontiers in Immunology. 2015;**6**.
123. Epelman S., Lavine J., Kory, Beaudin E., Anna, Sojka K., Dorothy, Carrero A., Javier, Calderon B., Brija T., Gautier L., Emmanuel, Ivanov S., Satpathy T., Ansuman, et al., *Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation*. Immunity. 2014;**40**(1): p. 91-104.
124. Pinto A.R., Ilinykh A., Ivey M.J., Kuwabara J.T., D'Antoni M.L., Debuque R., Chandran A., Wang L., Arora K., Rosenthal N.A., et al., *Revisiting cardiac cellular composition*. Circulation Research. 2016;**118**(3): p. 400-09.
125. Cohen B., Heather, Mosser M., David, *Cardiac macrophages: How to mend a broken heart*. Immunity. 2014;**40**(1): p. 3-5.
126. Ben-Mordechai T., Palevski D., Glucksam-Galnoy Y., Elron-Gross I., Margalit R., Leor J., *Targeting macrophage subsets for infarct repair*. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics. 2015;**20**(1): p. 36-51.
127. Chattopadhyay P.K., Roederer M., *Cytometry: Today's technology and tomorrow's horizons*. Methods. 2012;**57**(3): p. 251-58.

128. Hoffman R.A., *Flow cytometry: Instrumentation, applications, future trends and limitations*. Springer series on fluorescence: Springer Berlin Heidelberg. p. 307-42.
129. Austyn J.M., Gordon S., *F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage*. Eur J Immunol. 1981;**11**(10): p. 805-15.
130. Morris L., Graham C.F., Gordon S., *Macrophages in haemopoietic and other tissues of the developing mouse detected by the monoclonal antibody f4/80*. Development. 1991;**112**(2): p. 517-26.
131. De Calisto J., Villablanca E.J., Mora J.R., *Fcγri (cd64): An identity card for intestinal macrophages*. European Journal of Immunology. 2012;**42**(12): p. 3136-40.
132. Mittal R., Sukumaran S.K., Selvaraj S.K., Wooster D.G., Babu M.M., Schreiber A.D., Verbeek J.S., Prasadarao N.V., *Fcγ receptor i alpha chain (cd64) expression in macrophages is critical for the onset of meningitis by escherichia coli k1*. PLoS Pathogens. 2010;**6**(11): p. e1001203.
133. Schraml U., Barbara, Blijswijk V., Janneke, Zelenay S., Whitney G., Paul, Filby A., Acton E., Sophie, Rogers C., Neil, Moncaut N., Carvajal J., Jaime, Sousa E., Reis, Caetano, *Genetic tracing via dngr-1 expression history defines dendritic cells as a hematopoietic lineage*. Cell. 2013;**154**(4): p. 843-58.
134. Gautier E.L., Shay T., Miller J., Greter M., Jakubzick C., Ivanov S., Helft J., Chow A., Elpek K.G., Gordonov S., et al., *Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages*. Nature Immunology. 2012;**13**(11): p. 1118-28.
135. Heidt T., Courties G., Dutta P., Sager H.B., Sebas M., Iwamoto Y., Sun Y., Da Silva N., Panizzi P., Van Der Laan A.M., et al., *Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction*. Circulation Research. 2014;**115**(2): p. 284-95.
136. Ramirez T.A., Iyer R.P., Ghasemi O., Lopez E.F., Levin D.B., Zhang J., Zamilpa R., Chou Y.-M., Jin Y.-F., Lindsey M.L., *Aliskiren and valsartan mediate left ventricular remodeling post-myocardial infarction in mice through mmp-9 effects*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2014;**72**: p. 326-35.
137. Dick S.A., Macklin J.A., Nejat S., Momen A., Clemente-Casares X., Althagafi M.G., Chen J., Kantores C., Hosseinzadeh S., Aronoff L., et al., *Self-renewing resident cardiac macrophages limit adverse remodeling following myocardial infarction*. Nature Immunology. 2019;**20**(1): p. 29-39.



