

Die Rolle mononukleärer Phagozyten der Nebenniere in der Inflammation

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Moritz Wolfram Leweke

aus Wiesbaden

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Kurts
2. Gutachterin: Prof. Dr. Stephanie Jung

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2025

Aus dem Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie

Für meine liebe Verlobte
Marie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	10
1.1	Sepsis	10
1.2	Die Nebenniere	10
1.3	Das angeborene Immunsystem	13
1.4	Die CX3CL1-CX3CR1-Achse	16
1.5	Fragestellung und Ziel	18
2.	Material und Methoden	19
2.1	Materialien	19
2.2	Methoden	24
2.2.1	Tierversuche	24
2.2.1.1	LPS-Provokation	25
2.2.1.2	Hämodynamische Analyse	25
2.2.1.3	Dynamik in Populationen mononukleärer Phagozyten der Nebenniere	26
2.2.1.4	LPS-Provokation nach Dexamethason-Vorbehandlung	26
2.2.2	Zellkultur	28
2.2.2.1	Magnetische Zellsortierung (MACS, magnetic activated cell sorting)	28
2.2.3	Probengewinnung und Analyse	29
2.2.3.1	Messung von Puls und Blutdruck	29
2.2.3.2	Gewebebegewinnung	31
2.2.3.3	Blutgewinnung	32
2.2.3.4	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)	32
2.2.3.5	Gating-Strategie	34
2.2.3.6	Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR)	35
3.	Ergebnisse	37
3.1	Veränderungen der Plasmaspiegel von Corticosteron und Aldosteron	37
3.2	Hämodynamische Unterschiede nach intraperitonealer LPS-Injektion	38
3.3	Mononukleäre Phagozyten der Nebenniere in Wildtyp Mäusen	40

3.4	Die Dynamik der Oberflächenantigene mononukleärer Phagozyten der Nebenniere von Wildtyp Mäusen anhand der geometrischen Mitte der Fluoreszenz-Intensität (gMFI)	41
3.5	Die Dynamik der CX3CL1-CX3CR1-Achse der Nebenniere	43
3.6	Mononukleäre Phagozyten in der Nebenniere bei Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen nach LPS-Provokation	44
3.7	Zytokine in der Nebenniere nach LPS-Provokation	47
3.8	Auswirkung von Stressmediatoren auf die Expression von CX3CR1 in vitro	47
3.9	Hämodynamische Veränderungen durch LPS-Provokation nach Dexamethason Vorbehandlung	48
3.10	Die CX3CL1-CX3CR1-Achse in der Nebenniere nach Dexamethason-Vorbehandlung	52
3.11	Oberflächenantigene mononukleärer Phagozyten der Nebenniere	53
4.	Diskussion	56
4.1	Aldosteron und Corticosteron	56
4.2	Hämodynamik nach LPS-Provokation	57
4.3	Migration mononukleärer Phagozyten in die Nebenniere	59
4.4	Inflammatorische Zytokine in der Nebenniere	62
4.5	Oberflächenexpression von CX3CR1 auf mononukleären Phagozyten	63
4.6	Hämodynamik nach Dexamethason-Vorbehandlung	64
4.7	Mononukleäre Phagozyten der Nebenniere nach Dexamethason-Vorbehandlung	65
4.8	Limitationen und Perspektiven dieser Arbeit	67
5.	Zusammenfassung	71
6.	Abbildungsverzeichnis	72
7.	Tabellenverzeichnis	74
8.	Literaturverzeichnis	75
9.	Danksagung	87

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADAM10	Disintegrin and Metalloproteinase 10
ADAM17	Disintegrin and Metalloproteinase 17, alias TACE
BSA	Bovines Serum Albumin
CCL2	CC-Chemokin-Ligand-2 (Synonym MCP-1)
CCR2	CC-Chemokin-Rezeptor 2
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> <i>Complementary DNA</i>)
Cp	Schwellenzyklus (<i>engl. Cross point</i>)
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormone
CX3CR1	C-X3-C Motiv Chemokinrezeptor 1, Fraktalkinrezeptor
CX3CL1	C-X3-C Motiv Chemokinligand, Fraktalkin
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
et al.	und Mitarbeiter
FACS	Durchflusszytometrie (<i>engl.</i> <i>Fluorescence activated cell sorting</i>)

FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>engl. forward scatter</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
gMFI	geometrische Mitte der Fluoreszenz-Intensität (<i>engl. geometric mean fluorescence intensity</i>)
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden Achse (<i>engl. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (Axis)</i>)
H ₂ O	Wasser
KG	Körpergewicht
IFN- γ	Interferon gamma
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
i.p.	intraperitoneal
LPS	Lipopolysaccharid
MAD	mittlerer arterieller Druck
mg/kg KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol/L	Millimol pro Liter
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>engl. pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl. Polymerase chain reaction</i>)
RBC	Rote Blutzellen, Erythrozyten (<i>engl. red blood cell</i>)

PRR	Muster-Erkennungs-Rezeptoren (<i>engl. Pattern-Recognition-Rezeptoren</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl. ribonucleic acid</i>)
RNAse	Ribonuklease
rpm	Drehzahl (<i>engl. revolutions per minute</i>)
RPMI	Gibco Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
rTNF- α	Rekombinantes TNF- α
rtPCR	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl. real-time polymerase chain reaction</i>)
SAM	Sympathoadrenomedulläres System (<i>engl. Sympathetic Adrenal Medullary System</i>)
sCX3CL1	Gelöstes CX3CL1 (<i>engl. soluble</i>)
SD	Standardabweichung (<i>engl. standard deviation</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>engl. standard error of the mean</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>engl. side scatter</i>)
Tab.	Tabelle
TACE	TNF- α konvertierendes Enzym, alias ADAM17 (<i>engl. TNF-α converting enzyme</i>)
TLR2	Toll-like-Rezeptor 2
TLR4	Toll-like-Rezeptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
UV	ultraviolettes Licht
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>engl. World Health Organization</i>)
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

Im Fokus dieser Arbeit stehen die mononukleären Phagozyten der Nebenniere. Nach Immunprovokation migrieren sie rapide in die Nebenniere und können dort schnell große Mengen proinflammatorischer Zytokine freisetzen. Auf diesem Wege könnten sie die Nebenniere in ihrer lebensnotwendigen Produktfreisetzung während systemischer Inflammation beeinflussen.

1.1 Sepsis

Sepsis ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit (Gaieski et al., 2013; Mayr et al., 2014; Fleischmann-Struzek und Rudd, 2023). Sie stellt eine der größten Herausforderungen für das Immunsystem dar. Ein Infekt löst bei diesem Krankheitsbild eine dysregulierte Immunantwort mit überschießender proinflammatorischer Komponente aus. Der septische Schock stellt die Maximalvariante der Sepsis dar, bei dem es zu einem Multiorganversagen kommen kann, mit oftmals tödlichem Ausgang (Shankar-Hari et al., 2016; Singer et al., 2016). Eine rasche Diagnose sowie eine entschlossene Behandlung der Ursachen und Symptome sind hierbei für das Überleben der Patienten von immenser Bedeutung (Chaudhary et al., 2014).

Die Nebenniere produziert Katecholamine und Glukokortikoide und spielt somit eine wichtige Rolle in der Antwort des Organismus auf eine Sepsis (Chan et al., 2012; McKechnie et al., 1985). Während einer Sepsis kann es zu einer multifaktoriell verursachten Nebenniereninsuffizienz kommen, einer potentiell letalen Komplikation (Prigent et al., 2004). In der Nebenniere existieren CX3CR1-positive mononukleäre Phagozyten, welche das Potential besitzen könnten, die Synthese der Nebennierenprodukte in solch einer kritischen Situation, wie der Sepsis, zu beeinflussen.

1.2 Die Nebenniere

Die Nebennieren sind paarig angelegte endokrine Drüsen, jeweils lokalisiert auf dem oberen Nierenpool. In ihrer Rinde produzieren sie Gluko- sowie Mineralokortikoide, namentlich Corticosteron, welches in der Maus eine Rolle ähnlich des Cortisons im

Menschen erfüllt, sowie Aldosteron. Im Nebennierenmark werden die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin synthetisiert (Ehrhart-Bornstein et al., 1998). Sie sind maßgeblich an der Kreislaufregulation des Organismus beteiligt. Nebennierenmark und -rinde lassen sich histologisch nicht scharf voneinander abgrenzen, sondern gehen fließend ineinander über (Berka et al., 1996; Bornstein et al., 1991; Bornstein et al., 1994; Gallo-Payet et al., 1987; Palacios und Lafarga, 1975). Die unterschiedlichen Zelltypen der Nebenniere kommunizieren (Bornstein et al., 1994; Gallo-Payet et al., 1987) über ihre Produkte (Katecholamine, Steroidhormone, Zytokine, Chemokine, Neurotransmitter und Neuropeptide (Ehrhart-Bornstein et al., 1998; Kanczkowski et al., 2015)) auf parakrinem Wege als auch über Gap Junctions (Black et al., 1979; Decker et al., 1978; Usadel et al., 1993). Diese dynamisch-effizienten Austauschwege zwischen den, in ihren Spezialisierungen so unterschiedlichen, Zellpopulationen sind im Krankheitsbild der Sepsis von groß Bedeutung (Nicolaidis et al., 2015).

Die Nebenniere ist ein wichtiger Bestandteil zweier fundamentaler Achsen einer akuten Stressantwort: Zum einen (1) der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA), zum anderen (2) des Sympathoadrenomedullären Systems (SAM). Die HPA sorgt für eine, den Umständen entsprechende, Plasmakonzentration adrenokortikaler Steroide, das SAM regelt dies bei Katecholaminen (Bornstein und Chrousos, 1999; Chrousos, 1995; Chrousos, 2009). HPA und SAM unterliegen sowohl zahlreichen intra-adrenalen Interaktionen (Ehrhart-Bornstein et al., 1998) als auch einer neuronalen Kontrolle (Bornstein et al., 1990; Ehrhart-Bornstein et al., 1994; Bergmann, 2022; Gorain et al., 2020).

Unter homöostatischen Bedingungen unterliegt die Glukokortikoidproduktion sowie -freisetzung einem ultradianen Rhythmus, gesteuert durch die HPA (Spiga et al., 2014). Der morgendlich erhöhte Spiegel des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH) bewirkt einen Anstieg des Adrenocorticotropen Hormon-Spiegels (ACTH), was wiederum zu einem Anstieg des Glukokortikoid-Spiegels führt. Die Ausschüttung von Glukokortikoiden ist unter physiologischen Umständen durch negative Rückkopplung selbstlimitiert, sie hemmen direkt am Hypophysenvorderlappen sowie an den hypothalamischen Neuronen die weitere Freisetzung von ACTH respektive CRH (Evans

et al., 2013; Gillies et al., 1982; Hinz und Hirschelmann, 2000). Der Plasmaspiegel der Katecholamine wird hingegen direkt neuronal durch das sympathische Nervensystem kontrolliert (Bergmann, 2022; Gorain et al., 2020). Anhand der Aktivierung durch Nervenfasern kommt es zur Ausschüttung monoaminer Neurotransmitter (Adrenalin, Noradrenalin) in der Nebenniere. Dank ihrer ausgeprägten Vaskularisation kann die Nebenniere Adrenalin und Noradrenalin innerhalb von kürzester Zeit im gesamten Organismus verteilen (Elenkov et al., 2000; Winkler et al., 1986; Gorain et al., 2020).

Während einer Sepsis reagiert der Organismus mit erhöhten Plasmaspiegeln an Glukokortikoiden (Bornstein und Briegel, 2003; Mueller et al., 2022) sowie Katecholaminen (Hahn et al., 1995; Mueller et al., 2022). Ihre protektives Wirkungsprofil besteht aus metabolischen, kardiogenen sowie anti-inflammatorischen Charakteristiken. Sie erhöhen die Konzentration der Glukose im Plasma, steigern den Blutdruck sowie die kardiale Ejektion und wirken so einer Hypotonie entgegen, zudem schützen sie vor übermäßiger Inflammation (Bornstein und Briegel, 2003; Ensinger et al., 2002; Galon et al., 2002; Träger und Radermacher, 2003; Gorain et al., 2020; Mueller et al., 2022). In der Regulation der Plasmaspiegel von Glukokortikoiden und Katecholaminen scheint während einer Sepsis interessanterweise ein Paradigmenwechsel stattzufinden, wonach die Sekretion der Nebenniere nicht länger zentral sondern wahrscheinlich vielmehr peripher gesteuert wird (Annane et al., 2006; Bornstein et al., 2008; Mueller et al., 2022). In der Vergangenheit wurden immer wieder Erklärungsversuche zu diesem Phänomen angestrengt (Boonen et al., 2015), darunter ein verminderter Abbau der Glukokortikoide (Boonen et al., 2013), parakrine Interaktionen via intra-adrenaler Zytokine (Mazzocchi et al., 1993), eine erhöhte Perfusion der Nebenniere (Lang et al., 1984) oder eine Größenveränderung (Kanczkowski et al., 2013c) der Nebenniere. Auch eine, durch Glukokortikoide verursachte, Hochregulation des Gens für das Enzym Phenylethanolamin N-methyltransferase, welches für die Synthese von Adrenalin aus Noradrenalin verantwortlich ist, konnte nachgewiesen werden (Yoshida-Hiroi et al., 2002), genau wie Katecholamin-verursachte Steigerung des Glukokortikoid-Plasmaspiegels (Haidan et al., 1998) sowie eine ACTH-unabhängige Produktion von Glukokortikoiden nach Zytokinstimulation (Bethin et al., 2000).

Weil die Zellen der Nebennierenrinde eine hohe Rezeptordichte für intra-adrenale Zytokine aufweisen, sind, von den oben genannten ineinandergreifenden Mechanismen, die intra-adrenalen Zytokine von besonderem Interesse (Bornstein et al., 2004; González-Hernández et al., 1995; Judd et al., 2000). Jedoch sind die *in vivo* Plasmaspiegel jener Zytokine weder unter homöostatischen noch unter pathologischen Umständen annähernd hoch genug, um die Hormonproduktion der Nebenniere in jener Art und Weise zu beeinflussen, wie es *in vitro* gezeigt werden konnte (Ehrhart-Bornstein et al., 1998). Solche Zytokinspiegel wären theoretisch *in vivo* auf parakrinem Wege zu erreichen. Dies würde bedeuten, dass jene Zytokine in der Nebenniere selbst synthetisiert und sezerniert werden müssten, um die dortigen Nebennierenzellen in ihrer Hormonproduktion und -freisetzung entsprechend beeinflussen zu können (Ehrhart-Bornstein et al., 1998). Während einer Sepsis wird die Nebenniere durch mononukleäre Phagozyten infiltriert (Engström et al., 2008) welche in der Lage sind, große Mengen inflammatorischer Zytokine zu produzieren.

1.3 Das angeborene Immunsystem

Diese mononukleären Phagozyten sind Teil des Immunsystems, welches der Mensch benötigt, um in der ständigen Auseinandersetzung mit seiner Umwelt bestehen zu können. Das Immunsystem lässt sich in zwei Entitäten unterteilen: (1) das angeborene Immunsystem, mit welchem alle höheren Organismen ausgestattet sind, sowie eine Erweiterung dessen (2), das erworbene Immunsystem, welches sich auf die Wirbeltiere beschränkt. Während das erworbene Immunsystem vornehmlich aus B- und T-Zellen besteht, setzt sich das angeborene Immunsystem aus verschiedenen Granulozyten, natürlichen Killerzellen sowie mononukleären Phagozyten zusammen. Die Vertreter des erworbenen Immunsystems bedürfen erst eines Kontaktes mit einem Pathogen oder Fremdkörper für die Entwicklung spezieller Abwehrmechanismen, wie z.B. der Synthese passender Antikörper. Dagegen sind die Zellen des angeborenen Immunsystems von Geburt an zur aktiven Verteidigung des Organismus fähig. Die Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen potenzielle Pathogene mit ihren *pattern-recognition-rezeptoren* (PRR) anhand von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPS) oder *damage-associated molecular patterns* (DAMPS) (**Abb. 1**). Einer dieser Rezeptoren ist der Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR-4). Er erkennt unter anderem das PAMP des

Lipopolysaccharids (LPS), welches ein Hauptbestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien ist (Park und Lee, 2013).

Das mononukleäre Phagozytensystem ist Teil des angeborenen Immunsystems und ist hier für die rasche Erkennung und Elimination potenzieller Pathogene zuständig, indem sie diese phagozytieren und in Peptide zersetzen. Die mononukleären Phagozyten migrieren dann in das lymphatische System und präsentieren dort jene Peptide im Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Kontext den Zellen des erworbenen Systems. Auf diesem Weg bilden mononukleäre Phagozyten eine Brücke zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem und treiben so die Involvierung des erworbenen Systems in der Immunabwehr des Organismus voran (Chen et al., 2023). Zudem beschleunigen mononukleäre Phagozyten nach Erkennung eines potenziellen Pathogens die Immunantwort, indem sie große Mengen inflammatorischer Zytokine freisetzen, durch welche wiederum weitere Immunzellen aktiviert und rekrutiert werden (Chen et al., 2023).

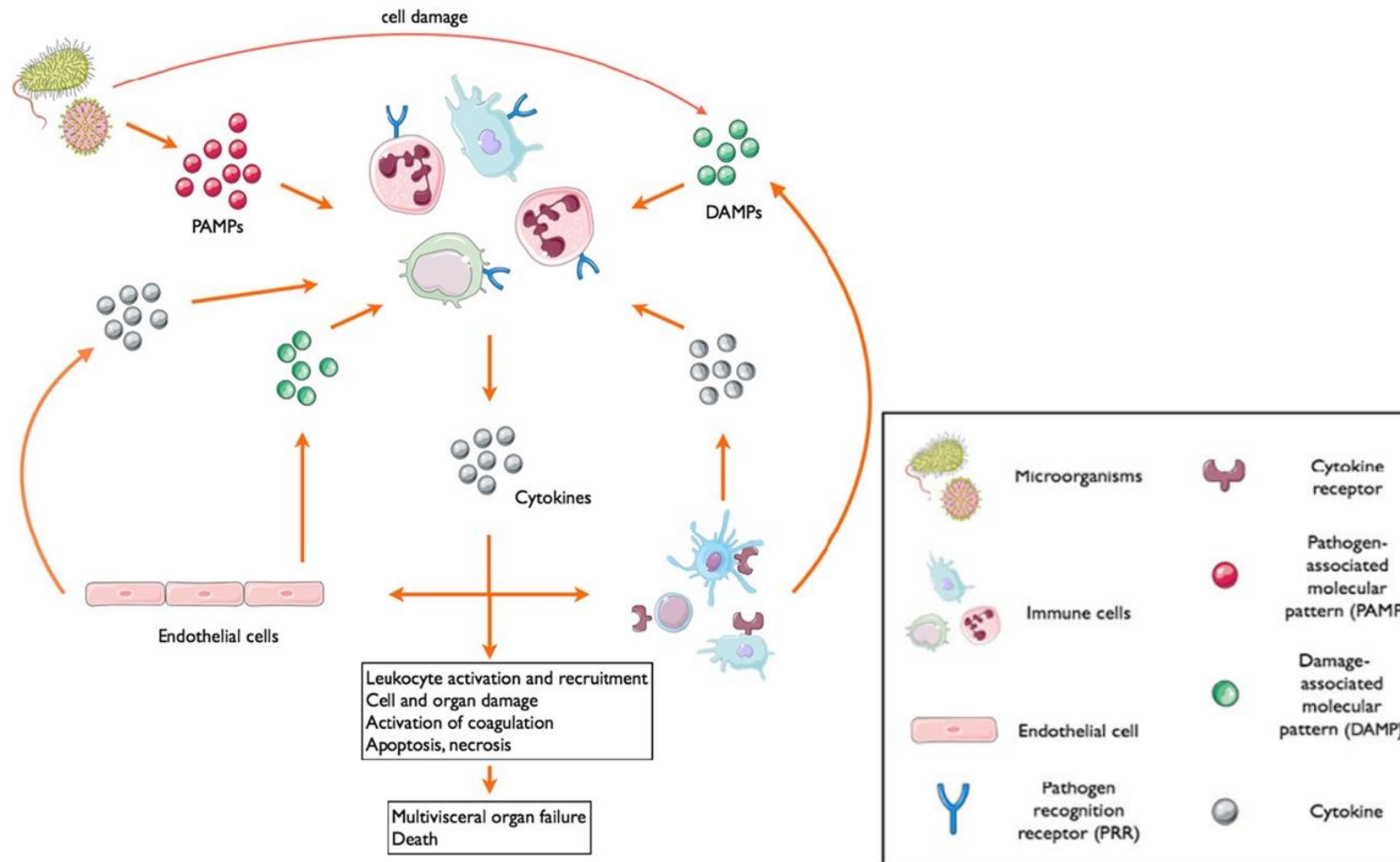


Abb. 1: Immunologische Aktivierung via PAMPs und DAMPs

Über die Erkennung verschiedener PAMPs und DAMPs werden Immunzellen aktiviert, welche nun proinflammatorische Zytokine sezernieren. Diese wiederum aktivieren weitere Immunzellen, was den, für die dysregulierte Immunantwort typischen, *circulus vitiosus* resultiert (Chousterman et al., 2017).

1.4 Die CX3CL1-CX3CR1-Achse

Die oben genannten inflammatorischen Zytokine sind für eine effektive Zusammenarbeit zwischen dem angeborenen Immunsystem sowie den Zellen der Nebenniere von großer Bedeutung. Eine Zytokin-Untergruppe bilden die Chemokine, welche sich wiederum in die C-, CC-, CXC- sowie die CX3C-Familie, unterteilen lassen. Chemokine entfalten ihre Wirkung über G-Protein-gekoppelte 7-Transmembranhelix-Rezeptoren (Zlotnik und Yoshie, 2000). Das bis dato einzige bekannte Mitglied der CX3C-Familie, CX3CL1/Fraktalkin (Pan et al., 1997; Bazan et al., 1997; Rivas-Fuentes et al., 2021) ist im oben beschriebenen Szenario einer Sepsis von besonderem Interesse, da eine positive Korrelation zwischen dem mRNA-Gehalt seines einzigen Rezeptors, namentlich CX3CR1/Fraktalkin-Rezeptor (Ludwig et al., 2002), und dem Überleben von Patienten nachgewiesen werden konnte (Cazalis et al., 2024; Pachot et al., 2008; Friggeri et al., 2016). Eine umfassende Erklärung dieser Korrelation ist bis heute ausstehend.

Eine Aufgabe von Chemokinen ist die Chemotaxis, die Rekrutierung von Immunzellen in entzündetes Gewebe. Wie oben beschrieben, werden bei Detektion von Pathogenen neben anderen inflammatorischen Zytokinen auch lösliche Chemokine freigesetzt, welche sich dann an Proteoglykane der extrazellulären Matrix anheften. So bauen lösliche Chemokine ein Konzentrationsgefälle auf, anhand dessen Immunzellen mit passenden Rezeptoren in das entsprechende Gewebe geführt werden. CX3CL1 kann in zwei verschiedenen Formen vorliegen: Zum einen kann es (1) als Transmembranprotein vorliegen, wobei es seine Chemokindomäne an einem muzinähnlichen Proteinstrang präsentiert (Pan et al., 1997; Bazan et al., 1997). In dieser Form ermöglicht es CX3CR1-exprimierenden Leukozyten die Integrin-unabhängige Adhäsion und somit deren Leukodiapedese (Ludwig et al., 2002; Fong et al., 1998). Monozyten stellen einen Großteil dieser CX3CR1-exprimierenden Leukozyten dar (Jung et al., 2000; Imai et al., 1997). Weiter kann CX3CL1 (2) in löslicher Form (soluble CX3CL1/sCX3CL1) vorliegen. Unter homöostatischen Umständen wird hierfür transmembranständiges CX3CL1 durch die Metalloprotease ADAM10, während Inflammation durch die Metalloprotease ADAM17, abgespalten (**Abb. 2**). Bei Inflammation werden Endothelzellen unter anderem durch LPS oder proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IFN- γ aktiviert, woraufhin sie ihre

Expression von CX3CL1 steigern (Bazan et al., 1997). So entsteht ein Konzentrationsgradient, welcher der Rekrutierung CX3CR1-positiver Immunzellen in inflammatorisch verändertes Gewebe dient (Bazan et al., 1997; Ludwig et al., 2005).

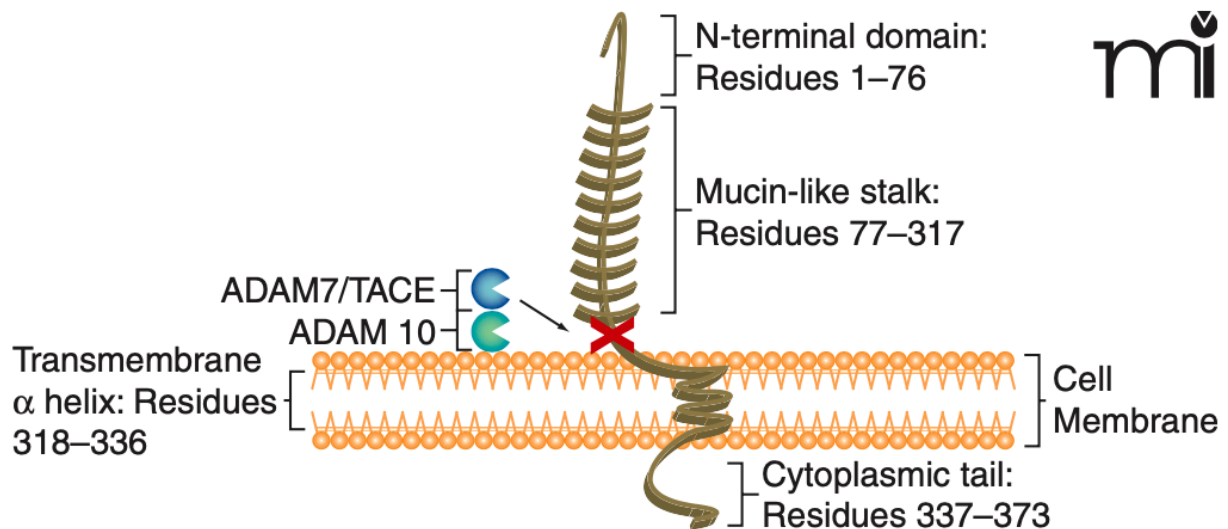


Abb. 2: CX3CL1 (Jones et al., 2010)

Das humane Gen für CX3CL1 ist auf Chromosom 16 lokalisiert. Typisch ist das CX3C-Motiv sowie der mucinähnliche, membranständige Proteinstrang, welcher die Chemokindomäne präsentiert. In Homöostase ist ADAM10 hauptverantwortlich für die Abspaltung und einhergehende Bildung von sCX3CL1, unter inflammatorischen Bedingungen geschieht dies vornehmlich durch ADAM17/TACE.

