

Charakterisierung der Entwicklung und Funktion synovialer Makrophagen

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

vorgelegt von
Stephan Culemann
aus Magdeburg

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2020

Vorsitzender des

Promotionsorgans: Prof. Dr. Georg Kreimer

Gutachter: Prof. Dr. Falk Nimmerjahn

Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Krönke

Gutachter: Prof. Dr. Martina Rauner

für Alma und Alfons

Vorwort

Die Ergebnisse, die in dieser Dissertationsschrift präsentiert werden, sind zuvor in der Fachzeitschrift *nature* (VOL 572/ 29.08.2019) unter dem Titel „*Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint*“ von mir (Stephan Culemann) und Anika Grüneboom als gleichwertige Co-Erstautoren publiziert worden ¹. Die Abbildungen der vorliegenden Dissertationsschrift stammen aus der oben genannten Publikation und wurden modifiziert.

Projektleiter und korrespondierender Autor der Studie ist Prof. Dr. Gerhard Krönke. Als Erstautor dieser Studie war ich am Design und der Auswertung der Experimente und der Interpretation aller Ergebnisse maßgeblich beteiligt.

Einige Experimente wurden mitunter teilweise oder vollständig durch kollaborierende Wissenschaftler durchgeführt.

So wurden die konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie und die Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie sowie die Datenaufbereitung mittels Imaris-Software von Anika Grüneboom und Daniela Weidner durchgeführt.

José Ángel Nicolás-Ávila und Juan A. Quintana aus der Gruppe von Andrés Hidalgo generierten die Parabiosen und führten die FACS-Analysen zu den Parabiosen durch.

Tobias Rothe führte die FACS-Analysen der humanen Synovialproben durch. Maria Faas generierte die BMDMs. Jochen A. Ackermann etablierte das konditionale Mausmodell der *CD115^{creER};tdTomato*-Maus in unserem Labor. René Pfeifle isolierte und markierte IgGs aus dem K/BxN Serum. Kim Fischer half bei den Behandlungen der Mäuse.

Im Rahmen einer Masterarbeit assistierte Katrin Franziska Lämmle bei Experimenten und führte Experimente unter meiner Aufsicht durch. Einige Ergebnisse dieses Projektes finden sich somit auch in der Masterarbeit von K. F. Lämmle mit dem Titel „*Cx3Cr1+ synovial lining macrophages establish a functional barrier shielding the joint*“.

Das K/BxN Serum wurde von Wolfgang Baum und Ulrike Baschant gesammelt und bereitgestellt.

Philipp Kirchner, Martin Eberhardt, Fulvia Ferrazzi, Julio Vera und Arif B. Ekici halfen bei der Generierung und Analyse der Sequenzierungsdaten.

Lisa Seyler und Tobias Bäuerle führten die Messungen am Magnetresonanztomographen durch.

Reiner F. Haseloff und Ingolf E. Blasig synthetisierten die Peptidomimetika und halfen beim Design der Experimente zur pharmakologischen Manipulation der Tight Junctions.

Branislav Krljanac und David Vöhringer generierte die *Retnla^{cre};tdTomato*-Maus.

Elke Kretzschmar aus der Arbeitsgruppe von Prof. Friedrich Paulsen bereitete die Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie und half beim Erstellen elektronenmikroskopischer Aufnahmen.

Milena Pachowsky, Nina Renner, David Simon, Arnd Kleyer, Kolja Gelse und Martin Schicht sammelten die humanen Synovialbiopsien.

Kapitel 3 des Journals *Advances in Immunology*, Volume 143 mit dem Titel „*Origin and function of synovial macrophage subsets during inflammatory joint disease*“², welches von mir, Dr. Anika Grüneboom und Prof. Dr. Gerhard Krönke verfasst wurde, sind wesentliche Forschungsergebnisse der letzten Jahre und Erkenntnisse zum Thema Ursprung, Subpopulationen und Funktion von Makrophagen im Allgemeinen und synovialer Makrophagen im Speziellen im Kontext von Gelenksentzündungen aufgeführt. Die Einleitung dieser Dissertation orientiert sich an dem genannten Review-Artikel und fasst die Grundlagen, welche zum Verständnis der vorliegenden Arbeit wichtig sind, in ähnlicher Weise zusammen.

Zusammenfassung

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen in unserer Gesellschaft und geht mit starken Schmerzen und motorischen Behinderungen einher. Die RA ist vor allem durch chronische Entzündungen der synovialen Gelenke gekennzeichnet. Unbehandelt führt sie schließlich zum vollständigen Funktionsverlust der Gelenke.

Eine Vielzahl von Immunzellen sind in die Pathogenese der RA involviert, wobei Makrophagen eine besondere Rolle im Entzündungsprozess spielen. Mit Hilfe konditionaler, transgener Mäuse, hochauflösender und dreidimensionaler Bildgebung sowie neuester Sequenzierungstechniken zur Erstellung von Transkriptionsprofilen wurden die mikroanatomische Organisation, Ontogenese und Differenzierung von unterschiedlichen synovialen Makrophagen-Populationen sowie deren funktionelle Rolle im gesunden und entzündeten Gelenk untersucht.

So konnte gezeigt werden, dass eine besondere Population von gewebsresidenten CX₃CR1⁺ Makrophagen in der synovialen Intima der Gelenke eine dynamische Membran bilden, welche das umgebene synoviale Gewebe von der Gelenkflüssigkeit trennt und als immunologische Barriere fungiert. CX₃CR1⁺ Makrophagen und eine weitere Subpopulation interstitieller Makrophagen, welche einen alternativ aktivierten Phänotyp aufweisen, gehen aus einem residenten Pool proliferierender CX₃CR1⁻ CSF1R⁺ Makrophagenvorläufer hervor, die sich im interstitiellen Synovialgewebe befinden.

Im Falle einer Gelenksentzündung kommt es zum Aufbrechen der Makrophagenbarriere, die unter physiologischen Bedingungen durch Tight Junctions und Desmosomen stabilisiert wird. Infiltrierende Makrophagen, die sich von Knochenmarkszellen ableiten, infiltrieren das Synovialgewebe und treiben die Entzündung voran.

Pharmakologische Destabilisierung oder Stabilisierung der Tight Junctions legen eine protektive Funktion der Makrophagenbarriere nahe. Im Gegensatz zur Depletion von Blutmonozyten, führte der Verlust der Synovialmakrophagen zu einer Exazerbation Antikörper-vermittelter Gelenksentzündungen und bestätigte die entzündungseindämmende Funktion der Synovialmakrophagen.

Diese Dissertation erweitert somit maßgeblich das grundlegende Verständnis über die Diversität, Ontogenese sowie Funktion synovialer Makrophagen unter physiologischen und entzündlichen Bedingungen und setzt sie in einen mikroanatomischen Kontext.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	3
Zusammenfassung	5
Inhaltsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	11
Abkürzungsverzeichnis	12
1. Einleitung	14
1.1 Rheumatoide Arthritis	14
1.2 Architektur und zellulärer Aufbau synovialer Gelenke	16
1.3 Das mononukleär-phagozytäre System	17
1.3.1 Ontogenese von Monozyten und Gewebsmakrophagen	18
1.3.2 Funktion und Polarisation von Gewebsmakrophagen	21
1.3.3 Die Rolle von Makrophagen in Rheumatoider Arthritis	23
2. Zielstellung der Dissertation	27
3. Ergebnisse	28
3.1 Räumliche und zeitliche Charakterisierung der synovialen Lining-Makrophagen in gesundem und entzündetem Zustand	28
3.1.1 Synoviale Lining-Makrophagen bilden eine Grenzmembran zwischen Gelenkflüssigkeit und Synovialgewebe	28
3.1.2 Disruption und Reorganisation der CX ₃ CR1 ⁺ Makrophagen-Membran bei Antikörper-induzierter Arthritis	31
3.1.3 Disruption und Reorganisation der CX ₃ CR1 ⁺ Makrophagenmembran während Kollagen-induzierter Arthritis (CIA)	35
3.1.4 Synoviale Fibroblasten tauschen ihre Position mit Lining-Makrophagen bei Antikörper-vermittelter Arthritis	36
3.2 Ontogenetischer Ursprung von Makrophagen-Subtypen des Synovialgewebes ...	37
3.2.1 Synoviale Lining-Makrophagen besiedeln das Gelenk während der Embryongenese	37
3.2.2 Synoviale Gewebsmakrophagen sind resident und selbsterneuernd	38
3.3 Expressionsprofile von mononukleären Phagozyten im gesunden und entzündeten Synovialgewebe	48

3.3.1 Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung von synovialen Makrophagen-Subpopulation	48
3.3.2 Einzelzell-RNA-Sequenzierung von mononukleären Phagozyten aus gesundem Synovialgewebe	53
3.3.3 Transkriptom-basierte Rekonstruktion der Entwicklungsbahn residenter Synovialmakrophagen	56
3.3.4 Evaluierung der Entwicklungsbahn residenter Makrophagen-Subtypen	58
3.3.5 Transkriptionsprofile mononukleärer Phagozyten während der Gelenkentzündung	62
3.4 Funktionelle Eigenschaften von CX ₃ CR1 ⁺ Lining-Makrophagen	68
3.4.1 Lining-Makrophagen sind direkt über Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden..	68
3.4.2 Die funktionelle Rolle der Lining-Makrophagen im synovialen Gelenk	70
3.4.3 Modulation der synovialen Barrierefunktion durch pharmakologische Desintegration oder Stabilisierung der Tight Junctions	78
3.4.4 Infiltrierende Makrophagen haben eine proinflammatorische Funktion	80
3.5 Übertragbarkeit der Erkenntnisse über Synovialmakrophagen aus der Maus auf den Menschen	81
4. Diskussion.....	85
4.1 CX ₃ CR1 ⁺ synoviale Lining-Makrophagen bilden eine dynamische membranähnliche Barriere im synovialen Gelenk	85
4.2 CSF1R ⁺ interstitielle Makrophagenvorläufer sind der Ursprung der CX ₃ CR1 ⁺ Lining-Makrophagen	86
4.3 Die Heterogenität synovialer Makrophagen-Populationen	88
4.4 CX ₃ CR1 ⁺ synoviale Lining-Makrophagen bilden eine Tight-Junction-vermittelte anti-inflammatorische Barriere im Gelenk.....	89
4.5 Von Mäusen und Menschen	91
4.6 Ausblick	93
5. Highlights	97
6. Material und Methoden.....	98
6.5 Mäuse	98
6.6. Humane Synovialbiopsien	99
6.6 Mausmodelle für experimentelle Arthritis.....	99

K/BxN Serumtransfer-Modell	99
Kollagen-induzierte Arthritis.....	99
6.7 In vivo Behandlungen	100
Tamoxifen-Behandlungen.....	100
Diphtherietoxin-Behandlung.	100
Imatinib-Behandlung	100
Injektion Fluorophor-markierter Antikörper von K/BxN Serum.....	101
Anti-Gr-1 Behandlung	101
6.8 Parabiosen.....	101
6.9 Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)	101
6.10 Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung.....	102
6.11 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	103
6.12 Einzelzell-RNA-Sequenzierung	103
6.13 Probenaufbereitung für Immunfluoreszenzmikroskopie	104
6.14 Bright-field-Fluoreszenzmikroskopie (BFM).....	105
6.15 Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie (CLSM).	105
6.16 Optisches Clearing muriner Kniegelenke.	105
6.17 Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie (LSFM).	106
6.18 3D-Analyse der Dichte der synovialen Makrophagenmembran	106
6.19 Magnetresonanztomographie (MRT).....	107
6.20 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	107
6.21 Statistik.	107
6.22 Material und Hersteller.....	108
Referenzen.....	112
Danksagung	124
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau eines gesunden synovialen Gelenkes	17
Abbildung 2 CX ₃ CR1 ⁺ Lining-Makrophagen bilden eine dichte Membran als oberste Schicht des Synovialgewebes	30
Abbildung 3 Dynamische Veränderung der synovialen Makrophagen-Membran während Antikörper-induzierter Arthritis	32
Abbildung 4 Hochauflösende konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie der CX ₃ CR1 ⁺ Lining-Makrophagen während Antikörper-induzierter Arthritis	33
Abbildung 5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) der Synovialmembran	34
Abbildung 6 Veränderungen der Makrophagen-Morphologie und Disruption der Makrophagen-membran während Kollagen-induzierter Arthritis	35
Abbildung 7 Während einer Arthritis expandieren die synoviale Fibroblasten durch die Schicht der Lining-Makrophagen hindurch	36
Abbildung 8 Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie von Kniegelenken von Mausembryonen während der Embryogenese	37
Abbildung 9 CX ₃ CR1 ⁺ Lining-Makrophagen durchlaufen ein <i>Csf1r</i> -exprimierenden Satus	39
Abbildung 10 Synovialgewebe von <i>DsRed^{tg}/Wildtyp</i> -Parabiosen nach 6 und 9 Wochen 41	
Abbildung 11 Quantifizierung des Chimärismus von Makrophagen in gesunden und entzündeten Gelenken der <i>DsRed^{tg}/Wildtyp</i> -Parabiosen	42
Abbildung 12 Quantifizierung der tdTomato-Expression in <i>Cx3cr1^{creER}:tdTomato</i> -Mäusen	44
Abbildung 13 Histologische Analyse der tdTomato-Expression in <i>Cx3cr1^{creER}:tdTomato</i> -Mäusen	45
Abbildung 14 Lokale 4-Hydroxytamoxifen-Injektion in <i>Cx3cr1^{creER}:tdTomato</i> -Mäusen	46
Abbildung 15 Proliferationskapazitäten von synovialen Makrophagen in der Gelenkentzündung	47
Abbildung 16 RNA-Sequenzierung von sortierten CX ₃ CR1 ⁺ Lining-Makrophagen, CX ₃ CR1 ⁻ interstitiellen Makrophagen und Knochenmark-abgeleiteten kultivierten Makrophagen	49
Abbildung 17 Analyse differentieller Genexpression von sortierten Lining-Makrophagen, interstitiellen Makrophagen und BMDM	50
Abbildung 18 Differenzielle Genexpression-Analyse von Tight Junction-assoziierten Genen.....	51

Abbildung 19 Bestätigende quantitative Analyse der Expression von <i>Tjp1</i> , <i>Claudin-5</i> und <i>Claudin-10</i>	52
Abbildung 20 Analyse der Einzelzell-RNA-Sequenzierung mononukleärer Phagozyten des gesunden Synovialgewebes	54
Abbildung 21 Entwicklungsbahn synovialer Gewebsmakrophagen.....	56
Abbildung 22 Differenzielle Genexpressionsanalyse als Funktion der Pseudotime.....	57
Abbildung 23 Longitudinale tdTomato-Expression in Lining-Makrophagen und RELM α ⁺ interstitielle Makrophagen der <i>Csf1r^{creER}:tdTomato</i> -Mäuse.....	59
Abbildung 24 Synovialgewebe der <i>Retnla^{cre}:tdTomato</i> Maus	60
Abbildung 25 Depletion synovialer Makrophagenvorläufer in <i>LysM^{cre}:CD115DTR</i> -Mäusen	61
Abbildung 26 Einzelzell-Transkriptionsprofil von sortierten CD45 ⁺ CD11b ⁺ Ly6G ⁻ Zellen an Tag 1 nach K/BxN Serumtransfer	64
Abbildung 27 Einzelzell-Transkriptionsprofil von sortierten CD45 ⁺ CD11b ⁺ Ly6G ⁻ Zellen an Tag 2 nach K/BxN Serumtransfer	65
Abbildung 28 Einzelzell-Transkriptionsprofil von sortierten CD45 ⁺ CD11b ⁺ Ly6G ⁻ Zellen an Tag 5 nach K/BxN Serumtransfer	66
Abbildung 29 Expressionsmuster ausgewählter Gene basierend auf Einzelzell-RNA-Sequenzierung.....	67
Abbildung 30 Expressionsmuster von Apoptose-relevanten Rezeptoren.....	67
Abbildung 31 Expression von TJP1 auf synovialen CX ₃ CR1 ⁺ Lining-Makrophagen.....	68
Abbildung 32 Expression von Tight-Junction- und Gap-junction-Proteinen in Lining-Makrophagen.	69
Abbildung 33 Zell-Zell-Verbindungen zwischen synovialen Lining-Makrophagen.....	70
Abbildung 34 Raumzeitliche Veränderung der synovialen Makrophagenmembran während der Gelenkentzündung	71
Abbildung 35 Magnetresonanztomographie zur Quantifizierung der Permeabilität des Synovialgewebes.....	72
Abbildung 36 Aufnahme von IgG durch synoviale CX ₃ CR1 ⁺ Lining-Makrophagen	73
Abbildung 37 Die Disruption der Makrophagenmembran wird nicht durch Neutrophile Granulozyten vermittelt.....	74
Abbildung 38 Exazerbation Antikörper-induzierter Arthritis durch Depletion synovialer Gewebsmakrophagen.....	75
Abbildung 39 Exazerbation von Neutrophilen-Infiltration und NET-Bildung durch Depletion synovialer Makrophagen.....	76

Abbildung 40 Exazerbation von K/BxN Serumtransfer-Arthritis durch lokale Makrophagen-Depletion	77
Abbildung 41 Modulation der Barrierefunktion durch pharmakologische Desintegration oder Stabilisierung der Tight Junctions	79
Abbildung 42 CSF1R ⁺ Monozyten/Makrophagen haben entzündungsfördernde Funktionen	80
Abbildung 43 Vergleich muriner und humaner synovialer Lining-Makrophagen.....	82
Abbildung 44 Quantifizierung der MHCII ⁺ TREM2 ⁻ und MHCII ⁻ TREM2 ⁺ Makrophagen in humanem Synovialgewebe	83
Abbildung 45 Vergleichende Analyse der Transkriptionsprofile humaner und muriner Synovialmakrophagen	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Markergene der Cluster der Einzelzell-RNA-Sequenzierung von sortierten synovialen CD45 ⁺ CD11b ⁺ Ly6G ⁻ mononukleären Phagozyten aus dem gesunden Gelenk.	55
Tabelle 2 Verwendete Mausstämme	98
Tabelle 3 Verwendete Antikörper.....	108
Tabelle 4 Molekulare Farbstoffe.....	110
Tabelle 5 Chemikalien und Reagenzien	111

Abkürzungsverzeichnis

ACPAs	<i>Anti-citrullinated peptide antibodies</i>
Adgre	<i>Adhesion G Protein-Coupled Receptor E1</i>
AGM-Region	Aorto-gonadale-mesonephrische Region
anti-CarP	<i>anti-carbamylated protein</i>
Aqp1	Aquaporin 1
Arg1	Arginase-1
AUC	<i>Area under the curve</i>
BFM	Bright-field-Fluoreszenzmikroskopie
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL2	CC-Chemokinligand 2
CCR2	<i>C-C chemokine receptor type 2</i>
Cdk1	Cyclin-abhängige Kinase 1
Chil3	<i>Chitinase-like protein 3</i>
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
Cldn5	Claudin-5
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie
CX ₃ CR1	<i>CX3C chemokine receptor 1</i>
CXCL4	CXC-Motiv-Chemokin 4
CXCL7	CXC-Motiv-Chemokin 7
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokin 8
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
EMPs	Erythro-myeloide Vorläuferzellen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fat3	<i>FAT Atypical Cadherin 3</i>
FC	<i>Flow cytometry</i>
FCS	Fetales Kälberserum
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HBEGF	<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HLA	Humane Leukozytenantigene
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IF	Immunofluorescence
IL-10	Interleukin-10
IL-13	Interleukin-13
IL-17	Interleukin-17
IL-23	Interleukin-23

IL-4	Interleukin-4
Itgam	<i>Integrin alpha M</i>
Itgax	<i>Integrin alpha X</i>
Itgb5	<i>Integrin Subunit Beta 5</i>
Klf2	<i>Krüppel-like fator 2</i>
Klf4	<i>Krüppel-like fator 4</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LSFM	Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie
Ly6C	<i>lymphocyte antigen 6 complex</i>
M-CSFR	<i>macrophage colony-stimulating factor receptor</i>
Mfge8	<i>Milk fat globule-EGF factor 8 protein</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplexes
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
Mrc1	<i>Mannose Receptor C-Type 1</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NET	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NUPR1 ⁺	<i>Nuclear protein 1</i>
OA	Osteoarthritis
PAD	Peptidylarginin-Deiminase
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Pf4	<i>Platelet factor 4</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMN	<i>Polymorphonuclear leukocytes</i>
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
Ptprc	<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RELMa	<i>Resistin-Like Molecule-alpha</i>
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribonukleinsäure
SPP1	<i>Secreted phosphoprotein 1</i>
Stmn1	Stathmin 1
t-SNE	<i>t-distributed stochastic neighbour embedding</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Tjp1	<i>Tight junction protein 1</i>
TNF α	Tumornekrose-Faktor alpha
Trem2	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
Vangl2	<i>Vang-like protein 2</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Vsig4	<i>V-Set And Immunoglobulin Domain Containing 4</i>

1. Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine schwere systemische Autoimmunerkrankung, die vor allem durch chronische Entzündungen der Gelenke und der Bildung von Autoantikörpern charakterisiert ist ^{3,4}. Im Zusammenhang mit der RA sind unter anderem anti-IgG Antikörper, der sogenannte Rheumafaktor (RF), und Antikörper gegen citrullinierte Peptide (*anti-citrullinated peptide antibodies*, ACPAs) beschrieben und werden für die Diagnostik verwendet ^{3,4}. Mit einer Prävalenz von rund 1% der westlichen Bevölkerung ist die RA eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen ^{3,4}. Risikofaktoren für die Pathogenese der RA schließen eine genetische Prädisposition, das Geschlecht und Umweltfaktoren ein ^{3,4}.

Als genetische Risikofaktoren sind im Besonderen einige Allele der Humanen Leukozytenantigene (HLA) des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) mit RA assoziiert. Dabei gehen Allele der Klasse II HLA-Antigene HLA-DR, insbesondere HLA-DRB1, mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung der RA einher. Auch epigenetische Faktoren werden als Risikofaktoren in Betracht gezogen ^{3,4}.

Das Geschlecht eines Menschen spielt bei der Entwicklung der RA ebenfalls eine Rolle ^{4,5}. Im Allgemeinen sind Frauen zwei bis dreimal mehr von RA betroffen als Männer ^{4,5}. Die immunmodulatorischen Effekte des Östrogens werden hierbei diskutiert ^{4,5}.

Die Inhalation von Tabak und Feinstaub gehört ebenfalls zu den Risikofaktoren, wobei deren Wirkungen mitunter auf epigenetische DNA-Modifikation zurückgeführt werden ^{3,4}.

Auch das individuelle Mikrobiom wird als Risikofaktor diskutiert. Bakterielle Zahnfleischentzündungen sind zum Beispiel mit erhöhtem Risiko für RA assoziiert ^{4,6}. Ebenso wird das Mikrobiom des Darmtraktes als entscheidender Faktor in der Pathogenese der RA diskutiert ⁴. Verglichen mit Personen der Kontrollgruppe ohne RA sind seltene Bakterienarten wie zum Beispiel Actinobakterien in RA-Patienten überproportional vertreten, wobei normalerweise häufig vorkommende Arten reduziert sind ^{4,7}.

Ebenso werden Viren wie das Epstein-Barr-Virus mit der Pathogenese der RA in Zusammenhang gebracht ^{3,4,8}.

Die genauen Mechanismen, die zum Ausbruch der RA führen sind nur unvollständig verstanden⁴. Schon Jahre bevor sich die ersten klinischen Symptome der RA zeigen, kann Autoimmunität entstehen^{4,9}. Es wird davon ausgegangen, dass die kontinuierliche Exposition mit verschiedenen Risikofaktoren im Zusammenspiel mit dem genetischen Hintergrund zum Bruch der Selbsttoleranz führen.

Die Bildung von ACPAs wird gern als mögliches Modell-Szenario zur Entwicklung der RA herangezogen⁴. Dabei geht man davon aus, dass zum Beispiel die Inhalation von Tabakrauch oder das vermehrte Vorkommen bestimmter Bakterien die Expression des Enzyms Peptidylarginin-Deiminase (PAD) induziert^{4,10}. PAD vermittelt Citrullinierungen von Proteinen der Zellen der Mukosa⁴.

Diese veränderten, citrullinierten Proteine stellen Neoantigene dar und werden durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen den CD4+ T-Helferzellen präsentiert⁴. Diese T-Zellen wiederum stimulieren B-Zellen, welche ihrerseits Antikörper wie ACPAs und RF gegen Selbst-Antigene produzieren⁴.

Neben Citrullinierungen werden weitere posttranslationale Modifikationen wie nicht-enzymatische Carbamylierungen als Neoantigene, die zu Autoantikörperproduktion führen, diskutiert^{4,11}.

Die Produktion von Autoantikörpern geht nicht zwangsläufig mit gleichzeitiger Gelenkentzündung einher. ACPAs und anti-CarP (*anti-carbamylated protein*) Antikörper konnten Jahre vor klinischer Manifestation der RA im Serum detektiert werden^{4,12,13}. Zusätzliche Ereignisse wie Immunkomplex-Bildung und Komplementaktivierung scheinen nötig zu sein, um eine Entzündung auszulösen⁴.

Typische Zeichen der charakteristischen Gelenkentzündungen der RA sind erhöhte Permeabilität der Gefäße, die Infiltration von Immunzellen in synoviales Gewebe, Hyperplasie der Synovialmembran und Pannusbildung^{3,4}.

Eine chronische Entzündung der Gelenke führt letztendlich zur Zerstörung des Knorpels und zur Erosion des Knochengewebes^{3,4}. Diese destruktiven Prozesse können bei fehlender Behandlung der RA zum vollständigen Verlust der Funktionsfähigkeit der Gelenke führen und geht mit starken Schmerzen einher^{3,4}.

Es gibt derzeit keine Möglichkeit die RA zu heilen. Therapeutische Interventionen umfassen vor allem Minderung der Symptome durch immunsupprimierende Behandlung aber auch spezifische Therapiestrategien wie der Einsatz von *Biologicals*, welche spezifisch gegen proinflammatorische Zytokin- und Rezeptorsignalwege oder Zellen des adaptiven Immunsystems gerichtet sind^{4,14,15}. Obwohl diese spezifischen Therapeutika die Behandlung der RA revolutionierten, sind sie in einem nicht unerheblichen Teil der RA-Patienten nur unzureichend oder gar nicht wirksam^{15,16}.

Um neue Therapieansätze zu entwickeln, ist es wichtig die zellulären und molekularen Vorgänge der RA Pathogenese insbesondere in den betroffenen synovialen Gelenken zu verstehen.

1.2 Architektur und zellulärer Aufbau synovialer Gelenke

Anatomisch unterscheidet man Gelenke in kontinuierliche Synarthrosen und diskontinuierliche Diarthrosen, welche auch als synoviale Gelenke bezeichnet werden ¹⁷. Im Gegensatz zu den kontinuierlichen Synarthrosen zeichnen sich die synovialen Gelenke durch einen Gelenkspalt zwischen den artikulierenden Skelettelementen aus, welcher mit Synovialflüssigkeit gefüllt ist ¹⁷. Weitere Merkmale der synovialen Gelenke sind hyaliner Knorpel, der die Gelenkflächen bedeckt, eine Gelenkkapsel, welche das gesamte Gelenk umschließt, die Bänder, welche die Kapsel stabilisieren und die Muskeln, welche die Bewegung ermöglichen ¹⁷.

Die Gelenkflüssigkeit ist ein visköses Transsudat aus Blut, Hyaluronsäure, Proteinen wie Lubricin und abgeschilferten Zellen ¹⁷. Die Funktionen der Gelenkflüssigkeit sind unter anderem Ernährung der Zellen des Gelenkes, Schmierung und Stoßabsorption ¹⁷.

Die Gelenkkapsel besteht aus zwei Schichten: eine äußere fibröse Schicht und eine innere synoviale Schicht ^{2,17}. Die synoviale Schicht kann weiterhin unterteilt werden in synoviale Intima und subsynoviales Interstitium ^{2,17}. Die synoviale Intima kleidet das Gewebe zum Gelenkspalt hin aus und besteht aus zwei Zelltypen, welche historisch als Typ A Synoviozyten und Typ B Synoviozyten bezeichnet werden ^{2,17}.

Die Typ A Synoviozyten sind synoviale Makrophagen und werden im weiteren Verlauf dieser Dissertationsschrift als „Lining-Makrophagen“ bezeichnet. Es wird angenommen, dass sie an der Beseitigung von Zelltrümmern und metabolischen Produkten der Chondrozyten beteiligt sind. Die Typ B Synoviozyten sind synoviale Fibroblasten ¹⁷. Zusammen bilden die beiden Zelltypen eine Grenzmembran zwischen Gelenkflüssigkeit und subsynovialen Interstitium ^{2,17}.

Im subsynovialen Interstitium befinden sich weitere Fibroblasten, Adipozyten, Mastzellen, Nozizeptoren und Mechanorezeptoren sowie eine große Anzahl von Blut- und Lymphgefäßen ^{2,17,18}.

Wie auch die synoviale Intima ist das subsynoviale interstitielle Gewebe von Makrophagen bevölkert ^{2,19}. Im Gegensatz dazu sind die Synovialflüssigkeit im Gelenkspalt und der

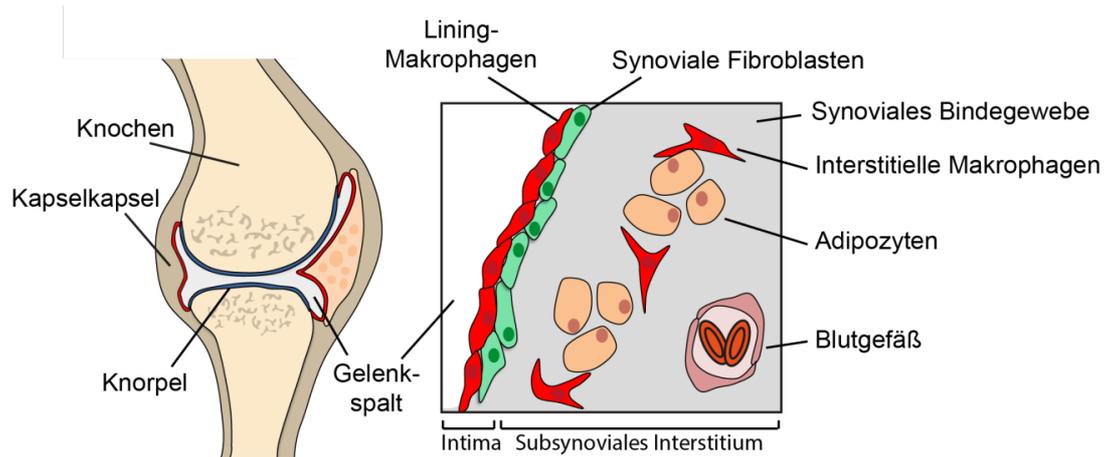


Abbildung 1 Aufbau eines gesunden synovialen Gelenkes

Synoviale Gelenke bestehen aus einer Gelenkkapsel, die die artikulierenden Skelettelemente umschließt. Die beweglichen Skelettelemente sind durch einen Gelenkspalt, welcher mit Synovialflüssigkeit gefüllt ist, voneinander getrennt. Die Gelenkoberflächen sind größtenteils mit Knorpel bedeckt. Das Synovialgewebe setzt sich aus Intima, welche das Gewebe zum Gelenkspalt hin auskleidet, und dem subsynovialen Interstitium zusammen. Die Intima wird durch die Lining-Makrophagen und synoviale Fibroblasten gebildet. Im subsynovialen Interstitium befinden sich weitere Zellen wie Adipozyten, interstitielle Makrophagen sowie Blut- und Lymphgefäß-bildende Endothelzellen. Modifiziert von ¹.

hyaline Knorpel frei von Immunzellen ^{2,18}. Obwohl synoviale Gelenke extremen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind und Knorpelgewebe große Mengen entzündungsfördernder metabolischer Produkte wie zum Beispiel Hyaluronsäure-Abbauprodukte freisetzt, kommt es nicht zu einer Aktivierung des Immunsystems ². Trotz der hohen Anzahl von Makrophagen scheinen synoviale Gelenke somit ein immunprivilegiertes Gewebe zu sein ².

Makrophagen werden dem angeborenen Immunsystem zugeschrieben und dem mononukleär-phagozytären System zugeordnet ²⁰.

1.3 Das mononukleär-phagozytäre System

Van Furth & Cohn etablierten 1968 das Modell des mononukleär-phagozytären Systems ²⁰. Dieses Modell geht davon aus, dass Zellen mit der Fähigkeit zur Phagozytose, wie zum Beispiel Makrophagen und dendritische Zellen, aus einer Population von proliferierenden Vorläuferzellen des Knochenmarks hervorgehen und zu Monozyten differenzieren ^{2,20}. Diese Monozyten zirkulieren im Gefäßsystem, migrieren in die verschiedenen Gewebe und differenzieren zu Gewebsmakrophagen.

Lange Zeit wurde also davon ausgegangen, dass die Populationen der Gewebsmakrophagen in gesundem und entzündetem Gewebe ihren Ursprung in aus dem Knochenmark stammenden Blutmonozyten haben.

Heute wissen wir, dass Makrophagen und Monozyten sehr heterogene und plastische Zellpopulationen sind, die ihren Ursprung nicht nur in der Hämatopoese des Knochenmarks haben².

1.3.1 Ontogenese von Monozyten und Gewebsmakrophagen

Monozyten des Blutes der Maus weisen verschiedene Phänotypen auf. Dabei unterscheidet man die inflammatorischen, „klassischen“ von den patrouillierenden „nicht-klassischen“ Monozyten^{2,21,22}. Die klassischen Monozyten zeichnen sich durch die hohe Expression von CCR2 (*C-C chemokine receptor type 2*) und Ly6C aus, entstehen aus Vorläuferzellen des Knochenmarkes und infiltrieren vor allem entzündete Gewebe²². Sowohl der Austritt aus dem Knochenmark als auch die Infiltration in entzündetes Gewebe ist CCR2-abhängig^{2,23,24}. Eine hohe Expression von CX₃CR1 auf der Zelloberfläche ist charakteristisch für die Ly6C^{low} „nicht-klassischen“ Monozyten²². Bisherige Befunde deuten darauf hin, dass sich im gesunden Zustand Ly6C^{high} Monozyten im Blut zu Ly6C^{low} Monozyten differenzieren, welche schließlich als „*blood-resident macrophages*“ durch das Gefäßsystem patrouillieren und die Integrität des Endothels überwachen^{2,22,25-27}.

Die unterschiedlichen Phänotypen der Monozyten der Maus finden sich auch in ähnlicher Weise im Blut des Menschen. Humane Monozyten des Blutes sind durch die Expression von CD14 gekennzeichnet und unterscheiden sich unter anderem durch die Expression von CD16 und die Sekretion inflammatorischer Zytokine in Antwort auf Stimulationen *in vitro*^{22,28}.

Unter physiologischen Bedingungen sind die Subpopulation der Monozyten in der Lage die Blutzirkulation zu verlassen und als potentielle Makrophagen-Vorläufer zu fungieren. Ebenso können sie ihre Funktion als migrierende Monozyten fortsetzen^{21,29-31}.

Ly6C^{high} Monozyten stellen tatsächlich eine wichtige Quelle von Makrophagen in Entzündungen dar. Jedoch darf nicht mehr davon ausgegangen werden, dass sich alle Makrophagen von diesen Monozyten ableiten und somit ihren Ursprung im Knochenmark haben^{32,33}.

Neue Techniken und Methoden, die es ermöglichen die Ontogenese gewebespezifischer Makrophagen-Populationen zu verfolgen, konnten demonstrieren, dass ein großer Anteil der Makrophagen in gesundem Gewebe nicht von Blutmonozyten abstammt. Vielmehr leiten sich die meisten Gewebsmakrophagen von embryonalen Vorläuferzellen ab^{2,33}.

Diese Vorläuferzellen besiedeln die sich entwickelnden Gewebe während der Embryogenese und der fötalen Entwicklung^{25,34-37}. Zu diesen geweberesidenten Makrophagen zählen unter anderem die Mikroglia des Gehirns, die Kupffer-Zellen der Leber, die Alveolarmakrophagen der Lunge und die Langerhans-Zellen der Epidermis^{2,32}. Geweberesidente Makrophagen haben die Fähigkeit sich selbst zu erneuern und erhalten somit den Makrophagen-Pool in den entsprechenden Geweben unabhängig von Monozyten des Blutes^{2,38}.

Die Hämatopoese während der embryonalen Entwicklung findet in drei sich überlappenden Wellen statt. Diese besitzen das Potential, Makrophagen-Vorläufer hervorzubringen, die sich schließlich zu Gewebsmakrophagen differenzieren können^{2,33,34}. Diese Wellen unterscheiden sich in anatomischer Lokalisation und Ursprungsgewebe^{2,33}. Die ersten primitiven myeloiden Vorläufer mit eingeschränktem Differenzierungspotential erscheinen in den sogenannten *blood islands* des extraembryonalen Dottersacks ungefähr am Tag 7 der Embryogenese der Maus^{33,39}. Eine zweite Welle von erythro-myeloiden Vorläuferzellen (EMPs), welche zwischen Tag 8,25 und 10,5 der Embryogenese entstehen, haben ihren Ursprung im hämogenen Endothel des Dottersacks und expandieren in der fötalen Leber^{33,40}. Die dritte Welle von hämatopoetischen Vorläufern stellen schließlich hämatopoetische Stammzellen dar, welche von der aorto-gonadalen-mesonephrischen Region (AGM-Region) abgeleitet sind^{33,41,42}. Diese hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSCs) entstehen zwischen Tag 9,5 und 12,5 der Embryogenese und haben die Fähigkeit in die erythroide, myeloide oder lymphoide Linie zu differenzieren³³. Die HSCs besiedeln die fötale Leber^{33,43}, in der sie mit den erythro-myeloiden Vorläufern (EMPs) des Dottersacks koexistieren. Ungefähr an Tag 15,0 der Embryogenese bevölkern die HSCs schließlich das Knochenmark^{33,44}.

Die primitiven myeloiden Vorläufer des Dottersacks sind die Hauptquelle von adulten Mikroglia^{2,35}. Ausgehend von einem proliferierenden residenten Pool von Zellen sind Mikroglia in der Lage sich selbst zu erneuern und halten somit ihre Anzahl im Gewebe unabhängig von der Hämatopoese des Knochenmarks aufrecht^{35,45}.

Andere residente Gewebsmakrophagen wie epidermale Langerhans-Zellen haben ihren Ursprung hauptsächlich in den Populationen der EMPs und HSCs der fötalen Leber und

weniger in den frühen Vorläufern des Dottersacks. Im Fall der Langerhans-Zellen tragen somit alle drei Wellen der embryonalen Hämatopoese zum adulten Pool bei⁴⁶. Die meisten anderen geweberesidenten Makrophagen wie Kupffer-Zellen oder Alveolarmakrophagen entstehen vornehmlich aus fötalen HSCs oder fötalen Monozyten^{47,48}.

Der fötale und postnatale Beitrag am Pool der adulten Gewebsmakrophagen variiert zwischen den Organen und kann sich während des Alterungsprozesses auch verschieben.

Anteile von Fötus-abgeleiteten Gewebsmakrophagen von Herz, Lunge und Milz werden mit der Zeit durch Makrophagen, die aus dem Knochenmark stammen, ersetzt und nehmen den für die spezifischen Gewebsmakrophagen charakteristischen Phänotypen an^{2,34,49,50}.

Einzelne Organe können verschiedene Makrophagen-Populationen beherbergen, die sich in Phänotyp, Funktion und Ursprung unterscheiden².

Diese Situation wurde zum Beispiel in der Lunge beschrieben. Die Lunge enthält die Alveolarmakrophagen, welche von fötalen Vorläuferzellen abstammen sowie zwei verschiedene Subtypen von interstitiellen Makrophagen, die entweder mit Neuronen oder Gefäßen assoziiert sind. Beide interstitiellen Subtypen werden permanent durch Ly6C^{high} Blutmonozyten ersetzt^{2,25,49}.

Im Dünndarm werden CX₃CR1⁺ Makrophagen kontinuierlich durch infiltrierende Ly6C^{high} Monozyten ersetzt. Zusätzlich gibt es dort interstitielle Makrophagen, die um Neurone und die Gefäße der Mukosa lokalisiert sind, einen embryonalen Ursprung haben und sich unabhängig von Blutmonozyten selbst erneuern^{2,51,52}.

Auch im Hoden gibt es verschiedene Subtypen von Makrophagen. Die interstitiellen Makrophagen gehen aus embryonalen Vorläufern hervor. Peritubuläre Makrophagen des Hodens hingegen entstehen erst postnatal ausschließlich aus Vorläufern des Knochenmarkes⁵³.

Die multinukleären knochenresorbierenden Osteoklasten haben ihren Ursprung ebenfalls in EMPs. Die Besonderheit dieser Zellen besteht darin, dass langlebige Osteoklasten mit Blutmonozyten fusionieren und somit ein vielkerniges Synzytium bilden^{2,54}.

Viele der Gewebsmakrophagen etablieren sich also schon während der Embryogenese und sind in der Lage ihren Zell-Pool unabhängig von der Hämatopoese des Knochenmarks auch im adulten Organismus aufrechtzuerhalten.

Es ist jedoch weiterhin nicht vollständig geklärt, ob diese Makrophagen einfach sehr langlebig sind, im Gewebe proliferieren oder aus einer kleinen gewebsständigen Population von Makrophagen-Vorläufern heraus differenzieren^{2,55-58}.

Im Falle einer Entzündung oder Infektion kann ein Verlust oder erhöhter Bedarf von Gewebsmakrophagen entstehen, welcher durch Monozyten aus dem Knochenmark kompensiert wird ^{59,60}.

1.3.2 Funktion und Polarisation von Gewebsmakrophagen

Makrophagen wurden erstmals von Élie Metchnikoff im Jahr 1884 beschrieben und nach ihrer charakteristischen Fähigkeit zur Phagozytose benannt ^{61,62}.

Heute wissen wir, dass Makrophagen als Immunzellen eine wichtige Rolle im komplexen Verteidigungssystem gegen pathogene Mikroorganismen spielen. Zusätzlich stellen sie unverzichtbare Akteure bei der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase und dem Remodeling nach Gewebsschädigung dar ^{2,63,64}.

Um diese Aufgaben zu erfüllen, besiedeln Makrophagen nahezu jedes Gewebe und sind spezialisiert in Pathogenerkennung, Zytokinproduktion und der Fähigkeit der Phagozytose ^{63,64}.

Als Teil des angeborenen Immunsystems gehören Makrophagen zur ersten Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene, stellen jedoch auch die Verbindung zum angeborenen und adaptiven Immunsystem her, welches eine spezifische Abwehr und Langzeitschutz ermöglicht ^{2,63,64}.

Makrophagen sind jedoch auch in der Lage die Immunantworten des adaptiven Immunsystems zu regulieren und spielen auf diese Weise eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und der Verhinderung chronischer Entzündung.

Die funktionellen Phänotypen von Makrophagen sind vielfältig. So konnten *in vitro*-Studien, die sich mit der Reaktion von Makrophagen auf verschiedene Stimuli befassten, zeigen, dass Makrophagen verschiedene Phänotypen der Polarisation annehmen können. Gut charakterisierte Stimuli sind unter anderem Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) wie Lipopolysaccharide (LPS) oder Zytokine wie Gamma-Interferon oder Interleukin-4 (IL-4). Die verschiedenen Möglichkeiten der Makrophagen-Polarisation sind durch unterschiedliche Genexpressionsmuster von Zytokinen, Transkriptionsfaktoren und metabolischen Signaturen gekennzeichnet ^{2,65-67}.

Hierbei nehmen Makrophagen, die mit LPS und Gamma-Interferon stimuliert wurden, einen proinflammatorischen Phänotyp an und werden als „M1“ Makrophagen beschrieben. Diese M1 Makrophagen sind durch die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen, hohe glykolytische Aktivität und die Expression von Enzymen wie der NO Synthase charakterisiert ^{2,65,66}.

Diese proinflammatorischen Makrophagen sind an der Immunantwort gegen extra- und intrazelluläre Pathogene beteiligt und werden mit der Ausbildung und Verstärkung von Entzündungen bei Autoimmunerkrankungen wie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen oder rheumatoider Arthritis in Zusammenhang gebracht ^{2,65,67}.

Im Gegensatz zum M1 Status nehmen Makrophagen, die mit IL-4, Interleukin-13 (IL-13) oder Interleukin-10 (IL-10) stimuliert werden, einen anti-inflammatorischen Phänotyp an und werden als „M2“ oder alternativ aktivierte Makrophagen bezeichnet, welche durch eine erhöhte Expression von sogenannten „Scavenger-Rezeptoren“ wie CD163, Oberflächenmolekülen wie CD206, eine verstärkte phagozytische Aktivität und verminderte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen charakterisiert sind ^{2,65,67}. M2 Makrophagen sind zudem durch vermehrte oxidative Phosphorylierung und die Produktion des Enzyms Arginase-1 (Arg1) definiert ^{2,65}. Zusätzlich spielen M2 Makrophagen eine Rolle bei der Resolution von Entzündungen, dem Remodeling und der Reparatur von Gewebe ^{2,65}. Alternativ aktivierte Makrophagen sind in der Immunantwort gegen Parasiten involviert, tragen jedoch auch zur Entwicklung von allergischen Reaktionen bei ^{2,65,67}.

Die Kategorisierung in M1 und M2 basiert vor allem auf Beobachtungen von Zellkultur-Phänomenen. Die tatsächlichen funktionellen Eigenschaften *in vivo* werden durch dieses dichotome Modell jedoch nur bedingt abgebildet.

Der funktionelle Phänotyp von Gewebsmakrophagen hängt stark von der Organfunktion und anatomischen Lokalisation ab ⁶³. Dabei können Makrophagen ein integraler Teil einer spezifischen physiologischen Organfunktion sein oder akzessorische Funktionen ausüben, die die Arbeitsfähigkeit eines Gewebes ermöglichen ⁶³. In beiden Fällen benötigen Makrophagen Stimuli, welche durch das Gewebe bereitgestellt werden, durch Sensoren und Rezeptoren erkannt werden und schließlich über Transkriptionsfaktoren ein spezifisches transkriptionelles Profil und charakteristische epigenetische Landschaften erhalten ^{63,68,69}.

So ist zum Beispiel die Hauptaufgabe der roten Pulpa der Milz die Entfernung von seneszenten Erythrozyten aus dem Blut und das damit zusammenhängende Recycling von Häm und Eisen. Diese spezielle Aufgabe wird von den Makrophagen ausgeführt und das Fehlen des Transkriptionsfaktors Spi-C, welcher für die Differenzierung dieser Zellen nötig ist, führt zu einer Eisenüberladung in der roten Pulpa. Der Häm Sensor ist Bach1, welcher gleichzeitig ein transkriptioneller Repressor von *Spic* ist ^{2,63,70,71}.

Alveolarmakrophagen spielen eine essentielle akzessorische Rolle in der Lunge, um deren Funktion zu gewährleisten ^{2,63}. Um einen Kollaps der Alveolen zu verhindern, produzieren Typ-II-Pneumozyten Surfactant (*surface active agent*), welches hauptsächlich

aus Lipiden, Proteinen und Kalzium besteht⁶³. Die Differenzierung und Funktion der Alveolarmakrophagen ist abhängig von GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), welcher wiederum den Lipid-Sensor PPAR γ induziert^{2,63,72}.

Residente Makrophagen des Peritoneums exprimieren den Transkriptionsfaktor GATA6, welcher bei Stimulation mit Retinsäure die Differenzierung und Selbsterneuerung der peritonealen Makrophagen kontrolliert^{69,73}.

Der essentielle Einfluss der vom Gewebe bereitgestellten Faktoren auf die Makrophagen-Differenzierung und –Funktion wird auch bei Osteoklasten oder Mikroglia deutlich. Osteoklasten benötigen das von Osteoblasten und Osteozyten produzierte RANKL (*Receptor Activator of NF- κ B Ligand*), um zu differenzieren und zu fusionieren^{2,74}. Mikroglia wiederum sind abhängig von TGF β , welches durch das zentrale Nervensystem bereitgestellt wird^{2,63,75}.

