

Aus dem Bereich Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Analyse der Makrophagenfunktion im Rahmen
der Wundheilung bei Hämophilie**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von: Daniela Kagiri, geb. Lessig

geb. am 21.08.1991 in Nürnberg

Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Eichler

Tag der Prüfung: 26.07.2021

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Herrmann Eichler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Laschke

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung, eigene Fragestellung	3
2.1	Überblick über Hämophilie	3
2.2	Hämophile Arthropathie	5
2.3	Molekulare Mechanismen der hämophilen Arthropathie	6
2.4	Rolle der Makrophagen bei der hämophilen Arthropathie	8
2.5	Hypothese, Ziel dieser Arbeit	9
3	Material und Methodik	11
3.1	Reagenzien, Arbeitsmaterialien und Geräte	11
3.2	Patienten und Kontrollgruppe	11
3.3	Monozytenisolierung	13
3.4	Kultivierung von Makrophagen	16
3.5	Morphologische Analyse der Makrophagenkultur	16
3.6	Fluoreszenzmikroskopie	20
3.7	Phagozytoseassay	23
3.8	Kultivierung von Makrophagen in Plasmaclots	27
3.9	Statistische Analyse	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Qualität der Monozytenpopulation	29
4.2	Spreading und Polarisierung sind bei Makrophagen von Hämophilie-Patienten vermindert	31
4.3	Phagozytosefähigkeit von Makrophagen von Hämophilen ist vermindert	36
4.4	Reduzierte Clotinvasion von Makrophagen von Hämophilen	40
4.5	Makrophagen von Hämophilie-Patienten reagieren inadäquat auf M-CSF und GM- CSF	45
5	Diskussion	52
5.1	Die Makrophagendifferenzierung ist bei der Hämophilie gestört	52
5.2	Deregulierung der Wundheilungsfunktion in Makrophagen von Hämophilie- Patienten	52
5.3	Störung der Phagozytose als Pathomechanismus der hämophilen Arthropathie ..	54
5.4	Die Clotinfiltration ist bei Makrophagen von Hämophilie-Patienten gestört	55
5.5	Makrophagen von Hämophilie-Patienten sind gegenüber M-CSF resistent	56
5.6	Zusammenfassung und Ausblick	57
6	Literaturverzeichnis	62
7	Abbildungsverzeichnis	72
8	Abkürzungsverzeichnis	73

9	Anhang	75
9.1	Überblick der verwendeten Geräte.....	75
9.2	Überblick der verwendeten Reagentien	75
9.3	Patientendaten	77
10	Publikationen	80
11	Danksagung.....	82
12	Lebenslauf	83

1 Zusammenfassung

Makrophagen sind an der Entzündungsregulation bei der hämophilen Arthropathie beteiligt. Wir konnten mit unseren Untersuchungen zeigen, dass sich Monozyten von Patienten mit Hämophilie, welche durch Kultivierung zu Makrophagen differenziert wurden, von Monozyten gesunder Blutspender unterscheiden. Diese Unterschiede betreffen unter anderem die Unfähigkeit von Makrophagen von Hämophilie-Patienten, in Gegenwart von M-CSF zu wachsen und zu polarisieren. Das Zytokin M-CSF vermittelt hier physiologischerweise eine Makrophagendifferenzierung in einen anti-inflammatorischen M2-Phänotyp. Als Folge der M-CSF-Resistenz weisen Makrophagen von Hämophilie-Patienten funktionelle Defizite in Funktionen auf, die mit der Wundheilung assoziiert sind. Hierzu zählen eine verminderte Clotinvasion sowie eine gestörte Phagozytose von roten Blutzellen. Auf struktureller Ebene detektierten wir in Makrophagen von Hämophilie-Patienten sowohl unter einer M-CSF als auch unter einer GM-CSF Stimulation eine reduzierte Filopodienbildung. Des Weiteren waren typische Aktivitätsmarker in Makrophagen von Hämophilie-Patienten unter einer M-CSF Stimulation kaum nachweisbar, während diese in Gegenwart von GM-CSF noch exprimiert waren. GM-CSF stellt in diesem Zusammenhang einen Wachstumsfaktor dar, welcher Makrophagen zu einem pro-inflammatorischen M1-Phänotyp differenziert. Zusammenfassend lassen diese Daten auf eine Störung der M-CSF-vermittelten Funktionen in Makrophagen von Hämophilie-Patienten im Rahmen der Wundheilung schließen, welche insbesondere durch eine reduzierte Clotinvasion und eine verminderte Phagozytose repräsentiert sind. Die GM-CSF-abhängige Differenzierung in entzündliche M1-Makrophagen ist hingegen zumindest teilweise erhalten. Wir postulieren daher, dass Makrophagen von Hämophilie-Patienten Entzündungen, wie sie z.B. im Rahmen der hämophilen Arthropathie vorkommen, fördern, während kritische Schritte zur Geweberegeneration und Wundheilung unterbleiben.

Summary:

Macrophage polarization is deregulated in hemophilia. Macrophages are implicated in modulating inflammation in hemophilic arthropathy. Here, we show that monocytes from hemophilia patients that we cultured to generate macrophages are distinct from monocytes isolated from healthy blood donors. These differences are exemplified by the inability of hemophilia macrophages to spread and polarize in response to M-CSF, a cytokine that promotes M2 macrophage differentiation. As a result, hemophilia macrophages exhibit deficits in functions associated with wound healing such as clot invasion and RBC phagocytosis. Mechanistically, we detected reduced filopodia formation in hemophilia macrophages following stimulation with M-CSF as well as GM-CSF. However, failure of hemophilia macrophages to spread affected the expression of macrophage activation markers much stronger after stimulation with M-CSF than GM-CSF, which has been shown to induce a pro-inflammatory M1 macrophage phenotype. Together, our data indicate a specific impairment of M-CSF-mediated macrophage functions involved in wound healing such as phagocytosis and clot invasion in hemophilia. GM-CSF signaling, on the other hand, remained partially intact suggesting that hemophilia macrophages are able to contribute to the inflammatory response that is associated with hemophilic arthropathy.

2 Einleitung, eigene Fragestellung

2.1 Überblick über Hämophilie

Die Hämophilie, auch Bluterkrankheit genannt, ist nach dem Von-Willebrandt-Syndrom die häufigste angeborene Störung des plasmatischen Gerinnungssystems und wird X-chromosomal-rezessiv vererbt (8; 51). Hierbei lassen sich zwei verschiedene Erkrankungsformen unterscheiden. Je nachdem welcher Gerinnungsfaktor betroffen ist, ist von Hämophilie A bzw. Hämophilie B die Rede. Die Hämophilie A ist durch eine Mutation im F8-Gen, häufig durch eine Intron 22-Inversion, und einem daraus resultierenden Verlust oder Mangel des Gerinnungsfaktors VIII gekennzeichnet (51). Durch eine Mutation im F9-Gen wird ein Mangel/Verlust des Gerinnungsfaktors IX manifestiert (12). Diese Form der Gerinnungsstörung wird als Hämophilie B bezeichnet und tritt 6-mal seltener als die Hämophilie A auf, welche eine Frequenz von 1:5000 hat (51). Beide Formen führen zu einer gestörten sekundären Hämostase, welche das intrinsische Gerinnungssystem betrifft. Die Gerinnung kann zwar zunächst über das exogene System angestoßen werden, allerdings wird die fortgesetzte Aktivierung sehr schnell durch den Inhibitor TFPI (=tissue factor pathway inhibitor) bzw. durch AT (=Antithrombin) gehemmt. Durch einen Mangel an Faktor VIII bzw. Faktor IX fällt die Verstärkerfunktion des endogenen Systems aus, welche für die Überwindung der inhibitorischen Wirkung von TFPI und AT notwendig ist (40).

Die Folge ist eine verminderte Bildung von aktiviertem Faktor X und Thrombin und in der Folge von quervernetztem Fibrin, welches als Endprodukt der plasmatischen Hämostase zusammen mit den Blutplättchen für den dauerhaften Wundverschluss benötigt wird (4; 12).

Eine funktionsfähige Gerinnungskaskade ist für den Organismus sehr wichtig, da sie zu einer adäquaten Reaktion auf eine Gewebeerletzung führt (53). Auf die initiale Blutstillung unter Ausbildung eines Plättchen-Fibringerinnsels folgt die Einleitung der Wundheilung. Hierbei werden Zelltrümmer durch Phagozyten entfernt und neues Gewebe durch Fibroblasten aufgebaut (2; 42). Damit die Wundheilung problemlos ablaufen kann, ist eine intakte Hämostase, unter anderem in Form von stabilen Fibrinthromben, notwendig (79). Liegt wie im Falle der Hämophilie eine gestörte Blutgerinnung vor, so kommt es neben Blutungsereignissen auch zu einer verzögerten Wundheilung (22; 41).

Wie genau sich das klinische Bild der Hämophilie manifestiert, hängt mit der verbleibenden Restaktivität des Faktors VIII (Hämophilie A) bzw. des Faktors IX (Hämophilie B) ab. Auf Grundlage dieser Aktivität kann die Erkrankung in die vier Schweregrade Subhämophilie (Restaktivität >15-50%), leichte Form (5-15%), mittelschwere Form (1-5%) und schwere Form (<1%) unterteilt werden (31). Bei allen Formen können Blutungen in das subkutane Gewebe, in die Muskulatur sowie in Gelenke entstehen (4). Der Schweregrad entscheidet vielmehr darüber, in welchem Alter, in welcher Situation und wie häufig solche Blutungen auftreten. Die Subhämophilie bzw. die leichte Form der Hämophilie fällt meist erst im Erwachsenenalter nach Verletzungen/Eingriffen auf, die mit Nachblutungen oder verzögerter Wundheilung einhergehen. Spontanblutungen sind jedoch eine Rarität bei der Subhämophilie (51). Im Gegensatz dazu tritt die schwere Form der Hämophilie bereits im Kindesalter in Form von Spontanblutungen in Erscheinung (85). Diese Blutungsereignisse betreffen häufig die großen Gelenke, wie z.B. das Sprung-, Knie- und Ellenbogengelenk, in selteneren Fällen auch das Hüftgelenk (5; 31). Treten diese Einblutungen häufiger auf, so kann sich als Komplikation eine hämophile Arthropathie entwickeln (43; 51; 61; 85; 87). Die meisten Blutungen und deren Komplikationen lassen sich durch eine Substitution mit entsprechenden Gerinnungsfaktor-Konzentraten behandeln, die entweder aus Plasma isoliert oder rekombinant hergestellt werden (31; 61; 85; 87). Hierbei unterscheidet man zwischen einer prophylaktischen und einer on-demand-Therapie. Während bei einer prophylaktischen Therapie eine regelmäßige Substitution des Gerinnungsfaktors unabhängig von Blutungsereignissen erfolgt, wird bei einer on-demand-Therapie nur bedarfsgerecht, d.h. vor Operationen oder nach Verletzungen und Spontanblutungen, therapiert. Eine prophylaktische Therapie wird hingegen zur Vermeidung spontaner Blutungen und den damit einhergehenden Komplikationen eingesetzt (31; 51; 87). Neben der Therapie mit Gerinnungsfaktoren gibt es auch weitere Möglichkeiten der Behandlung- insbesondere bei leichteren Formen-, zum Beispiel mittels Antifibrinolytika oder Desmopressin (DDAVP) (29; 31). Trotz dieser großen Bandbreite an Therapiemöglichkeiten lassen sich bestimmte Komplikationen, insbesondere die Entwicklung einer hämophilen Arthropathie, auch durch eine bestmögliche und langfristige Prophylaxe aktuell noch nicht vollständig verhindern (87; 88). Da dieses Krankheitsbild mit einer stark eingeschränkten Lebensqualität einhergeht, ist es wichtig, die exakten Mechanismen, die zur Entwicklung der hämophilen Arthropathie führen, zu erforschen. Nur so ist es möglich, neue

und effektive Therapieansätze zu entwickeln, um die Entwicklung einer hämophilen Arthropathie zu verhindern.

2.2 Hämophile Arthropathie

Unter der hämophilen Arthropathie versteht man eine chronisch deformierende Gelenkerkrankung, die mit Symptomen wie Schmerzen, Schwellung des betroffenen Gelenks, Bewegungseinschränkungen, Achsabweichungen, Muskelatrophie und Muskelkontrakturen einhergeht (31; 83). In Abb. 1 ist ein typisches klinisches Bild der hämophilen Arthropathie abgebildet. Die hämophile Arthropathie betrifft insbesondere die großen Gelenke, wie Sprunggelenk, Knie und Ellenbogen, und muss nicht selten operativ in Form von Arthrodesen oder Endoprothesen behandelt werden (5; 83). Bei vielen Blutern findet selbst unter einer optimalen Therapie zwischen der 2. und 4. Lebensdekade eine relevante Gelenkzerstörung statt und betrifft insofern vor allem erwachsene Patienten (61).



Abb. 1: klinisches Bild der schweren hämophilen Arthropathie des rechten Kniegelenks bei einem Patienten mit schwerer Hämophilie (126)

Unter einer on-demand-Therapie treten häufig Spontanblutungen auf und es entwickeln sich daher bereits im Kindesalter Gelenkschäden, welche kontinuierlich an Intensität zunehmen. Diese Schäden umfassen klinische Manifestationen wie Gelenkschwellungen, Muskelatrophie, Krepitationen unter Bewegung, Flexions- und Extensionsverlust und Gelenkschmerzen. Sie können radiologisch, zum Beispiel durch periartikuläre Osteoporosen, einen verschmälerten Gelenkspalt oder subchondrale Zysten erfasst werden. Solche radiologischen Veränderungen treten bereits regelmäßig im 5. Lebensjahr auf und sind sehr kritisch anzusehen, da insbesondere während des Wachstums eine starke Progredienz der Gelenkschädigung stattfindet (92; 107; 109).

Die derzeit beste Therapie zur Verzögerung einer hämophilen Arthropathie besteht in einer Verhinderung der Entstehung von Gelenkblutungen. Um dieses Ziel zu erreichen, ist eine prophylaktische Substitutionstherapie mit Gerinnungsfaktor VIII oder IX, welche bereits im frühen Kindesalter begonnen werden sollte, äußerst wichtig. Es konnte gezeigt werden, dass deutlich weniger Gelenkschäden im Kindesalter und frühen Erwachsenenalter unter einer Substitutionstherapie als bei einer on-demand-Therapie auftreten (67; 85; 87; 88). Allerdings kann auch unter Prophylaxe die Entwicklung einer hämophilen Arthropathie langfristig gesehen nicht komplett verhindert werden (87; 88). Interessant ist auch die Tatsache, dass bei der Entwicklung der hämophilen Arthropathie neben den Einblutungen in die Gelenke noch weitere Faktoren eine Rolle spielen müssen. Nur so lässt sich die große Variabilität bzgl. Intensität und Anzahl der Blutungen, die zu einer hämophilen Arthropathie führen, erklären. Bei manchen Patienten kommt es nämlich direkt nach einer einzigen Blutung zu einer Gelenkschädigung, während andere Hämophilie-Patienten auch nach etlichen Gelenkblutungen kein morphologisches Korrelat in der radiologischen Diagnostik zeigen (67). Um die vielschichtigen Einflüsse, die zu einer hämophilen Arthropathie führen, ansatzweise zu verstehen, ist es unerlässlich, die molekularen Mechanismen der Erkrankung aufzuklären und vollständig zu verstehen.

2.3 Molekulare Mechanismen der hämophilen Arthropathie

Die Mechanismen, die zu der Entwicklung einer hämophilen Arthropathie führen, sind multifaktoriell, komplex und daher bis heute nur im Ansatz verstanden. Als einer der wichtigsten Mechanismen wird die Ablagerung von roten Blutzellen (RBC)

in die Synovia als Folge der Gelenkeinblutung angesehen. Diese führt im Folgenden zu einer Eisenfreisetzung in Form von Häm (80; 99; 100). Das freigesetzte Eisen führt über verschiedene Wege zur Inflammation und Gefäßneubildung in der Synovia, wodurch es letztlich zu dem klinischen Bild der hämophilen Arthropathie über eine Knochen- und Knorpelzerstörung des entsprechenden Gelenks kommt (1; 100; 110). Zum einen führt Eisen zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche toxisch sind und neben der Initiierung einer Entzündungsreaktion auch direkt zum Knorpelschaden führen. Zum anderen kommt es, unter anderem durch Eisen vermittelt, zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Dieser Faktor ist wiederum in der Lage, eine Reihe von entzündungsassoziierten Genen (IL-6, IFN γ und TNF α) anzuschalten, die wiederum zur Perpetuierung der Entzündungsreaktion führen. Darüber hinaus können Entzündungsmediatoren in Zusammenarbeit mit VEGF (=Vascular Endothelial Growth Factor) die Neoangiogenese einleiten. NF- κ B führt zudem über verschiedene Matrix-Metalloproteinasen (MMP) zur Zerstörung des Knorpels (103). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Eisen durch die Expression von c-myc und durch die Inhibierung von p53 die Proliferation von Synoviozyten herbeiführt. Die proliferationsbedingte Gewebhypoxie führt zur Aktivierung von HIF-1 α und darauffolgend zur Neubildung von Blutgefäßen in der Synovia (Angiogenese) (36; 118). Diese Vorgänge sind prädisponierend für weitere Gelenkblutungen, da die neugebildeten, unreifen Blutgefäße wesentlich verletzungsanfälliger sind als die etablierten (74; 103). Hieraus ergibt sich ein Teufelskreis aus Gelenkblutung, Inflammation und Angiogenese zur protrahierten Gelenkzerstörung, die neben mechanischen Faktoren durch die Freisetzung von ROS und Gewebe-Proteasen zustande kommt (101) (Abb. 2). Die Proteasen führen zusammen mit dem freigesetzten Eisen zu einem katabolen Stoffwechsel, indem unter anderem die Proteoglykan-Synthese und somit die Bildung der extrazellulären Knorpelmatrix gehemmt wird und eine Apoptose der Chondrozyten stattfindet (28; 100; 101). Das Zusammenspiel von Enzymen, Zytokinen, ROS, Eisen und einigen verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten, Makrophagen oder Endothelzellen mündet letztendlich in einer Knorpel- und Gelenkzerstörung mit dem typischen klinischen Bild der hämophilen Arthropathie (100; 101; 103).

Der Einfluss von Eisen und die hieraus resultierende Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen bei rezidivierenden Gelenkblutungen lassen vermuten, dass der oben beschriebene Phänotypen-Switch bei der hämophilen Arthropathie kaum stattfinden kann. $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ führen vielmehr zu einer ständigen Aktivierung von M1-Makrophagen, wodurch die Inflammation weiter aufrecht erhalten bleibt (69; 103). Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse von Nieuwenhuizen et al. sowie von Øvlisen et al. gestützt. Die beiden Arbeitsgruppen untersuchten die Makrophagenpolarisierung nach induzierter Gelenkverletzung bei hämophilen Mäusen und konnten zeigen, dass eine Zunahme von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen resultierte (84; 90). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei chronisch venösen Ulzera aufgrund einer Eisenüberladung, wie es auch bei der hämophilen Arthropathie der Fall ist, kaum ein M1–M2-Switch stattfindet, sondern der pro-inflammatorische M1-Phänotyp überwiegt, während ein funktionsfähiger M2-Typ vermindert vorliegt (104).

Zusammenfassend kann daraus geschlossen werden, dass eine Überexpression des M1-Phänotyps sowie eine verringerte Expression des M2-Phänotyps bei Makrophagen in Gelenken von Patienten mit hämphiler Arthropathie vorliegt. Die pro-inflammatorische Aktivität des M1-Phänotyps trägt selbst zur Entstehung der Gelenkzerstörung bei, wohingegen die protektive Wirkung des M2-Phänotyps via Phagozytose von RBCs und nachfolgendem Tissue-Remodeling reduziert ist.

2.5 Hypothese, Ziel dieser Arbeit

Die Hämophilie ist eine klinisch schwerwiegende angeborene Störung der plasmatischen Gerinnung, die gehäuft mit Spontanblutungen in den großen Gelenken einhergeht. Die Gelenkblutungen führen durch die Ablagerung von extravasalen Erythrozyten zu einer eiseninduzierten Entzündungsreaktion mit der Folge von Gelenkschäden bis hin zum Vollbild einer hämophilen Arthropathie. Anti-inflammatorische M2-Makrophagen sind physiologischerweise auf die Eisenentfernung durch Phagozytose spezialisiert, wodurch eine Hemmung der Inflammation und die Einleitung der Wundheilung ermöglicht wird. Wäre dieser Mechanismus auch in Hämophilie-Patienten effizient, so sollte es für den Organismus relativ einfach möglich sein, die eiseninduzierte Entzündungsreaktion, welche zur Entwicklung der hämophilen Arthropathie maßgeblich beiträgt, zu unterbinden. Hierzu formulierten

wir die Hypothese, dass die Makrophagenfunktion bei Patienten mit Hämophilie dereguliert ist. Diese Deregulation verursacht Wundheilungsstörungen, unter anderem durch eine gestörte Erythrozyten-Phagozytose und eine gestörte zelluläre Clot-invasion von Makrophagen.

Um unsere Hypothese zu testen, isolierten wir Monozyten aus dem peripheren Blut von Hämophilie-Patienten, die in Makrophagendifferenzierungsmedium kultiviert und nachfolgend anhand ihrer Morphologie phänotypisiert wurden. Monozyten von gesunden Blutspendern dienten hierbei als Kontrollgruppe. Um die Rolle der Makrophagen von Hämophilie-Patienten bei der Wundheilung zu evaluieren, analysierten wir außerdem deren Fähigkeit zur Phagozytose, Clotinvasion und Filopodienbildung und verglichen diese Funktionen mit der Expression typischer Makrophagen-Aktivierungsmarker.

3 Material und Methodik

3.1 Reagenzien, Arbeitsmaterialien und Geräte

Eine Liste der verwendeten Reagenzien, Arbeitsmaterialien und Geräte befindet sich im Anhang.

3.2 Patienten und Kontrollgruppe

Vor Beginn der Studie wurde ein positives Votum bei der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes eingeholt (Kenn-Nr. 73/14).

In diese Studie wurden 9 Patienten mit Hämophilie A bzw. B eingeschlossen (siehe Auszug Tabelle 1; vollständige Tabelle 1 im Anhang). Diese erwachsenen Patienten werden im Hämophilie-Zentrum am Universitätsklinikum des Saarlandes behandelt, das ein Teil des Instituts für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin ist. Hier finden halbjährliche Untersuchungen statt, bei deren Gelegenheit die Patienten für die Studie rekrutiert wurden. Das Homburger Hämophilie-Zentrum wurde als eines von deutschlandweit 17 Zentren als European Hemophilia Comprehensive Care Center (EHCCC) qualifiziert. Das interdisziplinäre Behandlungsteam betreut ca. 60 Patienten mit schwerer Hämophilie A/B sowie mehr als 30 Patienten mit leichteren Formen der Hämophilie A/B (130; 136).

Den rekrutierten Patienten wurde die Studie zunächst durch einen Arzt ausführlich erklärt und nach schriftlicher Einwilligung wurden im Rahmen der Routineuntersuchung 20-50 ml peripheres Venenblut in Zitratröhrchen (0,8% Endkonzentration) entnommen. Das Blut wurde stets vor der Substitution von Gerinnungsfaktoren (sofern notwendig) abgenommen. Die Talspiegel (Trough-Level) der Affinität von Gerinnungsfaktor FVIII und FIX lagen im Durchschnitt bei $9,8 \pm 4,4$ % bzw. $11,5 \pm 3,5$ % (Tabelle 1 im Anhang). Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse der Studie repräsentativ für alle Hämophilie-Patienten zutreffen, wurden Patienten mit aktiver Blutung zum Zeitpunkt der Untersuchung aus der Studie ausgeschlossen. Das abgenommene Blut wurde ohne Verzögerung im Forschungslabor des Instituts weiterverarbeitet.

Die untersuchten Patienten, 7 mit Hämophilie A und 2 mit Hämophilie B, waren zum Zeitpunkt der Studie zwischen 19 und 50 Jahre alt. Von diesen 9 Patienten leiden 6

an einer schweren Form der Hämophilie, ein Patient an einer mittelschweren Form und die anderen zwei Patienten an einer leichten bis mittelschweren Hämophilie. Alle untersuchten Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Hemmkörper gegen den Gerinnungsfaktor VIII bzw. IX auf, sodass ein regelrechter Anstieg des jeweiligen Gerinnungsfaktors nach der Substitution zu verzeichnen war. Bei 6 der 9 untersuchten Patienten wurde eine Substitutionsprophylaxe durchgeführt. Die restlichen 3 Patienten erhielten hingegen eine on-demand-Therapie. Für die jeweilige Therapie kam bei 2 Patienten ein plasmatisches Gerinnungsfaktorenkonzentrat und bei 6 Patienten ein rekombinant hergestelltes Gerinnungsfaktorenkonzentrat zum Einsatz. Bei einem der 9 Patienten wurde anstelle von Gerinnungsfaktorenkonzentraten DDAVP (=Desmopressin) eingesetzt. Bei einem Patienten lag eine Serokonversion mit HBV (= Hepatitis B Virus) sowie eine aktive HCV- (=Hepatitis C Virus) Infektion vor. Zwei weitere Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung HCV seropositiv. Des Weiteren litten 2 der 9 Patienten an einer hämophilen Arthropathie. Sofern es zu Blutungen kam, stand auch bei der Mehrzahl der anderen Patienten die Gelenk- und Muskelblutung im Vordergrund, welche für die Entwicklung der hämophilen Arthropathie verantwortlich ist. Als Kontrollgruppe wurden 11 gesunde Spender aus dem Blutspendedienst des Instituts rekrutiert.