Über die Funktion des CX3CR1 gibt es bereits einige Erkenntnisse: Die Affinität von CX3CL1 zu CX3CR1 ist ausreichend, um Zellen unter physiologischen Flussbedingungen zu immobilisieren (Imai et al., 1997; Goda et al., 2000; Fong et al., 1998). Jedoch wird vermutet, dass die Leukodiapedese-unterstützende Adhäsion von Makrophagen am Endothel eher durch die CCL2-CCR2-Achse vermittelt wird (Boring et al., 1997; Gomes et al., 2006; Kurihara et al., 1997; Kuziel et al., 1997; Matsukawa et al., 1999; Robben et al., 2005). Geissmann et al. (2003) konnten Monozyten in Hinsicht auf ihr Migrationsverhalten in zwei Subpopulationen unterteilen: (1) klassische, zirkulierende CCR2^{hi}CX3CR1^{lo} und (2) lokal patrouillierenden, nicht-klassische

CCR2^{lo}CX3CR1^{hi} Monozyten (Sunderkötter et al., 2004). Über die erwähnte CCL2-CCR2-Achse migrieren vornehmlich CCR2^{hi}CX3CR1^{lo} Monozyten in inflammatorisch verändertes Gewebe. Diese Bindung führt zu einer Internalisierung des CCR2 mitsamt dessen Liganden und zu einer Hochregulation der Zelloberflächenexpression von CX3CR1 (Green et al., 2006). So liegen in entzündlich verändertem Gewebe (Kanczkowski et al., 2013c) vermehrt CCR2^{lo}CX3CR1^{hi} Monozyten vor (Dal-Secco et al., 2015). Durch dieses angepasste Rezeptorprofil von CCR2 und CX3CR1 kommt es zu einer vermehrten Aktivierung dieser Immunzellen durch CX3CL1, wodurch die Abwehrfähigkeit von Monozyten gegenüber Bakterien deutlich gesteigert wird (Ishida et al., 2008).

1.5 Fragestellung und Ziel

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war zu untersuchen, ob CX3CR1-positive mononukleäre Phagozyten in der Nebenniere während einer Sepsis Einfluss auf die Plasmakonzentration verschiedener Nebennierenprodukte haben. Parallel sollte ermittelt werden, ob der genetische Knockout von CX3CR1 in Mäusen mit einer veränderten hämodynamischen Reaktion während einer Sepsis einhergeht.

Ziel war es zu prüfen, ob hier ein Erklärungsansatz für den Überlebensvorteil von Wildtyp Mäusen gegenüber CX3CR1-Knockout Mäusen nach CLP (cecal ligation puncture) (Ishida et al., 2008) liegen könnte.

Um eine vergleichbare und verlässlich reproduzierbare Immunreaktion zu provozieren, wurde ein Modell genutzt, in welchem per intraperitonealer LPS-Injektion bei Mäusen eine systemische Inflammation induziert wurde. Um die Funktion CX3CR1-positiver mononukleärer Phagozyten in jenem Versuchsszenario näher charakterisieren zu können, wurden die Ergebnisse von Wildtyp Mäusen mit den Ergebnissen von CX3CR1-Knockout Mäusen verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Tab. 1: Laborgeräte

Modell	Hersteller
LightCycler® 480	Roche, Basel, Schweiz
Labofuge™ 400 Tischzentrifuge	Heraeus™, Hanau, Deutschland
BP-2000 Blood Pressure Analysis System™	Vistech Systems, Inc., Apex, NC, USA
NanoDrop 2000	Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA
FastPrep-24™	MP Biomedicals, Irvine, CA, USA
Safire ² microplate reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mastercycler® nexus X2 – PCR Thermocycler	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
BD FACSCanto II	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland

Tab. 2: Software

Name	Firma
Microsoft® Word für Mac v16.16.27	Microsoft®, Redmond, WA, USA
Microsoft® Excel für Mac v16.16.27	Microsoft®, Redmond, WA, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
FlowJo™ v10.5.3	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
BP 2000 Analysis Software	Vistech Systems, Inc., Apex, NC, USA
BD FACSDiva™ Software	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA

Tab. 3: Tierlinien

Für diese Arbeit wurden Mäuse vom C57BL/6J Genotyp, im Folgetext als Wildtyp Mäuse bezeichnet, sowie B6.129P-Cx3cr1tm1Litt/J, folgend CX3CR1-Knockout Mäuse genannt, verwendet. Wie durch Jung et al. (2000) beschrieben, exprimieren die CX3CR1-Knockout Mäuse keinen funktionellen CX3CR1.

Tierlinie	Artikelnummer	Firma
C57BL/6J Mäuse (Kernzucht HET) Wildtyp Mäuse	664	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
B6.129P-Cx3cr1tm1Litt/J (Kernzucht HET) CX3CR1-Knockout (CX3CR1 ^{-/-})	5582	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA

Tab. 4: Puffermedien und angesetzte Reagenzien

Medium	Inhalt
Verdauungslösung	500 ml RPMI mit GlutaMAX™ Supplement + 50 ml FCS + 5 ml Penicillin/Streptomycin + unmittelbar vor Benutzung 100 µl DNase/10 ml Medium + 100 µl Kollagenase/ 10 ml Medium
FACS-Puffer	500 ml PBS + 500 µl FCS alternativ 5 mg BSA + 1,7 ml 30 % NaN
FACSFix	500 ml PBS + 10 g Glukose + 13,5 ml Formaldehyd aus 37 % Stock (1 % finale Konzentration) + 350 µl 30 % NaN
MACS-Puffer	500 ml PBS + 5 ml FCS + 2 ml 0,5 M EDTA
Nährmedium für Zellkultur	500 ml RPMI Medium mit GlutaMAX™ + 50 ml FCS + 5 ml Penicillin/Streptomycin + 5 ml 5 mM Betamercaptoethanol
cDNA MasterMix	2µl rtPuffer, 2µl 10-fach rtPrimer, 1µl Ribonuklease-Inhibitor, 1µg reverse Transkriptase, 0,8µl 25-fach Desoxyribose-Nukleotidtriphosphat

Tab. 5: Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Artikelnummer	Hersteller/Lieferant
Kollagenase von Clostridium histolyticum	C5138-1G	Sigma Aldrich, Burlington, MA, USA
Lipopolysaccharid aus Escherichia coli O127:B8	L4516-1MG	Sigma Aldrich, Burlington, MA, USA
Desoxyribonuklease 1 Typ IV aus bovinem Pankreas, 750 U	D5025-750KU	Sigma Aldrich, Burlington, MA, USA
PowerTrack SYBR Green MasterMix	A46113	LifeTechnologies, Gaithersburg, MD, USA
DEPC behandeltes Wasser	786-117	G Biosciences, St. Louis, MO, USA
Todd-Hewitt-Bouillon	X936.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA) Fraction V	P06-1391500	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz-Dihydrat	324503-1	VWR, Wayne, PA, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung Tabletten	18912014	LifeTechnologies, Gaithersburg, MD, USA
Salzsäure 1 Mol/l – 1 N Maßlösung	K025.1	Carls Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin á 100 ml	P0781-100ML	Sigma Aldrich, Burlington, MA, USA
Gibco Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI) GlutaMAX	72400054	LifeTechnologies, Gaithersburg, MD, USA

Tab. 6: Antikörper Durchflusszytometrie (FACS)

Antikörper	Artikelnummer	Firma
APC anti-Maus CD11c Antikörper (HL3)	550261	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
PeCy7 anti-Maus CX3CR1 Antikörper	149016	BioLegend, San Diego, CA, USA
Viability Dye eFluor780 (Life/Dead)	65-0865-18	eBioscience (ThermoFisher), Waltham, MA, USA
BV421 anti-Maus CD45 Antikörper (30-F11)	103134	BioLegend, San Diego, CA, USA
FITC anti-Maus CCR2 Antikörper (SA203G11)	150608	BioLegend, San Diego, CA, USA
FITC (I-A/I-E) anti-Maus MHC II Antikörper (M5/114.15.2)	107606	BioLegend, San Diego, CA, USA
PE anti-Maus CD11b Antikörper (M1/70)	553311	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
PerCPCy5.5 anti-Maus F4/80 Antikörper (BM8)	123128	BioLegend, San Diego, CA, USA
PerCPCy5.5 anti-Maus CD11b Antikörper (M1/70)	101228	BioLegend, San Diego, CA, USA
PerCPCy5.5 anti-Maus CD80 Antikörper (16-10A1)	104722	BioLegend, San Diego, CA, USA
IgG anti-Maus Fc-Block Flebogamma	PZN-07580302	Grifols, Sant Cugat del Vallès, Spanien

Tab. 7: Primer rtPCR

Primer	Artikelnummer	Firma
Mm_Cx3cl1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00128345	Qiagen, Venlo, Niederlande
Mm_Slc12a1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00108738	Qiagen, Venlo, Niederlande
Mm_Slc12a3_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00110600	Qiagen, Venlo, Niederlande
Mm_Scnn1a_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00198289	Qiagen, Venlo, Niederlande

Tab. 8: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Artikel	Artikel-nummer	Firma	Protokoll
Aldosterone Elisa	ADI-900-173	Enzo LifeSciences	https://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/manual/ADI-900-173_insert.pdf
Corticosterone Elisa	ADI-900-097	Enzo LifeSciences	https://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/manual/ADI-900-097_insert.pdf
Mouse Cx3CL1/Fractalkine DuoSet Elisa	DY472	R&D Systems	https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dy472.pdf?v=20220818&_ga=2.20160248.1133663176.1660805784-1672656848.1656393668&_gac=1.50064146.1660805993.EAlalQobChMIhfyjyufP-QIVVojVCh3bagnREAYAiAAEgK3YvD_BwE

Tab. 9: Verbrauchsmaterialien

Material	Artikelnummer	Firma
Zellkultur-Testplatten 24 Wells F	TPPA92424	VWR, Wayne, PA, USA
Zellkultur-Testplatten 96 Wells rund 6,7 mm	TPPA92697	VWR, Wayne, PA, USA
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml	72.706	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml	72.695.400	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
FACS-Tubes (Röhre 5 ml 75x12 mm PS für FACSCanto)	551.579	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Siebgewebe 100 µm, Gr. 102x100 cm	2009773	Labomedic, Bonn, Deutschland
Corning™ Falcon™ Zentrifugenröhrchen 15 ml	188271	VWR, Wayne, PA, USA
PCR-Tubes 0,2 ml, Flachdeckel, farblos	711090	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
NucleoSpin RNA Isolation Kit	740.955.250	MachereyNagel, Düren, Deutschland
LS Columns	130-042-401	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
BD Columbia Agar mit 5% Schafblut	PA-254005.6	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Einmalkanülen Gr.18 braun 0,45x25mm	1798067	Labomedic, Bonn, Deutschland
Einmalkanülen Gr.16 blau 0,60x25mm à 100Stk.	1798065	Labomedic, Bonn, Deutschland
Tuberkulinspritze	115105	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

Alle Tierversuche wurden nach den Standards der institutionellen Tierschutzrichtlinien durch autorisiertes Personal nach Genehmigung durch die zuständigen Behörden (Tierversuchsantragsnummer: 81-02.04.2018.A089) durchgeführt. Wildtyp Mäuse respektive CX3CR1-Knockout Mäuse (siehe **Tab. 3**) wurden je nach Käfiggröße in

Gruppen von 1-3 oder 4-6 Mäusen pro Käfig bei invertiertem Tag-Nach-Rhythmus (Helligkeit ab 19:00Uhr, Dunkelheit ab 09:00 Uhr) gehalten. Die Mäuse hatten stets freien Zugriff auf Wasser und standardisiertes Pelletfutter.

2.2.1.1 LPS-Provokation

Die intraperitoneale Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) ist ein etabliertes Modell zur Simulation einer systemischen Infektion mit gramnegativen Bakterien (Seemann et al., 2017). Durch die genaue Dosierbarkeit des LPS lässt sich so in den Mäusen verlässlich eine vergleichbare Immunreaktion reproduzieren. Der Vorrat an Lipopolysaccharid (LPS) wird bei -20 °C gelagert und vor Gebrauch schonend aufgetaut. Er hat eine Konzentration von 5 mg/ml und wird bis zur angestrebten Zielkonzentration für ein Injektionsvolumen von 10 µl/g Körpergewicht (KG) mit PBS-Puffer verdünnt. Für die Berechnung der gewichtsadaptierten Injektionsmenge wurden die Mäuse unmittelbar bei Versuchsbeginn gewogen. Die LPS-Injektion erfolgt intraperitoneal (i.p.) per steril verpackter 1 ml Tuberkulinspritze mit Einmalkanüle Größe 16.

2.2.1.2 Hämodynamische Analyse

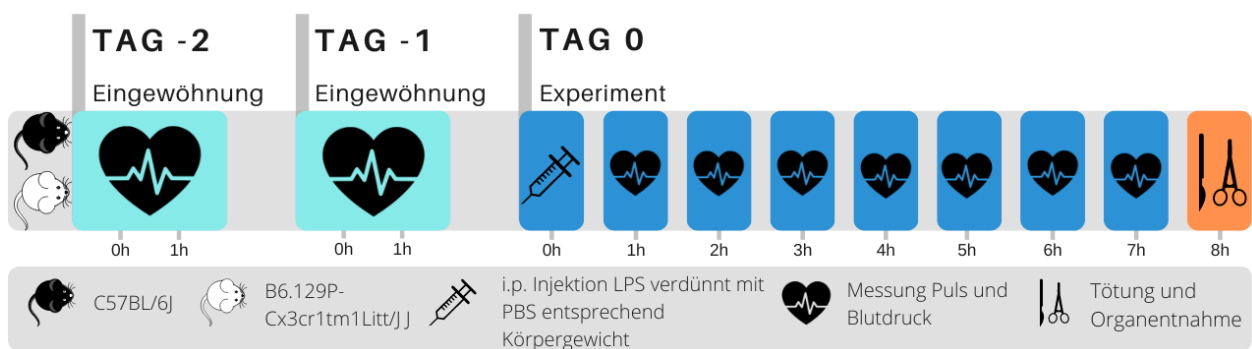


Abb. 3: Versuchsablauf LPS-Provokation

Während der vorrausgehenden Eingewöhnungsmessungen werden Daten über die hämodynamischen Parameter in Homöostase erfasst, zudem lernen die Mäuse den Ablauf der Puls- und Blutdruckmessung kennen. An Tag -1 und -2 erfolgen jeweils zwei Probemesszyklen, an Tag 0 wird das LPS gewichtsadaptiert den Mäusen intraperitoneal injiziert. Nachdem für 7 Stunden Puls und Blutdruck stündlich gemessen wurden erfolgt die Tötung der Mäuse und die Organentnahme.

Um die hämodynamische Reaktion von Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen zu analysieren, werden die Versuchstiere wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben an den Messvorgang gewöhnt. Am Versuchstag werden sie dann gewichtsadaptiert mit LPS intraperitoneal injiziert (siehe Kapitel 2.2.1.1) und im Anschluss entsprechend Kapitel 2.2.3.1 überwacht (**Abb. 3**). Nach 7 Stunden erfolgt die Tötung zur Probengewinnung (siehe Kapitel 2.2.3.2 und Kapitel 2.2.3.3)

2.2.1.3 Dynamik in Populationen mononukleärer Phagozyten der Nebenniere

Um Unterschiede in der Immunantwort zwischen Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen dynamisch zu erfassen, werden die Mäuse, getrennt nach Genotyp, in jeweils 5 Gruppen aufgeteilt und erhalten eine intraperitoneale LPS-Injektion (**Abb. 4**). Im Anschluss werden sie wieder in ihren Käfigen untergebracht. Zu den Zeitpunkten 0 Stunden, 0,5 Stunden, 3 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden werden die Mäuse der entsprechenden Gruppe zur Probengewinnung getötet. Die Gruppe „Zeitpunkt 0 Stunden“ erhält kein LPS, sie wird als Basalwert verwendet.

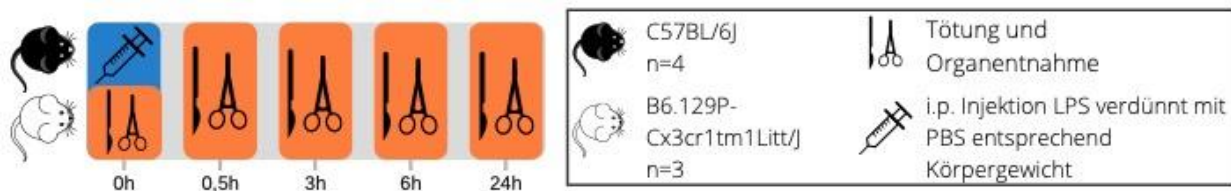


Abb. 4: Versuchsablauf zur Dynamik mononukleärer Phagozyten in der Nebenniere
Die Mäuse des jeweiligen Genotyps werden in jeweils gleichgroße Gruppen unterteilt (Wildtyp Mäuse (C57BL/6J) jeweils n=4, CX3CR1-Knockout Mäuse (Cx3cr1tm1Litt/J) jeweils n=3). Die Wildtyp Mäuse und CX3CR1-Knockout Mäuse des Zeitpunktes 0 Stunden erhalten kein LPS, sie dienen als Basalwert.

2.2.1.4 LPS-Provokation nach Dexamethason-Vorbehandlung

Wildtyp Mäuse und CX3CR1-Knockout Mäuse werden jeweils in zwei Gruppen unterteilt, von denen jeweils eine Gruppe intraperitoneal mit 0,2 mg/kg KG Dexamethason-Injektion vorbehandelt wird (**Abb. 6**). 30 min später erfolgt eine intraperitoneale Injektion von 0,8 mg/kg KG LPS. Über die folgenden 6 Stunden wird per transmissions-Photoplethysmographie stündlich Blutdruck und Puls gemessen (**Abb. 5**).

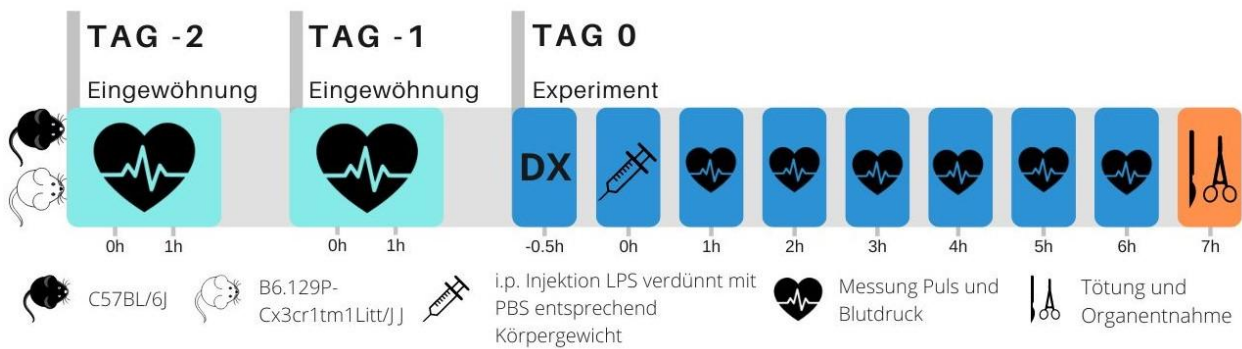


Abb. 5: Versuchsablauf der LPS-Provokation mit oder ohne Dexamethason-Vorbehandlung

Wildtyp Mäuse (C57BL/6J) und CX3CR1-Knockout Mäuse (Cx3cr1tm1Litt/J) wurden über zwei Tage hinweg durch mehrmalige Durchführung an das Messverfahren von Puls und Blutdruck gewöhnt. Am dritten Tag erfolgte bei den entsprechenden Gruppen 30 min vor LPS-Provokation die Dexamethason-Vorbehandlung. Im Anschluss erfolgte die intraperitoneale Injektion von 0,8 mg/kg KG LPS. Blutdruck und Pulsfrequenz wurden stündlich gemessen, nach 6 Stunden erfolgte die Tötung der aller Mäuse und die Organentnahme.

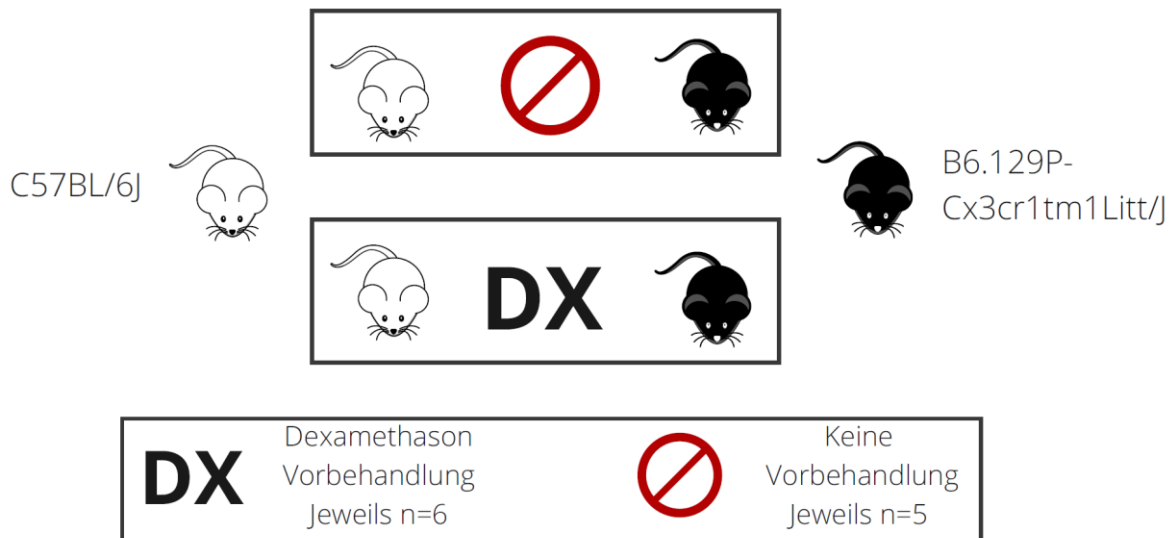


Abb. 6: Gruppeneinteilung hinsichtlich der Dexamethason-Vorbehandlung

Jeweils parallel durchgeführt wurden die Gruppen ohne, respektive mit Dexamethason-Vorbehandlung. Verglichen wurden Wildtyp Mäuse (C57BL/6J) mit CX3CR1-Knockout Mäusen (Cx3cr1tm1Litt/J). Somit lagen insgesamt 4 verschiedene Gruppen vor: Zwei Gruppen mit Wildtyp Mäusen, mit oder ohne Dexamethason-Vorbehandlung, sowie zwei Gruppen mit CX3CR1-Knockout Mäusen, mit oder ohne Dexamethason-Vorbehandlung.

Um vergleichbare Basalwerte in Homöostase zu gewinnen und um die Mäuse mit der Umgebung sowie mit dem Messverfahren vertraut zu machen, werden an den zwei, dem Experiment vorangehenden Tagen, Probemessungen durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.1.1). Pro Tag erfolgt hier die zweimalige Durchführung der Messungen. Der Mittelwert der hier gewonnenen Daten wird als Basalwert etabliert. Der weitere Versuchsablauf sowie die Probengewinnung erfolgen wie unter Kapitel 2.2.3 beschrieben.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Magnetische Zellsortierung (MACS, magnetic activated cell sorting)

Die magnetische Zellsortierung wird genutzt, um aus einem Zellkonglomerat eine Zellpopulation anhand eines bestimmten Zelloberflächenantigens zu isolieren. Bei der Niere wird dafür nach der Tötung die Organkapsel entfernt, im Anschluss das vollständige Organ entnommen und in einer 24-Well-Platte in jeweils 2 ml Verdauungslösung (**Tab. 4**) erst per Spritzenstempel homogenisiert, dann für 45 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss wird der Inhalt durch ein 100 µm Sieb in 15 ml fassende, konische Corning™ Falcon™ Zentrifugenröhrchen gegeben. Das Sieb wird jeweils mit 1 ml PBS gespült. Nachdem die Proben für 5 min bei 4 °C mit 1250 Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute, rpm) zentrifugiert wurden wird der Überstand abdekantiert, die verbleibenden Zell-Sedimente werden in 2 ml Red Blood Cell (RBC) Lysis Buffer resuspendiert und bei Raumtemperatur für 2 min inkubiert. Im Anschluss wird die Reaktion mit jeweils 4 ml MACS-Puffer abgestoppt, die Proben für 5 min bei 4 °C mit 1250 rpm zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Sediment in jeweils 500 µl MACS-Puffer mit 160 µl CD11c Perlen aufgenommen. Nun werden die Proben bei 4 °C für 15 min inkubiert. Im Anschluss werden die Proben jeweils mit 2 ml MACS-Puffer versetzt und für 5 min bei 4 °C mit 1250 rpm zentrifugiert, der Überstand wird abdekantiert und das Sediment in 2 ml MACS-Puffer aufgenommen. Die sich im QuadroMACS™ Separator, inklusive Magnet, befindenden LS-Säulen werden zuerst von 2 ml MACS-Puffer durchlaufen, dann werden die Proben hineingegeben, der Durchfluss wird in 15 ml fassenden, konischen Corning™ Falcon™ Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die Säulen werden dann noch mit jeweils 3 x 2 ml MACS-Puffer

gewaschen. Der Magnet wird entfernt und in einen separaten Raum gebracht, damit sich die magnetisch markierten Zellen vollständig aus der Säule lösen können. Mit jeweils 5 ml MACS-Puffer pro Säule werden die CD11c positiven Zellen nun ausgespült und in frischen konischen Corning™ Falcon™ Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die Proben werden erneut mit 1250 rpm bei 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Sediment wird in insgesamt 2 ml Nährmedium (**Tab. 4**) gemeinsam aufgenommen, 20 µl daraus werden mit 180 µl Tryptan-Blau gefärbt und anschließend unter Zuhilfenahme eines C-Chips auf 100.000 Zellen / 100 µl eingestellt. In dieser Konzentration werden die Zellen nun auf eine 96-Well-Platte mit Rundboden mit jeweils 100 µl pro Well gegeben. Zuletzt werden 100 µl des Behandlungsmediums (**Tab. 10**) hinzugefügt, sodass sich in jedem Well ein Volumen von 200 µl befindet.

