

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
des Klinikums der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Steffen Massberg

**Funktionelle Charakterisierung von Makrophagenpopulationen in  
kardiovaskulären Erkrankungen**



**Kumulative Habilitationsschrift**  
zur Erlangung der Venia Legendi  
für das Fach Innere Medizin und Kardiologie

vorgelegt von

**Dr. med. Christopher Stremmel**

**2022**

## Inhaltsverzeichnis

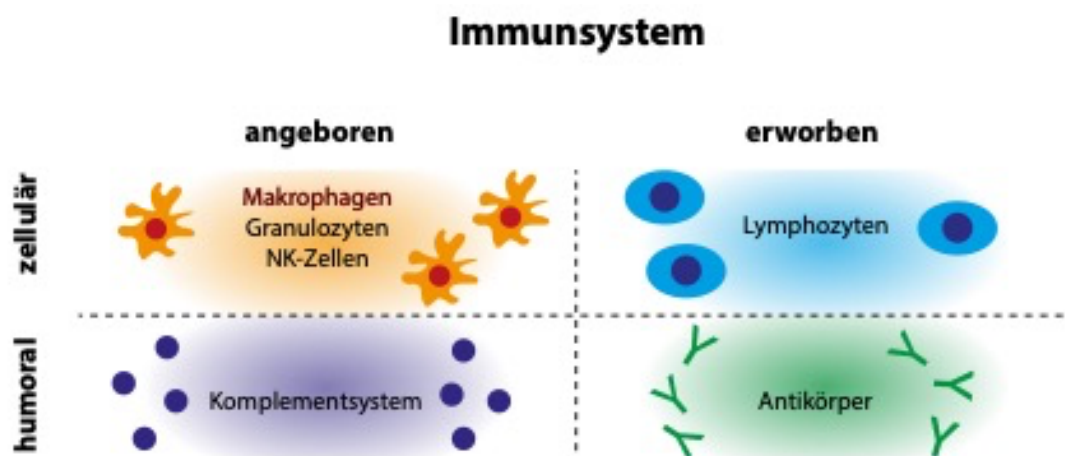
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
1.1. <b>MAKROPHAGEN ALS BESTANDTEILE DES IMMUNSYSTEMS .....</b>	<b>3</b>
1.2. <b>ENTWICKLUNG UND DIVERSITÄT GEWEBESTÄNDIGER MAKROPHAGEN .....</b>	<b>4</b>
1.3. <b>MAKROPHAGEN AUS KARDIOVASKULÄRER SICHT .....</b>	<b>6</b>
<b>2. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER WISSENSCHAFTLICHEN ARBEITEN .....</b>	<b>9</b>
2.1. <b>INTRAVITALE VISUALISIERUNG DER BEGINNENDEN HÄMATOPOESE IM DOTTERSACK .....</b>	<b>9</b>
2.1. <b>DOTTERSACKMAKROPHAGEN WANDERN TRANSVASKULÄR IN EMBRYONALE ZIELGEWEBE .....</b>	<b>10</b>
2.2. <b>ABGRENZUNG VON MAKROPHAGENPOPULATIONEN IN DER SPÄTEREN ENTWICKLUNG .....</b>	<b>12</b>
2.3. <b>GENETISCHE GENERATION VON KNOCHENMARKS-CHIMÄREN IM MYB-KNOCKOUT-MODELL .....</b>	<b>15</b>
2.4. <b>GEWEBESTÄNDIGE MAKROPHAGEN IM ADULTEN ORGANISMUS .....</b>	<b>18</b>
2.5. <b>MAKROPHAGENPOPULATIONEN IN ATHEROSKLEROTISCHEN PLAQUES .....</b>	<b>18</b>
2.6. <b>GENERIERUNG STABILER HOXB8 MAKROPHAGEN AUS DOTTERSACK UND KNOCHENMARK .....</b>	<b>20</b>
2.7. <b>URSPRUNGSABHÄNGIGE UNTERSCHIEDE DER MAKROPHAGENPOPULATIONEN .....</b>	<b>24</b>
<b>3. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>28</b>
<b>4. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>32</b>
<b>5. VERZEICHNIS DER IN DER HABILITATIONSSCHRIFT ZUSAMMENGEFASSTEN PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>34</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>35</b>
<b>7. DANKSAGUNG .....</b>	<b>41</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Makrophagen als Bestandteile des Immunsystems

Der Mensch ist regelmäßig verschiedensten Krankheitserregern in seiner Umgebung ausgesetzt und schafft es in der Regel dennoch sich erfolgreich gegen potenzielle Infektionen zu verteidigen. Grund hierfür ist ein ausgereiftes Immunsystem, welches sowohl angeborene als auch erworbene Abwehrmechanismen besitzt. Auf zellulärer Ebene werden die vorangehend genannten Systeme durch verschiedene Leukozytenpopulationen (weiße Blutkörperchen) vertreten. Zudem gibt es bestimmte Plasmaproteine, wie Antikörper oder Bestandteile des Komplementsystems, welche das sogenannte humorale Immunsystem repräsentieren (Tauber 2003) (Abb. 1).

Makrophagen sind stammesgeschichtlich die bedeutendsten Vertreter der angeborenen zellulären Immunität. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass sie bereits in zahlreichen Spezies nachgewiesen wurden. Dies unterstreicht ihre herausragende Rolle, die im Wesentlichen zwei Funktionen umfasst: Während sie unter physiologischen Bedingungen die Gewebemöostase aufrechterhalten, phagozytieren sie unter pathologischen Bedingungen Krankheitserreger und präsentieren deren Antigene an der Zelloberfläche zur weiteren gezielten Bekämpfung im Zusammenspiel mit anderen Komponenten des Immunsystems. Neben ihrer klassischen Zuordnung zum angeborenen Immunsystem, bilden sie somit zeitgleich auch eine Schnittstelle zur erworbenen Immunität. (Tauber 2003, McNelis and Olefsky 2014, Stremmel, Stark et al. 2019)



**Abbildung 1: Makrophagen im Kontext des Immunsystems**

Schemazeichnung des Immunsystems gegliedert nach angeborenem und erworbenem Immunsystem sowie Darstellung der wesentlichen zellulären und humoralen Komponenten.

## **1.2. Entwicklung und Diversität gewebeständiger Makrophagen**

Die klassische Entstehung von Makrophagen, wie sie bis heute in den meisten Lehrbüchern zu finden ist, verläuft wie folgt: Erste hämatopoetische Zellen sind in der embryonalen Entwicklung zunächst in der Aorto-Gonado-Mesonephros (AGM)-Region sowie in der fetalen Leber (FL) vorzufinden, bevor diese Progenitorzellen das Knochenmark (BM) besiedeln (Abb. 2A). Von dort wandern Monozyten über den Blutstrom aus und infiltrieren alle Organe, wo sie letztlich zu gewebeständigen Makrophagen differenzieren. (Cumano and Godin 2007, Bertrand, Chi et al. 2010, Boisset, van Cappellen et al. 2010, Kissa and Herbomel 2010)

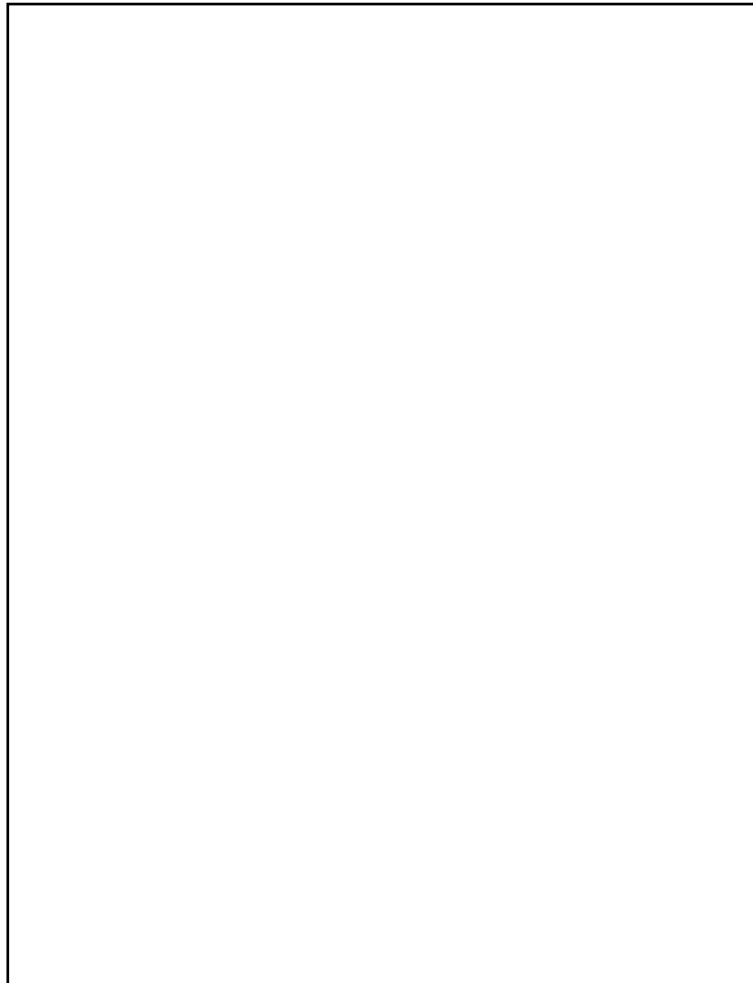
Vor etwa 10 Jahren entstand zunehmende Evidenz, dass dies nicht der universelle Entstehungsweg aller Makrophagen ist, sondern mehrere Populationen von Makrophagen mit unterschiedlichem embryonalem Ursprung koexistieren. In einem Mausmodell, in dem die Knochenmarkshämatopoese durch eine genetische Veränderung – einem sogenannten Myb-Knockout – ausgeschaltet ist, konnten Schulz und Kollegen demonstrieren, dass Makrophagen weiterhin in verschiedensten Geweben nachweisbar waren. Durch diese und zahlreiche kurz darauf publizierte Arbeiten, konnte eindrücklich gezeigt werden, dass Makrophagen unabhängig von der Knochenmarkshämatopoese im embryonalen Dottersack (YS) entstehen und im adulten Organismus persistieren. (Schulz, Gomez Perdiguero et al. 2012, Hashimoto, Chow et al. 2013, Yona, Kim et al. 2013, Epelman, Lavine et al. 2014) (Abb. 2A)

Ein wesentlicher Faktor für diese verzögerte Erkenntnis bei einer so bedeutenden Zellpopulation liegt mutmaßlich darin begründet, dass es bis heute keine eindeutigen zellulären Marker gibt, die Makrophagen aus dem Knochenmark zweifelsfrei von Makrophagen aus dem Dottersack abgrenzen. Man bedient sich daher vorwiegend sogenannter gepulster Markierungstechniken: Das heißt zu einem definierten Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung werden alle Zellen mit einem bestimmten Zellmarker dauerhaft kenntlich gemacht, meist über die Expression eines Fluoreszenzfarbstoffs. In Bezug auf Makrophagen nutzt man hierbei Unterschiede im embryonalen Entstehungszeitpunkt der beiden vorangehend beschriebenen Subpopulationen aus Dottersack und Knochenmark. Während die Dottersackhämatopoese bereits am Tag 7 der embryonalen Mausentwicklung (E7) beginnt, setzt die Knochenmarkshämatopoese (einschließlich AGM-Region und fetaler Leber) erst ab etwa Tag 10 bis 11 (E10/11) ein. Auf diese Weise führt eine vorzeitige gepulste Fluoreszenzmarkierung von Makrophagen – beispielsweise an Tag 8 der Mausentwicklung

(E8) – zu einer selektiven Markierung von Makrophagen aus dem Dottersack. Klassische Marker, die hierfür verwendet werden, sind CX3CR1 (*CX3C chemokine receptor 1*) oder CSF1R (*Colony stimulating factor 1 receptor*). (Schulz, Gomez Perdiguero et al. 2012, Epelman, Lavine et al. 2014, Stremmel, Schuchert et al. 2018)

Über viele Jahre hat man Makrophagen anhand ihres Differenzierungsmusters und der damit verbundenen zugeordneten Funktion in M1 und M2 Makrophagen eingeteilt. M1 Makrophagen exprimieren die induzierbare NO Synthase (iNOS), TLR2 (*Toll-like receptor 2*) und 4 sowie CD (*Cluster of differentiation*) 68, CD80 und CD86. Sie werden durch Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$ , Interferon  $\gamma$ , Lipopolysaccharide (LPS) und Pathogen- oder Schaden-assoziierte molekulare Muster (PAMPs/DAMPs) aktiviert, woraufhin sie TNF $\alpha$ , Interleukin (IL) 1 $\beta$ , IL6, IL12, IL23, NO, reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) und zahlreiche weitere Chemokine exprimieren. Dieses Zellprofil schreibt ihnen eine führende Rolle in der Abwehr von Krankheitserregern zu und sie sind im Rahmen der Atherosklerose vorwiegend in Hochrisiko-Plaques zu finden. Dem gegenüber stehen M2 Makrophagen, welche Arginase 1 (ARG1), Mannose Rezeptor Typ 1 (MRC1/ CD206), CHIL3 (YM1/*Chitinase-like Protein 3*), CHIL4 (YM2) und FIZZ1 (RETNLA/*Resistin-like  $\alpha$* ) sowie CD86 exprimieren. Sie werden durch IL4, IL10 und IL13 aktiviert und sezernieren IL1 Rezeptor Antagonist (IL1RA), IL10, TGF $\beta$  (*Transforming growth factor  $\beta$* ) und zahlreiche Chemokine wie CCL17 (*CC-chemokine ligand 17*), CCL18, CCL22 und CCL24. M2 Makrophagen wirken somit eher immunsuppressiv und spielen eine wichtige Rolle in der Gewebe-Reparatur und Homöostase. Vorwiegend sind letztere Makrophagen im Rahmen der Atherosklerose in stabilen Plaques und der Adventitia zu finden. (Ginhoux and Jung 2014, Chistiakov, Bobryshev et al. 2015, Ruytinx, Proost et al. 2018, Shapouri-Moghaddam, Mohammadian et al. 2018)

Auch wenn man heute diese strikte Einteilung verlassen hat, spricht man weiterhin von M1- bzw. M2- ähnlichen Zellen, um grundlegende Eigenschaften zu charakterisieren (Murray and Wynn 2011, Martinez and Gordon 2014, Stremmel, Stark et al. 2019) (Abb. 2B). Inwiefern diese funktionellen Unterschiede mit dem Ursprung der Zellen aus Dottersack und Knochenmark in Verbindung gebracht werden können, ist bis heute unklar und soll im Rahmen dieser Habilitationsarbeit näher beleuchtet werden.



**Abbildung 2: Entwicklung und Diversität gewebeständiger Makrophagen**

(A) Embryonale Entwicklung erster Makrophagen(vorläufer) sowohl im Dottersack als auch im Rahmen der fetalen Hämatopoese in der Aorto-Gonado-Mesonephros (AGM)-Region, der fetalen Leber (FL) und dem Knochenmark (BM). (B) Schematische Darstellung unterschiedlicher Makrophagen-Phänotypen in Bezug auf Ursprung und Funktion. Abbildung modifiziert aus Stremmel, Stark et al. 2019.

**1.3. Makrophagen aus kardiovaskulärer Sicht**

Aus der Perspektive kardiovaskulärer Erkrankungen bietet das Wissen um unterschiedliche Makrophagensubpopulationen ein weitreichendes Potential. Bis heute sind kardiovaskuläre Erkrankungen führend unter den weltweiten Todesfällen in entwickelten Nationen. Insbesondere atherosklerotische Gefäßveränderungen und dadurch bedingte Myokardinfarkte oder Schlaganfälle haben eine große bevölkerungsweite Bedeutung. Makrophagen spielen im Rahmen der Pathogenese hier die Hauptrolle, indem sie in Bereiche erhöhter Endothelbelastung rekrutiert werden und über die Aufnahme von Cholesterin sogenannte Schaumzellen bilden. Dieser stetige Vorgang führt durch eine sterile Entzündung zur Plaquebildung und einer daraus folgenden Gefäßeinengung bis zur kompletten Obstruktion oder Plaqueruptur, welche letztlich ursächlich für den akuten Myokardinfarkt ist.