Pat.- Nr.	Alter	Typ Hä- mophilie	Restak- tivität	hämophile Arthropathie	Art der The- rapie/ Typ Präparat	Coinfektionen *= Serokonversion
1	26	A	<1%	nein	on-demand rekombinant	-----
2	43	A	1-8%	ja	Prophylaxe rekombinant	HBV* HCV
3	28	A	4-14%	nein	on-demand DDAVP	-----
4	28	B	4-10%	nein	on- demand rekombinant	-----
5	24	A	<1%	nein	Prophylaxe rekombinant	-----
6	19	A	<1%	nein	Prophylaxe rekombinant	-----
7	50	A	<1%	ja	Prophylaxe plasmatisch	HCV*
8	32	A	<1%	nein	Prophylaxe plasmatisch	HCV*
9	31	B	<1%	nein	Prophylaxe rekombinant	-----

Tabelle 1 (Auszug): klinische Daten der untersuchten Hämophilie-Patienten

3.3 Monozytenisolierung

Zur Gewinnung von Monozyten erfolgte eine Isolierung von PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells), gefolgt von einer weiteren Aufreinigung. Unter PBMCs fasst man alle Zellen mit rundem Zellkern des Blutes, wie NK-Zellen (natürliche Killerzellen), T-Zellen, B-Zellen und Monozyten, zusammen (138). PBMCs können mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden. Die zu trennende Suspension wird über eine geeignete Trennschicht (hier das Lymphozyten-Separationsmedium Ficoll mit einer Dichte von 1,077 g/ml bei 20°C) geschichtet und anschließend zentrifugiert (131). Dadurch werden die einzelnen Zellfraktionen gemäß ihrer Dichte

aufgetrennt. Erythrozyten haben die höchste Dichte und wandern daher auf den Boden des Röhrchens. Von oben nach unten lassen sich durch dieses Verfahren folgende Schichten erkennen: Plasma, Buffy Coat (eine leukozytenreiche Schicht, welche die PBMCs enthält), Ficoll, Granulozyten und Erythrozyten (13).

Um die PBMCs zu isolieren, wurde das Blut 2:1 mit HBSS ohne Mg^{2+}/Ca^{2+} (30 ml Endvolumen) verdünnt und dann langsam auf 20 ml Ficoll geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 400 g für 30 Minuten bei Raumtemperatur (=RT), Beschleunigung 1 und ohne Bremse. Anschließend wurde der Buffy Coat, welcher die PBMCs enthält, entnommen. Noch vorhandene Plättchen wurden entfernt, indem der Buffy Coat nach Zugabe von 50 ml HBSS bei 300 g für 5 Minuten mit Bremse 9/Beschleunigung 9 bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand erneut abgesaugt wurde. Das Pellet wurde für 1-2 Minuten mit 1 ml RBC Lyse-Puffer inkubiert, mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt und bei 300 g für 5 Minuten (Raumtemperatur/Bremse 9/Beschleunigung 9) zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 20 ml eiskalter HBSS aufgenommen und bei 300 g für 10 Minuten, 4°C, Bremse 9, Beschleunigung 9 erneut zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurde das Pellet in 20 ml eiskalter PBS (+ 0,5% BSA/1 mM EDTA) resuspendiert und bei 300 g für 5 Minuten, 4°C, Bremse 9, Beschleunigung 9 zentrifugiert. Dieser Schritt diente dem Aufbrechen von Zell-Zellkontakten. Das neuerliche PBMC-Pellet wurde in eiskalten PBS/0,5% BSA aufgenommen und die Zellen wurden mittels automatischem Zellzähler CASY® gezählt (128; 129).

Isolierung der PBMCs zu Monozyten. Die isolierten PBMCs wurden anschließend zu Monozyten weiter isoliert. Dies geschah entweder durch Adhäsion an Plastik oder mittels Aufreinigung durch Magnetic-Beads. Im Falle des Adhäsionsverfahrens wurden die PBMCs in einer Zelldichte von $2,0 \times 10^5$ PBMC/cm² in Monozytenkulturmedium (RPMI-Medium, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin (= P/S), 1% L-Glutamin) auf Plastik ausgesät und für 2 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach dieser Zeit waren die Monozyten am Boden des Plastiks bereits adhärent, während sich die restliche Population der PBMCs als Zellsuspension im Medium befand. Durch drei hintereinander folgende Waschschrte mit Medium konnten so die nicht adhärenen Zellen entfernt werden und es blieb überwiegend eine Kultur zurück, die einen Monozytenanteil von ca. 70-75% enthält (7).

Im Falle der Aufreinigung durch superparamagnetische Beads (Dynabeads®) wurde die sogenannte Untouched-Methode angewendet. Bei diesem Verfahren wird zu den isolierten PBMCs ein Mix aus Dynabeads®-gekoppelten Antikörpern gegeben, die sich gegen alle PBMCs außer Monozyten richten. Der Antikörpermix besteht im Einzelnen aus anti-CD3, anti-CD7, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD5, anti-CDw123 sowie anti-CD235a und richtet sich daher gegen T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Erythrozyten, Granulozyten und Makrophagen (134). Nach einer kurzen Inkubationszeit wurden die Antikörper-gebundenen Blutzellen mittels eines Magneten von den Monozyten getrennt, wobei letztere in der Suspension verblieben (= Negativselektion). Abgesehen von wenigen unspezifischen Interaktionen bleibt die Monozytenpopulation von magnetischen Antikörpern unberührt, weshalb dieses Verfahren auch als Untouched-Methode bezeichnet wird (135). Hieraus ergibt sich eine > 90% reine Monozytenkultur.

Das Dynabeads® Kit ist für eine Größenordnung von $1-5 \times 10^7$ PBMCs geeignet. Die folgenden Angaben beziehen sich auf 5×10^7 PBMCs und wurden bei abweichender Zellzahl entsprechend angepasst. 5×10^7 PBMCs wurden in 500 µl 0,5% BSA/PBS (= Isolationspuffer) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nach Zugabe von 100 µl Blocking-Reagenz mit 100 µl Antikörpermix unter Rotation für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden ausgewaschen, indem die Zellsuspension nach Zugabe von 4 ml Isolationspuffer zentrifugiert (4°C, 350 g, 8 Minuten) und das Pellet anschließend in 500 µl Isolationspuffer resuspendiert wurde. Die Zellsuspension wurde mit 500 µl Dynabeads®, die zuvor ebenfalls mit Isolationspuffer (2 x 500 µl) gewaschen wurden, versetzt und für 15 Minuten bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit 4 ml Isolationspuffer unter Vermeidung von Luftblasenbildung verdünnt und für 2 Minuten in den Magneten gestellt, was dazu führte, dass alle Zellen außer den Monozyten an der Wand des Reagenzröhrchens immobilisiert wurden. Die suspendierten Monozyten hingegen konnten in ein neues Röhrchen überführt werden. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt, um sicherzustellen, dass alle Monozyten geborgen wurden. Danach wurde die Monozytensuspension nochmals in den Magneten gestellt, um zu gewährleisten, dass alle Beads-gebundenen Zellen entfernt wurden. Die Monozyten wurden danach mittels Zellzähler Moxi Z™ Mini über eine elektrische 3D-Messung gezählt und mit einer Dichte von $4,63 \times 10^4$ Zellen/cm² in Makrophagendifferenzierungsmedium für 7 bzw. 8 Tage auf Plastik oder Glas kultiviert (133).

3.4 Kultivierung von Makrophagen

Ziel der 7-8-tägigen Kultivierung war es, die Monozyten in Makrophagen umzuwandeln. Hierfür wurden die Monozyten in einem Nährmedium kultiviert, das auf RPMI basierte und neben 10% FBS, 1% P/S und 1% L-Glutamin zusätzlich die für die Makrophagendifferenzierung notwendigen Wachstumsfaktoren M-CSF oder GM-CSF enthielt.

Es gibt verschiedene Polarisierungsmöglichkeiten, die zu einer Makrophagendifferenzierung führen. So können Monozyten einerseits *in vitro* nach einer 7-tägigen Stimulation mit M-CSF in Makrophagen differenziert werden, die einen M2-Phänotyp aufweisen. Die M2-Polarisierung kann durch Zugabe von IL-4 weiter vertieft werden oder durch die Gabe von IFN γ /LPS in einen entzündlichen M1-Phänotyp umgekehrt werden (23; 25; 30; 48; 68; 71; 111; 112; 115). Entzündliche M1-Makrophagen können aber auch nach Gabe von GM-CSF an Stelle von M-CSF generiert werden (25; 64; 68; 111; 112; 115). Hierbei wirkt die Stimulation mit IFN γ /LPS dann verstärkend (25; 26).

Für unsere Fragestellungen wurden die Monozyten grundsätzlich für 7 Tage mit M-CSF (100 ng/ml) oder GM-CSF (125 ng/ml) stimuliert. Bei bestimmten Fragestellungen wurden die Monozyten für 8 Tage mit M-CSF bzw. GM-CSF behandelt, wobei in den letzten 48 Stunden M-CSF und GM-CSF durch IL-4 (20 ng/ml; nur bei M-CSF) oder IFN γ (20 ng/ml)/LPS (100 ng/ml) ersetzt wurden. Ein Teil der Zellen erhielt keinerlei Zytokinstimulation und wurde deshalb als „untreated“ bezeichnet. Bei all diesen Verfahren fand an Tag 6 ein Mediumwechsel einschließlich der Zytokine statt.

3.5 Morphologische Analyse der Makrophagenkultur

Monozyten beginnen rasch nach dem Aussähen in Zellkulturplatten fest am Plastikuntergrund zu adhären. Dieser Prozess ist wichtig für die Differenzierung und führt in Abhängigkeit von bestimmten Zytokinen zu spezifischen morphologischen Veränderungen. Am ausgeprägtesten sind diese Veränderungen nach der Gabe von M-CSF, welches die zuvor rundlichen Monozyten in längliche, spindelförmige Makrophagen umwandelt (sog. Spreading, Abb. 3) (38; 115). Zudem weisen diese Zellen

oft eine verbreiterte Front (leading edge) und ein spitzes Zellende (trailing edge) auf (113). Diese Funktion, welche die migratorischen Fähigkeiten von Makrophagen widerspiegelt, nennt sich Polarisierung. Zelladhäsion und Spreading nehmen zudem durch die Bildung von fokalen Adhäsionen (=Spreading) Einfluss auf die Signaltransduktion und Genexpression von Zellen, welche sich wiederum auf Überleben, Proliferation und Differenzierung auswirken (93; 108). Entsprechend kann man durch die morphologische Analyse von Makrophagen Rückschlüsse auf Differenzierung und Funktion ziehen (72; 75). Um die Makrophagenmorphologie von adhären-ten Makrophagen während der Differenzierung zu analysieren, wurden die Makrophagenkulturen über den gesamten Behandlungszeitraum (in der Regel 7-8 Tage) täglich mit dem Phasenkontrastmikroskop inspiziert. Repräsentative Bilder wurden mittels der angeschlossenen Kamera aufgenommen. Die Makrophagenmorphologie wurde anschließend anhand genau definierter Kriterien quantitativ am Computer ausgewertet.

Die Phasenkontrastmikroskopie ist ein Verfahren der Lichtmikroskopie und ist in der Lage dünne, ungefärbte Strukturen durch deren unterschiedlicher Dichte darzustellen. Das Licht durchdringt hierbei das Objekt und bewirkt eine Phasenverschiebung, welche in Bildkontraste umgewandelt wird. Dichtere und dickere Strukturen erscheinen durch dieses Verfahren dunkler als solche mit geringerer Dichte. Die Phasenkontrastmikroskopie ist insbesondere für lebende Zellen geeignet, da sie in ihrem nativen Zustand beurteilt werden können und somit nicht in ihrer Funktion gestört werden (137).

Ein Kriterium der Makrophagenadhäsion stellte die Polarisierung dar, welche für jedes aufgenommene Phasenkontrastbild einzeln per Adobe Photoshop bestimmt und als Mittelwert von vier optischen Feldern angegeben wurde (35; 54; 55; 66). Hierfür wurden alle Zellen eines optischen Feldes in die beiden Kategorien polarisiert und nicht polarisiert unterteilt. Als polarisiert wurden alle Makrophagen bezeichnet, welche einen länglichen, spindelförmigen Zellkörper aufwiesen. Nicht polarisierte Zellen blieben in ihrer Morphologie hingegen eher rund und zeigten maximal rudimentäre Pseudopodien (Abb. 3). Die Polarisation wurde als prozentueller Anteil der polarisierten Zellen an der Gesamtzellzahl pro mikroskopisches Gesichtsfeld angegeben und es wurde ein Mittelwert aus mindestens 4 repräsentativen Bildern gebildet.

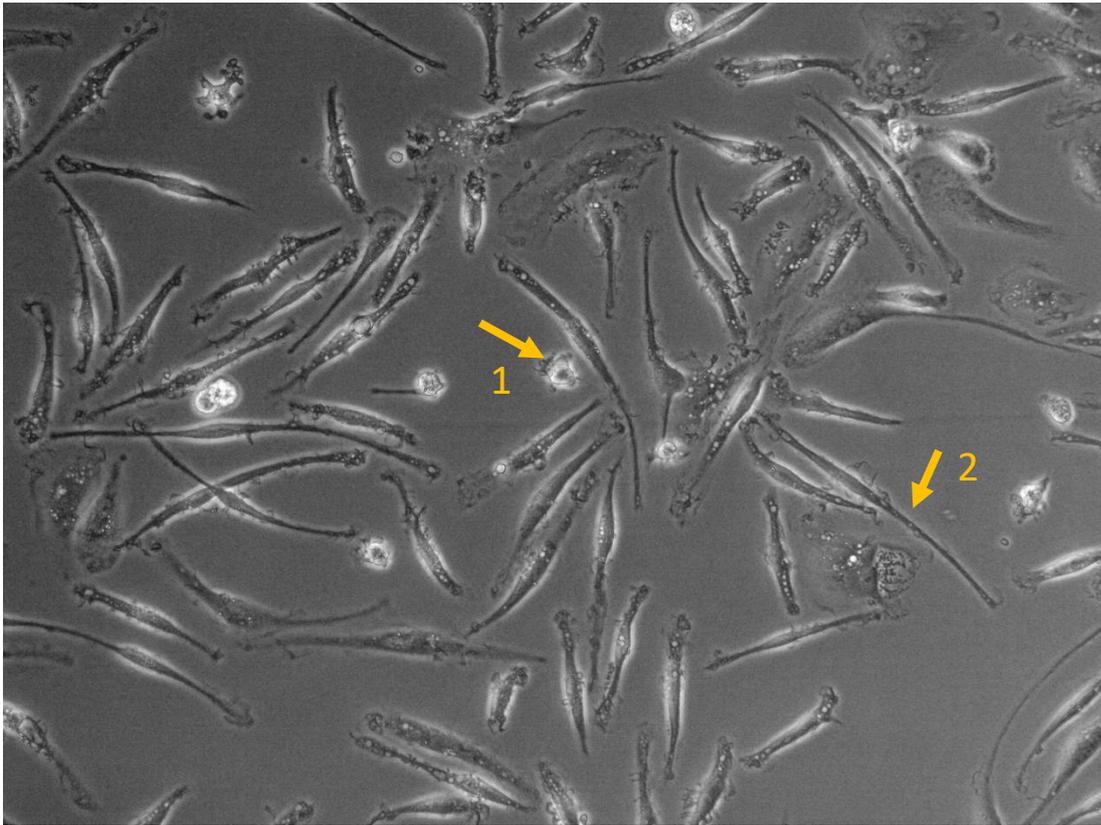


Abb. 3: Veranschaulichung der Kriterien für die Berechnung der Polarisierungsrate.

Der Pfeil mit Nummer 1 zeigt auf eine runde Zelle, welche als nicht polarisiert betrachtet wird. Pfeil Nummer 2 deutet hingegen auf einen länglichen, spindelförmigen Zellkörper. Diese Zelle wird somit als polarisiert gewertet und spiegelt das Spreading wieder. Die Polarisierungsrate wurde aus dem prozentualen Anteil polarisierter Zellen gemessen an der Gesamtzahl aller Zellen berechnet.

Ein Kriterium zur quantitativen Analyse der Zellmorphologie stellte der Elongationsindex dar, welcher sich aus dem Quotienten aus maximaler Zelllänge und maximaler Zellbreite einer Zelle berechnet (10; 120). Der minimale Wert dieses Indexes beträgt daher 1 und spiegelt eine runde Zelle wieder. Je größer der Index ist, desto länglicher (=elongierter) ist die Zelle (Abb. 4). Der Elongationsindex wurde für jede Zelle eines optischen Feldes angegeben.

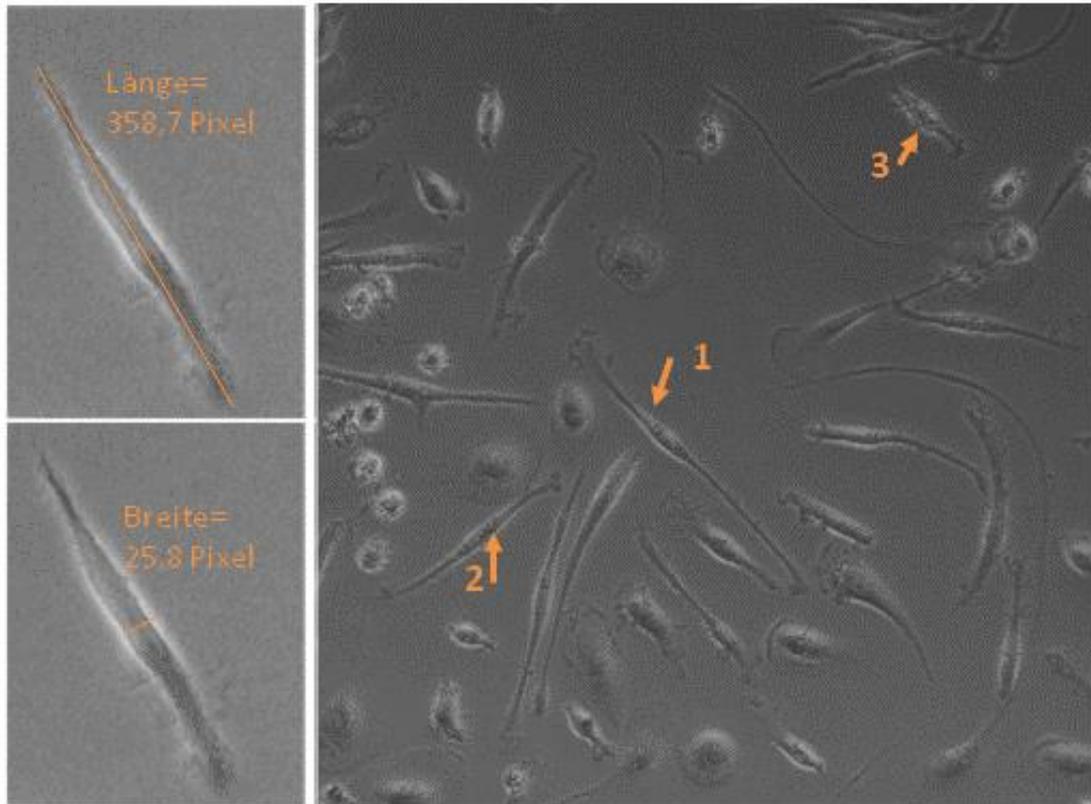


Abb. 4: Veranschaulichung der Kriterien für die Berechnung des Elongationsindex.

Der Elongationsindex wird aus dem Quotienten von Zelllänge und Zellbreite berechnet. Der Elongationsindex der Zelle auf der linken Seite beträgt beispielsweise 13,9 ($358,7 / 25,8$). Durch ihn ist es möglich, die Polarisationsrate zu quantifizieren: Zellen 1-3 auf der rechten Seite gelten alle als polarisiert, weisen jedoch unterschiedlich hohe Elongationsindizes auf.

Als letztes Kriterium der Makrophagenmorphologie wurden die Filopodien herangezogen. Filopodien sind fingerförmige Ausläufer des Zytoskeletts, bestehend aus parallel angeordneten F-Aktin-Filamenten, und sind unter anderem ein wichtiger Bestandteil für die Phagozytose (60). Hierfür wurde einerseits das Vorhandensein von Filopodien in der Phasenkontrastmikroskopie überprüft, indem an Tag 7 die Makrophagen eines optischen Feldes auf das prinzipielle Vorhandensein von Filopodien hin untersucht wurden, unabhängig von der Anzahl von Filopodien pro Zelle (Abb. 5A). Die Makrophagen, welche Filopodien enthielten, wurden prozentual als Filopodienpositiv bezogen auf die Gesamtzahl der Makrophagen angegeben (analysiert mittels Adobe Photoshop). Es wurde ein Mittelwert aus 4 optischen Feldern gebildet. Andererseits wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung die durchschnittliche Anzahl an Filopodien pro Zelle bestimmt. Hierfür erfolgte eine Anfärbung der Makrophagen mit Phalloidin, konjugiert an Alexa 546. Phalloidin ist ein Toxin des Knollenblätterpilzes und weist eine hohe Affinität für F-Aktin auf, wodurch dieses dargestellt

werden kann (16). Phalloidin wurde in einer Verdünnung von 1:40 zu den Zellen hinzugegeben (für eine genaue Beschreibung der Probenvorbereitung und Analyse siehe 3.6. Fluoreszenzmikroskopie). Hierdurch konnte das Aktinzytoskelett, inklusive eventuell vorhandener Filopodien, mittels Fluoreszenzmikroskop in 40-facher Vergrößerung als rot-fluoreszierendes Signal detektiert werden (Abb. 5B). Es wurde bei jeder Zelle die Anzahl an Filopodien mittels Adobe Photoshop gezählt und ein Mittelwert aus allen Zellen eines optischen Feldes ermittelt. Insgesamt wurden pro Ansatz 4 verschiedene optische Felder ausgewertet und aus diesen wiederum ein Mittelwert gebildet.

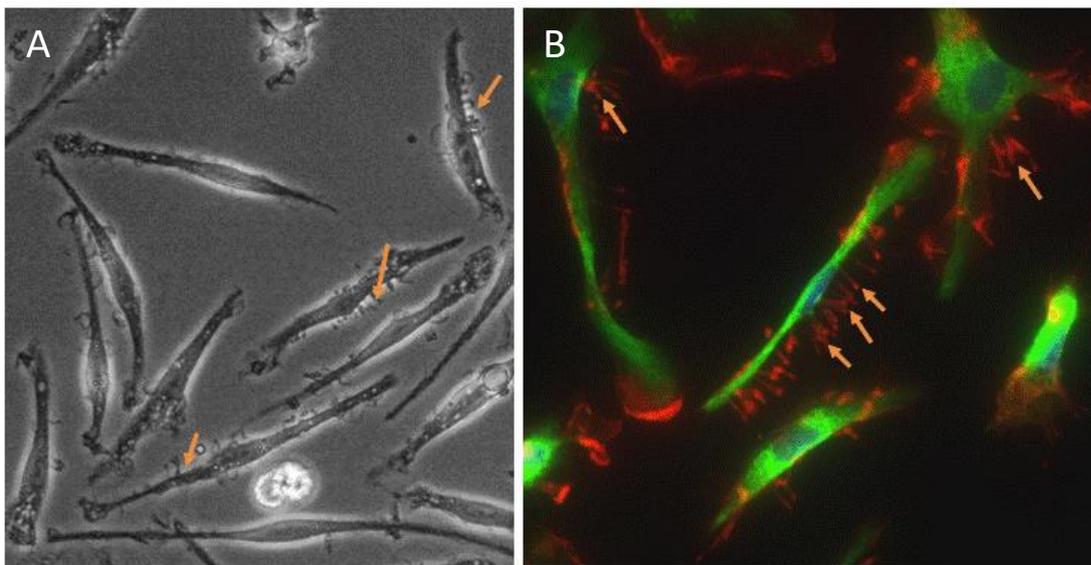


Abb. 5: Darstellung von Filopodien.

(A) Die Pfeile deuten auf Filopodien, welche mit einem Phasenkontrastmikroskop detektiert wurden. (B) Durch Phalloidin-Alexa 546 (rot) angefärbte Filopodien wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskop dargestellt. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf diese Strukturen.

3.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde zur Phänotypisierung von Makrophagen sowie zum Nachweis von Filopodien (3.5. Morphologische Analyse der Makrophagenkultur) und der Phagozytose (3.7. Phagozytoseassay) angewendet. Hierbei werden Antigene (Ag) durch Bindung mit spezifischen, fluoreszenzgefärbten Antikörpern oder anderen fluoreszierenden Liganden (z.B. Phalloidin für F-Aktin) unter einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen (124). Dabei wird zwischen der direkten und indirekten Immunfluoreszenz (IF) unterschieden. Bei der direkten IF ist der fluoreszierende Farbstoff direkt an einen Antikörper konjugiert, der sich gegen das zu de-

tektierende Antigen richtet. Im Gegensatz dazu werden bei der indirekten IF zwei Antikörper verwendet. Der erste (=primäre) Antikörper, welcher sich gegen das gewünschte Antigen richtet, ist in diesem Fall unkonjugiert. Der zweite (= sekundäre) Antikörper richtet sich gegen den primären Antikörper und ist an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. Er dient somit der Detektion des Antigen-gebundenen Antikörpers. Im Rahmen der Studie wurde ausschließlich die indirekte Immunfluoreszenz angewendet.

In unserer Studie wurden Antikörper gegen CD68, welches spezifisch auf der Oberfläche von Monozyten/Makrophagen nachgewiesen werden kann und somit als Marker für diese Zellreihe dient, verwendet (17; 115). Antikörper gegen CD206 wurden eingesetzt, da dieses Antigen typisch für GM-CSF-differenzierte Makrophagen ist, während Antikörper gegen CD163 zur Erkennung von M-CSF-behandelten M2-Makrophagen dienen (3; 96; 115). TNF α wird von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen und in geringerer Menge von regenerativen M2-Makrophagen produziert, kommt aber nicht in ruhenden Monozyten vor (25; 115). Insofern dient der Nachweis von TNF α durch entsprechende Antikörper dem Nachweis der Makrophagendifferenzierung.

Zur Immunfluoreszenzfärbung mit den genannten Antikörpern wurden die Makrophagen zunächst mit eiskaltem, 4% -igem PFA fixiert (20 Minuten, 4°C), dann mit 0,1%-igem Triton x 100 permeabilisiert (10 Minuten, RT) und schließlich 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermindern, wurden die Zellen anschließend mit PBS + 2% BSA geblockt (20 Minuten, RT) bevor die primäre Antikörperlösung beigefügt wurde (über 16 h bei 4°C). Die Antikörper waren in 2% BSA/PBS verdünnt (anti-CD68, 20 μ g/ml; anti-TNF α , 10 μ g/ml; anti-CD206, 10 μ g/ml; anti-CD163, 10 μ g/ml). Um die Spezifität der Antikörperbindung zu belegen, wurden die Zellen in einem ansonsten identischen Verfahren mit unspezifisch bindendem IgG der gleichen Spezies, Subklasse (bei monoklonalen Mausantikörpern) und Konzentration inkubiert (125). Nachdem die Zellen mit dem primären Antikörper über Nacht inkubiert wurden, wurden die Objektträger zweimal mit je 400 μ l PBS und einmal mit 400 μ l 2% BSA/PBS für jeweils 5 Minuten auf dem Shaker gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde jedes Well für 30 Minuten mit je 250 μ l sekundärer Antikörperlösung inkubiert, welche sich gegen den primären Antikörper richtete und mit dem Fluoreszenz-

farbstoff Alexa 488 konjugiert war (Verdünnung 1:100 in 2% BSA/PBS). Ab diesem Zeitpunkt wurde der Raum abgedunkelt, da der Fluoreszenzfarbstoff sehr lichtempfindlich ist. Nach der 30-minütigen Inkubation folgte dreimal hintereinander ein 5-minütiger Waschschrift mit je 400 µl PBS. Nach dem letzten Waschschrift wurde das vorhandene PBS entfernt und der Objektträger von der Kammer separiert, jedes Well mit einem Tropfen DAPI-Mounting Medium bedeckt, ein Deckglas auf den Objektträger gelegt und dieses mit Nagellack an den Seiten versiegelt.