Die Zellkulturen werden unter Standardbedingungen (Temperatur: 37 °C, Atmosphäre: 5 % CO₂) inkubiert. Die erste Gruppe wird nach 6 Stunden, wie in Kapitel 2.2.3.4 beschrieben, für die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung gefärbt, die zweite Gruppe nach 24 Stunden. Dazu werden die Kulturen in ihrer 96-Well-Platte bei 4°C für 5 min mit 1250 rpm zentrifugiert, der Überstand wird abdekantiert und das Sediment in 200 µl PBS resuspendiert, erneut bei 4°C für 5 min mit 1250 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird im Anschluss abdekantiert. Weiter wird wie in Kapitel 2.2.3.4 verfahren.

Tab. 10: Überblick über die Gruppen mit ihren jeweiligen Behandlungen

Behandlungsmedium	Konzentration	6 Stunden	24 Stunden
Ohne Behandlung		3 Replikate	3 Replikate
LPS	10 ng / ml	3 Replikate	3 Replikate
Dexamethason	10 ⁻⁶ M	3 Replikate	3 Replikate
rTNF α	100 ng / ml	3 Replikate	3 Replikate

2.2.3 Probengewinnung und Analyse

2.2.3.1 Messung von Puls und Blutdruck

Die Puls- sowie Blutdruckmessung nach LPS-Provokation erfolgt mittels transmissions-Photoplethysmographie durch das BP-2000 Blood Pressure Analysis System™. Das

Gerät sendet infrarote Strahlung durch den Schwanz der Maus. Die hier erfolgende Absorption durch das Hämoglobin unterliegt Schwankungen, welche durch die pulssynchrone Dilatation der kaudalen Arterie der Maus bedingt sind. Anhand dieser Absorptionsschwankungen wird der Puls ermittelt. Der Blutdruck wird ermittelt, indem die kaudale Arterie durch eine Schwanzmanschette so weit komprimiert wird, dass kein Puls mehr gemessen wird. Der Druck der Manschette, unter welchem der Puls wieder messbar wird entspricht der Systole, der, bei dem die Pulsamplitude nicht mehr weiter steigt, der Diastole (**Abb. 7**).

Die Werte werden in Echtzeit durch die kompatible BP-2000 Analysis Software analysiert und dokumentiert. Während der Messung befinden sich die Mäuse in einem Restriktionskäfig, welcher magnetisch auf einer Plattform befestigt wird. Die Plattform ist auf 37 °C vorgewärmt. Der Schwanz der Maus ragt aus dem hinteren Ende des Käfigs bis zur Schwanzwurzel heraus und wird zur Photoplethysmographie-Messung durch die Manschette hindurch geleitet. Durch die Restriktion der Maus werden Bewegungsartefakte minimiert, die Wärme der Plattform wirkt einer Zentralisation des Kreislaufes entgegen. Insbesondere bei Infektionsmodellen ist dies von Wichtigkeit, da es hier, bedingt durch periphere Vasokonstriktion im Rahmen der Kreislaufzentralisation, zu Messschwierigkeiten kommen kann. Pro Messzyklus wird die Systole, Diastole sowie die Pulsfrequenz zuerst fünfmal gemessen.

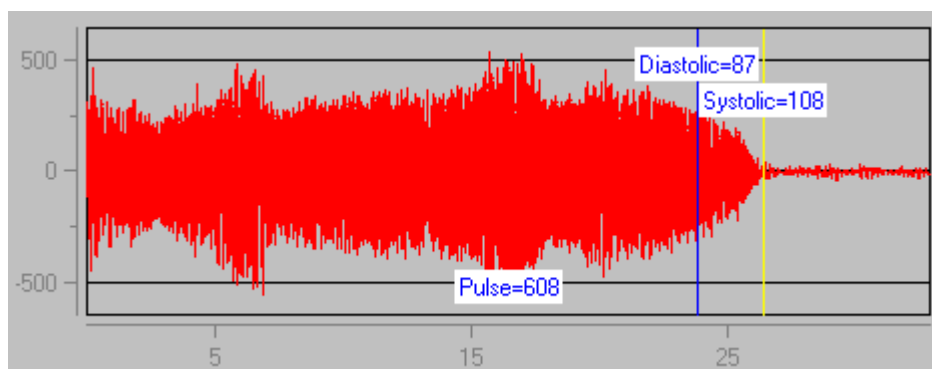


Abb. 7: Exemplarisches Messergebnis, erstellt durch die BP-2000 Analysis Software. Die Absorptionsschwankungen werden durch die Software als Puls analysiert. Die Systole entspricht dem Druck der Manschette, unter welchem der Puls wieder gemessen werden kann.

Diese Messungen dienen der Akklimation der Mäuse an die Umgebung und werden verworfen. Im Anschluss erfolgen sechs weitere Messungen, von denen der Mittelwert berechnet wird. Die Versuchsumgebung spielt eine wichtige Rolle, da fremde Eindrücke, wie zum Beispiel ungewohnte Gerüche oder Geräusche, die Maus stressen können. Um diese äußeren Störfaktoren zu minimieren, werden die Messungen in einem kleinen, stillen, dunklen Raum durch jeweils immer dieselbe Person durchgeführt.

Da es zusätzlich einer Etablierung der hämodynamischen Parameter unter homöostatischen Bedingungen bedarf und die Mäuse an die Umgebung sowie das Messverfahren gewöhnt werden sollen, durchlaufen sie an den beiden dem eigentlichen Experiment vorangehenden Tagen zur gleichen Uhrzeit wie das eigentliche Experiment jeweils zwei Messzyklen (**Abb. 3**). Während des Experiments werden die Mäuse zur Akklimation eine Stunde vor Messbeginn in den Versuchsraum gebracht. Da ein Messzyklus inklusive der Handhabung der Mäuse 30 min andauert, durchlaufen die Versuchs- und Kontrollkohorten jeweils abwechselnd diese Prozedur. Die Plattform sowie die Restriktionskäfige werden nach jedem Zyklus gründlich gereinigt. Aufgrund der Dauer der Messzyklen, der Reinigung sowie der Handhabung der Mäuse ist bei zwei Kohorten jeweils ein Messzyklus pro Stunde möglich. Da das BP-2000 Blood Pressure Analysis System™ auf sechs Messstationen limitiert ist, wird jede Gruppe auf 6 Mäuse begrenzt.

2.2.3.2 Gewebegewinnung

Die Organentnahme erfolgt nach der Tötung der Mäuse durch Isofluran. Nach Desinfektion der ventralen Seite des Thorax sowie des Abdomens der Maus wird per substernaler Punktion Blut entnommen und in 1,5 ml fassende Eppendorf Reaktionsgefäße gegeben (siehe Kapitel 2.2.3.3). Im Anschluss erfolgt die mediane Laparotomie, ergänzt durch beidseitige quere Oberbauchschnitte. Die Nebennieren werden schnellstmöglich entweder in 1,5 ml fassende Eppendorf Reaktionsgefäße gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in eine 24-Well-Platte mit Verdauung gegeben. Jede Nebenniere wird in einen separaten Well gegeben, welcher pro Nebenniere 1 ml Verdauung enthält. Nachdem die Nebennieren für 40 min in der Verdauung bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden, werden sie mit

Spritzenstempeln manuell homogenisiert und jeweils durch ein 100 µm Sieb in separate 15 ml fassende, konische Corning™ Falcon™ Zentrifugenröhrchen pipettiert. Um den Zellverlust zu minimieren wird das Sieb mit 1 ml FACS-Puffer nachgespült. Bei 4 °C werden die Proben mit 1300 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand wird abdekantiert und verworfen, das Sediment wird zum Waschen und Transport in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und auf eine 96-Well-Platte mit U-Böden gegeben. Nun werden die Proben erneut bei 4 °C mit 1300 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand wird abdekantiert und das Sediment in 30 µl MasterMix aufgenommen. Das Sediment inkubiert für 20 min bei 4°C, dann wird es in 150 µl FACS-Puffer resuspendiert. Im Anschluss wird es bei 4 °C mit 1300 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 150 µl FACS-Puffer resuspendiert.

2.2.3.3 Blutgewinnung

Unmittelbar nach Tötung der Maus wird ihr Thorax oberflächlich mit Ethanol (70%) desinfiziert und substernal mittels Einmalkanüle Größe 16 und Tuberkulinspritze punktiert. Das gewonnene Blut wird in 1,5 ml fassende, mit EDTA beschichtete, Eppendorf Reaktionsgefäße gegeben. Das Blut wird für 6 min mit 11000 rpm bei 4 °C zentrifugiert, das überstehende Serum abpipettiert und in 0,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert.

2.2.3.4 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)

Verschiedene Zellpopulationen lassen sich anhand der von ihnen exprimierten Oberflächenantigene voneinander unterscheiden. In der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung werden mit Fluorophor konjugierte Antikörper genutzt, um solche Oberflächenstrukturen bestimmter Zellpopulationen zu markieren (**Abb. 8**). Die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung ermöglicht die Beurteilung von Zellen bezüglich ihrer Größe, Granularität, Komplexität aber auch hinsichtlich der Intensität mit welcher sie bestimmte Oberflächenantigene präsentieren. Die Verwendung eines MasterMix, einer Kombination von Antikörpern mit unterschiedlichen Emissionsspektren, ermöglicht die simultane Identifizierung mehrerer Oberflächenantigene.

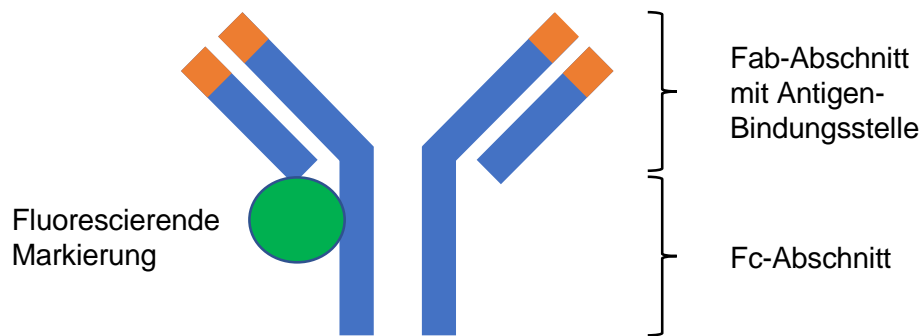


Abb. 8: Die rekombinanten Antikörper für die FACS-Analyse

Die Antikörper sind mit Fluorophor konjugiert. Der MasterMix muss so aus den Antikörpern von Interesse zusammengesetzt werden, dass sich ihre Emissionsspektren möglichst wenig überschneiden. Um ungewollte Bindungen zu vermeiden werden die Enden der Fc-Abschnitte der Antikörper durch einen Fc-Block besetzt.

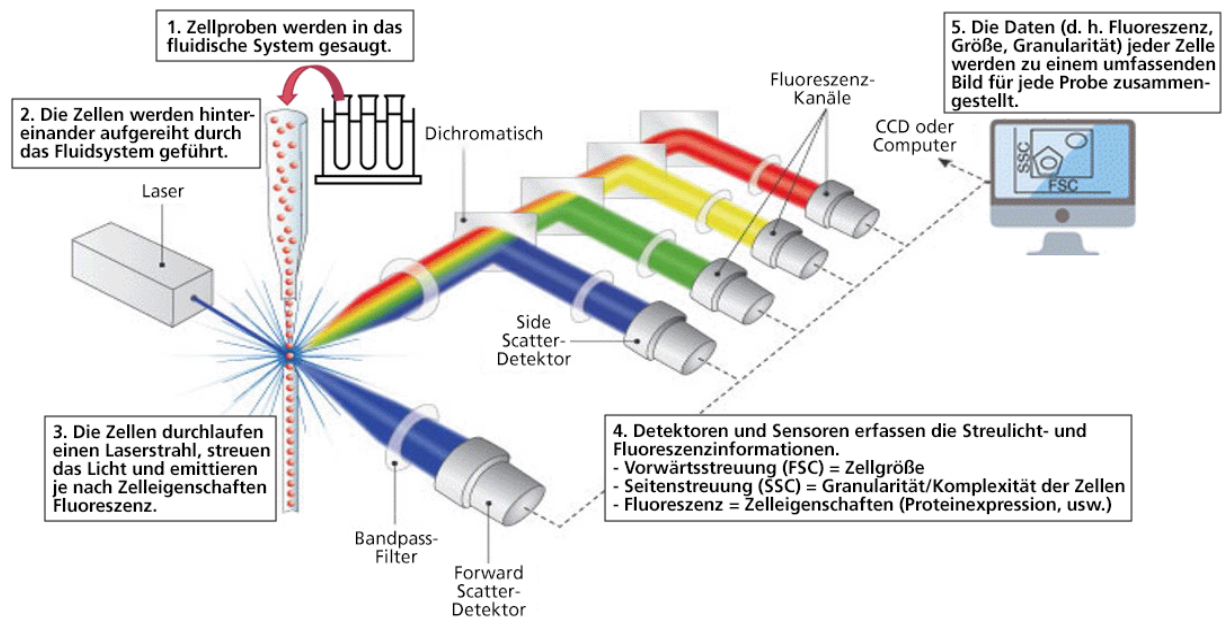


Abb. 9: Prinzip der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (Biomol GmbH - Life Science Shop, 15.12.2022)

Für die Kompensierung des Durchflusszytometers BD FACS Canto II (beispielhaft **Abb. 9**) werden Einzelfärbungen mit Kompensierungsperlen (compensation beads) vorbereitet. Hier werden in einer 96 Well Platte mit U-Böden jeweils 50 µl FACS-Puffer mit jeweils einem der Antikörper aus der ausgewählten Antikörper-Palette im selben Verhältnis wie im MasterMix gemischt. Anschließend werden 50 µl Kompensationsperlen mit jeweils 30 µl des Antikörpers vermischt und bei 4 °C für 20

min inkubiert. Im Anschluss wird die 96 Well Platte mit U-Böden mit 1250 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wird jeweils in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert.

2.2.3.5 Gating-Strategie

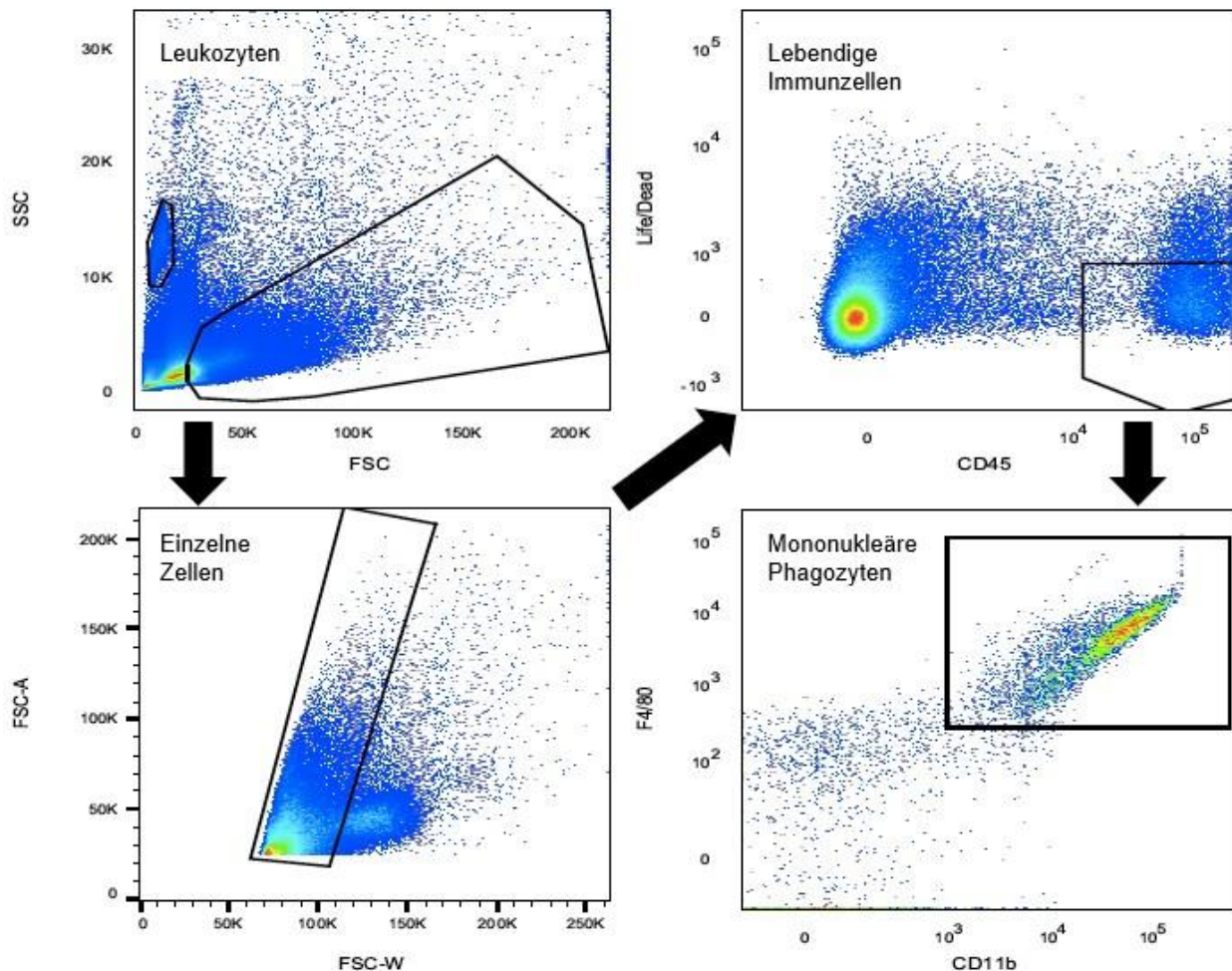


Abb. 10: Gating-Strategie für die Identifikation mononukleärer Phagozyten der Nebenniere

Nachdem Leukozyten anhand des Profils ihrer vorwärts- sowie seitwärts Streuung isoliert worden sind, werden Dubletten aussortiert. Von den verbliebenen Zellen werden die lebendigen, CD45+ Zellen, und als letztes die CD11b+ F4/80+ Zellen, isoliert.

SSC: Seitliche Streuung, FSC: Vorwärts Streuung Breite, FSC-A: Vorwärts Streuung Fläche

Die Analyse der FACS-Daten erfolgt unter der Verwendung des Analyseprogramms FlowJo™. Nachdem zu Beginn die Leukozyten identifiziert und für die weitere Analyse isoliert wurden, folgt nun die Aussortierung der Dubletten und toten Zellen, sowie eine weitere Isolation von CD45+ Zellen. Aus der nun bereinigten Population an lebendigen CD45+ Leukozyten werden für diese Arbeit mononukleäre Phagozyten anhand ihrer Expression von CD11b und F4/80 identifiziert und isoliert (**Abb. 10**).

2.2.3.6 Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR)

Ribonukleinsäure (ribonucleic acid/RNA) -Aufreinigung

Die bei -80 °C gelagerten Nebennieren werden langsam auf Zimmertemperatur aufgetaut, die RNA wird nach Anleitung des NucleoSpin™ RNA Isolation Kit aufgereinigt.

Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary DNA/cDNA)

Für die Synthese von cDNA wird die aufgereinigte RNA in entsprechendem Verhältnis mit DEPC behandeltem Wasser versetzt, sodass die Probe eine RNA-Konzentration von 1000 ng/ml aufweist. Dann werden 13,2 µl einer jeden Probe mit 6,8 µl des cDNA MasterMix versetzt (**Tab. 4**). Das Gemisch beträgt pro Probe nun 20 µl und wird jeweils in einem einzelnen PCR-Gefäß in den PCR-Cycler gegeben (**Tab. 11**). Im Anschluss wird die cDNA bei -80°C gelagert.

Tab. 11: Programmphasen des Mastercycler® nexus X2 – PCR Thermocycler

Phase	Zieltemperatur (°C)	Zeit (Minuten)
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	bis Probenentnahme, bis zu 12 Stunden

Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (real time/rt-PCR)

Die bei -80 °C gelagerte cDNA wird schonend auf Zimmertemperatur aufgetaut und im Anschluss, pro Probe, mit jeweils 20 µl DEPC behandeltem Wasser im Volumen 1:1 verdünnt. Währenddessen werden entsprechende Mixe angesetzt, pro Probe bestehend aus 5 µl PowerTrack SYBR Green MasterMix, 0,5 µl des jeweiligen Primers und 3,5 µl DEPC behandeltem Wasser. Das Haushaltsgen GAPDH dient als Referenzgen. Diese Mixe werden nach einem vorher erstelltem Belegungsplan auf eine 384 Well-Platte pipettiert, 9 µl pro Well. Ebenfalls werden oben genanntem Belegungsplan die verdünnten cDNA-Proben mit jeweils 1 µl hinzugegeben, sie werden in Triplets angeordnet. Zur jeweiligen Kalibrierung wird pro Primer ein Triplet negativer Kontrollen mit DEPC behandeltem Wasser anstatt der Probe pipettiert. Die Platte wird nach Vollendung mit qPCR Seal verschlossen und für 5 min mit 1250 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Im LightCycler® 480 durchlaufen die Proben im Anschluss das in **Tab. 12** beschriebene Programm. Die relative mRNA-Quantifizierung erfolgt dann durch komparative Cp-Methode im Vergleich zur GAPDH-Expression.

Tab. 12: Die einzelnen Phasen des LightCycler® 480

Name Programm	Zieltemperatur (°C)	Geschwindigkeit Temperaturrampe (°C/s)	Haltezeit (s)	Anzahl Zyklen	Analysemodus
Denaturieren 1	50	4,8	120	1	keiner
Denaturieren 2	95	4,8	600	1	keiner
Amplifikation	95	4,8	15	35	Quantifikation
	60	2,4	60		
Schmelzen	50	2,5	1	1	Schmelz-kurve
	95	0,11			
Abkühlen	40	2,5	1	1	keiner

3. Ergebnisse

Immunprovokation durch die intraperitoneale Injektion mit LPS

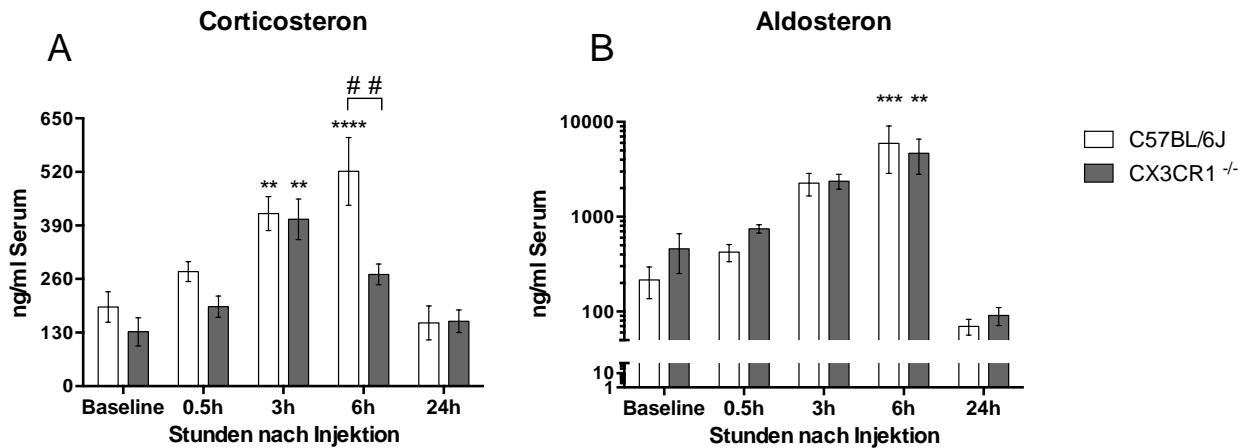


Abb. 11: Corticosteron- und Aldosteron-Plasmaspiegel nach intraperitonealer LPS-Injektion

Wildtyp Mäuse (C57BL/6J, n=4) oder CX3CR1-Knockout Mäuse (CX3CR1^{-/-}, n=3) wurden mit 0,5 mg/kg KG LPS i.p. injiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten getötet. Die Plasmaspiegel von **A** Corticosteron sowie **B** Aldosteron wurden per ELISA bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm die Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Two-way Analysis of Variance (two-way ANOVA) und Tukey's respektive Dunnett's multiple comparisons test mit Signifikanzniveau $p \leq 0,05$.