Wie wichtig das Mikroumfeld für den Phänotyp der Gewebemakrophagen ist, konnte auch in Experimenten gezeigt werden, in denen Makrophagen eines frühen Differenzierungsstadiums (embryonale Makrophagen und Knochenmarksmakrophagen) in adulte Gewebe transferiert wurden^{2,76}. Auf diese Weise konnte demonstriert werden, dass das transkriptionelle Profil und der Phänotyp der transferierten Makrophagen vom Mikroumfeld der Gewebe abhängig ist^{2,76}.

Die Anwendung des M1/M2 Konzeptes auf Gewebemakrophagen *in vivo* anhand von bekannten Markern wie iNOS (M1), Arg1 (M2) oder entsprechender Oberflächenmoleküle ist oft nicht möglich, da sich die Expressionsprofile der Makrophagen *in vivo* von denen kultivierter Makrophagen mitunter stark unterscheiden².

1.3.3 Die Rolle von Makrophagen in Rheumatoider Arthritis

Im Zuge einer Gelenksentzündung während der RA kommt es zu einer Verdickung der synovialen Intima durch die Expansion von synovialen Makrophagen und Fibroblasten aber auch durch die Infiltration von Immunzellen. Sowohl Makrophagen als auch Fibroblasten produzieren entzündungsfördernde Zytokine sowie Chemokine, Matrix-degradierende Enzyme wie MMPs, Leukotriene und Prostaglandine^{3,4}.

Synoviale Fibroblasten nehmen einen invasiven Phänotyp an und spielen neben den knochenabbauenden Osteoklasten eine wesentliche Rolle bei der Entzündung und der Zerstörung von Knorpel und Knochen des Gelenks^{2-4,77}.

Auch T und B-Zellen sowie Mastzellen werden in großer Zahl in entzündetem Synovialgewebe gefunden²⁻⁴.

Die funktionelle Rolle von Makrophagen-Subtypen in der Entstehung und Entwicklung der RA ist weiterhin unvollständig verstanden. Die Anzahl der Makrophagen im entzündeten

Synovialgewebe korreliert mit dem Grad der Gelenkerosion und radiographischem Fortschreiten der Gelenkzerstörung während der RA⁷⁸⁻⁸⁰.

Studien in denen CD14⁺ Blutmonozyten markiert wurden, konnten zeigen, dass Monozyten das Synovialgewebe von RA-Patienten kontinuierlich infiltrieren⁸¹.

Vor allem MHCII⁺ Makrophagen sind im interstitiellen Synovialgewebe und der synovialen Intima in großer Anzahl zu finden⁸². Da MHCII Moleküle eine Schnittstelle zum adaptiven Immunsystem darstellen, könnten synoviale Makrophagen als Antigen-präsentierende Zellen an der Rekrutierung und Aktivierung autoreaktiver T-Zellen beteiligt sein^{67,83-85}.

Aktivierte Makrophagen in Synovialgewebe von RA-Patienten produzieren pro-inflammatorische Zytokine wie den Tumornekrose-Faktor alpha (TNF α), Interleukin -6 (IL-6) und IL-1 sowie Chemokine wie CCL2 und CXCL8^{2,86-88}.

Da Monozyten und Makrophagen das entzündete Synovialgewebe massiv infiltrieren und als Hauptproduzenten inflammatorischer Mediatoren gelten, wurden sie Ziel einer Vielzahl therapeutischer Interventionsstrategien, welche Depletionen oder Inhibierung der Zellen aber auch die Inaktivierung ihrer Entzündungsmediatoren einschlossen⁶⁷.

So konnte die Entwicklung von TNF-Blockern die symptomatische Behandlung von rheumatoider Arthritis revolutionieren und zählt seit über 20 Jahren zu den erfolgreichsten Therapeutika der Behandlung der RA^{2,83}.

Neben der Zytokinproduktion sind synoviale Makrophagen auch durch Bildung von Stickstoff-Intermediaten, Matrix-degradierenden Enzymen und als Quelle von reaktiven Sauerstoff-Spezies an der Manifestation der Entzündung und der damit verbundenen Gewebeerstörung beteiligt^{2,89,90}.

Hypervaskularisation des Synovialewebes ist ein Kennzeichen von RA und wird im Zuge der Diagnostik untersucht. Makrophagen produzieren das pro-angiogene VEGF und können somit zur gesteigerten Blutgefäßbildung beitragen^{2,91}.

Da Makrophagen bereits in gesundem Synovialgewebe vorhanden sind, wird angenommen, dass Makrophagen nicht nur bei der Progression der Arthritis eine Rolle spielen, sondern auch bei Initiation der Erkrankung. So produzieren synoviale Makrophagen in sehr frühen Stadien der RA vorübergehend Chemokine wie CXCL4 und CXCL7^{2,92}.

Die funktionelle Heterogenität der Makrophagen-Populationen rückt verstärkt in den Fokus der Forschung. Eine Studie, die Einzelzell-Sequenzierung und Massen-Zytometrie von Subpopulationen von Monozyten und Makrophagen aus humanem Synovialgewebe von RA und Osteoarthritis (OA) -Patienten durchführte, identifizierte vier verschiedene Subpopulation^{2,93,94}.

Identifiziert wurden eine pro-inflammatorische IL-1 β ⁺ HBEGF⁺ Population, eine NUPR1⁺ Population, welche im Synovialgewebe der OA Patienten vorherrschte, ein Cluster von Zellen, welche unter anderem durch die Expression des Komplementfaktors C1QA charakterisiert wurde, sowie eine Population SPP1⁺ Interferon-aktivierter Monozyten. Die IL-1 β ⁺ HBEGF⁺ pro-inflammatorischen Makrophagen interagieren mit synovialen Fibroblasten und fördern die invasiven und destruktiven Eigenschaften dieser Zellen ⁹⁴.

Eine Vielzahl tierexperimenteller Studien versuchte die funktionelle Rolle von Monozyten und Makrophagen zu entschlüsseln. Dabei wurde vor allem die entzündungsfördernde Rolle der Monozyten und Makrophagen bestätigt.

Frühe Studien, welche die Rolle von Makrophagen in Mausmodellen für Arthritis untersuchten, vernachlässigten dabei die Heterogenität der Makrophagen. Eine weit verbreitete Methode zur Depletion von Makrophagen ist die Anwendung von Clodronat-Liposomen. Systemisch verabreichtes Clodronat depletiert unter anderem die Makrophagen des Knochenmarks, der Milz und die Monozyten des Blutes ^{95,96}.

Clodronat behandelte Mäuse sind vor K/BxN Serumtransfer-Arthritis geschützt ⁹⁷. Die anti-inflammatorischen Effekte der Clodronat-Behandlung wurden unter anderem der Depletion der Ly6C^{low} Monozyten zugeschrieben, welche eine essentielle Rolle bei der Initiation der Antikörper-vermittelten Entzündung zu spielen scheinen ⁹⁵.

NR4a1-Knockout-Mäuse, denen die nichtklassischen Monozyten im Blut fehlen, entwickeln hingegen massive Entzündungen im K/BxN Serumtransfer-Modell und konnten die Funktion als Initiatoren der Entzündung nicht bestätigen ⁹⁸.

Die Selektivität von Clodronat-Liposomen muss zudem infrage gestellt werden, da die Liposomen auch von anderen Zellen wie Neutrophile Granulozyten aufgenommen werden können und deren Funktionen beeinflussen (unveröffentlichte eigene Daten).

Die Depletion von Ly6C^{high} Monozyten mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen CCR2 gerichtet ist, konnte die Entzündung im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis vermindern ⁹⁹. Auch die Blockade von CCR2 hat protektive Effekte ¹⁰⁰. Mutante Mäuse ohne CCR2 zeigen Resistenz gegen Antigen-induzierte Arthritis ¹⁰¹.

Im Gegensatz dazu weisen CCR2-Knockout-Mäuse einen zu Wildtypen vergleichbaren Verlauf der K/BxN Serumtransfer-Arthritis und sogar eine Exazerbation in der Kollagen-induzierten Arthritis auf ^{95,102}.

Diese gegensätzlichen Ergebnisse werden mitunter auf die unterschiedliche Pathogenese der verschiedenen Mausmodelle zurückgeführt, wobei Monozyten in den einzelnen Modellen unterschiedliche Funktionen ausüben könnten ². Kollagen-induzierte Arthritis und Antigen-induzierte Arthritis sind abhängig von Antigen-Präsentation und T-Zell-

Aktivierung². Das K/BxN Serumtransfermodell wird durch arthritogene Antikörper ausgelöst und ist T-Zell unabhängig. Dieses passive Modell spiegelt die Antikörpervermittelte Effektorphase der RA wieder^{103,104}.

Auch CCR2-Effekte die unabhängig von Monozyten sind, könnten die Diskrepanzen zwischen den Studien erklären, da CCR2 auf einer Vielzahl von Immunzellen exprimiert wird. CCR2 blockierende Antikörper-Behandlung in Patienten führte nicht zu einer Linderung der Erkrankung¹⁰⁵.

Eine proinflammatorische Rolle von Monozyten und Makrophagen in Kollagen-induzierter Arthritis konnte in Mäusen gezeigt werden, die transgen für eine LysM-cre Rekombinase und den chimären „Todesrezeptor“ *human/mouse death receptor 5* waren^{67,106}. In diesem System gingen vor allem Ly6C^{high} Monozyten und interstitielle synoviale Makrophagen in Apoptose. Eine reduzierte Expression von entzündungsfördernden Zytokinen wie TNF α , IL-6, IL-17 und IL-23 konnte dabei beobachtet werden^{67,106}.

Die differenzielle Rolle von residenten synovialen Makrophagen gegenüber infiltrierenden Monozyten wurde mit Knochenmarkschimären im K/BxN Serumtransfermodell untersucht⁹⁵.

Bei diesen Chimären handelte es sich zum einen um transgene Mäuse die den humanen Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) in CD11b⁺ Zellen exprimierten und ein wildtypisches Knochenmark besaßen. Mittels lokaler Diphtherietoxin (DT) Injektion konnten somit CD11b⁺ residente Zellen selektiv depletiert werden⁹⁵.

Zum anderen wurden Chimären generiert, welche den CD11b-abhängigen DTR nur in Knochenmarkszellen exprimierten. Dadurch konnten unter anderem CD11b⁺ Monozyten des Blutes depletiert werden ohne die Gewebsmakrophagen zu verlieren⁹⁵.

Die Ergebnisse dieser aufwändigen Experimente legen nahe, dass CD11b-exprimierende Gewebsmakrophagen der Initiation der Entzündung entgegenwirkten⁹⁵. Infiltrierende Monozyten hingegen fördern die Entzündung in der frühen Phase der Erkrankung⁹⁵. Wurden die infiltrierenden Makrophagen erst nach Manifestation der Entzündung depletiert, kam es zu einer verzögerten Remission⁹⁵.

2. Zielstellung der Dissertation

Mit dem Wissen, dass Makrophagen bezüglich Ontogenese, Differenzierung, Polarisation und Funktion eine sehr diverse und plastische Zellpopulation darstellen, sollte die vorliegende Dissertation folgende grundlegende Fragestellungen zur Biologie synovialer Makrophagen adressieren:

- Wie ist die mikroanatomische Verteilung von Makrophagensubtypen im gesunden und entzündeten synovialen Gelenk?
- Was ist der Ursprung synovialer Makrophagen und wie erfolgt die Aufrechterhaltung der Populationen in der adulten Maus?
- Welche Subpopulation befinden sich im gesunden und entzündeten Synovialgewebe und wie sehen deren Transkriptionsprofile aus?
- Welche funktionelle Rolle spielen Makrophagen im gesunden und entzündeten Gelenk?

Bei der Beantwortung dieser Fragen sollten unter anderem neueste Techniken der Bildgebung wie die dreidimensionale Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie, hochauflösende konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie, longitudinale Magnetresonanztomographie, Transmissionselektronenmikroskopie, Sequenzierungstechniken wie der Einzelzell-RNA-Sequenzierung sowie eine Vielzahl muriner Reporter- und Depletionssysteme zum Einsatz kommen.

Experimentelle Mausmodelle für Arthritis wie das K/BxN Serumtransfermodell und die Kollagen-induzierte Arthritis sollten genutzt werden, um Gelenkentzündungen zu induzieren, welche denen der rheumatoiden Arthritis entsprechen.

Die Integration dieser Vielfalt an Methoden sollte ein umfassendes Bild über die räumlich-zeitliche Verteilung, die Herkunft, Differenzierung und Funktion von Makrophagen-Subpopulationen im gesunden und erkrankten Gelenk erstellen.

Die spezifischen Fragestellungen dieser Dissertation sollen dabei nicht nur das grundlegende Verständnis über synoviale Makrophagen im Speziellen und über Gewebemakrophagen im Allgemeinen erweitern, sondern vor allem neue Ansätze für Strategien zur Behandlung und Heilung chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis ermöglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Räumliche und zeitliche Charakterisierung der synovialen Lining-Makrophagen in gesundem und entzündetem Zustand

3.1.1 *Synoviale Lining-Makrophagen bilden eine Grenzmembran zwischen Gelenkflüssigkeit und Synovialgewebe*

Die mikroanatomische Organisation von synovialen Makrophagen war nur unzureichend bekannt. *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Reporter-Mäuse wurden verwendet, um die generelle Verteilung von Makrophagen im synovialen Gelenk zu charakterisieren.

Diese Mäuse exprimieren eine cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Cx3cr1*-Promotors und besitzen eine loxP-flankierte STOP-Kassette, welche die Transkription des Fluoreszenzproteins tdTomato blockiert¹⁰⁷. Das tdTomato-Transgen besitzt einen CAG Promotor und befindet sich im Gt(ROSA)26Sor Locus. CX₃CR1 ist ein Chemokin-Rezeptor, der vor allem in Zellen des mononukleär-phagozytären Systems exprimiert wird²⁵.

Die Aktivierung des *Cx3cr1*-Promotors führt in den *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Reporter-Mäusen zur Expression der cre-Rekombinase, welche wiederum die STOP-Kassette entfernt und somit die Expression des tdTomato-Fluoreszenzproteins ermöglicht. Mit diesem System ist es möglich alle Zellen zu identifizieren, die während ihrer Entwicklung das CX₃CR1 exprimiert haben.

Optisches „Clearing“ und dreidimensionale Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie (LSFM) sowie konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie von Kniegelenken der *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäuse zeigten eine hohe tdTomato-Expression in Zellen des Knochenmarks, welche vor allem Osteoklasten und Knochenmarksmakrophagen waren (Abbildung 2a).

Zusätzlich wird eine dichte Membran bestehend aus tdTomato⁺ synovialen Lining-Makrophagen als oberste Grenzschicht auf dem synovialen Gewebe sichtbar (Abbildung 2a).

Die 3D-Analysen der Gelenke der *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäuse zeigten, dass die Lining-Makrophagen eine Art physikalische Barriere bildeten, welche die Flüssigkeit des Gelenkspalts vom umgebenen Synovialgewebe trennte (Abbildung 2b).

LSFM Bilder von *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäusen, denen eine Fluorophor-gekoppelter Antikörper gegen den Endothelmarker CD31 intravenös verabreicht wurde, illustrieren die umfassende Vaskularisation des Synovialgewebes (Abbildung 2c).

Dabei befinden sich Blutgefäße in direkter Nähe der Lining-Makrophagen ohne deren Membran zu durchdringen.

Immunfluoreszenzmikroskopie von Gewebeschnitten der Synovialmembranen bestätigte den Makrophagen-Charakter der Zellen durch Expression der Makrophagen-Marker F4/80 und CD68 (Abbildung 2d).

Mit Hilfe der *Col1A1^{cre}:R26-tdTomato*-Reportermause, welche das tdTomato unter anderem in Fibroblasten exprimieren, konnte gezeigt werden, dass sich die Lining-Makrophagen direkt auf den synovialen Fibroblasten (Typ B Synoviozyten) befinden (Abbildung 2d).

Durch Verwendung der heterozygoten, transgenen *Cx3cr1^{gfp}*-Reportermaus¹⁰⁸ konnte gezeigt werden, dass synoviale Lining-Makrophagen ständig CX₃CR1 exprimieren und ungefähr 40% aller Gelenksmakrophagen ausmachen (Abbildung 2d, e).

Das GFP ist direkt in den Locus des natürlichen CX₃CR1 integriert und fungiert unter homozygoten Bedingungen als Knockout. Anders als die *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäuse können bei der *Cx3cr1^{gfp}*-Reportermaus nicht Zellen identifiziert werden, die das CX₃CR1 während ihrer Ontogenese exprimierten und die Expression in der späteren Entwicklung einstellten. In den *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato* Mäusen konnten so zusätzlich auch interstitielle Makrophagen gefunden werden, die das CX₃CR1 nicht mehr exprimierten.

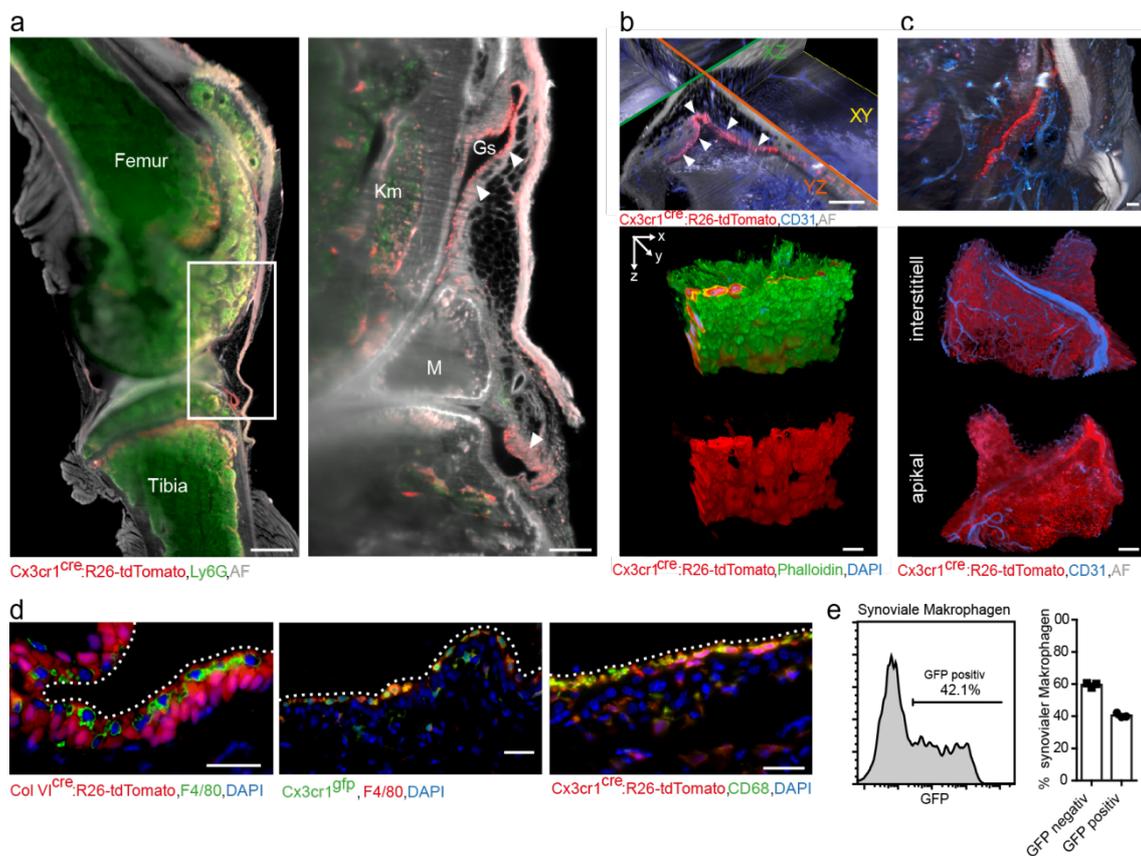


Abbildung 2 CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen bilden eine dichte Membran als oberste Schicht des Synovialgewebes

(a) 3D-Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie (LSFM) von gesunden Kniegelenken der *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato* Mäuse zeigt die räumliche Verteilung der tdTomato⁺ Zellen (rot) und anti-Ly6G markierter Neutrophiler (grün); AF: Autofluoreszenz. Pfeile sind auf tdTomato⁺ Lining-Makrophagen gerichtet. Gs: Gelenkspalt; Km: Knochenmark, M: Meniskus. Größenbalken: 500µm (links) und 100µm (rechts).

(b) Oben: LSFM Analyse der dreidimensionalen Ausdehnung der Schicht der Lining-Makrophagen (tdTomato⁺, rot) des Synovialgewebes eines Kniegelenks der *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäuse. Größenbalken, 100µm. Unten: Hochauflösende 3D-Rekonstruktion von CLSM Daten der Membran der Lining-Makrophagen von Synovialgewebe eines Kniegelenks der *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäuse (tdTomato, rot, Phalloidin, grün, DAPI, blau). Größenbalken, 10µm.

(c) Oben: 3D-Rekonstruktion von LSFM Aufnahmen der Kniegelenke von *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäusen (tdTomato, rot), denen anti-CD31 Antikörper (blau) zur Darstellung des Gefäßsystems injiziert wurde. Größenbalken, 100µm. Unten: 3D-Rekonstruktion des Gefäßsystems (blau) mit Blick auf die apikale bzw. interstitielle Seite der Schicht der Lining-Makrophagen (tdTomato, rot). Größenbalken 100µm.

(d) Links: Bright-field-Fluoreszenzmikroskopie (BFM) der Synovialmembran der Kniegelenke von *Col1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäusen zeigt tdTomato-exprimierende synoviale Fibroblasten (tdTomato, rot), die eine zweite Schicht unterhalb der Lining-Makrophagen (F4/80, grün) bilden. Mitte: BFM von Synovialgewebe der Kniegelenke von *Cx3cr1^{GFP}*-Mäusen zeigt GFP-Expression in synovialen Lining-Makrophagen (F4/80, grün). Rechts: BFM von Synovialgewebe von Kniegelenken von *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäusen mit tdTomato-exprimierenden (tdTomato, rot) Lining- und interstitiellen Makrophagen (CD68, grün).

(e) Durchflusszytometrische Analyse von synovialen Makrophagen von dissoziierten Hinterpfoten von *Cx3cr1^{GFP}*-Mäusen. Die Makrophagen wurden als CD45⁺, CD11b⁺ und F4/80⁺ definiert. Die Expression von GFP unterscheidet die Lining-Makrophagen von den interstitiellen Makrophagen. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

3.1.2 Disruption und Reorganisation der CX₃CR1⁺ Makrophagen-Membran bei Antikörper-induzierter Arthritis

Das K/BxN Serumtransfermodell als Modell für experimentelle Arthritis bei Mäusen wurde verwendet, um die Veränderungen der membranbildenden CX₃CR1⁺ Makrophagen im Kontext einer Gelenkentzündung zu untersuchen. In diesem Krankheitsmodell wird Serum von K/BxN Mäusen, welche spontan eine Polyarthritis entwickeln, intraperitoneal in gesunde Mäuse injiziert¹⁰³.

Das Serum der K/BxN Mäuse enthält arthritogene Antikörper gegen die ubiquitär exprimierte Glukose-6-Phosphat-Isomerase¹⁰³. Der Transfer dieser Antikörper löst massive Entzündungen in den Gelenken der Tiere aus und ähnelt der Effektorphase der humanen rheumatoiden Arthritis bezüglich Infiltration von Immunzellen, Gelenks- und Knorpelzerstörung sowie Knochenerosion.

Um Veränderungen der synovialen Makrophagen-Membran während einer Antikörper-vermittelten Gelenkentzündung zu untersuchen, wurden Kniegelenke von *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäusen in gesundem Zustand und an Tag 2 und Tag 7 nach Injektion des K/BxN Serums mittel Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie (LSFM, Abbildung 3a), Bright-field-Fluoreszenzmikroskopie (BFM, Abbildung 3b) und konfokaler Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie (CLSM) analysiert (Abbildung 4).

Für die LSFM wurde den Tieren vor Präparation der Kniegelenke ein Fluorophor-konjugierter Antikörper gegen den Neutrophilen-Marker Ly6G intravenös gespritzt.

Sowohl mit LSFM am intakten, transparenten Knie als auch mit BFM und CLSM von Gewebeschnitten der Synovialmembranen konnten umfassenden dynamische Änderungen bezüglich der Dichte der Makrophagen-Membran als auch der Morphologie der Makrophagen festgestellt werden.

Bei gesunden Tieren bildet die Makrophagen-Membran eine dünne, zumeist einzellige flache Schicht, welche die Synovialflüssigkeit von synovialen Fibroblasten und interstitiellem Gewebe trennt. Bei Induktion der Arthritis (Tag 2) verliert die CX₃CR1⁺ Makrophagen-Membran die engen Bindungen der Makrophagen untereinander und es entstehen Lücken zwischen den Makrophagen. Neutrophile Granulozyten, welche große Mengen von DNA durch NETose (Freisetzung von *neutrophil extracellular traps*) freisetzen, und Monozyten infiltrierten den Gelenkspalt. Schon zeitig nach Induktion der Arthritis wiesen phagozytierende Lining-Makrophagen einen hohen Gehalt an Lysosomen auf, welche sowohl DNA als auch Membranbestandteile (Ly6G⁺) von Neutrophilen enthielten.

Bei ausgeprägter Entzündung (Tag 7) verdichtete sich die Membran aus CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen wieder. Allerdings veränderte sich die Morphologie der Makrophagen hin zu einem Pallisaden-ähnlichen Phänotyp, der sich senkrecht zur Synovialmembran ausrichtete.

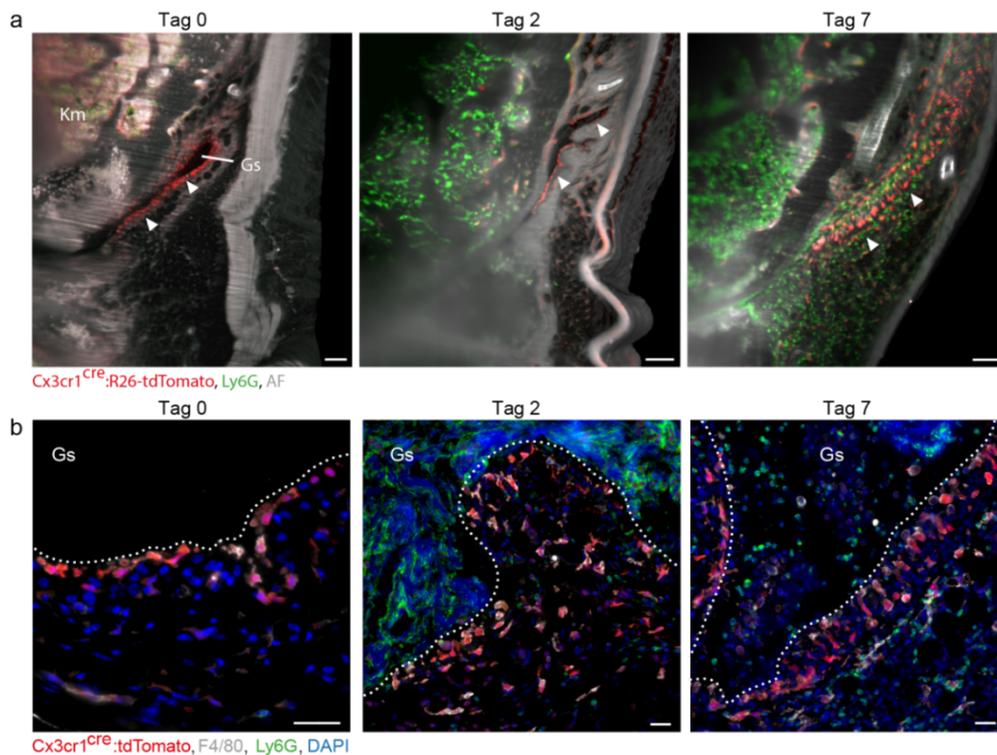


Abbildung 3 Dynamische Veränderung der synovialen Makrophagenmembran während Antikörper-induzierter Arthritis

(a) Repräsentative LSFM Aufnahmen von Kniegelenken der *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäuse (tdTomato, rot) in gesundem Zustand und an Tag 2 und Tag 7 nach K/BxN Serumtransfer. Den Tieren wurden Fluorophor-gekoppelte Anti-Ly6G Antikörper (grün) intravenös verabreicht. Die Pfeile markieren die Schicht aus Lining-Makrophagen. Km: Knochenmark, Gs: Gelenkspalt. Größenbalken, 100 µm.

(b) Repräsentative BFM Aufnahmen der Synovialmembran von Kniegelenken der *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäuse in gesundem Zustand und an Tag 2 und Tag 4 nach Induktion der Arthritis. Makrophagen wurden mit Anti-F4/80 Antikörper (weiß) und Neutrophile mit Anti-Ly6G Antikörper (grün) markiert. DAPI (blau) färbt Zellkerne und NETs (*neutrophil extracellular traps*). Gs: Gelenkspalt. Größenbalken, 25µm. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

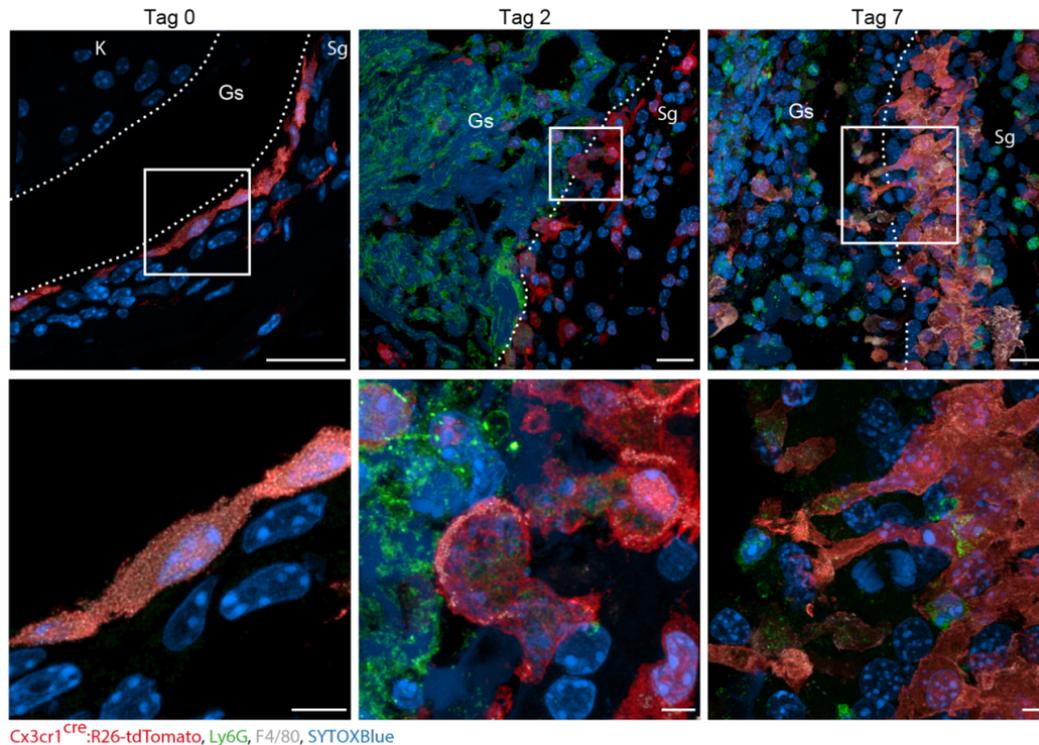


Abbildung 4 Hochauflösende konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie der CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen während Antikörper-induzierter Arthritis

Repräsentative Aufnahmen eines konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskops (CLSM) von synovialen Lining-Makrophagen (F4/80, weiß) der Kniegelenke der *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäuse (tdTomato, rot) in gesundem Zustand (Tag 0) und an Tag 2 und Tag 7 nach K/BxN Serumtransfer. Neutrophile Granulozyten wurden mit Anti-Ly6G Antikörper (grün) gefärbt. DAPI-gefärbte DNA ist in Zellkernen, als NETs im Gelenkspalt und phagozytiert in den Lysosomen der Lining-Makrophagen zu finden. K: Knorpel, Gs, Gelenkspalt; Sg: Synovialgewebe. Größenbalken, 20 µm (oben), 5 µm (unten). Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Transmissionselektronenmikroskopie von Synovialgewebe der Kniegelenken von gesunden und erkrankten Wildtyp-Mäusen konnten die Beobachtungen aus der Lichtmikroskopie untermauern (Abbildung 5). Unter physiologischen Bedingungen bilden vesikelreiche Makrophagen die oberste Zellschicht der Synovialmembran (Abbildung 5a, b).

Dabei sind die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen den synovialen Fibroblasten, welche reich an endoplasmatischem Retikulum (ER) sind, aufgelagert. Beide Zelltypen befinden sich in unmittelbarer Nähe zum kapillären Netzwerk.

Synoviale Fibroblasten und Blutgefäße sind in eine ausgeprägte extrazelluläre Matrix (ECM) eingebettet. CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen hingegen sind nur geringfügig von ECM umgeben, was wiederum engen Zell-Zell-Kontakt innerhalb der Makrophagen-Membran erlaubt.

Zwei Tage nach K/BxN Serumtransfer und Induktion der Antikörper-vermittelten Entzündung wird das Aufbrechen der Makrophagenmembran deutlich (Abbildung 5c, d). Synoviale Fibroblasten breiten sich zwischen den Lining-Makrophagen aus. Die Lysosomen der Lining-Makrophagen sind mit phagozytierten Zellrümmern gefüllt (Abbildung 5e).

Im Gelenkspalt befindet sich freigesetzte DNA aus den NETs, Neutrophile Granulozyten und Monozyten (Abbildung 5f). Die in die DNA eingebetteten Monozyten scheinen die freie DNA zu umschließen und aufzunehmen (Abbildung 5g).

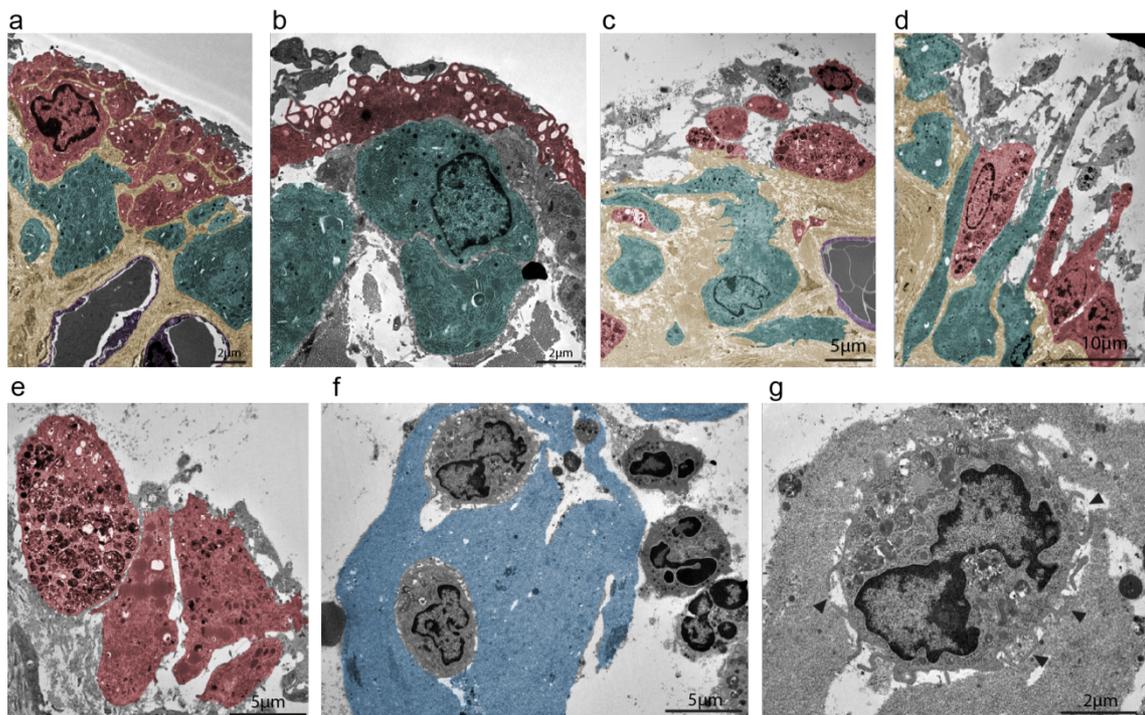


Abbildung 5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) der Synovialmembran

(a) und (b) TEM der Synovialmembran von gesunden Kniegelenken von Wildtyp-Mäusen zeigt Makrophagen (rot), welche die oberste Zellschicht bilden und die darunterliegenden synovialen Fibroblasten (grün). Endothelzellen (violett) durchziehen die extrazelluläre Matrix (gelb) des interstitiellen Gewebes.

(c) bis (e) TEM der Synovialmembran von Kniegelenken von Wildtyp-Mäusen zwei Tage nach K/BxN Serumtransfer demonstriert die Disruption der Membran aus CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen (rot) und die Neuausrichtung der Makrophagen und der synovialen Fibroblasten in Richtung Gelenkspalt. CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen besitzen Einschlüsse von phagozytiertem Material.

(f) bis (g) TEM von *neutrophil extracellular traps* (DNA, blau) sowie Neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Die Pfeile sind auf Zellfortsätze einer Monozyte gerichtet, die DNA zur Phagozytose umschließt.

Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

3.1.3 Disruption und Reorganisation der CX₃CR1⁺ Makrophagenmembran während Kollagen-induzierter Arthritis (CIA)

Die Veränderungen der Schicht aus CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen bezüglich Membranintegrität und Makrophagen-Morphologie während der Antikörper-vermittelten K/BxN Serumtransfer-Arthritis konnte auch im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) bestätigt werden.

In diesem Modell wurden *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäuse gegen Typ II Kollagen aus dem Huhn immunisiert. Dies führt zur Produktion von Antikörpern gegen murines Kollagen. Eine zweite Immunisierung an Tag 21 führt schließlich zur Induktion von Gelenkentzündungen.

Die Kniegelenke der Tiere wurden an Tag 21 und Tag 35 mittels LSFM (Abbildung 6a) und CLSM (Abbildung 6b) analysiert. Tag 21 nach erster Immunisierung entspricht dabei der nicht-entzündeten Kontrolle und Tag 35 der etablierten Arthritis. Im Vergleich zum Tag 21 konnte am Tag 35 die Disruption und Neuausrichtung der CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen festgestellt werden. Es kam außerdem zu einer massiven Infiltration von weiteren tdTomato-exprimierenden mononukleären Phagozyten.

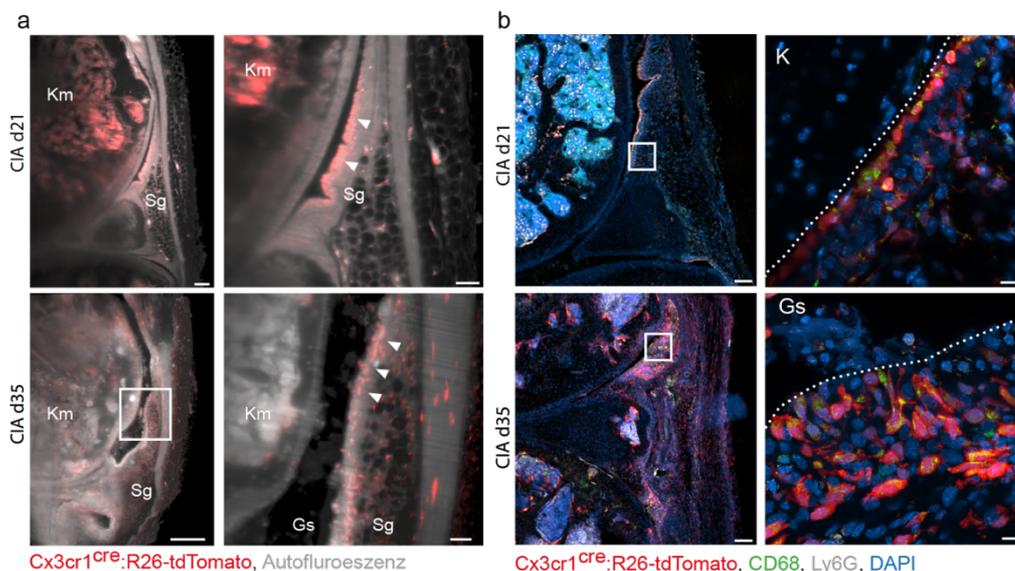


Abbildung 6 Veränderungen der Makrophagen-Morphologie und Disruption der Makrophagenmembran während Kollagen-induzierter Arthritis

(a) Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie (LSFM) von Kniegelenken (Autofluoreszenz, weiß) von *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäusen (tdTomato, rot) an Tag 21 (CIA d21) und Tag 35 (CIA d35) nach erster Immunisierung. Km: Knochenmark, Sg: Synovialgewebe, Gs: Gelenkspalt. Größenbalken, 500µm (links) und 100µm (rechts).

(b) Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie der Synovialmembran von Kniegelenken von *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäusen (tdTomato, rot) an Tag 21 (CIA d21) und Tag 35 (CIA d35) nach erster Immunisierung. Makrophagen wurden mit Anti-CD68 (grün) und Neutrophile Granulozyten mit Anti-Ly6G (weiß) Antikörper markiert. K: Knorpel, Gs: Gelenkspalt; Größenbalken, 100µm (links) und 10µm (rechts).

Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

3.1.4 Synoviale Fibroblasten tauschen ihre Position mit Lining-Makrophagen bei Antikörper-vermittelter Arthritis

Die fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Synovialmembran von *Cx3cr1^{cre}:R26-tdTomato*-Mäusen zeigten, dass die CX_3CR1^+ Lining-Makrophagen die oberste Zellschicht bilden und das Synovialgewebe von der Gelenkflüssigkeit abtrennen. Während der Gelenkentzündung werden die CX_3CR1^+ Lining-Makrophagen von einem tdTomato-negativen Zelltyp überwachsen. Theoretisch sollte es sich bei diesen Zellen um die synovialen Fibroblasten (Typ B Synoviozyten) handeln.

CLSM von Gewebeschnitten der Kniegelenke von *ColVI^{cre}:R26-tdTomato* Reporter-mäusen konnten bestätigen, dass es sich bei diesen Zellen um Kollagen Typ VI-exprimierende synoviale Fibroblasten handelte (Abbildung 7).

In gesundem Zustand befand sich die Schicht der Fibroblasten der Synovialmembran unterhalb der Schicht aus CX_3CR1^+ Lining-Makrophagen. Nach Induktion der K/BxN Serumtransfer-Arthritis (Tag 2) expandierten diese synovialen Fibroblasten durch die Makrophagenschicht hindurch und besetzten die erste Reihe der Synovialmembran. Wie an Tag 7 ersichtlich kam es zu einer massiven Zunahme der Anzahl der Fibroblasten in der Synovialmembran. Die Membranstruktur der CX_3CR1^+ Lining-Makrophagen löste sich vollständig auf.

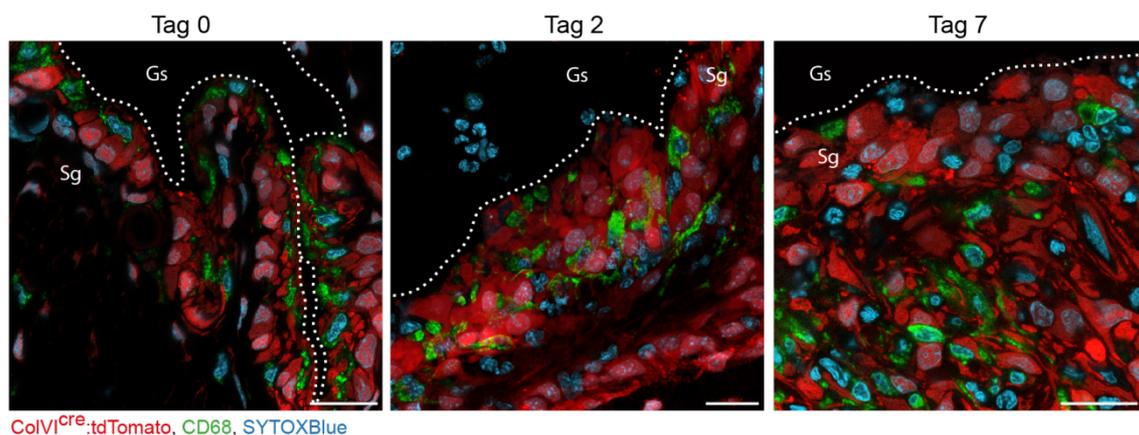


Abbildung 7 Während einer Arthritis expandieren die synoviale Fibroblasten durch die Schicht der Lining-Makrophagen hindurch

Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der Synovialmembran der Kniegelenke von *ColVI^{cre}:R26-tdTomato*-Reporter-mäusen (tdTomato, rot) in gesundem Zustand und an Tag 2 und Tag 7 nach K/BxN Serumtransfer. Anti-CD68 Antikörper (grün) markiert die synovialen Makrophagen. Gs: Gelenkspalt, Sg: Synovialgewebe. Größenbalken: 20 μ m. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

3.2 Ontogenetischer Ursprung von Makrophagen-Subtypen des Synovialgewebes

Es ist bekannt, dass die Makrophagen-Subtypen eines Gewebes unterschiedlichen Ursprungs sein können. Im Falle des Synovialgewebes war wenig über die Subtypen und deren Herkunft bekannt.

Die mikroanatomische Charakterisierung des Synovialgewebes konnte bereits zeigen, dass es im gesunden Gelenk mindestens zwei unterschiedliche synoviale Makrophagen-Subtypen gibt: CX_3CR1^+ Lining-Makrophagen und CX_3CR1^- interstitielle Makrophagen. Die Aufklärung der Ontogenese dieser geweberesidenten Makrophagen und die Änderung des Makrophagen-Pools während einer Antikörper-vermittelten Gelenkentzündung werden im Folgenden beschrieben.

3.2.1 Synoviale Lining-Makrophagen besiedeln das Gelenk während der Embryogenese

Zunächst sollte festgestellt werden, ob Makrophagen das Synovialgewebe schon während der Embryogenese besiedeln. Dazu wurden Kniegelenke von Mausembryonen von Tag E15,5 und E16,5 für konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie aufgearbeitet. Es konnten erste $CD68^+$ und $F4/80^+$ Makrophagen im sich entwickelnden embryonalen Gelenk detektiert werden (Abbildung 8).

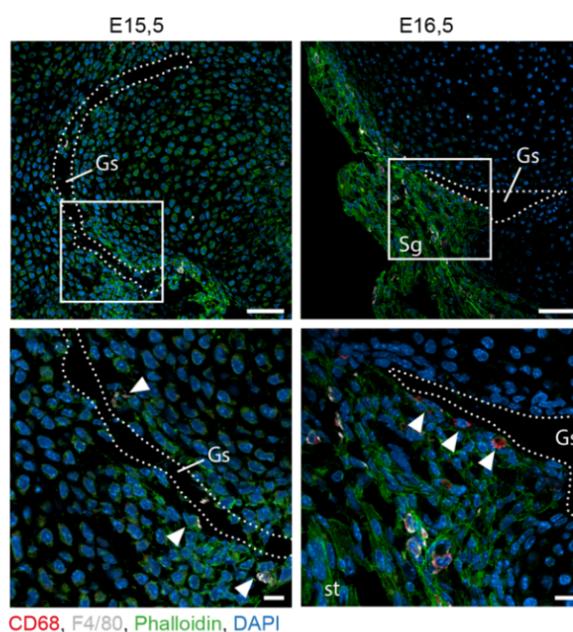


Abbildung 8 Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie von Kniegelenken von Mausembryonen während der Embryogenese

Gewebeschnitte von Mausembryonen wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Aufnahmen zeigen Kniegelenke von Embryonen von Tag 15,5 (E15,5) und Tag 16,5 (E16,5) der Embryonalentwicklung. Makrophagen wurden mit Anti-F4/80 (weiß) und Anti-CD68 (rot) Antikörpern markiert. Fluorophor-gekoppeltes Phalloidin (grün) färbt Aktin und DAPI die Zellkerne (blau). Pfeile deuten auf synoviale Lining-Makrophagen. Größenbalken, 50 μ m (oben) und 10 μ m (unten). Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

An Tag 15,5 wurden nur wenige F4/80⁺ Makrophagen am sich bildenden Gelenkspalt nachgewiesen. Die charakteristische Architektur des synovialen Gelenkes mit Gelenkspalt, Synovialmembran und interstitiellem Gewebe ist am Tag E16,5 bereits zu erkennen. Eine Aneinanderreihung von Lining-Makrophagen in der Synovialmembran wird bereits deutlich und deutet die Entwicklung der Membran aus synovialen Makrophagen an. Auch im interstitiellen Synovialgewebe siedeln sich Makrophagen an.