Nachdem die Zellen auf den zu analysierenden Marker mittels fluoreszierender Farbstoffe, sog. Fluorochrome, angefärbt wurden, wurden sie mit einem Immunfluoreszenzmikroskop dargestellt. Das Immunfluoreszenzmikroskop enthält verschiedene Filter, wodurch nur Licht mit bestimmter Wellenlänge durchgelassen wird. Durch dieses sogenannte Anregungslicht werden die Fluorochrome angeregt und emittieren anschließend ein Licht, welches langwelliger ist als das Anregungslicht. Dieses Emissionslicht ermöglicht eine optische Detektion der zu analysierenden Marker (6). Zellstrukturen, welche mit Alexa 488 oder Alexa 546 angefärbt wurden, erscheinen somit als grünes bzw. rotes Signal. Der Zellkern erscheint hingegen durch DAPI angefärbt blau. Um die Intensität des detektierten Signals anzupassen, wurde die Belichtungszeit entsprechend variiert. Innerhalb der Analyse desselben Markers wurde die Belichtungszeit jedoch bei allen Samples identisch gehalten.

Zur Analyse der einzelnen Marker wurden die aufgenommenen Bilder in 20-facher Vergrößerung mittels Adobe Photoshop zum Nachweis der Signalspezifität im direkten Vergleich zur Isotypkontrolle ausgewertet. Die Expression der jeweiligen Marker wurde als prozentueller Anteil der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl pro optisches Feld ausgewertet und als Mittelwert aus 4 optischen Feldern angegeben. Als positiv wurde eine Zelle bewertet sobald in ihrem Zytoplasma der Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 grün aufleuchtete. Als negativ wurden hingegen alle Zellen gezählt, bei denen nur der Zellkern blau angefärbt war, aber kein grünes Signal zu detektieren war (Abb. 6).

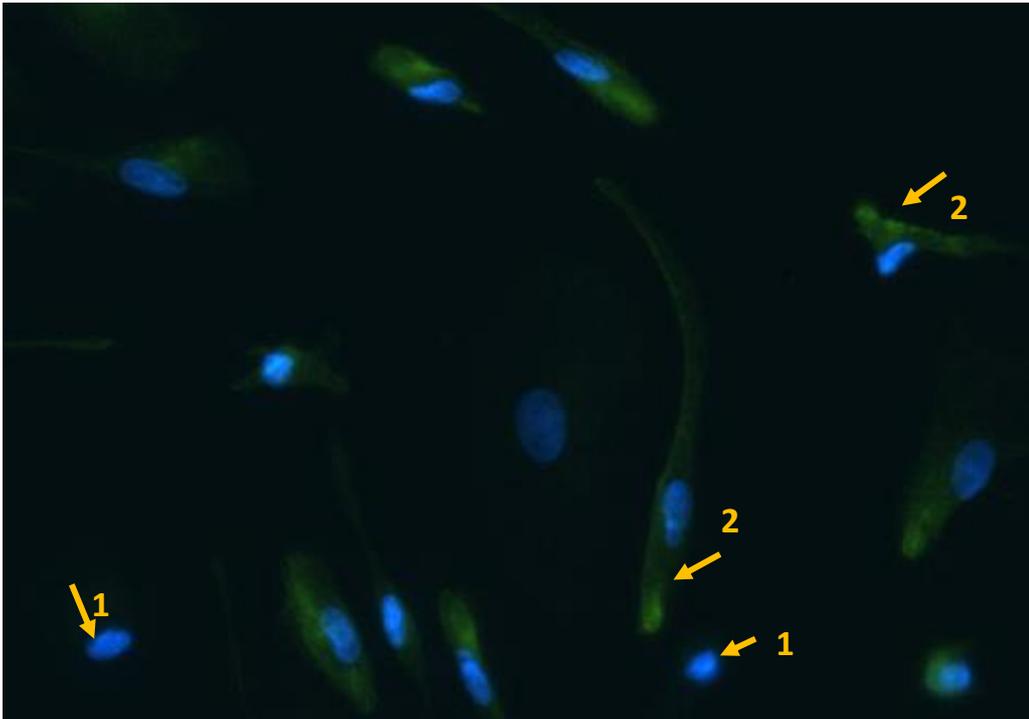


Abb. 6: Analyse der durch Immunfluoreszenz angeführten Marker.

Zellkerne sind durch DAPI blau und der zu analysierende Marker mit Alexa 488 grün angeführt. Die Pfeile mit Nummer 1 stellen beispielhaft Marker-negative Zellen dar, wo hingegen ein Teil der Marker-positiven Zellen durch den Pfeil mit der Nummer 2 gekennzeichnet sind.

3.7 Phagozytoseassay

Während der Wundheilung werden Zelldetritus und extravasale rote Blutzellen durch M2-Makrophagen phagozytiert, indem sie IgG- und anderweitig opsonierte Partikel durch Pseudopodien und Fc γ -Rezeptoren in ihr Zellinneres aufnehmen (11). Die Phagozytose stellt somit eine zentrale Rolle der Makrophagenfunktion, insbesondere von M2-Makrophagen, dar (18; 44). Um die Fähigkeit zur Phagozytose zu überprüfen, wurden die Makrophagen nach einer Woche Zellkultur in Differenzierungsmedium entweder mit FITC-konjugierten Latex-IgG-Beads oder mit Fluoreszenzmarkierten roten Blutzellen inkubiert und anschließend mittels Immunfluoreszenzmikroskop auf ihre Phagozytoserate untersucht. Am Tag des Phagozytoseassays wurden zusätzlich von jeder Behandlungsgruppe 4 repräsentative Phasenkontrastbilder in 20-facher Vergrößerung aufgenommen, um die Polarisierung der Makrophagen mit der Phagozytoserate zu vergleichen.

Phagozytose von Latex-Beads. Um die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen zu überprüfen, wurde das Medium aus den in einem 8-Well Chamber Slide stimulierten

Makrophagen bis auf ein Restvolumen von 200 μl pro Well entfernt. Dann wurden IgG-konjugierte, fluoreszierende Latex-Partikel mit einer mittleren Teilchengröße von 0,1 μm (Cayman Chemical) zugegeben (in 50 μl , Endverdünnung 1:250) (127). Nach 60 Minuten Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und jedes Well für 2 Minuten mit 100 μl Trypan Blue Quenching Lösung (Verdünnung 1:10) inkubiert, um die Fluoreszenz von nicht internalisierten Beads auszulöschen. Nach 2 Minuten wurde das Trypan Blau wieder entfernt und die Slides zweimal für 5 Minuten mit je 400 μl Assay Puffer pro Well gewaschen, um ungebundene Latex-Beads zu entfernen. Im Anschluss an die beiden Waschschrte wurden die Slides mit eiskaltem, gefiltertem PFA fixiert (4%, 400 μl pro Well, 20 Minuten), dann wiederum 3 x gewaschen. Nach dem letzten Waschschrte wurde die gesamte Flüssigkeit aus den 8-Well Chamber Slides entfernt und der Objektträger von der Kammer separiert. Der Objektträger wurde mit einer Schicht Mountingmedium benetzt und dann mit einem Deckglas bedeckt, das mit Nagellack versiegelt wurde. Der Objektträger wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse TS100) in 20- und 40-facher Vergrößerung analysiert. Zum einen wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie das FITC-Signal (=grünes Signal) erfasst, welches die Phagozytose widerspiegelt, und zum anderen ein Phasenkontrastbild aufgenommen. Anhand des Überlagerungsbildes konnte gezeigt werden, dass die Latex-Beads tatsächlich innerhalb der Zelle liegen (Abb. 7). Der Zellkern wurde mittels DAPI visualisiert (blau), welches im Mountingmedium enthalten ist. Anhand von 4 repräsentativen Bildern in 20-facher Vergrößerung wurde mittels Adobe Photoshop die Phagozytoserate zu jedem Treatment prozentual (Phagozytose-positive Zellen \times 100/gesamte Zellzahl) berechnet und diese mit der ebenfalls über Photoshop analysierten Polarisierungsrate verglichen. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die nicht mit Trypan Blau gequencht wurden; als Negativkontrollen dienten Präparate ohne Latex-Beads.

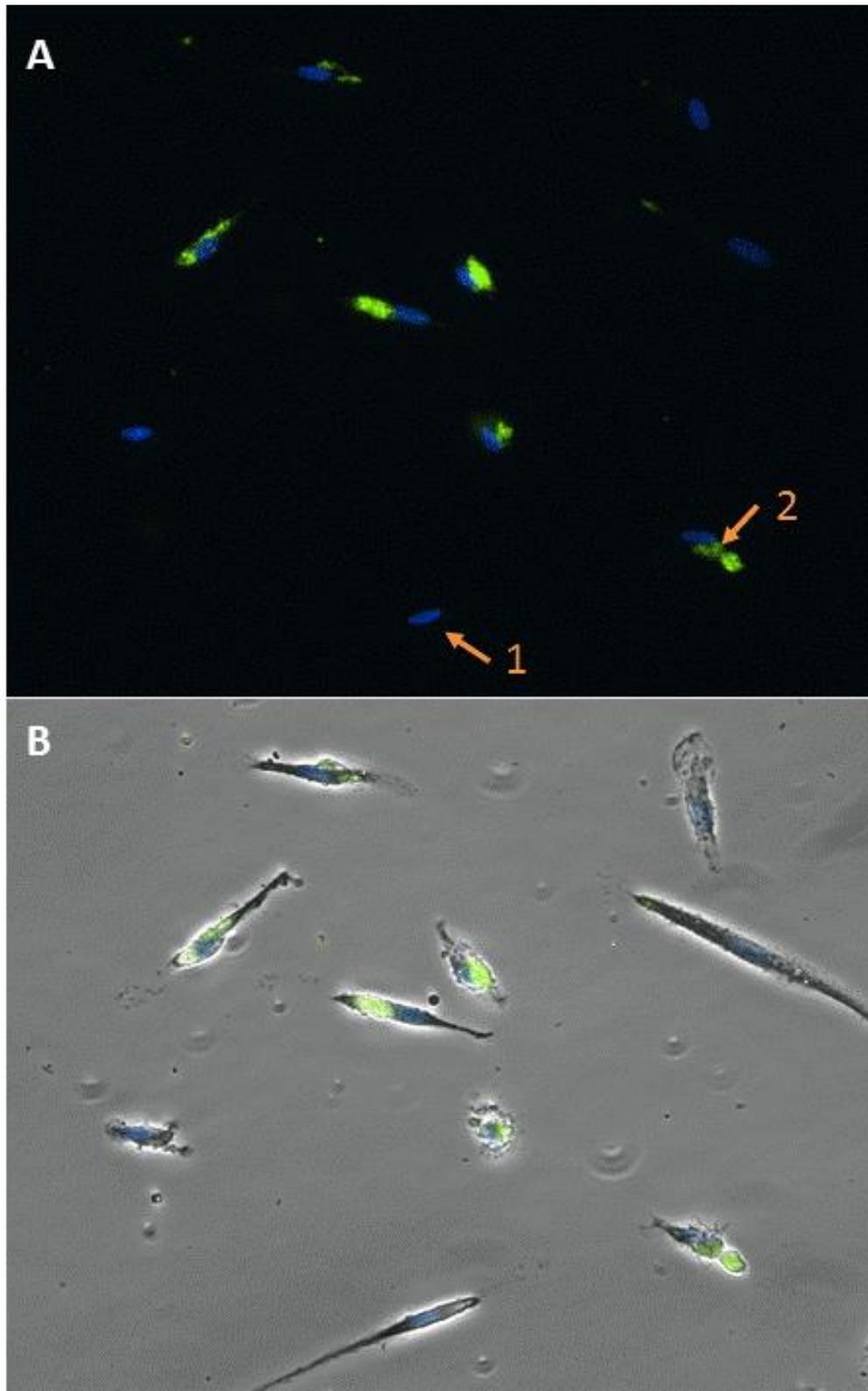


Abb. 7: Auswertung der Phagozytoserate.

(A) Fluoreszenzmikroskopieaufnahme von FITC-konjugierten Latex-Beads, welche durch Makrophagen phagozytiert wurden. Der Zellkern stellt sich durch DAPI angefärbt blau und die aufgenommenen Latex-Beads grün dar. Zelle 1 stellt hierbei einen Makrophagen dar, der keine Latex-Beads phagozytiert hat (Phagozytose-negativ), während Zelle 2 als Phagozytose-positiv eingestuft wird. (B) Merge-Bild, bestehend aus Fluoreszenzbild und Phasenkontrastbild.

Phagozytose von RBCs. Um die über 8 Tage mit GM-CSF- bzw. M-CSF-stimulierten M1- bzw. M2-Makrophagen mit RBCs zu inkubieren, mussten zunächst die RBCs isoliert und vorbereitet werden. Hierfür wurde Vollblut eines Spenders in EDTA-haltigen Röhrchen abgenommen und 1:1 mit PBS + 5 mM EDTA gemischt. Dann wurde das Blut bei 300 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend das Plasma und der Buffy Coat entfernt, so dass nur noch RBCs zurückbleiben. Die RBCs wurden dreimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Hierzu wurde die Zellsuspension bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in PBS resuspendiert. Nach dem 3. Waschschrift wurden die RBCs erneut in PBS resuspendiert und mittels eines Zellzählers (KX-21NTM, Sysmex) gezählt (132). Aus der Zellsuspension wurden 5×10^8 Zellen entnommen, in ein 1,7 ml Röhrchen überführt und bei 2000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe mit je 1 ml PBS. Um die Phagozytose mittels Immunfluoreszenzmikroskop nachweisen zu können, wurden die RBCs mit Cell Tracker Green CMFDA markiert, welcher zunächst als 10 mM-Lösung mit DMSO angesetzt wurde. 5 μ l dieser Ausgangskonzentration wurden in 1 ml serumfreiem RPMI-Medium zu einer 50 μ M Lösung verdünnt. Das Pellet der 5×10^8 RBCs, welche zuvor gewaschen wurden, wurde in 1 ml Medium + 50 μ M des Cell Trackers Green CMFDA resuspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Shaker lichtgeschützt inkubiert. Außerdem wurden die RBCs mit einem Antikörper gegen das Rhesusmerkmal D markiert, um die Phagozytose zu stimulieren. Hierfür wurden die RBCs, welche bereits mit dem Cell Tracker markiert wurden, bei 2000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet mit 1 ml anti-D in einer Konzentration von 100 μ g/ml inkubiert. 2×10^8 RBCs wurden schließlich in ein neues 1,7 ml Röhrchen überführt, bei 2000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und mit 1 ml serumfreien RPMI Medium resuspendiert. Um die Phagozytose zu testen, wurden 8 Tage alte, M-CSF-stimulierte Makrophagen mit den vorbereiteten RBCs inkubiert. Das Protokoll entsprach hierbei dem Versuchsablauf des Phagozytoseassays mit Latex-Beads. Statt des Trypan Blue Quenchings wurde allerdings jedes Well nach Beendigung der Inkubationszeit 40 Sekunden mit 300 μ l eiskaltem H₂O behandelt, um die nicht phagozytierten RBCs zu lysieren. Die weitere Verarbeitung und Analyse der Objektträger erfolgte dann wiederum analog zum Latex-Beads-Assay.

3.8 Kultivierung von Makrophagen in Plasmaclots

Nach einer Verletzung kommt es physiologischerweise zu einer lokalen Gerinnungsbildung (53). Das geronnene Plasma stellt somit im Anschluss an eine Verletzung eine mechanische Gewebsbarriere dar. Damit Makrophagen ihre Funktion in der Wundheilung ausüben können, müssen sie in der Lage sein, durch das geronnene Plasma hindurch zu dem Ort des Geschehens zu wandern. Um die Invasionsfähigkeit von Makrophagen zu überprüfen, wurden Monozyten in Plasmaclots eingebettet. Das verwendete Plasma stammte von einem gesunden Individuum, dem 20 ml peripheren venöses Vollblut in zitrathaltigen Röhrchen abgenommen und für 20 Minuten bei 3000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Plasma abpipettiert und bis zur 3D-Einbettung bei -80°C eingefroren.

Für die Einbettung wurden Monozyten mittels der Dynabeads[®]-No-Touch-Methode isoliert. $3,57 \times 10^4$ Monozyten wurden dann in eiskaltes PBS/0,5% BSA in 1,7 ml Eppendorfröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 2000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und eiskalte Gerinnungsreagenzien, bestehend aus 94 μl Plasma, 6 μl CaCl_2 (100 mM) und 2,5 U/ml Thrombin (im Verhältnis 1:1), wurden dem Pellet hinzugefügt. Thrombin wurde hierbei immer als letztes beigemischt, da hierdurch die Gerinnung aktiviert wird. Dann wurden 4 bis 5 $15 \mu\text{l}$ große Clots möglichst schnell auf 6-Well Platten pipettiert. Zwischen den einzelnen Ansätzen wurden die Platten für etwa 10 Minuten umgedreht, damit die Zellen nicht am Boden des Clots sedimentieren. Sobald die Clots vollständig geliert waren, wurden die Kulturplatten wieder zurückgedreht, die Wells mit 2 ml vorgewärmtem Kulturmedium (mit M-CSF, GM-CSF oder untreated) gefüllt und für 7 Tage bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert. Analog zu der 2D-Einbettung wurden täglich repräsentative Bilder (pro Clot 3-4) der eingebetteten Zellen mittels Phasenkontrastmikroskop aufgenommen. Um die Invasivität der Makrophagen zu bestimmen, wurden die Bilder hinsichtlich Polarisierung (Adobe Photoshop) und Elongationsindex (Image J) analysiert. Für die Polarisierung in 3D ist das Vorhandensein von invasiven Podosomen kennzeichnend. Zellen mit einem länglichen, elongierten Zellkörper wurden als Podosomen-positiv bezeichnet, während dessen runde Zellen als Podosomen-negativ gewertet wurden. Es wurde der prozentuale Anteil an Podosomen-positiver Zellen gemessen an der Gesamtzellzahl pro optisches Feld als Mittelwert aus 3-4 optischen Feldern in 5 Clots ermittelt. Die Zellinvasion wurde außerdem mittels Elongationsindex (Quotient

aus maximaler Zelllänge und Zellbreite) quantifiziert (10; 120). Je höher der Elongationsindex war, desto ausgeprägter war die Invasion. Der Elongationsindex wurde für jede Zelle eines optischen Feldes bestimmt und als Mittelwert aller Zellen aus 3-4 optischen Feldern pro Clot in insgesamt 5 Plasmaclots angegeben.

3.9 Statistische Analyse

Die Signifikanz der einzelnen Ergebnisse wurde mittels t-Test bzw. ANOVA, gefolgt vom Tukey's Multiple Comparisons Test mit dem Programm GraphPad Prism 5 überprüft. Ein zweiseitiger p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant definiert.

4 Ergebnisse

4.1 Qualität der Monozytenpopulation

Die im Rahmen der Studie erhobenen Ergebnisse beziehen sich auf Makrophagen, die aus Monozyten von gesunden Spendern bzw. Hämophilie-Patienten hervorgegangen sind. Die Monozyten wurden hierfür über zwei verschiedene Methoden isoliert. Zum einen wurden PBMCs durch die Adhäsionsmethode weiter aufgereinigt, indem PBMCs auf Plastik ausgesät wurden und nach kurzer Inkubationszeit die Non-Monozyten, welche sich in Suspension befanden, von den adhärenen Monozyten entfernt werden konnten. Diese Art der Monozytenisolierung wurde für die Bestimmung der Polarisierung unter einem M-CSF-Stimulus verwendet. Zum anderen wurden Monozyten aus PBMCs über die Untouched-Methode mittels Dynabeads[®] isoliert. PBMCs wurden hierfür mit einem Antikörpermix, welcher Leukozyten außer Monozyten bindet, sowie mit Magnetic-Beads versetzt. Die gebundenen Zellen wurden anschließend mittels Magneten von Monozyten separiert. Die so isolierten Monozyten wurden zur morphologischen Analyse, Clotinvation, Immunfluoreszenz und Phagozytose verwendet. Um sicherzugehen, dass diese Methode der Isolierung tatsächlich eine hohe Reinheit an Monozyten hervorbringt, wurden die isolierten Zellen für 7 Tage mit M-CSF oder GM-CSF inkubiert, an Tag 7 fixiert und anschließend per Immunfluoreszenzfärbung mit anti-CD68 markiert. CD68 diente hierbei als Marker für Monozyten und Makrophagen (17; 115). Sowohl in Spendern als auch in Hämophilie-Patienten lag eine über 90% Expression von CD68 in M-CSF- und GM-CSF-stimulierten Makrophagen vor (Abb. 8). Dies zeigt eine hohe Reinheit von Monozyten nach Isolierung mit der Dynabeads[®]-Untouched-Methode an und sichert somit, dass die im Folgenden erhobenen Ergebnisse auf die Makrophagen selbst und nicht auf eventuell andere Zellen zurückzuführen sind.

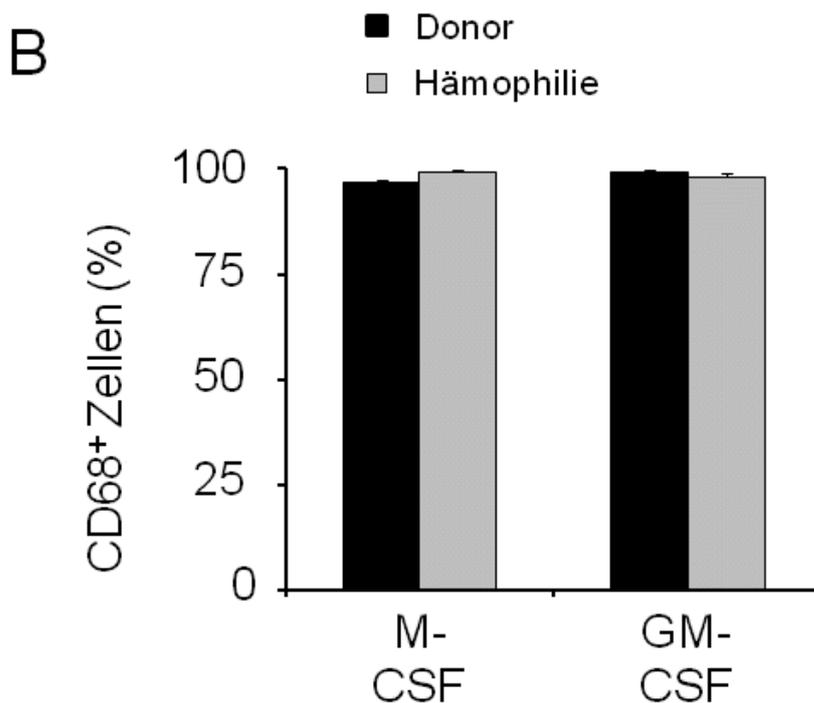
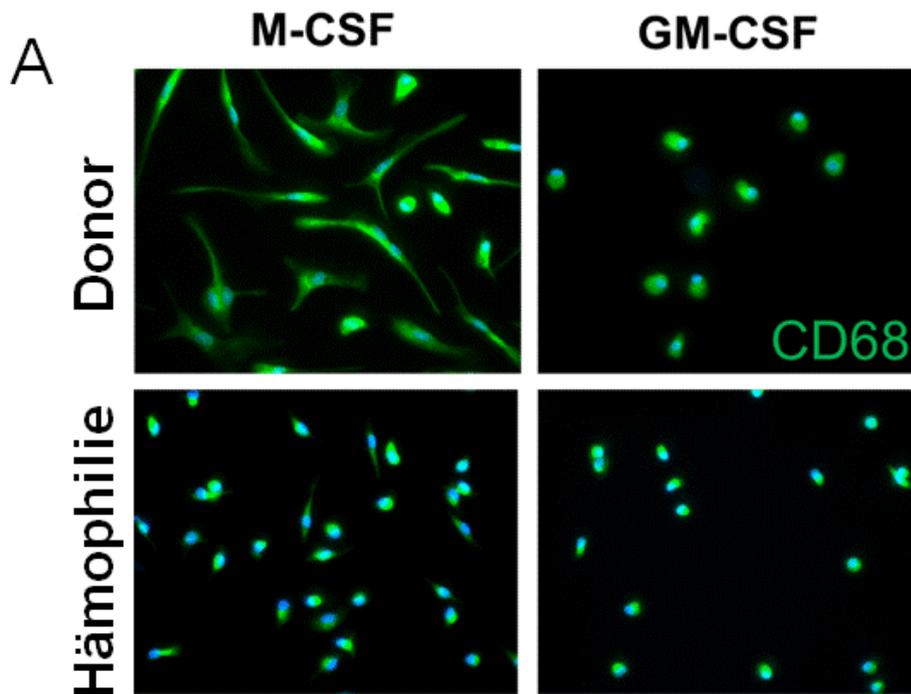


Abb. 8: Monozytenisolation mit der Dynabeads® Untouched-Methode

(A), Repräsentative Immunfluoreszenzmikroskopiebilder (40-fache Vergrößerung) von Monozyten, die mittels Dynabeads® aus PBMCs von gesunden Blutspendern sowie von Hämophilie-Patienten isoliert, für 7 Tage mit 100 ng/ml M-CSF oder 125 ng/ml GM-CSF auf Objektträgern kultiviert, fixiert und mit anti-CD68/Alexa 488 anti-mouse IgG (grün) angefärbt wurden. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) markiert. (B), Anzahl CD68-positiver Makrophagen pro Sichtfeld in Prozent nach 7-tägiger Zellkultur.