Vergleich mit Basalwert: ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$

Vergleich der Zeitpunkte: ## $p \leq 0,01$

3.1 Veränderungen der Plasmaspiegel von Corticosteron und Aldosteron

Bei systemischer Inflammation kommt es bei Mäusen, sowohl bei Corticosteron als auch bei Aldosteron, zu einem Anstieg der Plasmaspiegel (Bornstein und Briegel, 2003). Entsprechend war die zeitliche Entwicklung der Plasmaspiegel von Mäusen nach LPS-Provokation von Interesse (**Abb. 11**). Wie bei Corticosteron, kam es auch bei Aldosteron bereits 30 min nach intraperitonealer LPS-Injektion zu einem Anstieg des Plasmaspiegels von Corticosteron. Nach 3 Stunden ist der gemessene Corticosteron Plasmaspiegel, im Vergleich zum Basalwert, sowohl bei den Wildtyp Mäusen als auch bei den CX3CR1-Knockout Mäusen jeweils signifikant erhöht. Während die CX3CR1-Knockout Mäuse im Folgenden wieder einen niedrigeren Plasmaspiegel für Corticosteron verzeichnen, wird bei den Wildtyp Mäusen nach 6 Stunden der höchste Plasmaspiegel gemessen. Er ist zu jenem Zeitpunkt signifikant höher als jender der

CX3CR1-Knockout Mäuse. Nach 24 Stunden wird bei beiden Versuchsgruppen wieder, ein dem Basalwerten ähnlicher, Corticosteron Plasmaspiegel gemessen, ohne signifikanten Unterschied. Der Plasmaspiegel für Aldosteron der Wildtyp und CX3CR1-Knockout Mäuse unterscheidet sich in Homöostase nicht signifikant. Er steigt bei den Wildtyp Mäusen und den CX3CR1-Knockout Mäusen nach 30 min an und ist nach 6 Stunden signifikant erhöht. Der nächste gemessene Plasmaspiegel für Aldosteron nach 24 Stunden ist bei beiden Gruppen jeweils wiederum niedriger als unter homöostatischen Bedingungen, wenn auch nicht signifikant.

3.2 Hämodynamische Unterschiede nach intraperitonealer LPS-Injektion

Nach intraperitonealer Injektion der Mäuse mit 0,5 mg/kg KG LPS wurde bei ihnen stündlich per transmissions-Photoplethysmographie der Blutdruck und der Puls gemessen. Unter homöostatischen Bedingungen unterscheiden sich weder der Blutdruck noch die Pulsfrequenz der beiden Gruppen. Nach der intraperitonealen Injektion von LPS ändert sich dies jedoch: Der Blutdruck der Wildtyp Mäuse steigt an, der Blutdruck der CX3CR1-Knockout Mäusen sinkt. Nach 4 Stunden sind diese Unterschiede erstmals signifikant: Die Wildtyp Mäuse haben zu diesem Zeitpunkt einen signifikant höheren Blutdruck als die CX3CR1-Knockout Mäuse. Beim Vergleich der Verlaufswerte mit denen aus der Eingewöhnungsphase gibt es bei beiden Gruppen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede. Gespiegelt verhält es sich mit der Pulsfrequenz: Auch hier sind während der Eingewöhnungsphase keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen auszumachen. Nach LPS-Injektion kommt es bei beiden Gruppen, im Vergleich zu den Basalwerten, zu einem Abfall der Pulsfrequenz, welcher bei den CX3CR1-Knockout Mäusen nach 3 Stunden, bei den Wildtyp Mäusen nach 4 Stunden signifikant ist. Dies setzt sich bis zum Ende des Experiments fort, die niedrigsten Werte werden bei beiden Gruppen während den jeweils letzten Messungen nach 7 Stunden registriert.

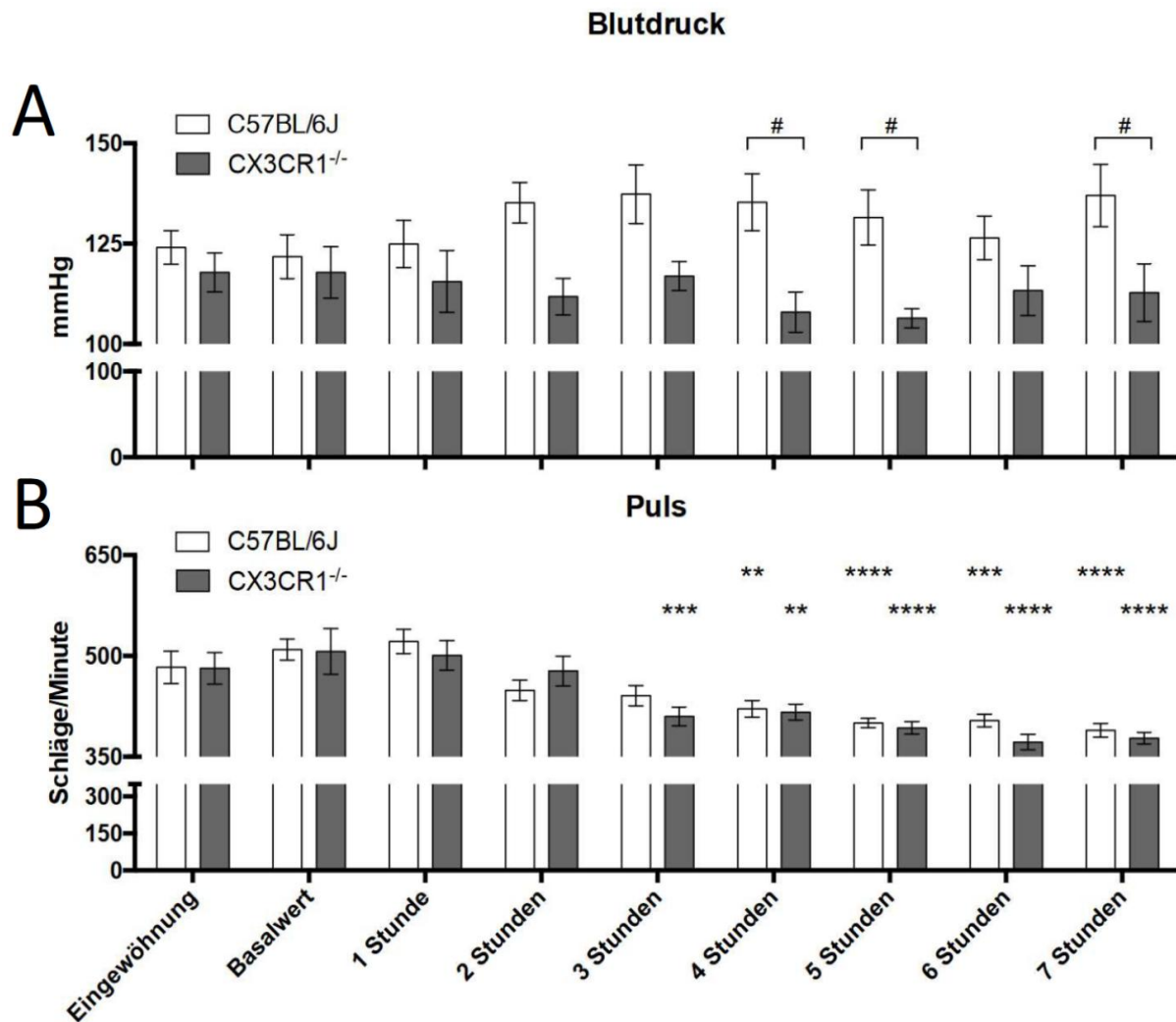


Abb. 12: Hämodynamik nach intraperitonealer LPS-Injektion

Wildtyp Mäuse (C57BL/6J, n=6) oder CX3CR1-Knockout Mäuse (CX3CR1^{-/-}, n=6) wurden mit 0,5 mg/kg KG LPS i.p. injiziert und im Anschluss hämodynamisch überwacht.

A zeigt den systolischen Blutdruck der beiden Versuchsgruppen, B zeigt ihren Puls zu den jeweiligen Zeitpunkten.

Abgebildet sind die Mittelwerte \pm die Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Two-way Analysis of Variance (two-way ANOVA) und Tukey's respektive Dunnett's multiple comparisons test sowie zweiseitiger studentischer t-Test mit Signifikanzniveau $p \leq 0,05$.

Vergleich mit Eingewöhnung: ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$

Vergleich der Zeitpunkte: # $p \leq 0,05$

3.3 Mononukleäre Phagozyten der Nebenniere in Wildtyp Mäusen

Im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen, welche keine LPS-Provokation bekamen, befinden sich, bei den Wildtyp Mäusen mit LPS-Provokation, 3 Stunden nach intraperitonealer LPS-Injektion, signifikant mehr mononukleäre Phagozyten in der Nebenniere (**Abb. 13**). Die Anzahl mononukleärer Phagozyten in der Nebenniere nimmt im Anschluss kontinuierlich ab, nach 6 Stunden respektive 24 Stunden werden immer weniger lebende Zellen dieser Population in der Nebenniere identifiziert. Der Anteil CX3CR1-positiver Zellen an dieser Population steigt nach einer halben Stunde an und ist nach 3 Stunden signifikant. Im weiteren Verlauf nimmt ihr Anteil wieder ab und ist nach 24 Stunden signifikant niedriger als nach 3 Stunden respektive 6 Stunden, er ist dennoch weiterhin signifikant höher als in Homöostase.

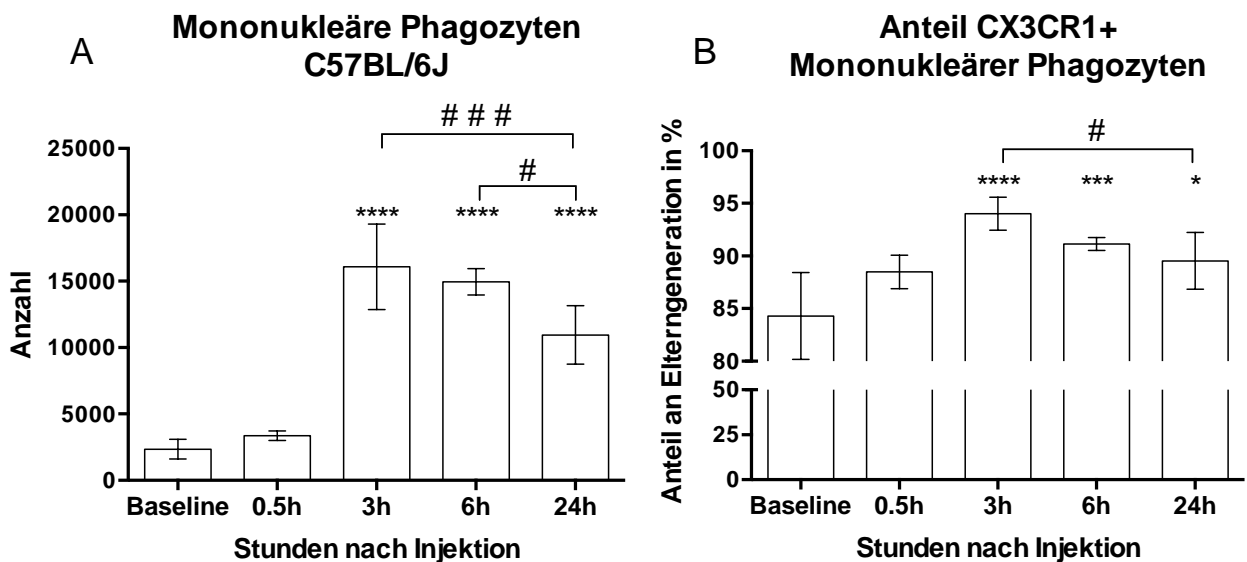


Abb. 13: Mononukleäre Phagozyten der Nebenniere nach LPS-Provokation Wildtyp Mäuse (C57BL/6J, n=4) bekamen 0,5 mg/kg KG LPS i.p. injiziert und wurden zu den angegebenen Zeitpunkten getötet.

A zeigt die Anzahl mononukleärer Phagozyten zu den jeweiligen Zeitpunkten in der Nebenniere, B stellt den Anteil CX3CR1-positiver Zellen an deren Gesamtpopulation in der Nebenniere dar.

Abgebildet sind die Mittelwerte \pm die Standardfehler des Mittelwertes (SEM). One-way Analysis of Variance (one-way ANOVA) und Tukey's respective Dunnett's multiple comparisons test mit Signifikanzniveau $p \leq 0,05$.

Vergleich mit Basalwert: * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$

Vergleich der Zeitpunkte: # $p \leq 0,05$, ### $p \leq 0,001$

3.4 Die Dynamik der Oberflächenantigene mononukleärer Phagozyten der Nebenniere von Wildtyp Mäusen anhand der geometrischen Mitte der Fluoreszenz-Intensität (gMFI)

Zu den jeweiligen Zeitpunkten nach LPS-Provokation (**Abb. 14**) wird die Population mononukleärer Phagozyten der Nebenniere auf die Fluoreszenz-Intensität der, mit einem Fluorophor konjugierten Antikörper gegen verschiedene Oberflächenantigene hin analysiert. Die gMFI der Antikörper gegen die Oberflächenantigene F4/80 sowie CD11b ist nach 3 Stunden, im Vergleich mit den jeweiligen Basalwerten, signifikant erhöht, nach 6 Stunden kommt es zu einem Abfall, welcher bei F4/80 signifikant ausfällt. Vergleicht man die Werte von F4/80 und CD11b nach 6 Stunden mit denen nach 24 Stunden, so ist es bei beiden Oberflächenantigenen wieder zu einem signifikanten Anstieg der gMFI auf das Niveau der Werte nach 3 Stunden, gekommen.

Die gMFI des Antikörpers gegen CD11c ist nach 3 Stunden signifikant geringer als zu Versuchsbeginn. Nach 6 Stunden wird die geringste gMFI für CD11c registriert. Nach 24 Stunden ist sie auf dem Niveau von 3 Stunden, weiterhin signifikant niedriger als bei Homöostase.

Die gMFI des Antikörpers gegen CCR2 nimmt kontinuierlich ab, für die Population mononukleärer Phagozyten der Nebenniere wird nach 3 Stunden eine signifikant geringere gMFI für den Antikörper gegen CCR2 registriert, dies setzt sich nach 6 Stunden respektive 24 Stunden fort.

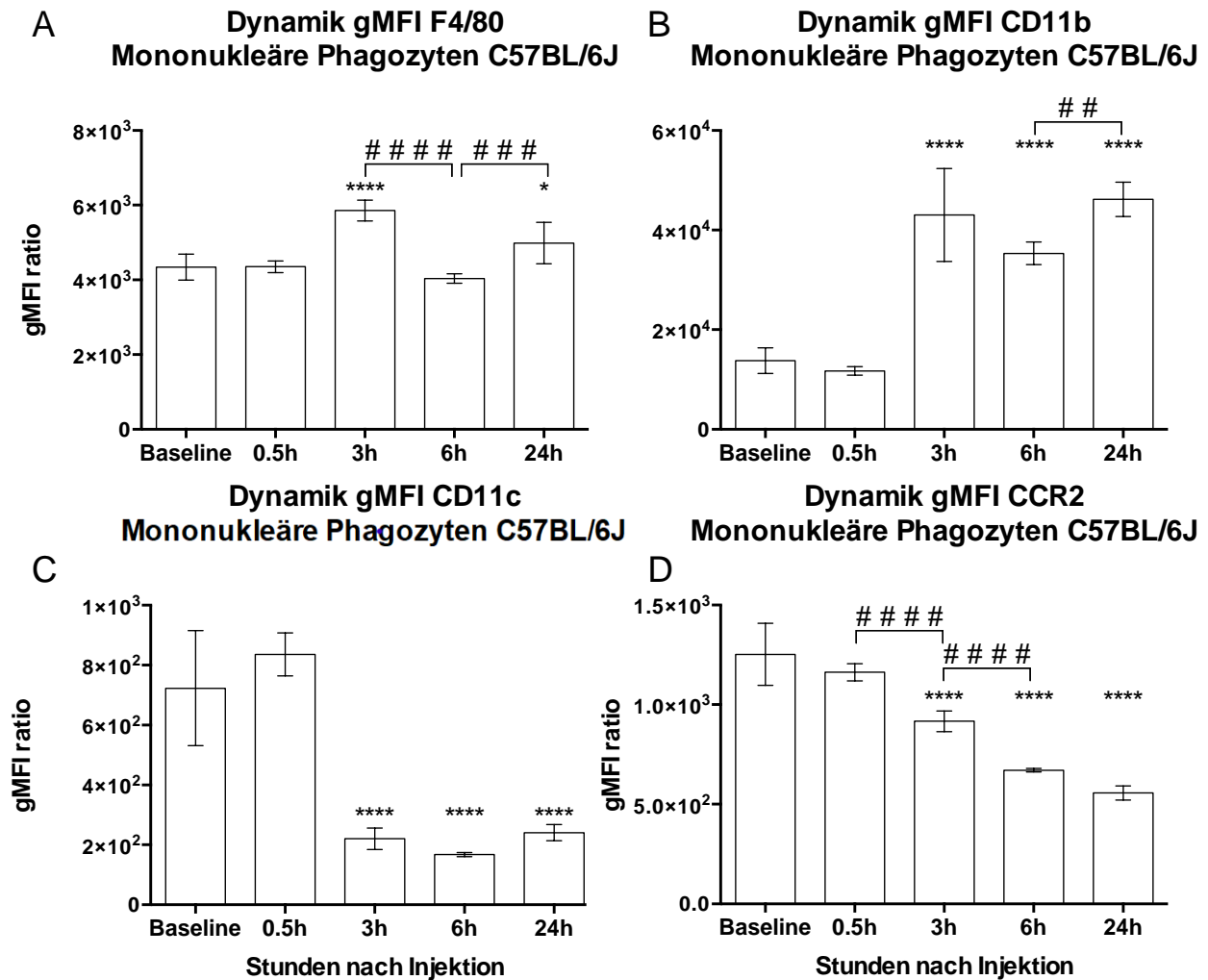


Abb. 14: Die Dynamik der Oberflächenantigene mononukleärer Phagozyten der Nebenniere nach LPS-Provokation

Wildtyp Mäuse (C57BL/6J, n=4) wurden mit 0,5 mg/kg KG LPS i.p. injiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten getötet. A-D zeigen die geometrische Mitte der Fluoreszenz-Intensität (gMFI) der jeweiligen Antikörper.

Abgebildet sind die Mittelwerte \pm die Standardfehler des Mittelwertes (SEM). One-way Analysis of Variance (one-way ANOVA) und Tukey's respektive Dunnett's multiple comparisons test mit Signifikanzniveau $p \leq 0,05$.

Vergleich mit Basalwert: * $p \leq 0,05$, **** $p \leq 0,0001$

Vergleich der Zeitpunkte: ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,001$, #### $p \leq 0,0001$

3.5 Die Dynamik der CX3CL1-CX3CR1-Achse der Nebenniere

Die mononukleären Phagozyten der Nebenniere bei Wildtyp Mäusen zeigen 30 min nach LPS-Provokation einen nicht signifikanten Anstieg der gMFI für den Antikörper gegen CX3CR1. Nach 3 Stunden wird eine signifikant geringere gMFI für den Antikörper gegen CX3CR1 registriert, nach 6 Stunden ist die gMFI mit noch höherer Signifikanz geringer.

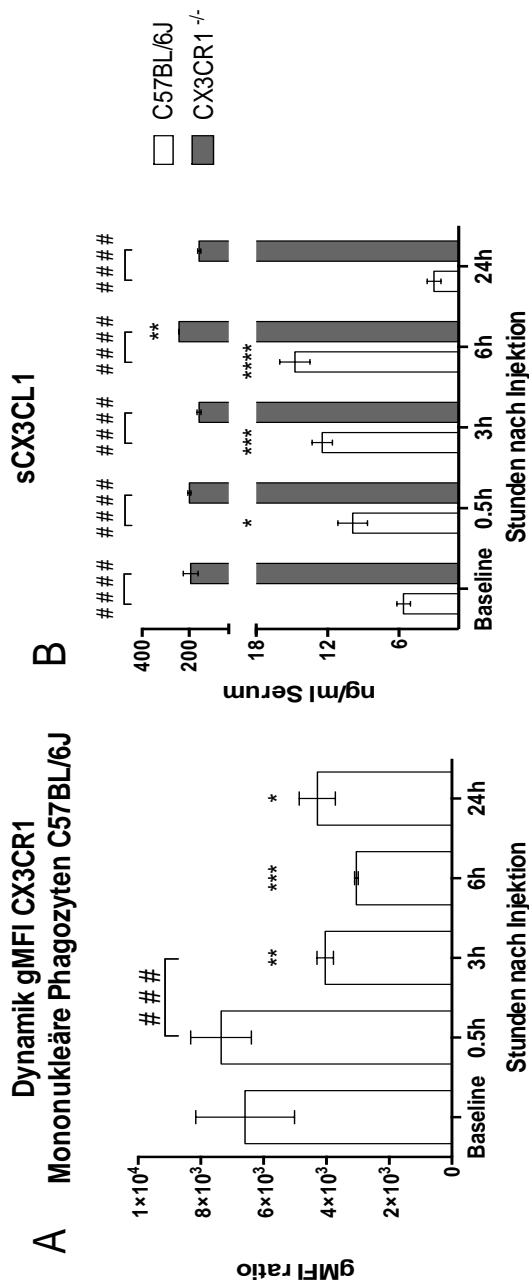


Abb. 15: Die Dynamik der CX3CL1-CX3CR1-Achse nach LPS-Provokation Wildtyp Mäuse (C57BL/6J, n=4) oder CX3CR1-Knockout Mäuse (CX3CR1^{-/-}, n=3) wurden mit 0,5 mg/kg KG LPS i.p. injiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten getötet. **A** zeigt die geometrische Mitte der Fluoreszenz-Intensität (gMFI) des Antikörpers gegen CX3CR1 auf mononukleären Phagozyten in den Nebennieren in Wildtyp Mäusen. In **B** sind die Serumspiegel für sCX3CL1 in Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm die Standardfehler des Mittelwertes (SEM). One-way Analysis of Variance (one-way ANOVA) beziehungsweise two-way Analysis of Variance (two-way ANOVA) und Tukey's respektive Dunnett's multiple comparisons test mit Signifikanzniveau $p \leq 0,05$. Vergleich mit Basalwert: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ Vergleich der Zeitpunkte: ### $p \leq 0,001$, #### $p \leq 0,0001$

Nach 24 Stunden ist es zu einem Anstieg der gMFI für den Antikörper gegen CX3CR1 gekommen, sie ist weiterhin signifikant niedriger als vor LPS-Injektion (**Abb. 15 A**). Die Analyse des Serumspiegels von sCX3CL1 ergibt, dass er bei den CX3CR1-Knockout Mäusen zu jedem gemessenen Zeitpunkt um bis zu 30-fach höher ist als bei den Wildtyp Mäusen. Nach 6 Stunden wird bei den CX3CR1-Knockout Mäusen ein signifikant erhöhter Spiegel für sCX3CL1 gemessen, zu den Zeitpunkten 0,5 Stunden, 3 Stunden sowie 24 Stunden ist der Unterschied gegenüber den unbehandelten CX3CR1-Knockout Mäusen nicht signifikant. Bei den Wildtyp Mäusen ist der Plasmaspiegel für sCX3CL1 nach 0,5 Stunden signifikant erhöht, nach 3 Stunden erhöht sich die Signifikanz, nach 6 Stunden wird der höchste Plasmaspiegel registriert. Nach 24 Stunden ist der Plasmaspiegel für sCX3CL1 bei den Wildtyp Mäusen soweit wieder gesunken, dass keine Signifikanz mehr besteht (**Abb. 15 B**).

3.6 Mononukleäre Phagozyten in der Nebenniere bei Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen nach LPS-Provokation

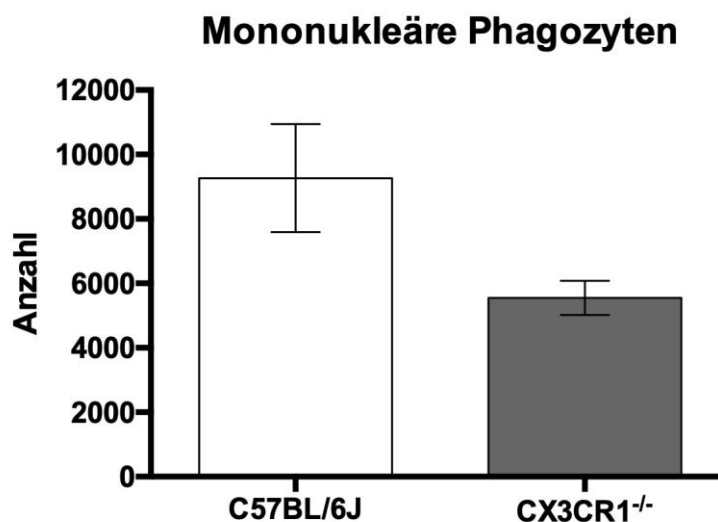


Abb. 16: Vergleich der Populationsgröße mononukleärer Phagozyten der Nebenniere bei Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen nach LPS-Provokation. Wildtyp Mäuse (C57BL/6J, n=6) oder CX3CR1-Knockout Mäuse (CX3CR1^{-/-}, n=6) erhielten eine i.p. Injektion mit jeweils 0,5 mg/kg KG LPS. Nach 6 Stunden erfolgte die Tötung zur Probengewinnung. Zu sehen ist die Anzahl mononukleärer Phagozyten in der Nebenniere der jeweiligen Genotypen. Abgebildet sind die Mittelwerte ± die Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Zweiseitiger studentischer t-Test mit Signifikanzniveau $p \leq 0,05$.

Die Analyse der Populationsgröße der mononukleären Phagozyten der Nebennieren bei Wildtyp Mäusen sowie CX3CR1-Knockout Mäusen nach LPS-Provokation ergibt nach 6 Stunden keinen signifikanten Unterschied (**Abb. 16**). Die Populationen mononukleärer Phagozyten der Nebenniere bei beiden Versuchsgruppen werden weiter auf die gMFI der Antikörper gegen F4/80 oder CD11b analysiert: Die mononukleären Phagozyten der CX3CR1-Knockout Mäuse zeigen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen eine signifikant erhöhte gMFI für den Antikörper gegen CD11b sowie eine signifikant geringere gMFI für den Antikörper gegen F4/80 (**Abb. 17**).