3.2.2 Synoviale Gewebsmakrophagen sind resident und selbsterneuernd

Adulte Makrophagen sind entweder resident und erneuern sich selbst oder entstammen dem Knochenmark. Um den Ursprung adulter synovialer Makrophagen zu untersuchen wurden Parabiose-Studien durchgeführt¹⁰⁹.

Dabei wurden *Cx3cr1^{gfp}*-Mäuse und Wildtyp-Mäuse operativ verbunden (Abbildung 9a). Diese parabiotischen Mäuse teilten sich eine gemeinsame Blutzirkulation und wiesen somit einen Chimerismus des myeloiden Kompartiments im peripheren Blut auf.

Mittels *Cx3cr1*-abhängiger GFP (*green fluorescent protein*)-Expression konnte festgestellt werden, ob Makrophagen aus dem Knochenmark der Partnermaus stammen.

Es wurde das Synovialgewebe der Kniegelenke des Wildtyp-Parabionten untersucht (Abbildung 9a). Dabei konnten keine GFP-exprimierenden Makrophagen in der synovialen Intima detektiert werden. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass sich die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen nicht durch infiltrierende Blutmonozyten sondern durch Selbsterneuerung erhalten.

Um zu ermitteln, ob CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen proliferieren und ihre Anzahl dadurch Selbsterneuerung erhalten, wurden Gewebeschnitte von Kniegelenken der *Cx3cr1^{gfp}*-Mäuse mit Anti-Ki67 Antikörper gefärbt. Ki67 ist ein Proliferationsmarker und wird in sich teilenden Zellen exprimiert¹¹⁰. Es konnten jedoch keine Ki67⁺ Zellen unter den CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen gefunden werden (Abbildung 9b).

Im interstitiellen Synovialgewebe hingegen wurden proliferierende Ki67⁺CD68⁺CX₃CR1⁻ interstitielle Makrophagen detektiert. Ausgehend von diesen proliferierenden Zellen steigerte sich die *Cx3cr1*-abhängige GFP-Expression mit fortschreitender Annäherung an die synoviale Makrophagenmembran der Intima.

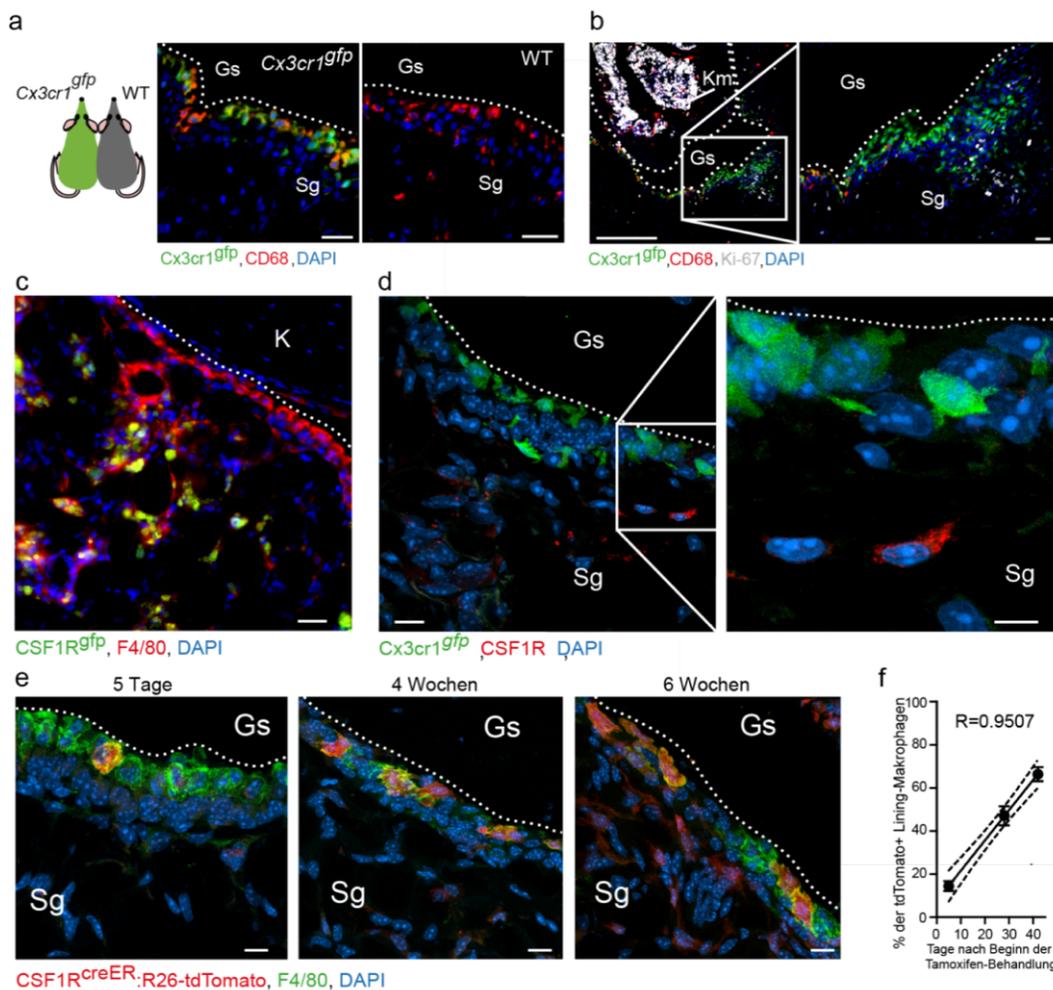


Abbildung 9 CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen durchlaufen ein *Csf1r*-exprimierenden Satus

(a) Bright-field-Fluoreszenzmikroskopie (BFM) von *Cx3cr1^{gfp}*- und Wildtype-Parabionten nach 6 wöchiger Parabiose. Makrophagen sind CD68 (rot) positiv. Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Gs: Gelenkspalt, Sg: Synovialgewebe. Größenbalken: 25µm.

(b) BFM von Kniegelenken der *Cx3cr1^{gfp}* zeigen Ki67-positive proliferierende Zellen (weiß) im interstitiellen Gewebe. Der Grad der GFP-Expression (grün) in Makrophagen (CD68, rot) nimmt mit Annäherung an die Synovialmembran zu. Gs: Gelenkspalt, Sg: Synovialgewebe, Km: Knochenmark. Größenbalken, 250µm (links) und 25µm (rechts).

(c) BFM des Synovialgewebes eines Kniegelenkes der *Csf1r^{gfp}* Maus demonstriert GFP-Expression ausschließlich in interstitiellen Makrophagen (F4/80, rot). Scale bars, 25µm.

(d) Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie (CLSM) von Synovialgewebe eines Kniegelenkes der *Cx3cr1^{gfp}*-Mäuse (GFP, grün) mit Anti-CSF1R Antikörperfärbung (rot) bestätigt, die exklusive CSF1R Expression in interstitiellen Synovialmakrophagen. Gs: Gelenkspalt, Sg: Synovialgewebe. Größenbalken, 25µm (links) und 10µm (rechts)

(e) Repräsentative Aufnahmen von CLSM der Synovialmembran der Kniegelenke von *Csf1r^{creER};R26-tdTomato*-Mäusen (tdTomato, rot) nach 5 Tagen, 4 Wochen und 6 Wochen der Behandlung mit Tamoxifen-beladenem Futter. Makrophagen wurden durch die F4/80 Expression (grün) identifiziert. Zellkerne sind DAPI-markiert (blau). Gs: Gelenkspalt, Sg: Synovialgewebe. Größenbalken, 10µm.

(f) Prozentuale Quantifizierung der tdTomato positiven Lining-Makrophagen zu allen CD68 positiven Makrophagen der Synovialmembran anhand der Aufnahmen aus (e). Die gestrichelte Linie entspricht dem 95% Konfidenzintervall.

Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Ein für Makrophagen charakteristisches Protein ist der *macrophage colony-stimulating factor receptor* (M-CSFR, CSF1R, CD115)^{111,112}. Die CSF1R-Expression wurde mit Hilfe der *CSF1R^{gfp}*-Reportermaus¹¹³ (Abbildung 9c) und mit Antikörpern gegen CSF1R (Abbildung 9d) analysiert. Interessanterweise wiesen die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen keine CSF1R-Expression auf.

Die interstitiellen Synovialmakrophagen hingegen waren GFP-positiv in den *CSF1R^{gfp}*-Reportermäusen und in *Cx3cr1^{gfp}*-Mäusen konnte der CSF1R mittels Antikörper-Färbung ausschließlich auf den interstitiellen GFP-negative Makrophagen nachgewiesen werden.

Auf Grund der Parabiose-Studien, den Ki67-Antikörperfärbungen und den Expressionsanalysen zum M-CSF Rezeptor wurde die Hypothese aufgestellt, dass CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen von einem Pool von eher undifferenzierten CSF1R-exprimierenden interstitiellen Synovialmakrophagen abstammen.

Um diese Hypothese zu validieren, wurden *CSF1R^{creER}*-Mäuse¹¹⁴ mit *R26-tdTomato*-Mäusen verpaart. Die *CSF1R^{creER}*-Mäuse exprimieren eine cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Csf1r*-Promotors. Diese cre-Rekombinase ist ausschließlich nach Bindung von Tamoxifen in der Lage in den Zellkern zu translozieren und die STOP-Kassette im tdTomato zu entfernen.

Auf diese Weise können selektiv genau die Zellen markiert werden, die zum Zeitpunkt der Tamoxifen-Behandlung den CSF1R exprimieren. *CSF1R^{creER}:R26-tdTomato*-Mäuse wurden mit Tamoxifen-Futter behandelt und die Synovialmembranen der Kniegelenke nach 5 Tagen, 4 Wochen und 6 Wochen nach Behandlungsbeginn mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert (Abbildung 9e).

An Tag 5 konnten nur wenige tdTomato⁺ Lining-Makrophagen in der Synovialmembran detektiert werden. Der Anteil der tdTomato⁺ Zellen in der Makrophagenmembran der Intima steigerte sich jedoch linear innerhalb von sechs Wochen auf über 60%.

Aus diesen Beobachtungen konnte gefolgert werden, dass die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen eine Halbwertszeit von ungefähr 30 Tagen besitzen.

Es konnte damit ebenfalls gezeigt werden, dass sich die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen von interstitiellen CSF1R-exprimierenden Vorläufern ableiteten.

In weiteren Parabiose-Experimenten bei denen *DsRed^{tg}*-Mäuse die Blutzirkulation mit Wildtyp-Mäusen teilten (*DsRed^{tg}/Wildtyp*-Parabiose), konnte bestätigt werden, dass die synovialen Lining-Makrophagen im gesunden Zustand auch nach langer Zeit in Parabiose (6 Wochen und 9 Wochen in Parabiose) unabhängig von der Hämatopoese des Knochenmarks sind (Abbildung 10).

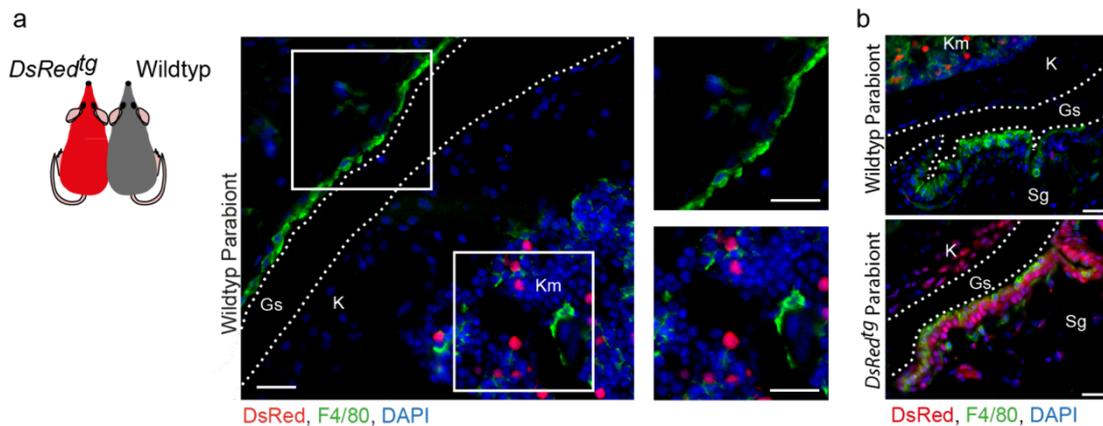


Abbildung 10 Synovialgewebe von *DsRed^{tg}/Wildtyp*-Parabiosen nach 6 und 9 Wochen

(a) Repräsentative Bright-field-Fluoreszenzmikroskopie (BFM) von Synovialgewebe der Kniegelenke von einem Wildtyp-Parabionten (*DsRed/Wildtyp*-Parabiose) 6 Wochen nach Generierung der Parabiose. Bildausschnitte zeigen die Synovialmembran (oben) und das Knochenmark (unten). Gs: Gelenkspalt, K: Knorpel, Km: Knochenmark. Größenbalken, 25µm.

(b) Repräsentative BFM-Aufnahmen des Synovialgewebes der Kniegelenke von *DsRed^{tg}/Wildtyp*-Parabionten nach 9-wöchiger Parabiose. Gs: Gelenkspalt, K: Knorpel, Km: Knochenmark, Sg, Synovialgewebe. Größenbalken, 25µm.

Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Um die Ontogenese der Makrophagen des Gelenkes in entzündetem Zustand zu untersuchen, wurde den *DsRed^{tg}/Wildtyp*-Parabionten K/BxN Serum injiziert und die zellulären Anteile der Partner-abgeleiteten Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 11).

Quantifiziert wurden Neutrophile Granulozyten und Monozyten oder Makrophagen im Blut und im Synovialgewebe.

Der Quotient des Anteils der Partner-abgeleiteten Zellen im Blut zu den Partner-abgeleiteten Zellen im Synovialgewebe ist ein Maß für den Chimärismus und drückt aus, inwieweit die jeweiligen Zellen aus dem Knochenmark hervorgehen (Abbildung 11d).

Wie zu erwarten war, entstammten alle Neutrophilen Granulozyten dem Knochenmark. Die Anteile der Partner-abgeleiteten Neutrophile im Blut und im Gelenk sind annähernd gleich und ergeben somit einen Chimerismus von 1.

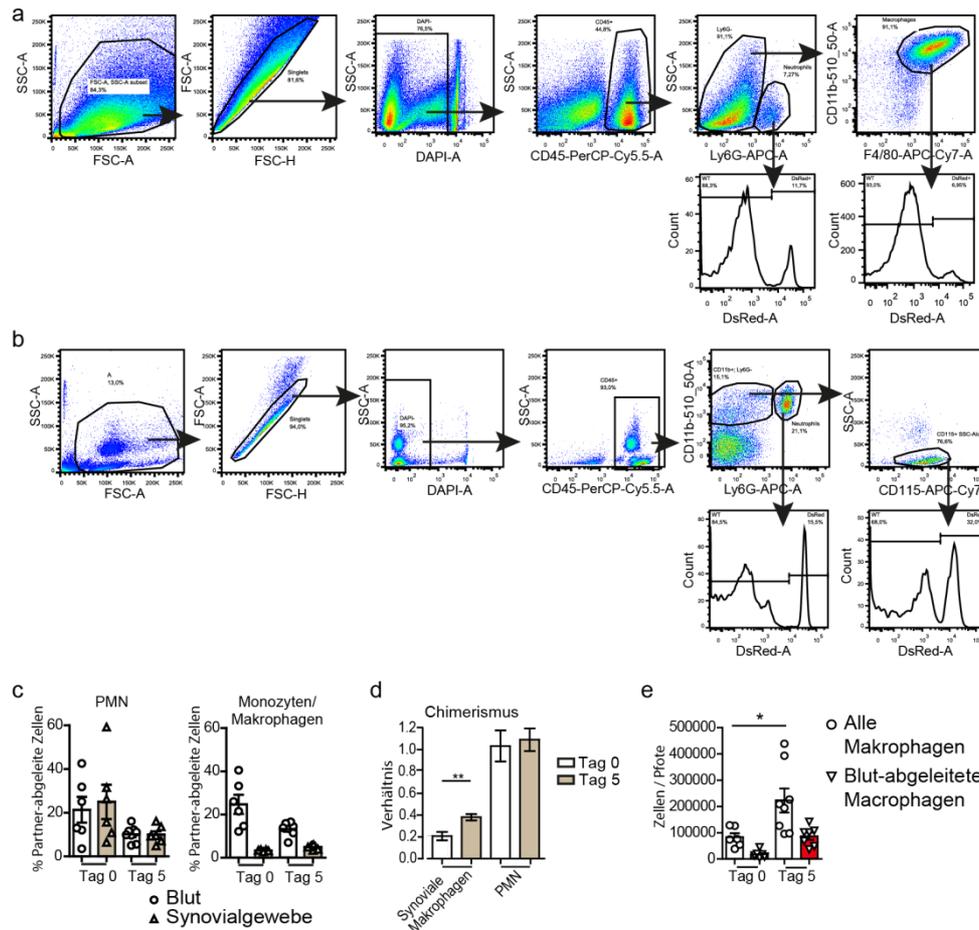


Abbildung 11 Quantifizierung des Chimärismus von Makrophagen in gesunden und entzündeten Gelenken der *DsRed^{tg}/Wildtyp-Parabiosen*

Parabiosen aus *DsRed^{tg}*-Mäusen und Wildtyp-Mäusen wurden generiert. Nach sechs Wochen in Parabiose wurde zur Induktion der Arthritis K/BxN Serum transferiert. Analysiert wurden Blut und synoviale Makrophagen aus Hinterpfoten in gesundem Zustand (Tag 0) und 5 Tage nach Induktion der Arthritis.

(a) Gatingstrategie für synoviale Makrophagen. Makrophagen wurden als DAPI^{negativ} (lebend), CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁻ und F4/80⁺ definiert. Die Expression von DsRed bestimmt den Ursprungsparabionten.

(b) Gatingstrategie für Blutmonozyten. Blutmonozyten wurden als DAPI^{negativ} (lebend), CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁻ und CD115⁺ definiert. Die Expression von DsRed bestimmt den Ursprungsparabionten.

(c) Durchflusszytometrische Analyse des Blutes und des Synovialgewebes der Parabionten an Tag 0 und Tag 5 nach K/BxN Serumtransfer. Dargestellt sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Partner-abgeleiteten Neutrophilen Granulozyten (PMN) im Blut und im Synovialgewebe sowie die Anteile der Partner-abgeleiteten Monozyten und Makrophagen im Blut und Synovialgewebe zu den angegebenen Zeitpunkten. Diese Daten wurden zur Bestimmung des Gewebe-Chimärismus herangezogen. Neutrophile: Tag 0, für Blut n = 6 und für Synovialgewebe n = 6; Tag 5, für Blut n = 8 und für Synovialgewebe n = 7; Monozyten/Makrophagen: Tag 0, für Blut n = 6 und für Synovialgewebe n = 5; Tag 5, für Blut n = 7 und für Synovialgewebe n = 8. Mittelwert ± Standardfehler.

(d) Gewebe-Chimärismus der CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺ synovialen Makrophagen und der CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophilen Granulozyten (PMN) an Tag 0 und Tag 5 nach K/BxN Serumtransfer. Der Chimärismus wurde als Quotient der jeweiligen Anteile an Partner-abgeleiteten Zellen des Blutes zum Anteil der Partner-abgeleiteten Zellen im Synovialgewebe berechnet. Tag 0: Makrophagen, n = 6; Neutrophile; Tag 5: Makrophagen n = 7, Neutrophile, n = 7. Mittelwert ± Standardfehler. P-Wert wurde mit dem zweiseitigen ungepaarten T-Test ermittelt; *P = 0,004

(e) Absolute Anzahl der gesamten Makrophagen und der Blut-abgeleiteten Makrophagen in gesundem Zustand (Tag 0: Totale Makrophagen: n = 6; Blut-abgeleitete Makrophagen n = 6) und 5 Tage nach K/BxN Serumtransfer (Tag 5: Totale Makrophagen, n = 8; Blut-abgeleitete Makrophagen, n = 7). Mittelwert ± Standardfehler. P-Wert wurde mit dem zweiseitigen ungepaarten T-Test ermittelt; *P = 0,0261. Abbildung modifiziert übernommen aus 1.

Der Anteil der Partner-abgeleiteten synovialen Makrophagen war im Vergleich zu den Blutmonozyten nur sehr gering (Abbildung 11c).

Bezüglich der synovialen Makrophagen errechnete sich für den gesunden Zustand ein Chimerismus von ca. 0,2, welcher sich während der Entzündung auf ca. 0,4 erhöhte. Dies bedeutet, dass es während der Entzündung zur Infiltration von Makrophagen kommt, welche sich von Blutmonozyten herleiten (Abbildung 11d).

Die Berechnungen der absoluten Zellzahlen aller Makrophagen im Gelenk sowie der absoluten Anzahl der Blut-abgeleiteten Makrophagen zeigte, dass sich sowohl die infiltrierenden Makrophagen als auch die residenten Makrophagen während einer Gelenkentzündung stark vermehrten (Abbildung 11e).

Diese Experimente bestätigten, dass sich im gesunden Zustand der Großteil der residenten Makrophagen durch Selbsterneuerung unabhängig vom Blutmonozyten-Pool erhält. Die absolute Vermehrung der Makrophagen im entzündeten Gelenk ist sowohl durch Infiltration als auch durch Proliferation residenter Makrophagen zu erklären.

Die *DsRed^{tg}/Wildtyp*-Parabionten ließen jedoch keine Unterscheidung zwischen CX_3CR1^+ Lining-Makrophagen und CX_3CR1^- interstitiellen Makrophagen zu.

Es konnte nicht festgestellt werden, ob beide residenten Gewebemakrophagen während der Entzündung proliferierten oder nur eine der beiden Subpopulation. Außerdem konnte keine Aussage getroffen werden, ob CX_3CR1^+ Lining-Makrophagen ihre Position in der Intima beibehalten oder sogar in den Gelenkspalt migrieren.

Daher wurden *Cx3cr1^{creER}:R26-tdTomato*-Mäuse generiert, die eine Unterscheidung zwischen CX_3CR1^+ Lining-Makrophagen und CX_3CR1^- interstitiellen Makrophagen sowie infiltrierenden Makrophagen erlaubten.

Diese Mäuse zeichnen sich durch eine Tamoxifen-induzierbare und CX_3CR1 -abhängige cre-Rekombinase aus ²⁵. So können alle Zellen, die zum Zeitpunkt der Tamoxifen-Administration CX_3CR1 exprimierten durch Induktion der tdTomato-Expression markiert werden.

Zwei Tage nach dem Tamoxifen-Puls waren ca. 50% der $Ly6C^{high}$ Monozyten, alle $Ly6C^{low}$ Monozyten sowie ca. 40% der synovialen Makrophagen tdTomato⁺. Nach vier weiteren Wochen repopulierten die Monozyten und wiesen keine tdTomato Expression mehr auf. In den synovialen Makrophagen hingegen konnte weiterhin tdTomato detektiert werden (Abbildung 12a-d).

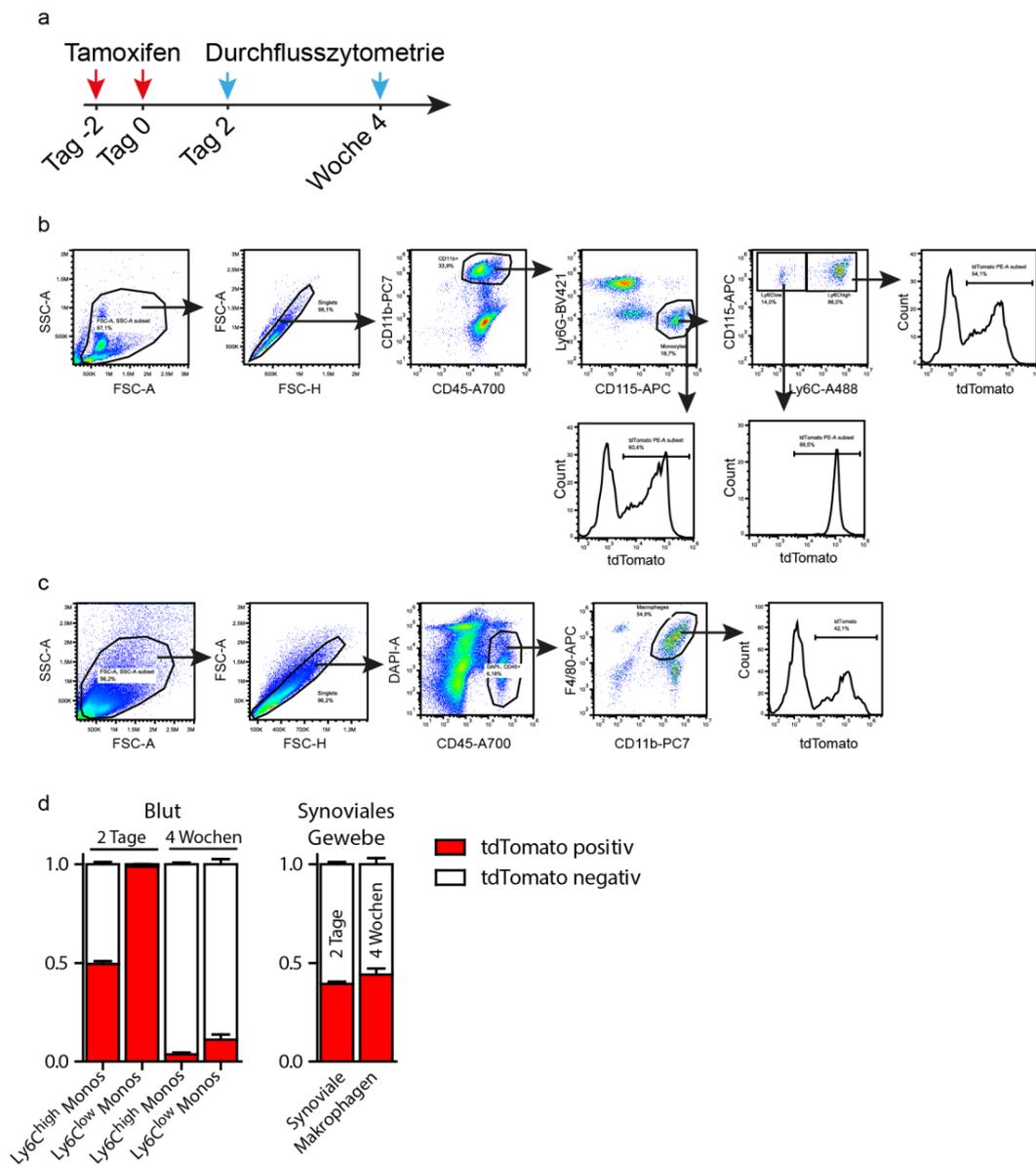


Abbildung 12 Quantifizierung der tdTomato-Expression in *Cx3cr1^{creER}:tdTomato*-Mäusen

(a) Behandlungsschema der *Cx3cr1^{creER}:tdTomato*-Mäusen. Den Tieren wurde zweimal innerhalb von 48 Stunden Tamoxifen intraperitoneal injiziert. Zwei Tag und 4 Wochen nach dem Tamoxifen-Puls wurden die Monozyten und Makrophagen bezüglich tdTomato Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert.

(b) Gating-Strategie für Blutmonozyten. Monozyten sind CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁺ und Ly6G⁻. tdTomato wird nach erfolgreicher Rekombination exprimiert.

(c) Gating-Strategie für Synovialmakrophagen. Synoviale Makrophagen sind CD45⁺, CD11b⁺, F4/80⁺ und Ly6G⁻. DAPI wurde für den lebend/tot Ausschluss verwendet. tdTomato wird nach erfolgreicher Rekombination exprimiert.

(d) Quantifizierung der tdTomato-positiven und -negativen Monozyten aus Blut und Makrophagen aus dem Synovialgewebe 2 Tage und 4 Wochen nach dem Tamoxifen-Puls.

Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Die *Cx3cr1^{creER}:tdTomato*-Mäuse und deren Behandlung mit einem Tamoxifen-Puls und eine Karenz von vier Wochen ist somit ein geeignetes Modell zur Unterscheidung der CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen und infiltrierenden oder interstitiellen Makrophagen.

Die *Cx3cr1^{creER}:tdTomato*-Mäuse bekamen vier Wochen nach dem Tamoxifen-Puls K/BxN Serum appliziert, um eine Gelenkentzündung zu induzieren (Abbildung 14).

In gesundem Zustand zeigte sich, dass die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen tdTomato exprimierten und ihre charakteristische Membranstruktur aufwiesen. Die interstitiellen Makrophagen hingegen waren tdTomato negativ.

Sieben Tage nach dem K/BxN Serumtransfer zeigte sich erneut die Neuausrichtung der CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen und die massive Infiltration von Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in den Gelenkspalt.

Die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen blieben in der synovialen Intima lokalisiert. tdTomato⁺ Makrophagen konnten im Gelenkspalt nicht gefunden werden (Abbildung 14).

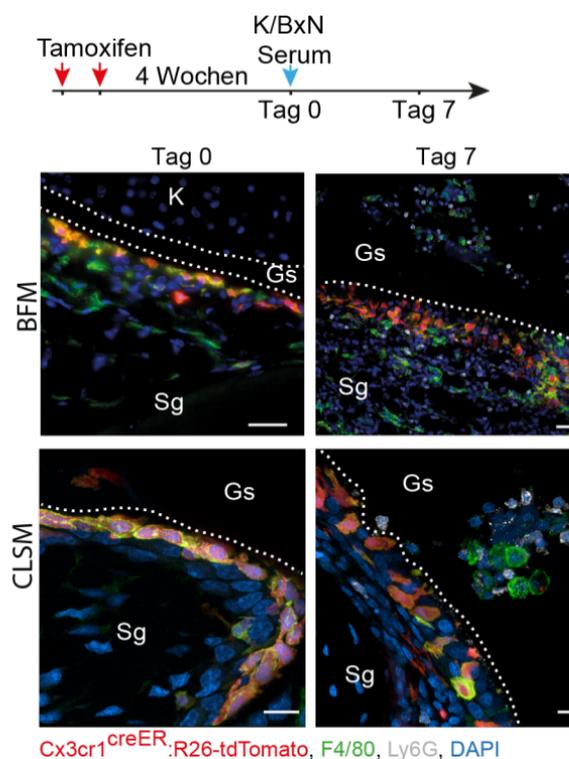


Abbildung 13 Histologische Analyse der tdTomato-Expression in *Cx3cr1^{creER}:tdTomato*-Mäusen
Cx3cr1^{creER}:tdTomato-Mäusen bekamen zwei Tamoxifen Injektionen intraperitoneal innerhalb von 48 Stunden. Vier Wochen später wurde K/BxN Serum transferiert. Analysiert wurden Tag 0 und Tag 7 nach K/BxN Serumtransfer mittels Bright-field-Fluoreszenzmikroskopie (BFM) und konfokaler Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie (CLSM). Makrophagen wurden mit anti-CD68 (grün) Antikörper und Neutrophile mit Anti-Ly6G (weiß) Antikörper markiert. DAPI färbt Zellkerne. Gs: Gelenkspalt, Sg: Synovialgewebe, K: Knorpel. Größenbalken, 25µm (BFM) und 10µm (CLSM).
 Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Es ist bekannt, dass systemisch verabreichtes Tamoxifen das Immunsystem beeinflussen kann¹¹⁵. Um mögliche systemische Effekte auszuschließen, wurde in einem weiteren Experiment 4-Hydroxytamoxifen lokal in den Gelenkspalt der Kniegelenke von *Cx3cr1^{creER};tdTomato*-Mäusen gespritzt und fünf Tage später K/BxN Serum transferiert. Dabei zeigte sich an Tag 0 die effektive Rekombination durch tdTomato-Expression vor allem in CX₃CR1⁺-Lining-Makrophagen, wobei die Blutmonozyten keine Rekombination erfuhren. An Tag 7 nach K/BxN Serumtransfer zeigte sich auch in diesem Experiment, dass die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen ihre Position beibehielten und sich zum Gelenkspalt hin ausrichteten (Abbildung 14).

Die *Cx3cr1^{creER};tdTomato*-Mäuse sind zudem gut geeignet um festzustellen, ob CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen während der Antikörper-vermittelten Entzündung proliferieren und sich die Anzahl während einer Arthritis erhöht (Abbildung 15).

Auch hierbei wurden die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen durch einen systemischen Tamoxifen-Puls markiert. Vier Wochen später wurde K/BxN Serum transferiert.

An Tag 0, Tag 2 und Tag 5 wurde den Tieren EdU intraperitoneal injiziert. EdU wird in proliferierenden Zellen in die neu synthetisierte DNA eingebaut und kann mittels Durchflusszytometrie detektiert werden.

Die Ermittlung der absoluten Zahlen der tdTomato⁺ CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen und der tdTomato⁻ infiltrierenden und interstitiellen Makrophagen ergab, dass sich die Anzahl der CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen während der Entzündung nicht veränderte. Die Anzahl der tdTomato negativen Makrophagen nahm jedoch zu (Abbildung 15d).

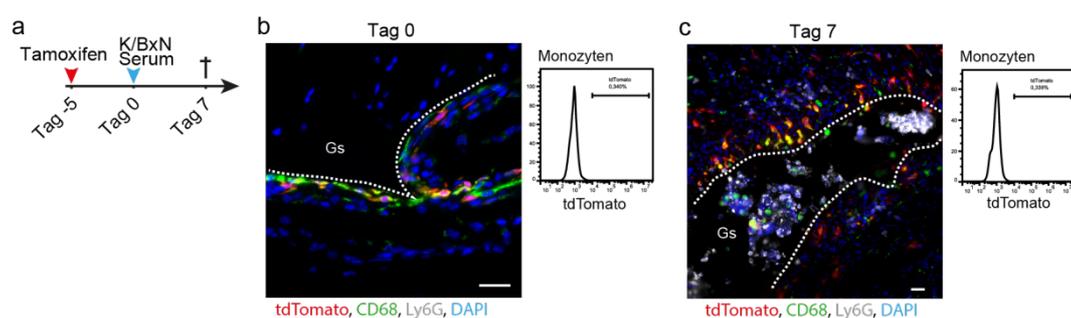


Abbildung 14 Lokale 4-Hydroxytamoxifen-Injektion in *Cx3cr1^{creER};tdTomato*-Mäusen

(a) Behandlungsschema für die lokale 4-Hydroxytamoxifen Applikation in Kniegelenke von *Cx3cr1^{creER};tdTomato*-Mäusen. Fünf Tage vor K/BxN Serumtransfer wurde den Tieren 4-Hydroxytamoxifen in das Kniegelenk injiziert. An Tag 0 (b) und Tag 7 (c) nach Induktion der Arthritis erfolgte die histologische Analyse der Synovialgewebe mittels Bright-field-Fluoreszenzmikroskopie. Die Expression von tdTomato in Blutmonozyten wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und ist rechts neben dem entsprechenden Tag als Histogramm dargestellt.

Abbildung modifiziert übernommen aus¹.

Durch EdU-Detektion konnte ermittelt werden, dass im Gegensatz zu den Lining-Makrophagen vor allem die tdTomato negativen Makrophagen proliferierten und sich die Proliferationskapazität im Verlauf der Entzündung sogar erhöhte (Abbildung 15e).

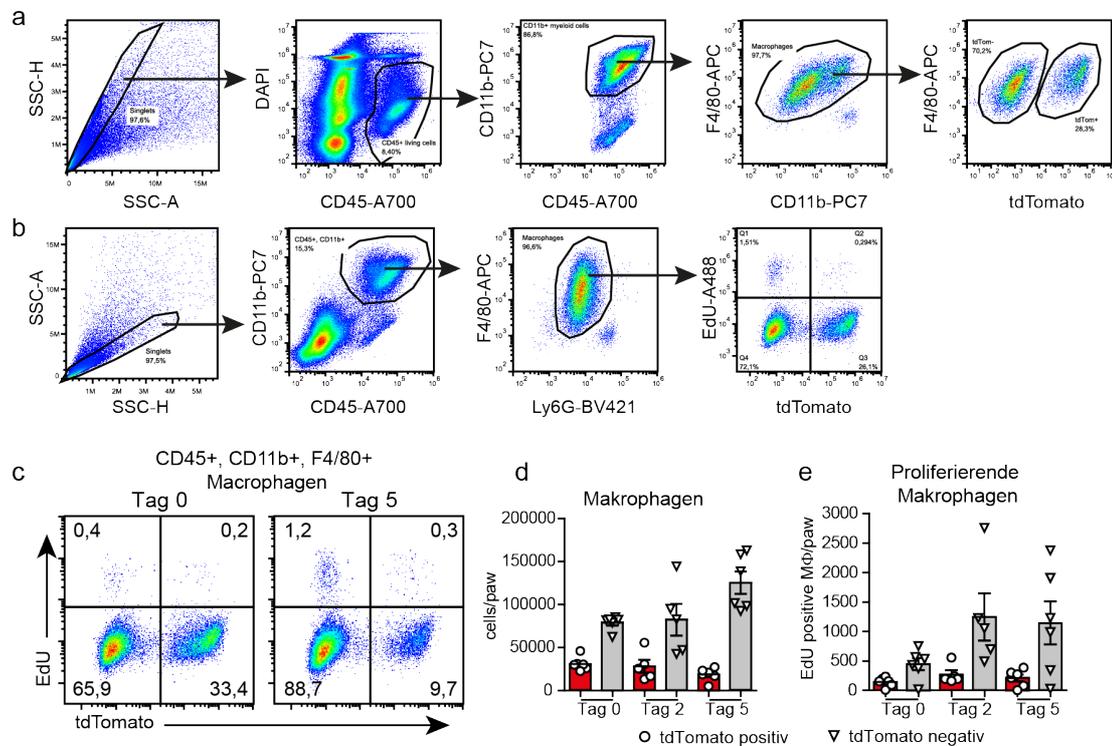


Abbildung 15 Proliferationskapazitäten von synovialen Makrophagen in der Gelenkentzündung

(a) Gating-Strategie zur Identifizierung von synovialen Makrophagen der *Cx3cr1^{creER};tdTomato*-Mäuse, die einen Tamoxifen-Puls vier Wochen vor Induktion der Arthritis erhielten. Makrophagen sind CD45⁺, CD11b⁺ und F4/80⁺. Die tdTomato-Expression unterscheidet Lining-Makrophagen und interstitielle oder infiltrierende Makrophagen.

(b) Gating-Strategie zur Identifizierung von EdU positiven, proliferierenden synovialen Makrophagen der *Cx3cr1^{creER};tdTomato*-Mäuse. Fünf Stunden vor Präparation der Tiere erhielten die Tiere EdU intraperitoneal.

(c) Representative Durchflusszytometrie-Diagramme von Tag 0 und Tag 5 nach K/BxN Serumtransfer zeigen tdTomato-positive Lining-Makrophagen oder interstitielle und infiltrierende Makrophagen sowie deren EdU-Positivität bei Proliferation.

(d) Absolute Anzahl von tdTomato-positiven Lining-Makrophagen und interstitiellen oder infiltrierenden tdTomato-negativen Makrophagen an Tag 0, Tag 2 und Tag 5 nach K/BxN Serumtransfer.

(e) Absolute Anzahl von proliferierenden tdTomato-positiven Lining-Makrophagen und interstitiellen oder infiltrierenden tdTomato-negativen Makrophagen an Tag 0, Tag 2 und Tag 5 nach K/BxN Serumtransfer. Die absoluten Zahlen der proliferierenden Zellen wurde aus der Anzahl der absoluten Zahlen aus (d) und dem prozentualen Anteil der EdU-positiven Zellen errechnet.

Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

3.3 Expressionsprofile von mononuklären Phagozyten im gesunden und entzündeten Synovialgewebe

In den vorangegangenen Experimenten wurden bereits unterschiedliche Makrophagen-Subtypen im gesunden und erkrankten Gelenk beschrieben. Auf Basis mikroanatomischer und ontogenetischer Analysen konnte gezeigt werden, dass es mindestens zwei residente Makrophagen-Populationen im Synovialgewebe gibt. Das Repertoire der Makrophagen-Subtypen erweitert sich im Fall einer Entzündung durch Infiltration und Differenzierung von Blutmonozyten, die aus dem Knochenmark stammen.

Um mehr über die funktionelle Rolle dieser einzelnen Makrophagen-Populationen zu lernen, wurden die transkriptionellen Profile dieser Zellen durch RNA-Sequenzierungen untersucht. Dazu wurde zum einen das Gesamt-Transkriptom von sortierten synovialen Makrophagen aus gesunden Mäusen analysiert. Zum anderen wurden Einzelzell-RNA-Sequenzierungen von sortierten mononuklären Phagozyten aus gesunden und erkrankten Mäusen durchgeführt.

3.3.1 Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung von synovialen Makrophagen-Subpopulation

Für die Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung wurden synoviale Makrophagen aus gesunden *Cx3cr1^{gfp}*-Mäusen durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung isoliert. Makrophagen wurden als CD45⁺, CD11b⁺, LY6G⁻ und F4/80⁺ definiert. Final wurden CX₃CR1⁺ und daher GFP⁺ Lining-Makrophagen getrennt von den GFP⁻ interstitiellen Makrophagen isoliert.

Kultivierte Makrophagen aus dem Knochenmark (*bone-marrow-derived macrophages*, BMDM) dienten als Kontrolle und entsprachen einem eher undifferenzierten Makrophagen-Typ, welcher keine Stimulation durch Faktoren, die durch das synoviale Gewebe bereit gestellt wurden, erfuhr.

Sequenziert wurde die gesamte RNA, welche aus den sortierten und kultivierten Zellen gewonnen wurde. Hauptkomponentenanalysen zeigten, dass es sich bei den Makrophagen-Subtypen des Synovialgewebes (Lining-Makrophagen vs. Interstitielle Makrophagen) auch auf transkriptioneller Ebene um verschiedene Population handelte. Sowohl die Lining-Makrophagen als auch interstitielle Makrophagen unterschieden sich jedoch stark von *in vitro* differenzierten BMDMs (Abbildung 16).

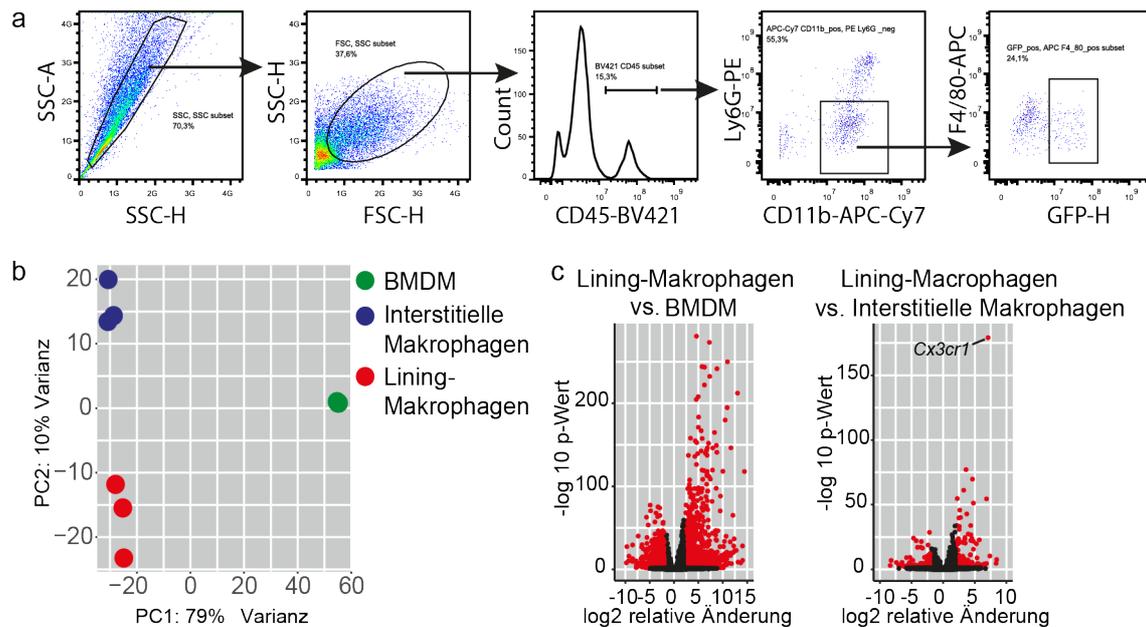


Abbildung 16 RNA-Sequenzierung von sortierten CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen, CX₃CR1⁻ interstitiellen Makrophagen und Knochenmark-abgeleiteten kultivierten Makrophagen

(a) Gating-Strategie zum Sortieren der CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁻ und F4/80⁺, CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen (GFP⁺) sowie CX₃CR1⁻ interstitiellen Makrophagen (GFP⁻).

(b) Hauptkomponentenanalyse von sortierten CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁻ und F4/80⁺, CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen (GFP⁺), CX₃CR1⁻ interstitiellen Makrophagen (GFP⁻) und *in vitro* differenzierten Makrophagen (BMDM).

(c) Differenzielle Genexpressionsanalyse zwischen Lining-Makrophagen und BMDMs sowie zwischen Lining-Makrophagen und interstitiellen Makrophagen. Dargestellt sind die relativen Änderungen der Expression und die korrespondierenden p-Werte. Im Vergleich Lining-Makrophagen vs. BMDMs sind 6189 Gene differenziell mit einem justierten p-Wert von p<0,05 differenziell exprimiert. Im Vergleich Lining-Makrophagen vs. Interstitielle Makrophagen sind 1332 Gene mit einem justierten p-Wert von p<0,05 differenziell exprimiert.

Die differenzielle Genexpression wurde mit DESeq2 analysiert. Der Wald-Test wurde genutzt, um einen zweiseitigen T-Test zu berechnen. Die Justierung der p-Werte erfolgte mit der Benjamini-Hochberg Methode.

Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Die beobachtete unterschiedliche Genexpression der verschiedenen Makrophagen-Populationen betraf eine Vielzahl von Genen. Im Folgenden sollen einige Gene, die als Marker dienen können oder die funktionellen Eigenschaften der Zellen charakterisieren, hervorgehoben werden (Abbildung 17).

Die Detektion der Transkripte von *Ptprc* (CD45), *Itgam* (CD11b), *CD68* und *Adgre* (F4/80) sowie die selektive Expression von *Cx3cr1* bestätigte die Sortierstrategie und die Identifikation der Zellen als Makrophagen.

Vangl2 und *Fat3* sind Gene, die in Zusammenhang mit planarer Zellpolarität beschrieben sind ¹¹⁶⁻¹¹⁸, und entsprechen sowohl dem einschichtigen Wachstum der planaren Einzelzellkultur der BMDM als auch dem membranartigen Charakter der CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen. CX₃CR1⁻ interstitielle Makrophagen exprimieren diese Gene hingegen nicht.

Hohe Expressionslevel für *Sparc*, *Vsig4*, *Itgb5* und *Trem2* sind charakteristisch für CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen. *Sparc* codiert für ein Matrix-Protein¹¹⁹, *Vsig4* besitzt immunmodulatorische Funktionen in Makrophagen¹²⁰ und *Trem2* wird auch in Zusammenhang mit der Pathogenese von Alzheimer beschrieben¹²¹. Außerdem sind in den Lining-Makrophagen Gene wie *Axl* und *Mfge8* differenziell exprimiert, welche für die Aufnahme von apoptotischen Zellen wichtig sind^{122,123}.

Die CX₃CR1⁻ interstitiellen Makrophagen zeichnen sich unter anderem durch hohe Expression von *CD163*, *Pf4* und *Aqp1* aus. *CD163* ist als Scavenger-Rezeptor beschrieben¹²⁴. *Aqp1* codiert für einen Wasserkanal, der die migratorische Funktion von Makrophagen zu regulieren scheint¹²⁵. *Pf4* codiert für das Chemokin CXCL4 und ist an der Auslösung von Immunantworten beteiligt¹²⁶.