4.2 Spreading und Polarisierung sind bei Makrophagen von Hämophilie-Patienten vermindert

Makrophagen werden während einer Verletzung in das Wundgebiet rekrutiert, um als Effektorzellen bei der Inflammation und Wundheilung mitzuwirken (46). Damit Makrophagen in der Lage sind in das Wundgebiet einzuwandern, bilden sie adhäsive Interaktionen mit der extrazellulären Matrix aus. Die Adhäsionsfähigkeit der Makrophagen stellt allerdings nicht nur eine essentielle Funktion im Rahmen der Wundheilung bzw. Inflammation dar, sondern spiegelt zusammen mit dynamischen Veränderungen des Zytoskeletts auch die Aktivierung von spezifischen Signalkaskaden und Genexpressionsmustern wieder (75). So führt die Kultivierung von Monozyten mit M-CSF *in vitro* sowohl zu funktionellen als auch zu morphologischen Veränderungen. Funktionell leitet M-CSF die Differenzierung von Monozyten in anti-inflammatorische M2-Makrophagen ein (25; 111). Gleichzeitig bewirkt M-CSF spezifische morphologische Veränderungen, die durch ausgeprägtes Spreading und einen elongierten/polarisierten Zellphänotyp gekennzeichnet sind (38; 115).

Um diese spezifischen morphologischen Veränderungen von Makrophagen zu analysieren, wurden Monozyten von Hämophilie-Patienten und gesunden Blutspendern mittels Dynabeads[®] isoliert und über 7 Tage in Plastikschaalen zusammen mit GM-CSF (M1-Polarisierung) bzw. M-CSF (M2-Polarisierung) kultiviert. Dabei wurden die morphologischen Veränderungen, die bei der Makrophagendifferenzierung auftreten, mittels Phasenkontrastmikroskopie dokumentiert. Bei Monozyten von Spendern stellte sich in Gegenwart von M-CSF relativ rasch eine morphologische Umwandlung von runden Zellen hin zu länglichen, spindelförmigen Zellen im Sinne einer Polarisierung ein (Abb. 9A). Der spindelförmige Phänotyp war ab Tag 3 eindeutig nachzuweisen (18,8% polarisierte Zellen) und nahm auch weiterhin kontinuierlich zu. Insofern waren an Tag 5 44% der Zellen und an Tag 7 über 60% aller Zellen polarisiert (Abb. 10A). Im Gegensatz hierzu trat bei Spendermonozyten nach Stimulation mit GM-CSF während der 7-tägigen Kultur kaum eine Polarisierung auf (Abb. 9B, 10A). Die geringere Polarisationsrate in GM-CSF zeigte zudem im Gegensatz zu M-CSF keine kontinuierliche Steigerung, sondern nahm an Tag 3 mit 10,7% einen Maximalwert an. Danach war die Polarisierung wieder leicht rückläufig (7,8% an Tag 5; 6,3% an Tag 7). Diese Daten reflektieren substantielle morphologische Unterschiede von Makrophagen nach Differenzierung mit GM-CSF, welche im

Gegensatz zu M-CSF-behandelten Makrophagen überwiegend rund blieben, obwohl eine Größenzunahme ihres Durchmessers durchaus zu verzeichnen war. Es ist daher davon auszugehen, dass diese Zellen während des Spreadingprozesses flacher wurden (Abb. 9B). Die vereinzelt vorhandenen Pseudopodien sahen des Weiteren größtenteils verschieden zu Pseudopodien in M-CSF-stimulierten Zellen aus: Während in M2-Makrophagen (M-CSF) Pseudopodien fast immer mit einem sehr schmalen, aber länglichen Zellkörper vergesellschaftet waren, war in M1-Makrophagen (GM-CSF) wenn überhaupt nur ein einzelnes Pseudopodium vorhanden, welches aus dem kugeligen, spiegeleiförmigen Zellkörper empor-ragte (Abb. 9A-B). Entsprechend wurden die Unterschiede der Polarisationsrate auch anhand des Elongationsindexes (Zelllänge/Zellbreite) deutlich. Der durchschnittliche Elongationsindex pro Zelle an Tag 7 lag mit knapp 10 in M-CSF-stimulierten Spendermonozyten deutlich höher als in GM-CSF-stimulierten Zellen, welche auch im polarisierten Zustand deutlich weniger verlängert aussahen (Elongationsindex < 2) (Abb. 10B).

Monozyten von Hämophilie-Patienten zeigten interessanterweise ein Adhäsionsverhalten, welches sehr stark von dem der Spendermonozyten abwich. So war es den Monozyten von Hämophilie-Patienten auch in Gegenwart von M-CSF kaum möglich zu polarisieren (Abb. 9C). Eine geringgradige Polarisation konnte im Vergleich zu Spendermakrophagen erst verzögert ab Tag 5 mit etwa 15% (Spender: 44%) festgestellt werden. Sie erreichte auch an Tag 7 nur einen Anteil an polarisierten Zellen von knapp 30% (Spender: 66,5%) (Abb. 10A). Der Elongationsindex lag mit 3,0 ebenfalls stark hinter dem der Spender (Elongationsindex 9,3) zurück (Abb. 10B). Da die Polarisation bei einer Stimulation mit GM-CSF bereits in Spendern sehr gering war, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Spendern und Hämophilie-Patienten bezüglich Polarisationsrate und Elongationsindex festgestellt werden. Es wurde zwischen Tag 3 und Tag 7 eine etwa gleichbleibende Polarisation der GM-CSF-stimulierten Monozyten von Hämophilie-Patienten auf niedrigem Niveau erreicht (etwa 6%) (Abb. 10A). Der Elongationsindex an Tag 7 erbrachte einen Wert von 1,5 (Abb. 10B). Bemerkenswert ist, dass sich trotz fehlender Signifikanz bezüglich Polarisation zwischen Spendern und Hämophilie-Patienten unter einem GM-CSF Treatment die Morphologie durchaus unterscheidet. Während Monozyten aus gesunden Spendern wie oben beschrieben in der Lage waren, sich auszubreiten und somit abzuflachen, veränderten Monozyten aus Hämophilieblut in der Mehrzahl der

Fälle kaum ihre Größe und ihr Aussehen, sondern blieben als kleine, kugelige Zellen zurück (Abb. 9C-D).

Die gewonnenen Ergebnisse der Polarisierung von Dynabeads[®]-isolierten Makrophagen wurden zudem durch die Verwendung von PBMCs von Patienten und Spendern bestätigt. Hierbei wurden die PBMCs durch das Adhäsionsverfahren aufgereinigt und über 7 Tage mit M-CSF inkubiert. Die Gabe von M-CSF führte wie bereits bei der Untouched-Methode zu der typischen Polarisierung von Spendermakrophagen, welche bei Hämophilie-Patienten entsprechend signifikant reduziert war (Abb. 10C). Die Anzahl an prozentual polarisierten Zellen zeigte auch unter Spendern geringfügige Unterschiede, lag aber mit Werten zwischen 46,3% und 63,4% an Tag 7 stets signifikant höher als bei den Hämophilie-Patienten, welche ebenfalls eine gewisse Individualität untereinander aufwiesen. Je nach Hämophilie-Patient wurden Polarisationsraten von 7,6% bis zu 29,0% erreicht. Der durchschnittliche Elongationsindex von Spendern an Tag 7 lag mit 5,9 ebenfalls deutlich höher als der durchschnittliche Elongationsindex von Hämophilie-Patienten, welcher bei 2,5 lag (Abb. 10D).

Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass Monozyten von Hämophilie-Patienten nicht adäquat auf den Differenzierungsstimulus von M-CSF reagieren und daher nur eine eingeschränkte Polarisation aufweisen. Dies lässt auf erhebliche funktionelle Unterschiede zwischen Makrophagen von Hämophilie-Patienten und gesunden Spendern schließen, die wir nachfolgend untersucht haben.

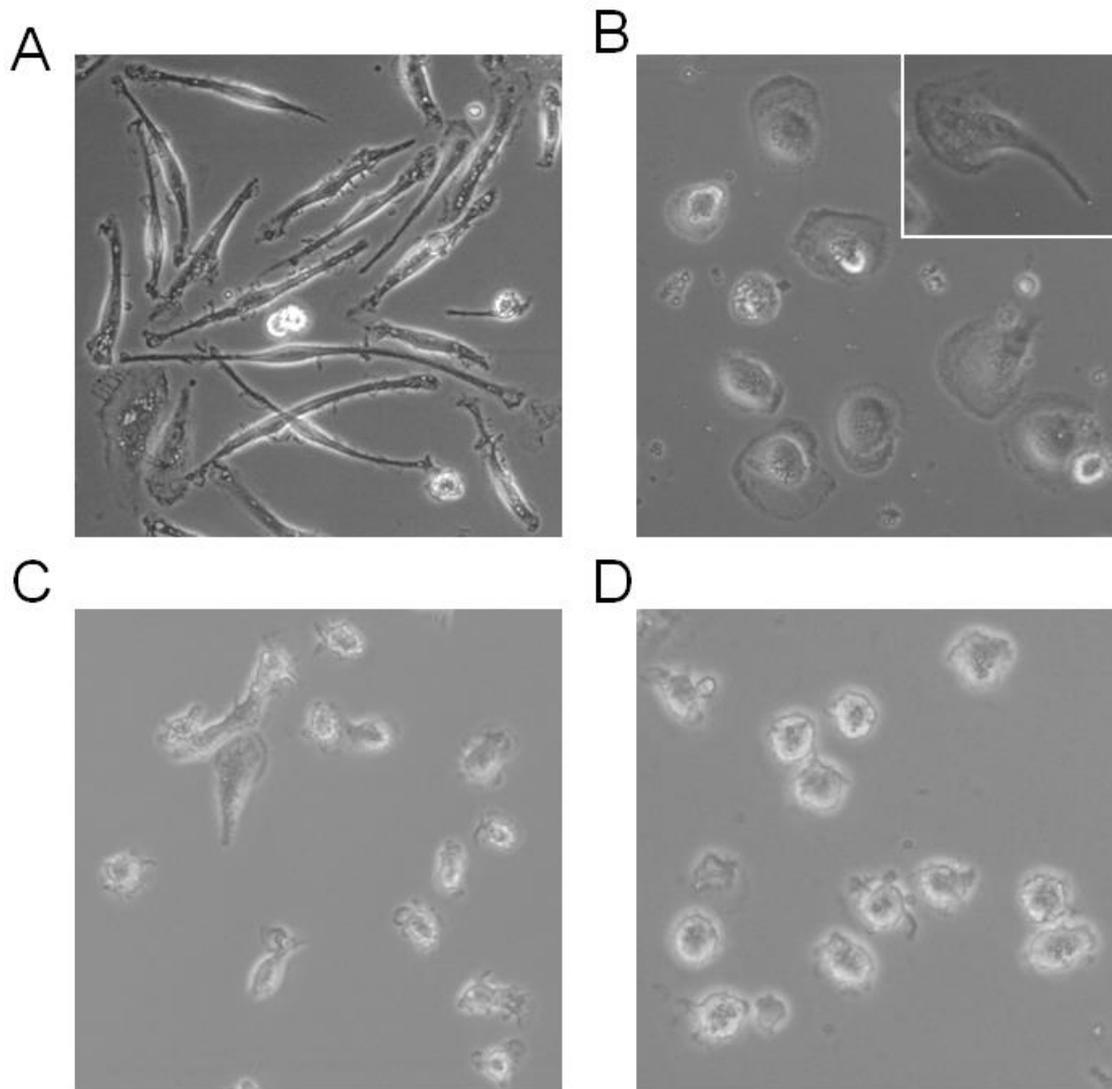


Abb. 9: Makrophagenmorphologie

Repräsentative Phasenkontrastbilder (20-fache Vergrößerung) von Monozyten von Spendern (A, B) und Hämophilie-Patienten (C, D) 7 Tage nach Dynabeads®-Isolierung und Kultivierung mit 100 ng/ml M-CSF (A, C) oder 125 ng/ml GM-CSF (B, D). Die eingefügte Zelle im Bild B (obere rechte Ecke) stellt eine typische Polarisierung in GM-CSF-stimulierten Spenderzellen dar.

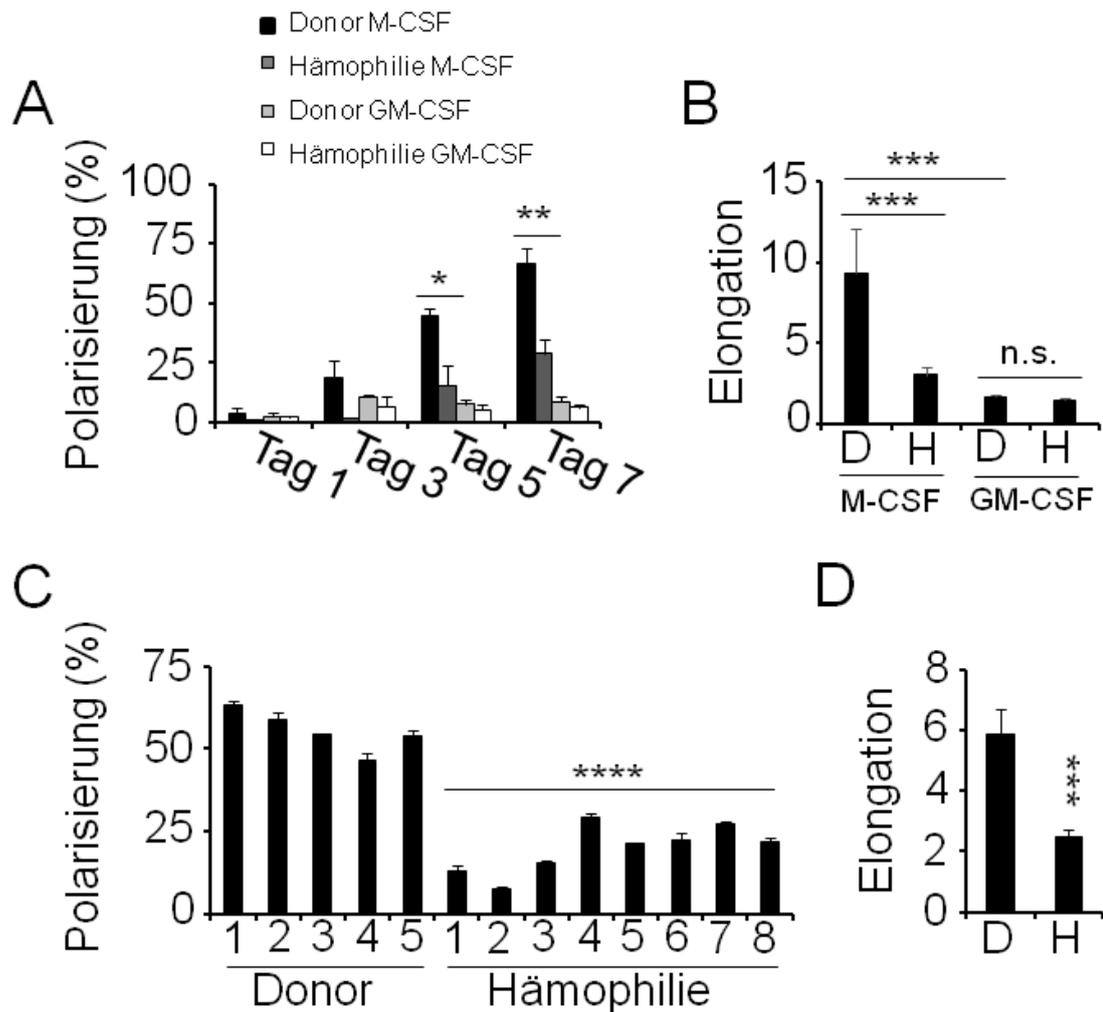


Abb. 10: Makrophagen von Hämophilie-Patienten weisen eine ineffektive Polarisierung auf (A-B), Spendermonozyten (D = Donor) sowie Monozyten von Hämophilie-Patienten (H) wurden mittels Dynabeads® aufgereinigt und 7 Tage in der Gegenwart von 100 ng/ml M-CSF oder 125 ng/ml GM-CSF kultiviert. Phasenkontrastbilder wurden in diesem Zeitraum bezüglich Zellpolarisierung (A: prozentualer Anteil der polarisierten Zellen) und Zellelongation (B: Elongationsindex als Quotient aus Länge und Breite einer Zelle) ausgewertet. (C-D), PBMCs von Hämophilie-Patienten (H) und Blutspendern (D = Donor) wurden auf Plastik aufgereinigt und dann für 7 Tage mit 100 ng/ml M-CSF stimuliert. An Tag 7 wurden Phasenkontrastmikroskopiebilder bezüglich Makrophagenpolarisierung (C) und Elongation (D) analysiert. n.s.= nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4.3 Phagozytosefähigkeit von Makrophagen von Hämophilen ist vermindert

Eine wichtige Aufgabe der Makrophagen während der Wundheilung ist das Entfernen von extravasalen roten Blutkörperchen und Zellresten. Diese Aufgabe wird durch die Phagozytose wahrgenommen. Die Fähigkeit zur Phagozytose steht in engem funktionellem Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Zellpolarisierung, da beide Funktionen durch einen ähnlichen Mechanismus des Zytoskeletts reguliert werden (72).

Um systematisch zu analysieren, ob Polarisierung und Phagozytose funktionell miteinander korrelieren, untersuchten wir zunächst die Polarisierungsrate von Dynabeads[®]-isolierten Spendermakrophagen in serumhaltigem Zellkulturmedium alleine oder 8 Tage nach Zusatz von M-CSF bzw. GM-CSF \pm IL-4 (nur bei M-CSF) oder \pm IFN γ /LPS. Hierbei wurde M-CSF bzw. GM-CSF an Tag 6 durch IL-4 oder IFN γ /LPS an Tag 6 ersetzt. An Tag 8 wurden die Makrophagen dann mit fluoreszierenden Latex-Beads inkubiert, um die Phagozytoserate zu bestimmen. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte mit 70% die stärkste Phagozytoserate nach Stimulation mit M-CSF alleine auf, gefolgt von M-CSF + IL-4 mit 63,8%. Gleichzeitig wiesen beide Treatments die höchste Polarisierungsrate auf (M-CSF: 77%; M-CSF + IL-4: 53%), welche mittels Phasenkontrastmikroskopie analysiert wurde. Eine Aktivierung der M-CSF-stimulierten Makrophagen mit den pro-inflammatorischen Zytokinen IFN γ /LPS führte sowohl zu einer deutlichen Reduzierung der Phagozytoserate (46%) als auch der Polarisierung (32,9%). Die Stimulation mit GM-CSF erzielte nur geringe Raten sowohl für Polarisierung als auch für Phagozytose und dieser Sachverhalt blieb auch nach Gabe von IFN γ /LPS unverändert. Die Polarisierung lag in beiden Gruppen, GM-CSF mit oder ohne IFN γ /LPS, bei ca. 13%, während die Phagozytose bei ca. 13% in GM-CSF bzw. 3% nach GM-CSF + IFN γ /LPS lag. Des Weiteren waren unstimulierte Monozyten kaum in der Lage zu phagozytieren (9,5%) und polarisierten zu einem deutlich geringeren Grad als M-CSF-behandelte Makrophagen (28% vs. 77%). Zusammenfassend konnte bei allen Treatments ein positiver Zusammenhang zwischen Polarisierung und Phagozytose aufgezeigt werden (Abb. 11 A, C).

Um die gewonnenen Erkenntnisse der Phagozytosefähigkeit nun mit Makrophagen von Hämophilie-Patienten zu vergleichen, wurden als nächstes Monozyten von

Spendern und Monozyten von Hämophilie-Patienten, welche mittels der Untouched-Methode isoliert wurden, für 7 Tage mit M-CSF bzw. GM-CSF stimuliert und anschließend mit Latex-Beads inkubiert. Eine Stimulation mit M-CSF bzw. GM-CSF wurde gewählt, da sie im obigen Versuch Maximalvarianten der Phagozytosefähigkeit darstellten: Unter M-CSF war die Phagozytose am stärksten, während unter GM-CSF kaum ein Latex-Uptake erfolgte. Hierunter zeigte sich bei Spendern ein ähnliches Bild wie an Tag 8: M-CSF führte mit 56% zu einer deutlich höheren Phagozytoserate als GM-CSF mit knapp 10%, weshalb M-CSF als wichtig für das Erlangen der Phagozytosefähigkeit angesehen werden kann (Abb. 11B, D). Diese Funktion konnte M-CSF allerdings in Hämophilie-Patienten nur eingeschränkt wahrnehmen, weshalb die Phagozytose hier nur bei 40% lag. GM-CSF-stimulierte Makrophagen von Hämophilie-Patienten waren ähnlich wie Spendermakrophagen nur in 16% in der Lage, Latex-Beads zu phagozytieren (Abb. 11B, D).

Für die Pathogenese der hämophilen Arthropathie spielt die Phagozytose von roten Blutzellen eine große Bedeutung (20; 80; 99). Deshalb wurden isolierte Monozyten von Spendern sowie von Hämophilie-Patienten in einem weiteren Versuch über 8 Tage mit M-CSF bzw. GM-CSF und anschließend mit markierten RBCs inkubiert, was in einer signifikant verminderten Phagozytoserate von in M-CSF-stimulierten Makrophagen von Hämophilie-Patienten (24%) gegenüber M-CSF-stimulierten Spendermakrophagen (44%) resultierte (Abb. 11D). Unter GM-CSF-stimulierten Zellen konnte so gut wie keine RBC Aufnahme nachgewiesen werden (Spender 0%; Hämophilie 1,4%) (nicht gezeigt).

All diese Ergebnisse zeigen, dass M-CSF eine wichtige Rolle sowohl in der Makrophagenpolarisierung als auch in der Phagozytosefähigkeit spielt und dass diese Funktionen in Patienten mit Hämophilie gestört sind (Abb. 11). Dies bedeutet, dass Makrophagen von Hämophilie-Patienten nur eingeschränkt fähig sind, die Entfernung von roten Blutzellen zu bewerkstelligen. Dies wiederum könnte weitreichende Folgen für die Abheilung von Gelenkblutungen und somit für die Entstehung der hämophilen Arthropathie haben.

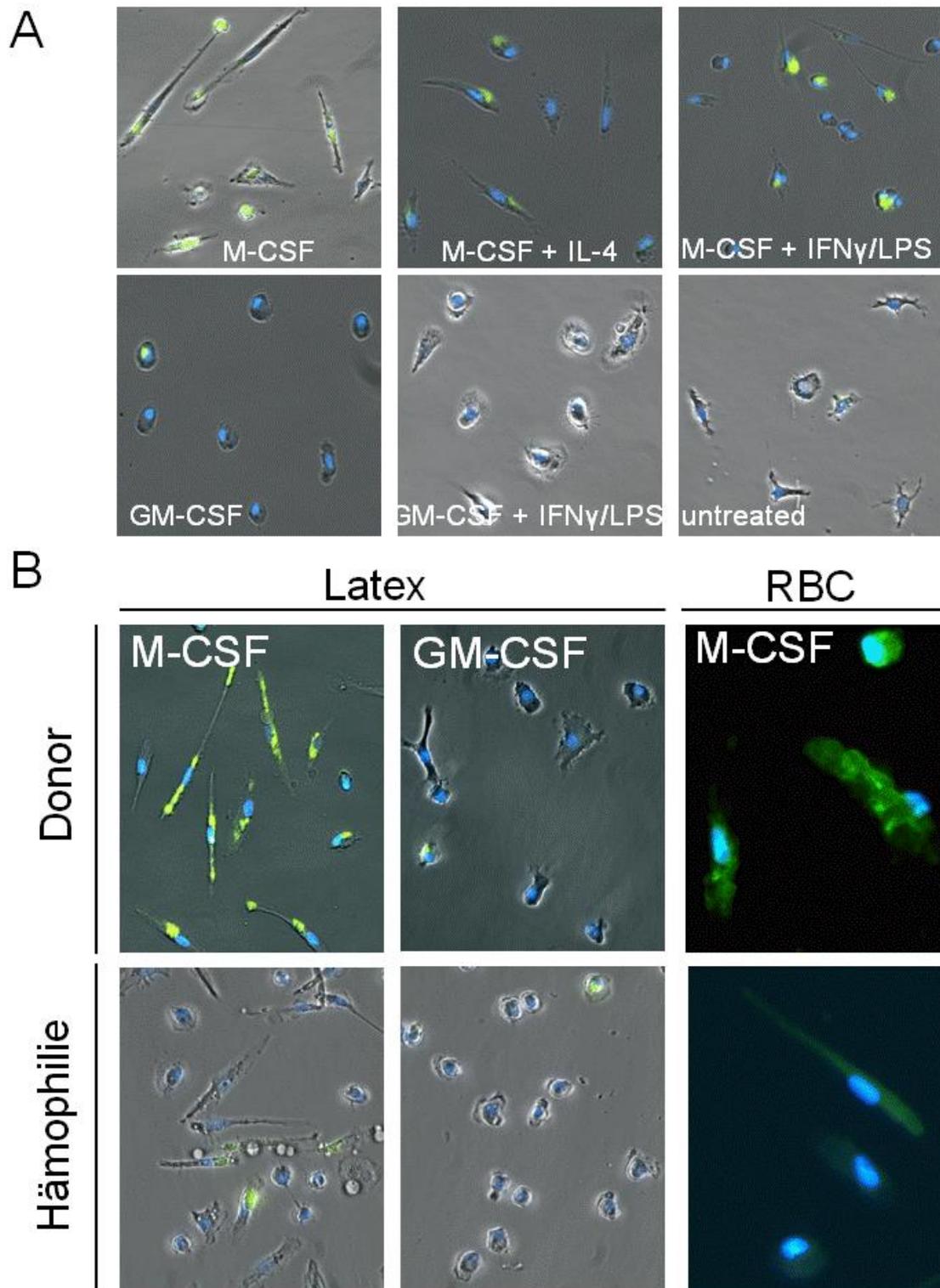


Abb. 11: Phagozytosefähigkeit ist in Makrophagen von Hämophilen vermindert
(Erklärung siehe nächste Seite)

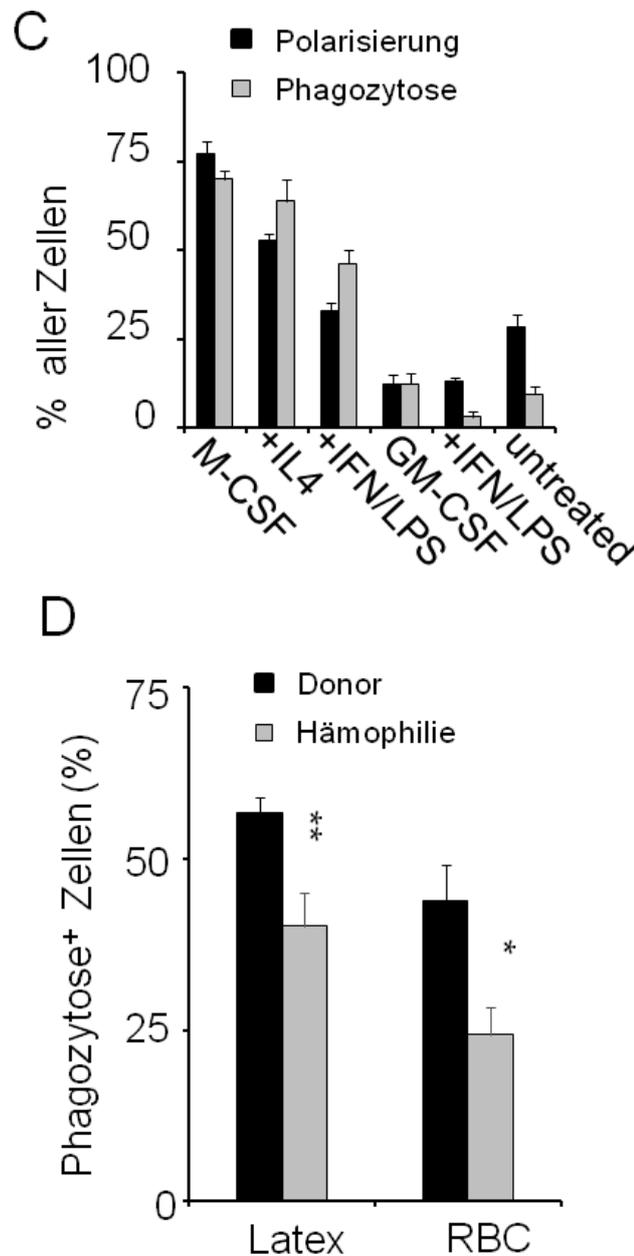


Abb. 11: Phagozytosefähigkeit ist in Makrophagen von Hämophilen vermindert

(A), Dynabeads®-isolierte Spendermakrophagen wurden in serumhaltigem Zellkulturmedium alleine (= untreated), 8 Tage nach Zusatz von M-CSF bzw. GM-CSF oder nach Zusatz von IL-4 (nur bei M-CSF) bzw. IFN γ /LPS inkubiert. In diesem Fall wurde M-CSF bzw. GM-CSF an Tag 6 durch IL-4 oder IFN γ /LPS ersetzt. An Tag 8 wurden dann die Makrophagen mit fluoreszierenden Latex-Beads (= grün) inkubiert, um die Phagozytoserate zu bestimmen und die Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt. Gezeigt werden repräsentative Fluoreszenz- und Phasenkontrastbilder (Merge) in 40-facher Vergrößerung. (B), Monozyten von gesunden Spendern sowie von Hämophilie-Patienten wurden an Tag 7 mit FITC-konjugierten Latex-Beads (grün) oder an Tag 8 mit roten Blutzellen (RBCs, grün markiert) inkubiert und anschließend fixiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Gezeigt werden wiederum repräsentative Fluoreszenz- und Phasenkontrastbilder (Merge) in 40-facher Vergrößerung. (C), Spendermakrophagen wurden wie in (A) beschrieben behandelt, an Tag 8 bezüglich Polarisierung und Phagozytose analysiert. (D), Prozentuale Phagozytose von FITC-konjugierten Latex-Beads nach 7 Tagen Kultur bzw. RBCs nach 8 Tagen Kultur in Spendern und Hämophilie-Patienten unter einer M-CSF Stimulation. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.4 Reduzierte Clotinvasion von Makrophagen von Hämophilen

Nach einer Verletzung bildet der Körper einen mechanischen Wundverschluss in Form von Thrombozyten und geronnenem Plasma, welches überwiegend aus Fibrin und Plasmafibronektin besteht (4). Diese Glykoproteine bilden eine adhäsive Matrix und tragen somit zur Rekrutierung von Monozyten bei, welche sich anschließend zu Makrophagen differenzieren. Entsprechend spielt die Monozyteninvasion in geronnenem Plasma eine wichtige Rolle im Rahmen der Wundheilung (41; 46; 53).