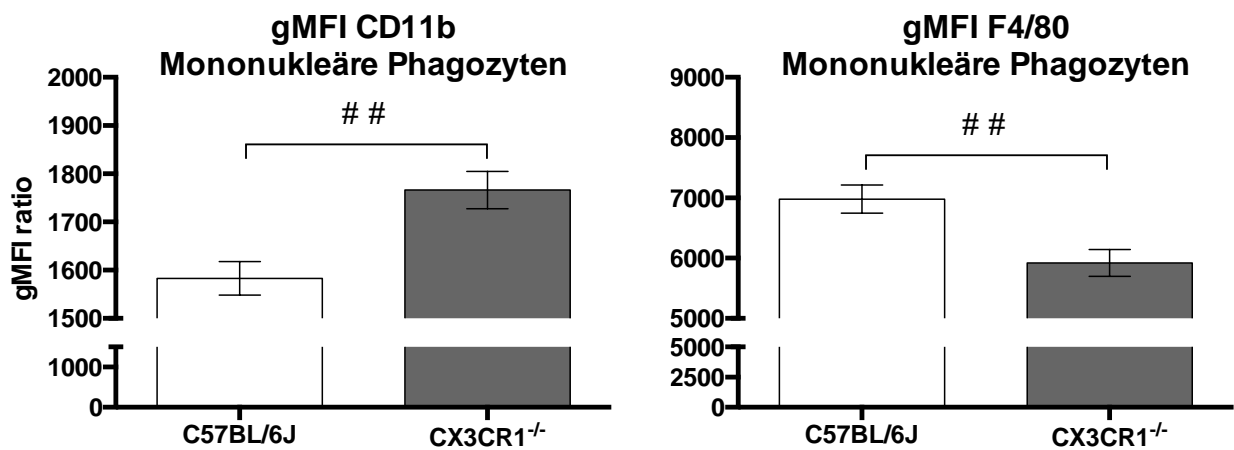


Abb. 17: Oberflächenmarker mononukleärer Phagozyten der Nebenniere in Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen nach LPS-Provokation
 Wildtyp Mäuse (C57BL/6J, n=6) oder CX3CR1-Knockout Mäuse (CX3CR1^{-/-}, n=6) erhielten eine i.p. Injektion von jeweils 0,5 mg/kg KG LPS, nach 6 Stunden erfolgte die Tötung zur Probengewinnung. Gezeigt sind die geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenz-Intensität (gMFI) für den jeweiligen Antikörper. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm die Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Zweiseitiger studentischer t-Test mit Signifikanzniveau $p \leq 0,05$. Vergleich der Zeitpunkte: ## $p \leq 0,01$

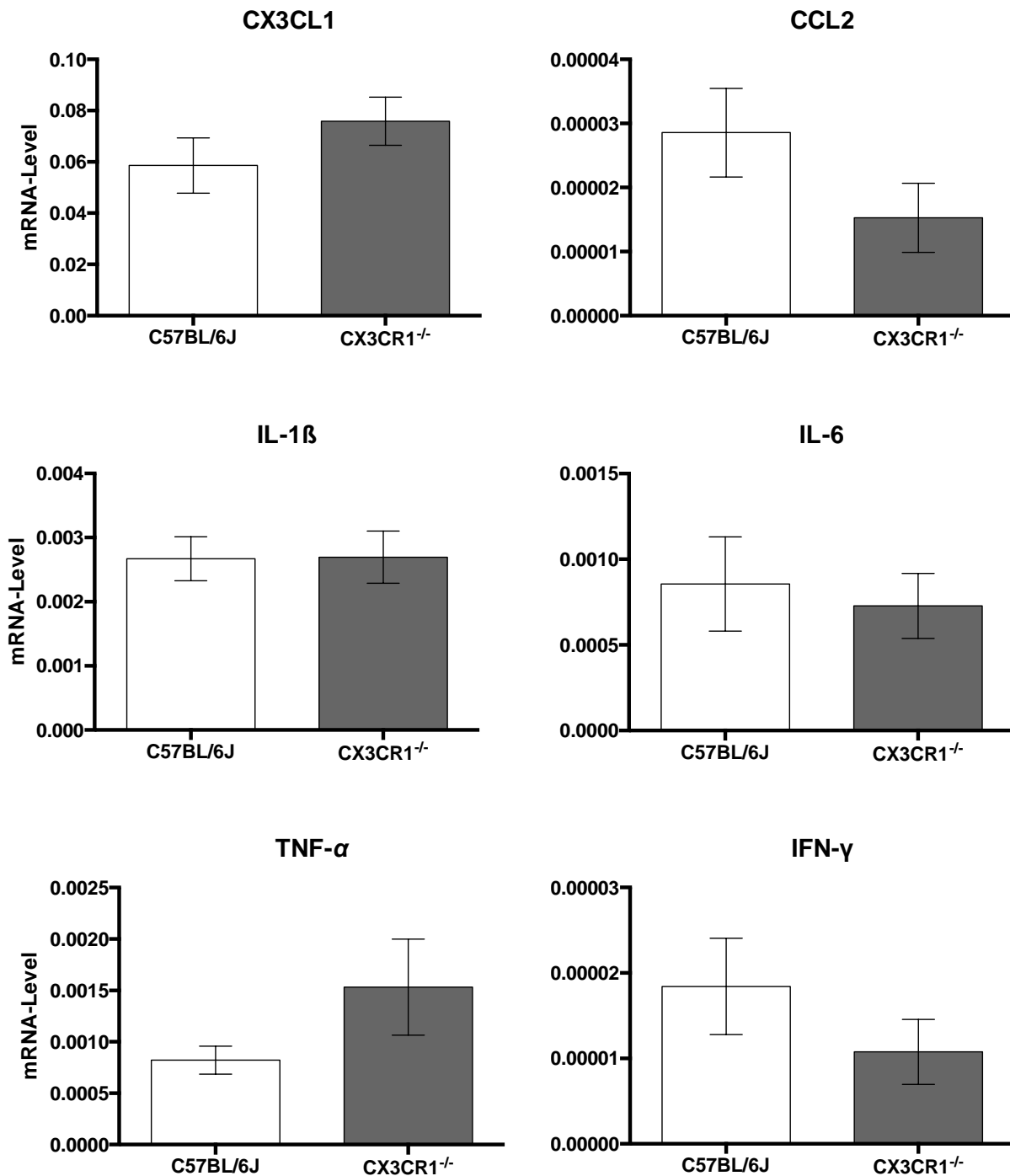


Abb. 18: Zytokine in der Nebenniere per rtPCR nach LPS-Provokation Wildtyp Mäuse (C57BL/6J, n=6) oder CX3CR1-Knockout Mäuse (CX3CR1^{-/-}, n=6) erhielten eine i.p. Injektion von jeweils 0,5 mg/kg KG LPS. Nach 6 Stunden erfolgte die Tötung zur Probengewinnung. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm die Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Zweiseitiger studentischer t-Test mit Signifikanzniveau $p \leq 0,05$.

3.7 Zytokine in der Nebenniere nach LPS-Provokation

Zwischen Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen fallen nach LPS-Provokation, bei der relativen Quantifizierung der gezeigten inflammatorischen Zytokine in der Nebenniere mittels mRNA-Gehalt, keine signifikanten Unterschiede auf (**Abb. 18**).

Für CCL2 und IFN- γ ist der mRNA-Gehalt in der Nebenniere der Wildtyp Mäuse im Vergleich mit dem der CX3CR1-Knockout Mäuse leicht erhöht, der Gehalt für CX3CL1 und TNF- α ist hingegen dezent niedriger. Bei IL-1 β und IL-6 sind keine Unterschiede festzustellen.

3.8 Auswirkung von Stressmediatoren auf die Expression von CX3CR1 *in vitro*

Von Wildtyp Mäusen werden renale CD11c⁺ Zellen isoliert (siehe Kapitel 2.2.2.1) und *in vitro* mit LPS, Dexamethason oder TNF- α behandelt (siehe Kapitel 2.2.2). Alle renalen CD11c⁺ Zellen zeigen nach 24 Stunden eine niedrigere gMFI des Antikörpers gegen CX3CR1 als nach 6 Stunden. Mit Ausnahme der Dexamethason-behandelten Zellen fällt dieser gMFI-Unterschied für alle Gruppen jeweils signifikant aus (**Abb. 19**). Zu den beiden Zeitpunkten 6 Stunden und 24 Stunden ist die gMFI des Antikörpers gegen CX3CR1 bei den LPS-behandelten Zellen signifikant geringer als bei den unbehandelten Zellen. Die Dexamethason-behandelten Zellen haben sowohl nach 6 Stunden als auch nach 24 Stunden eine signifikant höhere gMFI des Antikörpers gegen CX3CR1 als die unbehandelte Kontrollgruppe. Die TNF- α -behandelten Zellen zeigen weder nach 6 Stunden noch nach 24 Stunden signifikante Unterschiede zu den Zellen der unbehandelten Kontrollgruppe in der gMFI des Antikörpers gegen CX3CR1.

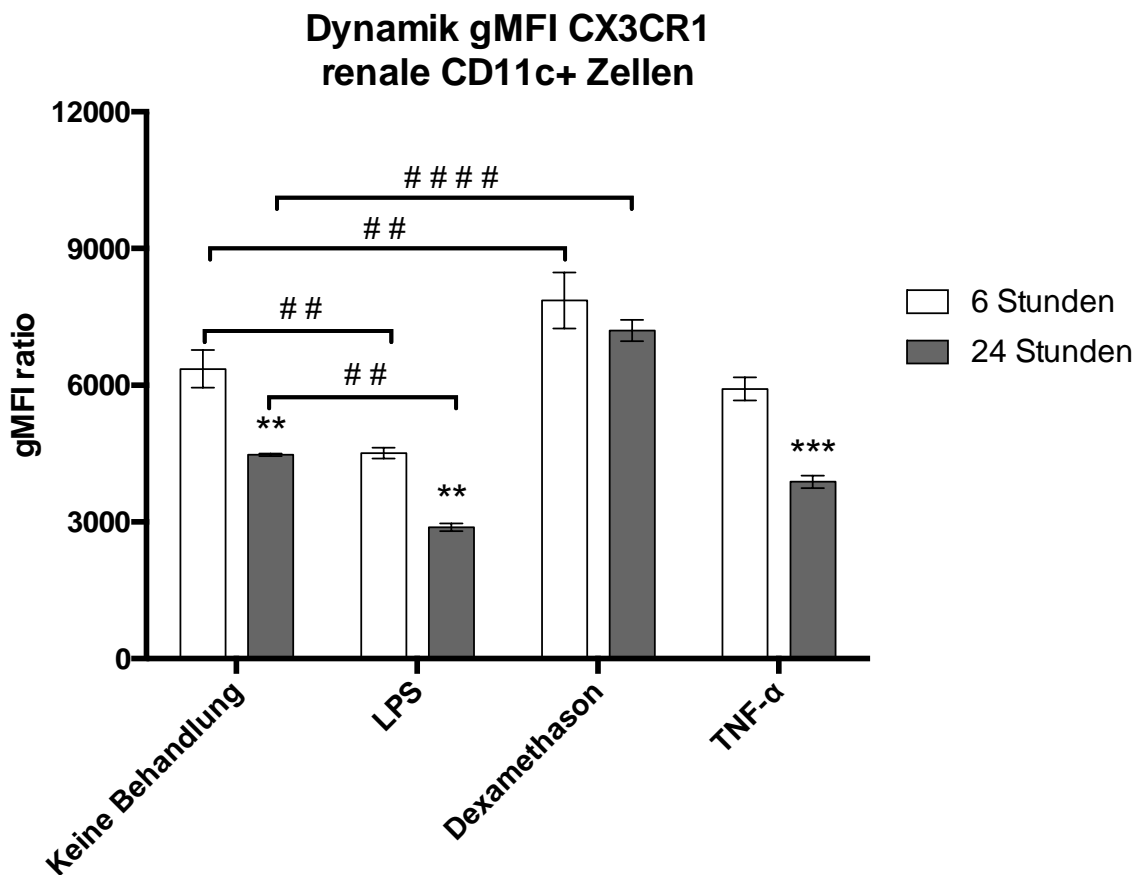


Abb. 19: Die gMFI des Antikörpers gegen CX3CR1 renaler CD11c+ Zellen von Wildtyp Mäusen nach *in vitro* Behandlung mit LPS, Dexamethason oder TNF- α CD11c+ renale Zellen von Wildtyp Mäusen (n=3) wurden isoliert und in Nährmedium kultiviert. Nach 6 Stunden respektive 24 Stunden wurden die Zellen per FACS auf die gMFI des Antikörpers gegen CX3CR1 auf der Zelloberfläche analysiert.

Abgebildet sind die Mittelwerte \pm die Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Two-way Analysis of Variance (two-way ANOVA) und Tukey's respektive Dunnett's multiple comparisons test mit Signifikanzniveau $p \leq 0,05$.

Vergleich mit Basalwert: ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Vergleich der Zeitpunkte: ## $p \leq 0,01$, #### $p \leq 0,0001$

3.9 Hämodynamische Veränderungen durch LPS-Provokation nach Dexamethason Vorbehandlung

Ohne Dexamethason-Vorbehandlung (**Abb. 20A**):

Während der Eingewöhnung der, nicht mit Dexamethason vorzubehandelnden, Mäuse ist die Pulsfrequenz der Wildtyp Mäuse signifikant höher als die der CX3CR1-Knockout Mäuse. Dies ist ebenfalls akut vor der LPS-Provokation der Fall. Zu diesem Zeitpunkt ist die Pulsfrequenz der Wildtyp Mäuse und CX3CR1-Knockout Mäuse signifikant höher

als während der Eingewöhnung. 1 Stunde nach LPS-Provokation sinkt die Pulsfrequenz der Wildtypmäuse und ist nicht mehr signifikant erhöht. Die Pulsfrequenz der CX3CR1-Knockout Mäuse sinkt ebenfalls, ist aber weiter signifikant höher als während der Eingewöhnung. Es besteht 1 Stunde nach LPS-Provokation kein signifikanter Unterschied zwischen den Pulsfrequenzen der Wildtyp Mäuse und CX3CR1-Knockout Mäuse. Die Pulsfrequenz der Wildtyp Mäuse ist 2 Stunden nach LPS-Provokation wieder signifikant höher als bei der Eingewöhnung, nun auch wieder signifikant höher als bei den CX3CR1-Knockout Mäusen. Die Pulsfrequenz der CX3CR1-Knockout Mäuse ist 2 Stunden nach LPS-Provokation signifikant höher als noch 1 Stunde zuvor. 3 Stunden nach LPS-Provokation ist die Pulsfrequenz der Wildtyp Mäuse weiter angestiegen und ist signifikant höher als 1 Stunde zuvor. Die Pulsfrequenz der CX3CR1-Knockout Mäuse ist ebenfalls signifikant höher als 1 Stunde zuvor. Der Unterschied in der Pulsfrequenz zwischen Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen ist 3 Stunden nach LPS Provokation signifikant größer als 2 Stunden nach LPS-Provokation. Die Pulsfrequenz der Wildtyp Mäuse ist 4 Stunden nach LPS-Provokation nicht mehr so stark signifikant erhöht wie noch 3 Stunden nach LPS-Provokation. Die Pulsfrequenz der CX3CR1-Knockout Mäuse ist zu diesem Zeitpunkt unverändert signifikant erhöht. Es besteht nun kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der Pulsfrequenz der Wildtyp Mäuse und jener der CX3CR1-Knockout Mäuse. 5 Stunden nach LPS-Provokation ist die Pulsfrequenz der Wildtyp Mäuse im Vergleich zu der Eingewöhnung nicht mehr signifikant erhöht. Die Pulsfrequenz der CX3CR1-Knockout Mäuse ist zu diesem Zeitpunkt im Vergleich mit der Eingewöhnung weiterhin unverändert signifikant erhöht. Auch 5 Stunden nach LPS-Provokation besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Pulsfrequenz der Wildtyp Mäuse und der CX3CR1-Knockout Mäuse.

Der Blutdruck der nicht mit Dexamethason vorbehandelten Wildtyp Mäuse ist 2 Stunden und 3 Stunden nach LPS-Provokation signifikant niedriger als während der Eingewöhnung. Zu allen anderen Zeitpunkten ist der Blutdruck nicht signifikant höher oder niedriger als während der Eingewöhnung. Der Blutdruck der CX3CR1-Knockout Mäuse ist zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert im Vergleich zu der Eingewöhnung. Der Blutdruck der Wildtyp Mäuse unterscheidet sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von dem Blutdruck der CX3CR1-Knockout Mäuse.

Mit Dexamethason-Vorbehandlung (**Abb. 20B**):

Während der Eingewöhnung der mit Dexamethason vorzubehandelnden Mäuse zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen in der Pulsfrequenz und im Blutdruck. Zu Beginn des Experiments ist die Pulsfrequenz der Wildtyp Mäuse signifikant höher als während der Eingewöhnungsphase. Während des weiteren Verlaufes des Experiments werden keine weiteren signifikanten Unterschiede in der Pulsfrequenz, im Vergleich mit der Eingewöhnung, gemessen. Bei den CX3CR1-Knockout Mäusen werden zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede bei der Pulsfrequenz im Vergleich mit dem Basalwert gemessen.

Die mit Dexamethason vorbehandelten Wildtyp Mäuse zeigen zu keinem Zeitpunkt während des Experiments einen signifikant veränderten Blutdruck im Vergleich zu ihrer Eingewöhnung. Die CX3CR1-Knockout Mäuse zeigen 2 Stunden nach LPS-Provokation einen signifikant niedrigeren Blutdruck als während der Eingewöhnung, ebenso 4 Stunden und 5 Stunden nach LPS-Provokation. Zu den anderen Zeitpunkten wird keine signifikante Veränderung gemessen.

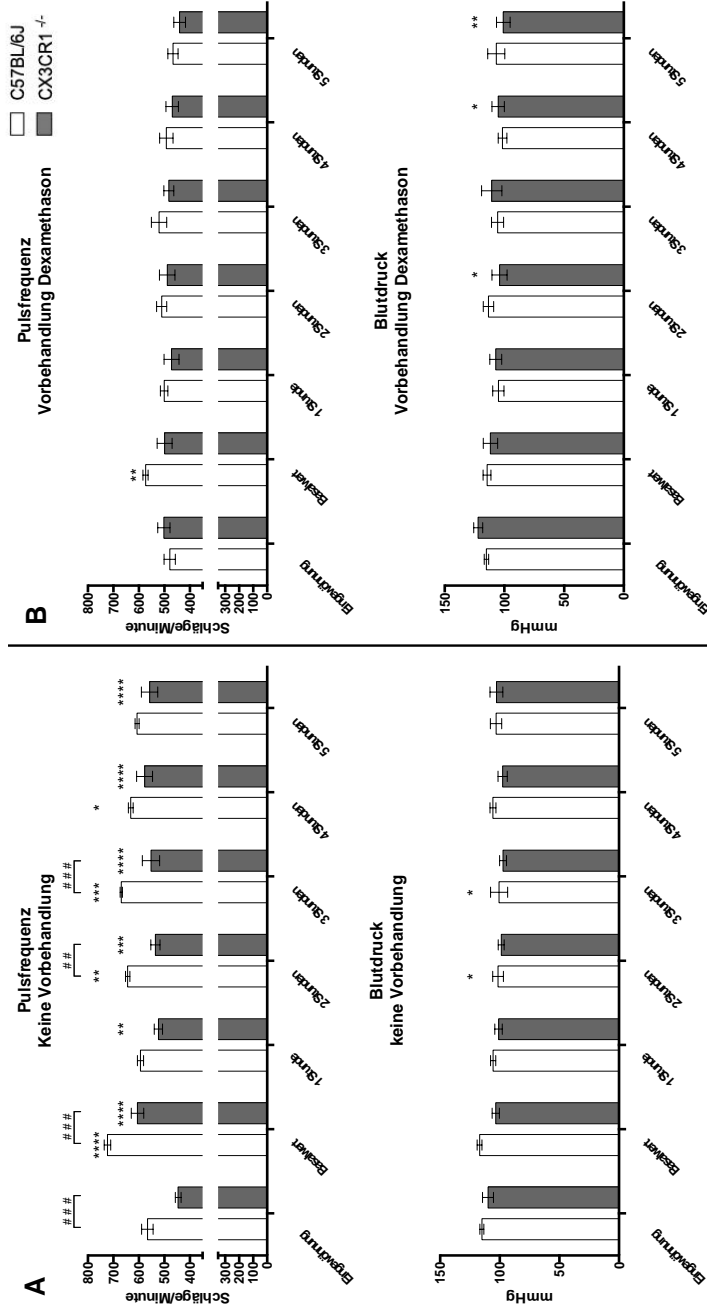


Abb. 20: Die hämodynamische Reaktion auf LPS-Provokation nach Dexamethason-Vorbehandlung Wildtyp Mäuse (C57BL/6J) oder CX3CR1-Knockout Mäuse (CX3CR1^{-/-}) wurden entweder mit 0,2 mg/kg KG Dexamethason (jeweils n=6), oder nur mit der Trägerlösung (jeweils n=5) vorbehandelt. Alle Mäuse bekamen 0,8 mg/kg KG LPS i.p. injiziert. Im Anschluss wurden die Mäuse hämodynamisch per transmissions-Photoplethysmographie überwacht. *A* zeigt die Hämodynamik der Mäuse ohne Vorbehandlung, *B* zeigt die der Mäuse mit Dexamethason-Vorbehandlung.

Abgebildet sind die Mittelwerte \pm die Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Two-way Analysis of Variance (two-way ANOVA) und Tukey's respektive Dunnett's multiple comparisons test sowie zweiseitiger studentischer t-Test mit Signifikanzniveau $p \leq 0,05$.

Vergleich mit Eingewöhnung: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$
Vergleich der Zeitpunkte: ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,001$, #### $p \leq 0,0001$

3.9.1 Die CX3CL1-CX3CR1-Achse in der Nebenniere nach Dexamethason-Vorbehandlung

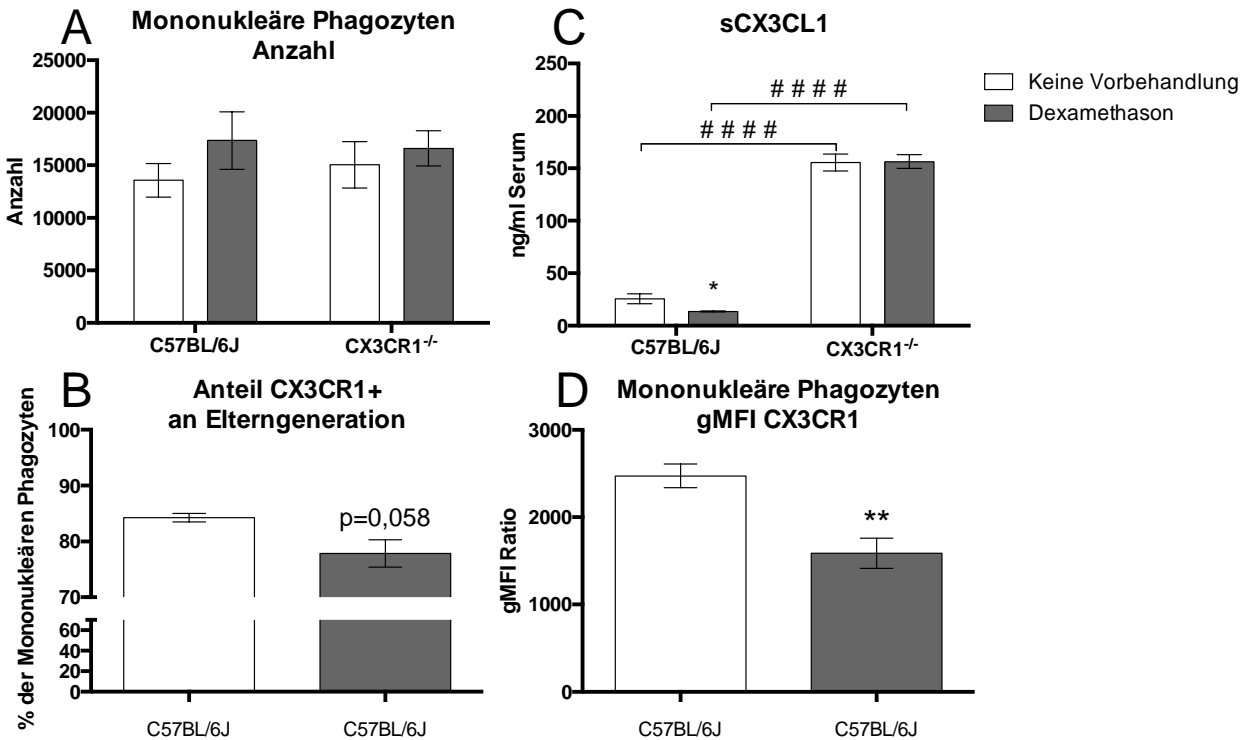


Abb. 21: Die CX3CL1-CX3CR1-Achse in der Nebenniere bei LPS-Provokation nach Dexamethason-Vorbehandlung

Wildtyp Mäuse (C57BL/6J) oder CX3CR1-Knockout Mäuse (CX3CR1^{-/-}) wurden, entsprechend ihrer Versuchsgruppe, teils mit 0,2 mg/kg KG Dexamethason i.p. (jeweils n=6), teils mit der Trägerlösung als Kontrollgruppe (jeweils n=5), vorbehandelt. Alle bekamen 0,8 mg/kg KG LPS i.p. injiziert und wurden nach 6 Stunden zur Probengewinnung getötet.

A zeigt die Anzahl an mononukleären Phagozyten in der Nebenniere, gemessen per Durchflusszytometrie. B zeigt den Anteil, welchen CX3CR1-positive Zellen an der Gesamtpopulation mononukleärer Phagozyten in der Nebenniere darstellen. In C wird der Serumspiegel von sCX3CL1 gezeigt, D beschreibt die geometrische Mitte der Fluoreszenz-Intensität (gMFI) des Antikörpers, welcher CX3CR1 auf der Zelloberfläche markiert.

Abgebildet sind die Mittelwerte \pm die Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Two-way Analysis of Variance (two-way ANOVA) und Tukey's respektive Dunnett's multiple comparisons test sowie zweiseitiger studentischer t-Test mit Signifikanzniveau $p \leq 0,05$.