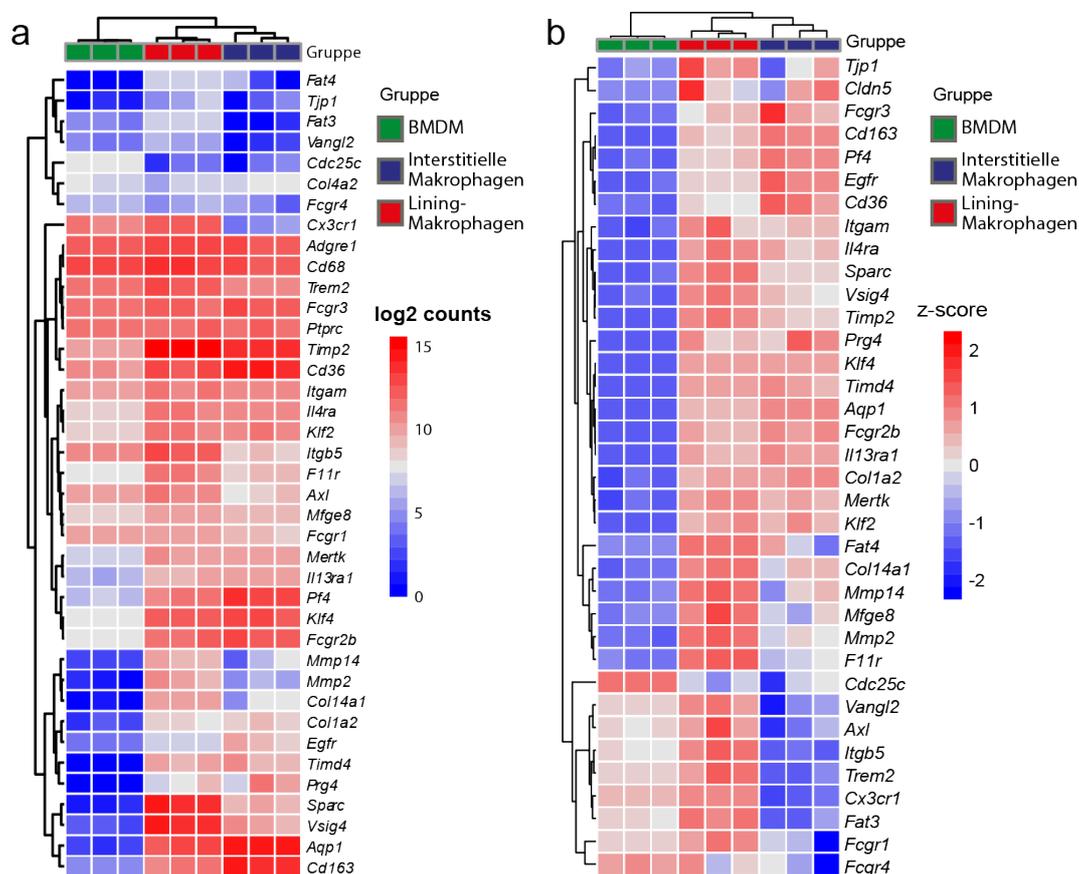


Abbildung 17 Analyse differentieller Genexpression von sortierten Lining-Makrophagen, interstitiellen Makrophagen und BMDM

Hierarchische Gruppierung der log₂ counts (a) und der z-Scores (b) ausgewählter Transkripte von sortierten GFP⁺ Lining-Makrophagen, GFP negativen interstitiellen Makrophagen aus der CX₃CR1^{gfp}-Maus und BMDM einer Wildtyp-Maus.

Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Fc-Rezeptoren für das Antikörper-vermittelte K/BxN-Serumtransfer Modell von großer Bedeutung sind ¹²⁷.

Interessanterweise ist der inhibitorische Fc γ RIIb (*Fcgr2b*) sowohl in CX $_3$ CR1 $^+$ Lining-Makrophagen als auch in CX $_3$ CR1 $^-$ interstitiellen Makrophagen exprimiert.

Der inflammatorische Fc γ RIV (*Fcgr4*) ist generell auf einem recht geringen Level exprimiert. Im Vergleich zu den interstitiellen Makrophagen wiesen die CX $_3$ CR1 $^+$ Lining-Makrophagen jedoch mehr RNA für den Fc γ RIV auf.

Bemerkenswert ist auch die Expression von *Klf2* und *Klf4* in den Gewebemakrophagen im Vergleich zu den BMDMs. Beide Gene sind unter anderem an der transkriptionellen Regulation von Genen beteiligt, die bei der Polarisation von Makrophagen und der Beseitigung von apoptotischen Zellen eine Rolle spielen ^{128,129}.

Besonders interessant war auch die Detektion von Transkripten für Proteine die am Aufbau von Tight Junctions beteiligt sind (Abbildung 18).

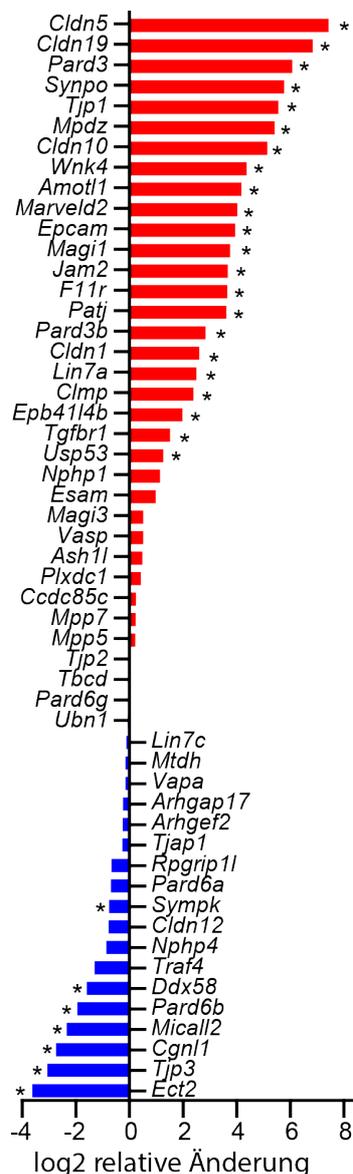


Abbildung 18 Differenzielle Genexpressionsanalyse von Tight Junction-assoziierten Genen

Die Expression von Tight Junction-assoziierten Genen sortierter GFP $^+$ synovialer Lining-Makrophagen der *Cx3cr1^{gfp}*-Maus wurde mit BMDMs verglichen. Dargestellt ist die differenzielle Genexpression als mittlere relative Änderung der log₂ counts der Lining-Makrophagen im Vergleich zu den BMDMs. Die Analyse wurde mit DeSeq2 durchgeführt. Der Wald-Test wurde genutzt, um die 2-seitigen p-Werte zu ermitteln. Die Benjamini-Hochberg Methode wurde für die Justierung der p-Werte für multiple Vergleiche angewendet. *p \leq 0,05. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Tight Junction Protein 1 (*Tjp1*), Claudin-5 (*Cldn5*) sowie weitere Tight Junction-assoziierte Gene waren signifikant höher exprimiert als in BMDMs.

Auch *Marvel2* sollte hierbei erwähnt werden, welches für Tricellulin codiert. Tricellulin ist ein Tight-Junction-Protein, welches sich an der Kontaktstelle von drei benachbarten Zellen befindet¹³⁰.

Tight Junctions sind vor allem dafür bekannt in Epithel und Endothel vorzukommen. Um auszuschließen, dass die Transkripte für Tight Junction-assoziierte Gene durch Kontaminationen mit Epithelzellen oder Endothelzellen zu Stande kamen, wurde die Gating-Strategie zum Sortieren synovialer Makrophagen durch einen „Dump“-Kanal erweitert (Abbildung 19a). Dieser „Dump“-Kanal beinhaltete Antikörper gegen den Endothel-Marker CD31 und den Epithelmarker E-Cadherin und wurde als Ausschlusskriterium beim Sortieren der Makrophagen genutzt. Die RNA der sortierten synovialen Makrophagen wurde aufgereinigt und Transkripte für Tight Junction-Proteine mittels quantitativer RT-PCR quantifiziert. Auch hier konnten Transkripte von *Tjp1*, *Cldn5* und *Cldn10* detektiert werden (Abbildung 19b).

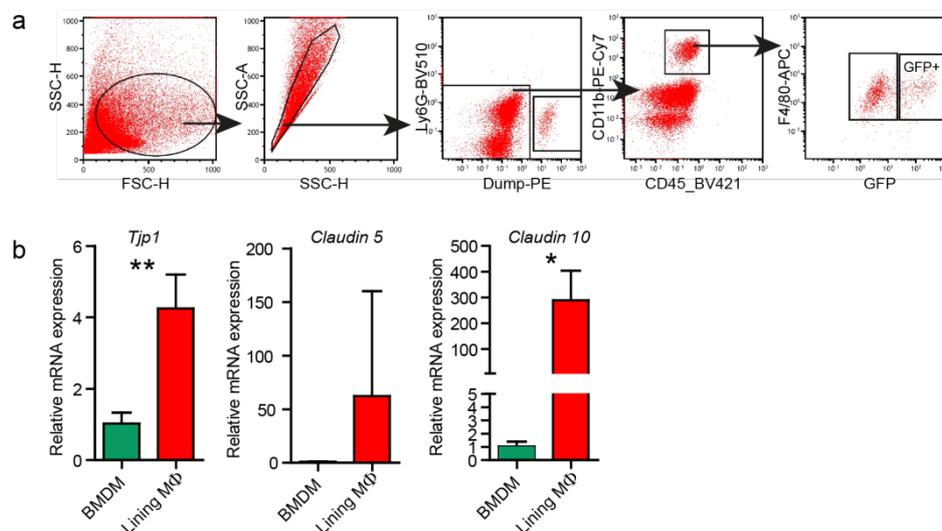


Abbildung 19 Bestätigende quantitative Analyse der Expression von *Tjp1*, *Claudin-5* und *Claudin-10*

Synoviale GFP⁺ Lining-Makrophagen wurden aus den Hinterpfoten von *Cx3cr1^{gfp}*-Mäusen sortiert. Die Gating-Strategie beinhaltete einen „Dump“-Kanal aus anti-CD31 und anti-E-Cadherin zum Ausschluss von endothelialen und epithelialen Kontaminationen. Makrophagen wurden nach Exklusion des Dump-Kanals als CD45⁺, CD11b⁺ und F4/80⁺ definiert. Knochenmarksmakrophagen wurden 5 Tage in MCSF-konditioniertem Medium kultiviert. Es wurde der relative mRNA-Gehalt von *Tjp1*, *Claudin 5* und *Claudin 10* mittels qRT-PCR ermittelt.

Abbildung modifiziert übernommen aus¹.

3.3.2 Einzelzell-RNA-Sequenzierung von mononukleären Phagozyten aus gesundem Synovialgewebe

Die transkriptionelle Heterogenität der synovialen Makrophagen auf Einzelzell-Ebene sollte durch Einzelzell-RNA-Sequenzierung detaillierter analysiert werden. So sollten weitere Subpopulation identifiziert werden, sowie mögliche Differenzierungswege der Zellen aufgeklärt werden.

Dazu bekamen *Cx3cr1^{creER}:tdTomato*-Mäuse vier Wochen vor der Präparation für die Einzelzell-RNA-Sequenzierung einen Tamoxifen-Puls, um die tdTomato-exprimierenden Zellen in den Genexpressionsanalysen identifizieren zu können.

CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁻ mononukleäre Zellen wurden mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung isoliert und die einzelnen Zellen anschließend sequenziert.

Cluster-Analysen basierend auf differenziell exprimierten Genen konnten sechs unterschiedliche Zell-Cluster voneinander abgrenzen (Abbildung 20a).

Mit Hilfe der Expression von *tdTomato* und *Cx3cr1*, *Trem2*, *Sparc* und *Vsig4* konnten die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen als eigenständige Population identifiziert und bestätigt werden. Die interstitiellen Makrophagen waren sehr heterogen und setzten sich aus drei Cluster zusammen, die sich durch die Expression von MHCII-Genen, *Aqp1* und *Retnla* unterschieden. Zusätzlich befanden sich *Acp5*-exprimierende Osteoklastenvorläufer in den sortierten Zellen (Abbildung 20a).

Eine Population von STMN1⁺ proliferierenden Zellen grenzte sich klar von den anderen Populationen ab. Die proliferative Aktivität des STMN1⁺ Clusters konnte durch Gen-Ontologie-Analysen der Marker-Gene des Clusters bekräftigt werden (Abbildung 20b).

Dabei waren Gene für biologische Prozesse wie Zentrosom-Regulation, mitotischem Zellzyklus, Chromatin-Remodeling und Spindelorganisation angereichert.

Da sich die proliferierenden Zellen vor allem durch Expression von Genen, die mit der Zellteilung assoziiert sind, separierten, wurden diese Gene aus den Berechnungen zur Clusterbildung ausgenommen. Dabei verschwand der Proliferations-Cluster (Abbildung 20a).

Die übrigen fünf Cluster blieben erhalten. Die proliferierenden Zellen verteilten sich vor allem in den Clustern der interstitiellen MHCII⁺ oder AQP1⁺ Zellcluster. In den Clustern der CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen und der RELM α ⁺ interstitiellen Makrophagen konnten kaum proliferierenden Zellen ausgemacht werden (Abbildung 20a).

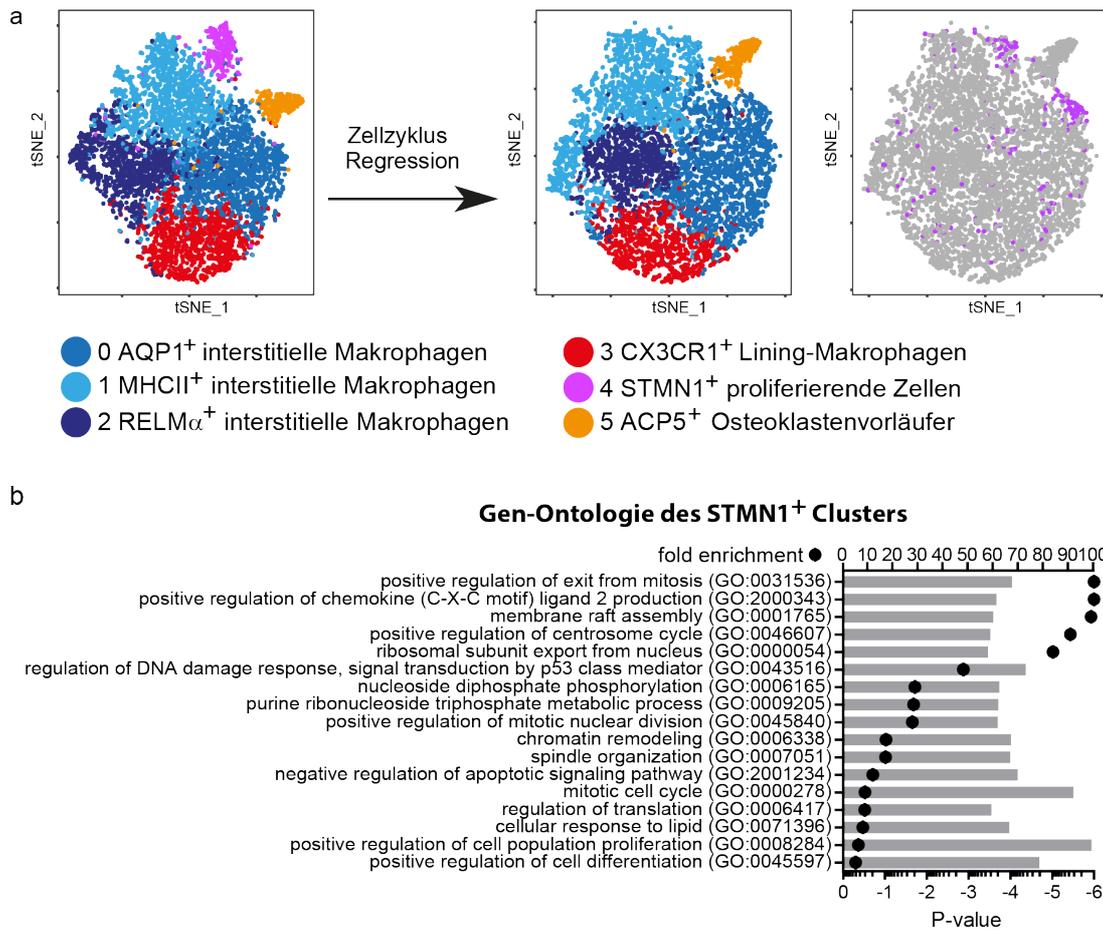


Abbildung 20 Analyse der Einzelzell-RNA-Sequenzierung mononuklärer Phagozyten des gesunden Synovialgewebes

(a) *Cx3cr1^{creER}:tdTomato*-Mäuse erhielten einen Tamoxifen-Puls vier Wochen vor dem Sortieren synovialer CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁻ Phagozyten. Es erfolgte die Einzelzell-RNA-Sequenzierung der Zellen. Die Zellen wurden anhand differenziell exprimierter Gene unterschiedlicher Cluster zugeordnet und mittels *t-distributed stochastic neighbour embedding (t-SNE)* dargestellt. Die Identifizierung der Zellen erfolgte auf Grundlage der charakteristischen Marker-Gene (siehe Tabelle 1). Nach Regression der Zellzyklus-assoziierten Gene verteilten sich die proliferierenden Zellen des STMN1⁺ Clusters vor allem auf die Cluster der MHCII⁺ und Aqp1⁺ Makrophagen.

(b) Anreicherungsanalysen der Gen-Ontologie biologischer Prozesse der Marker-Gene des proliferierenden STMN1⁺ Clusters aus (a). Die Top 51 Markergene des Clusters wurden für den PANTHER Überrepräsentations-Test genutzt und mit einer Referenzliste verglichen, wobei der *Fisher's exact*-Test mit Falscherkennungsrate-Korrektur angewendet wurde.

Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Tabelle 1 Markergene der Cluster der Einzelzell-RNA-Sequenzierung von sortierten synovialen CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻ mononukleären Phagozyten aus dem gesunden Gelenk.

Tabelle modifiziert übernommen aus ¹.

gene	p val	avg logFC	p val adj	cluster
App1	2.08E-	0.6736365	1.60E-122	0
Fxyd2	9.21E-	0.5703077	7.08E-113	0
Tppp3	6.33E-76	0.531636	4.87E-72	0
Cd9	5.34E-68	0.3820029	4.11E-64	0
Lvve1	4.71E-33	0.3407805	3.63E-29	0
Anxa1	6.94E-33	0.3828428	5.34E-29	0
Cyb5r3	3.85E-18	0.3480845	2.96E-14	0
Ifi272a	7.85E-18	0.3258748	6.04E-14	0
H2-Ab1	0	1.3123438	0	1
H2-Eb1	0	1.2994284	0	1
H2-Aa	0	1.2754512	0	1
Cd74	0	1.2564388	0	1
H2-DMa	6.07E-	1.0761156	4.67E-174	1
Cd52	3.26E-	0.8869993	2.51E-124	1
Mgl2	1.18E-	0.8693339	9.09E-100	1
S100a11	1.79E-32	0.4324623	1.38E-28	1
Gm2a	9.77E-23	0.3715456	7.52E-19	1
Lsp1	2.60E-17	0.3379984	2.00E-13	1
Coro1a	1.50E-16	0.3294116	1.18E-12	1
Pim1	3.48E-15	0.2763688	2.67E-11	1
Retnla	6.93E-12	0.2607837	5.33E-08	1
Clec4a2	2.98E-11	0.2630623	2.30E-07	1
Ccl8	8.91E-	1.1374496	6.86E-138	2
Ccl2	1.54E-	0.9616653	1.19E-124	2
Ccl7	9.39E-	1.1044551	7.22E-113	2
Cxcl2	3.55E-97	0.9394747	2.73E-93	2
Dusp1	2.99E-79	0.6288709	2.30E-75	2
Zfp36	1.63E-78	0.7146728	1.26E-74	2
Junb	9.58E-70	0.5732462	7.37E-66	2
Pf4	2.63E-68	0.3012539	2.03E-64	2
Fos	2.19E-64	0.5065967	1.69E-60	2
Aif3	5.18E-61	0.6610085	3.99E-57	2
Mt1	6.69E-59	0.4704272	5.15E-55	2
Ier3	1.99E-54	0.6134144	1.53E-50	2
Ccl4	2.98E-45	0.7144859	2.30E-41	2
Nfkbia	2.77E-42	0.5056772	2.13E-38	2
Retnla	1.94E-40	0.5362326	1.49E-36	2
Ccl24	9.89E-40	0.553219	7.61E-36	2
Marcksl1	7.71E-37	0.5512683	5.93E-33	2
Cxcl13	1.42E-36	0.7281834	1.09E-32	2
Jun	1.75E-35	0.4773535	1.35E-31	2
Ccl3	6.74E-34	0.5196627	5.18E-30	2
Mt2	7.36E-27	0.4592874	5.66E-23	2
Klf6	6.45E-26	0.361174	4.96E-22	2
Pim1	1.63E-22	0.4248209	1.25E-18	2
Ccl6	2.15E-22	0.289203	1.65E-18	2
Ifitm3	5.86E-21	0.3947271	4.51E-17	2
Cd83	1.69E-20	0.4418688	1.30E-16	2
Itq2	1.49E-17	0.3903928	1.14E-13	2
Klf4	3.33E-17	0.3584172	2.56E-13	2
Hspa1a	5.42E-16	0.3506177	4.17E-12	2
Ubc	2.87E-14	0.2802804	2.21E-10	2
Ier2	3.30E-13	0.3135671	2.54E-09	2
Mrc1	8.83E-13	0.2681005	6.79E-09	2
Mcl1	7.76E-11	0.2839753	5.97E-07	2
Maf	6.37E-10	0.2606169	4.90E-06	2
Vsig4	4.40E-	0.8613897	3.39E-197	3
Sparg	2.19E-	0.9223244	1.69E-174	3
Ctsd	6.78E-	0.7790815	5.22E-163	3
Lyz2	3.16E-	0.3679368	2.43E-138	3
Srrg	5.64E-	0.6431507	4.34E-129	3
S100b	6.10E-	0.9235882	4.69E-110	3
Fn1	1.48E-	0.7875353	1.14E-100	3
TdTomato	3.36E-	0.6282756	2.58E-97	3
Apoe	1.59E-82	0.4970414	1.22E-78	3
Wfdc17	1.85E-61	0.3771949	1.43E-57	3
Hexb	4.49E-53	0.5332315	3.45E-49	3
Nupr1	1.52E-48	0.5209451	1.17E-44	3
Gm	1.41E-39	0.3273935	1.08E-35	3
Ltd4s	9.73E-30	0.4091973	7.49E-26	3
Trem2	6.08E-26	0.3027722	4.68E-22	3
Synqr1	7.69E-25	0.4302726	5.91E-21	3
Cd68	8.63E-20	0.2854543	6.64E-16	3
Folr2	3.43E-19	0.2723361	2.64E-15	3
Tmem37	1.45E-18	0.3606988	1.12E-14	3
Camk1	4.37E-18	0.3407961	3.36E-14	3
Pltp	1.11E-16	0.2589247	8.54E-13	3
Timp2	5.52E-16	0.2881948	4.25E-12	3
Nfkbia	3.28E-15	0.2785373	2.52E-11	3
Cd83	1.55E-12	0.2532039	1.19E-08	3
Ccl3	1.05E-11	0.3282611	8.04E-08	3
Cbr2	2.40E-10	0.2831758	1.85E-06	3
Man2b1	3.07E-10	0.2506817	2.36E-06	3

gene	p val	avg logFC	p val adj	cluster
Stmn1	0	1.9883782	0	4
Ube2c	0	1.5257583	0	4
Birc5	0	1.5035044	0	4
Tubb5	1.91E-90	1.1612494	1.47E-86	4
Hmqb2	4.02E-84	1.3042904	3.09E-80	4
Tube1b	1.19E-51	0.9465081	9.16E-48	4
Tubb4b	9.46E-51	0.9793549	7.28E-47	4
Ptma	2.27E-41	0.6109267	1.75E-37	4
H2afz	8.42E-41	0.7556469	6.48E-37	4
Vim	6.50E-20	0.3351131	5.00E-16	4
Tube1c	8.21E-20	0.686901	6.32E-16	4
S100a10	1.68E-19	0.3718145	1.29E-15	4
Ran	2.19E-19	0.6049653	1.69E-15	4
Tmsb10	3.32E-19	0.7790258	2.56E-15	4
Hmqb1	1.70E-18	0.5692362	1.31E-14	4
Rbm3	2.71E-15	0.4156219	2.09E-11	4
Jpt1	6.26E-15	0.5551576	4.81E-11	4
Txn1	9.75E-14	0.3903175	7.50E-10	4
S100a11	1.20E-13	0.4070792	9.24E-10	4
Arl6ip1	6.53E-13	0.5886488	5.02E-09	4
Pkm	5.57E-12	0.4473849	4.28E-08	4
Tagln2	9.40E-12	0.4175422	7.23E-08	4
Lgals1	1.37E-09	0.2828733	1.06E-05	4
Anxa2	1.66E-09	0.2961342	1.28E-05	4
Nme1	8.69E-09	0.3816342	6.69E-05	4
Gapdh	9.22E-09	0.2811553	7.09E-05	4
Anxa1	1.04E-08	0.32088	8.01E-05	4
Ranbp1	1.88E-08	0.4794453	0.0001444	4
Lgals3	3.11E-08	0.3503709	0.0002393	4
Slc25a5	9.81E-08	0.2985713	0.0007546	4
Hnrnpa3	3.08E-07	0.3332675	0.0023683	4
Snrpe	9.18E-07	0.3444897	0.0070639	4
Cbx3	3.78E-06	0.3421318	0.0290823	4
Cd74	3.93E-06	0.2600467	0.0301999	4
Ncl	4.62E-06	0.3497589	0.0355218	4
Snrpg	5.04E-06	0.3364192	0.0387422	4
Acp5	0	3.319558	0	5
Ctsk	0	3.2098538	0	5
Mmp9	0	2.9319411	0	5
Atp6v0d2	0	1.6317394	0	5
Atp6v1a1	1.03E-32	0.714602	7.90E-29	5
Atp6v1b2	3.61E-32	0.8484075	2.78E-28	5
S100a4	2.88E-24	0.3580755	2.22E-20	5
Rplp0	2.24E-21	0.3789065	1.72E-17	5
Atp6v0e	1.59E-19	0.5791218	1.22E-15	5
Clec12a	2.15E-19	0.6797228	1.65E-15	5
Atp5b	5.04E-19	0.5895514	3.88E-15	5
Atp6ap2	4.55E-18	0.6521125	3.50E-14	5
Txn1	5.73E-18	0.5953859	4.41E-14	5
Aldoa	2.06E-16	0.5445913	1.59E-12	5
Vim	7.63E-16	0.3266097	5.87E-12	5
Cstb	3.91E-14	0.4908419	3.01E-10	5
Mdn2	4.74E-13	0.5192962	3.64E-09	5
Atp5a3	2.82E-12	0.548405	2.17E-08	5
Sh3bpl3	3.88E-12	0.2901452	2.98E-08	5
Mrp152	4.78E-12	0.4990309	3.67E-08	5
Atp6v0b	1.01E-11	0.4278917	7.75E-08	5
Uqcrl0	2.98E-11	0.4624327	2.29E-07	5
Rps8	4.25E-11	0.2593157	3.27E-07	5
Rps19	1.35E-10	0.2506816	1.04E-06	5
Ndufb5	1.62E-10	0.4361181	1.25E-06	5
Slc25a3	1.73E-10	0.3565163	1.33E-06	5
Uqcrls1	1.81E-10	0.4944496	1.40E-06	5
Cox5a	3.70E-10	0.3842793	2.85E-06	5
Rps13	3.78E-10	0.2747031	2.91E-06	5
Atp5c1	6.70E-10	0.4545524	5.16E-06	5
Rps16	1.14E-09	0.2777837	8.74E-06	5
Cox6b1	1.18E-09	0.3151552	9.10E-06	5
Mdh1	2.11E-09	0.4637367	1.62E-05	5
Ccl9	2.52E-09	0.3447143	1.94E-05	5
Slc25a4	2.27E-08	0.3759794	0.0001746	5
Cvcs	1.09E-07	0.4182443	0.0008364	5
Atp5a1	1.37E-07	0.4350791	0.0010554	5
Ndufab1	1.49E-07	0.3768366	0.0011467	5
Gpr137b	2.55E-07	0.3731087	0.0019642	5
Atp5o	2.65E-07	0.3711643	0.0020417	5
Rps7	3.84E-07	0.270865	0.002953	5
Ndufv2	4.61E-07	0.3838279	0.0035454	5
Arf1	5.91E-07	0.3578269	0.0045439	5
Rpl36al	6.23E-07	0.346795	0.0047959	5
Slc25a5	8.31E-07	0.3103557	0.0063954	5
Npm1	9.10E-07	0.3250698	0.0070003	5
Rpl10a	1.29E-06	0.2620756	0.0099586	5
Ndufb8	2.06E-06	0.3234848	0.0158748	5
Uqcrlb	5.78E-06	0.285285	0.0444756	5

3.3.3 Transkriptom-basierte Rekonstruktion der Entwicklungsbahn residenter Synovialmakrophagen

Um zu untersuchen, ob sich die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen und RELM α ⁺ interstitiellen Makrophagen von den MHCII⁺ und Aqp1⁺ Makrophagen ableiten, wurden Pseudotime-Analysen durchgeführt.

Dabei wird auf Basis von differenziell exprimierten Genen der einzelnen Cluster eine Entwicklungsbahn erlernt. Diese Entwicklungsbahn besitzt einen Anfang und kann sich im Verlauf aufspalten. Aufspaltungen entsprechen dabei unterschiedlichen Differenzierungswegen, die eine Zelle durchlaufen kann.

Die Pseudotime ist eine abstrakte Einheit und entspricht der Distanz zwischen einer Zelle und dem Beginn der erlernten Entwicklungsbahn. Zu diesem Zweck wurden die analysierten Zellen zunächst wieder in Cluster gruppiert und Veränderungen der Genexpression im Verlauf des Differenzierungsprozesses als Funktion der Pseudotime berechnet.

Es ergaben sich zwei kleine Cluster aus CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen und RELM α ⁺ interstitiellen Makrophagen sowie ein großer Cluster, der sich durch die Expression von MHCII Genen und *Aqp1* auszeichnete. Diese Gruppierung wurde verwendet, um die Entwicklungsbahn zu berechnen (Abbildung 21).

Der MHCII⁺ Cluster stellt den Anfang der Entwicklungsbahn dar, spaltet sich auf und endet entweder als Cluster der CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen oder RELM α ⁺ Cluster.

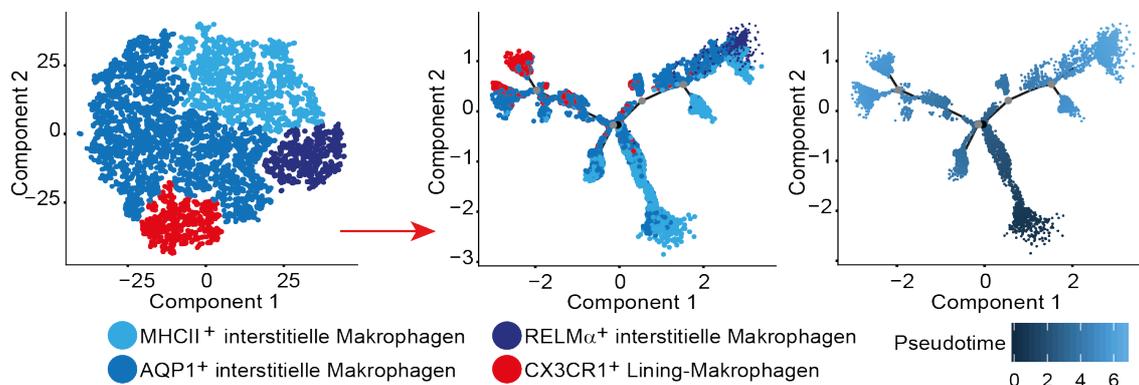


Abbildung 21 Entwicklungsbahn synovialer Gewebemakrophagen

Synoviale CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁻ Zellen wurden aus gesunden Gelenken sortiert und Einzelzell-RNA-Sequenzierung unterzogen. Zur Analyse der Differenzierung der residenten Makrophagen und der Generierung der Entwicklungsbahn wurde der Cluster der Osteoklasten-Vorläufer exkludiert und die Zellen im *t-SNE*-Diagramm dargestellt. Clusteranalysen zu Marker-Genen definierten vier unterschiedliche Zellpopulationen. Anhand der Marker der Cluster wurde eine Entwicklungsbahn (mittig und rechts) erlernt, welche ihren Ursprung bei den MHCII⁺ interstitiellen Makrophagen hat. Über den Cluster der AQP1⁺ interstitiellen Makrophagen finden die Makrophagen im Cluster der RELM α ⁺ interstitiellen Makrophagen oder im Cluster der CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen ihren Endpunkt der Differenzierung.

Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Die Darstellung der differenziell exprimierten Gene als Funktion der Pseudotime zeigt, dass veränderte Expressionsmuster der Zellen im Differenzierungsverlauf (Abbildung 22). Der Beginn der Entwicklungsbahn ist durch die Expression von Proliferation-assoziierten Genen wie *Cdk1*, *Mki67* und *Stmn1* gekennzeichnet und bestätigt den errechneten Startpunkt für den Differenzierungsprozess (Abbildung 21 und Abbildung 22).

Die Zellen dieses „jungen“ Stadiums zeichnen sich zudem durch eine geringe Expression des Makrophagenmarkers CD68 und die Expression von MHCII Genen aus.

Maf und *Mafb* sind Gene, die bei proliferierenden Makrophagen kaum und bei Differenzierung vermehrt exprimiert werden^{57,131}. Die geringe Expression von *Maf* und *Mafb* am Anfang und der Anstieg im Verlauf der Pseudotime validiert die erlernte Entwicklungsbahn zunehmend.

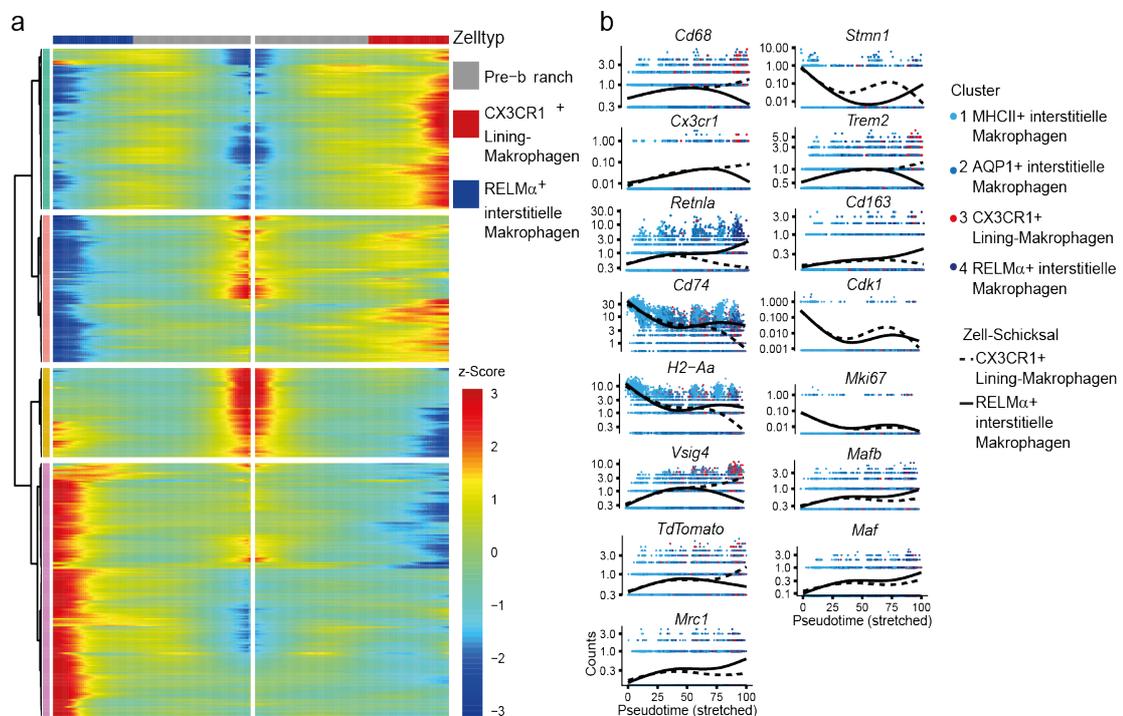


Abbildung 22 Differenzielle Genexpressionsanalyse als Funktion der Pseudotime

(a) Hierarchische Gruppierung differenziell exprimierter Gene unter Berücksichtigung der Aufspaltung der Entwicklungsbahn. Die Genexpression ist als Funktion der Pseudotime dargestellt, wobei der „Pre-branch“-Bereich Ursprung des gemeinsamen Differenzierungsweges darstellt. Da sich die Entwicklungsbahn aufspaltet ist die Genexpression für die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen (rot) rechts und für die RELMα⁺ interstitiellen Makrophagen (dunkelblau) links des „Pre-branch“ Bereiches abgebildet.

(b) Veränderung der Genexpression ausgewählter Marker-Gene als Funktion der Pseudotime. Die Linien entsprechen der mittleren Genexpression der Zellen, wobei gestrichelte Linien die Differenzierung zu Lining-Makrophagen und durchgezogene Linien die Differenzierung zu RELMα⁺ interstitiellen Makrophagen abbilden.

Abbildung modifiziert übernommen aus¹.

Die Expression von *tdTomato*, *Cx3cr1*, *Trem2* und *Vsig4* nimmt im Verlauf der Pseudotime zu, wird jedoch nach Aufspaltung der Entwicklungsbahn vor allem im CX₃CR1⁺ Lining-Cluster exprimiert. Der Endpunkt des RELM α ⁺ Clusters zeichnet sich durch die Expression von *Retnla*, *CD163* und *Mrc1* aus.

Die erlernte Entwicklungsbahn der synovialen Makrophagen ist ein errechnetes Modell, das weitere Validierungen erforderte. So musste bestätigt werden, dass die Lining-Makrophagen und die RELM α ⁺ interstitiellen Makrophagen tatsächlich Endpunkte eines Differenzierungsprozesses sind, welcher in proliferierenden MHCII⁺ Zellen ihren Ursprung hatten.

3.3.4 Evaluierung der Entwicklungsbahn residenter Makrophagen-Subtypen

Im vorangegangenen Experiment mit *Csf1r^{creER}:tdTomato*-Mäusen, welche Tamoxifen-Futter für 5 Tage, 4 Wochen und 6 Wochen bekamen, konnte gezeigt werden, dass der Anteil der tdTomato positiven Zellen mit der Zeit linear zunahm (Abbildung 9). Die gleichen Proben wurden nun genutzt, um die tdTomato Expression in den RELM α ⁺ Makrophagen zu untersuchen.

Geht man auf Grund der erlernten Entwicklungsbahn davon aus, dass die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen und die interstitiellen RELM α ⁺ Makrophagen-Subpopulation als Endpunkte eines Differenzierungsprozesses ausgehend von den MHCII⁺ Vorläuferzellen zu verstehen sind, so sollte der Anteil tdTomato⁺ Zellen mit der Zeit zunehmen.

In der Tat war nach 5 Tagen nur ein geringer Anteil der RELM α ⁺ Zellen auch tdTomato positiv. Dieser Anteil nahm im Verlauf der Tamoxifen-Behandlung zu. Die Hälfte der RELM α ⁺ Makrophagen exprimierte nach 4 Wochen tdTomato. Ein anderes Muster der tdTomato Expression ergab sich bei den MHCII⁺ Makrophagen. Hier waren alle Zellen schon nach 5 Tagen tdTomato positiv.

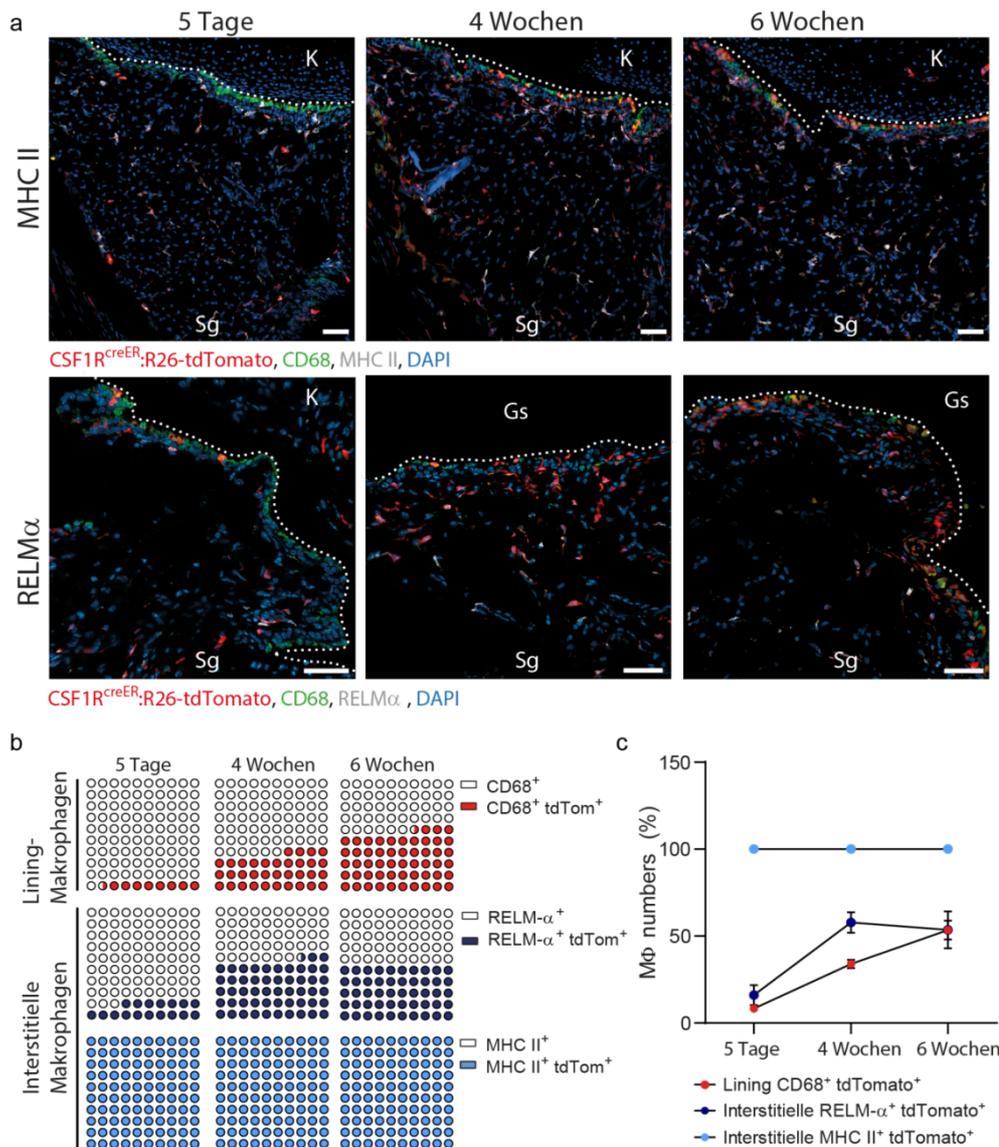


Abbildung 23 Longitudinale tdTomato-Expression in Lining-Makrophagen und RELM α ⁺ interstitielle Makrophagen der *Csf1r^{creER}:tdTomato*-Mäuse

(a) Repräsentative Bright-field-Fluoreszenzmikroskopie (BFM) von Synovialgewebe der *Csf1r^{creER}:tdTomato*-Mäuse 5 Tage, 4 Wochen und 6 Wochen nach Behandlungsbeginn mit Tamoxifen-Futter. Erfolgreiche *csf1r*-Promotor abhängige Rekombination stellt sich durch tdTomato-Expression (rot) dar. RELM α ⁺ interstitielle Makrophagen (RELM α , weiß; oben) und MHCII⁺ interstitielle Makrophagen (MHCII, weiß, unten) exprimieren CD68 (grün). K: Knorpel, Gs: Gelenkspalt, Sg: Synovialgewebe. Größenbalken, 50 μ m.

(b) und (c) Quantifizierung der Anteile tdTomato⁺ Zellen innerhalb der Lining-Makrophagen und der beiden interstitiellen Populationen der MHCII⁺ und RELM α ⁺ Makrophagen. Die Quantifizierung erfolgte anhand der BFM Aufnahmen aus (a), n = 3 Mäuse pro Gruppe, Mittelwert \pm Standardfehler.

Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Cx3cr1^{creER}:tdTomato-Mäuse, welche 4 Wochen zuvor einen Tamoxifen-Puls erhielten, legen nahe, dass die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen nicht zu RELM α ⁺ Makrophagen differenzieren können, da kein tdTomato in interstitiellen Makrophagen dieser Tiere detektiert werden konnten (Abbildung 13).

Ob RELM α ⁺ Makrophagen zu CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen differenzieren können, wurde mit Hilfe der *Retnla^{cre}:tdTomato*-Maus geklärt. Diese Maus rekombiniert in allen Zellen die *Retnla* exprimieren¹³². Somit sind alle Zellen die jemals *Retnla* exprimierten tdTomato positiv.

Histologische Analysen der Synovialmembran dieser Tiere konnten zeigen, dass nur wenige Zellen der Lining-Makrophagen tatsächlich tdTomato⁺ sind. Da es sich um eine konstitutiv aktive (und nicht induzierbare) cre-Rekombinase handelt und es sich um adulte Mäuse handelte, kann davon ausgegangen werden, dass RELM α ⁺ interstitielle Makrophagen nicht generell zu Lining-Makrophagen differenzieren.

Depletionsexperimente mit *LysM^{cre}:CD115DTR*-Mäuse¹³³ sollten klären, ob die *Csf1r* exprimierenden MHCII⁺ Makrophagen die Vorläufer der Lining-Makrophagen und der RELM α ⁺ interstitiellen Makrophagen sind. *LysM^{cre}:CD115DTR*-Mäuse exprimieren die cre-Rekombinase unter Kontrolle eines LysM-Promotors. LysM wird in Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten exprimiert¹³⁴.

Zusätzlich sind diese Mäuse transgen für einen Diphtherie-Toxin Rezeptor (DTR), der unter Kontrolle des *Csf1r*-Promotors steht und eine STOP-Kassette besitzt. Die Expression der cre-Rekombinase ermöglicht das Entfernen der STOP-Kassette im Promotor des DTR. Nur wenn eine Zelle auch *Csf1r* exprimiert, kann auch der DTR exprimiert werden. Den Tieren wurde dreimal pro Woche Diphtherietoxin bis zum Tag 10

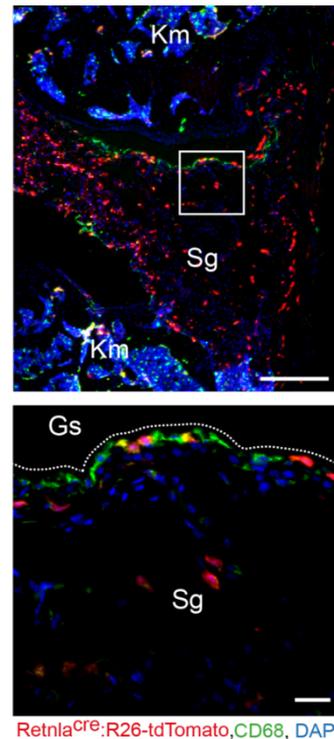


Abbildung 24 Synvoailgewebe der *Retnla^{cre}:tdTomato* Maus

Representative Bright-field-Fluoreszenz-mikroskopie von Synovialgewebe der Kniegelenke der *Retnla^{cre}:tdTomato* Maus zeigt tdTomato (rot) Expression in synovialen Makrophagen (CD68, grün). Sg: Synovialgewebe, Km: Knochenmark, Gs: Gelenkspalt. Größenbalken, 250 μ m (oben) und 25 μ m (unten).

Abbildung modifiziert übernommen aus¹.

injiziert. Analysiert wurden Synovialmembranen der Tiere an den Tagen 0, 12 und 23 (Abbildung 25a).

Hierbei zeigte sich, dass nach 12 Tagen fast alle MHCII⁺ Makrophagen aber nur 50% der Lining-Makrophagen depletiert waren (Abbildung 25b,c). Am Tag 23, also 13 Tage nach Beendigung der Diphtherietoxin-Behandlung, gab es nur noch 25% der ursprünglichen Lining-Makrophagen. Die Anzahl der MHCII⁺ Makrophagen stieg jedoch wieder auf ca. 70% der ursprünglichen Population an. Dieses Experiment zeigt, dass die Population der Lining-Makrophagen von MHCII⁺ Makrophagen aufgefüllt wird. Depletiert man die MHCII⁺ *Csf1r*-exprimierenden Makrophagen fehlt der Nachschub für die Lining-Makrophagen.