Um die Fähigkeit von Makrophagen von Spendern und von Hämophilie-Patienten zur Clotinvasion zu überprüfen, wurden Monozyten von Patienten und Blutspendern mittels Dynabeads®-Untouched isoliert, in geronnenem Plasma eingebettet und über 7 Tage mit M-CSF, GM-CSF oder ohne jegliche Zytokine inkubiert. Anschließend wurde die Podosomenbildung als Zeichen der Invasion täglich mit dem Phasenkontrastmikroskop erfasst.

Während an Tag 1 unter allen Treatments noch kaum Podosomenbildung und somit Polarisierung zu registrieren war, stieg diese in Spendern unter M-CSF an Tag 2 schlagartig auf 35% an und nahm im Laufe der 7-tägigen Stimulation kontinuierlich zu (Abb. 12A, C). So lag die Polarisierung an Tag 3 über 50%, an den Tagen 4 bis 6 relativ konstant bei 65-70% und nahm an Tag 7 den Spitzenwert von knapp 80% invasiver Zellen ein. Im Gegensatz zu M-CSF kam es unter einer GM-CSF Stimulation gemessen an der Podosomenausbildung zu keiner kontinuierlichen Zunahme der Invasionsrate, sondern eher zu einem kurvenförmigen Verlauf. So konnte an Tag 2 eine fast identische Polarisierung von 35% wie in M-CSF detektiert werden, welche an Tag 3 auf 45% anstieg und hier ihr Maximum erreichte. An Tag 4 nahm die Invasion im Sinne eines Kurvenverlaufs wieder auf 30% ab und nahm ab Tag 5 ein Plateau von weniger als 20% ein. Es konnte auch bei Spendermonozyten ohne Einfluss von Zytokinen eine Invasion ab dem 2. Tag nachgewiesen werden, welche ab diesem Tag zwischen 12% und 22% lag. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei Spendermakrophagen unter M-CSF die stärkste Invasionsfähigkeit gegeben war, welche zu jeder Zeit GM-CSF überlegen war. GM-CSF-stimulierte Makrophagen waren nur in der frühen Phase der Differenzierung in der Lage in den Clot einzuwandern und wiesen in der späten Phase keinen Unterschied zu unbehandelten Monozyten auf. Im Gegensatz hierzu war weder bei Makrophagen von Hämophilie-Patienten nach Behandlung mit M-CSF oder GM-CSF noch in unbehandelten Mak-

rophagen von Hämophilie-Patienten ein Anstieg der Invasionsrate über 13% feststellbar (Abb. 12B, D).

Diese Ergebnisse wurden mittels Elongationsindex (Zelllänge/Zellbreite) am Tag der jeweils maximalen Invasionsrate weiter quantifiziert (Abb. 12E). Dies bedeutet im Falle von GM-CSF, dass der Elongationsindex an Tag 3 und im Falle von M-CSF bzw. unbehandelten Monozyten der Elongationsindex an Tag 7 bestimmt wurde. Es zeigte sich in Spendern ein nur geringfügiger Unterschied zwischen dem Index von untreated Zellen (2,4) und dem Index von GM-CSF (3,3). M-CSF war mit einem Elongationsindex von 6,0 den anderen beiden Treatments eindeutig überlegen. Der über M-CSF vermittelte Anstieg des Elongationsindexes als Ausdruck der Invasion war allerdings nur in Spendermakrophagen und nicht in Makrophagen von Hämophilie-Patienten vorhanden. In Makrophagen von Hämophilie-Patienten lag der Index unabhängig von Zytokinen nie über 2. Somit lag der Elongationsindex von Makrophagen von Hämophilie-Patienten in jeder Behandlungsgruppe signifikant unter dem entsprechenden Elongationsindex von Spendermakrophagen.

Zusammenfassend konnte M-CSF als wichtiger und potenter pro-invasiver Stimulus in gesunden Makrophagen identifiziert werden. Makrophagen von Hämophilie-Patienten waren allerdings im Gegensatz zu gesunden Makrophagen kaum in der Lage, unter einem M-CSF Stimulus in geronnenes Plasma einzuwandern. Dies lässt vermuten, dass die Rekrutierung von alternativ aktivierten M2-Makrophagen in Wunden, welche für eine effektive Phagozytose erforderlich ist, in Hämophilie-Patienten nicht funktioniert.

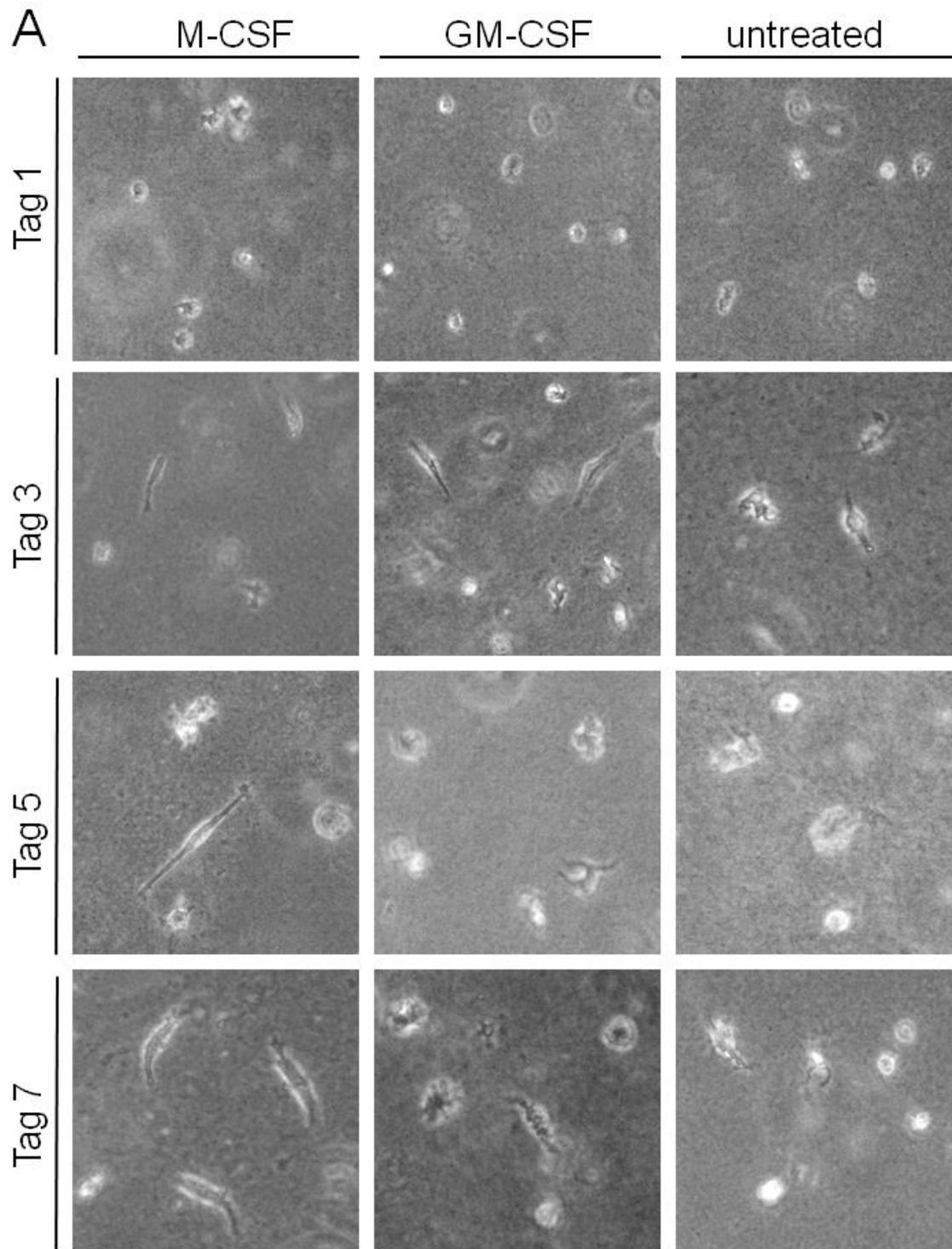


Abb. 12: mangelhafte Clotinvasion von Makrophagen von Hämophilie-Patienten
(Beschreibung siehe Seite 44)

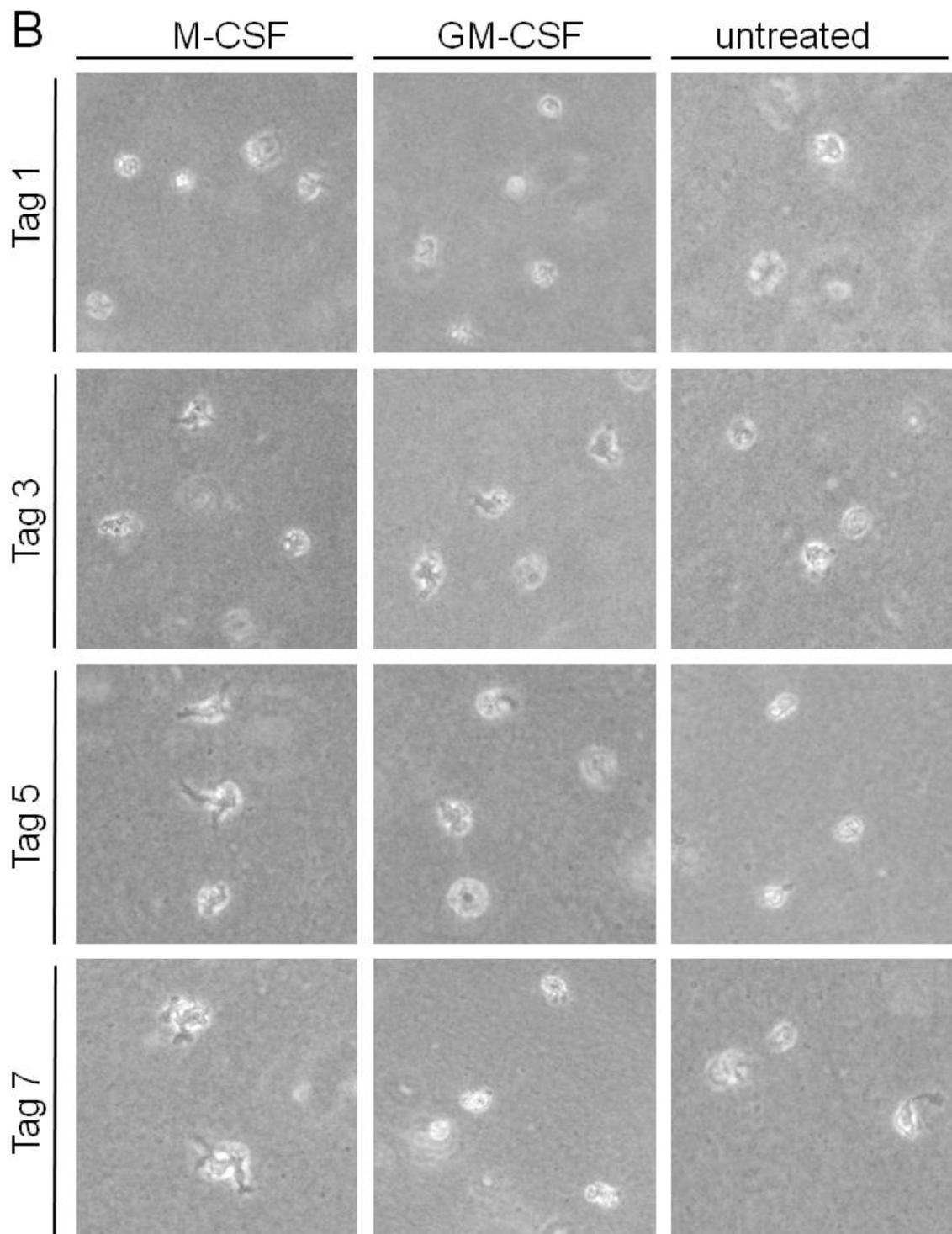


Abb. 12: mangelhafte Clotinvasion von Makrophagen von Hämophilie-Patienten
(Beschreibung siehe nächste Seite)

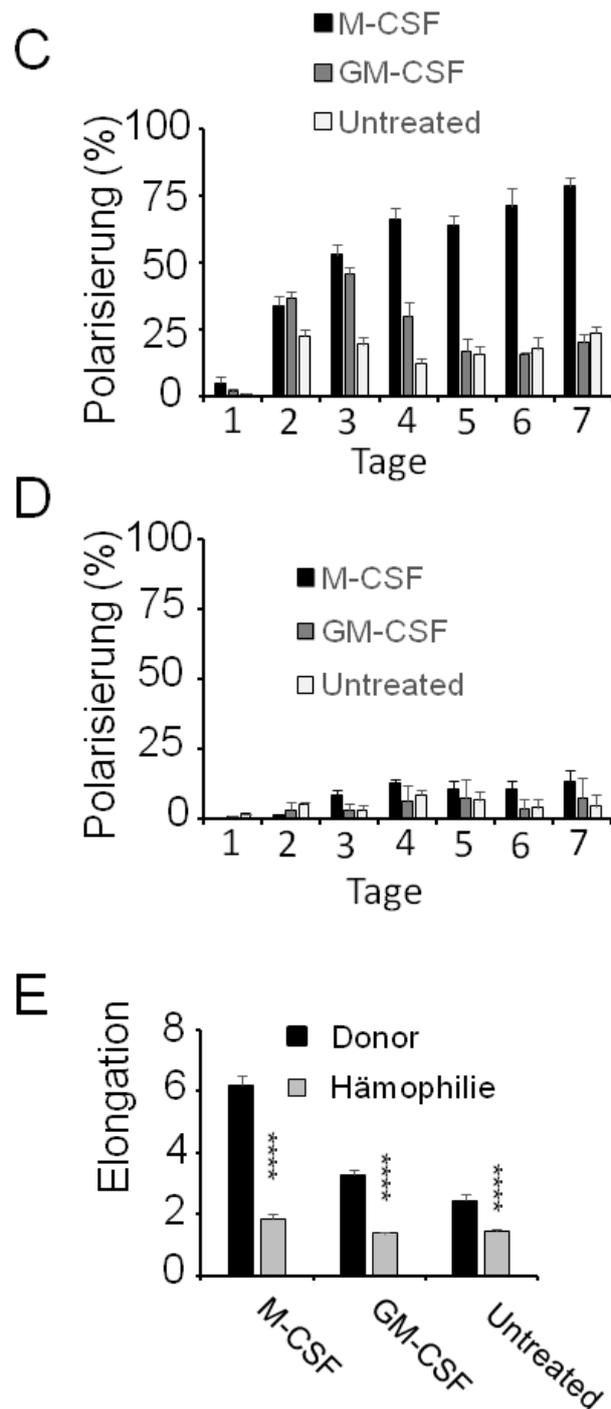


Abb. 12: mangelhafte Clotinvasion von Makrophagen von Hämophilie-Patienten

(A-B), repräsentative Phasenkontrastbilder von Makrophagen von Spendern (A) und von Hämophilie-Patienten (B) nach 7 Tagen in geronnenem Plasma (unbehandelt (= untreated) oder in der Gegenwart von M-CSF und GM-CSF). (C-D), in Clot eingebettete Spendermakrophagen (C) bzw. Makrophagen von Hämophilie-Patienten (D) wurden über die Zeit bzgl. ihrer Podosomenbildung analysiert. (E), Makrophagenelongation wurde am Tag der stärksten Polarisation (Tag 7 bei M-CSF und untreated, Tag 3 bei GM-CSF) als Quotient aus Zelllänge und Zellbreite berechnet. ****p<0,0001.

4.5 Makrophagen von Hämophilie-Patienten reagieren inadäquat auf M-CSF und GM-CSF

Unsere 3D-Daten zeigen, dass Makrophagen von Hämophilie-Patienten weder nach M-CSF noch nach GM-CSF Behandlung in der Lage sind, effektiv in Plasmaclots einzuwandern. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse haben wir Makrophagen von Hämophilie-Patienten auf Merkmale hin untersucht, die sowohl nach Gabe von M-CSF als auch von GM-CSF eingeschränkt sind. Hierfür wurden sowohl Monozyten von Spendern als auch von Hämophilie-Patienten mittels Dynabeads® isoliert und über 7 Tage mit M-CSF, GM-CSF oder ohne Zytokine stimuliert. An Tag 7 wurde der prozentuale Anteil an Filopodien mittels Phasenkontrastmikroskopie bestimmt. Unter Filopodien versteht man F-Aktin reiche, fingerartige Ausläufer des Zytoskeletts, welche für typische Makrophagenfunktionen wie Invasion und Phagozytose notwendig sind (60).

Unbehandelte Spendermonozyten wiesen mit knapp 6% kaum Filopodien auf, wohingegen 84% aller GM-CSF- und 87% aller M-CSF-stimulierten Spendermakrophagen diese typische Morphologie besaßen (Abb. 13A-B). Interessanterweise war die Ausformung von Filopodien in Makrophagen von Hämophilie-Patienten sowohl nach Stimulation mit M-CSF als auch mit GM-CSF erheblich reduziert. In beiden Fällen lag die Filopodienrate mit 19% (GM-CSF) bzw. mit 26% (M-CSF) eher im Bereich von unbehandelten Spendermonozyten als von differenzierten Makrophagen (Abb. 13A-B). Diese Beobachtung konnte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigt werden, indem adhärente Makrophagen an Tag 7 mit fluoreszierendem Phalloidin angefärbt wurden, das an polymerisiertes F-Aktin bindet, und die durchschnittliche Anzahl von Filopodien pro Zelle ermittelt wurde. M-CSF-stimulierte Makrophagen von gesunden Spendern wiesen im Durchschnitt 11 Filopodien pro Zelle auf, dicht gefolgt von GM-CSF-stimulierten Makrophagen mit 9 Filopodien pro Zelle. Im Gegensatz hierzu bildeten Makrophagen von Hämophilie-Patienten trotz Behandlung mit M-CSF bzw. GM-CSF im Durchschnitt nur 2 Filopodien pro Zelle aus, was wiederum der Anzahl von Filopodien in unbehandelten Spendermonozyten entspricht (Abb. 13A, C). Die wenigen Filopodien, welche vorhanden waren, waren zudem in ihrer Länge verkürzt. Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass Makrophagen von Hämophilie-Patienten auf dem Niveau von unbe-

handelten Spendermonozyten zurückbleiben und vermutlich nicht adäquat auf M-CSF und GM-CSF reagieren können.

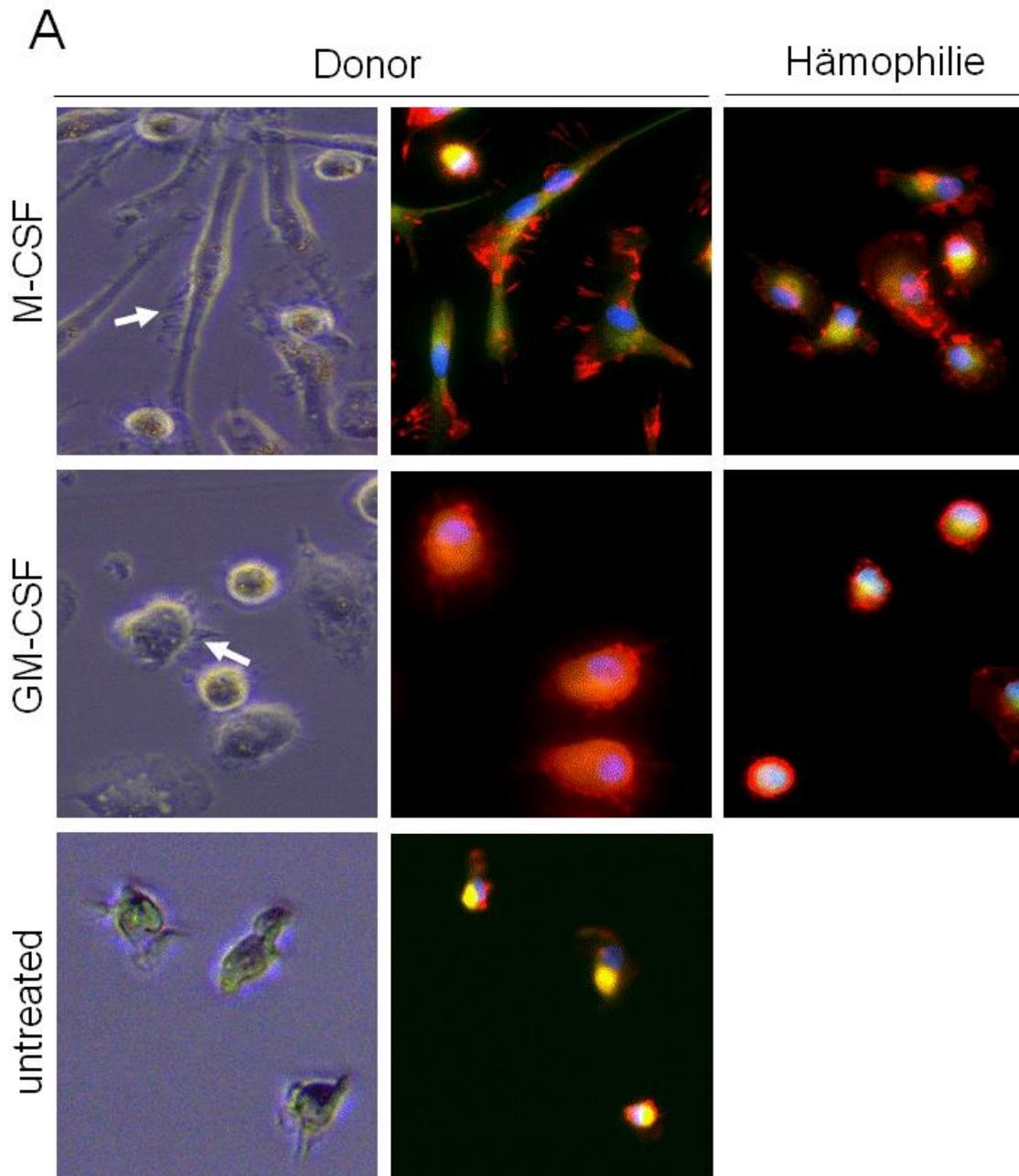


Abb. 13: eingeschränkte Filopodienbildung in Makrophagen von Hämophilie-Patienten
(Beschreibung siehe nächste Seite)

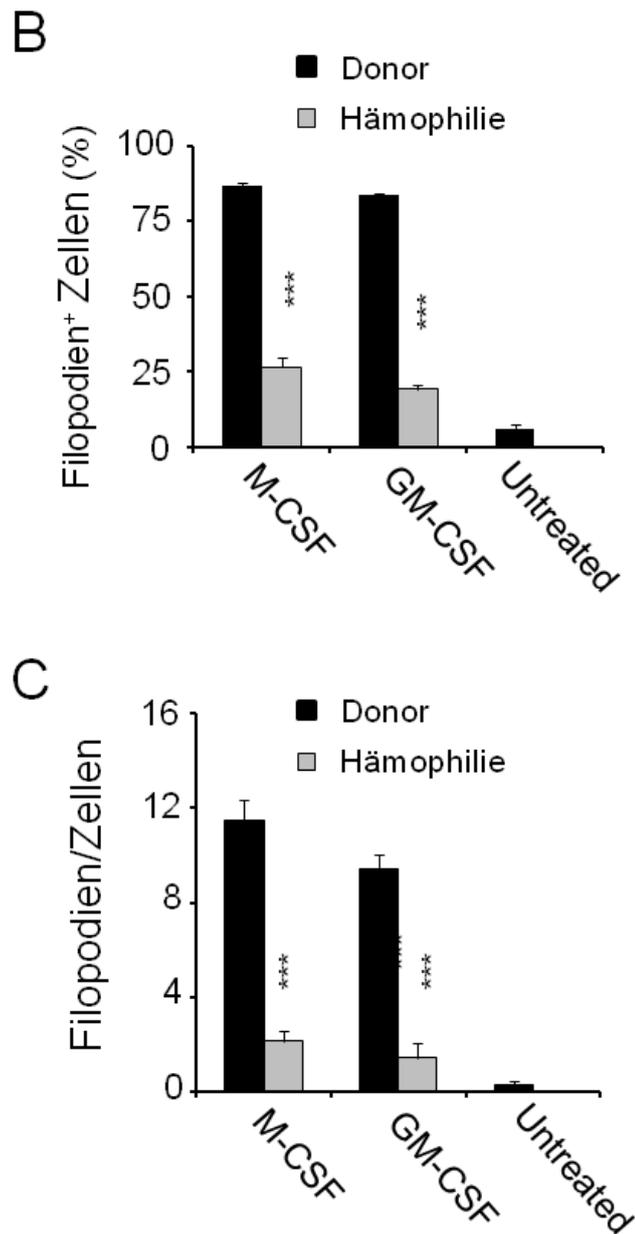


Abb. 13: eingeschränkte Filopodienbildung in Makrophagen von Hämophilie-Patienten

(A), repräsentative Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopiebilder von gesunden Spendern (Donor) und Hämophilie-Patienten 7 Tage nach Zellkultur mit M-CSF, GM-CSF oder ohne Zytokinstimulation. Die Immunfluoreszenzbilder zeigen Überlagerungsbilder nach Staining mit dem Makrophagenmarker anti-CD68 (grün), Phalloidin (F-Aktin, rot) und dem Zellkern (blau). Die Pfeile markieren beispielhaft Filopodien in Spendermakrophagen. (B-C), Phasenkontrast- bzw. Immunfluoreszenzbilder wurden prozentual hinsichtlich Filopodien-positiver Makrophagen (B) und durchschnittlicher Filopodienanzahl pro Makrophage (C) ausgewertet. *** $p < 0,001$.