138. Sager H.B., Hulsmans M., Lavine K.J., Moreira M.B., Heidt T., Courties G., Sun Y., Iwamoto Y., Tricot B., Khan O.F., et al., *Proliferation and recruitment contribute to myocardial macrophage expansion in chronic heart failure*. *Circulation Research*. 2016;**119**(7): p. 853-64.
139. Hashmi S., Al-Salam S., *Acute myocardial infarction and myocardial ischemia-reperfusion injury: A comparison*. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;**8**(8): p. 8786-96.
140. Vandervelde S., van Amerongen M.J., Tio R.A., Petersen A.H., van Luyn M.J., Harmsen M.C., *Increased inflammatory response and neovascularization in reperfused vs. Non-reperfused murine myocardial infarction*. *Cardiovasc Pathol*. 2006;**15**(2): p. 83-90.
141. Bajpai G., Bredemeyer A., Li W., Zaitsev K., Koenig A.L., Lokshina I., Mohan J., Ivey B., Hsiao H.-M., Weinheimer C., et al., *Tissue resident ccr2<sup>-</sup> and ccr2<sup>+</sup> cardiac macrophages differentially orchestrate monocyte recruitment and fate specification following myocardial injury*. *Circulation Research*. 2019;**124**(2): p. 263-78.
142. Mylonas K.J., Jenkins S.J., Castellan R.F., Ruckerl D., McGregor K., Phythian-Adams A.T., Hewitson J.P., Campbell S.M., MacDonald A.S., Allen J.E., et al., *The adult murine heart has a sparse, phagocytically active macrophage population that expands through monocyte recruitment and adopts an 'm2' phenotype in response to th2 immunologic challenge*. *Immunobiology*. 2015;**220**(7): p. 924-33.
143. Macri S.C., Bailey C.C., De Oca N.M., Silva N.A., Rosene D.L., Mansfield K.G., Miller A.D., *Immunophenotypic alterations in resident immune cells and myocardial fibrosis in the aging rhesus macaque (*macaca mulatta*) heart*. *Toxicologic Pathology*. 2012;**40**(4): p. 637-46.
144. Azzawi M., Hasleton P.S., Kan S.W., Hillier V.F., Quigley A., Hutchinson I.V., *Distribution of myocardial macrophages in the normal human heart*. *Journal of Anatomy*. 1997;**191**(3): p. 417-23.
145. Chistiakov D.A., Killingsworth M.C., Myasoedova V.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V., *Cd68/macrosialin: Not just a histochemical marker*. *Laboratory Investigation*. 2017;**97**(1): p. 4-13.
146. Wang B., Wang H., Zhang M., Ji R., Wei J., Xin Y., Jiang X., *Radiation-induced myocardial fibrosis: Mechanisms underlying its pathogenesis and therapeutic strategies*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020;**24**(14): p. 7717-29.

147. Gabriels K., Hoving S., Seemann I., Visser N.L., Gijbels M.J., Pol J.F., Daemen M.J., Stewart F.A., Heeneman S., *Local heart irradiation of apoe(-/-) mice induces microvascular and endocardial damage and accelerates coronary atherosclerosis*. Radiother Oncol. 2012;**105**(3): p. 358-64.
148. Gombozhapova A., Rogovskaya Y., Shurupov V., Rebenkova M., Kzhyshkowska J., Popov S.V., Karpov R.S., Ryabov V., *Macrophage activation and polarization in post-infarction cardiac remodeling*. Journal of Biomedical Science. 2017;**24**(1).
149. Prabhu S.D., *Post-infarction ventricular remodeling after myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol. 2005;**38**(547-550).
150. Hoeffel G., Wang Y., Greter M., See P., Teo P., Malleret B., Leboeuf M., Low D., Oller G., Almeida F., et al., *Adult langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages*. Journal of Experimental Medicine. 2012;**209**(6): p. 1167-81.
151. Macdonald K.P.A., Palmer J.S., Cronau S., Seppanen E., Olver S., Raffelt N.C., Kuns R., Pettit A.R., Clouston A., Wainwright B., et al., *An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation*. Blood. 2010;**116**(19): p. 3955-63.
152. Hilgendorf I., Gerhardt L.M., Tan T.C., Winter C., Holderried T.A., Chousterman B.G., Iwamoto Y., Liao R., Zirlik A., Scherer-Crosbie M., et al., *Ly-6chigh monocytes depend on nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium*. Circulation research. 2014;**114**(10): p. 1611-22.
153. Yang J., Zhang L., Yu C., Yang X.-F., Wang H., *Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases*. Biomarker Research. 2014;**2**(1): p. 1.
154. Cannarile M.A., Weisser M., Jacob W., Jegg A.M., Ries C.H., Rüttinger D., *Colony-stimulating factor 1 receptor (csf1r) inhibitors in cancer therapy*. J Immunother Cancer. 2017;**5**(1): p. 53.
155. Yeung J., Yaghoobi V., Miyagishima D., Vesely M.D., Zhang T., Badri T., Nassar A., Han X., Sanmamed M.F., Youngblood M., et al., *Targeting the csf1/csf1r axis is a potential treatment strategy for malignant meningiomas*. Neuro Oncol. 2021;**23**(11): p. 1922-35.