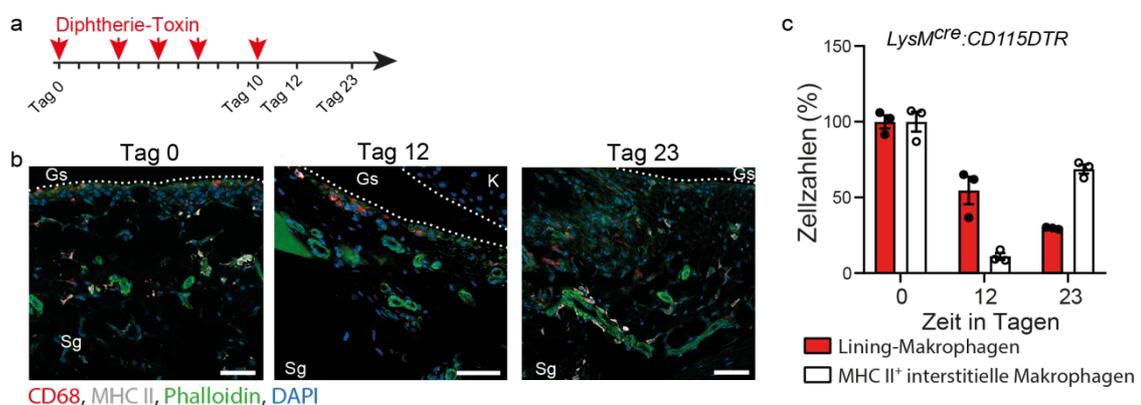


Abbildung 25 Depletion synovialer Makrophagenvorläufer in *LysM^{cre}:CD115DTR*-Mäusen

(a) Behandlungsstrategie zur Depletion LysM und CSF1R-exprimierender Zellen in *LysM^{cre}:CD115DTR*-Mäusen. Diphtherietoxin wurde 3 mal wöchentlich intraperitoneal injiziert. Die Diphtherietoxin-Behandlung erfolgte bis zum Tag 10 nach Beginn. Synovialgewebe der Kniegelenke der Tiere wurde an den Tagen 0, 12 und 23 analysiert.

(b) Bright-field-Fluoreszenzmikroskopie von Synovialgewebe an Tag 0, 12 und 23. Makrophagen wurden durch Anti-CD68 Antikörper markiert. Anti-MHCII Antikörper identifizieren die MHCII⁺ interstitiellen Makrophagen (weiß). Gs: Gelenkspalt, K: Knorpel, Sg: Synovialgewebe. Größenbalken, 50µm

(c) Quantifizierung der prozentualen Anteile von Lining-Makrophagen und MHCII⁺ interstitiellen Makrophagen nach Diphtheritoxin-Behandlung normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle an Tag 0. n = 3 technische Replikate, Mittelwert ± Standardfehler.

Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

3.3.5 Transkriptionsprofile mononukleärer Phagozyten während der Gelenkentzündung

Um festzustellen, wie sich die Zusammensetzung der verschiedenen Makrophagen-Subtypen und deren transkriptionelle Profile im entzündeten Gelenk verändern, wurden Einzelzell-RNA-Sequenzierungen von mononukleären Phagozyten unterschiedlicher Zeitpunkte nach Induktion der Gelenkentzündung durchgeführt.

Dazu bekamen *Cx3cr1^{creER}:tdTomato*-Mäuse einen Tamoxifen-Puls. Nach vier Wochen wurde durch K/BxN Serumtransfer die Gelenkentzündung induziert. An den Tagen 1, 2 und 5 nach Serumtransfer wurden CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁻ mononukleäre Phagozyten sortiert und einer Einzelzell-RNA-Sequenzierung unterzogen. An allen Tagen fanden sich die bereits im gesunden Zustand beschriebenen gewebesresidenten Makrophagen wieder (Abbildung 26, Abbildung 27, Abbildung 28).

Trotz der zunehmend inflammatorischen Umgebung zeichneten sich die Lining-Makrophagen auch hier durch die Expression von Genen wie *tdTomato* und *Sparc* aus und behielten ihren immunregulatorischen Phänotyp bei, welcher sich durch Expression von *Trem2*, *Vsig4* und die hohe Expression von Rezeptoren, welche die Beseitigung von apoptotischen Zellen vermitteln, auszeichnet.

Die beiden interstitiellen Makrophagen-Populationen wurden erneut durch Expression von *Retnla*, *Mrc1* und *CD163* (RELM α^+ interstitielle Makrophagen) bzw. die Expression von MHCII Genen (MHCII+ interstitielle Makrophagen) identifiziert.

An Tag 1 und Tag 5 konnte sich ein Cluster proliferierender *Stmn1*-exprimierender Zellen abgrenzen (Abbildung 26, Abbildung 28).

Durch die Induktion der Arthritis erweiterte sich das Repertoire der mononukleären Phagozyten durch infiltrierende Zellen. Diese zeichneten sich vor allem durch die Expression von *Ccr2* aus. An den Tagen 1, 2 und 5 konnte jeweils ein großer CCR2⁺ Cluster mit hoher Expression von MHCII-assoziierten Genen gefunden werden (Abbildung 29).

An den Tagen 1 und 2 separierte sich ein CCR2⁺ Cluster, der sich durch die Expression von *Hp*, *Plac8* und *Ly6c2* auszeichnet. Diese Gene werden vor allem auf Monozyten exprimiert¹³⁵. An Tag 5 waren diese Gene im Cluster der infiltrierenden CCR2⁺ Makrophagen integriert. Am Tag 5 fand sich zusätzlich ein CCR2⁺ Cluster mit dendritischen Zellen, die sich durch eine sehr hohe Expression von MHCII-assoziierten Genen und *Itgax* (CD11c) auszeichneten.

Das proinflammatorische Interleukin-1 β war vor allem in den CCR2⁺ MHCII-exprimierenden infiltrierenden Zellen exprimiert. Wobei sich die Zahl der IL-1 β -exprimierenden Makrophagen von Tag 1 über Tag 2 zu Tag 5 kontinuierlich erhöhte (Abbildung 29). An Tag 5 diversifizierte sich der Cluster der CCR2⁺ infiltrierenden Makrophagen und teilt sich in zwei Cluster auf, wobei einer unter anderem durch die Expression von IL-1 β charakterisiert ist. Der zweiten Cluster der CCR2⁺ infiltrierenden Makrophagen fällt vor allem durch die Expression von *Arg1* auf (Abbildung 28).

Arg1, *Retn1a* und *Chil3* sind Marker für alternativ aktivierte Makrophagen¹³⁶. Interessanterweise sind alle drei Gene als Marker-Gene detektiert worden, befinden sich jedoch alle in unterschiedlichen Clustern. *Chil3* befindet sich im Cluster der infiltrierenden CCR2⁺, IL-1 β -exprimierenden Zellen, *Arg1* in einem separaten IL-1 β negativen CCR2⁺ infiltrierenden Cluster und *Retn1a* wird als Marker einer interstitiellen residenten Makrophagen-Population herangezogen, welche mit der Expression von *CD163* und *Mrc1* (CD206) weitere Merkmale alternativer Aktivierung aufweist.

Mfge8 und *Axl*-exprimierende Zellen finden sich vor allem im Cluster der *Cx3cr1*-exprimierenden Lining-Makrophagen wieder und legen nahe, dass diese am Prozess der Phagozytose apoptotischer Zellen beteiligt sind.

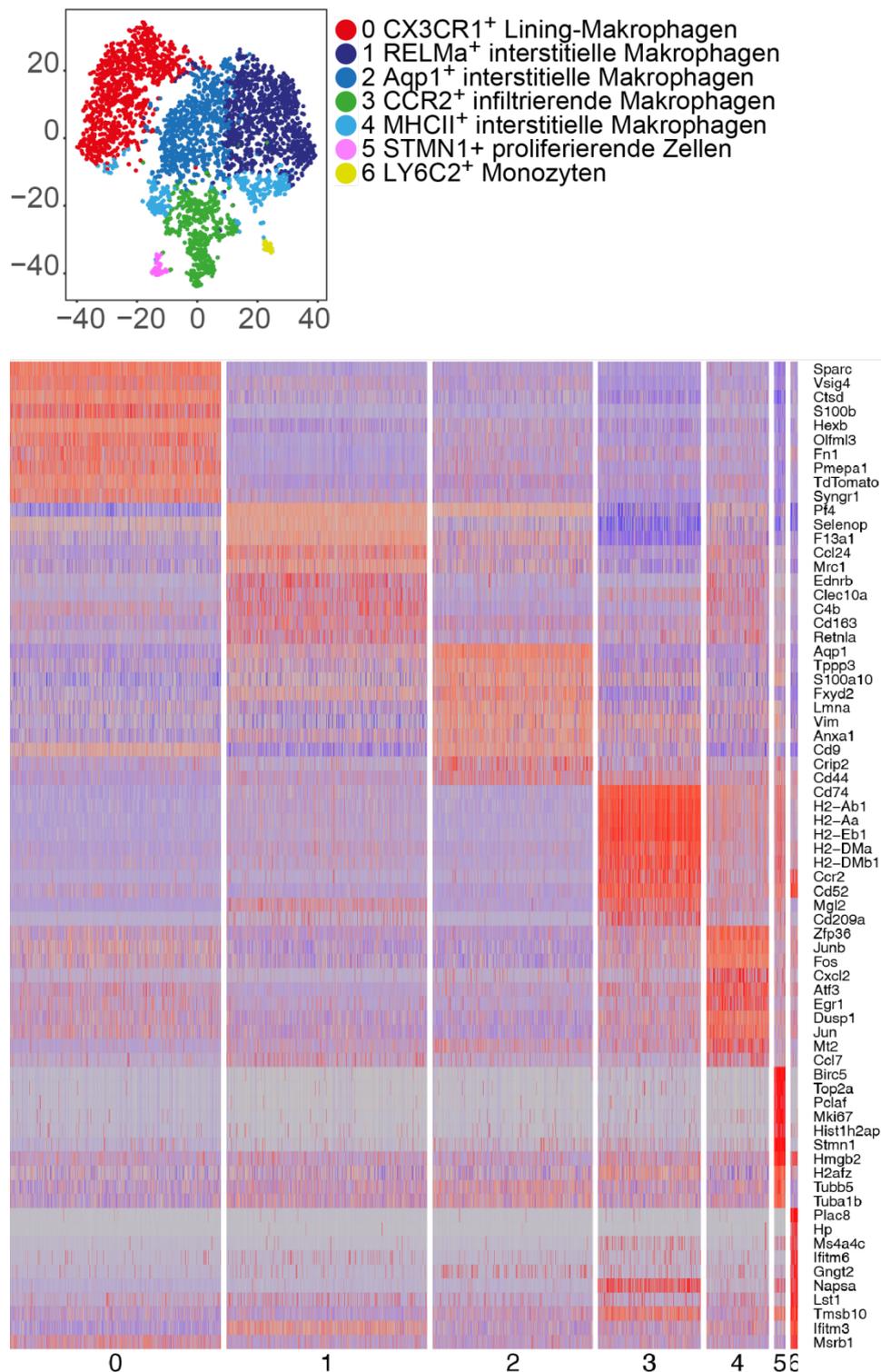


Abbildung 26 Einzelzell-Transkriptionsprofil von sortierten CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻ Zellen an Tag 1 nach K/BxN Serumtransfer

Cx3cr1^{creER}:tdTomato-Mäuse erhielten einen Tamoxifen-Puls. Vier Wochen später wurde durch Injektion von K/BxN Serum eine Arthritis induziert. Einen Tag nach Serumtransfer wurden CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻ Zellen einer Hinterpfote sortiert und der Einzelzell-Sequenzierung unterzogen.

(a) Einzelne Zellen wurden anhand ihres Expressionsmusters gruppiert und als *t-distributed stochastic neighbour embedding (t-SNE)*-Diagramm dargestellt.

(b) Die 10 bedeutendsten differenziell exprimierten Gene der einzelnen Cluster aus (a).

Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

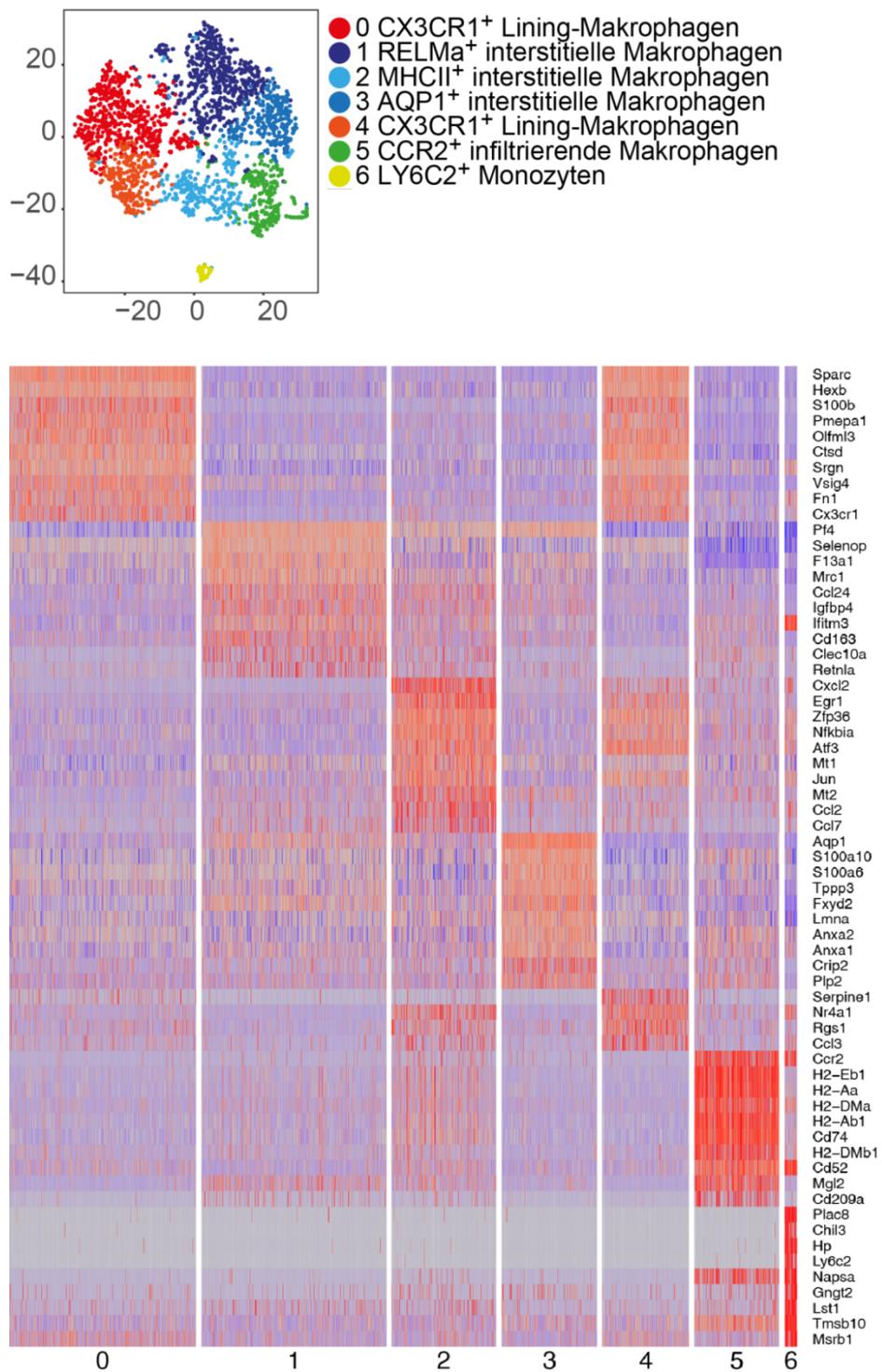


Abbildung 27 Einzelzell-Transkriptionsprofil von sortierten CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻ Zellen an Tag 2 nach K/BxN Serumtransfer

Cx3cr1^{creER};tdTomato-Mäuse erhielten einen Tamoxifen-Puls. Vier Wochen später wurde durch Injektion von K/BxN Serum eine Arthritis induziert. Zwei Tage nach Serumtransfer wurden CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻ Zellen einer Hinterpfote sortiert und der Einzelzell-Sequenzierung unterzogen.

(a) Einzelne Zellen wurden anhand ihres Expressionsmusters gruppiert und als *t-distributed stochastic neighbour embedding (t-SNE)*-Diagramm dargestellt.

(b) Die 10 bedeutendsten differenziell exprimierten Gene der einzelnen Cluster aus (a). Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

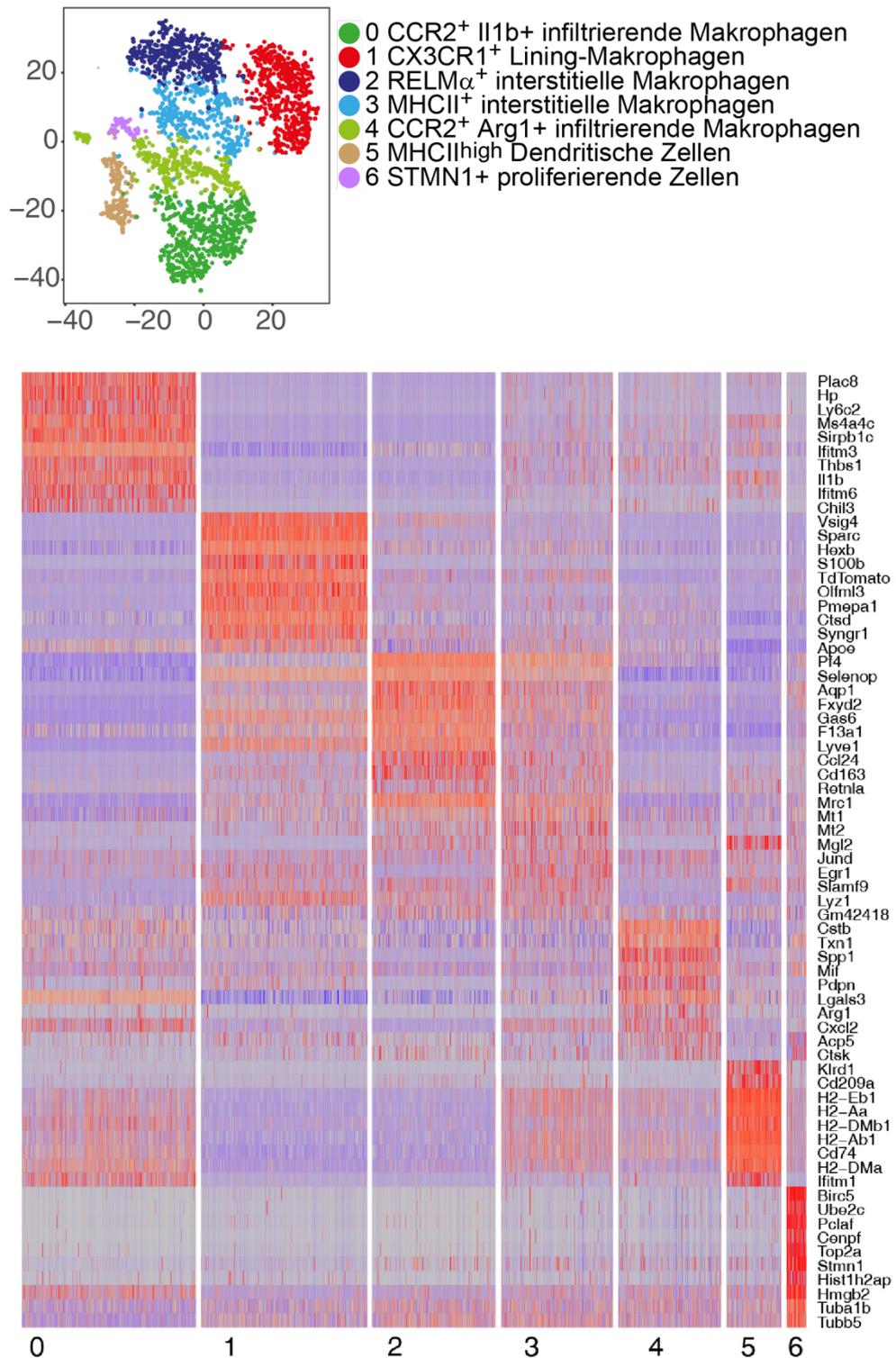


Abbildung 28 Einzelzell-Transkriptionsprofil von sortierten CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻ Zellen an Tag 5 nach K/BxN Serumtransfer

Cx3cr1^{creER}:tdTomato-Mäuse erhielten einen Tamoxifen-Puls. Vier Wochen später wurde durch Injektion von K/BxN Serum eine Arthritis induziert. Fünf Tage nach Serumtransfer wurden CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻ Zellen einer Hinterpfote sortiert und der Einzelzell-Sequenzierung unterzogen.

(a) Einzelne Zellen wurden anhand ihres Expressionsmusters gruppiert und als *t-distributed stochastic neighbour embedding (t-SNE)*-Diagramm dargestellt.

(b) Die 10 bedeutendsten differenziell exprimierten Gene der einzelnen Cluster aus (a). Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

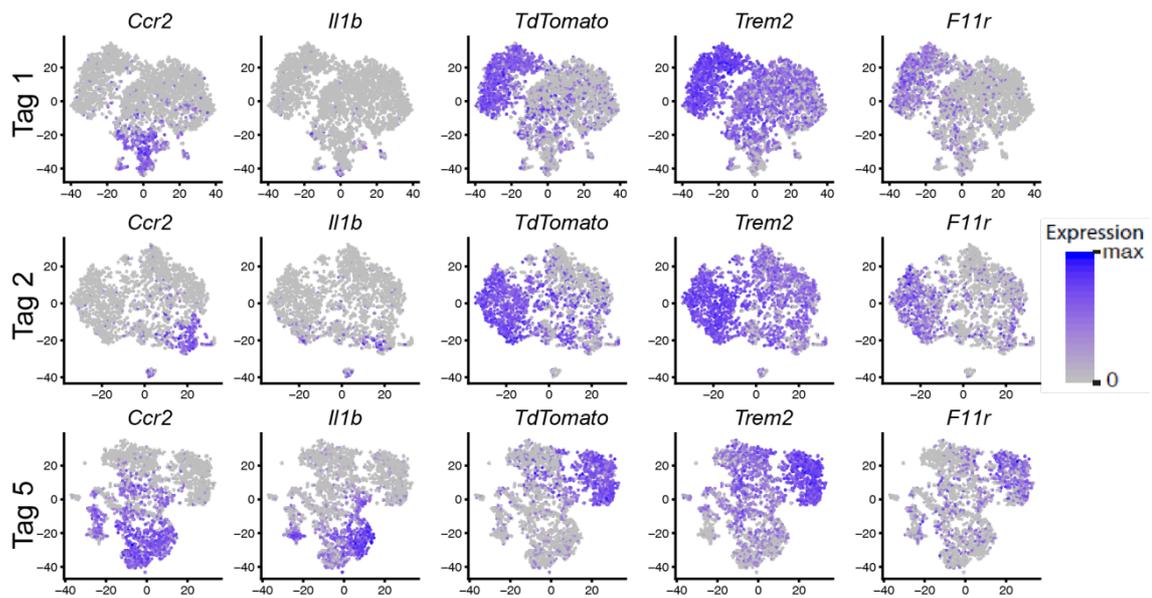


Abbildung 29 Expressionsmuster ausgewählter Gene basierend auf Einzelzell-RNA-Sequenzierung
t-SNE Diagramme mit inkludierter Information über Expressionslevel ausgewählter Gene zu den angegebenen Zeitpunkten nach K/BxN Serumtransfer. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

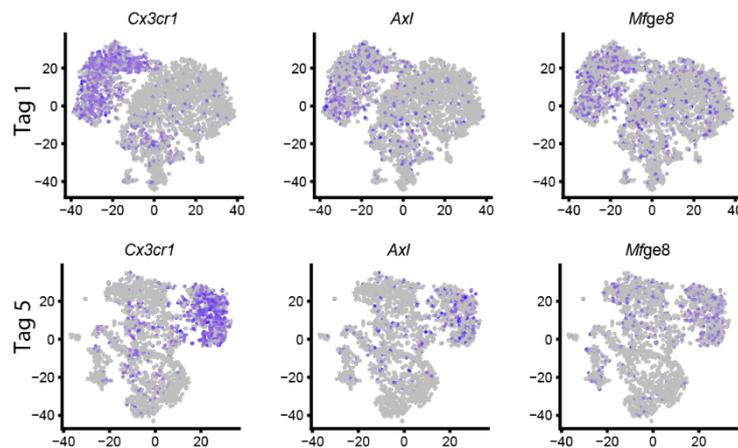


Abbildung 30 Expressionsmuster von Apoptose-relevanten Rezeptoren

t-SNE Diagramme der Einzelzell-Sequenzierung an Tag 1 und Tag 5 nach K/BxN Serumtransfer mit inkludierter Information über Expressionslevel von Rezeptoren, die wichtig für die Beseitigung apoptotischer Zellen sind. Die Expression von *Mfge8* und *Axl* korrespondiert mit *Cx3cr1*-Expression. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

3.4 Funktionelle Eigenschaften von CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen

3.4.1 Lining-Makrophagen sind direkt über Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden

Auf transkriptioneller Ebene konnte gezeigt werden, dass CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen Tight Junction-assoziierte Gene exprimieren. Darüber hinaus konnten die Tight-Junction-Proteine TJP1/ZO-1, Claudin-5 und Claudin-13 in der Membran der Lining-Makrophagen nachgewiesen werden (Abbildung 31 und Abbildung 32).

Dazu wurde Synovialgewebe der Kniegelenke der *Cx3cr1^{cre}:tdTomato* Mäuse im gesunden Zustand und an Tag 1, Tag 2 und Tag 7 nach K/BxN Serumtransfer mittels konfokaler Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Dabei zeigte sich, dass diese Proteine wie angenommen vor allem in der Zellmembran der Lining-Makrophagen lokalisiert waren. Nach Induktion der Arthritis kam es zu den bereits beschriebenen morphologischen Veränderungen der Zellen und der Neuausrichtung zum Gelenkspalt. Tight-Junction-Proteine konnten auch während der Arthritis nachgewiesen werden, wobei die Konnektivität zwischen den Zellen abnahm (Abbildung 32).

Auch Connexin-43 konnte auf den CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen detektiert werden (Abbildung 32). Connexin-43 ist an der Bildung von porenbildenden Gap Junctions beteiligt ¹³⁷.

Da die Expression von Tight junction-assoziierten Proteinen noch nicht zwangsläufig zur Bildung funktionaler Tight Junctions führen muss, wurde die Synovialmembran gesunder Mäuse mittels Transmissionselektronenmikroskopie auf das Vorhandensein direkter Zell-Zell-Verbindungen untersucht (Abbildung 33). Dabei konnten sowohl funktionale Tight Junctions, Adherens Junctions sowie die wesentlich stabileren Desmosomen zwischen CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen gefunden werden.

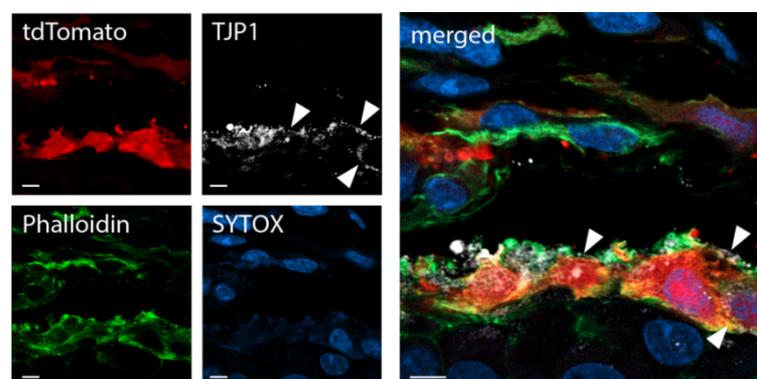


Abbildung 31 Expression von TJP1 auf synovialen CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen

Das Tight junction protein 1 (TJP1, weiß) wurde mittels Antikörperfärbung und konfokaler Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie auf den Lining-Makrophagen (rot) der Synovialmembran von *Cx3cr1^{cre}:tdTomato*-Mäusen detektiert. Durch Fluorophor-konjugiertes Phalloidin (grün) wurde das Aktin-Zytoskelett markiert. SYTOXBlue (blau) färbt Zellkerne. Größenbalken, 5µm. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

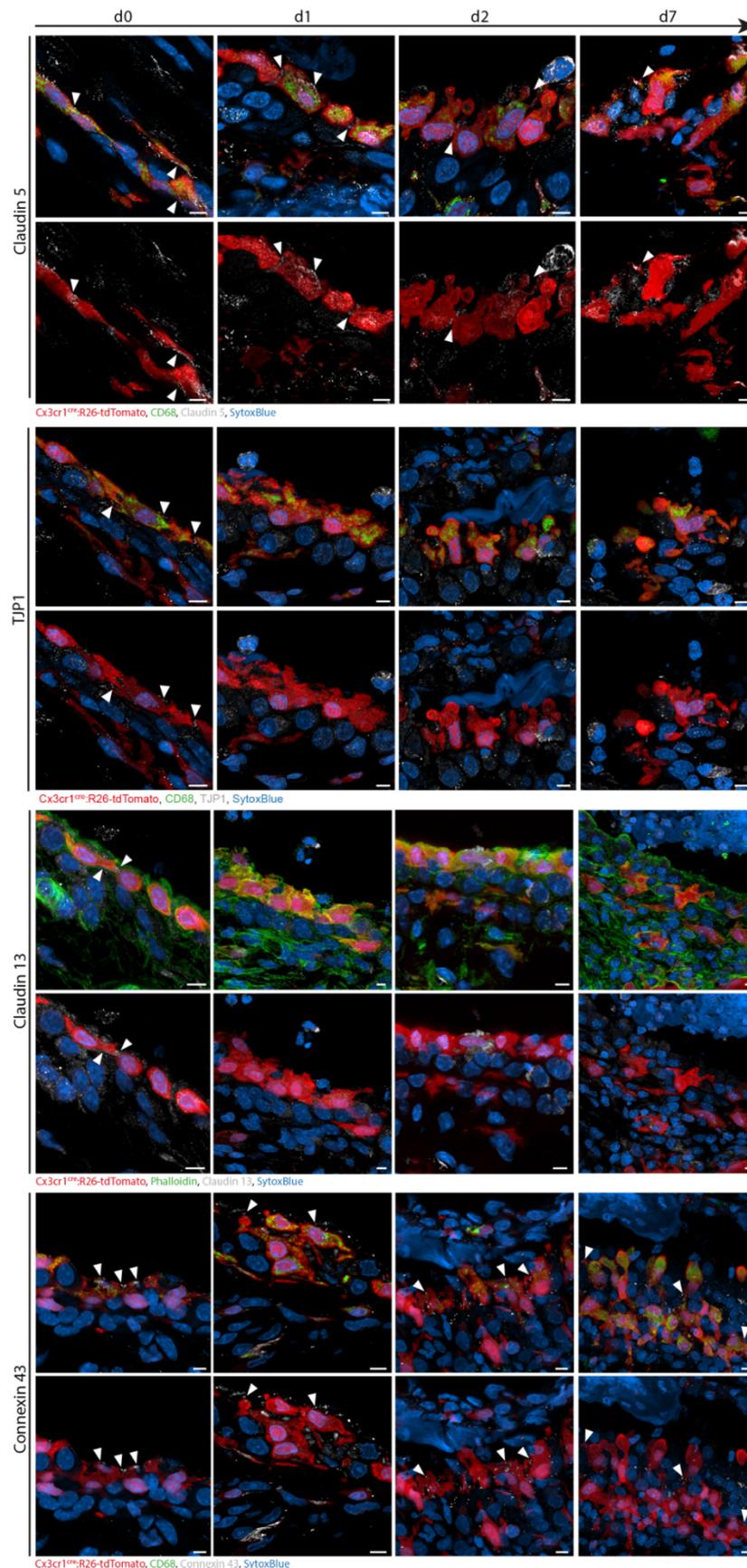


Abbildung 32 Expression von Tight-Junction- und Gap-junction-Proteinen in Lining-Makrophagen. Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzzykroskopie zeigt die Expression von Claudin 5, TJP1/ZO-1 und Claudin 13 sowie Connexin-43 (weiß, Pfeilköpfe) in synovialen tdTomato⁺ (rot) Lining-Makrophagen von *Cx3cr1^{cre}:tdTomato*-Mäusen im gesunden Zustand und an Tag 1, Tag 2 und Tag 7 nach K/BxN Serumtransfer. Größenbalken, 5µm. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

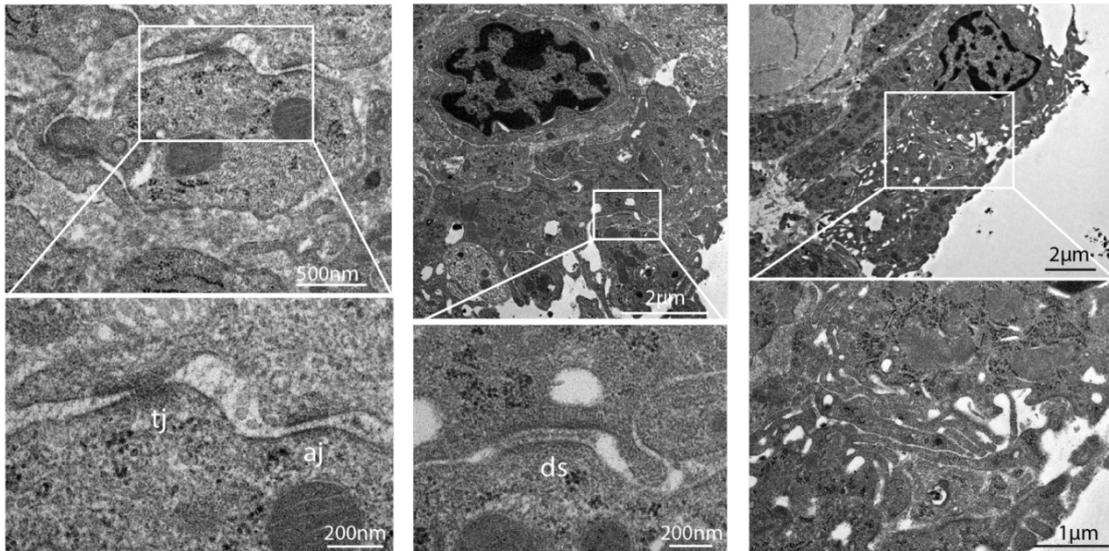


Abbildung 33 Zell-Zell-Verbindungen zwischen synovialen Lining-Makrophagen

Transmissionselektronenmikroskopie von Synovialmembranen gesunder Kniegelenke von Wildtyp-Mäusen zeigt Tight junctions (tj, links), Desmosomen (ds, mitte) und Adherens junctions (links) sowie Interdigitationen (rechts) zwischen Lining-Makrophagen. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

3.4.2 Die funktionelle Rolle der Lining-Makrophagen im synovialen Gelenk

Die Funktion der CX_3CR1^+ Lining-Makrophagen in gesundem und erkranktem Gelenk war bisher nicht bekannt. Durch die fluoreszenzmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen in Mäusen konnte jedoch gezeigt werden, dass die CX_3CR1^+ Lining-Makrophagen eine dichte Membran bilden, die die Gelenksflüssigkeit vom umliegenden Gewebe trennt.

Bei Gelenkentzündungen kommt es zu einem Lösen der Zellkontakte der CX_3CR1^+ Lining-Makrophagen. Daraufhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass die CX_3CR1^+ Lining-Makrophagen eine funktionelle Barriere bilden, die im Falle einer Antikörper-vermittelten Entzündung aufbricht.

Die „Öffnung“ der Membran aus CX_3CR1^+ Lining-Makrophagen als Antwort auf eine Antikörper-induzierte Arthritis wurde mittels Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie und dreidimensionaler Rekonstruktion quantifiziert (Abbildung 34). Dazu wurde *Cx3cr1^{cre};tdTomato*-Mäusen K/BxN Serum injiziert und die Kniegelenke an den Tagen 0, 1, 2 und 7 nach Serumtransfer analysiert.

Zur Aufbereitung der Proben für die Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie wurden die Proben einem Clearing-Prozess unterzogen, der das Gewebe für Licht durchlässig macht. Die Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die dreidimensionale Darstellung des gesamten

Kniegelenks. Die Membran aus Lining-Makrophagen wurde anhand der tdTomato-Expression identifiziert, mit der Imaris Software rekonstruiert und isoliert.

Die Dichte der Lining-Makrophagen wurde quantifiziert als Quotient aus dem Volumen der tdTomato⁺ CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen und dem Gesamtvolumen der Synovialmembran.

Im Kniegelenk bilden die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen eine dünne Membran mit einer relativen Dichte von ca. 60% des Gesamtvolumens der Synovialmembran (Abbildung 34c). Direkt nach Induktion der Entzündung kommt es zum Öffnen der CX₃CR1⁺ Makrophagenmembran und einer Verringerung der Dichte auf ca. 20%. Im Verlauf der Entzündung verdichteten sich die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen wieder kontinuierlich und erreichten beinahe wieder den Ausgangswert.

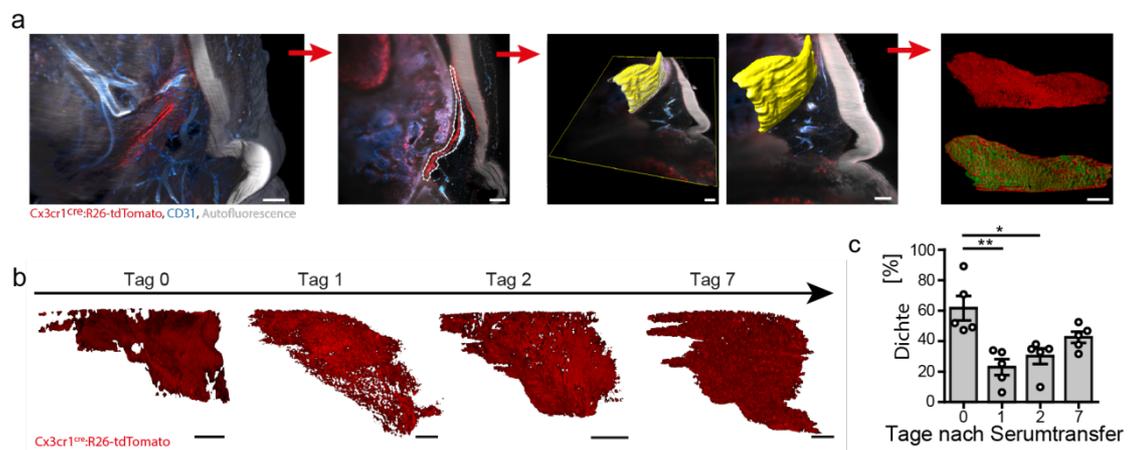


Abbildung 34 Raumzeitliche Veränderung der synovialen Makrophagenmembran während der Gelenkentzündung

(a) Quantifizierung der Dichte der synovialen Makrophagenmembran. Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie von Kniegelenken der *Cx3cr1^{cre}:tdTomato*-Mäusen ermöglicht die Ermittlung des Volumens der tdTomato⁺ Makrophagen der Synovialmembran durch die Imaris-Software. Dazu wurden Gesamtvolumen der Synovialmembran (gelb) und der tdTomato⁺ Makrophagen (rot) manuell aus den 3D-Rekonstruktionen isoliert. Größenbalken, 200µm.

(b) 3D-Rekonstruktion der Makrophagen der Synovialmembran von Kniegelenken der *Cx3cr1^{cre}:tdTomato*-Mäuse an Tag 0, Tag 1, Tag 2 und Tag 7 nach K/BxN Serumtransfer. Größenbalken, 100µm.

(c) Prozentuale Quantifizierung des Volumens der Makrophagen der Synovialmembran von Kniegelenken der *Cx3cr1^{cre}:tdTomato*-Mäuse bezogen auf das Gesamtvolumen der Synovialmembran als Maß für die Dichte der Lining-Makrophagen zu den angegebenen Zeitpunkten nach K/BxN Serumtransfer. n=5 Kniegelenke, Mittelwert ± Standardfehler, **P = 0.0025, *P = 0.034.

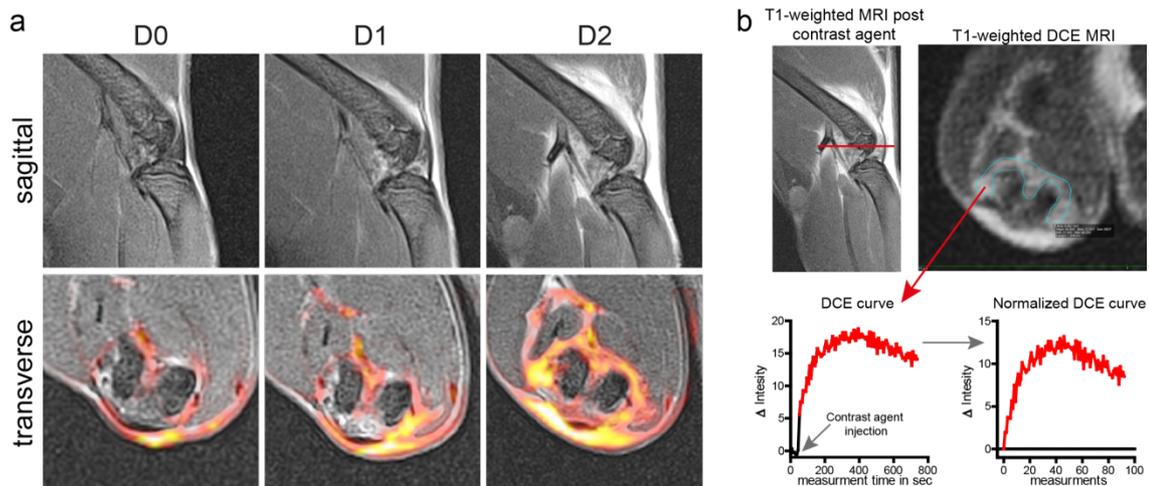


Abbildung 35 Magnetresonanztomographie zur Quantifizierung der Permeabilität des Synovialgewebes

(a) Magnetresonanztomographie (MRT) von Kniegelenken von Mäusen denen K/BxN Serum injiziert wurde. T1-gewichtete sagittale (oben) und transversale (unten) Aufnahmen zu den angegebenen Zeitpunkten nach K/BxN Serumtransfer und nach Applikation eines Kontrastmittels. Die Farbkarten der T1-gewichteten dynamischen kontrastverstärkten (DCE) MRT-Messung wurden über die Endpunktmessung gelegt und entsprechen der Fläche unter der Kurve (AUC) der Kontrastmittelakkumulation über 12 min nach Verabreichung (unten). Rote Areale weisen eine niedrige Kontrastmittelakkumulation und gelbe Areale eine hohe Kontrastmittelakkumulation auf.

(b) Strategie zur Ermittlung der DCE-Kurve der T1-gewichteten MRT-Aufnahmen von Kniegelenken. Das Synovialgewebe auf Höhe der Kondylen des Femurs wurde als das zu analysierende Areal (*region of interest*, ROI, blau) festgesetzt. Die DCE-Kurve der ROI wurde auf den Messzeitpunkt normalisiert an dem die Kontrastmittelinjektion abgeschlossen war. Die Messzeiten wurden als Anzahl der einzelnen Messungen konvertiert, welche im Intervall von 7 Sekunden erfolgten. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Um die Barriere-Funktion der CX₃CR1⁺ Makrophagenmembran zu quantifizieren, wurde Magnetresonanztomographie (MRT) von Kniegelenken durchgeführt (Abbildung 35). Dynamische kontrastverstärkte MRT kann die Anflutung und Akkumulation eines injizierten Kontrastmittels in das Synovialgewebe und den Gelenkspalt messen und spiegelt die Permeabilität des Synovialgewebes wieder.

Longitudinale MRT-Messungen zeigten, dass es in einem gesunden Gelenk nur zu einer geringen Kontrastmittelanreicherung kam. Nach K/BxN Serumtransfer erhöhte sich die Permeabilität und die Anreicherung des Kontrastmittels verstärkte sich mit zunehmender Entzündung.

Die injizierten Antikörperkomplexe aus dem K/BxN Serum wurden von synovialen Makrophagen aufgenommen. Dies konnte durch Injektion von K/BxN Serum gemischt mit Fluorophor-konjugierten IgGs aus dem K/BxN Serum nachgewiesen werden. Wobei die markierten IgGs in den intrazellulären Vesikeln sowohl der CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen als auch der interstitiellen Makrophagen detektiert werden konnten (Abbildung 36).

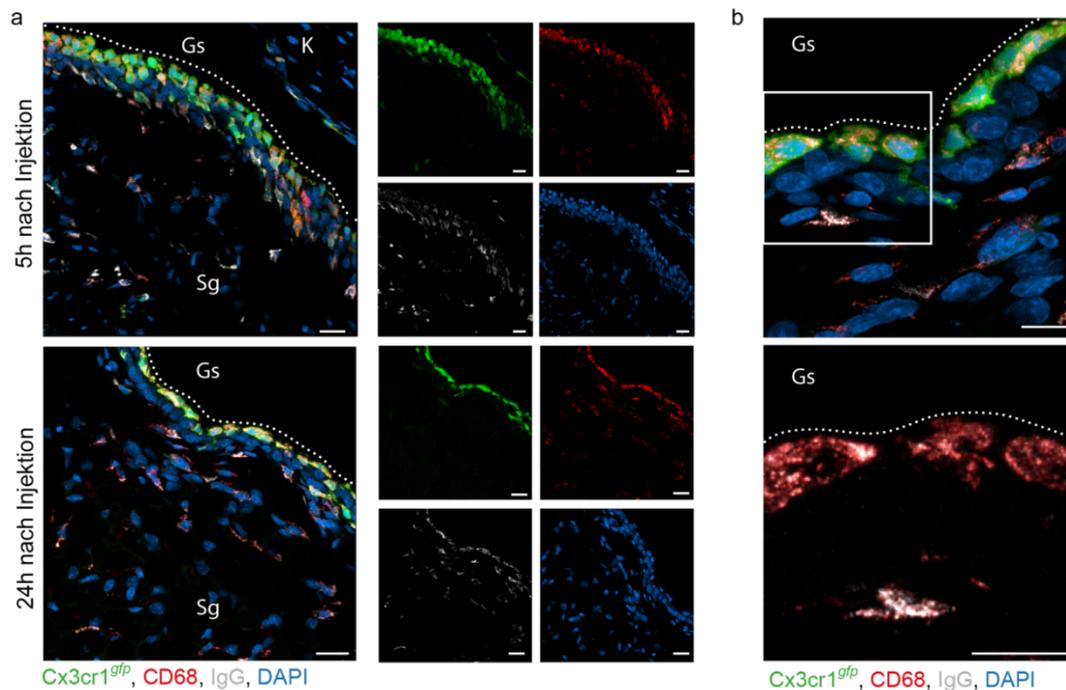


Abbildung 36 Aufnahme von IgG durch synoviale CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen

IgGs wurden aus K/BxN Serum mittels *protein* G-Säule isoliert, aufgereinigt und mit Alexa-Fluor-647 markiert. Eine Mischung aus K/BxN Serum und isolierten IgGs (Verhältnis 1:4) wurde intravenös in *Cx3cr1^{gfp}*-Mäuse injiziert. Fünf Stunden und 24 Stunden nach Injektion wurden die Synovialmembranen der Kniegelenke für Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie (CLSM) aufgearbeitet.

(a) Repräsentative CLSM-Aufnahmen der Kniegelenke zu angegebenen Zeitpunkten nach Injektion der IgG-Mischung. Fluorophor-markierte IgGs (grau) wurden sowohl in CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen (GFP, grün) als auch in interstitiellen Makrophagen (CD68, rot) detektiert. Gs: Gelenkspalt, Sg: Synovialgewebe, K: Knorpel. Größenskalen, 10µm.

(b) CLSM mit höherer Auflösung zeigt Fluorophor-markierte IgGs in intrazellulären vesikulären Strukturen sowohl in Lining-Makrophagen (CD68, rot; GFP, grün) als auch interstitiellen Makrophagen (CD68,rot) 24 Stunden nach Injektion. Gs: Gelenkspalt. Größenskalen, 10 µm. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Es musste geklärt werden, ob das Aufbrechen der Tight Junction-stabilisierten Membran aus CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen durch eine zelluläre intrinsische Aktivierung der CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen in Antwort auf die arthritogenen Immunkomplexe zustande kam oder ob infiltrierende Zellen wie Monozyten oder Neutrophile Granulozyten die Desintegration der Membran vermitteln.