Vergleich mit Basalwert: ** $p \leq 0,01$

Vergleich der Zeitpunkte: ##### $p \leq 0,0001$

Die mit Dexamethason vorbehandelten Wildtyp Mäuse und CX3CR1-Knockout Mäuse weisen 6 Stunden nach LPS-Provokation eine erhöhte Anzahl mononukleärer Phagozyten in der Nebenniere auf (**Abb. 21 A**). Bei den Wildtyp Mäusen fällt dieser Unterschied größer aus als bei den CX3CR1-Knockout-Mäusen, beide sind jedoch nicht signifikant. Der Anteil CX3CR1-positiver Zellen an der Gesamtpopulation mononukleärer Phagozyten in der Nebenniere ist bei den nicht vorbehandelten Wildtyp Mäusen höher, aber nicht signifikant (**Abb. 21 B**). Die gMFI des Antikörpers gegen CX3CR1 ist bei den Wildtyp Mäusen ohne Dexamethason-Vorbehandlung signifikant höher (**Abb. 21 D**).

Die Wildtyp Mäuse ohne Dexamethason-Vorbehandlung zeigen einen signifikant höheren Plasmaspiegel von sCX3CL1 als die Wildtyp Mäuse mit Dexamethason-Vorbehandlung. Bei den CX3CR1-Knockout Mäusen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem sCX3CL1-Plasmaspiegel von Dexamethason vorbehandelten und nicht Dexamethason vorbehandelten Mäusen. Der Serumspiegel für sCX3CL1 ist bei den Wildtyp Mäusen sowohl mit als auch ohne Dexamethason-Vorbehandlung signifikant niedriger als bei den CX3CR1-Knockout Mäusen (**Abb. 21 C**).

3.10 Oberflächenantigene mononukleärer Phagozyten der Nebenniere

Mit Dexamethason vorbehandelte Wildtyp Mäuse zeigen bei mononukleären Phagozyten der Nebenniere 6 Stunden nach LPS-Provokation eine signifikant höhere gMFI gegen den Ly6C markierenden Antikörper als Wildtyp Mäuse ohne Dexamethason-Vorbehandlung. Bei CX3CR1-Knockout Mäusen ist dies ebenfalls der Fall. Die gMFI des Ly6C markierenden Antikörpers ist bei Dexamethason vorbehandelten Wildtyp Mäusen signifikant geringer, als bei Dexamethason vorbehandelten CX3CR1-Knockout Mäusen (**Abb. 22 A**).

Mit Dexamethason vorbehandelte Wildtyp Mäuse zeigen bei mononukleären Phagozyten der Nebenniere 6 Stunden nach LPS-Provokation eine signifikant geringere gMFI für den CD11c markierenden Antikörper als Wildtyp Mäuse ohne Dexamethason-Vorbehandlung. Bei CX3CR1-Knockout Mäusen ist dies ebenfalls der Fall. Die gMFI des

CD11c markierenden Antikörpers ist bei nicht vorbehandelten Wildtyp Mäusen signifikant geringer, als bei nicht vorbehandelten CX3CR1-Knockout Mäusen. Dies ist ebenfalls bei den Dexamethason vorbehandelten Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen der Fall (**Abb. 22 B**).

Die gMFI des Antikörpers gegen CD11b ist bei mononukleären Phagozyten der Nebenniere von Dexamethason vorbehandelten Wildtyp Mäusen 6 Stunden nach LPS-Provokation nicht signifikant erhöht.

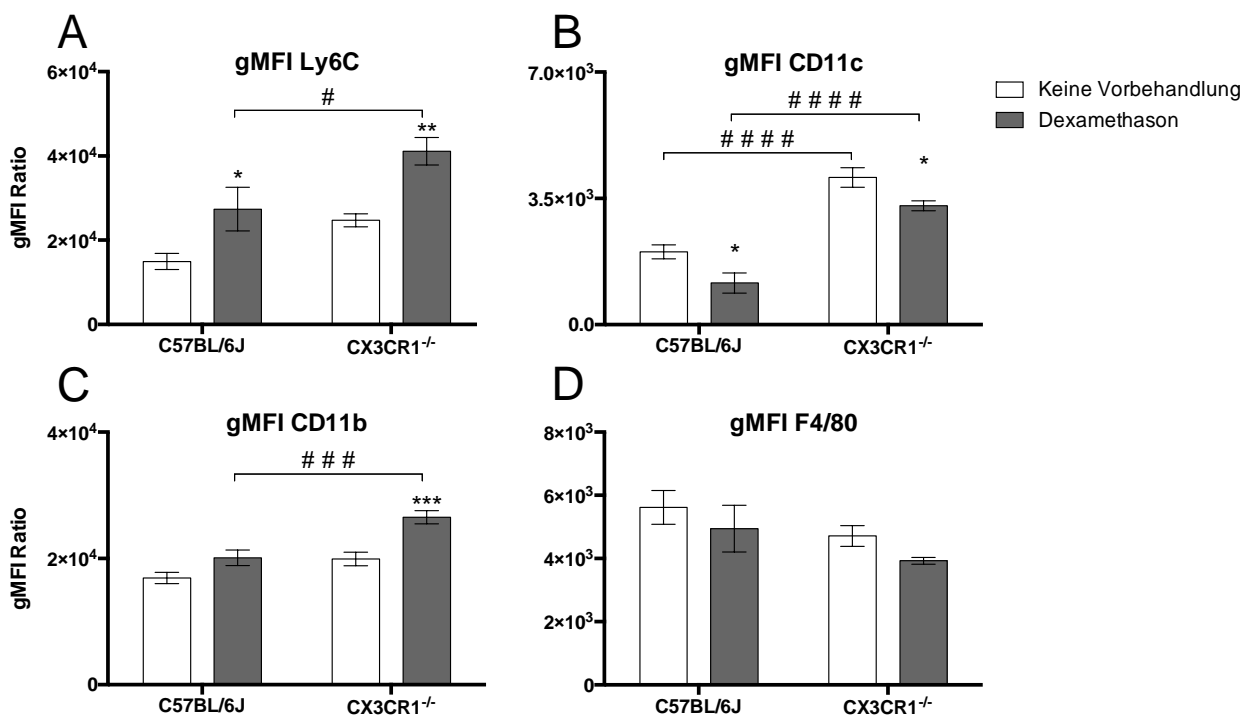


Abb. 22: Die Oberflächenantigene mononukleärer Phagozyten der Nebenniere bei LPS-Provokation nach Dexamethason-Vorbehandlung Wildtyp Mäuse (C57BL/6J) oder CX3CR1-Knockout Mäuse (CX3CR1^{-/-}) wurden, entsprechend ihrer Versuchsgruppe, teils mit 0,2 mg/kg KG Dexamethason i.p. (jeweils n=6), teils nur mit der Trägerlösung als Kontrollgruppe (jeweils n=5), vorbehandelt. Alle bekamen 0,8 mg/kg KG LPS i.p. injiziert und wurden nach 6 Stunden zur Probengewinnung getötet.

A-D zeigen die geometrische Mitte der Fluoreszenz-Intensität (gMFI) der jeweiligen Antikörper für die Population der mononukleären Phagozyten der Nebenniere.

Abgebildet sind die Mittelwerte ± die Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Two-way Analysis of Variance (two-way ANOVA) und Tukey's respektive Dunnett's multiple comparisons test mit Signifikanzniveau $p \leq 0,05$.

Vergleich mit Basalwert: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$

Vergleich der Zeitpunkte: # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,001$, #### $p \leq 0,0001$

Bei CX3CR1-Knockout Mäusen ist die gMFI des Antikörpers gegen CD11b im gleichen Szenario signifikant erhöht. Die Dexamethason vorbehandelten CX3CR1-Knockout Mäuse haben zudem eine signifikant höhere gMFI des Antikörpers gegen CD11b als die Dexamethason behandelten Wildtyp Mäuse (**Abb. 22 C**). Bei den gemessenen gMFI der Antikörper gegen F4/80 auf mononukleären Phagozyten der Nebenniere von Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen gibt es weder nach Dexamethason-Vorbehandlung noch ohne Dexamethason-Vorbehandlung 6 Stunden nach LPS-Provokation signifikante Unterschiede (**Abb. 22 D**).

4. Diskussion

Die Sepsis stellt für das Immunsystem des menschlichen Körpers eine der größten Herausforderungen dar (Fleischmann-Struzek und Rudd, 2023). Um sie zu überleben braucht der Organismus eine suffiziente Stressantwort, bei der die Nebenniere und ihre Produkte eine wichtige Rolle spielen (Chan et al., 2012; Gorain et al., 2020). Im Rahmen dieses Krankheitsbildes wird die Nebenniere rapide von einer Vielzahl an Immunzellen infiltriert, von denen ein Großteil mononukleäre Phagozyten sind (Kanczkowski et al., 2013c). Begleitet wird dieser Influx mononukleärer Phagozyten in die Nebenniere durch einen dortigen lokalen Anstieg proinflammatorischer Zytokine (Jennewein et al., 2016). Die meisten dieser infiltrierenden mononukleären Phagozyten exprimieren CX3CR1, durch welchen sie via CX3CL1 zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine angeregt werden können (Ishida et al., 2008). Liegen jene proinflammatorischen Zytokine in entsprechend hoher Konzentration vor, so können sie die Zellen der Nebenniere auf parakrinem Wege zu einer gesteigerten Synthese sowie zur Freisetzung von Nebennierenprodukten anregen (Bornstein et al., 2004; Judd et al., 2000; Bechmann et al., 2021).

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob mononukleäre Phagozyten in der Nebenniere durch die CX3CL1-CX3CR1-Achse nach LPS-Provokation Einfluss auf die Synthese von Nebennierenprodukten, und somit die Hämodynamik des Organismus ausüben. Hierzu wurde ein Mausmodell genutzt, bei dem die Ergebnisse von Wildtyp Mäusen mit den Ergebnissen von CX3CR1-Knockout Mäusen nach LPS-Provokation verglichen wurden.

4.1 Aldosteron und Corticosteron

Nach LPS-Provokation wurden die Plasmaspiegel der stressassoziierten Nebennierenprodukte Aldosteron und Corticosteron in CX3CR1-Knockout Mäusen gemessen und mit den Plasmaspiegeln von Wildtyp Mäusen verglichen (**Abb. 11**). Für Aldosteron zeigte sich hier sowohl bei den Wildtyp Mäusen als auch bei den CX3CR1-Knockout Mäusen ein signifikanter Anstieg des Plasmaspiegels. Diese Ergebnisse korrelieren mit der aktuellen Literatur (Huang et al., 2010). Der genetische Knockout von

CX3CR1 führte in diesem Szenario hinsichtlich des Aldosteron-Plasmaspiegels zu keinem signifikant veränderten Ergebnis. Interessanterweise konnte beim Plasmaspiegel von Corticosteron ein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Während bei den Wildtyp Mäusen eine signifikante Steigerung des Corticosteron-Plasmaspiegels, gipfelnd nach 6 Stunden, gemessen wurde, so erreichten die CX3CR1-Knockout Mäuse bereits nach 3 Stunden ihren höchsten Corticosteron-Plasmaspiegel. Dieser war zu jenem Zeitpunkt (3 Stunden) ohne signifikanten Unterschied zu dem Corticosteron-Plasmaspiegel der Wildtyp Mäuse (**Abb. 11**). Ein Vergleich der Verlaufskurven lässt die Interpretation zu, dass die Corticosteron-Stressantwort der Wildtyp Mäuse und CX3CR1-Knockout Mäuse einen zu Beginn ähnlichen Verlauf hat. Die Wildtyp Mäuse weisen nach 6 Stunden aber einen signifikant höheren Gipfel auf, während zu diesem Zeitpunkt der Plasmaspiegel der CX3CR1-Knockout Mäuse bereits wieder sinkt. Zahlreiche Veröffentlichungen thematisieren bereits den Nutzen von Glukokortikoiden während Sepsis (Ai et al., 2015; Pitre et al., 2024), und da während CLP, einem weit verbreiteten Sepsis-Modell bei Mäusen, bereits ein signifikanter Überlebensvorteil von Wildtyp Mäusen gegenüber CX3CR1-Knockout Mäusen dokumentiert wurde (Ishida et al., 2008) bestand die Frage, ob dieser Überlebensvorteil in Teilen durch eine vorteilhafte hämodynamische Reaktion zu erklären sei.

4.2 Hämodynamik nach LPS-Provokation

Bei akut verlaufenden Krankheitsbildern wie der Sepsis stellt die Hypotonie eine häufig auftretende Komplikation dar. Hypotonie wird unter anderem verursacht durch eine Kreislaufzentralisation sowie das Auftreten von Endotheldefekten (Joffre et al., 2020). Unter diesen Umständen herrscht kein Flüssigkeits-, sondern vielmehr ein Volumenmangel, weswegen es zur Minderperfusion im peripheren Gewebe und in den Organen kommt.

Während die langsamer werdende Pulsfrequenz der Wildtyp Mäuse als auch der CX3CR1-Knockout Mäuse im Einklang mit der Klinik einer Sepsis bei Mäusen steht (Li et al., 2018), so spricht der steigende Blutdruck der Wildtyp Mäuse nach 0,5 mg/kg KG LPS (**Abb. 12**) allerdings eher gegen eine ausgeprägte Kreislaufzentralisation. Er könnte Stress widerspiegeln, welchen die Mäuse durch den Messprozess, insbesondere

durch die Restriktion, empfinden (Wilde et al., 2017). Dahingegen kann der, im Vergleich mit den Wildtyp Mäusen zwischenzeitlich signifikant niedrigere Blutdruck der CX3CR1-Knockout Mäuse, welche ebenfalls demselben Restriktionsstress wie die Wildtyp Mäuse ausgesetzt sind, als eine komprimierte Stressantwort auf die LPS-Provokation interpretiert werden. Vergleicht man aber bei den Wildtyp Mäusen sowie bei den CX3CR1-Knockout Mäusen nach 0,5 mg/kg KG LPS die Blutdruck-Daten mit den jeweiligen Daten aus der Eingewöhnungsphase, so besteht zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied. Unterstützt wird die These der komprimierten Stressantwort auf die Restriktion von den hämodynamischen Daten nach 0,8 mg/kg KG LPS-Provokation, unter welcher es bei den Wildtyp Mäusen nun nicht mehr zu einer Blutdrucksteigerung gekommen ist. Die Wildtyp Mäuse zeigen in diesem Szenario nun keinen signifikanten Unterschied mehr zu dem gemessenen Blutdruck der CX3CR1-Knockout Mäuse (**Abb. 20**). Unter gesteigerter LPS-Provokation scheinen die Wildtyp Mäuse nicht mehr zu einer Blutdrucksteigerung als Antwort auf den stressbehafteten Blutdruckmessprozess imstande zu sein. Unerwartet ist in diesem Kontext, dass sowohl die Wildtyp Mäuse als auch die CX3CR1-Knockout Mäuse nach 0,8 mg/kg KG LPS eine gesteigerte Pulsfrequenz aufwiesen, was wiederum nicht dem Krankheitsbild einer akuten Sepsis entsprechen würde (Li et al., 2018).

Auffällig ist, dass es sowohl nach 0,5 mg/kg KG LPS als auch nach 0,8 mg/kg KG LPS hauptsächlich zu Veränderungen der Pulsfrequenz gekommen ist. Während es zwar zu vereinzelt signifikanten Unterschieden des Blutdrucks zwischen Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen kam (**Abb. 12**), so war der Blutdruck bei beiden LPS-Dosierungen nicht signifikant verändert im Vergleich mit der Eingewöhnungsphase. Die Pulsfrequenz verhielt sich gegenteilig der Erwartungen (Li et al., 2018), bei einer gesteigerten LPS-Dosis kam es zu einer Pulsfrequenzsteigerung, bei der niedrigeren LPS-Dosis zu einer Pulsfrequenzminderung, beides sowohl bei den Wildtyp Mäusen als auch bei den CX3CR1-Knockout Mäusen. Zudem zeigten sich zwischen Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen kein verwertbar signifikanter Unterschied bei der Pulsfrequenz. Die Daten der Pulsfrequenz der Wildtyp Mäuse aus **Abb. 20A** waren bereits signifikant unterschiedlich zu den Eingewöhnungsdaten der Wildtyp Mäuse aus **Abb. 20B** sowie denen der Wildtyp Mäuse aus **Abb. 12**. Die Daten der Pulsfrequenz

der Wildtyp Mäuse aus **Abb. 20A** werden daher als nicht repräsentativ für die Reaktion von Wildtyp Mäusen angesehen und somit nicht mit den Daten der anderen Wildtyp Mäuse oder CX3CR1-Knockout Mäuse verglichen. Somit lässt sich schlussfolgern, dass weder bei Wildtyp Mäusen noch bei CX3CR1-Knockout Mäusen nach 0,5 mg/kg KG LPS respektive 0,8 mg/kg KG LPS eine fulminante hämodynamische Reaktion im Sinne einer Sepsis (Li et al., 2018) erfolgt ist. Das würde bedeuten, dass, zumindest für diese LPS-Dosis, kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der hämodynamischen Reaktion zwischen Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen besteht. Denkbar ist, dass bei einer höheren LPS-Dosis Unterschiede in der hämodynamischen Reaktion zwischen Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen provoziert werden könnten, welche einen weiteren Erklärungsansatz für den Überlebensvorteil von Wildtyp Mäusen gegenüber CX3CR1-Knockout Mäusen während einer Sepsis aufzeigen könnten (Ishida et al., 2008). Da es bei der Dosis 1 mg/kg KG LPS allerdings bereits erhebliche Schwierigkeiten bei der hämodynamischen Überwachung per transmissions-Photoplethysmographie, am ehesten aufgrund von Kreislaufzentralisation gab, wäre hier eine alternative hämodynamische Überwachungsmethodik notwendig (siehe Kapitel 4.8).

4.3 Migration mononukleärer Phagozyten in die Nebenniere

Die CX3CL1-CX3CR1-Achse spielt eine Rolle im Migrationsverhalten mononukleärer Phagozyten. Dies wurde insbesondere bereits für die Niere (Hochheiser et al., 2013) gezeigt. Zudem gibt es starke Indikationen, dass inflammatorische Zytokine auf die Steroidsynthese der Nebenniere und ihre Produktfreisetzung aktivierend wirken (Kanczkowski et al., 2013a). Aufgrund dieser Datenlage lautete die Arbeitshypothese, dass, während einer Sepsis, eine verminderte Migration mononukleärer Phagozyten in die Nebennieren zu einer geringeren lokalen Konzentration inflammatorischer Zytokine, und so zu einer geringeren Ausschüttung von Corticosteron führen kann.

Mononukleäre Phagozyten der Nebenniere wurden für diese Arbeit anhand des Rezeptorprofils CD45+F4/80+CD11b+ (Dolfi et al., 2022) identifiziert. In Übereinstimmung mit zahlreichen Veröffentlichungen (Jung et al., 2000; Dolfi et al., 2022) waren 80 % von ihnen positiv für CX3CR1. Auch die beschriebene rapide

Infiltration der Nebenniere durch mononukleäre Phagozyten nach LPS-Provokation (Kanczkowski et al., 2013c) konnte robust reproduziert werden. Interessanterweise sind die hier infiltrierenden mononukleären Phagozyten fast alle CX3CR1-positiv (**Abb. 13**). Die Analyse der gMFI der Antikörper gegen CD11b und F4/80 zeigte, dass oben genannte mononukleäre Phagozyten F4/80 sowie CD11b in hohem Maße exprimieren und somit in der Differenzierung zu Makrophagen fortgeschritten sind (**Abb. 14**). Da diese beiden Marker speziell unter inflammatorischen Bedingungen normalerweise eine Hochregulation erfahren, war ihre verminderte Expression zum 6 Stunden-Zeitpunkt unerwartet. Die vorliegenden Daten lassen sich jedoch suffizient in das von Kanczkowski et al. (2013c) beschriebene Szenario einfügen, bei dem es nach LPS-Provokation zu einem Influx von Monozyten und Makrophagen in die Nebenniere kommt. Bei den ausdifferenzierten Makrophagen vermuten Kanczkowski et al. (2013c), dass diese nach Antigenaufnahme für die Antigenpräsentation aus der Nebenniere in das lymphatische System, migrieren. Dies würde den initialen Anstieg der gMFI für die Antikörper gegen die, auf ausdifferenzierten Makrophagen vermehrt exprimierten Oberflächenantigene, F4/80 und CD11b, erklären. Die Verminderung der gMFI der Antikörper gegen F4/80 und CD11b, was als Verjüngung des Profils der Oberflächenantigene der mononukleären Phagozyten der Nebenniere gewertet wird, geht zeitlich einher mit dem Efflux ausdifferenzierter Makrophagen aus der Nebenniere und dem Influx von weniger ausdifferenzierten Monozyten. Weniger ausdifferenzierte Monozyten exprimieren F4/80 und CD11b in geringerem Maße als ausdifferenzierte Makrophagen. Ab dem Zeitpunkt 3 Stunden bis zum Zeitpunkt 24 Stunden nimmt die Anzahl mononukleärer Phagozyten in der Nebenniere, nach dem initialen massiven Influx, nun stetig ab. Das Profil der Oberflächenantigene verändert sich vom Zeitpunkt 6 Stunden zum Zeitpunkt 24 Stunden dabei in Richtung der mehr ausdifferenzierten Makrophagen. Dies legt nahe, dass die zum Zeitpunkt 6 Stunden, infiltrierten Monozyten zu Makrophagen ausdifferenzieren und im Anschluss zu einem großen Teil die Nebenniere verlassen (Kanczkowski et al., 2013c). Gleichzeitig sistiert der anfängliche Influx von Monozyten, was sich in der fallenden Zellanzahl der Gesamtpopulation mononukleärer Phagozyten der Nebenniere widerspiegelt (**Abb. 13** und **Abb. 14**).

Um den Einfluss der CX3CL1-CX3CR1-Achse auf das Migrationsverhalten mononukleärer Phagozyten in die Nebenniere während Sepsis darzustellen, wurden bei CX3CR1-Knockout Mäusen die Population der mononukleären Phagozyten 6 Stunden nach LPS-Provokation analysiert und mit der von Wildtyp Mäusen verglichen. Liu et al. (2020) zeigte unter homöostatischen Bedingungen in der Nebenniere keine Unterschiede zwischen Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen in der Populationsgröße mononukleärer Phagozyten. Zum Zeitpunkt 6 Stunden nach intraperitonealer LPS-Provokation zeigten sich in der hier vorliegenden Arbeit Diskrepanzen zwischen Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen in der Gesamtpopulation mononukleärer Phagozyten in der Nebenniere, welche allerdings kein signifikantes Ausmaß annahm (**Abb. 16** und **Abb. 21**). Bei der folgenden Auswertung der Expressionsintensität bestimmter Oberflächenantigene von mononukleären Phagozyten der Nebenniere im oben beschriebenen Szenario, fanden sich interessante Ergebnisse: Die Expression für F4/80, einem Differenzierungsmarker (Nordlohne et al., 2021), war bei CX3CR1-Knockout Mäusen signifikant reduziert. CD11b, ein Aktivierungsmarker myeloider Zellen (Yu et al., 2023), wurde dafür umso mehr auf mononukleären Phagozyten der Nebenniere von CX3CR1-Knockout Mäusen exprimiert (**Abb. 17**). Dies spricht für eine veränderten Ausdifferenzierung der, sich zu diesem Zeitpunkt in der Nebenniere befindlichen, mononukleären Phagozyten.

Die aktuelle Datenlage bezüglich der CX3CR1-Expression sowie der Effekt, welcher durch die Stimulation durch CX3CL1 bei CX3CR1 exprimierenden mononukleären Phagozyten hervorgerufen wird, unterstreicht die Wichtigkeit dieses Rezeptors in der akuten Inflammation: Wie bereits bei Panek et al. (2015), so zeigen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass CX3CR1 während der, durch LPS ausgelösten, Immunprovokation auf mononukleären Phagozyten vermehrt exprimiert wird. Zudem lässt sich die Lebensdauer CX3CR1-exprimierender mononukleärer Phagozyten durch sCX3CL1-Stimulation verlängern (Panek et al., 2015; Niess et al., 2005; Landsman et al., 2009). Auch führt die Aktivierung zu einer gesteigerten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Ishida et al., 2008). Im Umkehrschluss kann vermutet werden, dass Mäuse mit CX3CR1-Knockout Defizite in den oben genannten Bereichen aufweisen. Die Daten der vorliegenden Arbeit werden dahingehend interpretiert, dass

mononukleäre Phagozyten, nach LPS-Provokation, in ihrem initialen Infiltrationsprozess in die Nebenniere nicht in signifikantem Ausmaß durch CX3CR1 beeinflusst werden, wohl aber in ihrer Aktivierung respektive ihrer Differenzierung.

4.4 Inflammatorische Zytokine in der Nebenniere

Als nächster Schritt wurde untersucht, welchen Einfluss die veränderte Aktivierung und Ausdifferenzierung mononukleärer Phagozyten in der Nebenniere bei CX3CR1-Knockout Mäusen nach LPS-Provokation auf die Synthese respektive Sezernierung inflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6, CCL2, IFN- γ und CX3CL1) hat. Es wurden die Daten von Wildtyp Mäusen mit denen von CX3CR1-Knockout Mäusen nach LPS-Provokation verglichen.

IL-1 β und IL-6 sind proinflammatorische Zytokine und werden durch mononukleäre Phagozyten freigesetzt. Sie sind in der Lage, die Synthese sowie Freisetzung von Corticosteron während systemischer Inflammation zu beeinflussen (Bethin et al., 2000). Während LPS-induzierter Immunprovokation kommt es zu einem massiven Anstieg von IL-1 β und IL-6 in der Nebenniere (Kanczkowski et al., 2013c). In der vorliegenden Arbeit konnten nach LPS-Provokation hinsichtlich des mRNA-Gehalts der oben genannten Zytokine keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen festgestellt werden (**Abb. 18**). Lediglich für CCL2 und IFN- γ wurde bei den Wildtyp Mäusen ein geringfügig höherer mRNA-Gehalt in der Nebenniere gemessen, bei den CX3CR1-Knockout Mäusen war dies bei TNF- α der Fall. Bemerkenswert ist hier, dass auch die Transkription von CX3CL1 zwischen den beiden Genotypen nicht signifikant verändert ist, wohingegen die Plasmakonzentration von sCX3CL1 zum gleichen Zeitpunkt bei CX3CR1-Knockout Mäusen bis zu 30-fach erhöht ist (**Abb. 15**). Nach LPS-Provokation wird bei Wildtyp Mäusen eine kontinuierliche Konzentrationssteigerung von sCX3CL1 gemessen, welche nach 6 Stunden ihren Höhepunkt und nach 24 Stunden wieder das Homöostase-Niveau erreicht. Interessanterweise gilt dies auch in einem gewissen Maße für CX3CR1-Knockout Mäuse: Sie haben zwar unter Ruhebedingungen bis zu 30-fach höhere sCX3CR1-Plasmaspiegel als Wildtyp Mäuse, so kann aber auch bei ihnen ein signifikanter Anstieg nach 6 Stunden, sowie eine Rückkehr auf Homöostase-Niveau nach 24 Stunden

verzeichnet werden. Diese Ergebnisse passen ebenfalls in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext: Dieser besagt, dass sCX3CL1 hauptsächlich durch die Aufnahme in CX3CR1-exprimierende Zellen eliminiert wird (Nakayama et al., 2010) und dass es so bei Fehlen dieses Rezeptors zu einer Akkumulation von sCX3CL1 kommen kann (Cardona et al., 2008). Einen Anhalt für einen Feedback-Mechanismus (Vietinghoff und Kurts, 2021) konnte diese Arbeit, hinsichtlich der mononukleären Phagozyten der Nebenniere, nicht gezeigt werden.