156. Meziani L., Mondini M., Petit B., Boissonnas A., Thomas De Montpreville V., Mercier O., Vozenin M.-C., Deutsch E., *Csf1r inhibition prevents radiation pulmonary fibrosis by depletion of interstitial macrophages*. European Respiratory Journal. 2018;**51**(3): p. 1702120.
157. Feng X., Jopson T.D., Paladini M.S., Liu S., West B.L., Gupta N., Rosi S., *Colony-stimulating factor 1 receptor blockade prevents fractionated whole-brain irradiation-induced memory deficits*. Journal of Neuroinflammation. 2016;**13**(1).
158. Lei F., Cui N., Zhou C., Chodosh J., Vavvas D.G., Paschalis E.I., *Csf1r inhibition by a small-molecule inhibitor is not microglia specific; affecting hematopoiesis and the function of macrophages*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2020;**117**(38): p. 23336-38.
159. Ruedl C., Jung S., *Dtr-mediated conditional cell ablation—progress and challenges*. European Journal of Immunology. 2018;**48**(7): p. 1114-19.
160. Sivakumaran S., Henderson S., Ward S., Santos E. Sousa P., Manzo T., Zhang L., Conlan T., Means T.K., D'Aveni M., Hermine O., et al., *Depletion of  $cd11c^+$  cells in the  $cd11c.Dtr$  model drives expansion of unique  $cd64^+$   $ly6c^+$  monocytes that are poised to release  $tnf-\alpha$* . European Journal of Immunology. 2016;**46**(1): p. 192-203.
161. Frieler R.A., Nadimpalli S., Boland L.K., Xie A., Kooistra L.J., Song J., Chung Y., Cho K.W., Lumeng C.N., Wang M.M., et al., *Depletion of macrophages in  $cd11b$  diphtheria toxin receptor mice induces brain inflammation and enhances inflammatory signaling during traumatic brain injury*. Brain Research. 2015;**1624**: p. 103-12.
162. Cumano A., Godin I., *Ontogeny of the hematopoietic system*. Annu Rev Immunol. 2007;**25**: p. 745-85.
163. Migliaccio G., Migliaccio A.R., Petti S., Mavilio F., Russo G., Lazzaro D., Testa U., Marinucci M., Peschle C., *Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac----liver transition*. Journal of Clinical Investigation. 1986;**78**(1): p. 51-60.
164. Bigley V., Haniffa M., Doulatov S., Wang X.-N., Dickinson R., MCGovern N., Jardine L., Pagan S., Dimmick I., Chua I., et al., *The human syndrome of dendritic cell, monocyte, b and nk lymphoid deficiency*. Journal of Experimental Medicine. 2011;**208**(2): p. 227-34.

165. Shay T., Jojic V., Zuk O., Rothamel K., Puyraimond-Zemmour D., Feng T., Wakamatsu E., Benoist C., Koller D., Regev A., *Conservation and divergence in the transcriptional programs of the human and mouse immune systems*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;**110**(8): p. 2946-51.
166. Murray P.J., Wynn T.A., *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. Nature Reviews Immunology. 2011;**11**(11): p. 723-37.
167. Tamoutounour S., Henri S., Lelouard H., De Bovis B., De Haar C., Van Der Woude C.J., Woltman A.M., Reyal Y., Bonnet D., Sichien D., et al., *Cd64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis*. European Journal of Immunology. 2012;**42**(12): p. 3150-66.
168. Hamann J., Koning N., Pouwels W., Ulfman L.H., Van Eijk M., Stacey M., Lin H.-H., Gordon S., Kwakkenbos M.J., *Emr1, the human homolog of f4/80, is an eosinophil-specific receptor*. European Journal of Immunology. 2007;**37**(10): p. 2797-802.
169. Kanter I., Kalisky T., *Single cell transcriptomics: Methods and applications*. Front Oncol. 2015;**5**: p. 53.

## XII. DANKSAGUNG

Herzlich bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei all den Personen, die zum Erfolg dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater danken, Herrn Prof. Dr. med. Christian Schulz, für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit, die hervorragende Betreuung, wissenschaftlichen Anregungen und Förderung während der Promotion, sowie die motivierende Begeisterung im Zuge der Forschungstätigkeit.

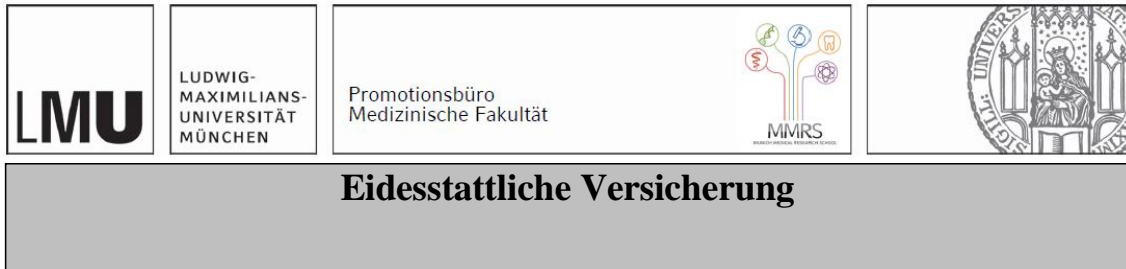
Ganz besonderer Dank gilt vor allem auch Dr. med. vet. Denise Messerer, die mit ihrer ausgezeichneten Betreuung und herausragenden wissenschaftlichen Expertise die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat. Ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen Lebenslagen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuungskommission, Prof. Dr. med. Massberg und Prof. Dr. Dendorfer, für die Mitbetreuung und konstruktive Kritik.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern aus dem Labor des Walter-Brendel-Zentrums, für die kollegiale Atmosphäre und großartige Unterstützung während der Forschungszeit. Besondere Anerkennung gilt hierbei Dominic van den Heuvel, der mir mit zahlreichen technischen Hilfestellungen zur Seite stand. Ein großes Dankeschön gilt auch allen Vets, die mit ihrer Arbeit ein unverzichtbarer Teil des Labors und Anlaufstelle für jegliche Fragestellungen waren. Besonders motivierend waren auch meine *partner in crime*, allen voran Kyungmin Kim, mit denen zahlreiche Pausen, Probleme und Erfolge geteilt wurden.

Dem Graduiertenprogramm IRTG im Rahmen des SFB914 sowie der medizinischen Fakultät danke ich vielmals für die Förderung des Projekts und Möglichkeiten zur wissenschaftlichen Weiterbildung.

Nicht zuletzt danke ich meinen lieben Freunden und meiner Familie für die Ermutigung, stetige Hilfsbereitschaft und motivierenden Worte während des Studiums und der Promotion. Eure Unterstützung war von unschätzbarem Wert.

**XIII. AFFIDAVIT****Ablinger, Sonja Christina**

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Ontogenetische Herkunft und Bedeutung von Gewebemakrophagen im  
Herzinfarktmodell**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 13.11.2024

Sonja Christina Ablinger

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

## XIV. PUBLIKATIONSLISTE

1. Weinberger T., Messerer D., Joppich M., Fischer M., Garcia C., Kumaraswami K., Wimmeler V., Ablinger S., Räuber S., Fang J., et al., *Resident and recruited macrophages differentially contribute to cardiac healing after myocardial ischemia*. eLife. 2024;**12**: p. RP89377. DOI: 10.7554/eLife.89377.