Um die Aktivität von M-CSF und GM-CSF in Makrophagen von Hämophilie-Patienten weitergehend zu untersuchen, führten wir an Tag 7 eine immunocytochemische Überprüfung der Proteinexpression von TNF α durch. TNF α wird typischerweise in differenzierten Makrophagen generiert, wobei die Konzentration in proinflammatorischen M1-Makrophagen höher ist als in alternativen M2-Makrophagen (115). Entsprechend detektierten wir über 80% TNF α -positive Makrophagen nach GM-CSF-Behandlung von Spendermonozyten. M-CSF-stimulierte Spendermakrophagen produzierten ebenfalls TNF α ; allerdings lag die Expression mit nahezu 50% TNF α -positiven Makrophagen unter der von GM-CSF. Unbehandelte Spendermonozyten exprimierten in nur 20% der Fälle TNF α , weshalb TNF α als spezifisch für differenzierte Makrophagen angesehen werden kann. In M-CSF-stimulierten Makrophagen von Hämophilie-Patienten konnte TNF α hingegen in nicht einmal 10% nachgewiesen werden und lag somit sogar unterhalb der TNF α -Expression in unbehandelten Spendermonozyten. Dem gegenüber war die TNF α -Expression in GM-CSF-stimulierten Makrophagen von Hämophilie-Patienten mit 40% positiven Zellen bedeutend besser erhalten (Abb. 14A-B). Zusammenfassend zeigen die hier erhobenen Ergebnisse, dass TNF α ein Kriterium für differenzierte Makrophagen von gesunden Spendern ist. Des Weiteren weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Monozyten von Hämophilie-Patienten nicht auf eine Stimulation mit M-CSF, aber zumindest teilweise auf GM-CSF reagieren.

Um das unterschiedliche Ansprechen auf M-CSF und GM-CSF in Makrophagen von Hämophilie-Patienten genauer zu untersuchen, wurden weitere Färbungen mit Markern durchgeführt, die spezifisch auf M-CSF bzw. GM-CSF reagieren (3; 96; 115). Hierfür wurden adhärenzte Makrophagen an Tag 7 mit anti-CD206 angefärbt, was in einer Expressionsrate von 66% nach Stimulation mit GM-CSF und von 15% nach Stimulation mit M-CSF resultierte. (Abb. 14A, C). Umgekehrt resultierte die Markierung mit anti-CD163 in einer Expressionsrate von 85% nach Gabe von M-CSF, wohingegen keine Expression nach GM-CSF-Gaben nachgewiesen werden konnte (Abb. 14A, C). Im Gegensatz hierzu konnte lediglich in 10% der M-CSF-stimulierten Makrophagen von Hämophilie-Patienten eine CD163-Expression nachgewiesen werden. CD206, andererseits konnte noch in 35% aller GM-CSF-stimulierten Makrophagen von Hämophilie-Patienten nachgewiesen werden (Abb. 14A, C).

Zusammenfassend mit den Ergebnissen aus der Filopodienanalyse ist festzuhalten, dass Monozyten von Hämophilie-Patienten nicht angemessen auf den Stimulus M-CSF und nur eingeschränkt auf den Stimulus GM-CSF reagieren können. Die Ergebnisse lassen außerdem darauf schließen, dass M-CSF-medierte M2-Stimuli in Hämophilie-Patienten weitestgehend verloren gegangen sind, während die pro-entzündliche Wirkung von GM-CSF zumindest teilweise erhalten geblieben ist. Diese Resultate korrelieren mit unseren Daten, dass bei Makrophagen von Hämophilie-Patienten die M-CSF-medierte regenerativen Funktionen kompromittiert sind. Dies spricht dafür, dass die inflammatorischen Funktionen, wie sie bei der hämophilen Arthropathie vorgefunden werden, zumindest teilweise erhalten sind.

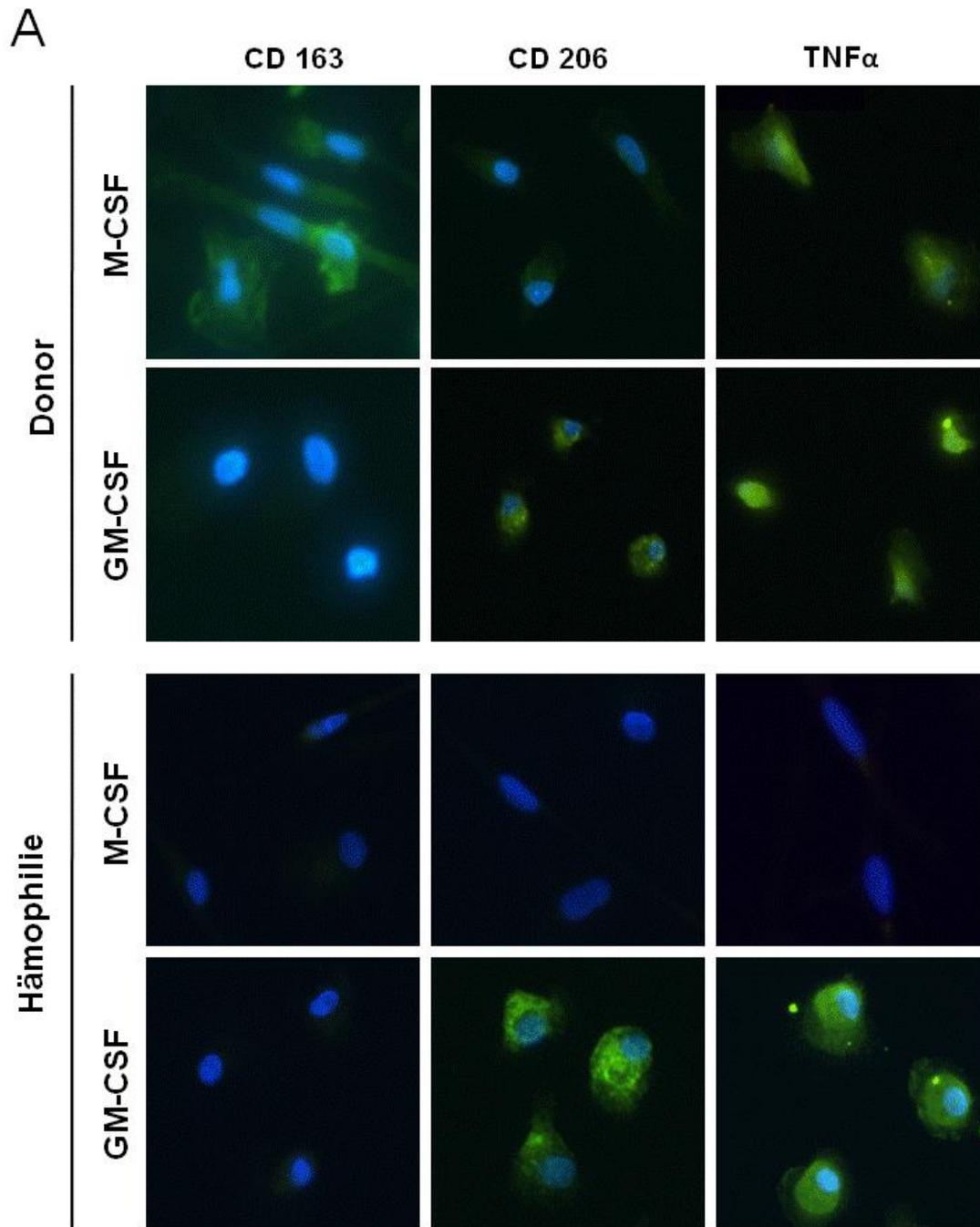


Abb. 14: Makrophagen von Hämophilie-Patienten exprimieren vermindert TNF α und CD163
(Beschreibung siehe nächste Seite)

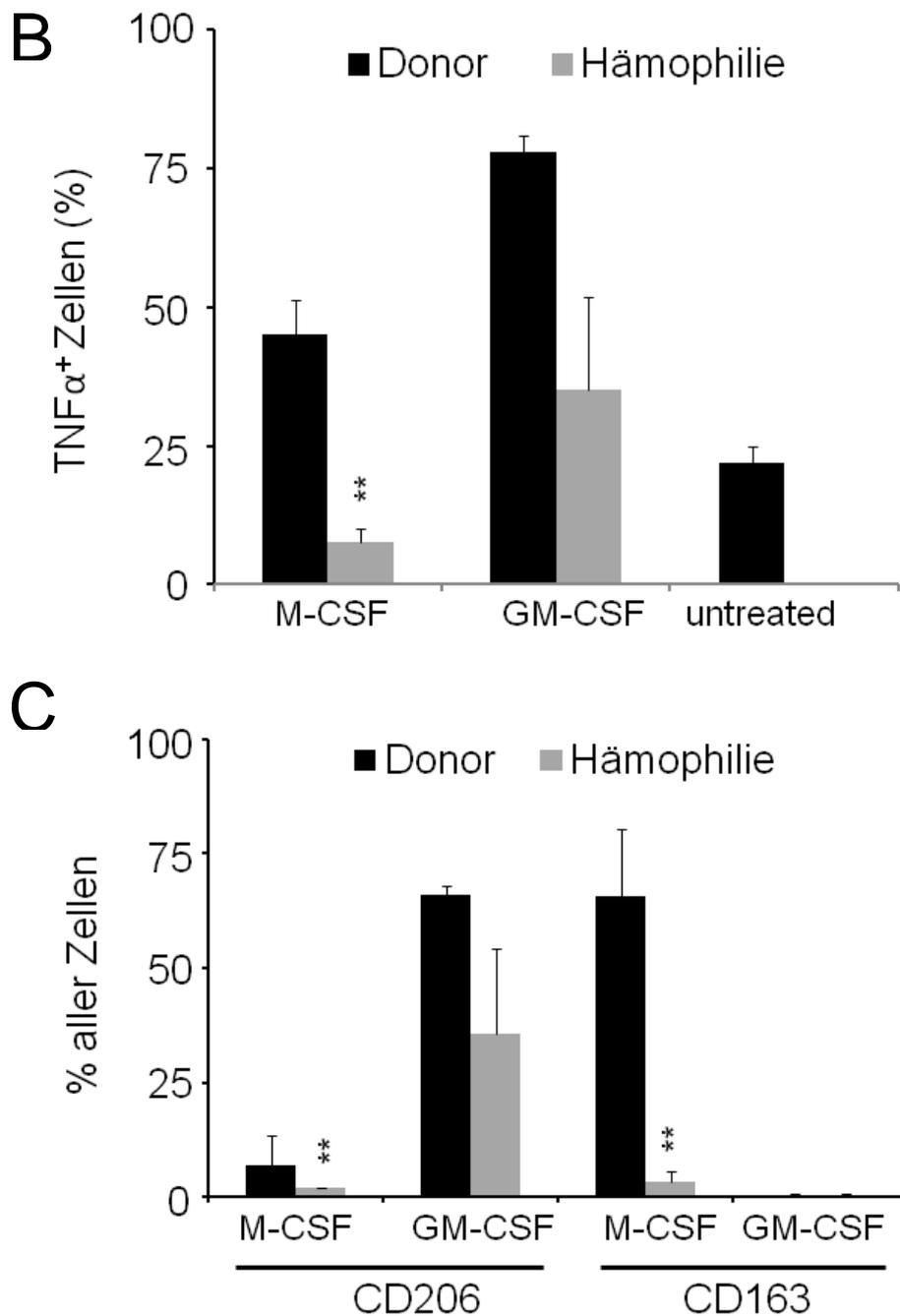


Abb. 14: Makrophagen von Hämophilie-Patienten exprimieren vermindert TNF α und CD163 (A), repräsentative Fluoreszenzmikroskopiebilder von gesunden Spendermakrophagen (Donor) und Makrophagen von Hämophilie-Patienten nach einer 7-tägigen Inkubation mit M-CSF oder GM-CSF und anschließender Färbung für TNF α , CD206 und CD163 (grün) sowie Anfärbung des Zellkerns mit DAPI (blau). (B), an Tag 7 wurden untreated, mit M-CSF-stimulierte und mit GM-CSF-stimulierte Spendermakrophagen sowie mit M-CSF- bzw. GM-CSF-stimulierte Makrophagen von Hämophilie-Patienten auf die prozentuale TNF α -Expression analysiert. (C), Immunfluoreszenzbilder wurden hinsichtlich CD206- und CD163- positiver Makrophagen (Donor vs. Hämophilie) als prozentualer Anteil der Gesamtzellzahl nach M-CSF- bzw. GM-CSF-Behandlung ausgewertet. **p<0,01.

5 Diskussion

5.1 Die Makrophagendifferenzierung ist bei der Hämophilie gestört

Makrophagen nehmen im Verlauf einer Gewebeverletzung eine wichtige Rolle ein. Während am Anfang der pro-inflammatorische M1-Phänotyp als Antwort auf humorale Gefahrensignale (danger signals) eine Entzündungsreaktion einleitet, findet wenig später ein Switch zu einem anti-inflammatorischen M2-Phänotyp statt, welcher die Inflammation beendet und die Wundheilung einleitet (58). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Wundheilungsfunktion von Makrophagen in Hämophilie-Patienten dereguliert scheint. Dies stützt sich auf die Beobachtung, dass Monozyten von Hämophilie-Patienten unfähig sind in der Gegenwart des Zytokins M-CSF, welches die Entwicklung eines anti-inflammatorischen, regenerativen Phänotyps einleitet, zu differenzieren und zu polarisieren (25; 111). Als Folge sind kritische regenerative Funktionen wie z.B. die Clotinvasion und Phagozytose von RBCs bei Makrophagen von Hämophilie-Patienten gestört. Das Zytokin GM-CSF, welches zur Differenzierung eines pro-inflammatorischen Makrophagen-Phänotyps eingesetzt wird, kann im Gegensatz zu M-CSF Monozyten von Hämophilie-Patienten zumindest teilweise polarisieren (111; 115). Dies spricht dafür, dass bei Makrophagen von Hämophilie-Patienten eine spezifische Störung der Wundheilungsfunktion vorliegt und sie sich trotz vermindertem regenerativem Potential an der Entzündungsreaktion beteiligen können. Insofern postulieren wir, dass die Deregulation der Makrophagenfunktion in der Hämophilie mit der hämophilen Arthropathie in einem funktionellen Zusammenhang steht.

5.2 Deregulierung der Wundheilungsfunktion in Makrophagen von Hämophilie-Patienten

Während bereits viele klinische Symptome von Hämophilie-Patienten durch eine effektive Substitutionsprophylaxe beherrscht werden, kann es dennoch zu Gelenkeinblutungen kommen (87; 88). Diese führen zu einer eiseninduzierten Entzündung und sind somit an der Entwicklung einer hämophilen Arthropathie, welche mit einer deutlich eingeschränkten Lebensqualität einhergeht, entscheidend beteiligt (28). Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass teilweise bereits sehr wenige Gelenkblutungen für die Entstehung der hämophilen Arthropathie ausreichen (67). Dieser Um-

stand könnte darin begründet sein, dass die Eisenüberladung und die damit verbundene Entzündung lange über die eigentliche Blutstillung anhält und sich sogar kaskadenartig verstärkt, ohne dass eine Wundheilung stattfinden kann (28). Physiologischerweise sind im Rahmen einer Entzündung etliche Zellen beteiligt, welche perfekt aufeinander abgestimmt sein müssen, um einerseits die Gefahr, die mit einer Inflammation einhergeht, zu beherrschen und andererseits möglichst frühzeitig die Gewebereparatur einzuleiten. Tritt eine Gewebeverletzung auf, so werden durch abgestorbene Zellen endogene Gefahrensignale der DAMP-Familie freigesetzt. Diese Signale, zu denen zum Beispiel Hitzeschockproteine, Fibronectin-Fragmente oder ATP zählen, führen zu einer Rekrutierung von Granulozyten und MDMs (81; 122). Um die zytotoxischen Effekte, welche mit der akuten Inflammation einhergehen, möglichst gering und lokal begrenzt zu halten, phagozytieren Makrophagen im weiteren Verlauf einer Entzündungsreaktion apoptotische Neutrophile und deren Metabolite (122). Durch diesen Schritt wird ein Phänotypen-Switch vom inflammatorischen M1-Typ zum anti-inflammatorischen M2-Typ eingeleitet. Neben der Phagozytose zeichnet M2-Makrophagen die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-4 und IL-10 sowie von Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF- β 1 und VEGF aus. Diese fördern die Wundheilung durch die Epithelialisierung, Angiogenese und Bildung von narbigem Bindegewebe (24; 77). Getriggert wird der hier beschriebene Phänotypen-Switch über etliche exogene Substanzen wie etwa IL-10, IL-4 oder TGF- β , welche über verschiedene Mechanismen zu einer Downregulation der Transkription von pro-inflammatorischen Genen wie z.B. GM-CSF, TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 auf mRNA-Ebene führen (9; 21; 37). Neben der hier beschriebenen M2-Aktivierung, an der etliche Zytokine beteiligt sind, ist es aber auch dem Wachstumsfaktor M-CSF allein möglich Monozyten zu einem alternativen M2-Phänotyp zu polarisieren (25; 111). Diese Tatsache lässt vermuten, dass bei fehlenden inflammatorischen Stimuli der M2-Phänotyp der Makrophagenpopulation als Grundzustand überwiegt, um durch seine anti-inflammatorischen und regulatorischen Eigenschaften den homöostatischen Zustand aufrechtzuerhalten. Gerade daher ist es bemerkenswert, dass wir zeigen konnten, dass Makrophagen von Hämophilie-Patienten nicht in angemessener Weise auf M-CSF reagieren können. M-CSF führte bei Makrophagen von Hämophilie-Patienten nicht zu der typischen spindelförmigen Polarisation, welche den anti-inflammatorischen Typ charakterisiert. Des Weiteren konnten wichtige Aufgaben des M2-Phänotyps, wie etwa die Phagozytose und die Clotinv-

sion von Hämophilie-Makrophagen nur unzureichend bzw. überhaupt nicht wahrgenommen werden. Somit ist der vorgegebene Mechanismus, bei dem der M2-Phänotyp unter Steady-State Bedingungen vorherrscht, bei Hämophilie-Patienten dereguliert. Dies lässt vermuten, dass Monozyten von Hämophilie-Patienten nicht in der Lage sind, die komplexen Anforderungen während der Inflammation und Wundheilung, insbesondere den Phänotypen-Switch, zu bewältigen.

5.3 Störung der Phagozytose als Pathomechanismus der hämophilen Arthropathie

Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass es einen engen Zusammenhang zwischen der Fähigkeit der Makrophagenpolarisierung und der Phagozytose von markierten Latex-Beads und RBCs gibt. Dabei war die höchste Phagozytoserate in gesunden Makrophagen zu verzeichnen, die durch M-CSF zu einem elongierten, anti-inflammatorischen M2-Typ differenziert wurden. Nach Stimulation mit GM-CSF, einem rundlichen, pro-inflammatorischen Phänotyp, wurde hingegen nur ein schwaches Phagozytosesignal erzielt. Die Phagozytose stellt somit eine spezifische M-CSF-vermittelte Funktion dar, welche insbesondere für die Wundheilung essentiell ist. Durch die Phagozytose ist es anti-inflammatorischen Makrophagen möglich, apoptotische Neutrophile zu eliminieren und somit die akute Inflammation zu beenden (76; 91). Zudem können Makrophagen auch gealterte oder zerstörte RBCs phagozytieren und leisten hierdurch einen wichtigen Beitrag zur RBC-Homöostase (20). Dieser Mechanismus könnte insbesondere bei der hämophilen Arthropathie von Bedeutung sein, da gerade durch Gelenkblutungen freigesetzte RBCs eine eiseninduzierte Entzündung und in der Folge die Entwicklung einer hämophilen Arthropathie begünstigen (80; 99; 100). Entsprechend konnten wir mit unseren Experimenten zeigen, dass die Phagozytosefähigkeit in Hämophilie-Patienten stark vermindert ist. Dies lässt darauf schließen, dass die zytotoxische Aktivität von Granulozyten verlängert wirksam ist und RBCs/Eisen als inflammatorische Stimuli hierdurch verstärkte Entzündung perpetuieren. Dieses Defizit von hämophilen Makrophagen könnte somit als mitverantwortlich für die Entwicklung der hämophilen Arthropathie angesehen werden.

5.4 Die Clotinfiltration ist bei Makrophagen von Hämophilie-Patienten gestört

Eine funktionsfähige Blutgerinnung ist einerseits wichtig, um größere Blutverluste nach Verletzungen durch Clotbildung zu verhindern. Andererseits wird ihr aber auch eine entscheidende Rolle an der Gewebereparatur im Rahmen der Wundheilung zugeschrieben. Durch die Formierung einer stabilen Fibrin-Matrix wird die Zellproliferation gefördert und inflammatorische Zellen, z.B. Monozyten, rekrutiert. Dies stellt einen entscheidenden Schritt bei der Wundheilung dar (22; 41). In Übereinstimmung mit dieser speziellen Rolle der Blutgerinnung konnten Drew et al. zeigen, dass in Fibrinogen-defizienten Mäusen eine verspätete Wundschließung stattfindet. Neben diesem zeitlichen Aspekt bestanden weitere Unterschiede zwischen Fibrinogen-defizienten Mäusen und gesunden Mäusen, wie zum Beispiel eine verringerte Zellinvasion, eine mechanische Instabilität und eine mangelhafte Wundkontraktion (22). Ein ähnlicher Effekt ließ sich auch in Makrophagen-defizienten Mäusen beobachten. Diese Mäuse reagierten auf eine Verletzung ebenfalls mit einer verzögerten Wundheilung sowie einer verzögerten Wundkontraktion. Bei einer genaueren Analyse der Wunde fielen zudem vermehrt pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β , MIP-2, MCP-1 oder COX-2 bei einer zugleich verminderten anti-inflammatorischen Expression von TGF β -1 oder VEGF auf. Des Weiteren waren neutrophile Granulozyten in dem verletzten Gewebe überrepräsentiert, während Makrophagen aufgrund des genetischen Designs der Mäuse fehlten. All diese Faktoren trugen letztendlich zu einer reduzierten Angiogenese, verzögerten Reepithelialisierung, verminderten Kollagen-Ablagerung und unzureichenden Zellproliferation bei, was sich dann entsprechend negativ auf die Wundheilung niederschlug (32; 77).

Hämophilie-B (Faktor IX-defiziente) Mäuse zeigten genau wie Fibrinogen- bzw. Makrophagen-defiziente Mäuse Auffälligkeiten in der Wundheilung sowohl bei dermalen Wunden als auch bei Wunden in Folge einer Gelenkblutung im Sinne eines verzögerten Wundverschlusses, die im Zusammenhang mit einer verzögerten Rekrutierung von Wundmonozyten standen (41; 106). Es ist denkbar, dass die deregulierte Monozyteninvasion Folge einer gestörten Gerinnung ist oder aber, dass die Monozyten-/ Makrophagenfunktion unabhängig vom Gerinnungsfaktorendefizit gestört ist. Letzteres wird durch unsere Versuche untermauert, in denen wir eine verminderte Makrophageninvasivität von Hämophilie-Patienten im Vergleich zu gesunden Spen-

dern nachweisen konnten. Hierbei fanden wir, dass unter Behandlung mit M-CSF ein großer Teil gesunder Makrophagen in den Plasmaclot einwandern konnte, während Makrophagen von Hämophilie-Patienten dazu kaum in der Lage waren. Unser Konzept, dass die Störung der Makrophagenrekrutierung gerinnungsunabhängig ist, wird zudem durch die Tatsache gestützt, dass die prophylaktische Substitutionsbehandlung mit Gerinnungsfaktoren zwar die Entwicklung der hämophilen Arthropathie hinauszögert, sie aber letztlich nicht zu verhindern vermag (87; 88). Insofern stellen die von uns gewonnenen Erkenntnisse ein wichtiges Argument für Strategien zur Korrektur der Makrophagenfunktion zusätzlich zur regelmäßigen Substitutionstherapie zur Vorbeugung der hämophilen Arthropathie dar. Zudem könnte eine solche Behandlung das erhöhte Risiko postoperativer Wundheilungsstörungen bei Hämophilen vermindern (39).