Eine erweiterte Kenntnis über Makrophagen, und insbesondere deren Subpopulationen mit potenziell spezifischen Funktionen, könnte in der Zukunft neue Therapiemöglichkeiten eröffnen. So wäre es beispielsweise denkbar Makrophagen, die zur Plaquebildung beitragen zu hemmen, während man die Gewebekomöostase weitgehend nicht beeinträchtigt. Bedeutende Forschungsschwerpunkte in Bezug auf Makrophagen liegen in erster Linie auf dem Zellursprung, der Expansion des lokalen Zellpools unter inflammatorischen Bedingungen, der Anpassungen der Makrophagen an das lokale Milieu, der Phagozytose an sich und zelltypabhängige metabolische Vorgänge, beispielsweise in Bezug auf Cholesterin. (Schulz and Massberg 2014, Bobryshev, Ivanova et al. 2016, Stremmel, Stark et al. 2019) (Abb. 3)



**Abbildung 3: Pathogenese der Atherosklerose**

Pathogenetische Kaskade der Atherosklerose mit Darstellung wissenschaftlicher Forschungsschwerpunkte in Bezug auf Makrophagen. Abbildung modifiziert aus Stremmel, Stark et al. 2019.

Im Rahmen der vorliegenden Habilitationsarbeit soll die Entstehung der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen *in vivo* nachvollzogen werden. Hierzu werden wir uns spezieller Fluoreszenzmarkierungstechniken bedienen, um die Zielzellen intravital mittels Epifluoreszenz und 2-Photonen-Mikroskopie darzustellen. Zudem werden wir stabile Zelllinien aus Dottersack und Knochenmark unter Verwendung des Hoxb8 (*Homeobox protein Hox-B8*)-Systems etablieren, um so detaillierte zellbiologische und funktionelle Analysen durchführen zu können.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist es Makrophagenpopulationen detailliert sowohl extra- als auch intravital zu charakterisieren, um mögliche spezifische Marker oder Funktionen der einzelnen Populationen gezielt zu identifizieren, die in der Folge Grundlage möglicher Therapieansätze sein können. Insbesondere in Bezug auf die Atherosklerose als bedeutendstes kardiovaskuläres Krankheitsbild, werden wir unsere Erkenntnisse anwenden und abschließend potenzielle Zukunftsmodelle diskutieren.



## 2. Ergebnisse und Diskussion der wissenschaftlichen Arbeiten

### 2.1. Intravitale Visualisierung der beginnenden Hämatopoese im Dottersack

In der frühen Mausentwicklung werden erste sogenannte erythromyeloide Progenitorzellen (EMPs) ab etwa Tag 7.25 der embryonalen Entwicklung (E7.25) erstmals im Dottersack nachweisbar. Neben dem Stammzellmarker KIT sind diese Zellen durch die Expression des Leukozytenmarkers CD45 und eines Markers der frühen Makrophagenentwicklung, CSF1R, charakterisiert. Mit Beginn der Makrophagendifferenzierung geht die Expression von KIT verloren und CX3CR1 als klassischer Oberflächenmarker von gewebeständigen reifen Makrophagen wird in zunehmendem Maße exprimiert. (Gomez Perdiguero, Klapproth et al. 2015, Hoeffel, Chen et al. 2015)

Aufbauend auf vorangehenden *ex vivo* Analysen von Dottersackgewebe, konnten wir diese Zellen erstmals intravital mittels Epifluoreszenz und 2-Photonen-Mikroskopie nachweisen. Wir haben hierzu *Csf1r* sowie *Cx3cr1* genetisch an einen Fluoreszenzmarker gekoppelt, sodass eine eindeutige Identifikation von Dottersackmakrophagen möglich war (Abb. 4A, B). Für diese frühen Analysen konnte eine Kontamination durch Knochenmarksmakrophagen der fetalen Hämatopoese durch ihre deutlich spätere Entstehung, ab etwa Tag E10.5, ausgeschlossen werden.

Im Mausorganismus ist der heranwachsende Embryo von einem Dottersack umgeben, der dicht mit Gefäßen durchsetzt ist (Abb. 4C). Ab etwa Tag E8.5 können erste Makrophagenvorläufer im Dottersackgewebe nachgewiesen werden, bevor dieser Zellpool rasch zunimmt und bis E16.5 die maximale Zelldichte erreicht (Abb. 4D, E). Es imponiert zunächst eine kugelförmige Zellmorphologie, die es den Makrophagen ermöglicht langsam im Gewebe zu migrieren, bevor sie im weiteren Verlauf ihren typischen dendritischen Ausläufer ausbilden und weitgehend immobil werden (Abb. 4D).

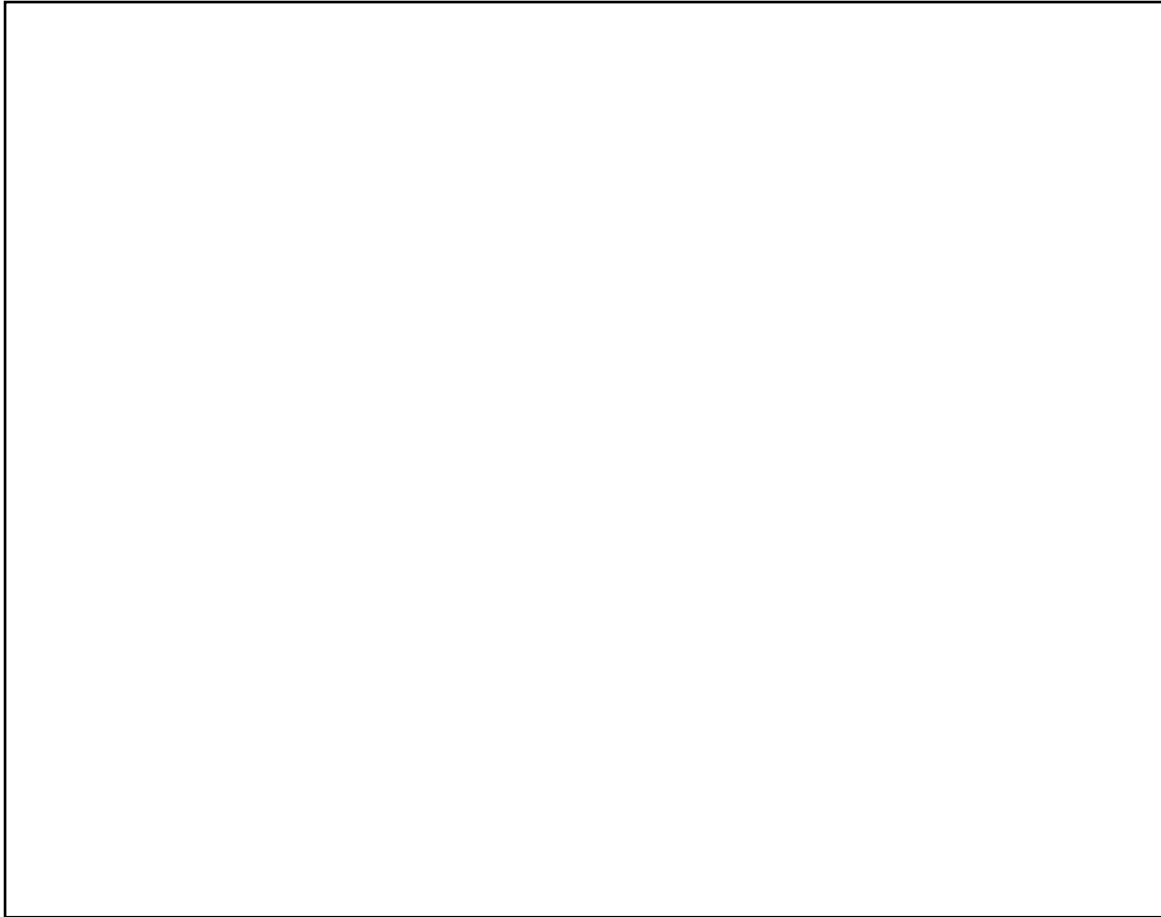


**Abbildung 4: Visualisierung der Dottersackhämatopoese**

(A) Schematische Darstellung des experimentellen Designs: Nach zeitgesteuerter Generierung von Cx3cr1<sup>GFP/+</sup> Mausembryonen, wird der Dottersack mittels (B) Epifluoreszenzmikroskopie gemäß dem skizzierten Versuchsaufbau untersucht. (C) Visualisierung des murinen Dottersacks an E16.5 mittels Licht- (links) und Fluoreszenzmikroskopie (rechts). (D) Dottersackgewebe mit Prämakrophagen an den angegebenen Zeitpunkten. Abgebildet sind repräsentative Bildausschnitte mit einer Größe von 400 µm x 400 µm. (E) Korrespondierende Quantifizierung der 400 µm x 400 µm großen Bildausschnitte; (\*\*\*) p<0.001 (zweiseitiger Mann-Whitney Test); abgebildet sind Median und Interquartilsabstand (IQR). Maßstabsleiste 1 mm (C), 100 µm (D). Cx3cr1-GFP, grün. Abbildung modifiziert aus Stremmel, Schuchert et al. 2018.

**2.1. Dottersackmakrophagen wandern transvaskulär in embryonale Zielgewebe**

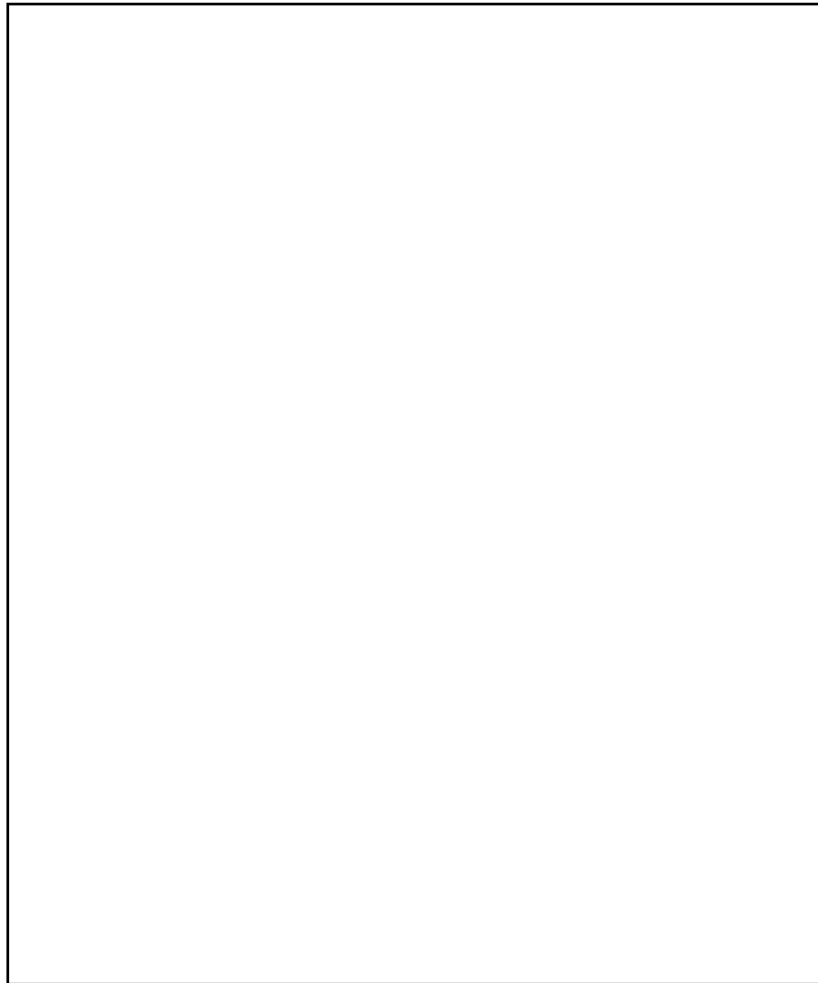
Mikroskopisch zeigt sich eine enge räumliche Nähe zwischen Makrophagen und dem dichten Blutgefäßsystem des Dottersacks (Abb. 5A). Durch hochauflösende intravitalmikroskopische Aufnahmen ist es uns erstmals gelungen, die Einwanderung von Prämakrophagen in die Gefäße zu visualisieren (Abb. 5B) und die Zellen direkt im Blutstrom darzustellen (Abb. 5C). Während erste Zellen ab Tag E8.5 intravaskulär nachweisbar sind, steigt ihre Zelldichte bis E10.5 rasch auf bis zu 40 CX3CR1+ Prämakrophagen/ Minute an, bevor sie zum Zeitpunkt E14.5 wieder komplett sistiert (Abb. 5D). Während die Mehrzahl der Zellen dabei frei im Blutstrom treibt und somit nicht adhärent sind, sind vereinzelt Zellen nachweisbar, die Kontakt zum Endothel aufbauen und mit verzögerter Geschwindigkeit daran entlang rollen (Abb. 5E, F).



**Abbildung 5: Transvaskuläre Migration von Prämakrophagen aus dem Dottersack**

(A) Intravitale Fluoreszenzfärbung und Visualisierung des CD31+ Endothels (rot) in Cx3cr1<sup>GFP/+</sup> Embryonen (grün) an E10.5. (B, C, E) Einzelbildextraktionen von intravitalem Videosequenzen mit CX3CR1+ Prämakrophagen (grün) an E10.5. Abgebildet ist (B) der Eintritt der Zellen aus dem Dottersack ins Gefäßsystem sowie (C) nicht adhärenz und (E) rollende intravaskuläre Zellen. Richtung des Blutstroms von unten nach oben (B) bzw. links nach rechts (C, E). (D) Quantifizierung intravaskulärer CX3CR1+ Zellen in einem Dottersackgefäß mittlerer Größe; Median  $\pm$  IQR. (F) Bewegungsgeschwindigkeit intravaskulärer nicht adhärenz und rollender CX3CR1+ Zellen im Dottersack an E10.5; Median  $\pm$  IQR. Maßstabsleisten 100  $\mu$ m (A, B, C, E). Abbildung modifiziert aus Stremmel, Schuchert et al. 2018.

Diese rollende Bewegung geht in den embryonalen Zielgeweben in eine komplette Adhäsion über, sodass die Prämakrophagen aus dem Blutstrom auswandern können (Abb. 6A). Die frühe Verteilung der Makrophagen im Embryo ist zunächst kopfbetont und ab etwa E12.5 ausgewogen in allen Körperregionen mit Zelldichten von bis zu 100 Prämakrophagen pro mikroskopischem Feld (400  $\mu$ m x 400  $\mu$ m) (Abb. 6B, C).



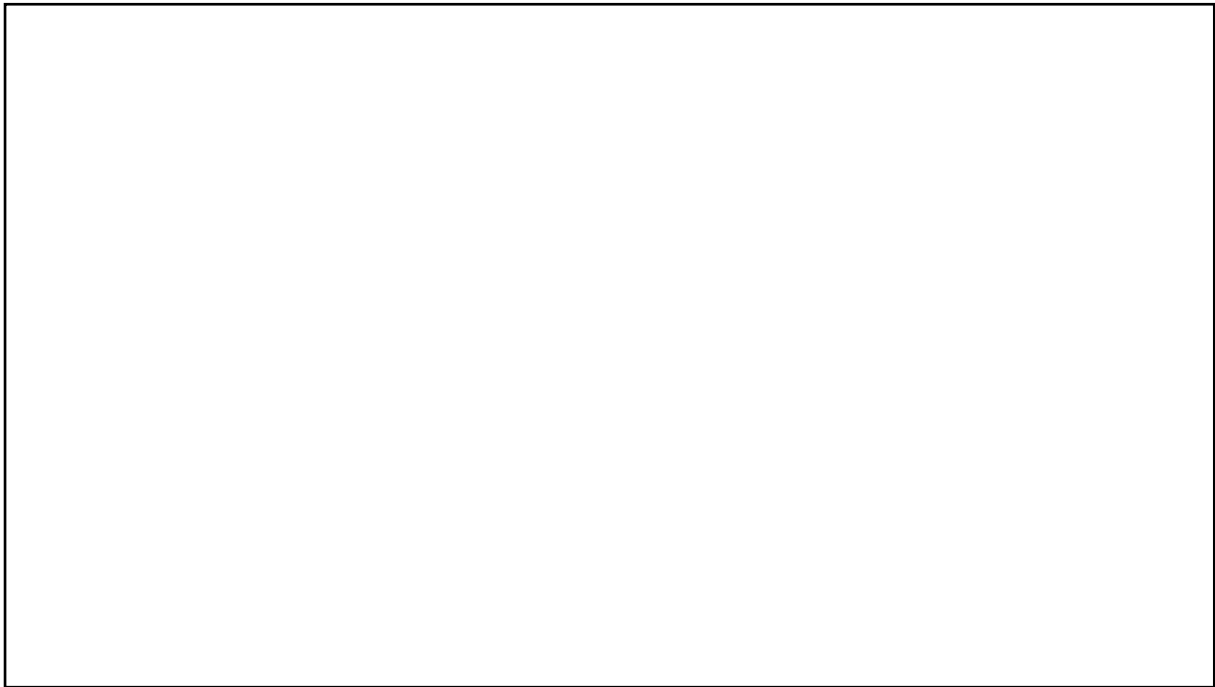
**Abbildung 6: Infiltration embryonaler Zielgewebe durch Dottersackmakrophagen**

(A) Bildserie aus einer E10.5 Videosequenz mit Adhäsion eines CX3CR1+ Prämakrophagen (grün) am Endothel der embryonalen Kopfregion; Blutflussrichtung von oben nach unten. (B) Fluoreszenzaufnahme eines isolierten E10.5 Cx3cr1<sup>GFP/+</sup> (grün) Embryos. (B) Quantifizierung der CX3CR1+ Makrophagendichte in verschiedenen Körperregionen zu den angegebenen Zeitpunkten; (\*)  $p < 0.05$  (einseitige ANOVA mit Tukey Korrektur für multiple Vergleiche: Kopf vs. Rumpf  $p = 0.0107$ , Kopf vs. Schwanz  $p = 0.0121$ , Rumpf vs. Schwanz  $0.9860$ ); Median  $\pm$  IQR. Maßstabsleisten sind 100  $\mu\text{m}$  (A), 1 mm (B). Abbildung modifiziert aus Stremmel, Schuchert et al. 2018.

## 2.2. Abgrenzung von Makrophagenpopulationen in der späteren Entwicklung

Nach der Entstehung erster Makrophagenvorläufer in der AGM-Region, der fetalen Leber sowie im Knochenmark ist spätestens ab E12.5 eine Abgrenzung zu Dottersackmakrophagen nicht mehr ohne weiteres möglich. Ein gängiges Modell, um Dottersackmakrophagen in der späteren Embryonalentwicklung zweifelsfrei zu identifizieren, ist das sogenannte Myb-Knockout-Modell. Durch genetische Ausschaltung des Transkriptionsfaktors Myb wird die fetale Hämatopoese in AGM-Region, fetaler Leber und Knochenmark komplett inhibiert. Obwohl somit sehr elegant Dottersackmakrophagen untersucht werden können, ist dieses Modell auf die embryonale Entwicklung bis kurz nach der Geburt begrenzt, da die Mäuse an einer schweren Anämie versterben. (Abb. 7A, B)

In der isolierten Analyse der Dottersackhämatopoese zeigt sich, dass die Zahl der Makrophagen im Dottersack unverändert bleibt und diese Zellen mit einer vergleichbaren Kinetik vorwiegend zwischen E8.5 und E12.5 in den Mausembryo einwandern (Abb. 7C-E). Somit kann eine wesentliche Kontamination durch Zellen der fetalen Hämatopoese auch für die vorangehend beschriebenen späteren Analysen weitgehend ausgeschlossen werden.

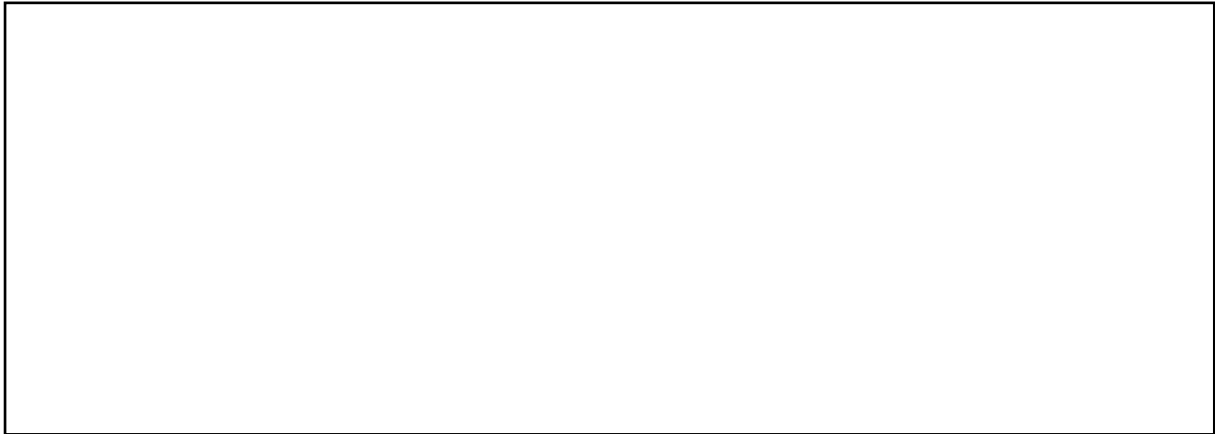


**Abbildung 7: Dottersackmakrophagen entstehen unabhängig von Myb**

(A) Schematische Darstellung der zeitgesteuerten Generierung von  $Cx3cr1^{GFP/+}$   $Myb^{-/-}$  Mausembryonen. (B) Lichtmikroskopie von  $Myb^{+/+}$  und  $Myb^{-/-}$  Embryonen an E16.5 zur Visualisierung der fehlenden fetalen Hämatopoese mit schwerer Anämie. (C) Visualisierung und (D) Quantifizierung von CX3CR1+ Zellen (grün) im Dottersack von  $Myb^{+/+}$  und  $Myb^{-/-}$  Mäusen zu den angegebenen Zeitpunkten; keine signifikanten Unterschiede nachweisbar (zweiseitiger t-Test); Mittelwert und Standardabweichung. (E) Quantifizierung intravaskulärer CX3CR1+ Zellen in  $Myb^{+/+}$  und  $Myb^{-/-}$  Embryonen zu den angegebenen Zeitpunkten. Unterschied  $Myb^{+/+}$  vs.  $Myb^{-/-}$  an E10.5 nicht signifikant (zweiseitiger Mann Whitney Test). Median  $\pm$  IQR. Maßstabsleiste 100  $\mu$ m (C). Abbildung modifiziert aus Stremmel, Schuchert et al. 2018.

Als weiteres Modell zur isolierten Analyse von Dottersackmakrophagen hat sich eine frühzeitige gepulste Fluoreszenzmarkierung etabliert. Das heißt alle Makrophagen werden zu einem Zeitpunkt vor dem Einsetzen der fetalen Hämatopoese markiert und behalten diese Markierung auch in der späteren Entwicklung dauerhaft bei. In unseren Versuchen wird diese Markierung durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von Hydroxytamoxifen (OH-TAM) und einem speziellen Reportermodell ( $Csf1r$  MerCreMer : Rosa26 eYFP) erreicht. Somit können diese Zellen zweifelsfrei einer embryonalen Herkunft aus dem Dottersack zugeordnet werden und sogar Expansionsmuster einzelner Zellklone dargestellt werden (Abb. 8A, B). Auch in

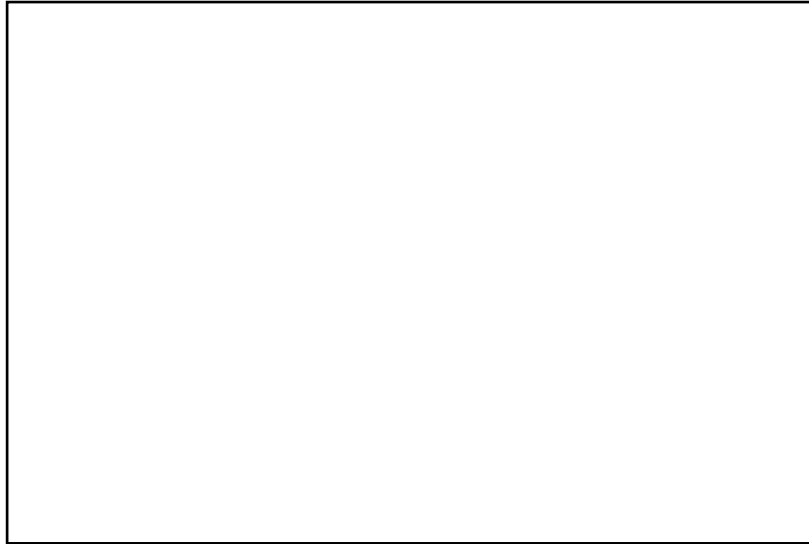
diesem Modell hat sich die zeitlich klar begrenzte Einwanderung von Dottersackmakrophagen in den embryonalen Organismus in einem Zeitfenster vorwiegend zwischen E8.5 und E12.5 bestätigt (Abb. 8C).



**Abbildung 8: Pulsmarkierung von Dottersackmakrophagen**

(A) Schematische Darstellung des Csf1r MerCreMer : Rosa26 eYFP Mausmodells. Nach der Injektion von OH-TAM (Hydroxytamoxifen) wird Cre Csf1r-abhängig exprimiert, was daraufhin eine Fluoreszenzexpression hervorruft (YFP, grün). (B) Fluoreszenzaufnahmen von an E8.5 gepulst markierten Makrophagenvorläufern im Dottersack und verschiedenen embryonalen Regionen an E12.5. (C) Quantifizierung intravaskulärer CSF1R+ Zellen nach Pulsmarkierung. Median  $\pm$  IQR. Maßstabsleiste 100  $\mu$ m (B). Abbildung modifiziert aus Stremmel, Schuchert et al. 2018.

In diesem ersten Abschnitt der Habilitationsarbeit ist es uns somit erstmals gelungen die Dottersackhämatopoese intravital zu visualisieren und somit die Entstehung, Entwicklung und Migration dieser frühen Makrophagen detailliert zu verfolgen: Ab E8.5 lassen sich erste Prämakrophagen im embryonalen Dottersack mit einer kugelförmigen migrationsfähigen Morphologie registrieren. Diese Zellen expandieren rasch und infiltrieren zeitlich klar begrenzt das Gefäßsystem vorwiegend zwischen E8.5 und E12.5, sodass spätestens ab E14.5 keine intravaskulären Prämakrophagen mehr nachweisbar sind. In den embryonalen Zielgeweben angekommen, wandern die Makrophagen aus dem Gefäßsystem aus und bilden dort ein engmaschiges Zellnetzwerk, welches durch die typischen dendritischen Zellausläufer reifer Makrophagen charakterisiert ist. Mit diesen tasten sie kontinuierlich die lokale Umgebung ab, sorgen für Gewebemöostase und können Krankheitserreger detektieren und phagozytieren. Im Rahmen dieser morphologischen Umwandlung kommt es zu einer gesteigerten Expression des Oberflächenmarkers Cx3cr1 sowie des typischen Markers differenzierter Makrophagen F4/80. (Abb. 9)



**Abbildung 9: Graphische Zusammenfassung der frühen Makrophagenentstehung**

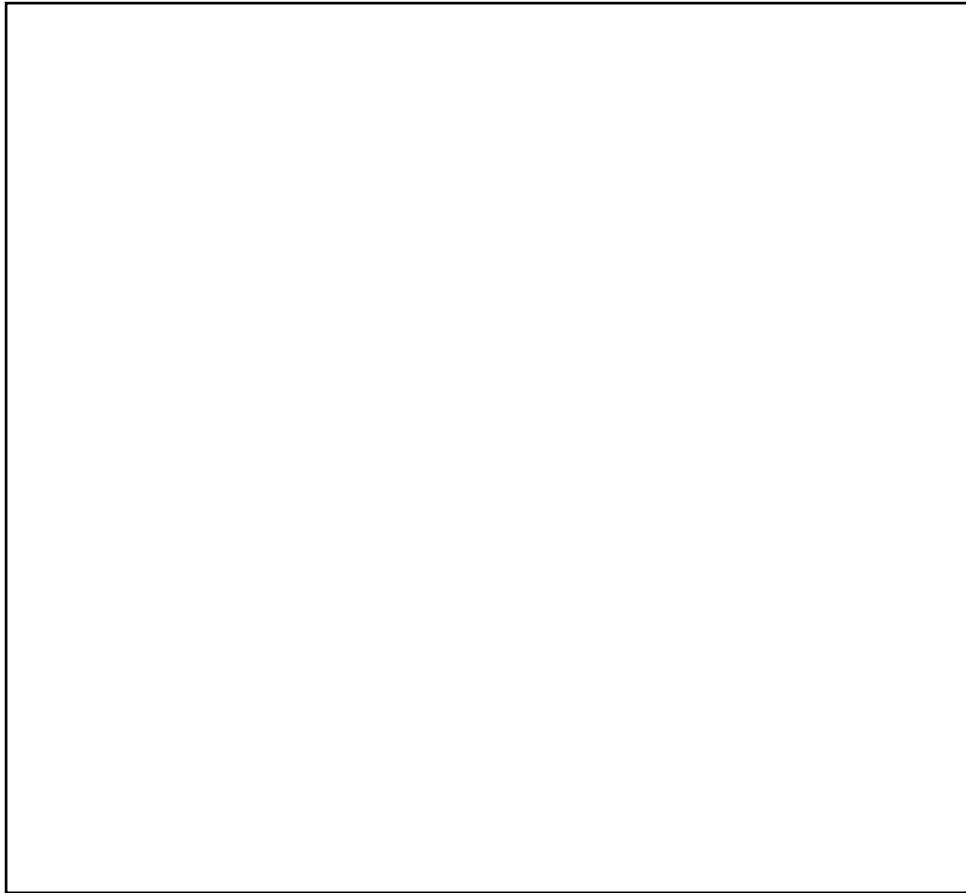
Graphische Zusammenfassung der Morphologie-abhängigen Migration: Makrophagenvorläufer expandieren ab E8.5 im Dottersack. Bis etwa E14.5 wandern sie über den Blutstrom in bestimmte Zielorgane ein. Diese kurze Zeitspanne ist durch Vorläuferzellen mit einer sphärischen Zellmorphologie charakterisiert. Im Zuge der progredienten Ausdifferenzierung verlieren Makrophagen die vorangehend beschriebene Einwanderungsfähigkeit und bilden zunehmend Dendriten aus, mit denen sie die lokale Umgebung abtasten. Abbildung modifiziert aus Stremmel, Schuchert et al. 2018.

**2.3. Genetische Generation von Knochenmarks-Chimären im Myb-Knockout-Modell**

Ein bekanntes Modell zur Analyse hämatopoetischer Zellen verwendet Knochenmarks-Chimären. Klassischerweise wird hierbei durch Bestrahlung das Empfänger Knochenmark komplett depletiert und durch Spenderknochenmark mit beispielsweise genetischen Veränderungen oder Fluoreszenzmarkierungen ersetzt. Analog zur vorangehend beschriebenen Technik einer gepulsten Markierung, ist dies eine weitere Möglichkeit Makrophagenpopulationen im adulten Organismus zu unterscheiden.