Die Depletion von Monozyten und Neutrophilen mittels eines gegen GR-1 gerichteten Antikörpers einen Tag vor K/BxN Serumtransfer schützt die Mäuse vor der Auslösung der Erkrankung (Abbildung 37a). Dies ist vor allem auf die zentrale inflammatorische Rolle der Neutrophilen im K/BxN Serumtransfer-Modell zurückzuführen ¹³⁸. Trotzdem kommt es auch unabhängig von Monozyten und Neutrophilen zum Auflösen der Makrophagenmembran bei Induktion der Entzündung und legt nahe, dass die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen selbst ihre Dissoziation vermitteln (Abbildung 37b).

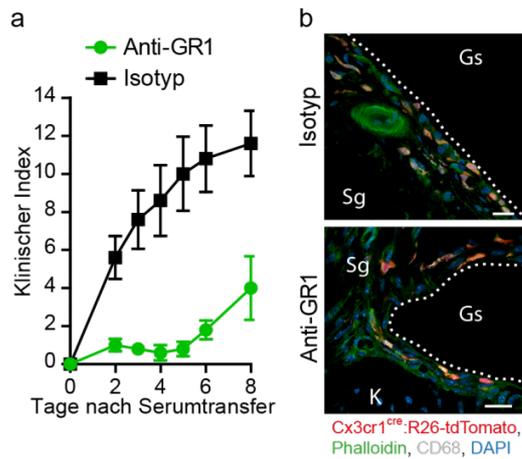


Abbildung 37 Die Disruption der Makrophagenmembran wird nicht durch Neutrophile Granulozyten vermittelt

(a) Klinische Entwicklung der K/BxN Serumtransfer-Arthritis von Wildtyp-Mäusen, welche einen Tag vor Induktion der Arthritis Anti-GR-1 Antikörper oder den Kontroll-Isotypen erhielten.

Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 5$ pro Gruppe.

(b) Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie synovialer Makrophagen (CD68, weiß) von Kniegelenken der *Cx3cr1^{cre};tdTomato*-Mäuse (tdTomato, rot) 24h nach K/BxN Serumtransfer und 48h nach Applikation des Anti-GR1 Antikörpers oder des Isotypes. Phalloidin, grün; DAPI, blau. Gs: Gelenkspalt, Sg: Synovialgewebe, K: Knorpel. Größenbalken, 20 μ m. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Um zu untersuchen inwieweit die synovialen Makrophagen selbst die Permeabilität im Gelenk beeinflussen, wurden Depletions-Studien durchgeführt. Dazu wurden *Cx3cr1^{cre};iDTR*-Mäuse generiert, welche transgen für die konstitutive *Cx3cr1-cre* Rekombinase und einen induzierbaren Diphtherietoxin-Rezeptor waren.

Dieses System ermöglicht die Depletion von Monozyten und Makrophagen, welche *Cx3cr1* exprimieren oder exprimiert haben. Schon einen Tag nach Diphtherietoxin-Behandlung sind ein Großteil der Ly6C^{low} Monozyten des Blutes und die synovialen Makrophagen depletiert (Abbildung 38b).

Der unerwünschte Effekt der Monozyten-Depletion wurde umgangen, indem weiterführende Behandlungen erst fünf Tage nach der Diphtheritoxin-Injektion durchgeführt wurden. Nach dieser Erholungsphase waren die Monozyten-Kompartimente wieder hergestellt (Abbildung 38c).

Die Populationen der synovialen Makrophagen erholten sich ebenfalls leicht wieder, wobei sich die Repopulation der synovialen Makrophagen vor allem auf die interstitiellen Makrophagen beschränkte. Die synoviale Grenzmembran war weitestgehend frei von CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen (Abbildung 38d).

Dynamische kontrastverstärkte MRT konnte zeigen, dass die Depletion der synovialen Makrophagen bereits im gesunden Gelenk eine signifikant gesteigerte Kontrastmittelanreicherung und Permeabilität im Gelenk zur Folge hatte (Abbildung 38e). Dies legt nahe, dass die synovialen Makrophagen auch im gesunden Zustand eine Barrierefunktion innehaben. Die gesteigerte Kontrastmittelanreicherung in den depletierten Tieren konnte auch an Tag 1 nach K/BxN Serumtransfer beobachtet werden (Abbildung 38e).

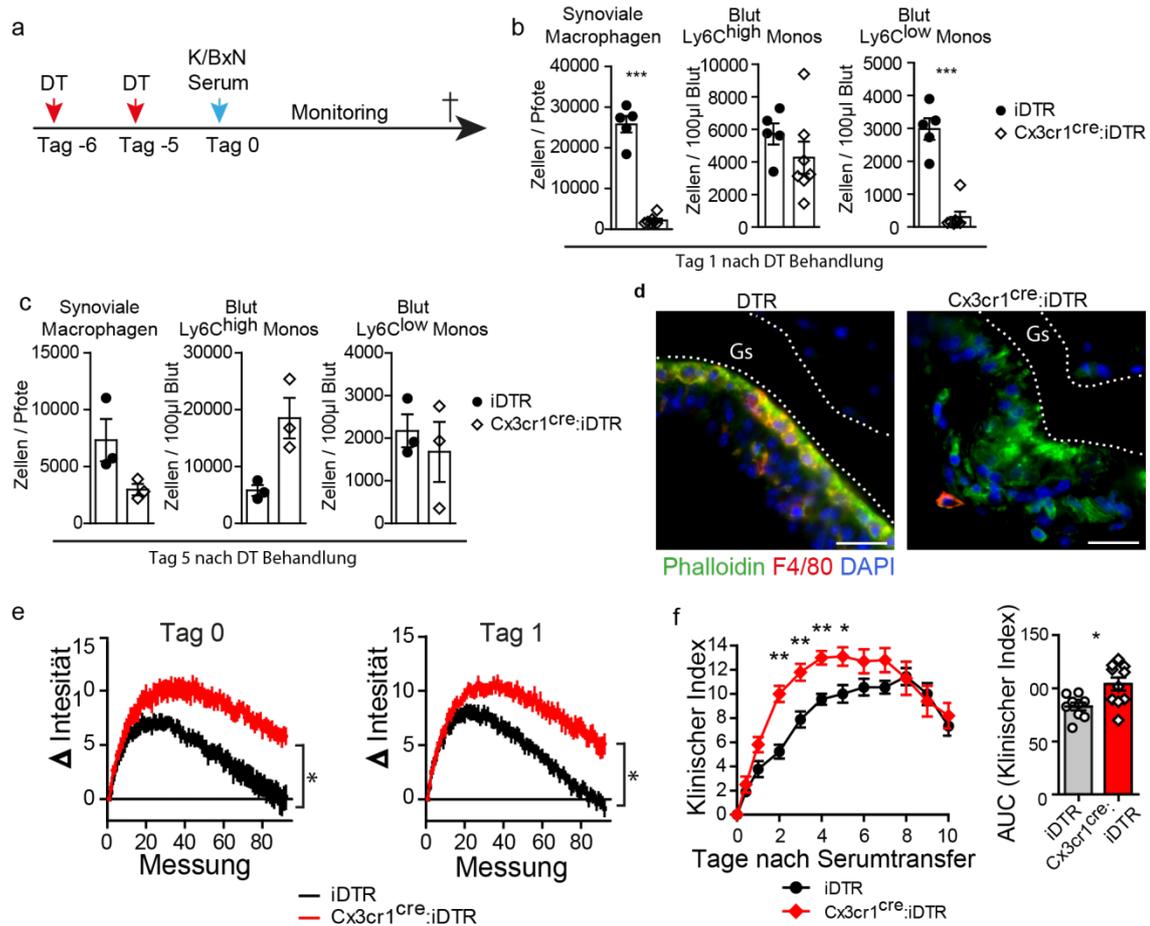


Abbildung 38 Exazerbation Antikörper-induzierter Arthritis durch Depletion synovialer Gewebsmakrophagen

(a) Strategie zur Depletion von Gewebsmakrophagen. An zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurde den *Cx3cr1^{cre}:iDTR*-Mäusen 500ng Diphtherietoxin (DT) intraperitoneal appliziert. Fünf Tage nach der letzten Diphtherietoxin-Injektion wurden die Depletionseffizienz analysiert bzw. K/BxN Serum transferiert.

(b) Analyse der Depletionseffizienz einen Tag nach Diphtherietoxin-Behandlung. Die Anzahl der synovialen Makrophagen pro Pfote und die Anzahl der Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Diphtherietoxin behandelte *iDTR*-Mäuse wurden als Kontrolle herangezogen.

(c) Analyse der Depletionseffizienz 5 Tag nach Diphtherietoxin Behandlung. Die Anzahl der synovialen Makrophagen pro Pfote und die Anzahl der Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Diphtherietoxin behandelte *iDTR*-Mäuse wurden als Kontrolle herangezogen.

(d) Bright-field-Mikroskopie von Synovialgewebe von Kniegelenken depletierter *Cx3cr1^{cre}:iDTR*-Mäuse und *iDTR*-Kontrolltieren 5 Tage nach Diphtherietoxin-Behandlung. Makrophagen wurden durch Anti-F4/80 Antikörper (rot) identifiziert. Fluorophor-gekoppeltes Phalloidin (grün) färbt das Aktin-Zytoskelett und verdeutlicht die Morphologie der Synovialmembran.

(e) Normalisierte Signalintensitätskurven der dynamischen kontrastverstärkten MRT Messung (90 Messungen mit 7-Sekunden-Intervall) der Kniegelenke von Diphtherietoxin behandelten depletierten *Cx3cr1^{cre}:iDTR* Mäusen und *iDTR* Kontrolltieren an Tag 0 und Tag 1 nach K/BxN Serumtransfer.

(f) Klinischer Verlauf von Diphtherietoxin behandelten depletierten *Cx3cr1^{cre}:iDTR* Mäusen und *iDTR* Kontrolltieren dargestellt als klinischer Index und den entsprechenden Flächen unter der Kurve (AUC).

Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Es konnte gezeigt werden, dass die Depletion der synovialen Makrophagen zu einer erhöhten Permeabilität im Synovialgewebe führte. Ob dieser Bruch der Barrierfunktion auch einen Einfluss auf die klinische Manifestation der Gelenkentzündung hat, wurde durch Bestimmung eines semiquantitativen Indexes ermittelt.

Es zeigte sich, dass die Tiere mit depletierten Synovialmakrophagen schneller und stärker erkrankten (Abbildung 38f). Vor allem die Anfangsphase der Entzündung geht mit einer verstärkten Infiltration von Neutrophilen Granulozyten und der Bildung von NETs im Gelenkspalt einher (Abbildung 39).

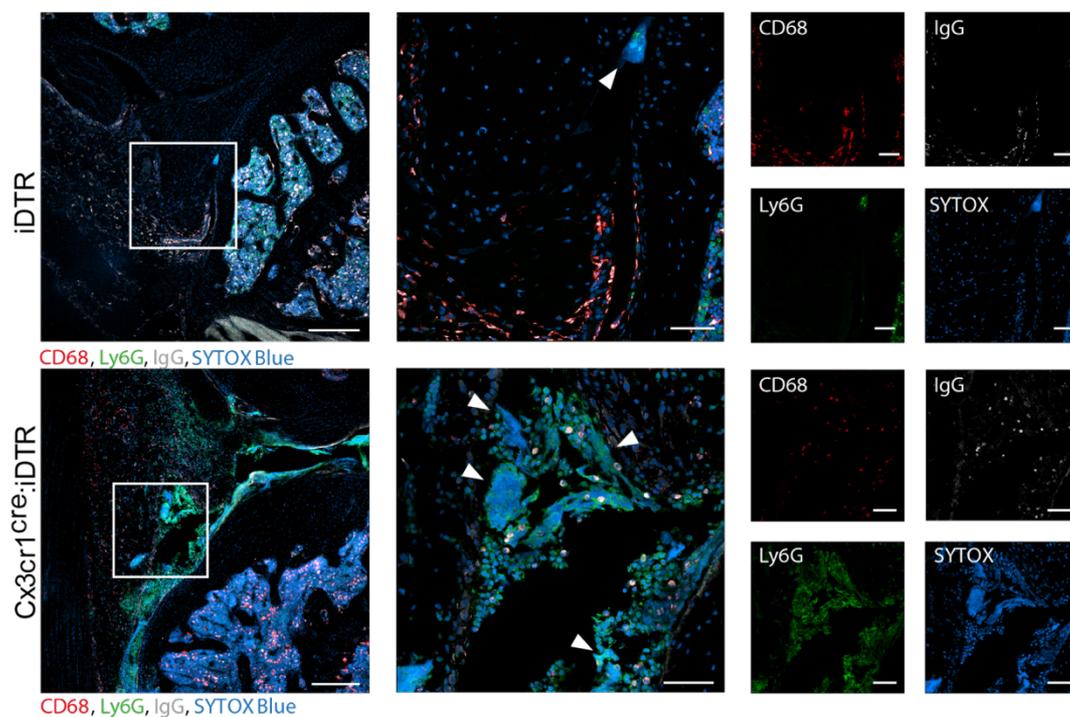


Abbildung 39 Exazerbation von Neutrophilen-Infiltration und NET-Bildung durch Depletion synovialer Makrophagen

Bright-field-Fluoreszenzmikroskopie von Synovialgewebe von Kniegelenken der *Cx3cr1^{cre}:iDTR*-Mäuse bzw. *iDTR* Kontrollmäuse 24h nach intravenöser Injektion der Mischung aus Fluorophor-markiertem IgG des K/BxN Serums und K/BxN Serum (Verhältnis 1:4) und 6 Tage nach Diphtherietoxin-Administration. Infiltrierende Neutrophile Granulozyten werden durch Anti-Ly6G Antikörper (grün), *neutrophile extracellular traps* durch DAPI (blau) sowie Makrophagen durch Anti-CD68 (rot) detektiert. Größenbalken, 200µm und für die vergrößerte Ansicht 50µm. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Der protektive Einfluss der synovialen Makrophagen im K/BxN Serumtransfer-Modell wurde in *Cx3cr1^{cre}:iDTR*-Mäusen, denen das Diphtherietoxin lokal appliziert wurde, bestätigt. Hierbei wurden die systemischen Effekte der intraperitonealen Diphtherietoxin-Applikation weitestgehend umgangen (Abbildung 40).

Drei Tage nach Injektion des Diphtherietoxins in eine Hinterpfote der *Cx3cr1^{cre}:iDTR* Mäuse wurde das K/BxN Serum gespritzt. Die kontralaterale Pfote diente als Kontrolle. Es zeigte sich, dass die Pfoten mit depletierten Makrophagen eine stärkere Entzündung entwickelte als die PBS-behandelten Kontroll-Pfoten. In der Kontroll-Tiergruppe aus *iDTR* Mäusen ohne cre-Rekombinase konnten keine Unterschiede zwischen den Diphtherietoxin-behandelten und PBS-behandelten Pfoten festgestellt werden. Dadurch können Toxineigene Effekte, welche den Krankheitsverlauf beeinflussen könnten, ausgeschlossen werden.

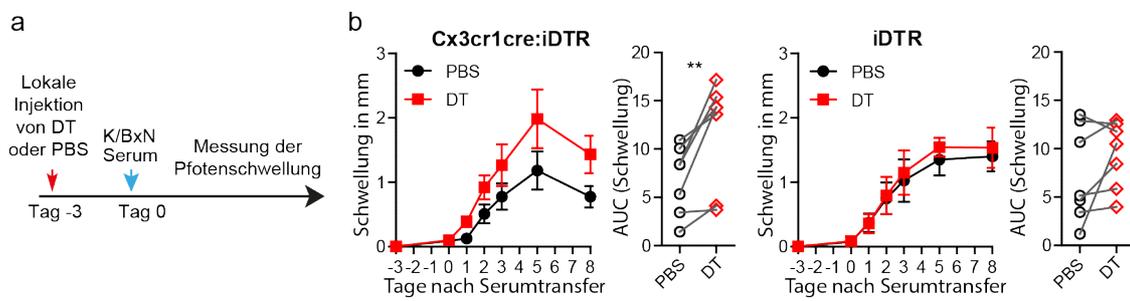


Abbildung 40 Exazerbation von K/BxN Serumtransfer-Arthritis durch lokale Makrophagen-Depletion

(a) Behandlungsschema zur lokalen Depletion von synovialen Makrophagen durch unilaterale Injektion von Diphtherietoxin oder PBS in *Cx3cr1^{cre}:iDTR*-Mäusen und *iDTR*-Kontrolltieren mit anschließender Induktion der Arthritis durch K/BxN Serumtransfer. Die klinische Evaluation der K/BxN Serumtransfer-Arthritis in *Cx3cr1^{cre}:iDTR*-Mäusen (a) und *iDTR*-Mäusen (b) erfolgte durch Messung der Schwellung von PBS- und Diphtherietoxin-behandelten Pfoten. P-Werte der *area under the curve* (AUC) wurden mit einem gepaarten T-Test ermittelt. $n = 7$. $P = 0,08$. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

3.4.3 Modulation der synovialen Barrierefunktion durch pharmakologische Desintegration oder Stabilisierung der Tight Junctions

Es wurde gezeigt, dass synoviale Lining-Makrophagen über Tight Junctions miteinander verbunden sind. Ob diese Tight Junctions an der Barrierefunktion der Makrophagenmembran beteiligt sind, sollte durch pharmakologische Intervention, die zur Auflösung oder Stabilisierung der Tight Junctions führt, untersucht werden (Abbildung 41).

Mit Hilfe des Claudin-Peptidomimetikums C5C2, welches sich gegen Claudin-5 richtet, ist man in der Lage Tight Junctions aufzulösen¹³⁹. Vor Induktion der Arthritis durch K/BxN Serumtransfer wurde das C5C2 Claudin-Peptidomimetikum intravenös appliziert. Der Kontrollgruppe wurde ein Peptid (C5C2scr) injiziert, welches einen nahezu identischen Anteil verschiedener Aminosäuren besitzt, jedoch eine andere Aminosäure-Sequenz aufweist.

Zur Evaluation des Einflusses der pharmakologischen Desintegration der Tight Junctions auf die Arthritis erhielten die Tiere eine Injektion der Peptide einen Tag vor dem Auslösen der Arthritis. Eine zweite Gabe des Peptids erfolgte einen Tag nach der Induktion. Dabei zeigten die C5C2-behandelten Tiere eine schnellere und stärkere Entzündung als die Kontrollgruppe (Abbildung 41a).

Auch im MRT zeigte sich in den C5C2-behandelten Tieren eine verstärkte Akkumulation von Kontrastmittel einen Tag nach Induktion der Arthritis (Abbildung 41b). Auch hier wurden die Peptide einen Tag vor dem K/BxN Serumtransfer injiziert. Die Injektion des C5C2 Claudin-Peptidomimetikums führte im gesunden Zustand (Tag 0) nicht zu einer gesteigerten Kontrastmittelakkumulation (Abbildung 41b).

Es ist bekannt, dass die Tight Junctions der Blut-Hirn-Schranke durch den Tyrosin-Kinase-Inhibitor Imatinib stabilisiert werden kann¹⁴⁰. Um den Einfluss der Tight-Junction-Stabilisierung auf die Entwicklung von Antikörper-vermittelter Arthritis zu untersuchen, erhielten Wildtyp-Mäuse zweimal täglich Imatinib. Dabei konnte gezeigt werden, dass Imatinib eine protektive Wirkung im K/BxN Serumtransfer-Modell hat (Abbildung 41c). Die mit Imatinib behandelten Tiere wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe geringe Zeichen von Entzündungen auf und bestätigten die Ergebnisse einer früheren Studie¹⁴¹.

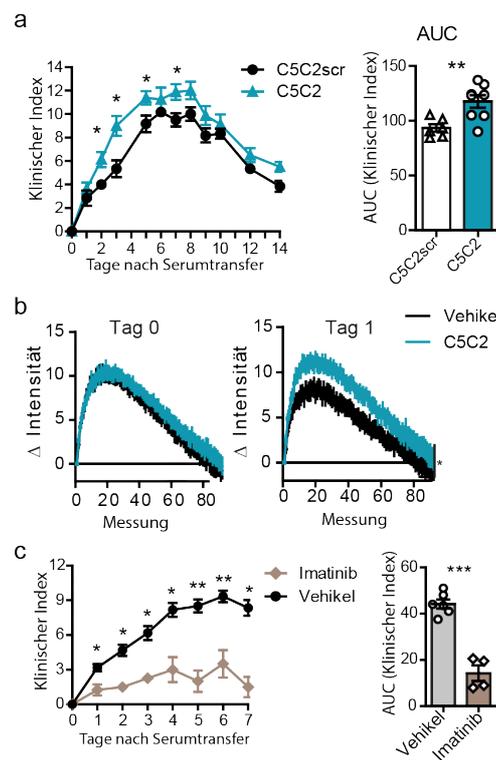


Abbildung 41 Modulation der Barrierefunktion durch pharmakologische Desintegration oder Stabilisierung der Tight Junctions

(a) Klinische Entwicklung und die *area under the curve* (AUC) des dazugehörigen klinischen Indexes des K/BxN Serumtransfer-Modells von Wildtyp-Mäusen, welche an Tag -1 und Tag 1 nach K/BxN Serumtransfer das C5C2 Claudin-5 Peptidomimetikum (3.5 $\mu\text{mol/kg}$, $n = 8$) oder die Kontrollvariante des Peptids (C5C2scr, 3.5 $\mu\text{mol/kg}$, $n = 6$) intravenös injiziert bekamen. P-Werte wurden mit dem Mann Whitney U Test (Klinischer Index), * $P \leq 0,05$; oder dem zweiseitigen ungepaarten T-Test (AUC), ** $P \leq 0,0062$, ermittelt.

(b) Normalisierte DCE-MRT-Kurven von synovialen Gewebe der Kniegelenke von Wildtyp-Mäusen, welche einen Tag vor K/BxN Serumtransfer C5C2 Claudin-5 Peptidomimetikum (3.5 $\mu\text{mol/kg}$) oder PBS appliziert bekamen. Mittelwerte \pm Standardfehler, Tag 0: Vehikel, $n = 10$ Kniegelenke; C5C2, $n = 10$ Kniegelenke; Tag 1: Vehikel, $n = 9$ Kniegelenke; C5C2, $n = 10$ Kniegelenke. Die P-Werte der AUC wurden mit dem zweiseitigen ungepaarten T-Test berechnet; * $P = 0,0256$.

(c) Klinische Entwicklung und die AUC des dazugehörigen klinischen Indexes des K/BxN Serumtransfer-Modells von Wildtyp-Mäusen, welche zweimal täglich Imatinib (oral, 80mg/kg) bekamen beginnend einen Tag vor Induktion der Arthritis. $n = 4$ mit Imatinib-Behandlung und $n = 6$ mit Vehikel-Kontrollbehandlung. P-Werte wurden mit dem Mann Whitney U Test (Klinischer Index), * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$; oder dem zweiseitigen ungepaarten T-Test (AUC), *** $P \leq 0,0001$, ermittelt.

Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

3.4.4 Infiltrierende Makrophagen haben eine proinflammatorische Funktion

Infiltrierte Makrophagen, welche sich von Blutmonozyten ableiten, erweitern den Pool von Makrophagen im entzündeten Gelenk. In den Analysen der Einzelzell-RNA-Sequenzierungen zeigte sich, dass ein Teil der infiltrierenden Makrophagen proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β produzieren. Mit Hilfe der *LysM^{cre}:CD115DTR*-Maus sollte der Einfluss von infiltrierenden Makrophagen im K/BxN Serumtransfermodell untersucht werden (Abbildung 42). In diesen Mäusen ist es möglich den Großteil der Ly6C^{high} Monozyten, einen Teil der Ly6C^{low} Monozyten sowie Gewebsmakrophagen im Gelenk mit Ausnahme der CSF1R⁻ CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen zu depletieren. Die Tiere wurden täglich mit Diphtherietoxin behandelt, wobei die erste Injektion einen Tag vor dem Transfer des K/BxN Serums erfolgte. Hierbei zeigte sich, dass die Depletion keinen Einfluss auf die Initiation der Entzündung hatte. Der Verlust der Monozyten und Makrophagen führte jedoch zu einer schnelleren Remission der Entzündung. Somit wird eine proinflammatorische Rolle der Monozyten und interstitiellen Makrophagen im Gelenk nahe gelegt, welche zur Perpetuierung der Entzündung beiträgt.

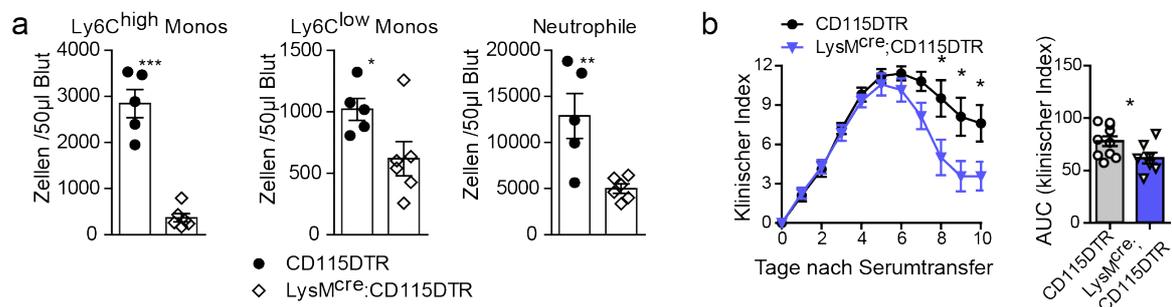


Abbildung 42 CSF1R⁺ Monozyten/Makrophagen haben entzündungsfördernde Funktionen

(a) Durchflusszytometrie von Blutmonozyten und Neutrophilen von *LysM^{cre}:CD115DTR*-Mäusen (n = 6) und *CD115DTR* Kontrolltieren (n = 5) einen Tag nach zweimaliger Diphtherietoxin-Injektion (500ng Diphtherietoxin pro Maus und Tag). Mittelwerte \pm Standardfehler. Der zweiseitige T-Test wurde zur Ermittlung der P-Werte genutzt, *P = 0.0467, **P \leq 0.0069, ***P = 0.0001.

(b) Klinische Entwicklung und die korrespondierende *area under the curve* (AUC) der K/BxN Serumtransfer-Arthritis in Diphtherietoxin-behandelten *LysM^{cre}:CD115DTR*-Mäusen (n = 7) und *CD115DTR* Kontrolltieren (n = 10). Die Mäuse wurden täglich mit Diphtherietoxin (intraperitoneal) behandelt, wobei einen Tag vor dem K/BxN Serumtransfer mit 500ng Diphtherie-Toxin begonnen wurde und jede weitere Injektion eine reduzierte Menge von 100ng enthielt. Mittelwert \pm Standardfehler. P-Werte für den klinischen Index wurden mit dem Mann Whitney U Test ermittelt, *P \leq 0,05 und für die AUC der zweiseitige ungepaarte T-Test, *P = 0,0417. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

3.5 Übertragbarkeit der Erkenntnisse über Synovialmakrophagen aus der Maus auf den Menschen

Murine Modellorganismen und experimentelle Methoden am Tier sind wichtige Instrumente der Grundlagenforschung. Da Maus und Mensch jedoch auch vielfach unterschiedlich sind, ist es wichtig zu untersuchen, inwieweit die Erkenntnisse aus den Tierversuchen auch auf den Menschen übertragbar und nutzbar sind.

Daher wurde Synovialgewebe von Patienten mit diagnostizierter Osteoarthritis (OA) oder rheumatoider Arthritis (RA) untersucht. Obwohl die OA-Proben nicht als gesunde Vergleichsgruppen betrachtet werden dürfen, entsprachen sie einer eher nicht-entzündlichen Situation.

Es wurde untersucht, ob neue Marker wie das TREM2 geeignet sind, um die Makrophagen der synovialen Intima von interstitiellen Makrophagen zu unterscheiden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen vom Synovialgewebe der Maus zeigte die selektive Expression von TREM2 vor allem auf den CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen sowohl in gesundem als auch entzündetem Zustand (Abbildung 43a).

Auch im humanen System ist TREM2 vor allem auf den Lining-Makrophagen exprimiert (Abbildung 43b). Es wird insbesondere im RA-Gewebe deutlich, dass interstitielle Makrophagen TREM2 nicht exprimieren, wobei nicht zwischen infiltrierenden Zellen und residenten Makrophagen unterschieden werden kann.

In den Maus-Studien wurde festgestellt, dass es im Laufe einer Gelenkentzündung zum Öffnen der Membran aus CX₃CR1⁺-Lining-Makrophagen kommt und die Makrophagen von stromalen Zellen überwuchert werden. Auch dies konnte im Synovialgewebe von RA-Patienten festgestellt werden. Im Synovialgewebe der OA-Patienten befinden sich die Lining-Makrophagen in der obersten Reihe. Im entzündeten Gelenk hingegen befinden sich die TREM2⁺ Lining-Makrophagen in tiefer gelegenen Zellschichten (Abbildung 43b). Die Membran aus TREM2⁺ Makrophagen der RA-Proben ist im Vergleich zu OA-Proben deutlich dissoziiert. Ebenso konnte festgestellt werden, dass Tight-Junction-Proteine wie das TJP1 auf den TREM2⁺ Lining-Makrophagen exprimiert werden (Abbildung 43c). Die Quantifizierung der Dichte der TREM2⁺ Lining-Makrophagen bestätigt die Dissoziation der Makrophagenmembran während einer RA.

Die histologischen Analysen der Synovialgewebe der OA und RA-Patienten legten nahe, dass im Falle einer Entzündung die Zahl der interstitiellen Makrophagen im Vergleich zu den TREM2⁺ Lining-Makrophagen zunahm.

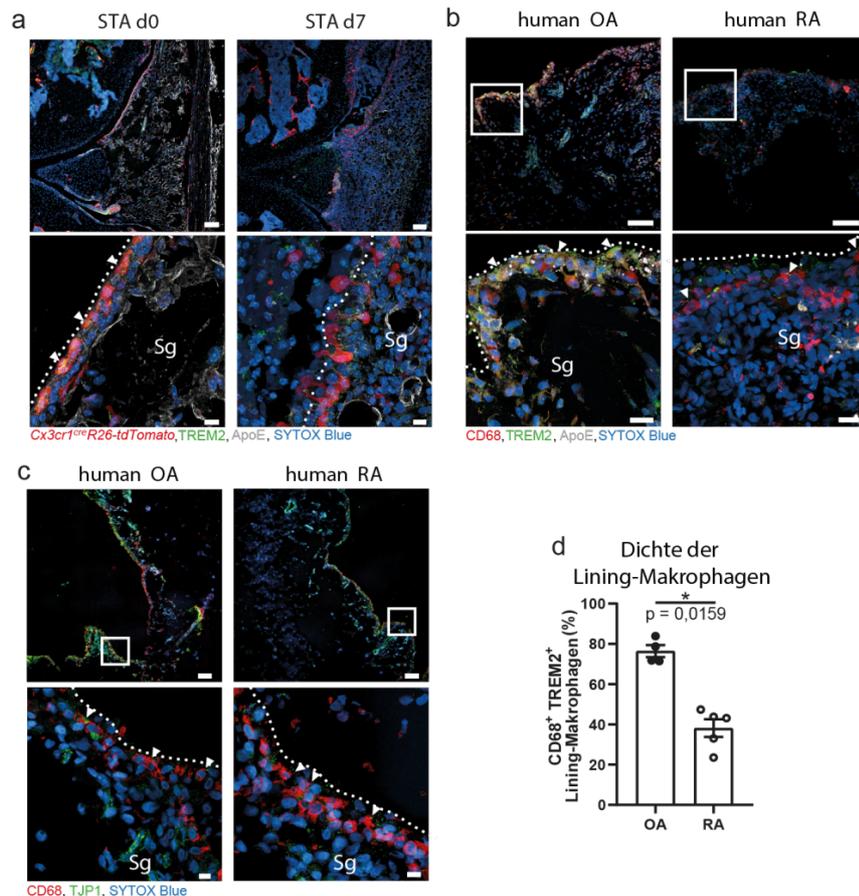


Abbildung 43 Vergleich muriner und humaner synovialer Lining-Makrophagen

(a) Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie (CLSM) von Synovialgewebe der Kniegelenke von *Cx3cr1^{cre};tdTomato*-Mäusen an Tag 0 und Tag 7 nach K/BxN Serumtransfer zeigt TREM2 (grün, gefüllte Pfeilspritzen) auf synovialen Lining-Makrophagen (tdTomato, rot). Größenbalken, 100µm (oben) und 10µm (unten).

(b) CLSM von humanem Synovialgewebe aus dem Kniegelenk von Patienten mit Osteoarthritis (OA) oder rheumatoider Arthritis (RA) detektiert TREM2 (grün) auf Lining-Makrophagen (CD68, rot). Größenbalken, 100µm (oben) und 10µm (unten).

(c) CLSM von humanem Synovialgewebe aus dem Kniegelenk von Patienten mit OA oder RA detektiert TJP1 (grün, gefüllte Pfeilspitzen) auf Lining-Makrophagen (CD68, rot). Größenbalken, 100µm (oben) und 10µm (unten).

(d) Quantifizierung der Dichte der synovialen Lining-Makrophagen von humanen Kniegelenken von Patienten mit OA (n = 4) oder RA (n = 5). Die Dichte wurde anhand histologischer Aufnahmen (siehe Abbildung 43b) als prozentualer Anteil von CD68⁺ TREM2⁺ Lining-Makrophagen pro Gesamtzellen der synovialen Grenzmembran quantifiziert. Mittelwerte ± Standardfehler. Der P-Wert wurde mit dem zweiseitigen ungepaarten T-Test ermittelt. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Der relative Anteil der Makrophagen-Populationen wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (Abbildung 44). Hierbei wurden Makrophagen als CD45⁺, CD11b⁺ und CD14⁺ definiert, wobei Marker für andere Linien wie CD20, CD15 und CD1c als Ausschlusskriterium dienen ¹⁴². Die Expression von TREM2 und MHCII wurde zur Identifizierung und Diskriminierung der intimalen Lining-Makrophagen (TREM2⁺) und interstitiellen Makrophagen (MHCII⁺) verwendet. Es zeigte sich, dass TREM2 und MHCII auf unterschiedlichen Zellpopulationen exprimiert werden.

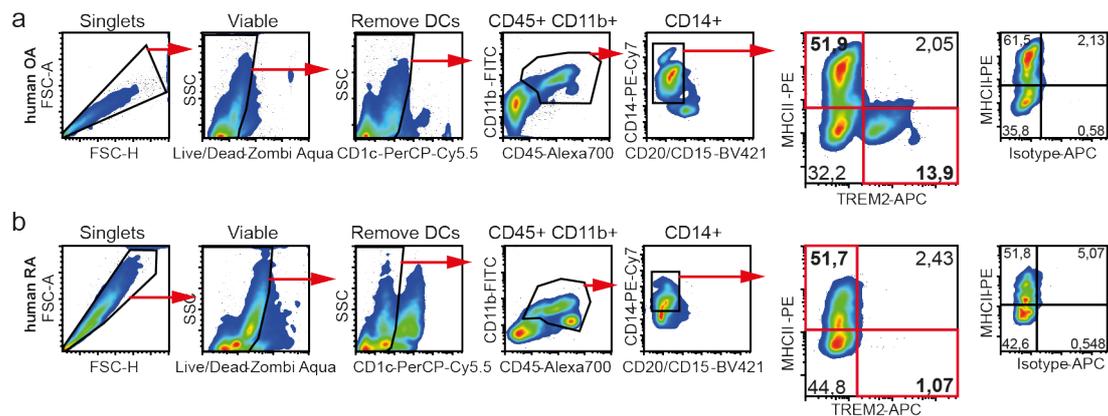


Abbildung 44 Quantifizierung der MHCII⁺TREM2⁻ und MHCII⁺TREM2⁺ Makrophagen in humanem Synovialgewebe

(a) und (b) Durchflusszytometrie von humanem Synovialgewebe aus dem Kniegelenk von Patienten mit diagnostizierter Osteoarthritis (OA in (a)) und rheumatoider Arthritis (RA in (b)).

Lebende (Zombi Aqua[®]) Makrophagen wurden definiert als CD1c⁻, CD45⁺, CD11b⁺, CD20⁻, CD15⁻ und CD14⁺. Die Expression von MHCII und TREM2 unterscheidet die Makrophagen-Subpopulation. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

Während einer RA verringert sich der Anteil der TREM2⁺ Lining-Makrophagen deutlich. Hierbei ist jedoch von einer Ausdünnung bezogen auf die Anzahl der gesamten Makrophagen auszugehen, die wahrscheinlich durch Infiltration und Proliferation von TREM2⁻ Makrophagen zu Stande kam.

Bisher sind nur wenige Daten, die das Transkriptom humaner Synovialmakrophagen beschreiben, verfügbar und Vergleiche der Expressionsprofile muriner und humaner Zellen waren daher begrenzt möglich.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Zhang et al. zu humanen Monozyten ⁹³, in denen Einzelzell-RNA-Sequenzierungen von humanen Monozyten aus Synovialgewebe von RA und OA-Patienten durchgeführt wurde, konnten vier Subpopulationen definiert werden: proinflammatorische IL-1 β -produzierende Monozyten (SC-M1), Interferon-aktivierte Monozyten (SC-M2), C1QA⁺ Monozyten (SC-M3) und NUPR1⁺ (SC-M4).

Es wurde untersucht, inwieweit diese vier unterschiedlichen Population mit denen übereinstimmen, die in den Einzelzell-RNA-Sequenzierungen der sortierten mononukleären Phagozyten einer erkrankten Maus (Tag 5 nach K/BxN Serumtransfer) identifiziert wurden (Abbildung 45).

Dabei wurden die Top 10 Markergene der humanen Cluster mit den Marker-Genen der murinen Cluster verglichen und ein Quotient aus coexprimierten Markern ermittelt. Es ergaben sich große Übereinstimmungen zwischen proinflammatorischen IL-1 β ⁺ Monozyten (SC-M1) und CCR2⁺ IL-1 β ⁺ infiltrierenden Makrophagen (murin) sowie

zwischen Interferon-aktivierten Monozyten (SC-M2) und CCR2⁺ Arg1⁺ infiltrierenden Makrophagen (murin). Die NUPR1⁺ Monozyten (SC-M4) entsprachen den CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen. Die C1QA⁺ Monozyten (SC-M3) wiesen Ähnlichkeiten mit den RELM α ⁺ interstitiellen und MHCII⁺ Makrophagen auf.

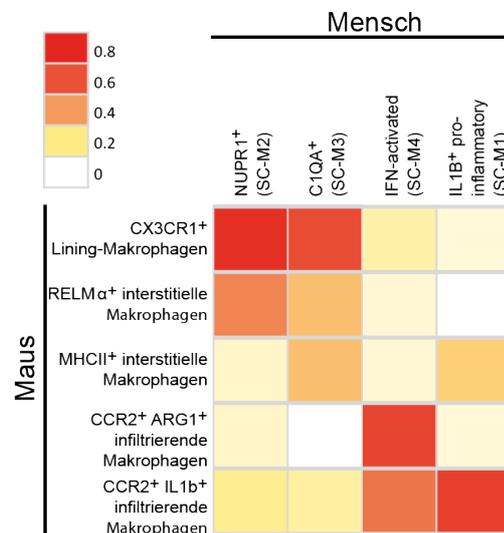


Abbildung 45 Vergleichende Analyse der Transkriptionsprofile humaner und muriner Synovialmakrophagen

Vergleich eines verfügbaren Einzelle-Sequenzierungsdatensatzes von Monozyten aus humanem Synovialgewebe von Patienten mit diagnostizierter Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis mit den Einzelle-RNA-Sequenzierungsdatensatz sortierter CD45⁺, CD11b⁺, LY6G⁻ Zellen aus der Maus vom Tag 5 nach K/BxN Serumtransfer. Die Werte repräsentieren den Quotienten der Anzahl aller co-exprimierter Makergene der 5 Makrophagen-Cluster an Tag 5 zu den 20 bereitgestellten humanen Markern der 4 beschriebenen Subpopulationen von Monozyten: SC-M1, SC-M2, SC-M3 und SC-M4. Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

4. Diskussion

4.1 CX₃CR1⁺ synoviale Lining-Makrophagen bilden eine dynamische membranähnliche Barriere im synovialen Gelenk

Mit Hilfe neuester Mikroskopie-Techniken wie der Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie und hochauflösender konfokaler Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie in Verbindung mit Reporter-gen-Strategien und Markierung vaskulärer Strukturen durch Fluorophor-gekoppelte Antikörper sowie der Anwendung ultrahochauflösender Transmissionselektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass CX₃CR1-exprimierende synoviale Makrophagen eine membranähnliche Struktur bilden, die die Synovialflüssigkeit des Gelenkspalts vom umliegenden Synovialgewebe mit seinem umfassenden Gefäßnetzwerk trennt.

Auch im interstitiellen Synovialgewebe befinden sich Makrophagen, die sich jedoch im Gegensatz zu CX₃CR1⁺ synoviale Lining-Makrophagen, welche ca. 40% aller synovialer Makrophagen ausmachen, nicht durch die Expression von CX₃CR1 auszeichnen (Abbildung 2).

Unter physiologischen Bedingungen ist die Barriere aus CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen synovialer Gelenke der Maus eine einzellige, planare, durchgängige und dichte Schicht. Inwieweit sich die Morphologie der Membran aus CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen im Kontext einer Entzündung verhält, wurde mit Hilfe experimenteller Arthritis-Modelle der Maus wie der Antikörper-vermittelten K/BxN Serumtransfer-Arthritis und der Kollagen-induzierten Arthritis untersucht.

Dabei stellte sich heraus, dass sich die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen neu ausrichten und einen pallisadenähnlichen Phänotyp annehmen während die Makrophagen-Barriere aufbricht (Abbildung 3, Abbildung 4).

Im Zuge der Entzündung infiltrieren Neutrophile Granulozyten und Monozyten den Gelenkspalt. Zelltrümmer und freie DNA im Gelenkspalt, die vor allem durch Neutrophile Granulozyten im Prozess der NETose frei gesetzt wurde, wird von CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen, die mit Zellfortsätzen weit in den Synovialspalt hineinreichen, phagozytiert (Abbildung 4, Abbildung 6).

Mfge8 und *Axl* spielen bei der Clearance von apoptotischen Zelle eine wichtige Rolle^{122,123} und sind während des Autoantikörper-vermittelten Entzündungsprozesses im

Synovialgewebe vor allem auf den CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen exprimiert (Abbildung 30).

Die mikroskopischen Beobachtungen zeigten, dass der Prozess der Eindämmung und Resolution der Entzündung durch Beseitigung von Zelltrümmern bereits frühzeitig nach Induktion einer Entzündung initiiert wird und vor allem CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen hierbei eine wesentliche Rolle spielen.

Synoviale Fibroblasten, welche unter gesunden Bedingungen die zweite Reihe der Zellen der Synovialmembran ausmachen, schieben sich während einer Entzündung in die erste Reihe und überwuchern die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen (Abbildung 7). Die Phagozytose-Funktion der CX₃CR1⁺-Lining-Makrophagen scheint dabei jedoch nicht wesentlich gestört zu sein, da sie mit langen Zellfortsetzungen zwischen die Fibroblasten greifen und Zelltrümmer aus der Synovialflüssigkeit entfernen.

4.2 CSF1R⁺ interstitielle Makrophagenvorläufer sind der Ursprung der CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen

Der Ursprung der Synovialen Makrophagen war bisher nicht bekannt. Es war nicht klar, ob sich die synovialen Makrophagen von aus dem Knochenmark stammenden Blutmonozyten ableiten, oder ob sie sich als residente Gewebsmakrophagen selbsterneuern. Zwar hatten Studien mit Knochenmarkchimären Hinweise darauf geliefert, dass ein Großteil der synovialen Makrophagen unabhängig von der Knochenmark-Hämatopoese existiert ⁹⁵. Jedoch war die Aussagekraft dieser Studien bezüglich der tatsächlichen Zusammensetzung der Makrophagen-Subpopulationen und ihrer Ontogenese durch experimentelle Schwachstellen, die unter anderem mit Bestrahlungen einhergehen, limitiert.

Fluoreszenzmikroskopische Analysen von Mausembryonen konnten zeigen, dass erste synoviale Makrophagen am Tag 15,5 der Embryogenese am Interface zwischen sich entwickelndem Synovialgewebe und dem größer werdenden Gelenkspalt auftreten (Abbildung 8).

Ob sich diese embryonalen Makrophagen im sich entwickelnden Synovialgewebe aus primitiven myeloiden Vorläufern, EMPs oder embryonalen HSC entwickelten, wurde in dieser Dissertation nicht untersucht und bedarf weiterer Aufklärung.

Durch Generierung von Parabiosen aus *Cx3cr1^{gfp}*-Mäusen und Wildtyp-Mäusen sowie *DsRed^{tg}*-Mäusen und Wildtyp-Mäusen, welche eine gemeinsame Blutzirkulation teilten, konnte gezeigt werden, dass es sich bei den CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen um eine

langlebige, residente Makrophagen-Population handelt, die sich unabhängig von Blutmonozyten aus dem Knochenmark aufrechterhält (Abbildung 9, Abbildung 10).

Während einer Entzündung wird das Makrophagen-Repertoire durch infiltrierende Makrophagen erweitert. Durch konditionale, Tamoxifen-abhängige *CSF1R*-Reporter-Mäuse und durch Antikörper-Markierung von *CSF1R* konnte gezeigt werden, dass sich im interstitiellen Synovialgewebe proliferierende *CSF1R*⁺ Zellen befinden, die sowohl zu *CX₃CR1*⁺ Lining-Makrophagen als auch zu interstitiellen Makrophagen differenzieren können (Abbildung 9).

Durch Quantifizierung der tdTomato-exprimierenden Zellen in der synovialen Grenzmembran, konnte für die *CX₃CR1*⁺ Lining-Makrophagen eine Halbwertszeit von ca. 30 Tagen ermittelt werden.

Die Depletion von *CSF1R*-exprimierenden Makrophagen im Synovialgewebe in *LysM^{cre}:CD115DTR*-Mäusen führte nach einiger Zeit zum Verlust der *CX₃CR1*⁺ Lining-Makrophagen und bestätigte den *CSF1R*-abhängigen Differenzierungsweg (Abbildung 25).

Dass die *CX₃CR1*⁺-Lining-Makrophagen nur eine sehr geringe proliferative Kapazität aufweisen, konnte in Tamoxifen-behandelten *Cx3cr1^{creER}:tdTomato*-Mäusen gezeigt werden (Abbildung 15).

Dabei stellte sich heraus, dass vor allem interstitielle Synovialmakrophagen proliferieren und, dass die Induktion einer Entzündung zum Anstieg der Anzahl proliferierender Zelle führte. In diesem Experiment konnte jedoch nicht unterschieden werden, ob infiltrierende oder residente interstitielle Makrophagen proliferieren und sich die Anzahl erhöht.

In Kombination mit den Studien der Parabiosen, bei denen es sowohl zu einer Vermehrung der residenten als auch der infiltrierenden Makrophagen kam, kann davon ausgegangen werden, dass sowohl infiltrierende als auch interstitielle, residente Makrophagen an der Vermehrung der Makrophagen während einer Entzündung beteiligt sind. Die Anzahl der *CX₃CR1*⁺ Lining-Makrophagen bleibt hingegen weitestgehend konstant, wobei diese Zellen während der Entzündung ihre Position beibehalten (Abbildung 13, Abbildung 14).

4.3 Die Heterogenität synovialer Makrophagen-Populationen

Mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierungen von CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁻ synovialen mononukleären Phagozyten konnten verschiedene Makrophagen-Subpopulationen identifiziert werden (Abbildung 20).

Neben den CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen, die eine charakteristische Expression von *Trem2* und *Vsig4* aufwiesen, konnten weitere interstitielle Makrophagen-Populationen unterschieden werden.

Eine interstitielle RELMα⁺ Makrophagen-Population zeichnete sich durch die Expression von bekannten Markern alternativer Aktivierung wie zum Beispiel CD206 und CD163 aus. Weitere interstitielle Makrophagen-Populationen exprimierten Gene des MHCII Komplexes sowie *Aqp1* und Gene, die im Prozess der Zellteilung eine Rolle spielen. Die Populationen der CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen und interstitiellen RELMα⁺ Makrophagen exprimierten solche Zellteilungs-Gene nicht und schienen somit nicht zu proliferieren.

Anhand vorangegangener Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den synovialen Makrophagen um residente selbsterneuernde Zellen handelte. Auf Basis der Analysen der Einzelzell-RNA-Sequenzierung wurden Entwicklungslaufbahnen berechnet, die die Differenzierung der einzelnen Makrophagen-Populationen abbilden. Ausgehend von einer proliferierenden MHCII⁺ AQP1⁺ Population synovialer Makrophagen differenzieren die Zellen entweder zu CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen oder zu interstitiellen RELMα⁺ Makrophagen (Abbildung 21, Abbildung 22).

Der Startpunkt dieser Entwicklungsbahn wurde durch Expression von Proliferations-assoziierten Genen wie *Cdk1*, *Stmn1* und *Mki67* validiert. Die fehlende Expression von *Maf* und *Mafb*, als negative Regulatoren der Zellproliferation von Makrophagen^{57,131}, in den Anfangsstadien und deren Zunahme im Verlauf der Differenzierung unterstützte die Richtung der Entwicklungslaufbahn.

Die Differenzierung von CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen zu RELMα⁺ Makrophagen und *vice versa* konnte durch *Cx3cr1^{creER}:tdTomato*-Mäuse und *Retnla^{cre}:tdTomato*-Mäuse weitestgehend ausgeschlossen werden (Abbildung 13, Abbildung 24).

Die berechneten Entwicklungslaufbahnen konnten weiter durch die *CSF1R^{creER}:tdTomato*-Mäuse, welche mit Tamoxifen gefüttert wurden, bestätigt werden (Abbildung 9, Abbildung 23). Hierbei waren alle MHCII⁺ interstitiellen Makrophagen schon nach sehr kurzer Zeit der Behandlung tdTomato positiv. Die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen und die RELMα⁺ Makrophagen hingegen wiesen nur einen langsamen und graduellen Anstieg der tdTomato Expression auf, wodurch davon ausgegangen werden konnte, dass sich diese Zellen von den MHCII⁺ interstitiellen Makrophagen ableiteten.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass synoviale CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen und die eigenständige interstitielle RELM α ⁺ Makrophagen-Population aus einem gemeinsamen residenten Pool synovialer MHCII⁺ CSF1R⁺ Makrophagen hervorgehen.

Einzelzell-RNA-Sequenzierungen von mononukleären Phagozyten aus der Anfangsphase der Antikörper-vermittelten Gelenkentzündung identifizierten infiltrierende Monozyten, welche zu Makrophagen differenzieren (Abbildungen 26 bis 29).

Diese Monozyten und Makrophagen-Populationen ließen sich zuverlässig unter anderem durch die Expression von CCR2 von den anderen Zell-Clustern abgrenzen. Auch bei den infiltrierenden Knochenmark-abgeleiteten CCR2⁺ Monozyten und Makrophagen untereinander handelt es sich um unterschiedliche Zellpopulation. Infiltrierende klassische Monozyten exprimierten unter anderem noch das für sie charakteristische Ly6C.

Die Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen konnten in zwei unterschiedliche Subpopulationen unterteilt werden, wobei sich eine Subpopulation durch die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β auszeichnete. Die zweite Subpopulation exprimierte *Arg1*, welches ein zuverlässiger Marker alternativer Aktivierung darstellt und mit anti-inflammatorischen Funktionen in Verbindung gebracht wird (Abbildung 28) ¹⁴³.

Misharin et al. postulierten, dass infiltrierende Ly6C^{low} Monozyten in entzündete Gelenke infiltrieren, einen M1 Phänotyp annehmen und die Entzündung vorantreiben. Im weiteren Verlauf der Arthritis sollen diese M1 Makrophagen einen M2 Phänotyp annehmen und die Resolution der Entzündung vermitteln⁹⁵.

Inwieweit die infiltrierenden Subpopulationen von Monozyten und Makrophage tatsächlich auseinander hervorgehen ist jedoch weiterhin nicht bekannt und wurde auch in dieser Dissertation nicht adressiert.

4.4 CX₃CR1⁺ synoviale Lining-Makrophagen bilden eine Tight-Junction-vermittelte anti-inflammatorische Barriere im Gelenk

Die genaue Funktion von synovialen Makrophagen im gesunden und entzündeten Gelenk war nur unzureichend verstanden, wobei davon auszugehen war, dass die verschiedenen Makrophagen-Subpopulation unterschiedliche Aufgaben im Gelenk erfüllen. Die Analyse der Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung sortierter CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen und CX₃CR1⁻ interstitieller Makrophagen sowie kultivierter BMDMs sollte Hinweise darauf geben, welche Funktionen vor allem die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen ausüben (Abbildungen 16 bis 19).

Besonders interessant war dabei die im Vergleich zu den kultivierten BMDMs signifikant erhöhte Expression einer Vielzahl von Tight-Junction-assoziierten Genen wie *Tjp1* und *Claudin-5*.

Dass Makrophagen überhaupt in der Lage sind funktionale Tight Junctions auszubilden ist weitestgehend unbekannt. Bisher wurde lediglich in einer Studie beschrieben, dass Makrophagen *in vivo* Tight Junctions ausbilden. In dieser Studie konnten Conan *et al.* zeigen, dass Makrophagen in Granulomen hervorgerufen durch eine *Mycobacterium tuberculosis*-Infektion über Tight Junctions miteinander verbunden sind¹⁴⁴.

Die Proteinexpression von TJP1 und CLDN5 konnte nun auch auf den CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen mittels konfokaler Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (Abbildung 31, Abbildung 32). Die Existenz funktioneller Tight Junctions aber auch von Desmosomen und Adherens Junctions als Zell-Zell-Kontakte zwischen CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen konnte mit Hilfe von Transmissionselektronenmikroskopie gezeigt werden (Abbildung 33).

Im Falle einer Entzündung brechen diese Zell-Zell-Verbindungen auseinander und es kommt zu der beschriebenen Neuausrichtung der Makrophagen.

Schon sehr zeitig nach Beginn der Anflutung der arthritogenen Antikörper im synovialen Gewebe konnte die Aufnahme der Immunglobuline beobachtet werden, was möglicherweise der direkte Auslöser für das Öffnen der Membran darstellte (Abbildung 36).

Dass es sich bei diesem Öffnen der Makrophagenmembran um einen von Neutrophilen Granulozyten-unabhängigen und Monozyten-unabhängigen Prozess handelte, konnte mittels depletierender Anti-GR1 Antikörper-Behandlung gezeigt werden, bei der es zum Verlust der Ly6C⁺ Zellen kam. Auch hier lösten die arthritogenen Antikörper das Aufbrechen der Membran aus ohne das Zeichen von Entzündungen wie Infiltration von Immunzellen zu beobachten war (Abbildung 37).

Die Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie und die dreidimensionale Rekonstruktion konnte die dynamischen Veränderungen der Membran aus CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen im gesunden Zustand und nach Initiation der Arthritis deutlich machen (Abbildung 34).

Es zeigte sich, dass es bei Induktion der Arthritis zu einer Verringerung der Dichte der CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen kam und als Perforation beschrieben werden kann.

Es wurde davon ausgegangen, dass es sich bei der Membran aus CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen nicht nur um eine physische sondern auch um eine funktionelle Barriere handelt. Magnetresonanztomographie konnte in der Tat zeigen, dass die Permeabilität

des synovialen Gewebes für Kontrastmittel durch Entzündungen gesteigert ist (Abbildung 35).

Die Depletion der CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen führte ebenso zu einer gesteigerten Permeabilität und Kontrastmittelakkumulation im Synovialgewebe (Abbildung 38).

Der durch die Depletion der CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen hervorgerufene Defekt der Synovialmembran ging mit einer Exazerbation der Entzündung bei der K/BxN Serumtransfer-Arthritis einher (Abbildung 38 bis 40).

Die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen scheinen also einen protektiven Einfluss bei der Initiation der Antikörper-vermittelten Entzündung zu haben. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es auch ohne CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen zur Entwicklung der Gelenkentzündungen kam.

Dass die residenten Makrophagen trotzdem einen proinflammatorischen Einfluss haben können, ist jedoch nicht ausgeschlossen.

Auch Tiere denen ein Großteil der Blutmonozyten depletiert wurde, entwickelten Gelenkentzündungen nach K/BxN Serumtransfer (Abbildung 42). Allerdings kam es bei permanenter Monozyten-Defizienz zu einer schnelleren Auflösung der Entzündung, was proinflammatorische Funktionen der infiltrierenden Makrophagen nahelegt.

Die pharmakologische Stabilisierung der Tight Junctions mittels Imatinib bzw. deren Destabilisierung durch Claudin-5 Peptidomimetika konnte zeigen, dass die protektive Funktion die Membran aus CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen unter anderem durch die Tight Junctions vermittelt werden. Pharmakologisches Aufbrechen der Tight Junctions verstärkte und beschleunigte die Entwicklung der Antikörper-vermittelten Entzündung. Die Stabilisierung der Tight Junctions hingegen hatte schützende Auswirkungen (Abbildung 41).

4.5 Von Mäusen und Menschen ...

Maus ist nicht Mensch und Mensch ist nicht Maus, aber sie sind sich doch sehr ähnlich....

Es ist klar, dass die Erkenntnisse aus Tierversuchen nicht immer auf den Menschen übertragbar sind. Für die Grundlagenforschung und die Erforschung komplexer Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis sind Tierversuche und die heutigen genetischen und molekularbiologischen Methoden jedoch unschätzbar wertvoll. Dabei muss jedoch immer bedacht werden, dass am Ende der Mensch das Säugetier ist, welches geheilt werden soll und nicht die Maus.

Somit ist es unbedingt nötig, die Erkenntnisse aus der Maus auch für den Menschen zu validieren.

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass es die Membran aus Lining-Makrophagen in ähnlicher Weise wie bei der Maus auch im Synovialgewebe des Menschen gibt.

Die Entdeckung von neuen Markern für CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen wie TREM2 ist geeignet, um Lining-Makrophagen und interstitielle Makrophagen auch im humanen Synovialgewebe zu unterscheiden. So konnte gezeigt werden, dass sich die Dichte der Makrophagen der Synovialmembran auch im Menschen im Falle einer Entzündung reduziert.

Mit Hilfe von TREM2 als Marker konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu OA Synovialgewebe im RA Synovialgewebe viel weniger TREM2⁺ Lining-Makrophagen im Verhältnis zu interstitiellen und infiltrierenden Makrophagen vorhanden sind. Wahrscheinlich kam es zu einer Ausdünnung der TREM2⁺ Lining-Makrophagen durch massive Infiltration weiterer Makrophagen (Abbildung 43, Abbildung 44).

Frühere Studien versuchten bereits die Makrophagen im humanen Synovialgewebe mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung zu charakterisieren^{93,94}. Dabei konnten vier verschiedene Monozyten-Populationen unterschieden werden, deren Expressionsprofile Ähnlichkeiten mit den murinen Subpopulationen aufwiesen. Es wurde in diesen Studien gezeigt, dass proinflammatorische Il-1β⁺ HEBGF⁺ Makrophagen in der Lage sind die Invasivität der synovialen Fibroblasten zu steigern. Weitere funktionelle oder mikroanatomische Schlüsse wurden nicht gezogen.

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass die inflammatorischen Il-1β⁺ CCR2⁺ infiltrierenden Makrophagen den humanen Il-1β⁺ HBEGF⁺ Makrophagen entsprachen. Die infiltrierenden CCR2⁺ARG1⁺ Makrophagen der Maus entsprachen der humanen Population Interferon-aktivierten Monozyten.

Die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen zeigten sehr große Übereinstimmungen mit den NUPR1⁺ Monozyten. Die murinen RELMα⁺ interstitiellen Makrophagen ähneln sowohl dem NUPR1⁺ Monozyten als auch den humanen C1QA⁺ Monozyten und die humanen C1QA⁺ Monozyten ähneln auch den CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen. Die murinen MHCII⁺ interstitiellen Makrophagen siedeln sich zwischen dem Pool residenter und infiltrierender Makrophagen an und konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Unterschiedliche Strategien des Clusters bei der Analyse der Sequenzierungsdaten können hierbei eine Rolle spielen (Abbildung 45).

4.6 Ausblick

Obwohl diese Dissertation das Wissen über Ursprung und Funktion der synovialen Makrophagen-Subtypen maßgeblich erweitern konnte, sind weiterhin viele Fragen offen und erfordern weitere Untersuchungen. Im Folgenden sind einige interessante und relevante Fragestellungen aufgeführt.

Wie heterogen sind infiltrierende Makrophagen?

In dieser Arbeit wurde auf die Ontogenese und Differenzierung von residenten Makrophagen-Populationen eingegangen. Nicht weniger interessant sind jedoch auch die infiltrierenden Monozyten und Makrophagen, die die Entzündung mitunter voranzutreiben scheinen, da sie proinflammatorische Zytokine wie zum Beispiel IL-1 β produzieren.

Weitere infiltrierende Makrophagen exprimierten hingegen Gene, die charakteristisch für alternative Aktivierung waren und möglicherweise anti-inflammatorische und entzündungauflösende Funktionen ausüben. Wie heterogen die Populationen der infiltrierenden Makrophagen tatsächlich sind, muss in weiteren Versuchen analysiert werden. Dabei geht es vor allem darum, die genauen Funktionen der Subtypen zu entschlüsseln. Ebenso muss der Differenzierungsweg vom Blutmonozyten zum inflammatorischen Gewebemakrophagen untersucht werden. Wobei man hier die unterschiedlichen Signalwege und deren Aktivatoren, welche die Differenzierung steuern, aufklären sollte.

Sind CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen an der Produktion der Synovialflüssigkeit beteiligt?

Eine der Funktionen des Synovialgewebes ist die Produktion der Synovialflüssigkeit. Diese wird als Ultrafiltrat des Blutes verstanden, welches durch Sezernierung von Proteinen, wie Lubricin und die Produktion von Makromolekülen wie Hyaluronsäure durch das synoviale Gewebe die charakteristischen Eigenschaften der Gelenkschmiere erhält¹⁵. Bezüglich der Funktion synovialer Makrophagen sind hierbei zwei Aspekte besonders interessant: die Produktion von Lubricin und eine potentielle allgemeine Filterfunktion.

Es wurde bisher angenommen, dass vor allem synoviale Fibroblasten Lubricin produzieren¹⁴⁵. Die Analyse des Transkriptom der synovialen CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen und die Detektion von Lubricin-Transkripten legen nahe, dass auch diese Zellen an der Produktion dieses wichtigen Glykoproteins beteiligt sind.

Für die Filtration des Blutes ist naturgemäß ein Gewebe mit Filterfunktion notwendig. Gut bekannt sind zum Beispiel die Podozyten und das Schlitzdiaphragma in den Glomeruli der Niere¹⁴⁶, welche für die Produktion des Primärharns eine wichtige Rolle einnehmen. Über

die Filterfunktion des Synovialgewebes ist kaum etwas bekannt. Betrachtet man die transmissionselektronischen Aufnahmen der Synovialmembran, fällt auf, dass die Zellzwischenräume ausgehend von kapillären Gefäßen mit zunehmender Annäherung an den Gelenkspalt abnehmen (Abbildung 5).

Die synovialen Fibroblasten sind relativ lose in der kollagenreichen extrazellulären Matrix eingebettet. Die synovialen CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen stehen schließlich in sehr engem Kontakt zueinander. Eine extrazelluläre Matrix ist kaum noch vorhanden.

So kann man die Hypothese aufstellen, dass Makrophagen ein wesentlicher Bestandteil eines physischen und funktionellen Filtersystems darstellen. Weitere Experimente zur potentiellen Filterfunktion von CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen sind nötig, um zu verstehen, ob und welche Rolle synoviale Makrophagen, bei der Produktion der Synovialflüssigkeit spielen.

Wie interagieren synoviale Makrophagen und Fibroblasten miteinander?

Über die Wechselwirkungen von synovialen Makrophagen und synovialen Fibroblasten ist nicht viel bekannt. Viele Forschungsprojekte betrachteten die Funktionen der Zelltypen isoliert^{77,95,142}.

Im humanen System konnte bereits gezeigt werden, dass infiltrierende porinflammatorische IL-1β⁺ HBEGF⁺ Monozyten die Invasivität von synovialen Fibroblasten fördern⁹⁴. Da beide Zelltypen im gesunden Gelenk schon rein räumlich in sehr enger Beziehung zueinander stehen, sind intensive Wechselwirkungen anzunehmen, die auch unter physiologischen Bedingungen bestehen. Die Verknüpfung von Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten von synovialen Makrophagen mit denen der synovialen Fibroblasten könnte dabei komplexe Netzwerke aus Stimulatoren des einen Zelltyps und Rezeptoren und korrespondierender Signalwege des anderen zum Vorschein bringen.

Was sind die synovialen Makrophagenvorläufer?

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass ausdifferenzierte synoviale Makrophagen-Populationen von einem gemeinsamen residenten Vorläufer abstammen. Diese Vorläuferzellen müssen näher charakterisiert werden. Es ist nicht geklärt, ob es sich bei diesen Vorläuferzellen um eine Art Stammzellpopulation handelt oder ob es sich lediglich um eher undifferenzierte Makrophagen handelt, die schließlich in Antwort auf bestimmte Stimuli einen Differenzierungsweg in Richtung CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen oder RELMα⁺ interstitielle Makrophagen einschlagen.

Dabei ist nicht bekannt, welche Faktoren eine potentielle „stem cell-ness“ oder Oligopotenz der Vorläufermakrophagen im synovialen Gewebe bestimmen.

Yasutaka Okabe & Ruslan Medzhitov stellten ein Konzept vor, in dem davon ausgegangen wird, dass Makrophagen entsprechend der funktionellen Anforderungen eines bestimmten Gewebes oder Organs spezifische Stimuli bereit gestellt bekommen, die wiederum die Differenzierung und Funktionalität der Makrophagen bestimmen⁶³.

Im Synovialgewebe und in der Synovialflüssigkeit sind vor allem Knorpel- und Fibroblasten-Metabolite wie Hyaluronsäure zu finden. Ein Rezeptor für Hyaluronsäure ist CD44⁶³. Dieser Oberflächenrezeptor konnte unter anderem auch auf den synovialen Vorläufermakrophagen gefunden werden (Daten wurden nicht gezeigt.). Ein potenzielles Szenario hierbei wäre, dass die Makrophagenvorläufer Moleküle wie Hyaluronsäure oder auch Kollagen-Derivate wahrnehmen und ihr Expressionsprofil dementsprechend anpassen und final zu CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen differenzieren. Diese sind nun in der Lage das umliegende Gewebe vor den proinflammatorischen Knorpel-Metaboliten abzuschirmen und verhindern somit eine Entzündung.

Bilden die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen ein funktionelles Synzytium?

Mittels konfokaler Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie konnte auch Connexin-43, welches ein integraler Bestandteil der Gap Junctions ist, detektiert werden. Eine interzelluläre Zellkommunikation ist daher sehr wahrscheinlich. Welche Signalmoleküle hierbei eine Rolle spielen ist jedoch unbekannt. In einer Studie die sich mit der funktionellen Rolle von Makrophagen des Herzens beschäftigte, konnte gezeigt werden, dass diese kardialen Makrophagen ebenfalls Gap Junctions ausbilden und an der Reizweiterleitung im Herzen beteiligt sind¹⁴⁷. Vor diesem Hintergrund ist es möglich, dass synoviale CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen ein funktionelles Synzytium bilden, welches über Signalmoleküle und Ionenströme kommuniziert. Kalzium als wichtiger *second messenger* könnte hierbei eine hervorgehobene Rolle in der Physiologie der synovialen Makrophagen einnehmen, da die CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen zum Beispiel hoch selektiv das Kalzium-bindende Protein S100b exprimierten.

Welche Rolle spielt TREM2?

In den Analysen der Sequenzierungsdaten tauchten eine Reihe weiterer interessanter Gene auf, deren Erforschung weitere Aufschlüsse über die Funktion synovialer Makrophagen geben können.

Hierbei ist vor allem TREM2 ein sehr interessantes Protein, das unter anderem in der Pathogenese von Alzheimer als Erkrankung des zentralen Nervensystems eine wichtige Rolle zu spielen scheint¹²¹. Generell weisen Mikroglia des Gehirns und CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen bezüglich ihres Transkriptionsprofils viele Gemeinsamkeiten auf. So exprimieren beide Zelltypen Gene wie *Cx3cr1*, *Sparc*, *Trem2*, *Hexb*, *Itgb5* und weitere⁷⁵.

Da auch Mikroglia an der Funktionalität einer Barriere, der Blut-Hirn-Schranke, beteiligt sind, existiert möglicherweise eine Art allgemeines transkriptionelles „Barriere-Profil“.

Eine generelle, potenziell anti-inflammatorische Barriere-Funktion von Makrophagen könnte auch in Bezug auf Tumore mit ihren Tumor-assoziierten Makrophagen oder bei der Makrophagen-vermittelten Granulombildung bei Infektionen mit Mykobakterien sowie bei Sarkoidose von besonderer Bedeutung sein.

Modifizierungen dieser Makrophagen-vermittelten Barrieren durch pharmakologische Stabilisierungen oder Destabilisierungen könnten somit neue Strategien bei der Prävention und Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen darstellen.

5. Highlights

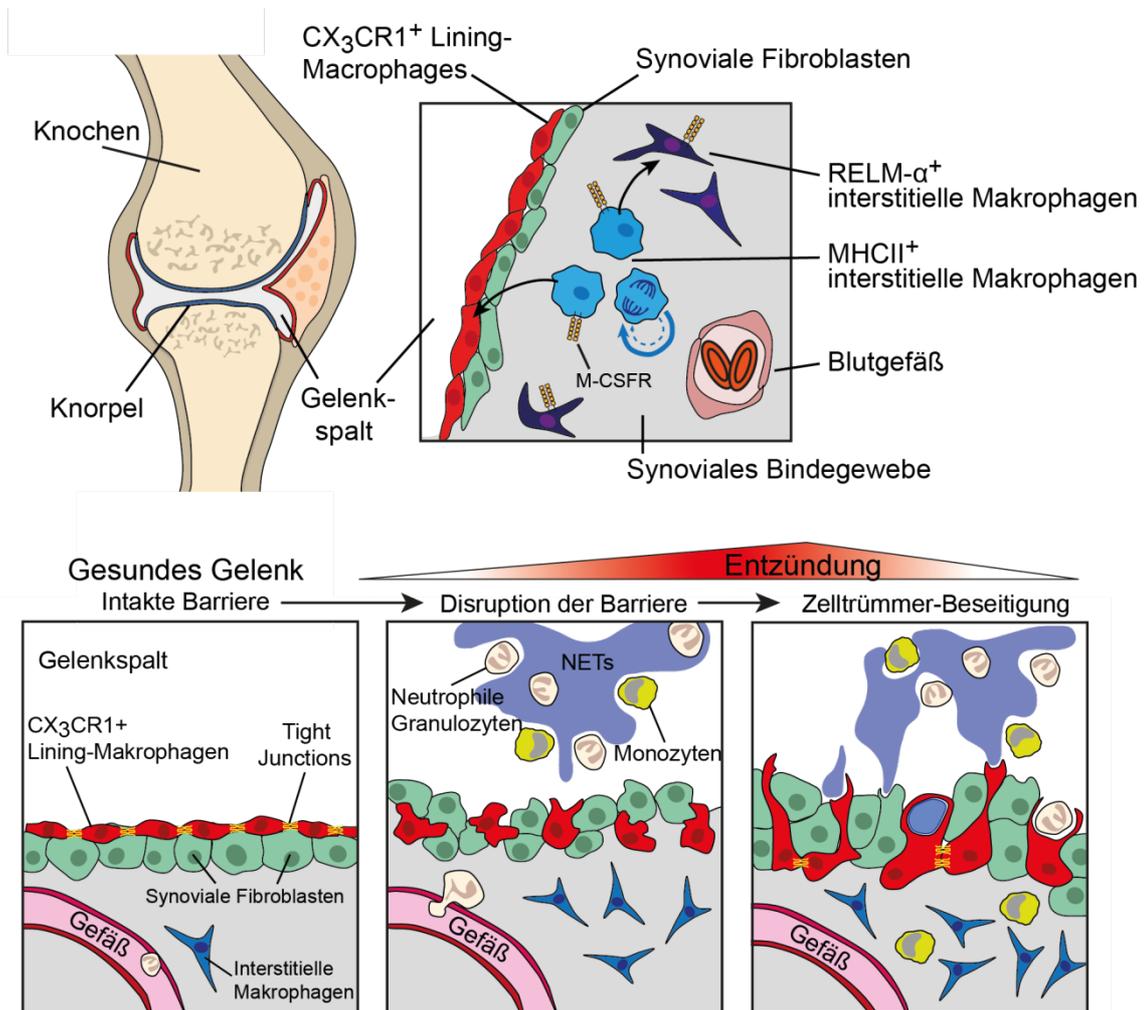


Abbildung modifiziert übernommen aus ¹.

- CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen bilden eine dichte Tight Junction-vermittelte physische Barriere in synovialen Gelenken.
- CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen gehen aus einem residenten Pool von interstitiellen Vorläuferzellen hervor.
- CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen richten sich während einer Entzündung zum Synovialspalt hin aus. Es kommt zum Aufbrechen der Makrophagen-Barriere.
- CX₃CR1⁺ Lining-Makrophagen sind protektiv und beseitigen Zelltrümmer aus der Synovialflüssigkeit

6. Material und Methoden

Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Methoden und Materialien sind in Culemann et al.¹ beschrieben und werden im folgenden erneut detailliert erläutert und aufgeführt.

6.5 Mäuse

Die Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit deutschem Gesetz und den Richtlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)* durchgeführt und wurden durch die Regierung von Unterfranken genehmigt. Die Parabiosen wurden durch die Tierschutz- und Ethik-Kommission des *Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Carlos III*, und lokale Behörden genehmigt.

Sowohl männliche als auch weibliche Mäuse im Alter von 8 bis 18 Wochen wurde, soweit nicht anders angegeben, verwendet. Verpaarung und Versorgung der Tiere erfolgte durch Mitarbeiter der Versuchstiereinrichtungen der Universität Erlangen unter pathogenfreien Bedingungen. Folgende Mäuse wurden für die Studien verwendet:

Tabelle 2 Verwendete Mausstämme

Organismus/ Stammabkürzung	Stamm	Hersteller/Vertreiber	Identifikationsnummer
Maus: C57BL/6	C57BL/6J	Charles River	632
Maus: C57BL/6	C57BL/6JRj	Janvier Labs	
Maus: Cx3cr1 ^{cre} ;R26- tdTomato	Tg(Cx3cr1- cre)MW126Gsat/Mmucd	MMRRC	036395-UCD
	Mouse: B6;129S6- Gt(ROSA)26Sor ^{tm9(CAG- tdTomato)Hze/J}	The Jackson Laboratory	007905
Maus: DsRed	STOCK Tg(ACTB- DsRed*MST)1Nagy/J, DsRed.T3	The Jackson Laboratory	005441
Maus: Cx3cr1 ^{creER}	B6.129P2(C)- Cx3cr1 ^{tm2.1(cre/ERT2)Jung/J}	The Jackson Laboratory	020940
Maus: CSF1R ^{creER}	FVB-Tg(Csf1r- cre/Esr1*)1Jwp/J	The Jackson Laboratory	019098
Maus: iDTR	C57BL/6- Gt(ROSA)26Sortm1(HBEG F)Awai/J	The Jackson Laboratory	007900
Maus: tdTomato	B6;129S6- Gt(ROSA)26Sor ^{tm9(CAG- tdTomato)Hze/J}	The Jackson Laboratory	007905
Maus: CD115DTR	C57BL/6-Tg(Csf1r- HBEGF/mCherry)1Mnz/J	The Jackson Laboratory	024046
Maus: Cx3cr1 ^{gfp}	B6.129P-Cx3cr1tm1Litt/J	The Jackson Laboratory	005582
Maus: Csf1r ^{gfp}	C57BL/6-Tg(Csf1r-EGFP- NGFR/FKBP1A/TNFRSF6) 2Bck/J	The Jackson Laboratory	005070

Co/VI^{cre}-Mäuse wurden im Labor von George Kollias hergestellt¹⁴⁸. Retnla^{cre};tdTomato Mäuse wurden im Labor von David Vöhringer generiert.

6.6. Humane Synovialbiopsien

Synovialbiopsien wurden von Patienten mit diagnostizierter rheumatoider Arthritis (RA, 2010 EULAR/ACR Kriterien für rheumatoide Arthritis) oder Osteoarthritis (OA) gewonnen. Alle Patienten waren mindestens 18 Jahre alt. Die Patienten wurden informiert und unterzeichneten eine Einverständniserklärung. RA-Proben wurden von Patienten der Medizinischen Klinik 3 - Rheumatologie und Immunologie des Universitätsklinikums Erlangen aquiriert. Die OA-Proben stammen von Patienten der Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Erlangen.

6.6 Mausmodelle für experimentelle Arthritis

K/BxN Serumtransfer-Modell. Das K/BxN Serumtransfer-Modell¹⁰³ ist ein Antikörpervermitteltes Arthritismodell bei dem eine Polyarthritis durch die intraperitoneale Injektion von 150µl K/BxN Serum ausgelöst wird. K/BxN Serum wurde von K/BxN Mäusen, die bereits eine Polyarthritis entwickelten, gesammelt. Dieses Serum enthält Antikörper gegen das Enzym Glukose-6-Phosphatisomerase, welche die Entzündung verursachen.

Die Evaluation der klinischen Entwicklung der Arthritis erfolgte durch Anwendung eines semiquantitativen klinischen Indexes. Dabei erhielt jede Pfote einen individuellen Score, welcher den Grad der Entzündung beschreibt: 0 = Keine Zeichen von Entzündung; 1 = Geringe Schwellung und Rötung einer Pfote oder einzelner Zehen; 2 = Mittelgradige Schwellung und Rötung einer Pfote oder mehrerer Zehen; 3 = Starke Schwellung und Rötung der gesamten Pfote; 4 = Maximale Entzündung der Pfote. Die Summe der Scores aller vier Pfoten entspricht dem klinischen Index, welcher somit von minimal 0 bis maximal 16 reicht. Zusätzlich wurden die Pfortenschwellungen mittels Kaliper metrisch erfasst. Dabei wurde die Breite der horizontalen Ausdehnung des Sprunggelenkes und die vertikale Ausdehnung des Mittelfußbereiches erfasst und adiert.

Kollagen-induzierte Arthritis. Die Durchführung der Kollagen-induzierten Arthritis wurde bereits in einer anderen Studie beschrieben¹⁴⁹. Hierbei wurden Mäuse durch eine intradermale Injektion einer Emulsion aus 200µg Hühnerkollagen Typ II (Sigma C-930), 250µg Hitze-inaktivierter Mykobakterien (*Mycobacterium tuberculosis* H37RA) und Freund's Adjuvant (Sigma #F5506) immunisiert. Die Immunisierungen erfolgten an Tag 0 und Tag 21.

6.7 *In vivo* Behandlungen

Tamoxifen-Behandlungen. *Cx3cr1^{creER}:tdTomato* Mäuse erhielten 0,8mg Tamoxifen zweimal innerhalb von 48 Stunden durch intraperitoneale Injektion, um systemisch wirksam zu sein. Tamoxifen wurde in Ethanol gelöst (100 mg/500 µl) und in Erdnussöl auf eine Konzentration von 4 mg/ml verdünnt. Für die intra-artikuläre, lokale Anwendung des Tamoxifens in Kniegelenken von *Cx3cr1^{creER}:tdTomato*-Mäusen wurden 25µl (Z)-4-Hydroxytamoxifen (Sigma, H7904) gelöst in PBS mit 4% Ethanol ins Knie injiziert. *CSF1R^{creER};R26-dtTomato* Mäuse erhielten für fünf Tage, vier Wochen oder sechs Wochen Futter, welches 400 mg/kg Tamoxifen-Zitrat (envigo) enthielt.

Diphtherietoxin-Behandlung. *Cx3cr1^{cre}:iDTR*-Mäuse wurden systemisch durch eine intraperitoneale Injektion von 500 ng DT/Maus an zwei aufeinander folgenden Tagen fünf Tage vor Injektion des K/BxN Serums behandelt. Für die lokale Depletion wurden drei Tage vor dem K/BxN Serumtransfer 50µl PBS mit 50ng DT in die Hinterpfote injiziert. Die kontralaterale Pfote diente als Kontrolle wobei 50µl PBS injiziert wurden.

LysM^{cre}:CD115DTR Mäuse wurden täglich mit Diphtherietoxin (DT) behandelt. Einen Tag vor K/BxN Serumtransfer wurden 500ng DT/Maus intraperitoneal injiziert. An jedem weiteren Tag erfolgte die Behandlung in gleicher Weise jedoch mit einer reduzierten DT Menge von 100ng/Maus. Um die Depletion und Repopulation von Makrophagen in *LysM^{cre}:CD115DTR* Mäusen zu untersuchen, wurde das DT (500 ng/Maus) dreimal wöchentlich bis zum Tag 10 intraperitoneal verabreicht.

Claudin-5 Peptidomimetika. Die Claudin-5 Peptidomimetika (C5C2, Sequenz: SSVVQSTGHMQSKVYESVLALSAEVQAAR-NH2) und die Kontrollvariante des Peptids (C5C2scr, AHLVRSVSDVMQSQTGKTSESYSQVAVQLVA-NH2) wurde in PBS rekonstituiert und intravenös in die Schwanzvene appliziert. Dabei wurden 3,5 µmol/kg einen Tag vor und einen Tag nach dem K/BxN Serumtransfer injiziert. Im Fall der Analyse mittels Magnetresonanztomograph wurde nur einmal am Tag vor Auslösen der Arthritis behandelt. Die Kontrollvariante des C5C2 wurde vom humanen C5C2 abgeleitet. Das humane und das murine C5C2 stimmen zu 93,1% in ihrer Aminosäuresequenz überein (humane C5C2 Sequenz: SSVVQSTGHMQSKVYDSVLALSTEVQAAR-NH2). Die Kontrollvariante wurde an Tight Junctions von bEND.3 Mausendothelzellen und an der Blut-Retina-Schranke *in vivo* getestet und hatte keinen Effekt.

Imatinib-Behandlung. Imatinib wurde in wässriger Lösung (0.5% (hydroxypropyl)cellulose und 0,05% TWEEN 80 in Wasser) gelöst und zweimal täglich beginnend einen Tag vor K/BxN Serumtransfer oral verabreicht.

Injektion Fluorophor-markierter Antikörper von K/BxN Serum.

A647-markierte IgGs von K/BxN Serum wurden intravenös zusammen mit K/BxN Serum im Verhältnis 1:4 injiziert. Die Aufreinigung der IgGs des Serums erfolgte mittels protein-G Gravi-Trap (GE Healthcare, 28-9852-55). Die Markierung der IgGs wurde mit dem SAIVI™ Alexa Fluor™ 647 Antibody/Protein 1 mg-Labeling Kit durchgeführt.

Anti-Gr-1 Behandlung. Die antikörpervermittelte Depletion von neutrophilen Granulozyten und Ly6C⁺ Monozyten erfolgte mit InVivoPlus anti-mouse Ly6G/Ly6C (Gr-1) antibody (clone: RB6-8C5, Bio X Cell, BP0075) durch intravenöse Injektion (200µl) einen Tag vor Auslösen der Arthritis. Als Kontrolle wurde InVivoPlus rat IgG2b isotype control, anti-keyhole limpet hemocyanin (200µg, i.v., clone: LTF-2, Bio X Cell, BP0090) verwendet.

6.8 Parabiosen

Die Parabiosen wurden im Labor von Andres Hidalgo durchgeführt. Dabei wurden die Mäuse narkotisiert und an der entsprechenden Körperseite rasiert. Die Haut zweier Tiere wurde über die Länge vom Ellenbogen bis zum Knie geöffnet. Anschließend wurden Olekranon und Knie der beiden Mäuse zusammengenäht (Propylene Naht, 5/0). Die dorsale und ventrale Haut der beiden Mäuse wurde vernäht. Nach der Operation erhielten die Tiere eine einzelne Injektion von Buprenorphin subkutan. Nach 6 bzw. 9 Wochen wurden die Mäuse getötet und mittels Durchflusszytometrie oder histologisch analysiert. Der Chimerismus der Gewebe wurde als Quotient der Verteilungen der Partner-abgeleiteten Blutmonozyten zu den Gewebsmakrophagen der synovialen Gelenke der Hinterpfoten dargestellt.

6.9 Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Blutproben wurden in 15 ml Falcon Röhrchen mit 2mM EDTA und 4% Hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) mittels Heparin-beschichteter Glaskapillare gesammelt. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte mit destilliertem Wasser mit anschließender Supplementierung von 10xPBS. Die Zellen wurden mit 10% Rattenserum in PBS bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit Fluorophor-konjugierten Antikörpern in PBS/5% Rattenserum für 20 Minuten bei 4°C gefärbt. Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen in PBS mit 2%FCS überführt.

Zur Isolation von synovialen Makrophagen wurden die Hinterpfoten der Mäuse verwendet. Dabei wurden Haut, Sehnen und Muskel entfernt. Die Dissoziation des Gewebes erfolgte in einer Lösung aus RPMI Medium mit 2 mg/ml Kollagenase von *Clostridium histolyticum* (Sigma, C5138-1G) und DNase (0.03mg/ml, Sigma 9003-98-9) für 45 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/2% FCS/2mM EDTA gewaschen und mit einem 70µm Zellfilter filtriert. Nachdem die Zellen mit 10% Rattenserum/PBS blockiert wurden (Raumtemperatur, 10 Minuten), erfolgte die Färbung mit konjugierten Antikörpern für 20 Minuten bei 4°C. Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen in PBS mit 2%FCS überführt. Um die Proliferationsfähigkeiten der Zellen zu untersuchen, wurde den Mäusen fünf Stunden vor dem Sammeln der Zellen EdU intraperitoneal (50 mg/kg) injiziert. Die Detektion des EdU erfolgte mittels EdU base click EdU-Flow Cytometry Kit 488 (BCK-FC488-100).

Humane Synovialmakrophagen wurden aus synovialem Gewebe von Kniegelenken von Patienten isoliert. Dazu wurde das Gewebe in einer Lösung aus RPMI Medium mit 2 mg/ml Kollagenase von *Clostridium histolyticum* und DNase (0.03mg/ml) für 45 Minuten bei 37°C dissoziiert. Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation in ZombieAqua (1:1000, Biolegend) für 15min bei Raumtemperatur für die spätere Diskriminierung lebender und toter Zellen. Anschließend wurden die Zellen mit 4%PFA/PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, mit 1%BSA/PBS gewaschen und mit einem Saponin-basierten Puffer permeabilisiert. Die Färbung mit CD11b-AF488, MHC II-PE, CD14-PeCy7, CD45-AF700, CD1c-PerCP/Cy5.5, CD20-BV421, CD15-BV421, und Trem2-APC erfolgte ebenfalls im Saponinpuffer über Nacht bei 4°C. Die Durchflusszytometrie wurde am CytoFLex S, Beckman Coulter durchgeführt. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung wurde am MoFlo XDP, Beckman Coulter, mit dem Summit Software System durchgeführt.

Die Analyse der FACS-Daten erfolgte mit folgenden Programmen: Kaluza (Beckman Coulter, Version 1.5a), CytExpert (Beckman Coulter, Version 2.2.0.97) oder FlowJo (Version 7.6.5).

6.10 Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung

Sortierte CX₃CR1⁺ und CX₃CR1⁻ synoviale Makrophagen von Hinterpfoten von *Cx3cr1^{gfp}* Mäusen und kultivierten Knochenmarksmakrophagen (*bone marrow-derived macrophages*, BMDM) wurde für die Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung verwendet. CD45⁺, CD11b⁺, F4/80⁺, CX₃CR1⁺ und CX₃CR1⁻ Makrophagen von *Cx3cr1^{gfp}* Mäusen wurden sortiert. BMDMs wurden aus dem Knochenmark der Femura von C57BL/6 Mäusen isoliert und in

DMEM (10%FCS, 1% Pen/Strep) kultiviert. Nach einem Tag wurden die nicht-adhären Zellen gesammelt und in M-CSF-konditioniertem DMEM (10%FCS, 1% Pen/Strep) zu Makrophagen differenziert. Die RNA Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Mini kit (QIAGEN, Cat No./ID: 74104). Die *libraries* wurden einer *single-end* Sequenzierung auf der HighSeq-2500 platform (Illumina, San Diego, CA) unterzogen. Die erhaltenen *reads* wurden in das .fastq Format konvertiert und mittels bcl2fastq v2.17.1.14 gemultiplext. Qualitätsfilterung wurde mit cutadapt v. 1.15 durchgeführt. Anschließend wurden die *reads* mit STAR aligner v. 2.5.4a 4 gegen das Mausreferenzgenom (Ensembl GRCm38, release 91) zugeordnet. Die *read counts* pro Gen wurden mit dem featureCounts program v. 1.6.1 5 erhalten. Alle folgenden Analysen wurden mit R version 3.5.0 (R Core Team 2015) durchgeführt. Dazu gehörten die Analyse der differentiellen Genexpression (DESeq2 package v.1.20.0 6) und die Erstellung der Diagramme (ggplot2_2.2.1 package).

6.11 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Sortieren der CX₃CR1⁺ und CX₃CR1⁻ synoviale Makrophagen von Hinterpfoten von *Cx3cr1^{gfp}* Mäusen und die Differenzierung der BMDMs von C57BL/6 Mäusen sowie die Isolation der RNA wurde, wie oben beschrieben (Abschnitt 6.10), durchgeführt. *Human leukemia virus reverse transcriptase* vom Gene Amp RNA PCR kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) und oligo(dT)₁₆ primers (Invitrogen) wurden zur Durchführung der reversen Transkription der totalen RNA benutzt. Folgende Primer-Sequenzen wurden verwendet ^{150,151}: β-actin: TGT CCA CCT TCC AGC AGA TGT (sense), AGC TCA GTA ACA GTC CGC CTA GA (antisense); ZO-1: GCT AAG AGC ACA GCA ATG GA (sense), GCA TGT TCA ACG TTA TCC AT (antisense); Claudin 5 TTA AGG CAC GGG TAG CAC TCA CG (sense), TTA AGG CAC GGG TAG CAC TCA CG (antisense), Claudin 10: TGG TGT GTG GTG TTG GAG GGT TTG G (sense), TGG AAG GAG CCC AGA GCG TTA CCT G (antisense).

6.12 Einzelzell-RNA-Sequenzierung

Die Einzelzell-RNA-Sequenzierung wurde mit sortierten CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁻ synovialen Zellen von gesunden und arthritischen *Cx3cr1^{creER}:tdTomato*-Mäusen durchgeführt. Die erkrankten Tiere erhielten K/BxN Serum und die Zellen von Tag 1, Tag 2 und Tag 5 wurden mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung isoliert. Vier Wochen vor dem K/BxN Serumtransfer erhielten die Mäuse zweimal intraperitoneal 0,8mg Tamoxifen

innerhalb von 48 Stunden. 10x Chromium Single Cell 3' Solution v2 wurde zur Aufbereitung der Zellen verwendet. Die Sequenzierung erfolgte am Illumina HiSeq 2500 Sequenzierer bis zu einer Tiefe von 100M *reads*. Die *reads* wurden in das fastq Format mittels mkfastq vom cellranger 2.1.0 (10X Genomics) konvertiert. Die Abgleichung an das Referenzgenom (GRCm38, Ensembl annotation release 91) einschließlich der Information zu tdTomato wurde mittels cellranger 2.1.0 (10X Genomics) vollzogen. Die primären Analysen und die Qualitätsfiltrierung (*gene count per cell*, *UMI count per cell*, *percent of mitochondrial transcripts*), Clustern der Zellen, die Regression der Zellzyklus-Gene aufgrund kanonischer Marker, die Identifikation der Markergene und die Darstellung der Genexpressionen wurde mit dem R Paket Seurat (Version 2.3)¹⁵² durchgeführt. Berechnungen und Darstellung der Genexpression als Funktion des Differenzierungsgrades (Pseudotime) wurde mit dem R Paket Monocle 2 ausgeführt. Die Berechnungen der Pseudotime erfolgte anhand der top 1000 zwischen den Clustern differenziell exprimierten Genen^{153,154}. Für die *gene ontology enrichment* Analysen biologischer Prozesse wurde der *PANTHER Statistical Overrepresentation Test* (<http://www.pantherdb.org>) genutzt.

6.13 Probenaufbereitung für Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Beine der Mäuse wurden präpariert und in 4% PFA/PBS (pH = 7.4) für 12h bei 4-8°C fixiert. Anschließend wurden die Proben in Dekalzifizierungs-Lösung (14% EDTA, NH₄OH, pH 7,2) für 10 Tage entkalkt. Die entkalkten Proben wurden daraufhin in 30% Saccharose/PBS-Lösung überführt. Nach 24h in der Zuckerlösung wurden die Proben in TissueTek eingebettet und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Gewebeschnitte (7µm) wurden mit einem Leica CM 3050 S Cryostat und Cryofilm Type 2C(9) (catalog no. C-MK001-A2, Section-Lab Co. Ltd.) angefertigt.

Die Gewebeschnitte wurden mit 10% Rattenserum/PBS oder 0,2% BSA/PBS für eine Stunde blockiert und anschließend für eine weitere Stunde mit 0,1% Saponin/PBS bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die Antikörperfärbungen wurden für 4 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in 10% Rattenserum/PBS oder 0,2% BSA/PBS durchgeführt. Im Falle des Gebrauchs von Primärantikörpern wurde anschließend mit Fluorophor-konjugierten Sekundärantikörpern (Donkey anti-Rabbit IgG AF488 or AF647 antibody) für 4 Stunden bei Raumtemperatur in 10% Rattenserum/PBS oder 0,2% BSA/PBS inkubiert. Nach den Antikörperfärbungen wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und mit DAPI (10 Minuten) oder SYTOXBlue (1 Stunde) bei Raumtemperatur

gefärbt. Schließlich wurde noch drei weitere Male mit PBS gewaschen und mit Dako Fluorescence Mounting Medium eingebettet.

6.14 Bright-field-Fluoreszenzmikroskopie (BFM).

Mikroskop: Nikon Eclipse Ni-U Mikroskop; CFI Plan Fluor Objektive: 10x (NA 0.30), 20x (NA 0.50), oder 40x (NA 0.75); Halogenlampe;

Filtereinstellung für Exzitationslicht (ex) und Emissionslicht (em):

DAPI ex: 390/18 nm und em: 460/60 nm,

FITC/AF488 ex: 475/35 nm und em: 530/43 nm,

tdTomato/AF594 ex: 542/20 nm und em: 620/52 nm,

AF647 ex: 628/40 nm und em: 692/40 nm.

Die generierten Daten wurden mit der Imaris Software aufgearbeitet.

6.15 Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie (CLSM).

Mikroskop: Leica TCS SP 5 II konfokales Mikroskop mit AOTF und AOBS, und HyD Detektion auf einem DMI6000 CS frame.

Objektive: HCX PL APO 100x Ölobjektiv mit einer NA von 1,44.

Folgende Laser- und Detektionseinstellungen für die spezifischen Fluorophore und Fluoreszenzproteine wurden verwendet:

tdTomato: DPSS Laser mit 561nm und Detektion mittels HyD bei 600-650nm,

FITC/AF488: Argon Laser mit 488nm (Exzitation) und HyD Detektor bei 500-550nm

SytoxBlue: Argon Laser mit 458nm (Exzitation) und HyD Detektor bei 470-520nm

AF647: Helium-Neon Laser mit 633nm (Exzitation) und HyD Detektor bei 650-700nm

Die generierten Daten wurden mit Huygens Professional dekonvolviert und mit der Imaris Software dreidimensional rekonstruiert.

6.16 Optisches Clearing muriner Kniegelenke.

Optisches Clearing von murinen Kniegelenken für Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie wurde durchgeführt, wie von Klingberg *et al.* beschrieben¹⁵⁵. Einigen Mäusen wurden vor dem Clearing Fluorophor-konjugierte Antikörper intravenös injiziert (2.5 µg Ly6G-AF647 oder CD31-AF647 in PBS). Eine Stunde nach Injektion der Antikörper wurden die Mäuse getötet und mit einer Lösung aus 5mM EDTA/PBS und 4%PFA/PBS (pH = 7.4) perfundiert.

Die Kniegelenke präpariert. Dabei wurden die Muskeln und großen Ligamente und Sehnen mit Ausnahme der Patella und dazugehöriger Sehne entfernt. Anschließend wurden die Proben in 4%PFA/PBS (pH = 7.4) für 4 Stunden bei 4-8°C fixiert. Folgend wurden die Proben bei 4°C in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (50%, 70% und zweimal 100% Ethanol), pH 9.0. Das Clearing erfolgte in Zimtsäureethylester für 6 Stunden bei Raumtemperatur.

6.17 Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie (LSFM).

Mikroskop: LaVison BioTec Ultramicroscope II mit Olympus MVX10 Zoom-Körper (Olympus, Tokyo, Japan), ein LaVision BioTec Laser Modul, und eine Andor Neo sCMOS Kamera mit einer Pixelgröße von 6.5 µm.

Bereich der optischen Vergrößerung: 1.263 bis 12.63; NA von 0.5.

Exzitations- und Detektionseinstellungen:

Autofluoreszenz: Exzitation: 488 nm *optically pumped semiconductor laser* (OPSL);

Detektionsfilter: 525/50 nm

tdTomato: Exzitation: 561nm OPSL; Detektionsfilter: 620/60 nm

CD31-AF647 oder Ly6G-AF647: Exzitation: 647 nm Diodenlaser; Detektionsfilter: 680/30nm

Optischer Zoomfaktor: 1.26 bis 8; Lichtblatt-Dicke: 5-10 µm.

6.18 3D-Analyse der Dichte der synovialen Makrophagenmembran

Die Dichte der Lining-Makrophagen wurde als Verhältnis des Volumens der tdTomato⁺ Zellen zum Volumen der Synovialmembran berechnet.

Die dreidimensionale Rekonstruktion der Kniegelenke der Mäuse auf Basis der durch das LSFM aufgenommenen Daten wurde mit der Imaris Software erstellt.

Durch manuelles *Surface Rendering* wurde die Synovialmembran isoliert. Die Volumina der isolierten Synovialmembran und der tdTomato⁺ Zellen wurde vollautomatisch durch die Imaris Software mittels *rendering tool* mit einem Größenschwellenwert von 5µm für tdTomato⁺ Zellen und 10µm für das synoviale Gewebe ermittelt.

6.19 Magnetresonanztomographie (MRT).

Die Mäuse wurden mit Isofluran anästhesiert. Ein Schwanzvenenkatheter zur Applikation des Kontrastmittels wurde gelegt. Die Körpertemperatur wurde während der gesamten Messung mit einer wärmenden Unterlage konstant gehalten. Die Atmung wurde während der Messung überwacht. Als MRT Gerät wurde ein ClinScan 70/30 7 Tesla MRI System (Bruker) mit RatBrain 1H-Surface Coil (Bruker). Dynamische kontrastverstärkte (DCE) MRT-Messungen erfolgten mit einer *fast low angle shot* (FLASH)-Sequenz ((repetition time (TR)/echo time (TE): 2.92ms/0.88 ms, flip angle: 25°, voxel size: 0.182 x 0.182 x 0.7 mm, matrix 192 x 192, Aquisitionszeit von 12 Minuten mit 100 Messungen). Das Kontrastmittel (0,1mmol/kg Gadovist, Bayer) wurde nach 40 Sekunden über die Dauer von 10 Sekunden injiziert. Sowohl sagitale als auch die transversalen T1-gewichteten Aufnahmen (voxel size: 0.078 x 0.078 x 0.7mm, TR/TE: 500 ms/9 ms, matrix 448 x 448) wurden gemacht, nachdem die DCE-Messung durchgeführt wurde. Mittels Horos Software (horosproject.org) wurde die mittlere Anreicherung des Kontrastmittels quantifiziert. Wobei das Synovialgewebe als *region of interest* (ROI) definiert wurde.

6.20 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).

Kniegelenke von Wildtyp-Mäusen wurden für zwei Tage in ITO-Fixierungslösung (2,5% Glutaraldehyd, (Roth, 4157.1), 2,5% Paraformaldehyd (Roth, 0335.3), 0,1M Cacodylat-Puffer (Roth, 5169.2) and 0,3% Pikrinsäure gelöst in PBS, pH 7.3) fixiert. Anschließend wurden die Proben für zwei Wochen in Dekalzifizierungslösung (14% EDTA in 0,1M Cacodylat-Puffer) entkalkt und schließlich in Epon eingebettet. Ultra-Dünn-Schnitte (Mikrotom, Reichert Ultracut S) von 50nm wurden mit Uranyl-Acetat und Lead(II) Acetat-Trihydrat kontrastiert. Die Schnitte wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop (JEM 1400 Plus, Jeol) analysiert.

6.21 Statistik.

Zur Berechnung statistischer Signifikanzen wurde GraphPad Prism 5 verwendet. Wenn nicht anders angegeben wurden die Daten als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt und mit zweiseitigem T-Test, Mann-Whitney U-Test oder Kruskal-Wallis H-Test mit Dunns's multiplen Vergleichs-Test als post hoc Prozedur verwendet. P-Werte, die kleiner als 0,05 waren, wurden als significant angenommen.

6.22 Material und Hersteller

Tabelle 3 Verwendete Antikörper

Antigen	Konjugation	Konz.	Isotyp	Wirt	Reaktivität	Clone	Source	Cat#	Lot#	Verd.	Applikation
ApoE	unconjugated	0.5 mg/ml	IgG	rabbit	Human/ Mouse/Rat	16H2 2L18	Thermo Fisher	701241	1984882	1:200	IF
CD1c	PerCP/Cy5.5	0.2 mg/ml	IgG1, κ	mouse	human	L161	BioLegend	331513	B267879	1:500	FC
CD11b	PE/Cy7	0.2 mg/ml	IgG2b, κ	rat	mouse/human	M1/70	BioLegend	101216	B185646	1:500	FC
CD11b	A488	0.1mg/ml	IgG1, κ	mouse	human	LM2	BioLegend	393107	B261594	1:500	FC
CD14	PE-Cy7	0.2mg/ml	IgG1, κ	mouse	human	63D3	BioLegend	367111	B252403	1:500	FC
CD15	Brilliant Violet 421	50µg/ml	IgG1, κ	mouse	human	W6D3	BioLegend	323039	B263781	1:500	FC
CD20	Brilliant Violet 421	25µg/ml	IgG2b, κ	mouse	human	2H7	BioLegend	302329	B257594	1:500	FC
CD31	Alexa Fluor 647	0.5 mg/ml	IgG2a, κ	rat	mouse	MEC1 3.3	BioLegend	102516	234197	2.5 µg/m.	LSFM
CD31	PE	0.2mg/ml	IgG2a, κ	rat	mouse	MEC1 3.3	BioLegend	102507	B129965	1:500	FC
CD45.2	Alexa Fluor 700	0.5 mg/ml	IgG2a, κ	mouse	mouse	104	BioLegend	109822	B202497	1:500	FC
CD45	Brilliant Violet 421	12µg/ml	IgG2a, κ	mouse	mouse	30- F11	BioLegend	103133	B263588	1:500	FC
CD45	Alexa Fluor 700	0.1mg/ml	IgG1, κ	mouse	human	2D1	BioLegend	368513	B248833	1:500	FC
CD68	Alexa Fluor 594	0.5 mg/ml	IgG2a	rat	mouse	FA-11	BioLegend	137020	B239125	1:400	IF
CD68	Alexa Fluor 647	0.5 mg/ml	IgG2a	rat	mouse	FA-11	BioLegend	137004	B153907	1:400	IF
CD68	unconjugated	0.5 mg/ml	IgG2b, κ	mouse	human	Y1/82 A	BioLegend	333801	B200949	1:200	IF
CD68	unconjugated	.0 mg/ml	IgG1, κ	mouse	mammals/human	KP1	Abcam	ab955	GR3230 929-1	1:200	IF
CD68	Alexa Fluor 594	0.2 mg/ml	IgG2b	mouse	human	29880 7	R&D systems	IC20401 T	1471045	1:200	IF
CSF1R	APC	0.2 mg/ml	IgG2a, κ	rat	mouse	AFS9 8	BioLegend	135510	B183456	1:500	FC
CSF1R	AlexaFluor 647	0.5mg/ml	IgG2a, κ	rat	mouse	AFS9 8	BioLegend	135530		1:200	IF
Claudin 2	unconjugated	1.0 mg/ml	IgG	rabbit	Mammals/human	polyclonal	Abcam	ab53032	GR3143 68-11	1:200	IF
Claudin 5	unconjugated	1.0 mg/ml	IgG	rabbit	mouse/human	polyclonal	Abcam	ab15106	GR3182 385	1:200	IF
Claudin 13	unconjugated	1.0 mg/ml	IgG	rabbit	mouse	polyclonal	Invitrogen	PA1- 24420	TA25078 51C	1:200	IF
Connexin 43	unconjugated	1.0 mg/ml	IgG	rabbit	mammals/human	polyclonal	Sigma Aldrich	C6219	027144 804V	1:200	IF
Donkey anti-Rabbit IgG	Alexa Fluor 647	2.0 mg/ml	IgG	donkey	rabbit	polyclonal	Life Technologies	A-31573	1563697	1:200	IF
Donkey anti-Rabbit IgG	Alexa Fluor 488	2.0 mg/ml	IgG	donkey	mouse	polyclonal	Life Technologies	A-21206	1644644	1:200	IF

Antigen	Konjugation	Konz.	Isotyp	Wirt	Reaktivität	Clone	Source	Cat#	Lot#	Verd.	Applikation
E-Cadherin	PE	0.2 mg/ml	IgG1, κ	rat	mouse/human	DECMA-1	BioLegend	147303	B260705	1:500	FC
F4/80	Alexa Fluor 647	0.5 mg/ml	IgG2a, κ	rat	mouse	BM8	BioLegend	123122	B212680	1:400	IF, FC
F4/80	FITC	0.5 mg/ml	IgG2a, κ	rat	mouse	BM8	BioLegend	123108	B177257	1:400	IF
HLA-DR	PE	0.1mg/ml	IgG2b, κ	mouse	human	Tü36	BioLegend	361605	B261328	1:500	FC
IgG2b, κ Isotype ctrl	APC	0.2 mg/ml	IgG2b, κ	rat		RTK4530	BioLegend	400611		1:500	FC
Ki67	APC	0.5 mg/ml	IgG2a, κ	rat	mouse	16A8	BioLegend	652405		1:400	IF
Ly6C	Alexa Fluor 488	0.5 mg/ml	IgG2c, κ	rat	mouse	HK1.4	BioLegend	128022	B248739	1:400	FC
Ly6G	Brilliant Violet	0.2 mg/ml	IgG2a, κ	rat	mouse	1A8	BioLegend	127627	B193096	1:400	FC
Ly6G	FITC	0.5 mg/ml	IgG2a, κ	rat	mouse	1A8	BioLegend	127606	B175677	1:400	FC
Ly6G	Alexa Fluor 488	0.5 mg/ml	IgG2a, κ	rat	mouse	1A8	BioLegend	127626	B240194	1:400	IF
Ly6G	Alexa Fluor 647	0.5 mg/ml	IgG2a, κ	rat	mouse	1A8	BioLegend	127610	B204928	1:200, 2.5 µg/ml	IF, LSFM
MHCII	PE	0.2mg/ml	IgG2b, κ	rat	mouse	M5/114.15.2	BioLegend	107608	B130064	1:200	IF
Relm alpha	unconjugated	0.2mg/ml	IgG	rabbit	mouse	polyclonal	Abcam	Ab39626	GR128715-1	1:200	IF
Trem2	unconjugated	0.5 mg/ml	IgG2b	rat	mouse/human	RM0139-5J46	Abcam	ab86491	GR3207091-11	1:200	IF
Trem2	APC		IgG2B	rat	Mouse/human	237920	R&D systems	FAB17291A	AADSO17111	1:500	FC
ZO-1	unconjugated	1.0 mg/ml	IgG	rabbit	mouse/human	polyclonal	EMD Millipore	AB2272	2905383	1:100	IF

Tabelle 4 Molekulare Farbstoffe

Dye	Konjugation/ Ex/EM [µm]	Konz.	Source	Cat#	Lot#	Dilution	Verwendung
DAPI	340/488	1 µg/ml	Roche	10236276001	28114320	1:2000	IF
Phalloidin	Alexa Fluor 647	300 U	Thermo Fisher	A22287		1:100	IF
Phalloidin	Alexa Fluor 488	300 U	Thermo Fisher	A12379	1687886	1:100	IF
Sytox Blue	444/480	1 mM	Thermo Fisher	S34857		1:100	IF
Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit	Excitation Laser 405nm, Maximum emission 516nm		BioLegend	423101		1:1000	FC

IF = *Immunofluorescence*

FC = *Flow cytometry*

LSFM = *Light sheet fluorescence microscopy*

Tabelle 5 Chemikalien und Reagenzien

Reagenz/Lösung	Hersteller	Cat#	Lot#
Aqua ad injectabilia	Braun	6724092.00.00	152518061
BSA	Carl Roth	CP84.2	097255477
Cacodylic acid sodium salt trihydrate	Carl Roth	5169.2	
Cryofilm Type 2C(9)	Section-Lab Co. Ltd.	C-MK001-A2	H300128
Dako Fluorescence Mounting Medium	Dako North America Inc.	S3023	10134819
ddH ₂ O	Invitrogen	10977-035	1896175
DNAse	Sigma	9003-98-9	SLBV1446
D-Saccharose	Carl Roth	9097.1	108268247
Dulbecco's PBS (DPBS)	Sigma-Aldrich	D8537	1971145
DT (Diphtheria toxin)	Sigma-Aldrich	D0564	
EDTA (5.0 M, pH=8.0)	Invitrogen	AM9260G	00478853
EdU (EdU-Flow Cytometry Kit 488)	Baseclick GmbH	BCK-FC488-100	
Ethanol 70.0%	Carl Roth	64-17-5	238272008
Ethanol ≥98.9%	Carl Roth	64-17-15	118268980
Ethyl cinnamate	Sigma-Aldrich	112372	STBH1248
Glutaraldehyde	Carl Roth	4157.1	
Glycidether 100	Carl Roth	8619.2	
Glycidether Accelerator DMP-30	Carl Roth	8621.1	
Glycidether Hardener DBA	Carl Roth	8623.2	
Glycidether Hardener MNA	Carl Roth	8639.2	
(Hydropropyl)methyl cellulose	Sigma-Aldrich	9004-65-3	MKCB1715V
Imatinib Mesylate	Selleckchem	S1026	S102607
Isofluran	Abbvie		6070961
Osmium tetroxide	Carl Roth	8371.3	
Peanut oil	Sigma-Aldrich	8002-03-7	MKBD0023
Paraformaldehyde	Carl Roth	0335.3	
Saponin, from Quillaja bark	Apollo Scientific	BIS4332	AS439793
Tamoxifen	Biomol	10540-29-1	
Tamoxifen (Tamoxifen containing food)	envigo	TD.130859	
(Z)-4-Hydroxytamoxifen	Sigma Aldrich	H7904	
Tissue Tec O.C.T compound	Sakura Finetek GmbH	4583	1707301015
Tween80	Sigma-Aldrich	8002-03-7	BCBW3990

Referenzen

- 1 Culemann, S. *et al.* Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint. *Nature* **572**, 670-675, doi:10.1038/s41586-019-1471-1 (2019).
- 2 Culemann, S., Gruneboom, A. & Kronke, G. Origin and function of synovial macrophage subsets during inflammatory joint disease. *Adv Immunol* **143**, 75-98, doi:10.1016/bs.ai.2019.08.006 (2019).
- 3 McInnes, I. B. & Schett, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **365**, 2205-2219, doi:10.1056/NEJMra1004965 (2011).
- 4 Smolen, J. S. *et al.* Rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Disease primers* **4**, 18001, doi:10.1038/nrdp.2018.1 (2018).
- 5 Ngo, S. T., Steyn, F. J. & McCombe, P. A. Gender differences in autoimmune disease. *Frontiers in neuroendocrinology* **35**, 347-369, doi:10.1016/j.yfrne.2014.04.004 (2014).
- 6 Hajishengallis, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature reviews. Immunology* **15**, 30-44, doi:10.1038/nri3785 (2015).
- 7 Chen, J. *et al.* An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome medicine* **8**, 43, doi:10.1186/s13073-016-0299-7 (2016).
- 8 Tan, E. M. & Smolen, J. S. Historical observations contributing insights on etiopathogenesis of rheumatoid arthritis and role of rheumatoid factor. *The Journal of experimental medicine* **213**, 1937-1950, doi:10.1084/jem.20160792 (2016).
- 9 Scherer, H. U., Huizinga, T. W. J., Kronke, G., Schett, G. & Toes, R. E. M. The B cell response to citrullinated antigens in the development of rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology* **14**, 157-169, doi:10.1038/nrrheum.2018.10 (2018).
- 10 Makrygiannakis, D. *et al.* Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis* **67**, 1488-1492, doi:10.1136/ard.2007.075192 (2008).
- 11 Trouw, L. A., Huizinga, T. W. & Toes, R. E. Autoimmunity in rheumatoid arthritis: different antigens--common principles. *Ann Rheum Dis* **72 Suppl 2**, ii132-136, doi:10.1136/annrheumdis-2012-202349 (2013).
- 12 Shi, J. *et al.* Anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies precede the onset of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **73**, 780-783, doi:10.1136/annrheumdis-2013-204154 (2014).
- 13 Trouw, L. A., Rispens, T. & Toes, R. E. M. Beyond citrullination: other post-translational protein modifications in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology* **13**, 331-339, doi:10.1038/nrrheum.2017.15 (2017).

- 14 Smolen, J. S., Aletaha, D. & McInnes, I. B. Rheumatoid arthritis. *The Lancet* **388**, 2023-2038, doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8) (2016).
- 15 Kurowska-Stolarska, M. & Alivernini, S. Synovial tissue macrophages: friend or foe? *RMD Open* **3**, e000527, doi:10.1136/rmdopen-2017-000527 (2017).
- 16 Nagy, G. & van Vollenhoven, R. F. Sustained biologic-free and drug-free remission in rheumatoid arthritis, where are we now? *Arthritis Res Ther* **17**, 181, doi:10.1186/s13075-015-0707-1 (2015).
- 17 Waschke, J. B. T. B. P. F. *Anatomie: Das Lehrbuch Sobotta*. Vol. 1st edition (Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 2015).
- 18 Orr, C. *et al.* Synovial tissue research: a state-of-the-art review. *Nat Rev Rheumatol* **13**, 630, doi:10.1038/nrrheum.2017.161 (2017).
- 19 Smith, M. D. The normal synovium. *The open rheumatology journal* **5**, 100-106, doi:10.2174/1874312901105010100 (2011).
- 20 van Furth, R. & Cohn, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of experimental medicine* **128**, 415-435, doi:10.1084/jem.128.3.415 (1968).
- 21 Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71-82 (2003).
- 22 Ginhoux, F. & Jung, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology* **14**, 392, doi:10.1038/nri3671 (2014).
- 23 Boring, L. *et al.* Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *The Journal of clinical investigation* **100**, 2552-2561, doi:10.1172/jci119798 (1997).
- 24 Serbina, N. V. & Pamer, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature immunology* **7**, 311-317, doi:10.1038/ni1309 (2006).
- 25 Yona, S. *et al.* Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* **38**, 79-91, doi:10.1016/j.immuni.2012.12.001 (2013).
- 26 Hettinger, J. *et al.* Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature immunology* **14**, 821-830, doi:10.1038/ni.2638 (2013).
- 27 Auffray, C. *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science (New York, N. Y.)* **317**, 666-670, doi:10.1126/science.1142883 (2007).
- 28 Auffray, C., Sieweke, M. H. & Geissmann, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology* **27**, 669-692, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132557 (2009).

- 29 Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (New York, N. Y.)* **327**, 656-661, doi:10.1126/science.1178331 (2010).
- 30 Jakubzick, C. *et al.* Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* **39**, 599-610, doi:10.1016/j.immuni.2013.08.007 (2013).
- 31 Rodero, M. P. *et al.* Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes. *eLife* **4**, e07847, doi:10.7554/eLife.07847 (2015).
- 32 Ginhoux, F., Schultze, J. L., Murray, P. J., Ochando, J. & Biswas, S. K. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol* **17**, 34-40, doi:10.1038/ni.3324 (2016).
- 33 Perdiguero, E. G. & Geissmann, F. The development and maintenance of resident macrophages. *Nat Immunol* **17**, 2-8, doi:10.1038/ni.3341 (2016).
- 34 Kierdorf, K., Prinz, M., Geissmann, F. & Gomez Perdiguero, E. Development and function of tissue resident macrophages in mice. *Seminars in immunology* **27**, 369-378, doi:10.1016/j.smim.2016.03.017 (2015).
- 35 Ginhoux, F. *et al.* Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* **330**, 841-845, doi:10.1126/science.1194637 (2010).
- 36 Schulz, C. *et al.* A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science (New York, N. Y.)* **336**, 86-90, doi:10.1126/science.1219179 (2012).
- 37 Hashimoto, D. *et al.* Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* **38**, 792-804, doi:10.1016/j.immuni.2013.04.004 (2013).
- 38 Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E. & Taylor, P. R. Tissue-resident macrophages. *Nature immunology* **14**, 986-995, doi:10.1038/ni.2705 (2013).
- 39 Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C. & Keller, G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* **126**, 5073-5084 (1999).
- 40 Gomez Perdiguero, E. *et al.* Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* **518**, 547-551, doi:10.1038/nature13989 (2015).
- 41 Kissa, K. & Herbomel, P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature* **464**, 112-115, doi:10.1038/nature08761 (2010).
- 42 Bertrand, J. Y. *et al.* Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature* **464**, 108-111, doi:10.1038/nature08738 (2010).

-
- 43 Kieusseian, A., Brunet de la Grange, P., Burlen-Defranoux, O., Godin, I. & Cumano, A. Immature hematopoietic stem cells undergo maturation in the fetal liver. *Development* **139**, 3521-3530, doi:10.1242/dev.079210 (2012).
- 44 Delassus, S. & Cumano, A. Circulation of hematopoietic progenitors in the mouse embryo. *Immunity* **4**, 97-106, doi:10.1016/s1074-7613(00)80302-7 (1996).
- 45 Bruttger, J. *et al.* Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity* **43**, 92-106, doi:10.1016/j.immuni.2015.06.012 (2015).
- 46 Hoeffel, G. *et al.* Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *The Journal of experimental medicine* **209**, 1167-1181, doi:10.1084/jem.20120340 (2012).
- 47 Sheng, J., Ruedl, C. & Karjalainen, K. Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* **43**, 382-393, doi:10.1016/j.immuni.2015.07.016 (2015).
- 48 Hoeffel, G. *et al.* C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity* **42**, 665-678, doi:10.1016/j.immuni.2015.03.011 (2015).
- 49 Chakarov, S. *et al.* Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science (New York, N.Y.)* **363**, doi:10.1126/science.aau0964 (2019).
- 50 Molawi, K. *et al.* Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *The Journal of experimental medicine* **211**, 2151-2158, doi:10.1084/jem.20140639 (2014).
- 51 Shaw, T. N. *et al.* Tissue-resident macrophages in the intestine are long lived and defined by Tim-4 and CD4 expression. *The Journal of experimental medicine* **215**, 1507-1518, doi:10.1084/jem.20180019 (2018).
- 52 De Schepper, S. *et al.* Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis. *Cell* **176**, 676, doi:10.1016/j.cell.2019.01.010 (2019).
- 53 Mossadegh-Keller, N. *et al.* Developmental origin and maintenance of distinct testicular macrophage populations. *The Journal of experimental medicine* **214**, 2829-2841, doi:10.1084/jem.20170829 (2017).
- 54 Jacome-Galarza, C. E. *et al.* Developmental origin, functional maintenance and genetic rescue of osteoclasts. *Nature* **568**, 541-545, doi:10.1038/s41586-019-1105-7 (2019).
- 55 Jenkins, S. J. *et al.* Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science (New York, N.Y.)* **332**, 1284-1288, doi:10.1126/science.1204351 (2011).
- 56 Ruckerl, D. & Allen, J. E. Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection. *Immunological reviews* **262**, 113-133, doi:10.1111/imr.12221 (2014).

- 57 Soucie, E. L. *et al.* Lineage-specific enhancers activate self-renewal genes in macrophages and embryonic stem cells. *Science* **351**, aad5510, doi:10.1126/science.aad5510 (2016).
- 58 Sieweke, M. H. & Allen, J. E. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science (New York, N.Y.)* **342**, 1242974, doi:10.1126/science.1242974 (2013).
- 59 Bleriot, C. *et al.* Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. *Immunity* **42**, 145-158, doi:10.1016/j.immuni.2014.12.020 (2015).
- 60 Theurl, I. *et al.* On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. *Nature medicine* **22**, 945-951, doi:10.1038/nm.4146 (2016).
- 61 Kaufmann, S. H. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol* **9**, 705-712, doi:10.1038/ni0708-705 (2008).
- 62 Tauber, A. I. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 897-901, doi:10.1038/nrm1244 (2003).
- 63 Okabe, Y. & Medzhitov, R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat Immunol* **17**, 9-17, doi:10.1038/ni.3320 (2016).
- 64 Amit, I., Winter, D. R. & Jung, S. The role of the local environment and epigenetics in shaping macrophage identity and their effect on tissue homeostasis. *Nat Immunol* **17**, 18-25, doi:10.1038/ni.3325 (2016).
- 65 Murray, P. J. Macrophage Polarization. *Annual review of physiology* **79**, 541-566, doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034339 (2017).
- 66 Glass, C. K. & Natoli, G. Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nat Immunol* **17**, 26-33, doi:10.1038/ni.3306 (2016).
- 67 Udalova, I. A., Mantovani, A. & Feldmann, M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* **12**, 472-485, doi:10.1038/nrrheum.2016.91 (2016).
- 68 Lavin, Y. *et al.* Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* **159**, 1312-1326, doi:10.1016/j.cell.2014.11.018 (2014).
- 69 Okabe, Y. & Medzhitov, R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell* **157**, 832-844, doi:10.1016/j.cell.2014.04.016 (2014).
- 70 Kohyama, M. *et al.* Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* **457**, 318-321, doi:10.1038/nature07472 (2009).
- 71 Haldar, M. *et al.* Heme-mediated SPI-C induction promotes monocyte differentiation into iron-recycling macrophages. *Cell* **156**, 1223-1234, doi:10.1016/j.cell.2014.01.069 (2014).

- 72 Schneider, C. *et al.* Induction of the nuclear receptor PPAR-gamma by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages. *Nature immunology* **15**, 1026-1037, doi:10.1038/ni.3005 (2014).
- 73 Rosas, M. *et al.* The transcription factor Gata6 links tissue macrophage phenotype and proliferative renewal. *Science (New York, N.Y.)* **344**, 645-648, doi:10.1126/science.1251414 (2014).
- 74 Scholtyssek, C., Kronke, G. & Schett, G. Inflammation-associated changes in bone homeostasis. *Inflammation & allergy drug targets* **11**, 188-195 (2012).
- 75 Butovsky, O. *et al.* Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature neuroscience* **17**, 131-143, doi:10.1038/nn.3599 (2014).
- 76 van de Laar, L. *et al.* Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* **44**, 755-768, doi:10.1016/j.immuni.2016.02.017 (2016).
- 77 Croft, A. P. *et al.* Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis. *Nature* **570**, 246-251, doi:10.1038/s41586-019-1263-7 (2019).
- 78 Mulherin, D., Fitzgerald, O. & Bresnihan, B. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **39**, 115-124, doi:10.1002/art.1780390116 (1996).
- 79 Kinne, R. W., Stuhlmuller, B. & Burmester, G. R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis research & therapy* **9**, 224, doi:10.1186/ar2333 (2007).
- 80 Tak, P. P. & Bresnihan, B. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis. *Arthritis and rheumatism* **43**, 2619-2633, doi:10.1002/1529-0131(200012)43:12<2619::Aid-anr1>3.0.Co;2-v (2000).
- 81 Thurlings, R. M. *et al.* Monocyte scintigraphy in rheumatoid arthritis: the dynamics of monocyte migration in immune-mediated inflammatory disease. *PLoS One* **4**, e7865, doi:10.1371/journal.pone.0007865 (2009).
- 82 Janossy, G. *et al.* Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet (London, England)* **2**, 839-842, doi:10.1016/s0140-6736(81)91107-7 (1981).
- 83 McInnes, I. B. & Schett, G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* **389**, 2328-2337, doi:10.1016/S0140-6736(17)31472-1 (2017).
- 84 Klareskog, L., Forsum, U., Scheynius, A., Kabelitz, D. & Wigzell, H. Evidence in support of a self-perpetuating HLA-DR-dependent delayed-type cell reaction in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 3632-3636, doi:10.1073/pnas.79.11.3632 (1982).
- 85 Klareskog, L. *et al.* Immune functions of human synovial cells. Phenotypic and T cell regulatory properties of macrophage-like cells that express HLA-DR. *Arthritis and rheumatism* **25**, 488-501, doi:10.1002/art.1780250502 (1982).

- 86 Chu, C. Q., Field, M., Feldmann, M. & Maini, R. N. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **34**, 1125-1132, doi:10.1002/art.1780340908 (1991).
- 87 Koch, A. E. *et al.* Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **90**, 772-779, doi:10.1172/JCI115950 (1992).
- 88 Koch, A. E. *et al.* Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **147**, 2187-2195 (1991).
- 89 Weyand, C. M., Zeisbrich, M. & Goronzy, J. J. Metabolic signatures of T-cells and macrophages in rheumatoid arthritis. *Current opinion in immunology* **46**, 112-120, doi:10.1016/j.coi.2017.04.010 (2017).
- 90 Malesud, C. J. Matrix Metalloproteinases and Synovial Joint Pathology. *Progress in molecular biology and translational science* **148**, 305-325, doi:10.1016/bs.pmbts.2017.03.003 (2017).
- 91 Maruotti, N., Annese, T., Cantatore, F. P. & Ribatti, D. Macrophages and angiogenesis in rheumatic diseases. *Vascular cell* **5**, 11, doi:10.1186/2045-824x-5-11 (2013).
- 92 Yeo, L. *et al.* Expression of chemokines CXCL4 and CXCL7 by synovial macrophages defines an early stage of rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **75**, 763-771, doi:10.1136/annrheumdis-2014-206921 (2016).
- 93 Zhang, F. *et al.* Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol* **20**, 928-942, doi:10.1038/s41590-019-0378-1 (2019).
- 94 Kuo, D. *et al.* HBEGF(+) macrophages in rheumatoid arthritis induce fibroblast invasiveness. *Science translational medicine* **11**, doi:10.1126/scitranslmed.aau8587 (2019).
- 95 Misharin, A. V. *et al.* Nonclassical Ly6C(-) monocytes drive the development of inflammatory arthritis in mice. *Cell reports* **9**, 591-604, doi:10.1016/j.celrep.2014.09.032 (2014).
- 96 Van Rooijen, N. & Sanders, A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* **174**, 83-93, doi:10.1016/0022-1759(94)90012-4 (1994).
- 97 Solomon, S., Rajasekaran, N., Jeisy-Walder, E., Snapper, S. B. & Illges, H. A crucial role for macrophages in the pathology of K/B x N serum-induced arthritis. *European journal of immunology* **35**, 3064-3073, doi:10.1002/eji.200526167 (2005).
- 98 Brunet, A. *et al.* NR4A1-dependent Ly6C(low) monocytes contribute to reducing joint inflammation in arthritic mice through Treg cells. *European journal of immunology* **46**, 2789-2800, doi:10.1002/eji.201646406 (2016).
- 99 Bruhl, H. *et al.* Targeting of Gr-1+,CCR2+ monocytes in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **56**, 2975-2985, doi:10.1002/art.22854 (2007).

- 100 Rafei, M. *et al.* An engineered GM-CSF-CCL2 fusokine is a potent inhibitor of CCR2-driven inflammation as demonstrated in a murine model of inflammatory arthritis. *J Immunol* **183**, 1759-1766, doi:10.4049/jimmunol.0900523 (2009).
- 101 Weiss, M. *et al.* IRF5 controls both acute and chronic inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 11001-11006, doi:10.1073/pnas.1506254112 (2015).
- 102 Quinones, M. P. *et al.* Experimental arthritis in CC chemokine receptor 2-null mice closely mimics severe human rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation* **113**, 856-866, doi:10.1172/jci20126 (2004).
- 103 Monach, P. A., Mathis, D. & Benoist, C. The K/BxN arthritis model. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 15**, Unit 15.22, doi:10.1002/0471142735.im1522s81 (2008).
- 104 Holmdahl, R. *et al.* Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis. Immunogenetics, pathogenesis and autoimmunity. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **97**, 575-584 (1989).
- 105 Vergunst, C. E. *et al.* Modulation of CCR2 in rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Arthritis and rheumatism* **58**, 1931-1939, doi:10.1002/art.23591 (2008).
- 106 Li, J. *et al.* Treatment of arthritis by macrophage depletion and immunomodulation: testing an apoptosis-mediated therapy in a humanized death receptor mouse model. *Arthritis and rheumatism* **64**, 1098-1109, doi:10.1002/art.33423 (2012).
- 107 Madisen, L. *et al.* A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* **13**, 133-140, doi:10.1038/nn.2467 (2010).
- 108 Jung, S. *et al.* Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* **20**, 4106-4114, doi:10.1128/mcb.20.11.4106-4114.2000 (2000).
- 109 N, A. G. *et al.* Phagocytosis imprints heterogeneity in tissue-resident macrophages. *J Exp Med* **214**, 1281-1296, doi:10.1084/jem.20161375 (2017).
- 110 Sun, X. & Kaufman, P. D. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma* **127**, 175-186, doi:10.1007/s00412-018-0659-8 (2018).
- 111 Pollard, J. W. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 259-270, doi:10.1038/nri2528 (2009).
- 112 Sasmono, R. T. *et al.* A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood* **101**, 1155-1163, doi:10.1182/blood-2002-02-0569 (2003).
- 113 Burnett, S. H. *et al.* Conditional macrophage ablation in transgenic mice expressing a Fas-based suicide gene. *J Leukoc Biol* **75**, 612-623, doi:10.1189/jlb.0903442 (2004).

- 114 Qian, B. Z. *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* **475**, 222-225, doi:10.1038/nature10138 (2011).
- 115 Behjati, S. & Frank, M. H. The effects of tamoxifen on immunity. *Curr Med Chem* **16**, 3076-3080, doi:10.2174/092986709788803042 (2009).
- 116 Taylor, J., Abramova, N., Charlton, J. & Adler, P. N. Van Gogh: a new *Drosophila* tissue polarity gene. *Genetics* **150**, 199-210 (1998).
- 117 Hatakeyama, J., Wald, J. H., Printsev, I., Ho, H. Y. & Carraway, K. L., 3rd. Vangl1 and Vangl2: planar cell polarity components with a developing role in cancer. *Endocr Relat Cancer* **21**, R345-356, doi:10.1530/ERC-14-0141 (2014).
- 118 Saburi, S., Hester, I., Goodrich, L. & McNeill, H. Functional interactions between Fat family cadherins in tissue morphogenesis and planar polarity. *Development* **139**, 1806-1820, doi:10.1242/dev.077461 (2012).
- 119 McDonald, L. T. *et al.* Increased macrophage-derived SPARC precedes collagen deposition in myocardial fibrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **315**, H92-H100, doi:10.1152/ajpheart.00719.2017 (2018).
- 120 Li, J. *et al.* VSIG4 inhibits proinflammatory macrophage activation by reprogramming mitochondrial pyruvate metabolism. *Nat Commun* **8**, 1322, doi:10.1038/s41467-017-01327-4 (2017).
- 121 Kim, S. M. *et al.* TREM2 promotes Abeta phagocytosis by upregulating C/EBPalpha-dependent CD36 expression in microglia. *Sci Rep* **7**, 11118, doi:10.1038/s41598-017-11634-x (2017).
- 122 Seitz, H. M., Camenisch, T. D., Lemke, G., Earp, H. S. & Matsushima, G. K. Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *J Immunol* **178**, 5635-5642, doi:10.4049/jimmunol.178.9.5635 (2007).
- 123 Miyasaka, K., Hanayama, R., Tanaka, M. & Nagata, S. Expression of milk fat globule epidermal growth factor 8 in immature dendritic cells for engulfment of apoptotic cells. *Eur J Immunol* **34**, 1414-1422, doi:10.1002/eji.200424930 (2004).
- 124 Van Gorp, H., Delputte, P. L. & Nauwynck, H. J. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol Immunol* **47**, 1650-1660, doi:10.1016/j.molimm.2010.02.008 (2010).
- 125 Tyteca, D. *et al.* Regulation of macrophage motility by the water channel aquaporin-1: crucial role of M0/M2 phenotype switch. *PLoS One* **10**, e0117398, doi:10.1371/journal.pone.0117398 (2015).
- 126 Vandercappellen, J., Van Damme, J. & Struyf, S. The role of the CXC chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **22**, 1-18, doi:10.1016/j.cytogfr.2010.10.011 (2011).
- 127 Mancardi, D. A. *et al.* Cutting Edge: The murine high-affinity IgG receptor FcgammaRIV is sufficient for autoantibody-induced arthritis. *J Immunol* **186**, 1899-1903, doi:10.4049/jimmunol.1003642 (2011).

-
- 128 Liao, X. *et al.* Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J Clin Invest* **121**, 2736-2749, doi:10.1172/JCI45444 (2011).
- 129 Roberts, A. W. *et al.* Tissue-Resident Macrophages Are Locally Programmed for Silent Clearance of Apoptotic Cells. *Immunity* **47**, 913-927 e916, doi:10.1016/j.immuni.2017.10.006 (2017).
- 130 Mariano, C., Sasaki, H., Brites, D. & Brito, M. A. A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance. *Eur J Cell Biol* **90**, 787-796, doi:10.1016/j.ejcb.2011.06.005 (2011).
- 131 Aziz, A., Soucie, E., Sarrazin, S. & Sieweke, M. H. MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. *Science* **326**, 867-871, doi:10.1126/science.1176056 (2009).
- 132 Krljanac, B. *et al.* RELM α -expressing macrophages protect against fatal lung damage and reduce parasite burden during helminth infection. *Sci Immunol* **4**, doi:10.1126/sciimmunol.aau3814 (2019).
- 133 Schreiber, H. A. *et al.* Intestinal monocytes and macrophages are required for T cell polarization in response to *Citrobacter rodentium*. *J Exp Med* **210**, 2025-2039, doi:10.1084/jem.20130903 (2013).
- 134 Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R. & Forster, I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* **8**, 265-277, doi:10.1023/a:1008942828960 (1999).
- 135 Bajpai, G. *et al.* Tissue Resident CCR2- and CCR2+ Cardiac Macrophages Differentially Orchestrate Monocyte Recruitment and Fate Specification Following Myocardial Injury. *Circ Res* **124**, 263-278, doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.314028 (2019).
- 136 Gundra, U. M. *et al.* Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood* **123**, e110-122, doi:10.1182/blood-2013-08-520619 (2014).
- 137 Kumar, N. M. & Gilula, N. B. The gap junction communication channel. *Cell* **84**, 381-388, doi:10.1016/s0092-8674(00)81282-9 (1996).
- 138 Wipke, B. T. & Allen, P. M. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* **167**, 1601-1608, doi:10.4049/jimmunol.167.3.1601 (2001).
- 139 Dithmer, S. *et al.* Claudin peptidomimetics modulate tissue barriers for enhanced drug delivery. *Ann N Y Acad Sci* **1397**, 169-184, doi:10.1111/nyas.13359 (2017).
- 140 Armulik, A. *et al.* Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* **468**, 557-561, doi:10.1038/nature09522 (2010).
- 141 Paniagua, R. T. *et al.* c-Fms-mediated differentiation and priming of monocyte lineage cells play a central role in autoimmune arthritis. *Arthritis Res Ther* **12**, R32, doi:10.1186/ar2940 (2010).

-
- 142 Mandelin, A. M., 2nd *et al.* Transcriptional Profiling of Synovial Macrophages Using Minimally Invasive Ultrasound-Guided Synovial Biopsies in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* **70**, 841-854, doi:10.1002/art.40453 (2018).
- 143 Viola, A., Munari, F., Sanchez-Rodriguez, R., Scolaro, T. & Castegna, A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol* **10**, 1462, doi:10.3389/fimmu.2019.01462 (2019).
- 144 Cronan, M. R. *et al.* Macrophage Epithelial Reprogramming Underlies Mycobacterial Granuloma Formation and Promotes Infection. *Immunity* **45**, 861-876, doi:10.1016/j.immuni.2016.09.014 (2016).
- 145 Jay, G. D., Britt, D. E. & Cha, C. J. Lubricin is a product of megakaryocyte stimulating factor gene expression by human synovial fibroblasts. *J Rheumatol* **27**, 594-600 (2000).
- 146 Grahammer, F., Schell, C. & Huber, T. B. The podocyte slit diaphragm--from a thin grey line to a complex signalling hub. *Nat Rev Nephrol* **9**, 587-598, doi:10.1038/nrneph.2013.169 (2013).
- 147 Hulsmans, M. *et al.* Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell* **169**, 510-522 e520, doi:10.1016/j.cell.2017.03.050 (2017).
- 148 Armaka, M. *et al.* Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *The Journal of experimental medicine* **205**, 331-337, doi:10.1084/jem.20070906 (2008).
- 149 Pfeifle, R. *et al.* Regulation of autoantibody activity by the IL-23-TH17 axis determines the onset of autoimmune disease. *Nat Immunol* **18**, 104-113, doi:10.1038/ni.3579 (2017).
- 150 Katsuno, T. *et al.* Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Molecular biology of the cell* **19**, 2465-2475, doi:10.1091/mbc.E07-12-1215 (2008).
- 151 Ohtsuki, S., Yamaguchi, H., Katsukura, Y., Asashima, T. & Terasaki, T. mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *Journal of neurochemistry* **104**, 147-154, doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05008.x (2008).
- 152 Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E. & Satija, R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nature biotechnology* **36**, 411-420, doi:10.1038/nbt.4096 (2018).
- 153 Trapnell, C. *et al.* The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nature biotechnology* **32**, 381-386, doi:10.1038/nbt.2859 (2014).
- 154 Qiu, X. *et al.* Single-cell mRNA quantification and differential analysis with Census. *Nature methods* **14**, 309-315, doi:10.1038/nmeth.4150 (2017).
- 155 Klingberg, A. *et al.* Fully Automated Evaluation of Total Glomerular Number and Capillary Tuft Size in Nephritic Kidneys Using Lightsheet Microscopy. *Journal of*

the American Society of Nephrology **28**, 452-459, doi:10.1681/ASN.2016020232 (2017).

Danksagung

Ich danke den Gutachtern und Prüfern dieser Dissertation für die Bewertung der Doktorarbeit.

Ich danke Prof. Dr. Gerhard Krönke für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu forschen und diese Dissertation anzufertigen. Eine Limitierung jeglicher Ressourcen war in seiner Arbeitsgruppe nie zu befürchten und so war es möglich alle wünschenswerten und erforderlichen Versuche durchzuführen. Ich danke ihm für die Freiheiten, die er mir ließ, um eigene Ideen zu entwickeln und eigenverantwortlich zu forschen. Nicht weniger danke ich ihm für seine Führung durch dieses Projekt. Ohne den Austausch mit ihm, seine Ideen und unermüdliche Motivation und Begeisterung aber auch Beharrlichkeit wäre dieses Projekt nicht in dem Maße erfolgreich geworden und hätte ganz sicher auch viel weniger Spaß gemacht. Ich danke ihm für die Geschichtsstunden über Völkerwanderungen und Elefanten auf Sizilien. Vielen Dank, Gerhard, dass du mich in meinen privaten und beruflichen Plänen immer unterstützt und beraten hast.

Vielen Dank an Anika Grüneboom. Dank ihrer Expertise konnte die Qualität dieser Arbeit auf ein viel höheres Level gehoben werden. Ich danke ihr für ihre akribische und ausdauernde Arbeitsweise. Anika ist ein *Perpetuum mobile*, dass meine Ermüdungserscheinungen kompensieren konnte. Anika, es war immer eine Freude mit dir zusammenzuarbeiten und ich habe viel von dir gelernt.

Ich danke Prof. Dr. Georg Schett für den wertvollen wissenschaftlichen Austausch und seinen unermüdlichen Einsatz für die Wissenschaftler der Medizinischen Klinik 3 und deren Forschung. Ich danke ihm für die Vermittlung in die AG Krönke. Vor allem Danke ich ihm für seine Begeisterung für unsere Forschung.

Im Besonderen Danke ich den Kollegen in unserem Büro AKA die Stöcklies: Tobias „*Captain Tweezer*“ Rothe , Maria „*Death Eater*“ Faas und Rene „*Doctor Glyco*“ Pfeifle. Tobias danke ich für die Hilfe bei den FACS Experimenten der humanen Proben, aber noch vielmehr dafür, dass er so ein wertvoller, humorvoller Kollege und Freund ist. Maria danke ich für ihre Hilfe bei den BMDMs. Besonders danke ich ihr jedoch für ihre angenehme Art, ihren subtilen Witz und den multimedialen Austausch. Rene danke ich für die Isolierung und Markierung der Antikörper sowie den Austausch wissenschaftlicher Erfahrungen und die Bereitschaft jederzeit zu unterstützen. Ich hätte mir kein besseres Büro-Team wünschen können.

Unserer Labormanagerin Christina Böhm danke ich für die vielfältige organisatorische Arbeit. Vielen Dank an unsere technischen Assistentinnen Alexandra Klej, Cornelia Stoll, Monica Pascual und Rosella Mancuso für Ihre Hilfe bei Experimenten, Genotypisierungen

und im Laboralltag. Dank an Jochen Ackermann für die Etablierung der *Csf1r^{creER};tdTomato*-Reportermaus in unserem Labor und die Tamoxifen-Behandlung der Tiere.

Ebenso danke ich allen nicht genannten Mitgliedern der AG Krönke mit denen ich in all der Zeit zusammenarbeiten durfte. Ich schätzte stets den wissenschaftlichen Austausch in der Arbeitsgruppe.

Großer Dank an Andrés Hidalgo und José Ángel Nicolás-Ávila sowie deren Team für die Zusammenarbeit bei den Parabiosen und deren Gastfreundschaft.

Dana Weidner danke ich für ihre großartige Arbeit im Bereich der Mikroskopie. Vielen Dank an Prof. Friedrich Paulsen und im Besonderen an Elke Kretzschmar für deren Zusammenarbeit bei der Transmissionselektronenmikroskopie.

Vielen Dank an Philipp Kirchner, Martin Eberhardt, Fulvia Ferrazzi, Julio Vera und Arif B. Ekici für die Generierung der Sequenzierungsdatensätze und deren Hilfe bei der Analyse. Lisa Seyler und Tobias Bäuerle danke ich für ihren Einsatz bei den MRT-Messungen.

Vielen Dank an Milena Pachowsky, Nina Renner, David Simon, Arnd Kleyer, Kolja Gelse und Martin Schicht für das Sammeln humaner Synovialbiopsien. Vielen Dank an Reiner F. Haseloff und Ingolf E. Blasig dafür, dass sie die Peptidomimetika und ihre wertvolle Erfahrung mit uns teilten. Vielen Dank auch an Branislav Krljanac und David Vöhringer für die *Retnla^{cre};tdTomato* Maus.

Ich danke meinen Eltern. Ihre Erziehung und ihre Unterstützung vor allem beim Studium haben die Voraussetzungen geschaffen, dass ich den Weg zu dieser Doktorarbeit einschlagen konnte und einen Beruf ausüben darf, der mir Freude bereitet.

Ich danke meinen Schwiegereltern für ihre Hilfe, wenn wir sie brauchten und die Sicherheiten, die sie uns gaben.

Ich danke meiner Frau Katja. Während meiner Doktorarbeit konnte ich ihre Unterstützung immer als selbstverständlich annehmen und danke ihr für ihr Verständnis, dass meine Arbeit im Labor, die oft auch zu Hause weiterging, einen so hohen Stellenwert in unserem Leben einnahm. Ihr Rückhalt im Privaten war unerlässlich. Dank Katja musste ich nicht zwischen Familie oder Wissenschaft wählen sondern konnte beides genießen.

Ihr Anteil an dieser Arbeit besteht somit nicht in der Produktion von Daten oder Analysen, war aber in gleichem Maße bedeutsam und notwendig für meine Arbeitsfähigkeit und auch den Erfolg des Projektes. Katja, vielen Dank, ich liebe dich.