5.5 Makrophagen von Hämophilie-Patienten sind gegenüber M-CSF resistent

Die funktionellen Defizite der Makrophagen von Hämophilie-Patienten korrelieren mit ihrer Unfähigkeit Filopodien auszubilden. Diese fingerförmigen F-Aktin-reichen Ausläufer sind eine der Grundvoraussetzungen, um Zellfunktionen wie Wachstum, Invasion oder Phagozytose zu aktivieren. Filopodien können mit Lamellipodien interagieren oder einen Signalweg über Integrine einleiten, was zu einer Stabilisierung der Zelladhäsion führt. Dies ist wiederum für das Spreading notwendig (34). Des Weiteren sind Filopodien maßgeblich an der Phagozytose von Pathogenen und Zelltrümmern beteiligt, in dem sie die Phagozytose initiieren. Hat ein Partikel an der Oberfläche von Makrophagen gebunden, so ist es die Aufgabe der Filopodien Partikel ins Zellinnere zu ziehen (16). Filopodien konnten in Spendermakrophagen sowohl unter einem M-CSF- als auch unter einem GM-CSF-Treatment in hoher Zahl nachgewiesen werden, während Makrophagen von Hämophilie-Patienten weder nach Stimulation mit M-CSF noch mit GM-CSF in der Lage waren diese funktionell wichtigen Zellstrukturen auszubilden. In Makrophagen von Hämophilie-Patienten, welche mit GM-CSF stimuliert wurden, konnte jedoch noch die Makrophagen-typischen Marker TNF α und CD206 nachgewiesen werden. Dem gegenüber stehen M-CSF-stimulierte Makrophagen von Hämophilie-Patienten, welche weder TNF α noch den M2-typischen Marker CD163, einen für die RBC-Clearance zuständigen Hämoglob-

in-Haptoglobin-Transporter, exprimieren (20; 94). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass eine Differenzierung von hämophilen Monozyten zu inflammatorischen Makrophagen zumindest teilweise möglich ist. Die M-CSF-medierte Differenzierung hin zu einem anti-inflammatorischen M2-Phänotyp war hingegen ineffizient. Des Weiteren deuten die Daten auf eine wichtige Rolle der Zelladhäsion für die M2-Polarisierungsfähigkeit hin. Dies wird durch Studien untermauert, welche zeigen konnten, dass die Interaktion von M-CSF mit dessen Rezeptor CSF1-R zur Formierung von Zelladhäsionen führt, die wiederum wichtige Signalwege steuern. Das Zytokin M-CSF führt über die Aktivierung seines Rezeptors, einer Tyrosinkinase, zur Phosphorylierung von Zytoskelettproteinen und Hochregulierung bestimmter Gene und bewirkt dadurch einen Morphologiewechsel, der mit Spreading, Polarisierung, und Migration einhergeht. Insofern kann M-CSF durch die Ausbildung von Zelladhäsionen als primärer Regulator für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Monozyten bzw. Makrophagen angesehen werden (93; 102). Da genau solche Funktionen wie Spreading, Polarisierung und Migration in Makrophagen von Hämophilie-Patienten versagen, gehen wir davon aus, dass bei Hämophilie-Monozyten eine M-CSF-Resistenz vorliegt.

5.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Tatsache, dass Gerinnung und Entzündung sowie Wundheilung eng miteinander gekoppelt sind und dies in die Pathogenese verschiedener Krankheiten wie Thrombose oder Sepsis mit hineinspielt, konnte durch mehrere Studien belegt werden (27; 59; 63; 95; 105; 117). Insofern ist es nicht verwunderlich, dass es bei der Hämophilie – einer angeborenen Gerinnungsstörung – zu einer deregulierten Entzündungssituation kommt, die sich unter anderem in Defiziten anti-inflammatorischer M2-Makrophagenfunktionen wie Clotinvasion und Phagozytose manifestiert. Diese Störungen sind multifaktoriell und komplex und daher nicht allein durch die Substitution von Gerinnungsfaktoren zu beseitigen. So konnte zwar in weiteren Versuchen unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Hämophilie-Makrophagen nach Einbetten in geronnenem Plasma in der Gegenwart von M-CSF die Expression typischer M2-Makrophagenmarker exprimieren können (56), was die enorme Bedeutung einer funktionierenden Gerinnung für die Wundheilung unterstreicht. Im Einklang hiermit gelang es auch anderen Arbeitsgruppen zu zeigen, dass Thrombin sowohl durch sei-

ne Gerinnungsfunktion als auch durch seine direkte Wirkung auf Makrophagen eine Verbesserung – jedoch keine Normalisierung – der Wundheilung erzielen kann (73; 78). Dies ändert jedoch nichts an der Tatsache, dass die Clotinvasion der Hämophilie-Makrophagen in Plasma kaum möglich war. Ob die 3D-Einbettung in Plasma eine Verbesserung der Phagozytosefähigkeit von Hämophilie-Makrophagen und somit eine effizientere Elimination von gewebeschädigenden Granulozyten, Erythrozyten und deren eisenhaltigen Produkte erreichen kann, muss durch weitere Studien überprüft werden.

Es ist schon länger bekannt, dass dysregulierte Monozyten bzw. Makrophagen zur Entstehung von Krankheiten beitragen können. Insbesondere bei Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA), dem systemischem Lupus erythematoses (SLE) oder den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen konnte gezeigt werden, dass ähnlich wie bei der Hämophilie der pro-inflammatorische M1-Typ zu Lasten des regulatorischen M2-Typs überpräsent ist (122). Dies hat zur Folge, dass eine chronische Entzündung trotz fehlendem Pathogen aufrecht erhalten wird (89). Die fehlende Phagozytosefähigkeit, welche bei Makrophagen von Hämophilie-Patienten eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Arthropathie darstellt, wurde auch beim SLE, bei der primär biliären Zirrhose, bei chronischen Wunden sowie bei der RA beobachtet (11; 45; 47; 89). Bei der RA sowie bei der Arteriosklerose treten neben Störungen der Makrophagenfunktion auch Störungen der Monozytenzusammensetzung im Sinne einer Erhöhung der CD16⁺-Population auf (49; 119). Da es sehr viele Parallelen zwischen den hier aufgezählten Erkrankungen und der Hämophilie gibt, stellte sich die Frage, ob der Defekt ausschließlich die Makrophagenfunktion betrifft oder ob er bereits auf Monozytenebene besteht. Hierzu fand unsere Arbeitsgruppe in weiteren Versuchen heraus, dass auch bei der Hämophilie bereits eine Störung der Monozytenpopulation auftritt. Diese betrifft jedoch im Gegensatz zu den oben aufgeführten Erkrankungen nicht die CD14⁺/CD16⁺-Zusammensetzung, sondern zeichnet sich u.a. in einer deutlich reduzierten Expression des M-CSF-Rezeptors CSF1-R sowie von Rezeptoren, die für die Eisenabsorption (CD163) und die Clotinvasion/ Angiogenese (Tie2) relevant sind, aus (56). Diese Veränderungen der Monozytenfunktion geben Anlass zur Spekulation, dass das Wundheilungsdefizit bei der Hämophilie und die hieraus resultierende chronische Entzündung von systemischen Veränderungen begleitet wird, die nicht allein durch die Korrektur der Blutungsneigung zu beheben sind. Ob diese Veränderungen bei Hämophilen tatsächlich zur Perpetuierung

der Gelenkzerstörung beitragen, sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

Zusammenfassend können folgende Schlussfolgerungen durch die hier gewonnenen Ergebnisse gezogen werden: 1) Das Zytokin M-CSF vermittelt in gesunden Spendermakrophagen wichtige M2-Funktionen, welche für die Beendigung einer Entzündungsreaktion und für die Einleitung der Wundheilung nötig sind. Hierzu zählen die Polarisierung, Phagozytose und Clotinvasion. An all diesen Funktionen ist die Zelladhäsion beteiligt, z.B. durch die Generierung von Filopodien. 2) In Makrophagen von Hämophilie-Patienten sind trotz M-CSF Stimulation sämtliche M2-typischen Funktionen ineffizient. Des Weiteren sind bei diesen Makrophagen sowohl Filopodien als auch typische Marker wie TNF α oder CD163 herunterreguliert. Makrophagen von Hämophilie-Patienten können also nicht auf M-CSF reagieren und scheinen auf dem Niveau von unstimulierten Spendermonozyten zurückzubleiben. Dies bedeutet, dass Makrophagen von Hämophilie-Patienten trotz Normalisierung der Gerinnung nicht durch das Gerinnsel zum Ort des Geschehens wandern können. Makrophagen, die es dennoch in das Wundgebiet schaffen, können das anfallende Eisen nicht effektiv phagozytieren und somit die Entzündungsreaktion, welche zur Entwicklung der hämophilen Arthropathie beiträgt, nicht aufhalten. Die Makrophagendysfunktion könnte somit eine Schlüsselstelle in der Pathogenese der hämophilen Arthropathie einnehmen. 3) Während Monozyten von Hämophilie-Patienten nicht auf M-CSF reagieren können, differenzieren sie unter GM-CSF zumindest teilweise zu inflammatorischen M1-Makrophagen, was an dem Vorhandensein der Marker TNF α und CD206 erkennbar ist. Dies bedeutet ein Missverhältnis der Makrophagen-Subtypen zu Gunsten von M1 mit der Folge der Verstärkung der Entzündungsreaktion anstelle ihrer Beendigung. 4) Wenn es gelingt die molekularen Mechanismen zu identifizieren, die zu einer M-CSF-Resistenz und somit zu einem Missverhältnis der Makrophagen-Phänotypen führen, könnten neue Therapiestrategien zur Beeinflussung der hämophilen Arthropathie entwickelt werden. Denkbar wäre beispielsweise, dass eine Downregulation des CSF1-Rezeptors, wie sie unsere Arbeitsgruppe in späteren Versuchen nachweisen konnte (56), durch das ständig vorherrschende entzündliche Milieu für das fehlende Ansprechen auf M-CSF verantwortlich ist. In Einklang mit dieser Hypothese konnte durch unsere Arbeitsgruppe ferner in weiteren Studien sowohl eine CRP- als auch eine Leptin-Erhöhung in Hämophilie-Patienten nachge-

wiesen werden (56). Leptin als auch CRP wurden bereits häufiger im Zusammenhang mit Entzündungen beschrieben, weshalb bei der Hämophilie wie auch bei anderen Erkrankungen wie etwa bei Adipositas, kardiovaskulären Erkrankungen oder Diabetes mellitus von einer chronischen low-grade-Infektion ausgegangen werden muss (15; 33; 62; 114). Somit könnte eine anti-inflammatorische Therapie, wie sie beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis eingesetzt wird, erfolgsversprechend sein (49). Klinische Studien, in welchen Hämophilie-Patienten intraartikulär Kortikosteroide verabreicht wurden, untermauern, dass dieses Therapiekonzept auch bei der hämophilen Arthropathie vielversprechend sein könnte (14; 70). Auch durch die Gabe von anti-TNF α , anti-IL-1 β , anti-IL-6 in Kombination mit einer Gerinnungsfaktorsubstitution, oder JODI-19, einem anti-inflammatorischen Agens, konnte via Reduktion von pro-inflammatorischen Zytokinen u.a. eine geringere Synovialhyperplasie und somit eine geringere Knorpelzerstörung erzielt werden (82; 116; 121; 123). Unsere Arbeitsgruppe konnte zwischenzeitlich zeigen, dass die Substitutionstherapie mit dem Präparat Idelvion®, dem Gerinnungsfaktor IX, welcher eine verlängerte Halbwertszeit aufweist, in Hämophilie B-Patienten neben einer reinen Gerinnungsfunktion auch anti-inflammatorische Funktionen übernimmt (57). Analog hierzu könnte eine weitere Therapiemöglichkeit bei Hämophilie A die prophylaktische Gabe eines rekombinant hergestellten Gerinnungsfaktors VIII, welcher mit der Fc-Domäne von IgG1 fusioniert ist (= rFVIII Fc), sein. Durch eine Interaktion zwischen rFVIII Fc und dem Fc-Rezeptor auf Monozyten wird eine M2-Polarisierung erzielt, welche sich positiv auf das vorhandene M1-M2-Missverhältnis in Hämophilie-Patienten auswirken könnte. Zudem ist durch die fusionierte Fc-Domäne eine verlängerte Bioverfügbarkeit des Gerinnungsfaktors gegeben, wodurch es zu einer geringeren Entwicklung von Knorpelschäden bei stattgehabter Gelenkblutung kommt (52; 106). Ein anderer Therapieansatz könnte auch die lokale Injektion von gesunden, exogenen Makrophagen sein. Diese Strategie wurde bereits bei Mäusen mit gestörter Wundheilung erfolgreich angewendet. Nach Injektion von funktionsfähigen Makrophagen konnte die Makrophagendysfunktion behoben werden und es stellte sich ein schneller Wundverschluss ein (19). Da unsere Arbeitsgruppe zeigen konnte, dass Plasma in der Lage ist unter M-CSF bei Hämophilie-Patienten die Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen zu generieren, wäre auch die Injektion von intraartikulärem Plasma denkbar (56). Berichte zeigen, dass dies bereits erfolgreich angewendet wird (65).

Das Ziel muss es sein, auf Grundlage der hier gewonnen Ergebnisse und weiterer noch folgender Studien wieder ein Makrophagengleichgewicht in Hämophilie-Patienten herzustellen. Dadurch wäre ein Therapieprinzip geschaffen, welches den Teufelskreis, der zur Entstehung der hämophilen Arthropathie führt, durchbrechen kann. Folglich könnte die Arthropathie nicht nur verzögert, sondern tatsächlich verhindert werden. Etlichen Hämophilie-Patienten würde somit eine schwere Komplikation, welche die Lebensqualität stark einschränkt, erspart bleiben.

6 Literaturverzeichnis

1. Acharya, S. S. et al., *Neoangiogenesis contributes to the development of hemophilic synovitis*. Blood, 2011. **117**(8): 2484-93.
2. Aktories, K. et al., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban& Ficher Verlag/ Elsevier GmbH, 2009. **10. Auflage**: 525f.
3. Ambarus, C. A. et al., *Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages*. J Immunol Methods, 2012. **375**(1-2): 196-206.
4. Arastéh, K., Baenkler, H.-W., *Duale Reihe Innere Medizin*. Thieme Verlag, 2009. **2. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage**: 1260ff.
5. Aronstam, A., Rainsford, S. G., Painter, M. J. *Patterns of bleeding in adolescents with severe haemophilia A*. Br Med J, 1979. **1**(6161): 469-70.
6. Beck, H., et. al., *faszinierendes Gehirn: eine bebilderte Reise in die Welt der Nervenzellen*. Springer Spektrum, 2016. 302.
7. Bennett, S., Breit, S. N., *Variables in the isolation and culture of human monocytes that are particular relevance to studies of HIV*. Journal of Leukocyte Biology, 1994. **56**(3): 236-240.
8. Biggs, R. et al., *Christmas disease: a condition previously mistaken for haemophilia*. Br Med J, 1952. **2**(4799): 1378-82.
9. Bogdan, C. et al., *Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10*. J Biol Chem, 1992. **267**(32): 23301-8.
10. Boissonnas, A. et al., *In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor*. J Exp Med, 2007. **204**(2): 354-56.
11. Botelho, R. J., Grinstein, S., *Phagocytosis*. Curr Biol, 2011. **21**(14):R533-38.
12. Bowen D. J., *Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights*. Mol Pathol., 2002. **55**(1): 1-18. Review.
13. Brakke, M. K., *Density gradient centrifugation: a new separation technique*. J. Am. Chem. Soc., 1951. **73**(4): 1847-1848.
14. Buccheri, E. et al., *Haemophilic arthropathy: A narrative review on the use of intra-articular drugs for arthritis*. Haemophilia, 2019. **25**(6):919-927.
15. Cardoso, C. R., Leite, N. C., Salles, G. F., *Prognostic importance of C-reactive protein in high cardiovascular risk patients with type 2 diabetes mellitus: the Rio de Janeiro Type 2 Diabetes Cohort Study*. J Am Heart Assoc, 2016. **5**(11): e004554.

16. Chazotte, B., *Labeling cytoskeletal F-actin with rhodamine phalloidin or fluorescein phalloidin for imaging*. Cold Spring Harb Protoc., 2010. **5**: pdb.prot.4947.
17. Cojocaru, E. et al., *Immunohistochemical expression of anti-CD68 antibodies in atherosclerotic plaque*. Rom J Morphol Embryol, 2012. **53**(1): 61-66.
18. Corna, G. et al., *Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages*. Haematologia, 2010. **95**(11): 1814-22.
19. Danon, D., Kowatch, M. A., Roth, G. S. *Promotion of wound repair in old mice by local injection of macrophages*. Proc Natl Acad Sci USA, 1989. **86**: 2018-2020.
20. de Back, D. Z. et al., *Of macrophages and red blood cells; a complex love story*. Front Physiol, 2014. **5**: 9.
21. de Waal Malefyt, R. et al., *Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. J Exp Med, 1991. **174**(5): 1209-20.
22. Drew, A. F. et al., *Wound-healing defects in mice lacking fibrinogen*. Blood, 2001. **97**(12): 3691-8.
23. Durafourt, B. A. et al, *Comparison of Polarization Properties of Human Adult Microglia and Blood-Derived Macrophages*. Glia, 2012. **60**(5): 717-727.
24. Fadok, V. A. et al., *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF*. J Clin Invest, 1998. **101**(4): 890-8.
25. Fleetwood, A. J. et al., *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF) and Macrophage CSF-dependent Macrophage Phenotype Display Differences in Cytokine Profiles and Transcription Factor Activities: Implications for CSF Blockade in Inflammation*. J Immunol, 2007. **178**(8): 5245-5252.
26. Fleetwood, A. J. et al., *GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on Type I interferon signaling*. J Leukoc Biol., 2009. **86**(2): 411-21.
27. Flick, M. J. et al., *Fibrin(ogen) exacerbates inflammatory joint disease through a mechanism linked to the integrin alphaMbeta2 binding motif*. J Clin Invest, 2007. **117** (11):3224–3235.
28. Forsyth, A. L. et al., *Consequences of intra-articular bleeding in haemophilia: science to clinical practice and beyond*. Haemophilia, 2012. **18** (Suppl4): 112-119.
29. Franchini, M., Favaloro, E. J., Lipp, G., *Mild hemophilia A*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(3): 421-32. Review.

30. Geissmann, F. et al., *Development of monocytes, macrophages and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): 656-661. Review.
31. Gerok, W. und Huber, C., *Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt*. Schattauer Verlag, 2007. **11.Auflage**: 84-88.
32. Goren, I. et al., *A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes*. Am J Pathol, 2009. **175**(1): 132-47.
33. Grunfeld, C. et al., *Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters*. J Clin Invest, 1996. **97**(09): 2152–2157.
34. Guillou, H. et al., *Lamellipodia nucleation by filopodia depends on integrin occupancy and downstream Rac1 signaling*. Exp Cell Res, 2008. **314**(3): 478-88.
35. Gurski, L. A. et al., *Relocation of CLIC1 Promotes Tumor Cell Invasion and Colonization of Fibrin*. Mol. Cancer. Res., 2015. **13**(2): 273-80.
36. Hakobyan, N. et al., *Pathobiology of hemophilic synovitis I: overexpression of mdm2 oncogene*. Blood, 2004. **104**(7): 2060-4.
37. Hart, P. H. et al., *Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2*. Proc Natl Acad Sci USA, 1989. **86**(10): 3803-7.
38. Hashimoto, S. et al., *Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages*. Blood, 1999. **94**(3): 837-44.
39. Hirose, J., Takedani, H. and Koibuchi, T., *The risk of elective orthopaedic surgery for hemophilia patients: Japanese single-centre experience*. Haemophilia, 2013. **19**(6): 951-955.
40. Hoffman, M., Monroe, D. M., *a cell-based model of hemostasis*. Thromb Haemost, 2001. **85**(6): 958-65. Review.
41. Hoffman, M. et al., *Cutaneous wound healing is impaired in hemophilia B*. Blood, 2006. **108**(9): 3053-60.
42. Hoffman, M., Monroe, D. M., *Coagulation 2006: a modern view of Hemostasis*. Hematol Oncol Clin North Am, 2007. **21**(1): 1-11.
43. Hoots, W. K., *Pathogenesis of hemophilic arthropathy*. Semin Hematol, 2006. **43**(1 Suppl 1): 18-22. Review.
44. Hoppstädter, J., et al., *M2 polarization enhances silica nanoparticle uptake by macrophages*. Front Pharmacol, 2015. **6**: 55.
45. Hurst, N. P., Nuki, G., *Evidence for defect of complement-mediated phagocytosis by monocytes from patients with rheumatoid arthritis and cutaneous vasculitis*. Br Med J (Clin Res Ed), 1981. **282**(6282): 2081-3.

46. Italiani, P., Boraschi, D., *From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation*. Front Immunol, 2014. **5**: 514.
47. Jaffe, C. J. et al., *Receptor specific clearance by the reticuloendothelial system in chronic liver diseases. Demonstration of defective C3b-specific clearance in primary biliary cirrhosis*. J Clin Invest, 1978. **62**(5): 1069-77.
48. Jaguin, M., et al., *Polarization profiles of human M-CSF generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin*. Cellular Immunology, 2013. **281**(1): 51-61.
49. Kawanaka, N. et al., *CD14+, CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(10): 2578-86.
50. Kharraz, Y. et al., *Macrophage Plasticity and the Role of Inflammation in Skeletal Muscle Repair*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: 491497. Review.
51. Kiefel, V, *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*. Springer Verlag, 2010. **4. Auflage**: 344-353.
52. Kis-Toth, K. et al., *Recombinant factor VIII Fc fusion protein drives regulatory macrophage polarization*. Blood Adv, 2018. **2**(21): 2904-2916.
53. Klinke, R. et al., *Physiologie*. Thieme Verlag, 2009, **6. Auflage**: 256-257.
54. Knowles, L. M. et al., *Plasma fibronectin promotes tumor cell survival and invasion through regulation of Tie2*. Journal of Cancer, 2013. **4**(5): 383-90.
55. Knowles, L. M. et al., *Fibronectin Matrix Formation is a Prerequisite for colonization of kidney tumor cells in fibrin*. Journal of Cancer, 2015. **6**(2): 98-104.
56. Knowles, L. M. et al., *Macrophage Polarization is Deregulated in Haemophilia*. Thromb Haemos, 2019. **119**(2): 234-245.
57. Knowles, L. M., Eichler, H., Pilch, J, *low grade inflammation in Hemophilia*. Blood, 2019. **134** (Supplement_1): 1115.
58. Koh, T. J., DiPietro, L. A., *Inflammation and wound healing: the role of the macrophage*. Expert Rev Mol Med, 2011. **13**: e23.
59. Kopec, A. K. et al., *Fibrin(ogen) drives repair after acetaminophen-induced liver injury via leukocyte α M β 2 integrin-dependent upregulation of Mmp12*. J Hepatol, 2017. **66**(04): 787-797.
60. Kress, H. et al., *Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity*. Proc Natl Acad Sci USA., 2007. **104**(28): 11633-38.
61. Kurth, A. et al., *Die orthopädische Behandlung von muskulo-skelettalen Komplikationen der Hämophilie*. Deutsches Ärzteblatt, 2002. **Jg.99, Heft 44**: 2928-2935.

62. Lagrand, W. K. et al., *C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon?* Circulation, 1999. **100**(01): 96–102.
63. Laouar, A. et al., *Interaction between alpha 5 beta 1 integrin and secreted fibronectin is involved in macrophage differentiation of human HL-60 myeloid leukemia cells.* J Immunol, 1999. **162**(01): 407–414.
64. Lacey, D. C. et al., *Defining GM-CSF- and Macrophage-CSF-Dependent Macrophage Responses by in Vitro Models.* J Immunol, 2012. **188**(11): 5752-65.
65. Li, T.-Y. et al., *An exploratory comparison of single intra-articular injection of platelet-rich plasma vs hyaluronic acid in treatment of haemophilic arthropathy of the knee.* Haemophilia, 2019. **25**(3): 484-492.
66. Malik, G. et al., *Plasma fibronectin promotes lung metastasis by contributions to fibrin clots and tumor cell invasion.* Cancer Res., 2010. **70**(11): 4327-4334.
67. Manco-Johnson, M. J. et al., *Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia.* N Engl J Med, 2007. **357**(6): 535-44.
68. Mantovani, A. et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.* Trends in Immunology, 2004. **25**(12): 677-86. Review.
69. Mantovani, A. et al., *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling.* J Pathol, 2013. **229**(2): 176-185.
70. Martin, E. J. et al., *Efficacy and safety of point-of-care ultrasound-guided intra-articular corticosteroid joint injections in patients with haemophilic arthropathy.* Haemophilia, 2017. **23**(1): 135-143.
71. Martinez, F. O. et al., *Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression.* Journal of Immunology, 2006. **177**(10): 7303-7311.
72. Masters, T. A. et al., *Plasma membrane tension orchestrates membrane trafficking, cytoskeletal remodeling, and biochemical signaling during phagocytosis.* Proc Natl Acad Sci USA, 2013. **110**(29): 11875-80.
73. McDonald, A. et al., *Restoring hemostatic thrombin generation at the time of cutaneous wounding does not normalize healing in hemophilia B.* J Thromb Haemost, 2007. **5**(8): 1577-83.
74. McDonald, A. G. et al., *Perivascular tissue factor is down-regulated following cutaneous wounding: implications for bleeding in hemophilia.* Blood, 2008. **111**(4): 2046-8.
75. McWhorter, F. Y. et al., *Modulation of macrophage phenotype by cell shape.* Proc Natl Acad Sci USA, 2013. **110**(43): 17253-8.
76. Meszaros, A.J., Reichner, J. S., Albina, J. E., *Macrophage phagocytosis of wound neutrophils.* J Leukoc Biol, 1999. **65**(1): 35-42.