Da die Bestrahlung jedoch mit einer relevanten sterilen Inflammation der Gewebe einhergeht, welche in der Folge auch zu Fibrosierungen führt, ist dieses Modell zur Analyse von Immunzellen nur bedingt geeignet. Wir haben daher ein alternatives Modell entwickelt, in dem wir das Empfänger Knochenmark durch ein genetisches Modell depletieren: Nach Injektion von Poly(I:C) kommt es in den Empfängermäusen zu einem Knockout von Myb. Wie vorangehend beschrieben wird dadurch die Knochenmarkshämatopoese komplett unterbunden. Um in diesem vulnerablen Zeitraum Infektionen zu vermeiden, erfolgt eine prophylaktische Behandlung mit Antibiotika. In einem zweiten Schritt wird dann, wie im Bestrahlungsmodell, Spenderknochenmark mit den gewünschten Modifikationen (z. B. Fluoreszenzmarkierung) injiziert. So können Makrophagen aus dem Knochenmark in

verschiedenen physiologischen und pathologischen Modellen gezielt *ex vivo* und *in vivo* verfolgt werden. (Abb. 10, 11A)



**Abbildung 10: Myb-basierte Generierung von Knochenmarks-Chimären**

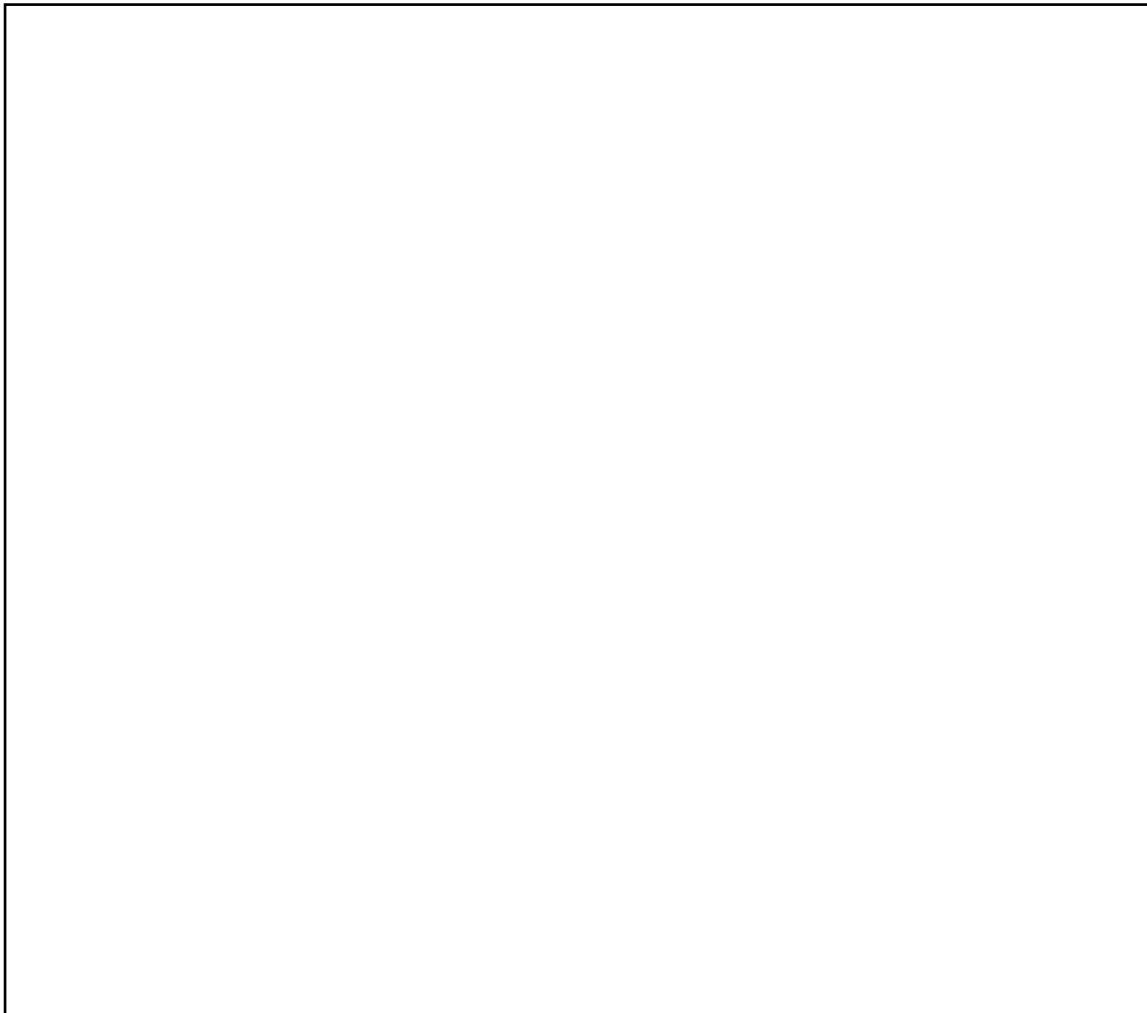
Durch wiederholte Injektion von Poly(I:C) wird in  $Mx1^{Cre} : c-Myb^{fl/fl}; CD45^{2/2}$  eine Knochenmarksdepletion erreicht. Anschließend werden  $CD45^{1/1}$  Spenderzellen transplantiert, um Knochenmarks-Chimäre zu generieren. Parallel werden die transplantierten Mäuse von Tag 3 bis 30 nach der ersten Poly(I:C) Injektion prophylaktisch antibiotisch behandelt. Abbildung modifiziert aus Stremmel, Schuchert et al. 2018.

Nach 3-5 Poly(I:C) Injektionen konnten wir in  $Mx1^{Cre} : c-Myb^{fl/fl} : CD45^{2/2}$  Mäusen eine suffiziente Knochenmarksdepletion erreichen und Spenderzellen (genetischer Hintergrund  $CD45.1$ ) erfolgreich transplantieren. Auch 3 Monate nach erfolgreicher Transplantation waren die Blutmonozyten und Granulozyten nahezu ausschließlich mit  $CD45.1$  Hintergrund und somit dem Spenderknochenmark entsprechend. Für Leukozyten konnten wir einen Chimärismus von ca. 90% erreichen, da diese Zellen deutlich langlebiger sind (Abb. 11B). Insgesamt zeigt sich jedoch für alle Populationen ein zunehmender Chimärismus über die Zeit (Abb. 11C). Da periphere Zielgewebe durch das Myb-Modell nicht angegriffen werden, konnten wir – wie erwartet – in exemplarischen Proben von Haut (Langerhanszellen) und



Gehirn (Mikrogliazellen) nachweisen, dass die dortigen gewebeständigen Makrophagen noch Empfängerursprung (genetischer Hintergrund CD45.2) haben (Abb. 11D).

Interessanterweise hat man diese Beobachtung auch nach Handtransplantation im humanen System gemacht: Jahre nach erfolgreicher Transplantation waren die gewebeständigen Makrophagen der Hand, die sogenannten Langerhanszellen, noch von Spenderursprung, während im Gefäßsystem ausschließlich Empfänger-Monozyten zirkulierten. Diese gewebeständigen Makrophagen sind also sehr langlebig und erneuern sich im Gewebe selbst. Ob sie möglicherweise einen Ursprung außerhalb des Knochenmarks haben, ist bis heute ungeklärt. (Petruzzo, Revillard et al. 2003, Kanitakis, Petruzzo et al. 2004, Kanitakis, Morelon et al. 2011)



**Abbildung 11: Chimärismus-Analysen**

(A) Experimentelles Design und Zeitplan der Poly(I:C) Injektionen vor geplanter Knochenmarkstransplantation. (B) Blut-Chimärismus in Kontrollmäusen sowie nach Knochenmarksdepletion (4 Poly(I:C) Injektionen) und Transplantation von Spenderknochenmark. (C) Blut-Chimärismus für angegebene Leukozytenlinien im Zeitverlauf. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment. (D) Gewebe-Chimärismus für Makrophagen in Gehirn (Mikroglia) und Epidermis (Langerhanszellen). Abbildung modifiziert aus Stremmel, Schuchert et al. 2018.

#### **2.4. Gewebeständige Makrophagen im adulten Organismus**

Im adulten Mausorganismus sind in nahezu allen Geweben Makrophagen mit einer dualen Herkunft aus Dottersack und Knochenmark langfristig nachweisbar. Die anteilige Zusammensetzung variiert dabei je nach Organ und verschiebt sich unter inflammatorischen Bedingungen zugunsten der Knochenmarksmakrophagen, die aus Monozyten in die betroffenen Gewebe rekrutiert werden. Eine Sonderrolle spielen Makrophagen des Gehirns: Mikrogliazellen stammen unter physiologischen Bedingungen ausschließlich aus dem embryonalen Dottersack ab. (Ginhoux, Greter et al. 2010, Schulz, Gomez Perdiguero et al. 2012, Wang, Yang et al. 2020)

Dieses duale System von Makrophagen lässt die Frage aufkommen, ob sich die beiden Subpopulationen in ihren Eigenschaften unterscheiden und, wenn ja, welche Rolle ihnen jeweils zuzuschreiben ist. So konnten wir in Kollaboration beispielsweise in der Niere zeigen, dass im adulten Organismus mindestens 4 Populationen von dendritischen Zellen/Makrophagen nachweisbar sind, welche sich in ihren inflammatorischen Eigenschaften und ihrer embryonalen Herkunft relevant unterscheiden (Salei, Rambichler et al. 2020).

#### **2.5. Makrophagenpopulationen in atherosklerotischen Plaques**

Natürlich ist die Beobachtung mehrerer Makrophagensubpopulationen nicht auf die Niere limitiert. Makrophagen machen mit etwa 30-50% einen relevanten Anteil der Leukozyten in der Gefäßwand aus (Cochain, Vafadarnejad et al. 2018, Cole, Park et al. 2018, Winkels, Ehinger et al. 2018). Auch wenn es als gesichert gilt, dass Makrophagen in atherosklerotischen Plaques sowohl aus dem embryonalen Dottersack als auch aus der fetalen Hämatopoese im Knochenmark entstammen, ist eine Zuordnung der einzelner Subpopulationen zum embryonalen Ursprung bisher nicht gelungen (Ensan, Li et al. 2016). Neben fehlender eindeutiger Oberflächenmarker kommt erschwerend hinzu, dass Makrophagen eine starke Anpassungsfähigkeit an das lokale umgebende Milieu besitzen und somit die Grenze zwischen herkunftsbasierter Prägung und lokaler Adaptation verschwimmt (Davies, Jenkins et al. 2013, Gosselin, Link et al. 2014, Lavin, Winter et al. 2014).

Wie einleitend erwähnt kann man Makrophagen grob anhand ihrer führenden Eigenschaften in inflammatorische M1-ähnliche Zellen und M2-ähnliche Zellen einteilen, die in erster Linie der Gewebemöostase dienen. Man geht davon aus, dass Dottersackmakrophagen vorwiegend im Sinne eines M2-ähnlichen Zelltyps der Gewebemöostase dienen, während

Makrophagen aus dem Knochenmark durch ein M1-ähnliches Profil charakterisiert sind. Dies ist jedoch nur eine vereinfachte Darstellung des Gesamtsystems, da es nach der bisherigen Datenlage auch innerhalb der einzelnen entwicklungsgeschichtlichen Kompartimente – Dottersack und Knochenmark – Populationen mit gegensätzlichen Eigenschaften gibt. So konnte wir im Rahmen einer Kollaboration unter den tendenziell pro-inflammatorischen Monozyten/ Makrophagen aus dem Knochenmark eine CD163 positive Subgruppe von Makrophagen identifizieren, welche immunmodulatorisch wirkt und anti-inflammatorische Eigenschaften hat (Fischer-Riepe, Daber et al. 2020).

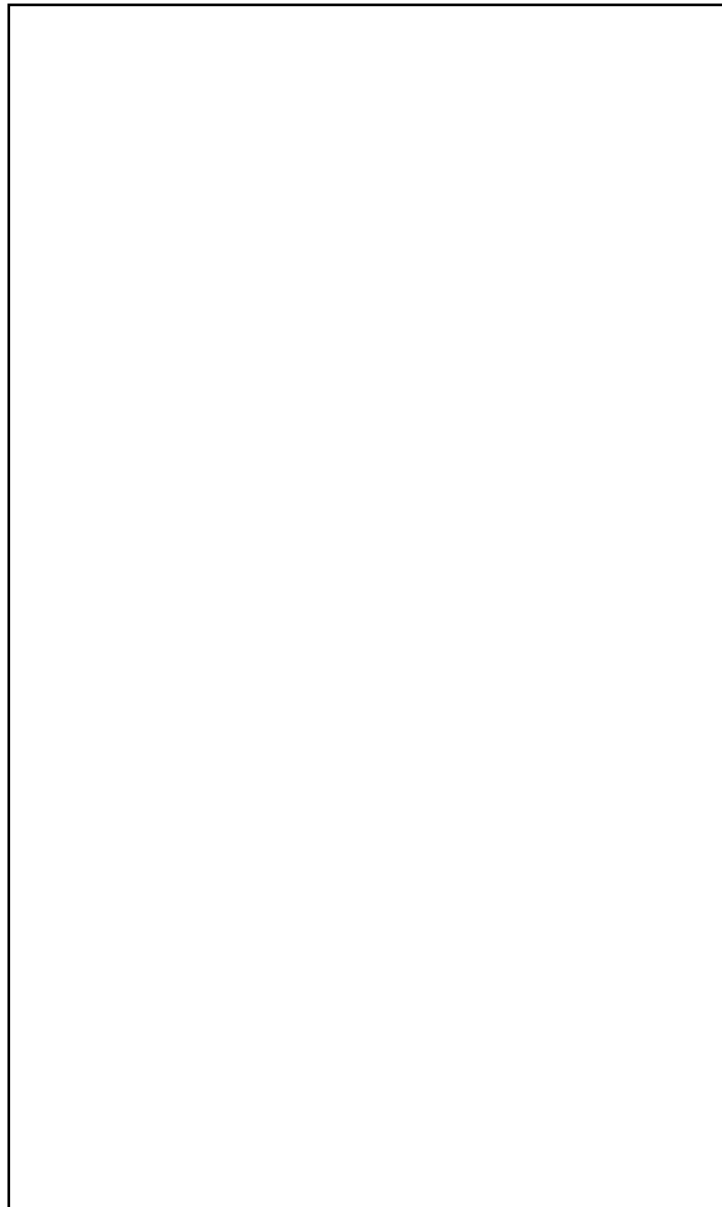
In einer Reihe kürzlich erschienenen Studien zu Makrophagen in atherosklerotischen Plaques konnte gezeigt werden, dass sich in detaillierten RNA Analysen oder mittels Massenspektrometrie auf zellulärer Ebene drei bis fünf Makrophagenpopulationen abgrenzen lassen. Allen Studien war gemeinsam, dass sie unter physiologischen Bedingungen residente Makrophagen in der Gefäßwand nachweisen konnten, die erhöhte Mengen von Lyve1 (*Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1*) und CD206 exprimierten und abhängig von M-Csf (*Macrophage colony-stimulating factor*)/ Csf1r-Signalwegen waren. In atherosklerotischen Plaques hingegen wurden vorwiegend inflammatorische M1-ähnliche Zellen nachgewiesen, die CD14, NLRP3 (*NLR family pyrin domain containing 3*) und IL1 $\beta$  exprimierten. (Cochain, Vafadarnejad et al. 2018, Cole, Park et al. 2018, Winkels, Ehinger et al. 2018)

Im Rahmen von Untersuchungen an aortalen Makrophagen konnten wir zeigen, dass Dottersackmakrophagen auch in der adulten Maus in der Adventitia erhalten bleiben, dort lokal proliferieren und erst im fortgeschrittenen Alter verschwinden. Parallel dazu existiert eine Population an Makrophagen aus dem Knochenmark, die unter physiologischen Bedingungen langsam und stetig rekrutiert wird. Ihr relativer Anteil nimmt unter inflammatorischen Bedingungen und im Alter zu. Die unterschiedliche Prägung der Zellen spielt in der Pathogenese der Atherosklerose möglicherweise eine entscheidende Rolle: Auf Genexpressionsebene sind Dottersackmakrophagen eher durch die Expression charakteristischer Gene für die Gewebemöostase geprägt, während Chil3/ Arg1 bzw. Ear2 (*Eosinophil cationic protein 2 precursor*)/ Retnla exprimierende Knochenmarksmakrophagen eher das Eindringen von Krankheitserregern verhindern und ein Auflösen der Inflammationsreaktion fördern. (Weinberger, Esfandyari et al. 2020)

## 2.6. Generierung stabiler Hoxb8 Makrophagen aus Dottersack und Knochenmark

Detaillierte Charakterisierungen von frisch isolierten Makrophagen sind durch zahlreiche Faktoren limitiert: (I) Wie bereits vorangehend erwähnt lässt sich aufgrund fehlender Zellmarker der embryonale Ursprung der Zellen nicht ohne weiteres zweifelsfrei klären, sodass man gezwungen ist komplexe Mausmodelle anzuwenden, um dieses Problem zu umgehen. (II) Makrophagen unterliegen einer ausgeprägten Anpassung an das lokale Milieu, sodass man nicht „den Makrophagen“ untersuchen kann, sondern jede Analyse organbezogen und vor dem Hintergrund des inflammatorischen Zustands durchführen muss (Davies, Jenkins et al. 2013, Gosselin, Link et al. 2014, Lavin, Winter et al. 2014). (III) Die saubere Isolation von Makrophagen aus der Maus erfordert einige Aufbereitungsschritte, die die folgenden Analysen möglicherweise beeinflusst und insgesamt nur eine Ausbeute begrenzter Zellzahlen ermöglicht. (IV) Aktuell Modelle stabiler Zelllinie für Makrophagenpopulationen beruhen daher häufig auf Tumorzelllinien, die sich teilweise nicht als das ideale Referenzmodell eignen und für Dottersackmakrophagen nicht etabliert sind. (V) Gleiches gilt für Monozyten-abstammende Kulturen, die *in vitro* zu Makrophagen differenziert werden und sich daher für Dottersackzellen nicht eignen.

All die vorangehend genannten Gründe haben uns dazu bewogen die Generierung einer stabilen Dottersackmakrophagen-Zelllinie voranzutreiben und als geeignete Referenz nach dem gleichen Modell Makrophagen aus dem Knochenmark zu erstellen. Als das ideale Modell für dieses Vorhaben hat sich das Hoxb8 System herausgestellt: Frühe EMPs bzw. Knochenmarkszellen werden mit einem retroviralen östrogenabhängigen Hoxb8 Konstrukt (ER-Hoxb8) transduziert (Wang, Calvo et al. 2006, Redecke, Wu et al. 2013, Gomez Perdiguero, Klapproth et al. 2015, Hoeffel, Chen et al. 2015). Sie erhalten dadurch die Fähigkeit unter Östrogeneinfluss persistierend Hoxb8 zu exprimieren und somit im Progenitorstadium zu verbleiben. Erst wenn Östrogen aus dem umgebenden Milieu entfernt wird, kommt es zur Differenzierung der Zellen. Insbesondere unter dem Einfluss von M-CSF können hier stabil hohe Raten an Makrophagen generiert werden. Für unser Projekt haben wir an E9.5 Progenitorzellen aus dem Dottersack isoliert, um zeitlich sicher vor dem Einsetzen der fetalen Hämatopoese zu bleiben und gleichzeitig eine ausreichend hohe Anzahl an Progenitorzellen zur Verfügung zu haben. In vergleichbarer Weise wurden Knochenmarkszellen aus 8 bis 12 Wochen alten Mäusen isoliert und diese nach dem gleichen Protokoll transduziert. (Wang, Calvo et al. 2006, Redecke, Wu et al. 2013) (Abb. 12)



**Abbildung 12: Generierung von stabilen Hoxb8 Zelllinien**

Schematische Darstellung zur Generierung stabiler Hoxb8 Zelllinien. Abbildung modifiziert aus Elhag, Stremmel et al. 2021.

Die isolierten Progenitorzellen exprimieren entsprechend ihrem Progenitorstadium KIT und noch kein CSF1R oder CX3CR1 (Abb. 13A, B). Ein ähnliches Bild zeigt sich auch nach erfolgreicher Transduktion und stabiler Kultur der Progenitorzellen über mehrere Wochen. Im undifferenzierten Vorläuferstadium ist eine Expression von Kit und Runx1 nachzuweisen, welche im Rahmen der *in vitro* Differenzierung verloren geht. Es kommt im gleichen Zuge zur typischen Expression der Makrophagenmarker Csf1r, Cx3cr1 und Lyz2 (*Lysozyme 2*) (Abb. 13C). Alle generierten Hoxb8 Zelllinien zeigen unabhängig von ihrer Herkunft aus Dottersack

oder Knochenmark eine hohe Proliferationsrate mit Verdopplungsraten von etwa 16 Stunden (Abb. 13D).



**Abbildung 13: Charakterisierung der Hoxb8 Zellen**

(A) FACS Analyse von Dottersackgewebe an E9.5 zur Detektion früher Progenitorzellen (KIT+ CX3CR1-) und beginnend differenzierenden Prämakrophagen (KIT- CX3CR1+), (B) mRNA Expressionsraten von Kit und Csf1r von Progenitorzellen und Prämakrophagen in Dottersack und Embryo. (C) mRNA Expressionslevel der angegebenen Gene in Dottersack- und Knochenmarkszellen sowohl im undifferenzierten Progenitorstadium als auch nach Differenzierung zu Makrophagen. (D) Wachstumskurve der Zellpopulation von YS und BM Progenitorzellen. Abbildung modifiziert aus Elhag, Stremmel et al. 2021.

In der Durchlichtmikroskopie konnten wir im Rahmen der Differenzierung von Knochenmarks- und Dottersackvorläufern eine rasche Zunahme der Zellpopulation mit gleichzeitig voranschreitender morphologischer Veränderung von einer kugelförmigen Vorläuferzelle zum reifen Makrophagen mit zahlreichen dendritischen Ausläufern beobachten (Abb. 14A). Diese morphologische Veränderung lässt sich auch gut in der May-Grünwald-Giemsa-Färbung nachvollziehen (Abb. 14B). Entsprechend der hohen Proliferationsrate ist immunhistochemisch ein deutliches Signal für Ki67 darstellbar. Darüber hinaus lässt sich unabhängig vom zellulären Ursprung eine Expression der Marker CX3CR1 und F4/80

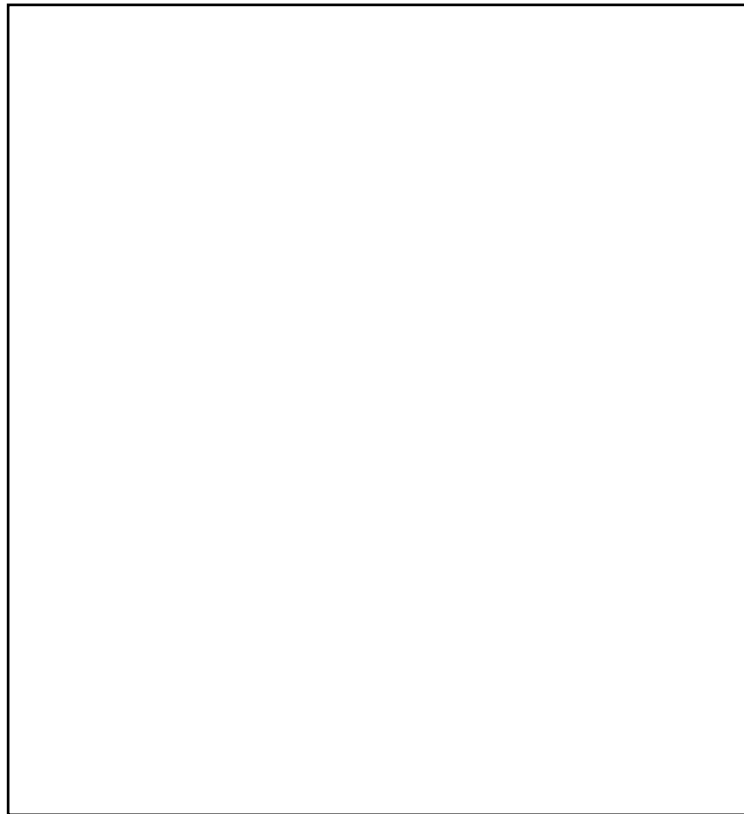
nachweisen, wie sie typisch für reife Makrophagen ist (Abb. 14C). Auch funktionell zeigen sich beide Zelllinien phagozytisch aktiv mit guten Aufnahmeraten von fluoreszierenden Zymosan-Partikeln (Abb. 14D).



**Abbildung 14: Vergleichende Differenzierungs- und Funktionsanalysen der Hoxb8 Makrophagen**

(A) Durchlichtmikroskopie von Hoxb8 Zellen aus Dottersack (YS) und Knochenmark (BM) während dem Differenzierungsvorgang. (B) May-Grünwald-Giemsa-Färbung differenzierter Hoxb8 Makrophagen. (C) Immunfluoreszenz differenzierter Hoxb8 Makrophagen für die angegebenen Marker. (D) Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen zur Visualisierung der Phagozytose nach 1h Inkubation mit pHrodo Zymosan-Biopartikeln. Maßstabsleisten sind 100  $\mu\text{m}$  (A), 20  $\mu\text{m}$  (B-D). Abbildung modifiziert aus Elhag, Stremmel et al. 2021.

Parallel zur morphologischen Differenzierung der Vorläuferzellen können wir auch in der durchflusszytometrischen Analyse eine schrittweise Ausreifung von Makrophagen nachvollziehen. So lässt sich über einen Zeitraum von 4-6 Tagen ein stetiger Anstieg der Differenzierungsmarker CD16/32, CD45, CD11B, CSF1R und F4/80 beobachten, der wiederum unabhängig vom zellulären Ursprung ist (Abb. 15A). Auch nach *in vivo* Injektion ins Peritoneum kommt es in Abwesenheit von zugeführtem Östrogen zu einer zeitlich vergleichbaren Differenzierungskinetik mit reifen Makrophagen als deutlich dominante Zellpopulation an Tag 7 (Abb. 15B, C).



**Abbildung 15: Extra- und intravitales Differenzierungsverhalten**

(A) Durchflusszytometrie der angegebenen Oberflächenmarker im zeitlichen Verlauf während der Differenzierung von Hoxb8 Makrophagen. (B) Schematische Darstellung der *in vivo* Differenzierung von Hoxb8 Zellen. (C) Quantifizierung der angegebenen Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie 7 Tage nach initialer Injektion. Abbildung modifiziert aus Elhag, Stremmel et al. 2021.

Es zeigt sich also eine gute und reproduzierbare Differenzierung innerhalb von 4-6 Tagen der Hoxb8 Vorläuferzellen zu reifen Makrophagen unabhängig von ihrer embryonalen Herkunft. Darüber hinaus ließen sich in unserem Modell keine relevanten Unterschiede in der orientierenden Analyse für klassische Makrophagenmarker auf mRNA und Proteinebene nachweisen. Beide Makrophagenpopulationen sind funktionell aktiv und zur effektiven Phagozytose von Zymosan-Partikeln fähig.

**2.7. Ursprungsabhängige Unterschiede der Makrophagenpopulationen**

Um dennoch feine Unterschiede zwischen den Zelllinien nachweisen zu können, haben wir eine detaillierte Transkriptom- und Proteomanalyse durchgeführt. Dabei zeigte sich eine deutlich erhöhte mRNA Expression von Pycard (*PYD and CARD domain containing*) und Ripk3 (*Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*) in Makrophagen aus dem Knochenmark gegenüber dem Dottersack als Hinweis für eine vorwiegend M1-ähnliche



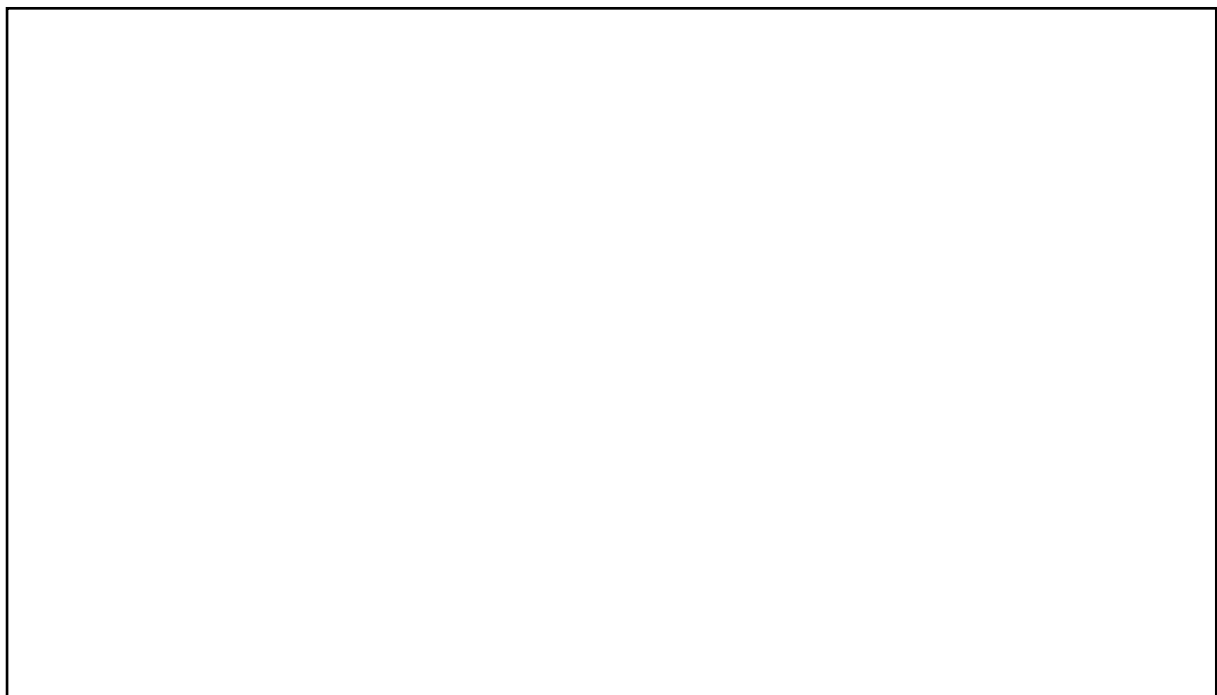
inflammatorische Prägung mit Involvierung des Inflammasom-Signalwegs. Passend dazu zeigten sich auch *Cxcl* (*CXC-motif chemokine ligand*) 10 und *Cxcl11* sowie *Nos2* (*Nitric oxide synthase 2*) deutlich hochreguliert. Darüber hinaus fanden wir auch eine erhöhte Expression Apoptose-assoziiierter Gene wie Transglutaminase 2 (*Tgm2*) und *Fam129a*. Letzteres Gen kodiert für das Protein Niban, welches erst kürzlich als charakteristisch für eine Makrophagensubpopulation mit mutmaßlichem Ursprung aus dem Knochenmark in humanen atherosklerotischen Plaques identifiziert werden konnte (Winkels, Ehinger et al. 2018) (Abb. 15A).

Im Gegensatz dazu weisen *Hoxb8* Makrophagen aus dem Dottersack eine erhöhte Expression von Clusterin auf, was mit Matrix-Reorganisation und der Beseitigung apoptotischer Zellen in Verbindung gebracht wurde – Funktionen, die auf ein M2-ähnliches Zellverhalten im Sinne der Gewebemöostase hinweisen (Shim, Kang et al. 2011, Cunin, Beauvillain et al. 2016). Auf Proteinebene wurde Clusterin zudem als Bindungspartner von *TREM2* (*Triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) identifiziert. Interessanterweise, wird *TREM2* aktuell als potenzieller Marker für eine dem Dottersack abstammende Makrophagensubpopulation diskutiert und weist hohe Expressionsspiegel in den Mikrogliazellen des Gehirns auf, die ausschließlich aus dem Dottersack abstammen (Turnbull, Gilfillan et al. 2006, Ginhoux, Greter et al. 2010, Yeh, Hansen et al. 2017). In dieses Bild passt auch eine erhöhte Expression von *SALL* (*Sal-like proteins*) 1 und 3, die ebenfalls mit der Entwicklung von Mikrogliazellen in Verbindung gebracht wurden (Mass, Ballesteros et al. 2016). Es zeigt sich weiterhin eine gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors *Mafb*, der eine anti-inflammatorische Polarisierung sowie die Cholesterin-Ausschleusung der Zelle begünstigt (Kim 2017). Abschließend ist noch eine deutliche Expressionssteigerung von *Mtus2* (*Microtubule-associated tumor suppressor candidate 2*) zu erwähnen – ein Protein, welches als Interaktionspartner von M-CSF identifiziert wurde (Luck, Kim et al. 2020). (Abb. 16A)

Auch auf Proteinebene lassen sich neben großflächigen Überschneidungen der beiden Zelllinien interessante ursprungsabhängige Unterschiede zwischen den Zellen nachweisen. Wie bereits für das Transkriptom gezeigt, weisen Knochenmarksmakrophagen auch im Proteom signifikant höhere Expressionspiegel für *PYCARD*, *RIPK3*, *TGM2* und *FAM129A* auf. Darüber hinaus zeigt auch *ICAM1* (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), welches eine entscheidende Rolle bei der Leukozytenmigration spielt, eine gesteigerte Expression in Knochenmarkszellen. Des Weiteren weisen auch die Proteine Lipoprotein Lipase (*LPL*), *BIN1*

(*Myc box-dependent-interacting protein 1*), OSBP (*Oxysterol-binding protein 1*) und LRRC59 (*Leucine-rich repeat-containing protein 59*) eine erhöhte Expression in Hoxb8 Knochenmarkzellen auf. Nach LPS-Stimulation konnten in Knochenmarkszellen zusätzliche überexprimierte Proteine identifiziert werden: Neben SQSTM1 (*Sequestosome-1*), welches mit Autophagie assoziiert wird, war dies in erster Linie CD14, welches gemeinsam mit TLR4, eine bedeutende Rolle in der inflammatorischen M1-ähnlichen Antwort von Makrophagen nach LPS-Stimulation spielt (Wright, Ramos et al. 1990). (Abb. 16B)

Die Dottersackzellen dagegen waren auf Proteinebene durch eine erhöhte Expression von F5 (*Coagulation factor 5*), GALNS (*Lysosomal protein galactosamine (N-acetyl)-6-sulfatase*) und ADPGK (*ADP-dependent glucokinase*) geprägt. CHIL3 ist ein Protein welches mit alternativ aktivierten Makrophagen assoziiert ist. Interessanterweise ist es in Ruhebedingungen erhöht in Knochenmarksmakrophagen exprimiert, gehört jedoch nach LPS-Stimulation zu den Top 10 hochregulierten Proteinen der Dottersackzellen. ACOD1 (*Aconitate decarboxylase 1*) war sowohl im Transkriptom als auch im Proteom in Dottersackmakrophagen erhöht exprimiert und wird als Regulator des Immunmetabolismus unter inflammatorischen Bedingungen betrachtet (Wu, Chen et al. 2020). (Abb. 16B)



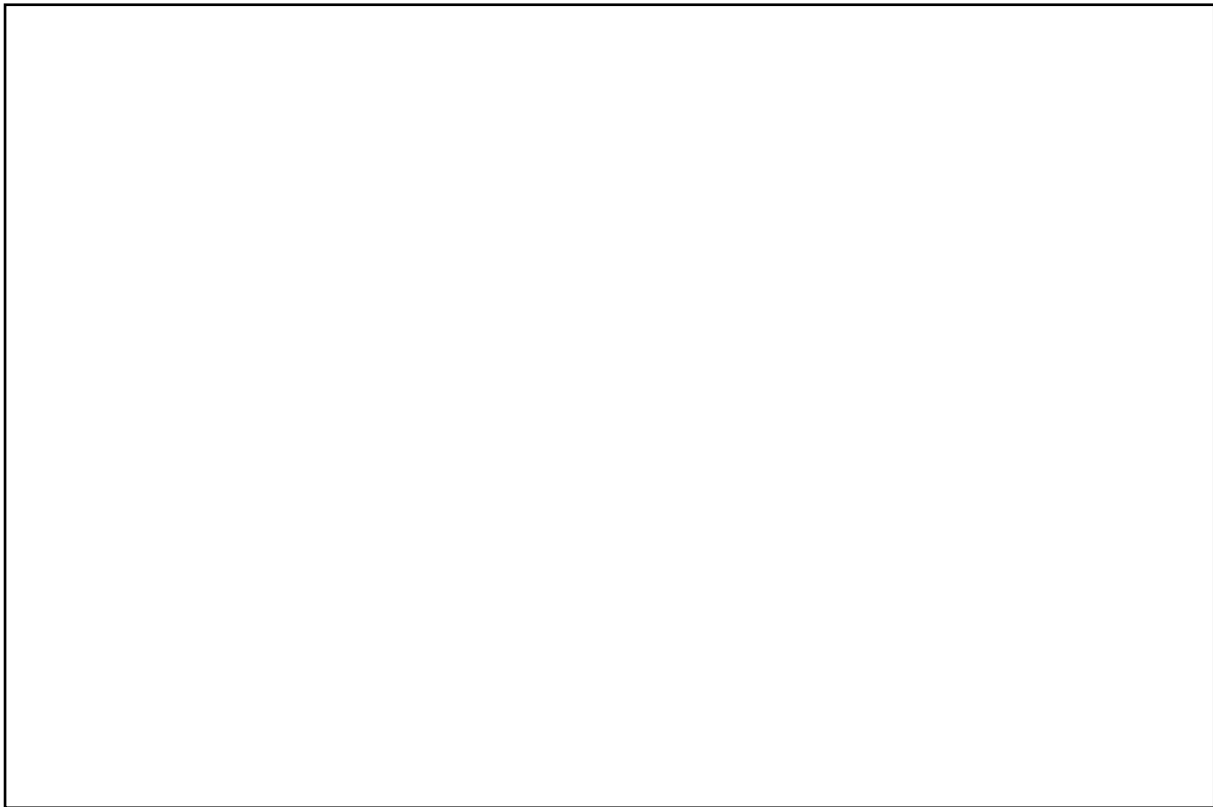
**Abbildung 16: Transkriptom und Proteom zeigen ursprungsabhängige Unterschiede**

(A) Transkriptom selektierter Gene differenzierter Hoxb8 Makrophagen. (B) Proteom differenzierter Hoxb8 Makrophagen aus dem Knochenmark gegenüber dem Dottersack. Abbildung modifiziert aus Elhag, Stremmel et al. 2021.

Nachdem die Transkriptom- und Proteomuntersuchungen sowie weitergehende *Gene Set Enrichment* Analysen (GSEA) Hinweise auf mögliche Unterscheide im Zellmetabolismus geliefert haben, wollten wir diese im Rahmen von Seahorse Untersuchung weitergehend aufschlüsseln. Dabei imponierte eine gesteigerte glykolytische Aktivität der Knochenmarksmakrophagen sowohl in Ruhe als auch nach IL4- bzw. LPS-Stimulation. Insgesamt zeigen Knochenmarksmakrophagen eine global höhere metabolische Aktivität sowie einen verstärkten Wechsel von oxidativer Phosphorylierung zur Glykolyse nach LPS-Stimulation (Abb. 17A). Es ergibt sich somit auch auf metabolischer Ebene ein Bild, welches Makrophagen aus dem Knochenmark gegenüber solchen aus dem Dottersack eine gesteigerte inflammatorische Aktivität zuschreibt.

Dies ist auch im Einklang mit der gesteigerten Expression von Proteinen des NLRP3 Inflammasoms. Im Rahmen des kanonischen Signalwegs aktivieren zytosolische Muster-Erkennungs-Rezeptoren Caspase-1 (CASP-1), was in der Folge zur Freisetzung von IL1 $\beta$ , IL18 und Gasdermin D führt. Typischerweise wird dieser kanonische Teil des Signalwegs durch Kristallstimulation aktiviert und entsprechend untersucht. Dabei können beispielsweise Monosodiumurat (MSU)- oder Cholesterinkristalle verwendet werden. Für ein eindeutiges Signal werden die zu untersuchenden Zellen dabei mit LPS vorbehandelt. Demgegenüber erfolgt die nicht-kanonische Inflammasomaktivierung durch beispielsweise äußere Membranvesikel gramnegativer Bakterien wie *E. coli*, die über zytosolisches LPS zu einer Caspase-11 (CASP11)-Aktivierung führen. (Duewell, Kono et al. 2010, Vanaja, Russo et al. 2016)

Knochenmarksmakrophagen haben nach LPS-Vorbehandlung unter MSU-Kristallstimulation eine deutliche IL1 $\beta$  Sekretion aufgewiesen, welche in Dottersackmakrophagen nahezu komplett fehlte. Ähnliche Beobachtungen konnten wir nach Stimulation mit äußeren Membranvesikeln von *E. coli* machen. Um die Spezifität des Signalwegs zu zeigen, haben wir zudem CASP1/11-Knockout-Knochenmarksmakrophagen generiert, in denen – wie erwartet – die Inflammasom-vermittelte IL1 $\beta$  Sekretion ausblieb (Abb. 17B). Auch im Rahmen weitergehender Western Blot-Untersuchungen konnten wir die vorangehend genannten Befunde bestätigen und die Beteiligung weiterer Proteine des Inflammasom-Signalwegs nachweisen (Abb. 17C, D).



**Abbildung 17: Metabolismus und Inflammasom**

(A) Extrazelluläre Ansäuerungsrate (ECAR) aufgetragen gegen die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR), um globale Veränderungen des Zellmetabolismus zu visualisieren. (B) IL1 $\beta$  Expressionsanalyse mittels ELISA in LPS-vorbehandelten Monosodiumurat (MSU)-Kristall-stimulierten Hoxb8 Makrophagen. (C) Western Blot der angegebenen Zelllinien und Proteine nach Stimulation mit 250  $\mu$ g/ml MSU-Kristalle sowie (D) die korrespondierende Quantifizierung. Statistische Analysen wurden durch einseitige ANOVA mit post-hoc Bonferroni Korrektur für multiple Vergleiche durchgeführt. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*)  $p < 0.05$ . Abbildung modifiziert aus Elhag, Stremmel et al. 2021.

### 3. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Habilitationsarbeit konnten Dottersackmakrophagen erstmals intravital visualisiert werden und somit bedeutende Informationen über ihre zellulären Eigenschaften und Funktionen, insbesondere in Abgrenzung zu Makrophagen aus dem Knochenmark, generiert werden. Wir konnten zeigen, dass im embryonalen Dottersack ab etwa Tag E8.5 EMPs bzw. Makrophagenvorläufer unabhängig von der fetalen Hämatopoese entstehen und im adulten Organismus erhalten bleiben. Zudem ist es uns durch intravitale Untersuchungen gelungen die transvaskuläre Migration der frühen Makrophagen direkt darzustellen und ihr einen klar begrenzten Zeitraum zuzuordnen: Nach einem Maximum der Zelldichte an E10.5 kommt es bis E12.5 zu einer deutlichen Abnahme intravaskulärer Zellen, bevor ab E14.5 keine Prämakrophagen mehr im Blutstrom nachweisbar sind.

Für einen detaillierten zellbiologischen Vergleich der Makrophagen in Abhängigkeit von ihrem zellulären Ursprung haben wir mit Hilfe des Hoxb8 Modells stabile Zelllinien generiert. Wir konnten so beeinflussende Umgebungsfaktoren eliminieren und einen gezielten Vergleich der zellulären Eigenschaften durchführen. Dabei hat sich zunächst gezeigt, dass beide Makrophagenpopulationen sich sowohl morphologisch als auch in der Expression etablierter Oberflächenmarker weitgehend ähnlich sind und beide Populationen effektiv phagozytieren können. Erst eine tiefergehende Untersuchung einschließlich Transkriptom- und Proteomanalysen sowie daraus abgeleitete funktionelle Experimente, haben es ermöglicht entscheidende Unterschiede in Abhängigkeit der Herkunft aufzuschlüsseln.

Knochenmarksmakrophagen besitzen einen pro-inflammatorischen Phänotyp und sind als M1-ähnlich zu klassifizieren. In diesem Sinne exprimieren sie Proteine wie CD14 (LPS Co-Rezeptor), PYCARD (Inflammasom), RIPK3 (Nekrosom) und SQSTM1 (Autophagie). Auch ihr metabolischer Phänotyp ist mit einer erhöhten glykolytischen Aktivität eher inflammatorisch geprägt. Dottersackmakrophagen sind eher anti-inflammatorische Eigenschaften im Sinne der Homöostase zuzuschreiben. Sie exprimieren beispielsweise CHIL3 und zeigen eine deutlich abgeschwächte Inflammasom-Aktivierung und daraus folgend eine ebenfalls reduzierte IL1 $\beta$  Sekretion. Biologisch gesehen sind diese anti-inflammatorischen Eigenschaften für den heranwachsenden Embryo von entscheidender Bedeutung: So spielen Makrophagen beispielsweise eine entscheidende Rolle bei der Organentwicklung und Angiogenese, bei denen pro-inflammatorische Eigenschaften eine eher untergeordnete Bedeutung haben (Lichanska and Hume 2000, Fantin, Vieira et al. 2010). Es ist auch denkbar, dass die reduzierte Inflammasom-Aktivität von Dottersackmakrophagen im Sinne der Immuntoleranz für Nahrungsantigene oder Bestandteile der physiologischen Bakterienflora entscheidend ist (Pellegrini, Antonioli et al. 2017). Unsere Ergebnisse sind im Einklang mit einer kürzlich publizierten Studie, die eine reduzierte Expression NLRP3 Inflammasom-assoziiierter Gene in Dottersackmakrophagen im Vergleich zu fetalen Leberzellen nachgewiesen hat (Lakhdari, Yamamura et al. 2019).

Es gibt also hinreichende Evidenz, dass Makrophagen nicht nur einen dualen embryonalen Ursprung haben, sondern dieser auch in der weiteren Entwicklung von Relevanz für die Eigenschaften verschiedener Makrophagenpopulationen ist. Während Makrophagen aus dem Knochenmark inflammatorisch M1-ähnlich geprägt sind, sind Dottersackmakrophagen in M2-ähnlicher Art und Weise für die Gewebemöostase verantwortlich. Auch wenn die

Funktionen zumindest partiell gegenseitig übernommen werden können, so scheint die embryonale Prägung dennoch eine bedeutende Rolle zu spielen. Beispielhaft sei hier erwähnt, dass PYCARD konstitutiv exprimiert wird und es zu keiner Beeinflussung durch inflammatorische Signale kommt, sondern das zellintrinsische Programm entscheidend ist (Christgen, Place et al. 2020).

Wir wissen heute, dass in atheroskerotischen Plaques mehrere Subpopulationen von Makrophagen nachweisbar sind, die einen unterschiedlichen embryonalen Ursprung haben. Daten von uns und anderen Arbeitsgruppen legen nahe, dass es auch hier vorwiegend pro-inflammatorisch und vorwiegend anti-inflammatorisch ausgerichtete Zellpopulationen gibt. Wenn es uns gelingt, diese Subpopulationen in Zukunft gezielt zu modifizieren, so können wir potenziell Krankheiten wie die Atherosklerose gezielt behandeln, ohne die Patienten gleichzeitig einem erhöhten Infektionsrisiko auszusetzen.

Erste Therapieansätze in diese Richtung wurden bereits in großen kardiologischen Studien erprobt. So wurde im Rahmen der CANTOS Studie (Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcome Study) ein monoklonaler Antikörper gegen IL1 $\beta$  eingesetzt. Dieser konnte die kardiovaskulären Ereignisse einschließlich der Myokardinfarkte signifikant reduzieren. Auch Statine wird neben dem Cholesterin-senkenden Effekt eine anti-inflammatorische Wirkung zugeschrieben. Und nicht zuletzt, wurde im Rahmen der LoDoCo (Low Dose Cholesterin for Secondary Prevention of Cardiovascular Disease) Studie die anti-inflammatorische Wirkung von Cholesterin erfolgreich genutzt, um kardiovaskuläre Ereignisse zu reduzieren (Nidorf, Eikelboom et al. 2013, Ridker, Everett et al. 2017, Stremmel, Stark et al. 2019). In zukünftigen Forschungsarbeiten wird es daher ein vorrangiges Ziel sein Makrophagenpopulationen noch besser zu charakterisieren, um darauf abbauend sehr gezielte therapeutische Interventionen einsetzen zu können.

Ein weiterer Aspekt, der in den letzten Jahren zunehmend in den wissenschaftlichen Fokus gerät, betrifft die sogenannte klonale Hämatopoese von unbestimmtem Potential (CHIP). Es wurden gehäufte somatische Mutationen der Gene TET2 (*Tet methylcytosine dioxygenase 2*), DNMT3A (*DNA methyltransferase 3  $\alpha$* ), und ASXL1 (*Additional sex combs like transcriptional regulator 1*) beobachtet, die zu einer klonalen Hämatopoese führen ohne jedoch zwingend eine maligne hämatologische Erkrankung auszulösen. In der Population der über 70-jährigen beträgt die Rate der vorangehend genannten Mutationen etwa 10%. Forscher konnten nun zeigen, dass diese Mutationen zu einer erhöhten Rate an kardiovaskulären Ereignissen führen

(Jaiswal, Fontanillas et al. 2014, Jaiswal, Natarajan et al. 2017). So ist das Risiko für einen Myokardinfarkt bei Mutationsträgern um Faktor 4 erhöht (Jaiswal, Natarajan et al. 2017). Mechanistisch ist diese Beobachtung auf eine erhöhte Aktivität des Inflammasoms in TET2-defizienten Makrophagen zurückzuführen, was wiederum eine gesteigerte IL1 $\beta$  Freisetzung zur Folge hat (Fuster, MacLauchlan et al. 2017, Jaiswal, Natarajan et al. 2017). Dieser pro-inflammatorische Phänotyp begünstigt sodann das Fortschreiten der Atherosklerose. Interessanterweise hat eine bisher unveröffentlichte Subgruppenanalyse der CANTOS Studie in diesem Sinne gezeigt, dass 8,8% der Studienteilnehmer eine CHIP Mutation (vorwiegend TET2) aufgewiesen haben. In dieser Subgruppe zeigte sich die IL1 $\beta$  Inhibition durch Canakinumab besonders effektiv (Svensson, Madar et al. 2018).

Zusammenfassend zeigt sich somit eine breite wissenschaftliche Datenlage, die die Entstehung atherosklerotischer Plaques als inflammatorische Reaktion betrachtet, die unterschiedliche Makrophagensubpopulationen mit spezifischen Funktionen einschließt. Es liegt der Gedanke nahe, dass es im Alter oder durch somatische Mutationen zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Subpopulationen unter den Makrophagen kommt, was eine rasche Progredienz der Atherosklerose zur Folge hat. Ein tiefergehendes Verständnis der einzelnen Populationen und deren Modulationsmöglichkeiten wird daher ein essenzieller Bestandteil zukünftiger Therapien sein.

## 4. Abkürzungsverzeichnis

ACOD1	Aconitate decarboxylase 1
ADPGK	ADP-dependent glucokinase
AGM	Aorto-Gonado-Mesonephros
ARG1	Arginase 1
ASXL1	Additional sex combs like transcriptional regulator 1
BIN1	Myc box-dependent-interacting protein 1
BM	Knochenmark
CANTOS	Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcome Study
CASP	Caspase
CCL	CC-chemokine ligand
CD	Cluster of differentiation
CHIL3/ YM1	Chitinase-like Protein 3
CHIP	Klonale Hämatopoese von unbestimmtem Potential
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1
CXCL	CXC-motif chemokine ligand
DAMPs	Schaden-assoziierte molekulare Muster
DNMT3A	DNA methyltransferase 3 $\alpha$
E7	Tag 7 der Embryonalentwicklung
EAR2	Eosinophil cationic protein 2 precursor
ECAR	Extratelluläre Ansäuerungsrate
EMPs	Erythromyeloide Progenitorzellen
ER	Östrogenrezeptor
eYFP	Verstärkt gelb fluoreszierendes Protein
F4/80/ ADGRE1/ EMR1	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1
F5	Coagulation factor 5
FAM129A	Niban-codierendes Gen
FIZZ1/ RETNLA	Resistin-like $\alpha$
FL	Fetale Leber
GALNS	Lysosomal protein galactosamine (N-acetyl)-6-sulfatase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GSEA	Gene Set Enrichment Analysen
Hoxb8	Homeobox protein Hox-B8
i.p.	intraperitoneal
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL	Interleukin
(i)NOS	(induzierbare) Stickoxid Synthase
IQR	Interquartilsabstand
LoDoCo	Low Dose Cholchicine for Secondary Prevention of Cardiovascular Disease
LPL	Lipoprotein Lipase
LPS	Lipopolysaccharide
LRRC59	Leucine-rich repeat-containing protein 59



LYVE1	Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1
LYZ2	Lysozyme 2
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MRC1/ CD206	Mannose Rezeptor Typ 1
MSU	Monosodiumurat
MTUS2	Microtubule-associated tumor suppressor candidate 2
MX1	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	Nod-like Receptor
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3
NO	Stickoxid
OCR	Sauerstoffverbrauchsrate
OH-TAM	Hydroxytamoxifen
OSBP	Oxysterol-binding protein 1
oxLDL	Oxidiertes Low-density Lipoprotein
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
Poly(I:C)	Polyinosinsäure:Polycytidylsäure
PTPRC/ CD45	Protein tyrosine phosphatase receptor type C
PYCARD/ ASC	PYD and CARD domain containing
RIPK3	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SALL	Sal-like proteins
SQSTM1	Sequestosome-1
TET2	Tet methylcytosine dioxygenase 2
TGF	Transforming growth factor
TGM2	Transglutaminase 2
TLR2	Toll-like receptor 2
TNF	Tumornekrosefaktor
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
YS	Dottersack

## 5. Verzeichnis der in der Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen

**Stremmel C**, Schuchert R, Wagner F, Thaler R, Weinberger T, Pick R, Mass E, Ishikawa-Ankerhold HC, Margraf A, Hutter S, Vagnozzi R, Klapproth S, Frampton J, Yona S, Scheiermann C, Molkentin JD, Jeschke U, Moser M, Sperandio M, Massberg S, Geissmann F, Schulz C. Yolk sac macrophage progenitors traffic to the embryo during defined stages of development. *Nat Commun.* 2018 Jan 8;9(1):75. doi: 10.1038/s41467-017-02492-2.

**Stremmel C\***, Schuchert R\*, Schneider V, Weinberger T, Thaler R, Messerer D, Helmer S, Geissmann F, Frampton J, Massberg S, Schulz C. Inducible disruption of the c-myb gene allows allogeneic bone marrow transplantation without irradiation. *J Immunol Methods.* 2018 Jun;457:66-72. doi: 10.1016/j.jim.2018.03.016. Epub 2018 Apr 6.

**Stremmel C**, Stark K, Schulz C. Heterogeneity of Macrophages in Atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2019 Aug;119(8):1237-1246. doi: 10.1055/s-0039-1692665. Epub 2019 Jun 26.

Weinberger T, Esfandyari D, Messerer D, Percin G, Schleifer C, Thaler R, Liu L, **Stremmel C**, Schneider V, Vagnozzi RJ, Schwanenkamp J, Fischer M, Busch K, Klapproth K, Ishikawa-Ankerhold H, Klösges L, Titova A, Molkentin JD, Kobayashi Y, Engelhardt S, Massberg S, Waskow C, Perdiguero EG, Schulz C. Ontogeny of arterial macrophages defines their functions in homeostasis and inflammation. *Nat Commun.* 2020 Sep 11;11(1):4549. doi: 10.1038/s41467-020-18287-x.

Elhag S\*, **Stremmel C\***, Zehrer A, Plocke J, Hennel R, Keuper M, Knabe C, Winterhalter J, Gölling V, Tomas L, Weinberger T, Fischer M, Liu L, Wagner F, Lorenz M, Stark K, Häcker H, Schmidt-Supprian M, Völker U, Jastroch M, Lauber K, Straub T, Walzog B, Hammer E, Schulz C. Differences in Cell-Intrinsic Inflammatory Programs of Yolk Sac and Bone Marrow Macrophages. *Cells.* 2021 Dec 17;10(12):3564. doi: 10.3390/cells10123564.

\* geteilte Erstautorenschaft

## 6. Literaturverzeichnis

Bertrand, J. Y., N. C. Chi, B. Santoso, S. Teng, D. Y. Stainier and D. Traver (2010). "Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development." *Nature* **464**(7285): 108-111.

Bobryshev, Y. V., E. A. Ivanova, D. A. Chistiakov, N. G. Nikiforov and A. N. Orekhov (2016). "Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis." *Biomed Res Int* **2016**: 9582430.

Boisset, J. C., W. van Cappellen, C. Andrieu-Soler, N. Galjart, E. Dzierzak and C. Robin (2010). "In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium." *Nature* **464**(7285): 116-120.

Chistiakov, D. A., Y. V. Bobryshev, N. G. Nikiforov, N. V. Elizova, I. A. Sobenin and A. N. Orekhov (2015). "Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: The associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes." *Int J Cardiol* **184**: 436-445.

Christgen, S., D. E. Place and T. D. Kanneganti (2020). "Toward targeting inflammasomes: insights into their regulation and activation." *Cell Res* **30**(4): 315-327.

Cochain, C., E. Vafadarnejad, P. Arampatzi, J. Pelisek, H. Winkels, K. Ley, D. Wolf, A. E. Saliba and A. Zerneck (2018). "Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis." *Circ Res* **122**(12): 1661-1674.

Cole, J. E., I. Park, D. J. Ahern, C. Kassiteridi, D. Danso Abeam, M. E. Goddard, P. Green, P. Maffia and C. Monaco (2018). "Immune cell census in murine atherosclerosis: cytometry by time of flight illuminates vascular myeloid cell diversity." *Cardiovasc Res* **114**(10): 1360-1371.

Cumano, A. and I. Godin (2007). "Ontogeny of the hematopoietic system." *Annu Rev Immunol* **25**: 745-785.

Cunin, P., C. Beauvillain, C. Miot, J. F. Augusto, L. Preisser, S. Blanchard, P. Pignon, M. Scotet, E. Garo, I. Fremaux, A. Chevailler, J. F. Subra, P. Blanco, M. R. Wilson, P. Jeannin and Y. Delneste (2016). "Clusterin facilitates apoptotic cell clearance and prevents apoptotic cell-induced autoimmune responses." *Cell Death Dis* **7**: e2215.

Davies, L. C., S. J. Jenkins, J. E. Allen and P. R. Taylor (2013). "Tissue-resident macrophages." *Nat Immunol* **14**(10): 986-995.

Duewell, P., H. Kono, K. J. Rayner, C. M. Sirois, G. Vladimer, F. G. Bauernfeind, G. S. Abela, L. Franchi, G. Nunez, M. Schnurr, T. Espevik, E. Lien, K. A. Fitzgerald, K. L. Rock, K. J. Moore, S. D. Wright, V. Hornung and E. Latz (2010). "NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals." *Nature* **464**(7293): 1357-1361.

Elhag, S., C. Stremmel, A. Zehrer, J. Plocke, R. Hennel, M. Keuper, C. Knabe, J. Winterhalter, V. Golling, L. Tomas, T. Weinberger, M. Fischer, L. Liu, F. Wagner, M. Lorenz, K. Stark, H. Hacker, M. Schmidt-Supprian, U. Volker, M. Jastroch, K. Lauber, T. Straub, B. Walzog, E. Hammer and

C. Schulz (2021). "Differences in Cell-Intrinsic Inflammatory Programs of Yolk Sac and Bone Marrow Macrophages." Cells **10**(12).

Ensan, S., A. Li, R. Besla, N. Degousee, J. Cosme, M. Roufaiel, E. A. Shikatani, M. El-Maklizi, J. W. Williams, L. Robins, C. Li, B. Lewis, T. J. Yun, J. S. Lee, P. Wieghofer, R. Khattar, K. Farrokhi, J. Byrne, M. Ouzounian, C. C. Zavitz, G. A. Levy, C. M. Bauer, P. Libby, M. Husain, F. K. Swirski, C. Cheong, M. Prinz, I. Hilgendorf, G. J. Randolph, S. Epelman, A. O. Gramolini, M. I. Cybulsky, B. B. Rubin and C. S. Robbins (2016). "Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1(+) precursors and circulating monocytes immediately after birth." Nat Immunol **17**(2): 159-168.

Epelman, S., K. J. Lavine and G. J. Randolph (2014). "Origin and functions of tissue macrophages." Immunity **41**(1): 21-35.

Fantin, A., J. M. Vieira, G. Gestri, L. Denti, Q. Schwarz, S. Prykhozhiy, F. Peri, S. W. Wilson and C. Ruhrberg (2010). "Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction." Blood **116**(5): 829-840.

Fischer-Riepe, L., N. Daber, J. Schulte-Schrepping, B. C. Veras De Carvalho, A. Russo, M. Pohlen, J. Fischer, A. I. Chasan, M. Wolf, T. Ulas, S. Glander, C. Schulz, B. Skryabin, A. Wollbrink Dipl-Ing, N. Steingraeber, C. Stremmel, M. Koehle, F. Gartner, S. Vettorazzi, D. Holzinger, J. Gross, F. Rosenbauer, M. Stoll, S. Niemann, J. Tuckermann, J. L. Schultze, J. Roth and K. Barczyk-Kahlert (2020). "CD163 expression defines specific, IRF8-dependent, immune-modulatory macrophages in the bone marrow." J Allergy Clin Immunol **146**(5): 1137-1151.

Fuster, J. J., S. MacLauchlan, M. A. Zuriaga, M. N. Polackal, A. C. Ostriker, R. Chakraborty, C. L. Wu, S. Sano, S. Muralidharan, C. Rius, J. Vuong, S. Jacob, V. Muralidhar, A. A. Robertson, M. A. Cooper, V. Andres, K. K. Hirschi, K. A. Martin and K. Walsh (2017). "Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice." Science **355**(6327): 842-847.

Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M. F. Mehler, S. J. Conway, L. G. Ng, E. R. Stanley, I. M. Samokhvalov and M. Merad (2010). "Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages." Science **330**(6005): 841-845.

Ginhoux, F. and S. Jung (2014). "Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis." Nat Rev Immunol **14**(6): 392-404.

Gomez Perdiguero, E., K. Klapproth, C. Schulz, K. Busch, E. Azzoni, L. Crozet, H. Garner, C. Trouillet, M. F. de Bruijn, F. Geissmann and H. R. Rodewald (2015). "Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors." Nature **518**(7540): 547-551.

Gosselin, D., V. M. Link, C. E. Romanoski, G. J. Fonseca, D. Z. Eichenfield, N. J. Spann, J. D. Stender, H. B. Chun, H. Garner, F. Geissmann and C. K. Glass (2014). "Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities." Cell **159**(6): 1327-1340.

Hashimoto, D., A. Chow, C. Noizat, P. Teo, M. B. Beasley, M. Leboeuf, C. D. Becker, P. See, J. Price, D. Lucas, M. Greter, A. Mortha, S. W. Boyer, E. C. Forsberg, M. Tanaka, N. van Rooijen,

A. Garcia-Sastre, E. R. Stanley, F. Ginhoux, P. S. Frenette and M. Merad (2013). "Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes." *Immunity* **38**(4): 792-804.

Hoeffel, G., J. Chen, Y. Lavin, D. Low, F. F. Almeida, P. See, A. E. Beaudin, J. Lum, I. Low, E. C. Forsberg, M. Poidinger, F. Zolezzi, A. Larbi, L. G. Ng, J. K. Chan, M. Greter, B. Becher, I. M. Samokhvalov, M. Merad and F. Ginhoux (2015). "C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages." *Immunity* **42**(4): 665-678.

Jaiswal, S., P. Fontanillas, J. Flannick, A. Manning, P. V. Grauman, B. G. Mar, R. C. Lindsley, C. H. Mermel, N. Burt, A. Chavez, J. M. Higgins, V. Moltchanov, F. C. Kuo, M. J. Kluk, B. Henderson, L. Kinnunen, H. A. Koistinen, C. Ladenvall, G. Getz, A. Correa, B. F. Banahan, S. Gabriel, S. Kathiresan, H. M. Stringham, M. I. McCarthy, M. Boehnke, J. Tuomilehto, C. Haiman, L. Groop, G. Atzmon, J. G. Wilson, D. Neuberg, D. Altshuler and B. L. Ebert (2014). "Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes." *N Engl J Med* **371**(26): 2488-2498.

Jaiswal, S., P. Natarajan, A. J. Silver, C. J. Gibson, A. G. Bick, E. Shvartz, M. McConkey, N. Gupta, S. Gabriel, D. Ardissino, U. Baber, R. Mehran, V. Fuster, J. Danesh, P. Frossard, D. Saleheen, O. Melander, G. K. Sukhova, D. Neuberg, P. Libby, S. Kathiresan and B. L. Ebert (2017). "Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease." *N Engl J Med* **377**(2): 111-121.

Kanitakis, J., E. Morelon, P. Petruzzo, L. Badet and J. M. Dubernard (2011). "Self-renewal capacity of human epidermal Langerhans cells: observations made on a composite tissue allograft." *Exp Dermatol* **20**(2): 145-146.

Kanitakis, J., P. Petruzzo and J. M. Dubernard (2004). "Turnover of epidermal Langerhans' cells." *N Engl J Med* **351**(25): 2661-2662.

Kim, H. (2017). "The transcription factor MafB promotes anti-inflammatory M2 polarization and cholesterol efflux in macrophages." *Sci Rep* **7**(1): 7591.

Kissa, K. and P. Herbomel (2010). "Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition." *Nature* **464**(7285): 112-115.

Lakhdari, O., A. Yamamura, G. E. Hernandez, K. K. Anderson, S. J. Lund, G. O. Oppong-Nonterah, H. M. Hoffman and L. S. Prince (2019). "Differential Immune Activation in Fetal Macrophage Populations." *Sci Rep* **9**(1): 7677.

Lavin, Y., D. Winter, R. Blecher-Gonen, E. David, H. Keren-Shaul, M. Merad, S. Jung and I. Amit (2014). "Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment." *Cell* **159**(6): 1312-1326.

Lichanska, A. M. and D. A. Hume (2000). "Origins and functions of phagocytes in the embryo." *Exp Hematol* **28**(6): 601-611.

Luck, K., D. K. Kim, L. Lambourne, K. Spirohn, B. E. Begg, W. Bian, R. Brignall, T. Cafarelli, F. J. Campos-Laborie, B. Charlotteaux, D. Choi, A. G. Cote, M. Daley, S. Deimling, A. Desbuleux, A. Dricot, M. Gebbia, M. F. Hardy, N. Kishore, J. J. Knapp, I. A. Kovacs, I. Lemmens, M. W. Mee, J.

C. Mellor, C. Pollis, C. Pons, A. D. Richardson, S. Schlabach, B. Teeking, A. Yadav, M. Babor, D. Balcha, O. Basha, C. Bowman-Colin, S. F. Chin, S. G. Choi, C. Colabella, G. Coppin, C. D'Amata, D. De Ridder, S. De Rouck, M. Duran-Frigola, H. Ennajaoui, F. Goebels, L. Goehring, A. Gopal, G. Haddad, E. Hatchi, M. Helmy, Y. Jacob, Y. Kassa, S. Landini, R. Li, N. van Lieshout, A. MacWilliams, D. Markey, J. N. Paulson, S. Rangarajan, J. Rasla, A. Rayhan, T. Rolland, A. San-Miguel, Y. Shen, D. Sheykhkarimli, G. M. Sheynkman, E. Simonovsky, M. Tasan, A. Tejada, V. Tropepe, J. C. Twizere, Y. Wang, R. J. Weatheritt, J. Weile, Y. Xia, X. Yang, E. Yeger-Lotem, Q. Zhong, P. Aloy, G. D. Bader, J. De Las Rivas, S. Gaudet, T. Hao, J. Rak, J. Tavernier, D. E. Hill, M. Vidal, F. P. Roth and M. A. Calderwood (2020). "A reference map of the human binary protein interactome." *Nature* **580**(7803): 402-408.

Martinez, F. O. and S. Gordon (2014). "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment." *F1000Prime Rep* **6**: 13.

Mass, E., I. Ballesteros, M. Farlik, F. Halbritter, P. Gunther, L. Crozet, C. E. Jacome-Galarza, K. Handler, J. Klughammer, Y. Kobayashi, E. Gomez-Perdiguero, J. L. Schultze, M. Beyer, C. Bock and F. Geissmann (2016). "Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis." *Science* **353**(6304).

McNelis, J. C. and J. M. Olefsky (2014). "Macrophages, immunity, and metabolic disease." *Immunity* **41**(1): 36-48.

Murray, P. J. and T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." *Nat Rev Immunol* **11**(11): 723-737.

Nidorf, S. M., J. W. Eikelboom, C. A. Budgeon and P. L. Thompson (2013). "Low-dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease." *J Am Coll Cardiol* **61**(4): 404-410.

Pellegrini, C., L. Antonioli, G. Lopez-Castejon, C. Blandizzi and M. Fornai (2017). "Canonical and Non-Canonical Activation of NLRP3 Inflammasome at the Crossroad between Immune Tolerance and Intestinal Inflammation." *Front Immunol* **8**: 36.

Petruzzo, P., J. P. Revillard, J. Kanitakis, M. Lanzetta, N. S. Hakim, N. Lefrancois, E. Owen and J. M. Dubernard (2003). "First human double hand transplantation: efficacy of a conventional immunosuppressive protocol." *Clin Transplant* **17**(5): 455-460.

Redecke, V., R. Wu, J. Zhou, D. Finkelstein, V. Chaturvedi, A. A. High and H. Hacker (2013). "Hematopoietic progenitor cell lines with myeloid and lymphoid potential." *Nat Methods* **10**(8): 795-803.

Ridker, P. M., B. M. Everett, T. Thuren, J. G. MacFadyen, W. H. Chang, C. Ballantyne, F. Fonseca, J. Nicolau, W. Koenig, S. D. Anker, J. J. P. Kastelein, J. H. Cornel, P. Pais, D. Pella, J. Genest, R. Cifkova, A. Lorenzatti, T. Forster, Z. Kopalava, L. Vida-Simiti, M. Flather, H. Shimokawa, H. Ogawa, M. Dellborg, P. R. F. Rossi, R. P. T. Troquay, P. Libby, R. J. Glynn and C. T. Group (2017). "Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease." *N Engl J Med* **377**(12): 1119-1131.

Ruytinx, P., P. Proost, J. Van Damme and S. Struyf (2018). "Chemokine-Induced Macrophage Polarization in Inflammatory Conditions." *Front Immunol* **9**: 1930.

Salei, N., S. Rambichler, J. Salvermoser, N. E. Papaioannou, R. Schuchert, D. Pakalniskyte, N. Li, J. A. Marschner, J. Lichtnekert, C. Stremmel, F. M. Cernilogar, M. Salvermoser, B. Walzog, T. Straub, G. Schotta, H. J. Anders, C. Schulz and B. U. Schraml (2020). "The Kidney Contains Ontogenetically Distinct Dendritic Cell and Macrophage Subtypes throughout Development That Differ in Their Inflammatory Properties." J Am Soc Nephrol **31**(2): 257-278.

Schulz, C., E. Gomez Perdiguero, L. Chorro, H. Szabo-Rogers, N. Cagnard, K. Kierdorf, M. Prinz, B. Wu, S. E. Jacobsen, J. W. Pollard, J. Frampton, K. J. Liu and F. Geissmann (2012). "A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells." Science **336**(6077): 86-90.

Schulz, C. and S. Massberg (2014). "Atherosclerosis--multiple pathways to lesional macrophages." Sci Transl Med **6**(239): 239ps232.

Shapouri-Moghaddam, A., S. Mohammadian, H. Vazini, M. Taghadosi, S. A. Esmaili, F. Mardani, B. Seifi, A. Mohammadi, J. T. Afshari and A. Sahebkar (2018). "Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease." J Cell Physiol **233**(9): 6425-6440.

Shim, Y. J., B. H. Kang, H. S. Jeon, I. S. Park, K. U. Lee, I. K. Lee, G. H. Park, K. M. Lee, P. Schedin and B. H. Min (2011). "Clusterin induces matrix metalloproteinase-9 expression via ERK1/2 and PI3K/Akt/NF-kappaB pathways in monocytes/macrophages." J Leukoc Biol **90**(4): 761-769.

Stremmel, C., R. Schuchert, V. Schneider, T. Weinberger, R. Thaler, D. Messerer, S. Helmer, F. Geissmann, J. Frampton, S. Massberg and C. Schulz (2018). "Inducible disruption of the c-myc gene allows allogeneic bone marrow transplantation without irradiation." J Immunol Methods **457**: 66-72.

Stremmel, C., R. Schuchert, F. Wagner, R. Thaler, T. Weinberger, R. Pick, E. Mass, H. C. Ishikawa-Ankerhold, A. Margraf, S. Hutter, R. Vagnozzi, S. Klapproth, J. Frampton, S. Yona, C. Scheiermann, J. D. Molkenkin, U. Jeschke, M. Moser, M. Sperandio, S. Massberg, F. Geissmann and C. Schulz (2018). "Yolk sac macrophage progenitors traffic to the embryo during defined stages of development." Nat Commun **9**(1): 75.

Stremmel, C., K. Stark and C. Schulz (2019). "Heterogeneity of Macrophages in Atherosclerosis." Thromb Haemost **119**(8): 1237-1246.

Svensson, E. C., A. Madar, C. D. Campbell, Y. He, M. Sultan, M. L. Healey, K. D'Aco, A. Fernandez, C. Wache-Mainier, P. M. Ridker, M. T. Beste and C. T. Basson (2018). "Abstract 15111: TET2-Driven Clonal Hematopoiesis Predicts Enhanced Response to Canakinumab in the CANTOS Trial: An Exploratory Analysis." Circulation **138**.

Tauber, A. I. (2003). "Metchnikoff and the phagocytosis theory." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(11): 897-901.

Turnbull, I. R., S. Gilfillan, M. Cella, T. Aoshi, M. Miller, L. Piccio, M. Hernandez and M. Colonna (2006). "Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation." J Immunol **177**(6): 3520-3524.

Vanaja, S. K., A. J. Russo, B. Behl, I. Banerjee, M. Yankova, S. D. Deshmukh and V. A. K. Rathinam (2016). "Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation." Cell **165**(5): 1106-1119.

Wang, G. G., K. R. Calvo, M. P. Pasillas, D. B. Sykes, H. Hacker and M. P. Kamps (2006). "Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8." Nat Methods **3**(4): 287-293.

Wang, M., Y. Yang, D. Cansever, Y. Wang, C. Kantores, S. Messiaen, D. Moison, G. Livera, S. Chakarov, T. Weinberger, C. Stremmel, M. Fijak, B. Klein, C. Pleuger, Z.-X. Lian, W.-T. Ma, Q.-Z. Liu, K. Klee, K. Händler, T. Ulas, A. Schlitzer, J. L. Schultze, B. Becher, M. Greter, Z. Liu, F. Ginhoux, S. Epelman, C. Schulz, A. Meinhardt and S. Bhushan (2020). "Two populations of self-maintaining monocyte-independent macrophages exist in adult epididymis and testis." PNAS.

Weinberger, T., D. Esfandyari, D. Messerer, G. Percin, C. Schleifer, R. Thaler, L. Liu, C. Stremmel, V. Schneider, R. J. Vagnozzi, J. Schwanenkamp, M. Fischer, K. Busch, K. Klapproth, H. Ishikawa-Ankerhold, L. Klosges, A. Titova, J. D. Molkenin, Y. Kobayashi, S. Engelhardt, S. Massberg, C. Waskow, E. G. Perdiguero and C. Schulz (2020). "Ontogeny of arterial macrophages defines their functions in homeostasis and inflammation." Nat Commun **11**(1): 4549.

Winkels, H., E. Ehinger, Y. Ghosheh, D. Wolf and K. Ley (2018). "Atherosclerosis in the single-cell era." Curr Opin Lipidol **29**(5): 389-396.

Winkels, H., E. Ehinger, M. Vassallo, K. Buscher, H. Q. Dinh, K. Kobiyama, A. A. J. Hamers, C. Cochain, E. Vafadarnejad, A. E. Saliba, A. Zerneck, A. B. Pramod, A. K. Ghosh, N. Anto Michel, N. Hoppe, I. Hilgendorf, A. Zirlik, C. C. Hedrick, K. Ley and D. Wolf (2018). "Atlas of the Immune Cell Repertoire in Mouse Atherosclerosis Defined by Single-Cell RNA-Sequencing and Mass Cytometry." Circ Res **122**(12): 1675-1688.

Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch and J. C. Mathison (1990). "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." Science **249**(4975): 1431-1433.

Wu, R., F. Chen, N. Wang, D. Tang and R. Kang (2020). "ACOD1 in immunometabolism and disease." Cell Mol Immunol **17**(8): 822-833.

Yeh, F. L., D. V. Hansen and M. Sheng (2017). "TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases." Trends Mol Med **23**(6): 512-533.

Yona, S., K. W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guillemin, A. Misharin, D. A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer and S. Jung (2013). "Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis." Immunity **38**(1): 79-91.



## 7. Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meiner Frau Julia bedanken, die mich auf dem Weg zur Habilitation über viele Jahre hinweg unermüdlich begleitet und unterstützt hat. Dank gilt natürlich auch meiner Familie, die stets für mich da ist und in vielen Diskussionen meinen klinischen und wissenschaftlichen Weg maßgeblich geprägt hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Professor Reinhard Fässler, der mir im Rahmen meiner Promotion eine exzellente wissenschaftliche Ausbildung ermöglicht hat, die bis heute meine Arbeitsweise maßgeblich beeinflusst.

In besonderem Maße danke ich Professor Steffen Massberg und Professor Christian Schulz, die mir nicht nur eine herausragende klinische Ausbildung ermöglichen, sondern stets auch die nötigen Freiräume schaffen und Unterstützung in jeder Hinsicht bieten, um Wissenschaft auf höchstem Niveau durchführen zu können. Ebenso danke ich auch Professor Markus Sperandio, der mich seit meiner Promotion begleitet und durchweg ein sehr angenehmer Kooperationspartner ist. Insofern freue ich mich besonders, dass er dankenswerterweise nun auch meinen Habilitationsprozess begleitet.

Abschließend möchte ich den zahlreichen Mitarbeiter\*innen danken, ohne die diese großen wissenschaftlichen Projekte nicht möglich gewesen wären und die meine Arbeit in den letzten Jahren wesentlich geprägt haben: Sue Chandraratne, Susanne Sauer, Michael Lorenz, Irene Schubert, Anna Titova, Elisabeth Raatz, Sebastian Helmer, Nicole Blount, Ronja Schuchert, Franziska Wagner, Sara Elhag, Julia Winterhalter und Clarissa Knabe.