4.5 Oberflächenexpression von CX3CR1 auf mononukleären Phagozyten

Die bisherigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine hohe Dynamik der Zelloberflächenexpression von CX3CR1 auf mononukleären Phagozyten der Nebenniere nach LPS-Provokation. *In vitro* wurden nun renale CD11c-positive Zellen von Wildtyp Mäusen mit LPS und dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α stimuliert und deren Zelloberflächenexpression von CX3CR1 analysiert. Aufgrund der, durch Yeager et al. (2016) beschriebenen, gesteigerten Migration mononukleärer Phagozyten in inflammatorisch verändertes Gewebe nach Vorbehandlung mit Hydrocortison, und der Beteiligung von CX3CR1 an der Migration mononukleärer Phagozyten in Inflammation (Hamon et al., 2017), wurden CD11c-positive renale Zellen ebenfalls mit Dexamethason stimuliert und die Auswirkungen auf ihre Zelloberflächenexpression von CX3CR1 analysiert (**Abb. 19**). Ramos et al. (2010) haben bereits gezeigt, dass es *in vitro* bei unbehandelten, mononukleären Phagozyten zu einer verminderten Expression von CX3CR1 kommt, welcher durch Co-Kultivierung mit LPS beschleunigt werden konnte. Diese Beobachtungen können in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden: Es zeigte sich *in vitro* eine, mit der Zeit schwächer werdende, Expression von CX3CR1 bei unbehandelten CD11c-positiven renalen Zellen. Ramos et al. (2010) kamen zu dem Ergebnis, dass die Behandlung mit LPS zu einer Akzeleration dieses Prozesses führt. Diese Interpretation bestätigen die Daten der vorliegenden Arbeit. Dem entgegengesetzt verhalten sich die, *in vitro* mit Dexamethason behandelten, CD11c-positiven renalen Zellen: Ihre, zu beiden Zeitpunkten gemessene, jeweils signifikant höhere gMFI des Antikörpers gegen CX3CR1 führen zu der Annahme, dass die Behandlung mit dem Glukokortikoid Hydrocortison in einer verlangsamten Internalisierung von CX3CR1 resultiert. Diese Beobachtungen hinsichtlich der

Stimulation durch LPS sowie durch Hydrocortison lassen sich folgendermaßen in Kontext setzen: Pro-inflammatorisches LPS ist mit einer akzelerierten Internalisierung von CX3CR1 (Tumpara et al., 2021; Ramos et al., 2010), das anti-inflammatorische Dexamethason mit einer gesteigerten Zelloberflächenexpression von CX3CR1 auf mononukleären Phagozyten assoziiert (Yeager et al., 2016). Interessanterweise zeigten sich bei den renalen CD11c-positiven Zellen nach Behandlung mit TNF- α keine signifikanten Unterschiede zu den unbehandelten renalen CD11c-positiven Zellen. Dieses Resultat war dahingehend unerwartet, als dass TNF- α ein prominentes proinflammatorisches Zytokin ist.

Entsprechend groß war das Interesse daran herauszufinden, ob ein Priming mit Glukokortikoiden auch zu einem gesteigerten Infiltrationsverhalten mononukleärer Phagozyten in die Nebenniere führen, was dann wiederum zu einer gesteigerten lokalen Konzentration inflammatorischer Zytokine führen sollte und welche Rolle CX3CR1 hier spielen würde.

4.6 Hämodynamik nach Dexamethason-Vorbehandlung

Um zu analysieren, ob eine Behandlung mit Dexamethason vor LPS-Provokation mit Veränderungen in der hämodynamischen Reaktion von Wildtyp-Mäusen oder CX3CR1-Knockout Mäusen einhergeht, wurden Mäuse beider Genotypen teils mit Dexamethason vorbehandelt. Allen Mäusen wurden anschließend LPS i.p. injiziert. Die Dosierung des LPS wurde mit 0,8 mg/kg KG höher als in Kapitel 4.1 - 4.4 gewählt, um eine deutlichere inflammatorische Reaktion als mit 0,5 mg/kg KG LPS hervorzurufen. Im Anschluss an die LPS-Injektion erfolgte eine Überwachung der Hämodynamik mittels transmissions-Photoplethysmographie.

Im Vergleich der hämodynamischen Daten der Wildtyp Mäuse sowie der CX3CR1-Knockout Mäuse mit Dexamethason-Vorbehandlung fallen keine signifikanten Unterschiede auf, weder hinsichtlich des Blutdrucks noch der Pulsfrequenz. Bei den nicht Dexamethason-vorbehandelten Mäusen kam es sowohl bei den Wildtyp Mäusen als auch bei den CX3CR1-Knockout Mäusen nicht zu einer signifikanten Veränderung des Blutdruckes, wohl aber zu einer Steigerung der Pulsfrequenz bei beiden Genotypen.

Zwischen Dexamethason-vorbehandelten und nicht Dexamethason-vorbehandelten CX3CR1-Knockout Mäusen bestanden hinsichtlich der Pulsfrequenz, nicht aber des Blutdruckes, signifikante Unterschiede nach LPS-Provokation. Die Daten der nicht Dexamethason-vorzubehandelnden Wildtyp Mäuse (**Abb. 20A**) wurden in diesem Kontext als nicht mit den drei anderen Versuchsgruppen (**Abb. 20**) vergleichbar gewertet. Während es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Eingewöhnungs-Daten der Pulsfrequenz zwischen den Wildtyp Mäusen aus **Abb. 12** und **Abb. 20B** gab, so war unerwarteter Weise bereits während der Eingewöhnungsphase die Pulsfrequenz der Wildtyp Mäuse aus **Abb. 20A** signifikant höher als die der Wildtyp Mäuse aus **Abb. 12** und **Abb. 20B**.

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die hämodynamische Reaktion auf LPS-Provokation hauptsächlich aus einer Veränderung der Pulsfrequenz zu bestehen scheint (siehe Kapitel 4.2). Eine Vorbehandlung mit Dexamethason geht hier einher mit der Verminderung dieser Reaktion. Somit war es von Interesse, ob sich diese Unterschiede nach Dexamethason-Vorbehandlung auch auf immunologischer Ebene in der Nebenniere widerspiegeln.

4.7 Mononukleäre Phagozyten der Nebenniere nach Dexamethason-Vorbehandlung

Um herauszufinden, ob die unter Kapitel 4.6 beschriebenen hämodynamischen Unterschiede mit Veränderungen in der Zellpopulation mononukleärer Phagozyten in der Nebenniere assoziiert sind, wurden jene Populationen per Durchflusszytometrie im Anschluss an das unter Kapitel 2.2.1.4 beschriebene Experiment analysiert.

Der Vergleich der Populationen mononukleärer Phagozyten in der Nebenniere von Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen ohne Dexamethason-Vorbehandlung bestätigt die Ergebnisse aus Kapitel 3.6: Auch hier wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Größe der Zellpopulation mononukleärer Phagozyten in der Nebenniere nach LPS-Provokation gefunden. Auch die Vorbehandlung mit Dexamethason führte nicht zu einer signifikanten Veränderung in der Populationsgröße mononukleärer Phagozyten in der Nebenniere nach LPS-Provokation.

Bei der Analyse der Oberflächenantigene fallen jedoch signifikante Unterschiede auf: Sowohl die Wildtyp Mäuse als auch die CX3CR1-Knockout Mäuse, beide mit Dexamethason vorbehandelt, weisen ein Markerprofil auf, welches für eine deutlich geringere Differenzierung der mononukleären Phagozyten der Nebenniere, im Vergleich mit den nicht vorbehandelten Mäusen der jeweiligen Genotypen, spricht (**Abb. 22**). Zusätzlich zeigen in der Gruppe ohne Dexamethason-Vorbehandlung die Wildtyp Mäuse gegenüber den CX3CR1-Knockout-Mäusen ein signifikant ausdifferenzierteres Oberflächenmarker-Profil. Ebenso verhielt es sich in den beiden Gruppen, welche mit Dexamethason vorbehandelt wurden. Im Einklang mit **Abb. 17** führten diese Ergebnisse zu der Interpretation, wonach mononukleären Phagozyten der Nebenniere bei CX3CR1-Knockout Mäusen eine langsamere, geringgradigere oder schlicht andere Differenzierung nach LPS-Provokation durchlaufen als jene der Wildtyp Mäuse.

Vergleicht man zusätzlich Wildtyp Mäuse mit Dexamethason-Vorbehandlung mit solchen ohne Dexamethason-Vorbehandlung hinsichtlich der CX3CL1-CX3CR1-Achse, so sieht man signifikant geringere Plasmaspiegel von sCX3CL1 in den mit Dexamethason vorbehandelten Mäusen. Zudem exprimieren mononukleäre Phagozyten der Nebenniere in nicht mit Dexamethason vorbehandelten Wildtyp Mäusen nach LPS-Provokation signifikant weniger CX3CR1 als jene von, mit Dexamethason behandelten, Wildtyp Mäusen im gleichen Szenario (**Abb. 21**). Die Zusammenschau dieser Ergebnisse ließ die Schlussfolgerung zu, dass eine Vorbehandlung mit Dexamethason vor LPS-Provokation nicht mit einer signifikant veränderten Migration mononukleärer Phagozyten in die Nebenniere assoziiert ist. Wohl aber kommt es in diesem Szenario zu einer signifikant veränderten Ausdifferenzierung mononukleärer Phagozyten in der Nebenniere, sichtbar anhand der Oberflächenantigene CD11b, CD11c, F4/80, Ly6C sowie CX3CR1. Interpretiert werden diese Unterschiede zwischen Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen als eine, am ehesten verlangsamte, Ausdifferenzierung dieser Zellpopulation in der Nebenniere nach LPS-Provokation in den CX3CR1-Knockout Mäusen. Interessanterweise hatte die Dexamethason-Vorbehandlung ähnliche Effekte sowohl auf die Zelloberflächenantigene bei Wildtyp Mäusen als auch bei CX3CR1-Knockout Mäusen. Welchen Effekt dies letzten Endes auf die Funktion der mononukleären Phagozyten der Nebenniere hat, insbesondere auf

ihre Rolle im Inflammationsprozess und der damit verbundenen Freisetzung von Zytokinen (Ehrchen et al., 2019), wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht und kann Subjekt weiterer Forschung sein.

4.8 Limitationen und Perspektiven dieser Arbeit

Ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit war die Analyse der Veränderungen, welche durch den genetischen Knockout des CX3CR1 in der Hämodynamik in Mäusen nach LPS-Provokation auftreten können. Die hierfür verwendete Messung per transmissions-Photoplethysmographie ist weit verbreitet und wurde bereits in zahlreichen Veröffentlichungen zur Dokumentation hämodynamischer Ereignisse genutzt. Die einfache Handhabung sowie die minimale Invasivität machen sie zu einer leicht einsetzbaren Option, hierbei ist es gängige Praxis, die Versuchsmäuse durch vorausgehende Testmessungen an den Prozess der Blutdruckmessung zu gewöhnen. Die Annahme, dass die Mäuse durch diese Maßnahme beim eigentlichen Experiment weniger Stress empfinden würden, konnte mittlerweile widerlegt werden (Wilde et al., 2017). Auch in dieser Arbeit wurde beobachtet, dass insbesondere die Restriktion in den Messkäfigen bei diesem Prozedere einen wesentlichen Stressfaktor darstellt. Wie in **Abb. 20** zu sehen ist, hat diese Herangehensweise davon unabhängige Limitationen: Bereits in der Eingewöhnungsphase wurden signifikante Unterschiede bezüglich der Pulsfrequenz zwischen den beiden Gruppen von Wildtyp Mäusen gemessen, obwohl beide Gruppen den gleichen Genotypen repräsentieren, unter den gleichen, standardisierten Bedingungen (Kapitel 2.2.1) gehalten wurden und bis zu diesem Zeitpunkt noch keiner Behandlung unterzogen worden waren. Dies muss bei der späteren Datenanalyse entsprechend berücksichtigt werden. Tatsächlich sind Tierversuche im Allgemeinen, gerade wenn es um so leicht beeinflussbare Daten wie Stressparameter geht, sehr anfällig für eine Vielzahl an externen Beeinflussungen respektive Störfaktoren. So finden sich in einer Veröffentlichung von Sorge et al. (2014) Ergebnisse, welche insbesondere für diese Arbeit von großem Interesse sind: Sogar durch die olfaktorische Stimulation mit dem Geruch eines Mannes bei Wildtyp Mäusen eine signifikant höhere Stressantwort im Sinne des Plasma-Corticosteron-Spiegels ausgelöst werden, als durch den Geruch einer Frau. Diese olfaktorische Stimulation führte zu keinen signifikanten hämodynamischen Unterschieden (Wilde et al., 2017).

Ein weiterer Einflussfaktor, welcher die hämodynamische Überwachung der Mäuse im akuten Infekt negativ beeinflussen kann, ist die Beschaffenheit des Schwanzes der Maus: Er ist bei der Maus ein wichtiges Organ für ihre Thermoregulation (Cassell et al., 1988; Sittiracha et al., 1987), abhängig von der Außentemperatur schwankt das Perfusionsvolumen hier von 1-5 % des Gesamtblutvolumens der Maus, weshalb die Blutdruckmessung hier entsprechend kälte-, und generell zentralisationsanfällig ist. Eine aussagekräftige Blutdruckmessung im Rahmen der vorliegenden Arbeit war bereits nach der Injektion von 1 mg/kg KG LPS aufgrund der massiven Zentralisation (Li et al., 2018) nach kurzer Zeit nicht mehr suffizient möglich. Auch die adäquat vorgeheizte Plattform, auf welcher die Mäuse in den Restriktionskäfigen während des Messvorganges gehalten werden, wirkte der Kreislaufzentralisation nur bedingt entgegen. Dies hatte zur Konsequenz, dass die LPS-Dosis für weitere Experimente entsprechend geringer gewählt wurde. Eine alternative Überwachungsmethode der Hämodynamik bei Mäusen stellt die Telemetrie dar: Hier wird der Blutdruck direkt über eine chirurgisch implantierte Sonde im Aortenbogen ermittelt. Die hohe Invasivität, durch welche diese Methode zwar sehr genaue Daten in Echtzeit liefern kann und auch vergleichsweise unanfällig gegenüber einer Kreislaufzentralisation ist, stellt aber gleichzeitig auch eine große Schwäche dar. Wundinfekt sowie Blutverlust im Rahmen der Operation sind nur einige wenige der Faktoren, durch welche die Immunreaktion der Mäuse maßgeblich beeinflusst werden kann, weswegen diese Methodik mit einer signifikanten Mortalität sowie Morbidität assoziiert ist (Drüeke und Devuyst, 2019). Trotzdem dürfte sie, aufgrund ihrer Überlegenheit, auch während fortgeschrittener Kreislaufzentralisation und ausgeprägter Hypotonie weiter genaue Daten liefern zu können in zukünftigen Untersuchungen, bei vorhandener Expertise eine gute Option für die hämodynamische Überwachung akuter Infekte darstellen.

Eine weitere Herausforderung bei der Investigation der akuten Immunreaktion auf LPS-Provokation stellt die teils rapide Dynamik dar. In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass sich innerhalb nur weniger Minuten respektive Stunden (Nakayama et al., 2010; Ge et al., 2016) die Oberflächenexpression, insbesondere von Chemokinrezeptoren wie CX3CR1, verändern kann. So ist die in Kapitel 2.2.1.3 beschriebene Herangehensweise für eine sinnvolle Interpretation solch rapider

Prozesse von Wichtigkeit. Wird diese, in ihrer Anfangsphase so hochrasante und multidimensionale, immunologische Dynamik bei der Datenanalyse nicht berücksichtigt, so kann dies dazu führen, dass Ergebnisse als unstimmig angesehen werden könnten, weil sie zu, wenn auch nur leicht, verschiedenen Zeitpunkten in der Zeitachse erhoben wurden (vergleiche Kapitel 4.3). Zwar wurden 6 Stunden nach LPS-Provokation keine Unterschiede zwischen den Populationsgrößen mononukleärer Phagozyten der Nebenniere bei Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen festgestellt, so deutete ihr signifikant unterschiedliches Markerprofil jedoch auf einen unterschiedlichen Differenzierungsstatus hin. Folglich könnte die Zellanzahl mononukleärer Phagozyten in der Nebenniere gleich sein, diese Zellen könnten aber aufgrund ihres unterschiedlichen Differenzierungsgrades sehr unterschiedliche Funktionen ausüben. Eine genauere Analyse dieser Population hinsichtlich einer Unterscheidung zwischen Monozyten und Makrophagen wäre hier von Interesse, ebenso hinsichtlich klassischer, zirkulierender CCR2^{hi} CX3CR1^{lo} sowie lokal patrouillierender, nicht-klassischer CCR2^{lo} CX3CR1^{hi} Monozyten (Geissmann et al., 2003; Sunderkötter et al., 2004). Von zukunftsweisender Wichtigkeit hinsichtlich der Methodik zur Identifikation dieser Populationen von Immunzellen kann die Veröffentlichung von Meghraoui-Kheddar et al. (2020) angesehen werden. Hier wurde gezeigt, dass eine signifikante Diskrepanz hinsichtlich der Identifikation CX3CR1-positiver Zellen anhand von GFP (Jung et al., 2000) und der tatsächlichen CX3CR1-Zelloberflächenexpression, festgestellt anhand von gMFI von Antikörpern gegen CX3CR1, herrscht.

Die für die vorliegende Arbeit untersuchten Zytokine zeigten auf mRNA-Ebene in der Nebenniere keine signifikanten Unterschiede, weswegen sich die Frage der Vergleichbarkeit dieser Population mononukleärer Phagozyten mit der des Peritoneums stellt (Ishida et al., 2008; Gautier et al., 2012). Eine *in vitro* LPS- sowie CX3CL1-Stimulation dieser Zellen mit anschließender Analyse der sezernierten Zytokine, etwa per LEGENDplexTM, würde einen Anhalt geben, ob das durch Ishida et al. (2008) für mononukleäre Phagozyten des Peritoneums beschriebene Prinzip der Beeinflussbarkeit der Zytokinfreisetzung durch die CX3CL1-CX3CR1-Achse auch auf die mononukleären Phagozyten der Nebenniere übertragbar ist. Zwar dürfte das sehr begrenzt vorhandene Zellmaterial der murinen Nebenniere eine Herausforderung darstellen, doch würde

solch ein Experiment, gerade mit Hinblick auf die zahlreichen Veröffentlichungen bezüglich der neuro-immunologischen Kommunikation innerhalb der Nebenniere (Kanczkowski et al., 2013c; Engström et al., 2008; Deak, 2008; Kanczkowski et al., 2013a) vermutlich weiterführende Einsichten hinsichtlich der Möglichkeiten der Einflussnahme auf die Hormonsekretion der Nebenniere liefern. Zudem könnte dies einen Ansatz in der Prävention der, mit einem schwierigen Krankheitsverlauf assoziierten Nebenniereninsuffizienz (Prigent et al., 2004), darstellen. Neutrophile Granulozyten infiltrieren hier das Organ (Kanczkowski et al., 2013b) und schädigen es. Da sie durch mononukleäre Phagozyten per CX3CL1 aktiviert werden können (Ishida et al., 2008), könnte eine Blockade dieser Aktivierung sich positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken.

Ein weiterer diskutabler Aspekt dieser Arbeit ist die intraperitoneale Injektion von LPS zur Provokation einer Immunantwort im Sinne einer Infektion. Nur in wenigen Szenarien kommt es zu solch einer explosionsartigen Exposition des Organismus mit einer vergleichbar hohen Dosis an LPS. Oftmals wird daher eine alternative Methode zur Auslösung einer Sepsis verwendet: die Ligatur und Punktion des Caecums (CLP) (Siempos et al., 2014), löst über die Perforation des Caecums eine fulminante Peritonitis mit septischem Krankheitsverlauf aus, was am ehesten den, außerhalb des experimentellen Umfeldes, auftretenden Krankheitsverlauf widerspiegelt. Doch auch dieses Model ist mit Herausforderungen behaftet, welche insbesondere dessen Reproduzierbarkeit betrifft. Aufgrund der oben beschriebenen Dynamik ist eine präzise zeitliche Einordnung des immunologischen Geschehens für die Vergleichbarkeit verschiedener Gruppen unabdingbar, welche allein wegen des aufwändigen Verfahrens der CLP nur schwer zu gewährleisten ist.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine stressbedingte Produktfreisetzung der Nebenniere durch mononukleäre Phagozyten anhand von CX3CR1 beeinflussbar sein könnte. LPS-Provokation führt in Mäusen zu einer Stressantwort, bei der die Produkte der Nebenniere wichtig sind, u.a. steuern sie die Hämodynamik. Die Nebenniere kann durch Zytokine, wie sie z.B. auch mononukleäre Phagozyten freisetzen, in ihrer Produktfreisetzung moduliert werden. So ist es möglich, dass es nach LPS-Provokation zu einer Beeinflussung der Nebennierenprodukt-Spiegel durch CX3CR1-positive mononukleäre Phagozyten per Stimulation durch sCX3CL1 kommt.

Es wird gezeigt, dass nach LPS-Provokation eine massive Infiltration mononukleärer Phagozyten in die Nebenniere stattfindet ohne quantitativ signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen, weder mit noch ohne Dexamethason-Vorbehandlung. Bei den Oberflächenantigen-Profilen mononukleärer Phagozyten der Nebenniere von Wildtyp Mäusen wurden signifikante Unterschiede zu mit Dexamethason-vorbehandelten Wildtyp Mäusen sowie zu CX3CR1-Knockout Mäusen, jeweils mit oder ohne Dexamethason-Vorbehandlung gesehen. Diese Unterschiede können als Indiz für eine veränderte Ausdifferenzierung gewertet werden. Hinsichtlich des mRNA-Gehalts proinflammatorischer Zytokine in den Nebennieren von Wildtyp Mäusen sowie CX3CR1-Knockout Mäusen wurden nach LPS-Provokation keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Bei den untersuchten Nebennierenprodukten Corticosteron und Aldosteron hatte erstgenanntes in Wildtyp Mäusen einen signifikant höheren Spitzenspiegel nach LPS-Provokation als in CX3CR1-Knockout Mäusen. Hämodynamisch zeigten sich hier teils signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen, die u.a. bereits in Homöostase bestanden.

In dieser Arbeit wurden erste Hinweise erarbeitet, dass mononukleäre Phagozyten eine stressbedingte Produktfreisetzung der Nebenniere beeinflussen könnten. Eine Konkretisierung dieser Hinweise könnte durch eine Quantifizierung lokal in der Nebenniere vorkommender Zytokine in Korrelation mit weiteren Nebennierenprodukten erreicht werden.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunologische Aktivierung via PAMPs und DAMPs	15
Abbildung 2: CX3CL1 (Jones et al., 2010)	17
Abbildung 3: Versuchsablauf LPS-Provokation	25
Abbildung 4: Versuchsablauf zur Dynamik mononukleärer Phagozyten in der Nebenniere	26
Abbildung 5: Gruppeneinteilung hinsichtlich der Dexamethason-Vorbehandlung	27
Abbildung 6: Versuchsablauf der LPS-Provokation mit oder ohne Dexamethason-Vorbehandlung	27
Abbildung 7: Exemplarisches Messergebnis, erstellt durch die BP-2000 Analysis Software.	30
Abbildung 8: Die rekombinanten Antikörper für die FACS-Analyse	33
Abbildung 9: Prinzip der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung	33
Abbildung 10: Gating-Strategie für die Identifikation mononukleärer Phagozyten der Nebenniere	34
Abbildung 11: Corticosteron- und Aldosteron-Plasmaspiegel nach intraperitonealer LPS-Injektion	37
Abbildung 12: Hämodynamik nach intraperitonealer LPS-Injektion	39
Abbildung 13: Mononukleäre Phagozyten der Nebenniere nach LPS-Provokation	40
Abbildung 14: Die Dynamik der Oberflächenantigene mononukleärer Phagozyten der Nebenniere nach LPS-Provokation	42
Abbildung 15: Die Dynamik der CX3CL1-CX3CR1-Achse nach LPS-Provokation	43
Abbildung 16: Vergleich der Populationsgröße mononukleärer Phagozyten der Nebenniere bei Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen nach LPS-Provokation	44
Abbildung 17: Oberflächenmarker mononukleärer Phagozyten der Nebenniere in Wildtyp Mäusen und CX3CR1-Knockout Mäusen nach LPS-Provokation	45
Abbildung 18: Zytokine in der Nebenniere per rtPCR nach LPS-Provokation	46
Abbildung 19: Die gMFI des Antikörpers gegen CX3CR1 renaler CD11c+ Zellen von Wildtyp Mäusen nach <i>in vitro</i> Behandlung mit LPS, Dexamethason oder TNF- α	48

Abbildung 20: Die hämodynamische Reaktion auf LPS-Provokation nach Dexamethason-Vorbehandlung	51
Abbildung 21: Die CX3CL1-CX3CR1-Achse in der Nebenniere bei LPS-Provokation nach Dexamethason-Vorbehandlung	52
Abbildung 22: Die Oberflächenantigene mononukleärer Phagozyten der Nebenniere bei LPS-Provokation nach Dexamethason-Vorbehandlung	54

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte	19
Tabelle 2: Software	19
Tabelle 3: Tierlinien	20
Tabelle 4: Puffermedien und angesetzte Reagenzien	20
Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien	21
Tabelle 6: Antikörper Durchflusszytometrie (FACS)	22
Tabelle 7: Primer rtPCR	22
Tabelle 8: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	23
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien	24
Tabelle 10: Überblick über die Gruppen mit ihren jeweiligen Behandlungen	29
Tabelle 11: Programmphasen des Mastercycler® nexus X2 – PCR Thermocycler	35
Tabelle 12: Die einzelnen Phasen des LightCycler® 480	36

8. Literaturverzeichnis

- Ai J, Guo L, Zheng Z, Wang S-X, Huang B, Li X-A. Corticosteroid Therapy Benefits Septic Mice With Adrenal Insufficiency But Harms Septic Mice Without Adrenal Insufficiency. *Crit Care Med.* 2015; 43: e490-8
- Annane D, Maxime V, Ibrahim F, Alvarez JC, Abe E, Boudou P. Diagnosis of adrenal insufficiency in severe sepsis and septic shock. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174: 1319–1326
- Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1997; 385: 640–644
- Bechmann N, Watts D, Steenblock C, Wallace PW, Schürmann A, Bornstein SR, Wielockx B, Eisenhofer G, Peitzsch M. Adrenal Hormone Interactions and Metabolism: A Single Sample Multi-Omics Approach. *Horm Metab Res.* 2021; 53: 326–334
- Bergmann T. Die Nebenniere: zwischen Diagnostik, konservativer und operativer Therapie. *J. Urol. Urogynäkol. AT* 2022; 29: 106–113
- Berka JL, Kelly DJ, Robinson DB, Alcorn D, Marley PD, Fernley RT, Skinner SL. Adrenaline cells of the rat adrenal cortex and medulla contain renin and prorenin. *Mol Cell Endocrinol.* 1996; 119: 175–184
- Bethin KE, Vogt SK, Muglia LJ. Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 9317–9322
- Black VH, Robbins D, McNamara N, Huima T. A correlated thin-section and freeze-fracture analysis of guinea pig adrenocortical cells. *Am J Anat.* 1979; 156: 453–503
- Boonen E, Bornstein SR, van den Berghe G. New insights into the controversy of adrenal function during critical illness. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015; 3: 805–815
- Boonen E, Vervenne H, Meersseman P, Andrew R, Mortier L, Declercq PE, Vanwijngaerden Y-M, Spriet I, Wouters PJ, Vander Perre S, Langouche L, Vanhorebeek I, Walker BR, van den Berghe G. Reduced cortisol metabolism during critical illness. *N Engl J Med.* 2013; 368: 1477–1488

- Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Faresse RV, Broxmeyer HE, Charo IF. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2552–2561
- Bornstein SR, Briegel J. A new role for glucocorticoids in septic shock: balancing the immune response. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167: 485–486
- Bornstein SR, Chrousos GP. Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84: 1729–1736
- Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA, Pfeiffer EF, Holst JJ. Effects of splanchnic nerve stimulation on the adrenal cortex may be mediated by chromaffin cells in a paracrine manner. *Endocrinology.* 1990; 127: 900–906
- Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Usadel H, Böckmann M, Scherbaum WA. Morphological evidence for a close interaction of chromaffin cells with cortical cells within the adrenal gland. *Cell Tissue Res.* 1991; 265: 1–9
- Bornstein SR, Engeland WC, Ehrhart-Bornstein M, Herman JP. Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends in endocrinology and metabolism: Trends Endocrinol Metab.* 2008; 19: 175–180
- Bornstein SR, Gonzalez-Hernandez JA, Ehrhart-Bornstein M, Adler G, Scherbaum WA. Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78: 225–232
- Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 215: 135–141
- Cardona AE, Sasse ME, Liu L, Cardona SM, Mizutani M, Savarin C, Hu T, Ransohoff RM. Scavenging roles of chemokine receptors: chemokine receptor deficiency is associated with increased levels of ligand in circulation and tissues. *Blood.* 2008; 112: 256–263
- Cassell JF, McLachlan EM, Sittiracha T. The effect of temperature on neuromuscular transmission in the main caudal artery of the rat. *J Physiol.* 1988; 397: 31–49
- Cazalis M-A, Kreitmann L, Monneret G, Pachot A, Brengel-Pesce K, Llitjos J-F. Whole blood ratio of CDK1/CX3CR1 mRNA expression combined to lactate refines the prediction of ICU mortality in septic patients in the Sepsis-3 era: a proof-of-concept study. *Front Med (Lausanne).* 2024; 11: 1445451

- Chan CM, Mitchell AL, Shorr AF. Etomidate is associated with mortality and adrenal insufficiency in sepsis: a meta-analysis*. *Critical care medicine* 2012; 40: 2945–2953
- Chaudhary T, Hohenstein C, Bayer O. Die goldene Stunde der Sepsis : Frühzeitiger präklinischer Therapiebeginn. *Med Klin Intensivmed Notfmed*. 2014; 109: 104–108
- Chen S, Saeed AFUH, Liu Q, Jiang Q, Xu H, Xiao GG, Rao L, Duo Y. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2023; 8: 207
- Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol*. 2017; 39: 517–528
- Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*. 1995; 332: 1351–1362
- Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nature Rev Endocrinol*. 2009; 5: 374–381
- Dal-Secco D, Wang J, Zeng Z, Kolaczowska E, Wong CHY, Petri B, Ransohoff RM, Charo IF, Jenne CN, Kubes P. A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury. *J Exp Med*. 2015; 212: 447–456
- Deak T. Immune cells and cytokine circuits: toward a working model for understanding direct immune-to-adrenal communication pathways. *Endocrinology*. 2008; 149: 1433–1435
- Decker RS, Donta ST, Larsen WJ, Murray SA. Gap junctions and ACTH sensitivity in Y-1 adrenal tumor cells. *J Supramol Struct*. 1978; 9: 497–507
- Dolfi B, Gallerand A, Firulyova MM, Xu Y, Merlin J, Dumont A, Castiglione A, Vaillant N, Quemener S, Gerke H, Stunault MI, Schrank PR, Kim S-H, Zhu A, Ding J, Gilleron J, Magnone V, Barbry P, Dombrowicz D, Duranton C, Wakkach A, Blin-Wakkach C, Becher B, Pagnotta S, Argüello RJ, Rantakari P, Chakarov S, Ginhoux F, Zaitsev K, Kim K-W, Yvan-Charvet L, Guinamard RR, Williams JW, Ivanov S. Unravelling the sex-specific diversity and functions of adrenal gland macrophages. *Cell Rep*. 2022; 39: 110949
- Drüeke TB, Devuyst O. Blood pressure measurement in mice: tail-cuff or telemetry? *Kidney Int*. 2019; 96: 36
- Ehrchen JM, Roth J, Barczyk-Kahlert K. More Than Suppression: Glucocorticoid Action on Monocytes and Macrophages. *Front Immunol*. 2019; 10: 2028

- Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Güse-Behling H, Stromeyer HG, Rasmussen TN, Scherbaum WA, Adler G, Holst JJ. Sympathoadrenal regulation of adrenal androstenedione release. *Neuroendocrinology*. 1994; 59: 406–412
- Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev*. 1998; 19: 101–143
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*. 2000; 52: 595–638
- Engström L, Rosén K, Angel A, Fyrberg A, Mackerlova L, Konsman JP, Engblom D, Blomqvist A. Systemic immune challenge activates an intrinsically regulated local inflammatory circuit in the adrenal gland. *Endocrinology*. 2008; 149: 1436–1450
- Ensinger H, Geisser W, Brinkmann A, Wachter U, Vogt J, Radermacher P, Georgieff M, Träger K. Metabolic effects of norepinephrine and dobutamine in healthy volunteers. *Shock*. 2002; 18: 495–500
- Evans AN, Liu Y, Macgregor R, Huang V, Aguilera G. Regulation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone transcription by elevated glucocorticoids. *Mol Endocrinol*. 2013; 27: 1796–1807
- Fleischmann-Struzek C, Rudd K. Schwierigkeiten bei der Ermittlung der Sepsiskrankheitslast. *Med Klin Intensivmed Notfmed* 2023; 118: 68–74
- Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel DD. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med*. 1998; 188: 1413–1419
- Friggeri A, Cazalis M-A, Pachot A, Cour M, Argaud L, Allaouchiche B, Floccard B, Schmitt Z, Martin O, Rimmelé T, Fontaine-Kesteloot O, Page M, Piriou V, Bohé J, Monneret G, Morisset S, Textoris J, Vallin H, Blein S, Maucort-Boulch D, Lepape A, Venet F. Decreased CX3CR1 messenger RNA expression is an independent molecular biomarker of early and late mortality in critically ill patients. *Crit Care*. 2016; 20: 204
- Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med*. 2013; 41: 1167–1174

- Gallo-Payet N, Pothier P, Isler H. On the presence of chromaffin cells in the adrenal cortex: their possible role in adrenocortical function. *Biochem Cell Biol.* 1987; 65: 588–592
- Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, O'Shea JJ, Chrousos GP, Bornstein SR. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J.* 2002; 16: 61–71
- Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, Helft J, Chow A, Elpek KG, Gordonov S, Mazloom AR, Ma'ayan A, Chua W-J, Hansen TH, Turley SJ, Merad M, Randolph GJ. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol.* 2012; 13: 1118–1128
- Ge X-Y, Fang S-P, Zhou M, Luo J, Wei J, Wen X-P, Yan X-D, Zou Z. TLR4-dependent internalization of CX3CR1 aggravates sepsis-induced immunoparalysis. *Am J Transl Res.* 2016; 8: 5696–5705
- Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003; 19: 71–82
- Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ. Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature.* 1982; 299: 355–357
- Goda S, Imai T, Yoshie O, Yoneda O, Inoue H, Nagano Y, Okazaki T, Imai H, Bloom ET, Domae N, Umehara H. CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol.* 2000; 164: 4313–4320
- Gomes RN, Figueiredo RT, Bozza FA, Pacheco P, Amâncio RT, Laranjeira AP, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Bozza MT. Increased susceptibility to septic and endotoxic shock in monocyte chemoattractant protein 1/cc chemokine ligand 2-deficient mice correlates with reduced interleukin 10 and enhanced macrophage migration inhibitory factor production. *Shock.* 2006; 26: 457–463
- González-Hernández JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Gschwend JE, Gwosdow A, Jirikowski G, Scherbaum WA. IL-1 is expressed in human adrenal gland in vivo. Possible role in a local immune-adrenal axis. *Clin Exp Immunol.* 1995; 99: 137–141

- Gorain B, Dutta S, Nandy U, Sengupta P, Choudhury H. Pharmacology of Adrenaline, Noradrenaline, and Their Receptors. In: Kumar P, Deb PK, Hrsg. *Frontiers in Pharmacology of Neurotransmitters*. Springer Singapore, 2020: 107–142
- Green SR, Han KH, Chen Y, Almazan F, Charo IF, Miller YI, Quehenberger O. The CC chemokine MCP-1 stimulates surface expression of CX3CR1 and enhances the adhesion of monocytes to fractalkine/CX3CL1 via p38 MAPK. *J Immunol*. 2006; 176: 7412–7420
- Hahn PY, Wang P, Tait SM, Ba ZF, Reich SS, Chaudry IH. Sustained elevation in circulating catecholamine levels during polymicrobial sepsis. *Shock*. 1995; 4: 269–273
- Haidan A, Bornstein SR, Glasow A, Uhlmann K, Lübke C, Ehrhart-Bornstein M. Basal steroidogenic activity of adrenocortical cells is increased 10-fold by coculture with chromaffin cells. *Endocrinology*. 1998; 139: 772–780
- Hamon P, Loyher P-L, Baudesson de Chanville C, Licata F, Combadière C, Boissonnas A. CX3CR1-dependent endothelial margination modulates Ly6Chigh monocyte systemic deployment upon inflammation in mice. *Blood*. 2017; 129: 1296–1307
- Hinz B, Hirschelmann R. Rapid non-genomic feedback effects of glucocorticoids on CRF-induced ACTH secretion in rats. *Pharm Res*. 2000; 17: 1273–1277
- Hochheiser K, Heuser C, Krause TA, Teteris S, Ilias A, Weisheit C, Hoss F, Tittel AP, Knolle PA, Panzer U, Engel DR, Tharaux P-L, Kurts C. Exclusive CX3CR1 dependence of kidney DCs impacts glomerulonephritis progression. *J Clin Invest*. 2013; 123: 4242–4254
- Huang H-L, Chiang M-F, Lin C-W, Pu H-F. Lipopolysaccharide directly stimulates aldosterone production via toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 related PI(3)K/Akt pathway in rat adrenal zona glomerulosa cells. *J Cell Biochem*. 2010; 111: 872–880
- Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell*. 1997; 91: 521–530
- Ishida Y, Hayashi T, Goto T, Kimura A, Akimoto S, Mukaida N, Kondo T. Essential involvement of CX3CR1-mediated signals in the bactericidal host defense during septic peritonitis. *J Immunol*. 2008; 181: 4208–4218

- Jennewein C, Tran N, Kanczkowski W, Heerdegen L, Kantharajah A, Dröse S, Bornstein S, Scheller B, Zacharowski K. Mortality of Septic Mice Strongly Correlates With Adrenal Gland Inflammation. *Crit Care Med.* 2016; 44: e190-9
- Joffre J, Hellman J, Ince C, Ait-Oufella H. Endothelial Responses in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020; 202: 361–370
- Judd AM, Call GB, Barney M, McIlmoil CJ, Balls AG, Adams A, Oliveira GK. Possible function of IL-6 and TNF as intraadrenal factors in the regulation of adrenal steroid secretion. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 917: 628–637
- Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 4106–4114
- Kanczkowski W, Alexaki V-I, Tran N, Großklaus S, Zacharowski K, Martinez A, Popovics P, Block NL, Chavakis T, Schally AV, Bornstein SR. Hypothalamo-pituitary and immune-dependent adrenal regulation during systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013a; 110: 14801–14806
- Kanczkowski W, Chatzigeorgiou A, Grossklaus S, Sprott D, Bornstein SR, Chavakis T. Role of the endothelial-derived endogenous anti-inflammatory factor Del-1 in inflammation-mediated adrenal gland dysfunction. *Endocrinology.* 2013b; 154: 1181–1189
- Kanczkowski W, Chatzigeorgiou A, Samus M, Tran N, Zacharowski K, Chavakis T, Bornstein SR. Characterization of the LPS-induced inflammation of the adrenal gland in mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2013c; 371: 228–235
- Kanczkowski W, Sue M, Zacharowski K, Reincke M, Bornstein SR. The role of adrenal gland microenvironment in the HPA axis function and dysfunction during sepsis. *Mol Cell Endocrinol.* 2015; 408: 241–248
- Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med.* 1997; 186: 1757–1762
- Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94: 12053–12058

- Landsman L, Bar-On L, Zerneck A, Kim K-W, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, Lira SA, Weissman IL, Weber C, Jung S. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood*. 2009; 113: 963–972
- Lang CH, Bagby GJ, Ferguson JL, Spitzer JJ. Cardiac output and redistribution of organ blood flow in hypermetabolic sepsis. *Am J Physiol*. 1984; 246: R331-7
- Li J-L, Li G, Jing X-Z, Li Y-F, Ye Q-Y, Jia H-H, Liu S-H, Li X-J, Li H, Huang R, Zhang Y, Wang H. Assessment of clinical sepsis-associated biomarkers in a septic mouse model. *J Int Med Res*. 2018; 46: 2410–2422
- Liu F, Dai S, Feng D, Qin Z, Peng X, Sakamuri SSV, Ren M, Huang L, Cheng M, Mohammad KE, Qu P, Chen Y, Zhao C, Zhu F, Liang S, Aktas BH, Yang X, Wang H, Katakam PVG, Busija DW, Fischer T, Datta PK, Rappaport J, Gao B, Qin X. Distinct fate, dynamics and niches of renal macrophages of bone marrow or embryonic origins. *Nat Commun*. 2020; 11: 2280
- Ludwig A, Berkhout T, Moores K, Groot P, Chapman G. Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN-gamma and TNF-alpha and is modulated by metalloproteinase activity. *J Immunol*. 2002; 168: 604–612
- Ludwig A, Hundhausen C, Lambert MH, Broadway N, Andrews RC, Bickett DM, Leesnitzer MA, Becherer JD. Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2005; 8: 161–171
- Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Strieter RM, Kunkel SL. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *J Immunol*. 1999; 163: 6148–6154
- Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 2014; 5: 4–11
- Mazzocchi G, Musajo FG, Malendowicz LK, Andreis PG, Nussdorfer GG. Interleukin-1beta Stimulates Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) and Adrenocorticotropin (ACTH) Release by Rat Adrenal Gland in Vitro. *Mol Cell Neurosci*. 1993; 4: 267–270
- McKechnie K, Dean HG, Furman BL, Parratt JR. Plasma catecholamines during endotoxin infusion in conscious unrestrained rats: effects of adrenal demedullation and/or guanethidine treatment. *Circ Shock*. 1985; 17: 85–94

- Meghraoui-Kheddar A, Barthelemy S, Boissonnas A, Combadière C. Revising CX3CR1 Expression on Murine Classical and Non-classical Monocytes. *Front Immunol.* 2020; 11: 1117
- Mueller B, Figueroa A, Robinson-Papp J. Structural and functional connections between the autonomic nervous system, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and the immune system: a context and time dependent stress response network. *Neurol Sci.* 2022; 43: 951–960
- Nakayama T, Watanabe Y, Oiso N, Higuchi T, Shigeta A, Mizuguchi N, Katou F, Hashimoto K, Kawada A, Yoshie O. Eotaxin-3/CC chemokine ligand 26 is a functional ligand for CX3CR1. *J Immunol.* 2010; 185: 6472–6479
- Nicolaidis NC, Kyratzi E, Lamprokostopoulou A, Chrousos GP, Charmandari E. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation.* 2015; 22: 6–19
- Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker H-C. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science.* 2005; 307: 254–258
- Nordlohne J, Hulsmann I, Schwafertz S, Zgrajek J, Grundmann M, Vietinghoff S von, Eitner F, Becker MS. A flow cytometry approach reveals heterogeneity in conventional subsets of murine renal mononuclear phagocytes. *Sci Rep.* 2021; 11: 13251
- Pachot A, Cazalis M-A, Venet F, Turrel F, Faudot C, Voirin N, Diasparra J, Bourgoin N, Poitevin F, Mouglin B, Lepape A, Monneret G. Decreased expression of the fractalkine receptor CX3CR1 on circulating monocytes as new feature of sepsis-induced immunosuppression. *J Immunol.* 2008; 180: 6421–6429
- Palacios G, Lafarga M. Chromaffin cells in the glomerular zone of adult rat adrenal cortex. *Cell Tissue Res.* 1975; 164: 275–278
- Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, Vath J, Gosselin M, Ma J, Dussault B, Woolf E, Alperin G, Culpepper J, Gutierrez-Ramos JC, Gearing D. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature.* 1997; 387: 611–617
- Panek CA, Ramos MV, Mejias MP, Abrey-Recalde MJ, Fernandez-Brando RJ, Gori MS, Salamone GV, Palermo MS. Differential expression of the fractalkine chemokine receptor

- (CX3CR1) in human monocytes during differentiation. *Cell Mol Immunol*. 2015; 12: 669–680
- Park BS, Lee J-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. 2013; 45: e66
- Pitre T, Drover K, Chaudhuri D, Zeraaktkar D, Menon K, Gershengorn HB, Jayaprakash N, Spencer-Segal JL, Pastores SM, Nei AM, Annane D, Rochweg B. Corticosteroids in Sepsis and Septic Shock: A Systematic Review, Pairwise, and Dose-Response Meta-Analysis. *Crit Care Explor*. 2024; 6: e1000
- Prigent H, Maxime V, Annane D. Science review: mechanisms of impaired adrenal function in sepsis and molecular actions of glucocorticoids. *Crit Care*. 2004; 8: 243–252
- Ramos MV, Fernández GC, Brando RJF, Panek CA, Bentancor LV, Landoni VI, Isturiz MA, Palermo MS. Interleukin-10 and interferon-gamma modulate surface expression of fractalkine-receptor (CX(3)CR1) via PI3K in monocytes. *Immunology*. 2010; 129: 600–609
- Rivas-Fuentes S, Salgado-Aguayo A, Arratia-Quijada J, Gorocica-Rosete P. Regulation and biological functions of the CX3CL1-CX3CR1 axis and its relevance in solid cancer: A mini-review. *J Cancer*. 2021; 12: 571–583
- Robben PM, LaRegina M, Kuziel WA, Sibley LD. Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J Exp Med*. 2005; 201: 1761–1769
- Seemann S, Zohles F, Lupp A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *J Biomed Sci*. 2017; 24: 60
- Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, Angus DC, Rubenfeld GD, Singer M. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315: 775–787
- Siempos II, Lam HC, Ding Y, Choi ME, Choi AMK, Ryter SW. Cecal Ligation and Puncture-induced Sepsis as a Model To Study Autophagy in Mice. *J Vis Exp*. 2014
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-L, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315: 801–810

- Sittiracha T, McLachlan EM, Bell C. The innervation of the caudal artery of the rat. *Neuroscience*. 1987; 21: 647–659
- Sorge RE, Martin LJ, Isbester KA, Sotocinal SG, Rosen S, Tuttle AH, Wieskopf JS, Acland EL, Dokova A, Kadoura B, Leger P, Mapplebeck JCS, McPhail M, Delaney A, Wigerblad G, Schumann AP, Quinn T, Frasnelli J, Svensson CI, Sternberg WF, Mogil JS. Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods*. 2014; 11: 629–632
- Spiga F, Walker JJ, Terry JR, Lightman SL. HPA axis-rhythms. *Compr Physiol*. 2014; 4: 1273–1298
- Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJM. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*. 2004; 172: 4410–4417
- Träger K, Radermacher P. Catecholamines in the treatment of septic shock: effects beyond perfusion. *Crit Care Resusc*. 2003; 5: 270–276
- Tumpara S, Ballmaier M, Wrenger S, König M, Lehmann M, Lichtinghagen R, Martinez-Delgado B, Korenbaum E, DeLuca D, Jedicke N, Welte T, Fromme M, Strnad P, Stolk J, Janciauskiene S. Polymerization of misfolded Z alpha-1 antitrypsin protein lowers CX3CR1 expression in human PBMCs. *Elife*. 2021; 10
- Usadel H, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Kreysch HG, Scherbaum WA. Gap junctions in the adrenal cortex. *Horm Metab Res*. 1993; 25: 653–654
- Vietinghoff S von, Kurts C. Regulation and function of CX3CR1 and its ligand CX3CL1 in kidney disease. *Cell Tissue Res*. 2021; 385: 335–344
- Wilde E, Aubdool AA, Thakore P, Baldissera L, Alawi KM, Keeble J, Nandi M, Brain SD. Tail-Cuff Technique and Its Influence on Central Blood Pressure in the Mouse. *J Am Heart Assoc*. 2017; 6
- Winkler H, Apps DK, Fischer-Colbrie R. The molecular function of adrenal chromaffin granules: established facts and unresolved topics. *Neuroscience*. 1986; 18: 261–290
- Yeager MP, Pioli PA, Collins J, Barr F, Metzler S, Sites BD, Guyre PM. Glucocorticoids enhance the in vivo migratory response of human monocytes. *Brain Behav Immun*. 2016; 54: 86–94
- Yoshida-Hiroi M, Bradbury MJ, Eisenhofer G, Hiroi N, Vale WW, Novotny GE, Hartwig HG, Scherbaum WA, Bornstein SR. Chromaffin cell function and structure is impaired in

corticotropin-releasing hormone receptor type 1-null mice. *Mol Psychiatry*. 2002; 7: 967–974

Yu P-C, Hao C-Y, Fan Y-Z, Di Liu, Qiao Y-F, Yao J-B, Li C-Z, Yu Y. Altered Membrane Expression and Function of CD11b Play a Role in the Immunosuppressive Effects of Morphine on Macrophages at the Nanomolar Level. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023; 16

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000; 12: 121–127

9. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christian Kurts, für Ihren steten Rat sowie Ihre immer freundliche Unterstützung.

Herrn Dr. med. Sebastian Schwab danke ich für die vortreffliche Betreuung. Ich durfte so viel von dir lernen, sowohl für meine Promotion, als auch für meinen beruflichen Werdegang.

Auch Frau Melanie Eichler möchte ich meinen Dank ausdrücken. Für deine Geduld im Labor, sowie die fantastische Unterstützung bei der Umsetzung unserer Experimente. Zudem bedanke ich mich bei Frau Dr. Natascha Stumpf. Du hattest stets ein offenes Ohr und hast mir bei so vielem weitergeholfen.

Herzlichen Dank für die Durchsicht meiner Arbeit an Herrn Heinz Feldmann, MD, Ph.D..

Zudem will ich mich bei meinem Vater Dr. Wolfram Klein für die stete Unterstützung über mein gesamtes Studium hinweg bedanken.

Auch bei meinen Großeltern bedanke ich mich sehr, ihr standet mir stets mit gutem Rat und Lebensweisheiten zur Seite.

Danke an meine Schwestern Luise und Johanna, für eure Unterstützung, ihr wart immer da, wenn ich euch gebraucht habe.

Meiner Mutter Frau Dr. Eva Leweke gilt mein ganz besonderer Dank. Danke für deine Unterstützung, diese Arbeit so formvollendet zu schreiben. Für deine stete Förderung und Forderung sowie die Inspiration, die mich zu dem gemacht hat, der ich heute bin.

Mein besonderer und persönlicher Dank gilt meiner Verlobten Frau Dr. med. Marie Feldmann. Du standest mir immer unterstützend zur Seite und warst stets für mich da. Für deinen festen Glauben an mich.