77. Mirza, R., DiPietro, L. A., Koh, T. J., *Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice*. Am J Pathol, 2009. **175**(6): 2454-62.
78. Monroe, D. M., Mackman, N., Hoffman, M., *Wound healing in hemophilia B mice and low tissue factor mice*. Thromb. Res., 2010. **125**(Suppl 1): 74-77.
79. Monroe, D. M., Hoffman, M., *The clotting system - a major player in wound healing*. Haemophilia, 2012. **18**(Suppl 5): 11-6.
80. Morris, C. J. et al., *Relationship between iron deposits and tissue damage in the synovium: an ultrastructural study*. Ann Rheum Dis, 1986. **45**(1): 21-6.
81. Mosser, D. M., Edwards, J. P., *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): 958-69.
82. Narkbunnam, N. et al., *IL-6 receptor antagonist as adjunctive therapy with clotting factor replacement to protect against bleeding-induced arthropathy in hemophilia*. J Thromb Haemost, 2013. **11**(5): 881-93.
83. Niethard, F. U., Heller, K. D., Weber M., *Orthopädie compact*. Thieme Verlag, 2005. **1. Auflage**: 413f.
84. Nieuwenhuizen, L. et al., *Hemarthrosis in hemophilic mice results in alterations in M1-M2 monocyte/macrophage polarization*. Thromb Res, 2014. **133**(3): 390-395.
85. Nijdam A. et al., *Bleeding before prophylaxis in severe hemophilia: paradigm shift over two decades*. Haematologia, 2015. **100**(3): e84-86.
86. Novak, M. L., Koh, T. J., *Macrophage phenotypes during tissue repair*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(6): 875-81.
87. Oldenburg, J., *Optimal treatment strategies for hemophilia: achievements and limitations of current prophylactic regimens*. Blood, 2015. **125**(30): 2038-44.
88. Oldenburg, J. et al., *Controlled, cross-sectional MRI evaluation of joint status in severe haemophilia A patients treated with prophylaxis vs. on demand*. Haemophilia, 2015. **21**(2): 171-9.
89. Orme, J., Mohan, C., *Macrophage subpopulations in systemic lupus erythematosus*. Discov. Med., 2012. **13**(69): 151-158.
90. Øvliisen, K. et al., *IL-1 beta, IL-6, KC and MCP-1 are elevated in synovial fluid from haemophilic mice with experimentally induced haemarthrosis*. Haemophilia, 2009. **15**(3): 802-10.
91. Peters, T. et al., *Wound-healing defect of CD18(-/-) mice due to a decrease in TGF-beta1 and myofibroblast differentiation*. EMBO J, 2005. **24**(19): 3400-10.
92. Pettersson, H., Ahlberg, A. and Nilsson, I. M., *A radiologic classification of Hemophilic Arthropathy*. Clin Orthop Relat Res, 1980. **149**: 153-9.

93. Pixley, F. J. et al., *Protein tyrosine phosphatase phi regulates paxillin tyrosine phosphorylation and mediates colony-stimulating factor 1-induced morphological changes in macrophages*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(5): 1795-809.
94. Porcheray, F. et al., *Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation*. Clin Exp Immunol, 2005. **142**(3): 481-9.
95. Rathnakumar, K. et al., *Angiopoietin-2 mediates thrombin-induced monocyte adhesion and endothelial permeability*. J Thromb Haemost, 2016. **14**(08): 1655–1667.
96. Rey-Giraud, F., Hafner, M. and Ries, C. H., *In Vitro Generation of Monocyte-Derived Macrophages under Serum-Free Conditions Improves Their Tumor Promoting Functions*. PLoS ONE, 2012. **7**(8): e42656.
97. Rigamonti, E. et al., *Macrophage Plasticity in Skeletal Muscle Repair*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: 560629. Review.
98. Rodero, M. P., Khosrotehrani, K., *Skin wound healing modulation by macrophages*. Int J Clin Exp Pathol, 2010. **3**(7): 643-53. Review.
99. Roosendaal, G. et al., *Cartilage damage as a result of hemarthrosis in a human in vitro model*. J Rheumatol, 1997. **24**(7): 1350-4.
100. Roosendaal, G. et al., *Iron deposits and catabolic properties of synovial tissue from patients with haemophilia*. J Bone Joint Surg Br, 1998. **80**(3): 540-5.
101. Roosendaal, G. and Lafeber, F. P., *Pathogenesis of haemophilic arthropathy*. Haemophilia, 2006. **12**(Supp.3): 117-121. Review.
102. Sampaio, N. G. et al., *Phosphorylation of CSF-1R Y721 mediates its association with PI3K to regulate macrophage motility and enhancement of tumor cell invasion*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 12): 2021-31.
103. Sen, D. et al., *Nuclear factor (NF)-kappaB and its associated pathways are major molecular regulators of blood-induced joint damage in a murine model of hemophilia*. J Thromb Haemost, 2013. **11**(2): 293-306.
104. Sindrilaru, A. et al., *An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(3): 985-997.
105. Steinbrecher, K. A. et al., *Colitis-associated cancer is dependent on the interplay between the hemostatic and inflammatory systems and supported by integrin alpha(M)beta(2) engagement of fibrinogen*. Cancer Res, 2010. **70**(07): 2634–2643.
106. Sun, J. et al., *Abnormal joint and bone wound healing in hemophilia mice is improved by extending factor IX activity after hemarthrosis*. Blood, 2017. **129**(15): 2161-2171.

107. Tagliaferri, A. et al., *Benefits of prophylaxis versus on-demand treatment in adolescents and adults with severe haemophilia A: the POTTER study.*, *Thromb Haemost.*, 2015. **114**(1): 35-45.
108. Tang, Y. et al., *Mertk Deficiency affects macrophage directional migration via disruption of cytoskeletal organization.* *PLoS ONE*, 2015. **10**(1): e0117787.
109. Trakymiene, S. S. et al., *Progression of haemophilic arthropathy in children: a Lithuanian- Danish comparative study.* *Haemophilia*, 2013. **19**(2): 212-18.
110. Valentino, L. A., *Blood-induced joint disease: the pathophysiology of hemophilic arthropathy.* *J Thromb Haemost*, 2010. **8**(9): 1895-902.
111. Vereck, F. A. W. et al., *Human IL-23-producing type 1 macrophage promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004. **101**(13): 4560-5.
112. Vereck, F. A. W. et al., *Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma and CD40L-mediated costimulation.* *J. Leukoc. Biol.*, 2006. **79**(2): 285-93.
113. Vicente-Manzanares, M., Webb, D. J. and Horwitz, A. R., *Cell migration at a glance.* *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 21): 4917-19. Review.
114. Visser, M. et al., *Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults.* *JAMA*, 1999. **282**(22): 2131–2135.
115. Vogel, D. Y. S. et al., *Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared.* *Immunobiology*, 2014. **219**(9): 695-703.
116. van Vulpen, L. F. D. et al., *IL-1 β , in contrast to TNF α , is pivotal in blood-induced cartilage damage and is a potential target for therapy.* *Blood*, 2015. **126**(19): 2239-46.
117. von Brühl, M. L. et al., *Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo.* *J Exp Med*, 2012. **209**(04): 819–835.
118. Wen, F.-Q. et al., *c-myc proto-oncogene expression in hemophilic synovitis: in vitro studies of the effects of iron and ceramide.* *Blood*, 2002. **100**(3): 912-6.
119. Wildgruber, M. et al., *Monocyte subset dynamics in human atherosclerosis can be profiled with magnetic nano-sensors.* *PLoS One*, 2009. **4**(5): e5663.
120. Yeager, L. A. et al., *Bacillus anthracis Edema Toxin Suppresses Human Macrophage Phagocytosis and Cytoskeletal Remodelling via the Protein Kinase A and Exchange Protein Activated by Cyclic AMP Pathways,* *Infect Immun*, 2009. **77**(6): 2530-43.
121. Zhang, F. et al., *A Translational Study of TNF-Alpha Antagonists as an Adjunctive Therapy for Preventing Hemophilic Arthropathy.* *J Clin Med*, 2019. **9**(1): 75.

122. Zhang, X. and Mosser, D. M., *Macrophage activation by endogenous danger signals*. J Pathol, 2008. **214**(2): 161-78.
123. Zhong, C. et al., *Novel Piperazino-Enaminones Decrease Pro-inflammatory Cytokines Following Hemarthrosis in a Hemophilia Mouse Model*. *Inflammation*, 2019. **42**(5): 1719-1729.
124. <http://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence> (zuletzt aufgerufen am 18.01.2021)
125. <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1223/isotyp-kontrollantikoerper/> (zuletzt aufgerufen am 18.01.2021)
126. <http://www.buw-output.de/archive/ausgabe11/die-programmierte-sporttherapie.html> (zuletzt aufgerufen am 18.01.2021)
127. <https://www.caymanchem.com/pdfs/500290.pdf> (zuletzt aufgerufen am 18.01.2021)
128. <https://cellcounting.de/die-technologie-im-casy/> (zuletzt aufgerufen am 18.01.2021)
129. http://cellcounting.de/wp-content/uploads/2014/11/CASY-TT_Quickguide_1_5.pdf (zuletzt aufgerufen am 18.01.2021)
130. <https://www.dhg.de/haemophiliezentren.html> (zuletzt aufgerufen am 18.01.2021)
131. <https://www.promocell.com/product/lymphocyte-separation-medium-1077/#:~:text=The%20PromoCell%20Lymphocyte%20Separation%20Medium,of%20low%20density%20gradient%20centrifugation.> (zuletzt aufgerufen am 18.01.2021)
132. https://www.sysmex.de/fileadmin/media/f101/Muster-Standardarbeitsanweisung/SOP_KX-21N.pdf (zuletzt aufgerufen am 18.01.2021)
133. <http://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Images/content/untouched-workflow.jpg> (zuletzt aufgerufen am 18.01.2021)
134. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Untouched_human_mouse_cells_negative_isolation.pdf (zuletzt aufgerufen am 18.01.2021)
135. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Dyna_untouched_human_monocyte_man.pdf (zuletzt aufgerufen am 18.01.2021)
136. http://www.uniklinikum-saarland.de/fileadmin/UKS/Einrichtungen/Kliniken_und_Institute/Chirurgie/Haemostaseologie/Haemophilie-Symposium/Eichler__Haemophilie-Symposium_2015__Einfuehrung.pdf (zuletzt aufgerufen am 18.01.2021)
137. https://www.univie.ac.at/mikroskopie/2_kontraste/phasenkontrast/3_prinzip.htm (zuletzt aufgerufen am 18.01.2021)

138. <http://www.zen-bio.com/products/cells/pbmcs.php>
(zuletzt aufgerufen am 18.01.2021)

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: klinisches Bild der hämophilen Arthropathie eines rechten Knies (126)

Abb. 2: vereinfachter Pathomechanismus der hämophilen Arthropathie

Abb. 3: Veranschaulichung der Kriterien für die Berechnung der Polarisierungsrate

Abb. 4: Veranschaulichung der Kriterien für die Berechnung des Elongationsindex

Abb. 5: Darstellung von Filopodien

Abb. 6: Analyse der durch Immunfluoreszenz angefärbten Marker

Abb. 7: Auswertung der Phagozytoserate

Abb. 8: Monozytenisolation mit der Dynabeads[®] untouched Methode

Abb. 9: Makrophagenmorphologie

Abb. 10: Makrophagen von Hämophilie-Patienten weisen eine ineffektive Polarisierung auf

Abb. 11: Phagozytosefähigkeit ist in Makrophagen von Hämophilen vermindert

Abb. 12: mangelhafte Clotinvasion von Makrophagen von Hämophilie-Patienten

Abb. 13: eingeschränkte Filopodienbildung in Makrophagen von Hämophilie-Patienten

Abb. 14: Makrophagen von Hämophilie-Patienten exprimieren vermindert TNF α und CD163

8 Abkürzungsverzeichnis

Ag:	Antigen
Ak:	Antikörper
AT:	Antithrombin
ATP:	Adenosintriphosphat
BSA:	bovine serum albumin
CD163/ CD206:	Cluster of differentiation 163/ Cluster of differentiation 206
COX:	Cyclooxygenase
CSF1-R:	Colony- stimulating-factor 1- receptor
DAPI:	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DDAVP:	Desmopressin
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNS/DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF:	epidermal growth factor
EHCCC:	European Hemophilia Comprehensive Care Center
FBS:	fetal bovine serum/ fetales Kälberserum
GM-CSF:	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HAV:	Hepatitis A-Virus
HBV:	Hepatitis B-Virus
HCV:	Hepatitis C-Virus
HBSS:	Hank´s balanced salt solution
HIF:	Hypoxie-induzierter Faktor
IF:	Immunfluoreszenz
IFN γ :	Interferon gamma
IL:	Interleukin
LPS:	Lipopolysaccharid
M-CSF:	macrophage colony-stimulating factor
MCP:	monocyte chemoattractant protein
MIP:	macrophage inflammatory protein

MDM:	monocyte derived macrophages
MMP:	Matrixmetalloproteinase
MvH	Makrophagen von Hämophilie-Patienten
mRNA:	messenger Ribonukleinsäure
MTX:	Methotrexat
NF- κ B:	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen:	natürliche Killerzellen
NSAID:	non-steroidal anti-inflammatory drugs
PBMC:	peripheral blood mononuclear cells
PBS:	phosphate-buffered saline
PFA:	Paraformaldehyd
P/S:	Penicillin/Streptomycin
RA:	rheumatoide Arthritis
RBC:	red blood cells, rote Blutzellen
ROS:	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI-Medium:	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RT:	Raumtemperatur
SLE:	systemischer Lupus erythematosus
TGF β :	Transforming growth factor beta
TNF α :	Tumornekrosefaktor alpha
TFPI:	tissue factor pathway inhibitor
untMo:	untouched Monozyten
VEGF:	vascular endothelial growth factor

9 Anhang

9.1 Überblick der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Absauganlage	Vacusaft Comfort(INTEGRA Biociences)
Brutschrank	Hera Cell 2401 Incubator
CASY® Cell Counter and Analyzer	OLS OMNI Life Science GmbH & Co, KG
Computerprogramme	Adope Photoshop Image J GraphPad Prism 5
Gefrierschrank	UF 755G (Dometic) (-80°C)
Immunfluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse TS100
Kühlschrank	MP 355S (Dometic)
KX-21N	Sysmex
Laborabzug	R1500 (Delta System 30)
Magnet/ bead separation	Invitrogen
Magnetrührer	Variomag Maxi (Magnetrührer)
Moxi Z™ mini automated cell counter	ORFLO
Phasenkontrastmikroskop	PrimoVert (Carl Zeiss)
Pipetten (Classic PR-2; -10; -20;-200;-1000)	Rainin
Shaker	Polymax 1040 (Heidolph)
Sterilbank	Hera Safe KS (Thermoscientific)
Vortexer	Vortexer lab dancer (VWR)
Waage	Analysewaage (Sartorius)
Wasserbad	TW8 (Julabo)
Zentrifugen	Heraeus Fresco 21 (Thermoscientific) Heraeus Megafuge 40R (Thermoscientific) Heraeus Megafuge 40 (Thermoscientific)

9.2 Überblick der verwendeten Reagentien

Substanz	Firma	Katalognummer
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG	Life technologies	A11029
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG	Life technologies	A11008
Alexa Fluor 546 Phalloidin	Life technologies	A22283
anti-human CD68 (monoclonal mouse)	Abcam	Ab955
anti-human CD163 (monoclonal mouse)	AbD Serotec	MCA1853T
anti-human CD206 (monoclonal mouse)	AbD Serotec	MCA2155T
anti-human RBC	Rockland antibodies & assay	109-4139

anti-human TNF α (polylonal rabbit)	Dianova	CYT-26676
BSA (Bovin serum albumin)	Fisher	BP1600-100
CaCl ₂	Merck KGaA	1.02382.0250
Cell tracker CMFDA (green)	Life technologies	C7025
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fisher	BP231-100
Dynabeads untouched human monocytes kit	Invitrogen Life technology	11350D
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Merck KGaA	1.08421.1000
Falcon 8-well Culture Slides	Corning Life science	354118
FBS (fetal bovine serum)	PAA Gibco Life Tech	A15-104 10270-106
Fluoroshield™ with DAPI	Sigma	F6057
GM-CSF	Mitenyi Biotec	130-093-865
HBSS (ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺) (Hank´s balanced salt solu- tion)	Corning	21-022-CVR
H ₂ O	Sigma	W3500
IFN γ	R&D System	285-IF-100
IgG1 mouse monoclonal	Millipore	MABC002
IgG rabbit polyclonal	R&D	ab 105-C
IL-4	Mitenyi Biotec	130-093-920
L-Glutamin	PAA	M11-004
LPS	Sigma	L2630
Lymphocyte separation Medium 1077	Promocell	C-44010
M-CSF	Miltenyi Biotec	130-096-489
PBS pH 7,2 (1x)	Fisher	
PFA (Paraformaldehyd) Pulver, wird in PBS gelöst	Roth	0335.2
Phagocytosis Assay Kit (IgG FITC)	Cayman chemical	500290
P/S (Penicillin/Streptomycin)	PAA	P11-010
RBC Lyse-Puffer, selbst her- gestellt (pH 7,3) aus:		
155nM NH ₄ Cl	VWR	700464-10137
10mM KHCO ₃	VWR	701095-12029
0,1mM EDTA	Merck KGaA	1.08421.1000
RPMI (Roswell Park Memorial Institute)	Fisher	31870-025
Thrombin	Sigma	T4393
Triton X100	Sigma	T9284

9.3 Patientendaten

#	Geschlecht	Alter	Subtyp	Genetik	Genese	Erstdiagnose
1= Hämophilie A 2= Hämophilie B						
1= hereditär 2= erworben						
1	M	26	1	Intron-22-Inversion	1	Sep 89
2	M	43	1	-----	1	1974
3	M	28	1	Missense-Mutation p. (Pro2319Leu)	1	Aug 91
4	M	28	2	Punktmutation Exon 6: Arg145Leu	1	Apr 03
5	M	24	1	Intron-22-Inversion	1	Apr 90
6	M	19	1	Intron-22-Inversion	1	Aug 95
7	M	50	1	Intron-22-Inversion (hemizygot)	1	92 in Dtl
8	M	32	1	Inversion Typ I	1	Sep 83
9	M	31	2	-----	1	Mrz 83

#	Restaktivität	Schweregrad	Blutungsintensität	Blutungslokalisierung
1= Subhämophilie (15-50%) 2= leicht (5-15%) 3= mittelschwer (1-5%) 4= schwer (<1%)				
1= leichte Blutungen 2= stärkere Blutungen 3= Spontanblutungen				
1= Gelenke, Muskeln 2= Schleimhäute 3= Blut im Urin 4= Magen-Darm-Trakt 5= sonstiges				
1	<1%	4	1	1
2	1-8%	3	mittlerweile 1 früher 2 und 3	1, (4 in Kindheit)
3	4-14%	2 bis 3	1	2 (erste Blutung), 1
4	4-10%	2 bis 3	1	2 (erste Blutung)
5	<1%	4	1	2 (erste Blutung), 1
6	<1%	4	1	5
7	<1%	4	1	1, 3 (1995)
8	<1%	4	1	1, 2
9	<1%	4	1, früher unter on demand Therapie 2 + 3 (2011)	1, 4

Tabelle 1: klinische Daten der untersuchten Hämophiliepatienten

#	Arthropathie	Blutungen im letzten Jahr	Arzneimitteltyp
	1=ja 2=nein		1=plasmatisch 2=rekombinant 3=DDAVP
1	2		2
2	1 Sprunggelenk (re>li) Knie (li>re), Ellenbogen (re>li)	aktuell: 0 früher: >20	2
3	2	0	3
4	2	0	2
5	2	0	1-->2
6	2	0	1-->2
7	1: große Gelenke	0, früher häufiger (unter on demand Therapie)	1
8	2	0	1
9	2	0	2
#	Art der Therapie	regelmäßiger Anstieg nach Substitution	Hemmkörper
	1=Prophylaxe 2=on demand	1=ja 2=nein	1=ja 2=nein
1	1: 3x2500IE Refacto (AF)/Wo	1	2
2	2: Kogenate bis 2010- 1-2Blutungen/Wo 1: 2/2010 bis 12/10- 3x 3000IE Kogenate/Wo 2: erneut ab 1/2011, ca2-6 x2000IE Kogenate/Mo (von Pat umgestellt)	1	2
3	2: Mimirin	1	2
4	2: Immuline	1	2
5	1: 3x3000IE Advate/Woche (früher: Beriate)	1	2
6	1: 3x2000IE Advate/Woche (bis 2005; Beriate)	1	2
7	1 (seit 2008): 3-4x 3000IE Haemoctin/Woche	1	2
8	1 (aktuell): 1-2 (alle 4-6Tage) x1000IE Beriate/Woche 2: 2009-2010 + 2012-2013	1	2
9	1: 2x3000IE Benefix (seit 2012), zuvor Bedarfsubstitution	1	2

Tabelle 1: klinische Daten der untersuchten Hämophiliepatienten (Fortsetzung)

#	ITI (Immunitoleranz-Induktionstherapie)	Coinfektionen	CRP	letztes Blutungsereignis
	1= ja 2= nein	0= keine 1= HAV 2= HBV 3= HCV		
1	2	0	3,0mg/l(9/14)	4/2014 Hämatom re Finger
2	2	1 (Z.n.), 2 (Z.n.), 3	10,5mg/l (10/14)	-----
3	2	0	0,3mg/l(10/14) 0,4mg/d (6/15)	9/2014: Stoßtraumali Hand
4	2	0	0,3mg/l (11/14)	2008: Schnittverletzung
5	2	0	5,1 mg/l(11/14)	2011: traumatische Schnittverletzung
6	2	0	0,9mg/d(11/14)	-----
7	2	1 (Z.n.), 3 (Z.n.)	8,1mg/l (11/14)	6/2014: Stoßtrauma
8	2	3 (Z.n.)	2,5mg/l (11/14)	10/13: Handverletzung
9	2	0	1,4mg/l (5/16)	12/2011: spontane, schwere GI-Blutung
#	letzte Substitution vor BE	Faktorenaktivität vor Substitution	Faktorenaktivität nach Substitution	BE
1	28.09.2014	5,30%	nicht bestimmt	29.09.2014
2	13.10.2014	3%	nicht bestimmt	16.10.2014
3	-----	8,20%	nicht bestimmt	16.10.2014
	-----	9,50%	nicht bestimmt	18.06.2015
	-----	6,30%	nicht bestimmt	09.05.2016
4	-----	15%	nicht bestimmt	06.11.2014
5	16h zuvor (5.11.14, 20.30h)	33,60%	nicht bestimmt	06.11.2014
6	16h zuvor (5.11.14, 20.30h)	15,50%	nicht bestimmt	06.11.2014
7	05.11.2014	2,90%	nicht bestimmt	06.11.2014
8	?, alle 4-6Tage	0,60%	61,90%	07.11.2014
9	?, 2x3000IE/Woche	8%	nicht bestimmt	15.06.2015 12.05.2016

Tabelle 1: klinische Daten der untersuchten Hämophiliepatienten (Fortsetzung)

10 Publikationen

Teile aus dieser Arbeit wurden wie unten aufgeführt veröffentlicht.

- Lynn M. Knowles, Daniela Kagiri, Martin Bernard, Eva C. Schwarz, Hermann Eichler and Jan Pilch, *Macrophage polarization is deregulated in hemophilia*. Thromb Haemos, 2019 Feb. **119**(2):234-245
- Lynn M. Knowles, Daniela Lessig, Martin Bernard, Eva C. Schwarz, Hermann Eichler and Jan Pilch, *Macrophage Polarization Is Impaired in Hemophilia*. Blood, 2018. **132** (Supplement 1): 2499

Kongresse:

- Postervortrag mit dem Titel „*Macrophage polarization and invasion is suppressed in hemophilia*“, Tagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) 2016 in Münster durch PD Dr. Jan Pilch und Dr. Lynn Knowles
- Vortrag mit dem Titel „*Macrophage function is de-regulated in hemophilia*“ Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) 2016 in Nürnberg durch PD Dr. Jan Pilch
- Vortrag mit dem Titel „*Hemophilia macrophages exhibit specific defects relating to wound healing*“, Tagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) 2017 in Basel durch PD Dr. Jan Pilch
- Vortrag mit dem Titel „*Imbalance between Wound Healing and Inflammation in Hemophilia*“, Tagung der International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) 2017 in Berlin durch PD Dr. Jan Pilch
- Vortrag mit dem Titel „*Imbalance between wound healing and inflammation in hemophilia*“, Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) 2017 in Köln durch PD Dr. Jan Pilch
- Postervortrag mit dem Titel „*Monocyte function is impaired in haemophilia*“ sowie Vortrag mit dem Titel „*Gestörte Wundheilungsprozesse bei Hämophilie- Erste Erkenntnisse*“ Tagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) 2018 in Wien durch PD Dr. Jan Pilch
- Vortrag mit dem Titel „*Deregulierte Makrophagenfunktion in der Hämophilie*“, Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) 2018 in Lübeck durch PD Dr. Jan Pilch

- Vortrag mit dem Titel „Chronic low grade inflammation in hemophilia“, Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) 2019 in Mannheim durch PD Dr. Jan Pilch

11 Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Eichler, Direktor des Instituts für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, danke ich herzlich für die Vergabe des spannenden Projekts und das dadurch mir entgegen gebrachte Vertrauen.

PD Dr. med. Jan Pilch und Dr. phil. Lynn Knowles danke ich besonders für die durchweg gute Betreuung. Sie waren jederzeit zur Stelle, lehrten mich sämtliche Labormethoden, beantworteten Fragen geduldig und investierten viel Zeit und Geduld in die Fertigstellung dieser Arbeit.

Ich danke ebenso den Labormitarbeiterinnen Dr. rer. nat. Isabelle Müller und Franziska Markwart, der Biologiestudentin Anna Drawz, sowie den Doktoranden Dominik Altherr, Martin Bernard, Alina Burkhardt und Patrick Niewald für den kollegialen Umgang und die dadurch entstandene angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank gilt zudem Dr. rer. nat. Eva Schwarz, Arbeitsgruppenleiterin Biophysik, Universitätsklinikum des Saarlandes, und ihrer Mitarbeiterin Kim Friedmann für das Erlernen der Dynabeads® untouched Isolation und das Bereitstellen des benötigten Kits und der benötigten Arbeitsmaterialien.

Dem gesamten Hämostaseologie-Ambulanz- und Blutspengeteam danke ich für die guten Absprachen bzgl. Terminen und für das Bereitstellen von Patienten- und Spenderblut.

Ich bedanke mich an dieser Stelle auch bei meiner Familie, welche mich zu jeder Zeit unterstützte und mich motivierte diese Arbeit zu Ende zu bringen. Der Dank gilt insbesondere meinem Mann Zachary, welcher mir immer wieder aufbauende Worte entgegenbrachte, sowie meiner Mama, welche sich um meinen Sohn Lukas kümmerte, sodass die Arbeit fertig gestellt werden konnte.

12 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht