

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Werner Solbach

**Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für die Bildung von
neutrophil extracellular traps (NETs)**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Tina Kirchner

aus Lutherstadt Wittenberg

Lübeck, 2013

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Tamás Laskay, Ph.D.

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Schaible

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung	3
2.1 Neutrophile Granulozyten.....	3
2.2 Ablauf der akuten Entzündung.....	4
2.3 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in neutrophilen Granulozyten	6
2.4 <i>Neutrophil extracellular traps</i> (NETs)	8
2.4.1 Mechanismus der Bildung von NETs	10
2.4.2 Durch reaktive Sauerstoffspezies-induzierte NETose	11
2.4.3 NETs – Strukturen mit zwei Gesichtern	13
2.4.4 Interaktion von NETs mit dem Immunsystem.....	14
2.5 Antioxidantien.....	15
2.6 Hypoxie und HIF-1 α vermittelte Zellfunktionen	17
2.7 Zielstellung.....	20
3 Materialien	22
3.1 Chemikalien	22
3.2 Verbrauchsmaterialien	24
3.3 Geräte und Software.....	25
3.4 Antikörper	27
3.5 Medien und Puffer.....	27
4 Methoden	29
4.1 Isolation neutrophiler Granulozyten aus humanem Vollblut	29
4.1.1 Bestimmung und Einstellung der Zellzahl.....	31
4.1.2 Überprüfung der Reinheit der isolierten neutrophilen Granulozyten	31
4.2 Zellkulturbedingungen	31
4.3 Inhibitoren der ROS-bildenden Enzyme und der mitochondrialen Atmungskette	32
4.4 Antioxidantien.....	33
4.5 Hypoxie und Nachahmung hypoxieähnlicher Bedingungen mit DMOG	33
4.5.1 Versuche bei 2 % O ₂ (Hypoxie) und 20 % O ₂ (Normoxie)	33
4.5.2 Nachahmung hypoxieähnlicher Bedingungen mit DMOG.....	35
4.6 Durchflusszytometrische Analyse von Zellsuspensionen.....	36
4.6.1 Bestimmung der Apoptose, Nekrose und Zellvitalität.....	37

4.7	Detektion reaktiver Sauerstoffspezies.....	38
4.7.1	Messung der intrazellulären ROS	39
4.7.2	Nachweis der intra- und extrazellulären ROS.....	39
4.7.3	Detektion der extrazellulären ROS	41
4.8	Induzierung und Detektion von <i>neutrophil extracellular traps</i>	42
4.9	Quantifizierung von NET-DNA.....	43
4.10	Mikroskopische Analyse der NETs	43
4.10.1	Fluoreszenzmikroskopie	43
4.10.2	Immunhistochemie.....	44
4.10.3	Rasterelektronenmikroskopie.....	45
4.11	Nachweis von HIF-1 α im Western Blot.....	45
4.11.1	Versuchsdurchführung und Zellyse	46
4.11.2	Gelelektrophorese	46
4.11.3	Blotting.....	47
4.11.4	Immunodetektion	47
4.12	Statistische Auswertung.....	48
5	Ergebnisse	49
5.1	Wirkung von ROS auf die Bildung von NETs	49
5.1.1	Einfluss von Inhibitoren auf die Apoptose und Zellvitalität von neutrophilen Granulozyten.....	49
5.1.2	Effizienz der verschiedenen Inhibitoren auf die ROS-Bildung in neutrophilen Granulozyten.....	51
5.1.3	Einfluss verschiedener Inhibitoren der ROS-Produktion auf die Bildung von NETs	56
5.2	Wirkung von Antioxidantien auf die Bildung von NETs	60
5.2.1	Einfluss der Antioxidantien auf die Zellvitalität und Apoptose der neutrophilen Granulozyten.....	61
5.2.2	Effizienz der eingesetzten Antioxidantien auf die ROS-Bildung in neutrophilen Granulozyten.....	62
5.2.3	Einfluss verschiedener Antioxidantien auf die Bildung von NETs	69
5.3	Einfluss von Hypoxie und hypoxieähnlichen Bedingungen auf die Funktionen neutrophiler Granulozyten	77
5.3.1	Einfluss von Hypoxie auf die Funktionen neutrophiler Granulozyten	77

5.3.2	Nachahmung hypoxischer Bedingungen durch DMOG und dessen Einfluss auf die Funktionen neutrophiler Granulozyten	84
6	Diskussion	92
6.1	Hemmung von ROS und NETs durch Inhibitoren	92
6.1.1	Intra- und/ oder extrazelluläre ROS werden durch Inhibitoren signifikant gehemmt.....	93
6.1.2	NADPH-Oxidase- und MPO-gebildete ROS sind für die Bildung von NETs erforderlich, während mitochondriale und SOD gebildete ROS keine Rolle in der Bildung von NETs spielen	96
6.2	Antioxidantien reduzieren ROS und verhindern die NET-Bildung in neutrophilen Granulozyten	99
6.2.1	Flavonoide hemmen ROS und NETs in neutrophilen Granulozyten.....	100
6.2.2	Ascorbinsäure reduziert im Gegensatz zu Tocopherol die Produktion von ROS und NETs in neutrophilen Granulozyten	102
6.2.3	5-Aminosalicylsäure und N-Acetylcystein inhibieren die ROS- und NET-Bildung neutrophiler Granulozyten	103
6.2.4	Acetylsalicylsäure hat keinen Einfluss auf die ROS- und NET-Bildung und Melatonin hemmt nur extrazelluläre ROS in neutrophilen Granulozyten	105
6.3	Hypoxie und die Stabilisierung von HIF-1 α durch DMOG erhöhen weder den oxidativen <i>burst</i> noch die NET-Bildung neutrophiler Granulozyten.....	107
6.3.1	Hypoxie, DMOG und PMA-Stimulation führen zur Stabilisierung von HIF-1 α in neutrophilen Granulozyten.....	108
6.3.2	Die Bildung von ROS wird unter Hypoxie gehemmt und durch DMOG nicht beeinflusst	109
6.3.3	Die NET-Bildung wird unter Hypoxie gehemmt und durch die Anwesenheit von DMOG nicht beeinflusst	112
6.4	Schlussbetrachtung und Ausblick	114
	Literaturverzeichnis.....	116
	Abbildungsverzeichnis	VII
	Tabellenverzeichnis.....	X
A.1	Publikationen	XI
A.2	Kongressbeiträge	XII

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
5-ASA	5-Aminosalicylsäure
Aminopyrin	4-Dimethylaminoantipyrin
ANCA	anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper
Anova	Analyse der Varianz
APS	Ammoniumpersulfat
Aroclor	Aroclor 1242
Ascorbinsäure	L-Ascorbinsäure
Asp	Asparagin
ASS	Acetylsalicylsäure
AUC	<i>Area under the curve</i> , Fläche unter der Kurve
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Catechinhydrat	(+)-Catechinhydrat
CL-Medium	Chemilumineszenz-Medium
DAMPs	<i>danger-associated molecular patterns</i>
DETC	Diethyldithiocarbaminsäure
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
Dinitrophenol	2,4-Dinitrophenol
Dipyron	Dipyronhydrat
DMOG	Dimethyloxalylglycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung
DPI	Diphenyliodiniumchlorid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Epicatechin	(–)-Epicatechin
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
FCCP	Carbonylcyanid p-[trifluoromethoyl]-phenyl-hydrazon
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
Fe ²⁺	Eisenionen

FIH	<i>factor inhibiting HIF</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FM	Fluoreszenzmikroskopie
fMLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
GeoMean	geometrischer Mittelwert
h	<i>hour</i> , Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HMGB1	<i>high-mobility group box 1</i>
HO [•]	Hydroxylradikale
HRE	<i>hypoxic-response elements</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSA	humanes Serumalbumin
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli
M	molar
Med.	Medium
MeOH	Methanol
min	Minuten
Mnase	Mikrokokken-Nuklease
MPO	Myeloperoxidase
mTOR	<i>mamalian target of rapamycin</i>
NAC	N-Acetylcystein
n.d.	nicht detektierbar
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>
NF-κB	nuklearer Faktor-κB
NOX	NADPH-Oxidase
OCl ⁻	Hypochlorit
O ₂	Sauerstoff
¹ O ₂	Singulett Sauerstoff
O ₂ ^{•-}	Superoxidanionradikal

PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i> , pathogenassoziierte molekulare Muster
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PHD	Prolylhydroxylasen
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Pro	Prolin
PRR	<i>pattern recognition receptors</i> , Mustererkennungsrezeptoren
pVHL	von Hippel-Lindau Protein
REM	Rasterelektronenmikroskopie
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SSC	<i>sideward scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
SOD	Superoxiddismutase
SVV	<i>small vessel vasculitis</i> , Vaskulitis der kleinen Gefäße
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR	<i>toll-like receptors</i> , Toll-ähnliche Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
Tocopherol	(±)- α -Tocopherol
U	units
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
z.B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten sind Hauptakteure der frühen Infektabwehr. Ein extrazellulärer Effektormechanismus dieser Zellen ist die Bildung von *neutrophil extracellular traps* (NETs). NETs sind komplexe Fangnetze, die aus einem mit antimikrobiellen Proteinen assoziierten DNA-Grundgerüst bestehen. Sie werden von aktivierten neutrophilen Granulozyten im Zuge eines Zelltodprogrammes (NETose), der abhängig von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist, ausgestoßen. Neben ihrer antimikrobiellen Wirkung können NETs jedoch auch unerwünschte Wirkungen haben. So spielen NETs z. B. bei der Entwicklung und Pathogenese von Autoimmunkrankheiten eine Rolle, indem sie die Bildung von Autoantikörpern induzieren und durch Exposition von toxischen Molekülen (ROS, Granulaproteine) Gewebeschäden verursachen. Die molekularen Mechanismen der NETose, insbesondere die Rolle der wahrscheinlich als Botenstoffe fungierenden ROS, sind bisher noch weitgehend unverstanden. Ziel dieser Arbeit war es daher, die zugrundeliegenden Mechanismen der ROS-abhängigen NET-Bildung *in vitro* näher zu untersuchen. Dazu wurden die DHR 123-, Luminol- und Lucigenin-Methode zur Detektion von ROS sowie die SYTOXgreen-Methode und die mikroskopische Betrachtung zur Analyse der Bildung von NETs durch humane neutrophile Granulozyten verwendet. Erstes Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Beteiligung von ROS und ROS-bildenden Signalwegen auf die PMA-induzierte NET-Bildung. Durch Verwendung spezifischer Inhibitoren wurde die Rolle von NADPH-Oxidase- und mitochondrial gebildeten ROS sowie die Beteiligung der Superoxiddismutase und Myeloperoxidase auf die NET-Bildung betrachtet. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen erstmals, dass mitochondriale ROS und die Superoxiddismutase *in vitro* keinen Einfluss auf die Bildung der NETs ausüben. Außerdem wurde bestätigt, dass die ROS-produzierenden Enzyme NADPH-Oxidase und Myeloperoxidase essentiell für die ROS-abhängige NET-Bildung sind. Da NETs bei der Entwicklung und Pathogenese von Autoimmunkrankheiten eine Rolle spielen, könnte das Abfangen der für die NET-Bildung essentiellen ROS ein neuer Angriffspunkt bei NET-assoziierten Autoimmunkrankheiten darstellen. Hier könnten Antioxidantien, die als Radikalfänger wirken und ROS neutralisieren, zum Einsatz kommen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob Antioxidantien die ROS-abhängige NET-Bildung PMA-stimulierter neutrophiler Granulozyten *in vitro* inhibieren können. Die Ergebnisse zeigen, dass Antioxidantien wie Flavonoide, Ascorbinsäure, N-Acetylcystein und 5-Aminosalicylsäure signifikant die PMA-induzierte

ROS- und NET-Bildung neutrophiler Granulozyten hemmen. Antioxidantien könnten daher therapeutisch bei NET-assoziierten Krankheiten zum Einsatz kommen.

Da Orte einer Entzündung durch Sauerstoffmangel (Hypoxie) gekennzeichnet sind, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den Effekt von Hypoxie (2 % O₂) auf die ROS- und NET-Bildung aktivierter neutrophiler Granulozyten *in vitro* im Vergleich zu Normoxie (20 % O₂) zu untersuchen. Hypoxie führte zur Hemmung der ROS- und NET-Bildung in aktivierten neutrophilen Granulozyten.

Die im Rahmen dieser Arbeit erlangten neuen Erkenntnisse tragen zum einen zum Verständnis der ablaufenden Prozesse während der NET-Bildung bei, zum anderen bieten sie neue Ansatzpunkte im Kampf gegen Autoimmunkrankheiten. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der am Entzündungsort vorliegende Sauerstoffmangel (Hypoxie) die Effektorfunktionen der neutrophilen Granulozyten, wie die Bildung von ROS und NETs, beeinflusst.

2 Einleitung

Der Mensch ist ständig in der Umgebung vorhandenen Mikroorganismen ausgesetzt. Eine Infektion durch Mikroorganismen wird jedoch meistens durch die mechanische und chemische Barriere der sich auf der Haut und den Schleimhäuten des Körpers befindenden Epithelzellen abgewehrt. Durchbricht der Mikroorganismus diesen Schutz und dringt in darunter liegende Gewebeschichten ein, setzt die angeborene Immunabwehr ein. Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten erkennen als Zellen der angeborenen Immunabwehr die eingedrungenen Mikroorganismen über verschiedene Mechanismen, unter anderem Mustererkennungsrezeptoren. Die Mikroorganismen werden durch Phagozytose von diesen Phagozyten (Fresszellen) aufgenommen und intrazellulär abgetötet. Neben diesen zellulären Komponenten zählt auch das humorale Komplementsystem zum angeborenen Immunsystem. Es besteht aus verschiedenen Plasmaproteinen, welche durch Interaktionen miteinander extrazelluläre Krankheitserreger angreifen, selbst abtöten oder die Aufnahme und Zerstörung des Krankheitserregers durch Phagozyten stimulieren. Dendritische Zellen induzieren zeitlich parallel zu den beschriebenen Abwehrmechanismen das adaptive Immunsystem, bestehend aus B-Zellen und T-Zellen. Dabei werden antigenspezifische Effektorzellen ausgebildet, die den Krankheitserreger gezielt angreifen können. Außerdem bilden sich Gedächtniszellen, die eine erneute Infektion mit diesem Erreger verhindern sollen [1].

2.1 Neutrophile Granulozyten

Die kurzlebigen neutrophilen Granulozyten stellen den Hauptbestandteil der weißen Blutzellen (Leukozyten) im peripheren Blut des Menschen dar. Sie entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und zirkulieren im Blut. Neutrophile Granulozyten sind die ersten aus dem Blutstrom rekrutierten Zellen am Infektionsherd und damit wichtige Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems. Durch freigesetzte Botenstoffe, sogenannte Zytokine, werden sie zum Ort der Entzündung gelockt. Die neutrophilen Granulozyten verlassen die Blutbahn und wandern im Gewebe entlang eines Gradienten aus Zytokinen zum Entzündungsort, um dort eingedrungene Mikroorganismen zu bekämpfen. Dort erkennen sie die infektiösen Mikroorganismen und nehmen diese durch Phagozytose auf. Die anschließende, intrazelluläre Abtötung der phagozytierten Mikroorganismen erfolgt durch mikrobizide Proteine, die in Granula im Zytoplasma gespeichert sind. Die azurophilen oder primären Granula enthalten antimikrobielle Proteine,

z. B. das auch auf der Plasmamembran exprimierte *bactericidal permeability-increasing protein*. Außerdem sind unter anderem die Myeloperoxidase und Serin Proteasen, z. B. Proteinase 3 und Elastase, in den primären Granula lokalisiert. Die sekundären, spezifischen Granula enthalten Lactoferrin, Cathelicidin LL37 und Kollagenase, die tertiären Granula Gelatinase. Ein vierter Typ von Granula, die sekretorischen Vesikel, enthalten z. B. das Plasmaprotein Albumin [1, 2]. Granulozyten werden aufgrund der unterschiedlichen Färbereigenschaften ihrer Granula in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilt. Neutrophile Granulozyten besitzen einen unregelmäßig geformten, segmentierten Zellkern und werden daher auch als polymorphkernige neutrophile Granulozyten bezeichnet (Abbildung 1) [1].

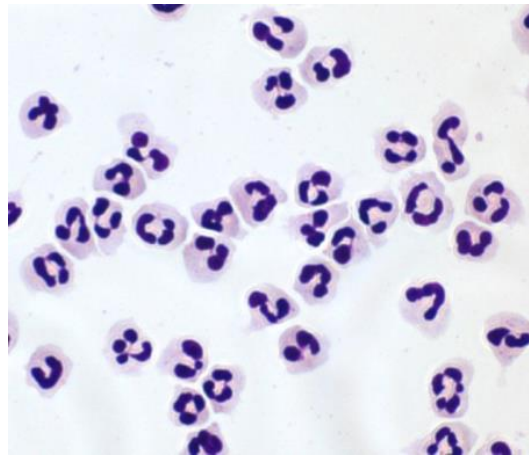


Abbildung 1: Isolierte neutrophile Granulozyten, angefärbt mittels Diff-Quik-Färbung

Zur Bekämpfung eingedrungener Mikroorganismen nutzen neutrophile Granulozyten verschiedene Mechanismen, wie die Abtötung durch antimikrobielle Proteine durch Degranulation und die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und *neutrophil extracellular traps* (NETs) [1, 3].

2.2 Ablauf der akuten Entzündung

Überwinden Mikroorganismen die schützende mechanische und chemische Barriere der Epithelzellschicht und wandern in das darunter liegende Gewebe werden die angeborenen Abwehrmechanismen aktiv, um die Mikroorganismen abzuwehren. Dabei werden die eingedrungenen Mikroorganismen durch sich im Gewebe befindliche Makrophagen und dendritische Zellen erkannt. Diese setzen daraufhin pro-entzündliche Zytokine wie z. B. Interleukin-1 β und den Tumornekrosefaktor (TNF)- α frei. Die durch Erkennung der Mikroorganismen aktivierten Makrophagen setzen Chemokine wie CXCL-8 (Interleukin-8)

frei und lösen am Infektionsherd die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten aus. Die freigesetzten Zytokine führen zur Erweiterung der lokalen, kleinen Blutgefäße und sorgen für die Reduzierung der Fließgeschwindigkeit des Blutes am Entzündungsort. Der verlangsamte Blutfluss erleichtert es den neutrophilen Granulozyten an das aktivierte Endothel zu binden. Die neutrophilen Granulozyten verlassen nun das Blutgefäß und migrieren durch die Endothelzellschicht in das tiefer liegende Gewebe. Sie wandern schließlich als erste Abwehrzellen entlang eines Konzentrationsgradienten von am Infektionsherd produzierten Chemokinen, z. B. CXCL-8, zum Entzündungsort. Dort vernichten sie zusammen mit ebenfalls aus den Blutgefäßen eingewanderten Monozyten, die sich im Gewebe zu Makrophagen differenziert haben, die eingedrungenen Mikroorganismen [1].

Um Mikroorganismen aufnehmen und vernichten zu können, müssen sie zunächst erst erkannt werden. Die Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen dafür Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche, welche ihnen die Erkennung körperfremder Mikroorganismen ermöglichen. Diese Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) erkennen charakteristische Muster an Oberflächenstrukturen, die pathogenassoziierten molekularen Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP), welche nicht auf körpereigenen Zellen vorkommen. Es gibt verschiedene Mustererkennungsrezeptoren. Eine wichtige Gruppe der PRR sind die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLR). Sie erkennen viele PAMPs, wie z. B. das auf der Zellhülle lokalisierte Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien (TLR-4), Lipopeptide der Bakterien (TLR-2) oder Flagellin (TLR-5). Bakterielle oder virale Nukleinsäuresequenzen werden durch intrazelluläre TLR (TLR 3, 7, 9) erkannt [1, 4]. Neben diesen Mustererkennungsrezeptoren exprimieren Phagozyten auch Komplementrezeptoren auf ihrer Oberfläche, welche die Erkennung, Aufnahme und Vernichtung mit Komplementproteinen bedeckter Krankheitserreger ermöglichen. Des Weiteren können auf der Oberfläche von Mikroorganismen haftende Antikörper durch Fc-Rezeptoren der Phagozyten erkannt werden [1].

Die Bindung eines Pathogens an diese Mustererkennungsrezeptoren vermittelt unter anderem die Aufnahme (Phagozytose) des Krankheitserregers mit der anschließenden Abtötung im Inneren des Phagozyten. Bei der Phagozytose wird das gebundene Pathogen von der Zellmembran des Phagozyten umhüllt und in ein Vesikel, das Phagosom, aufgenommen. Dieses verschmilzt schließlich mit den Granula (Lysosomen) der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten zu einem Phagolysosom. Die Granula der Phagozyten besitzen den Mikroorganismus angreifende antimikrobielle Enzyme und Peptide, welche im Phagolysosom

freigesetzt werden und den Mikroorganismus zerstören [1]. Die Freisetzung der in den Granula enthaltenen Proteine nach außen wird auch als Degranulation bezeichnet. Bei der Phagozytose werden zusätzlich toxische reaktive Sauerstoffspezies gebildet, welche zur intrazellulären Abtötung des Mikroorganismus beitragen (siehe 2.3). Neben diesen Effektormechanismen locken die neutrophilen Granulozyten nach Erkennung des Erregers weitere Abwehrzellen durch Ausschüttung von Zytokinen an. Des Weiteren können die neutrophilen Granulozyten über ihren Tod hinaus in Form von *neutrophil extracellular traps* eingedrungene Mikroorganismen abfangen, eindämmen und töten (siehe 2.4) [1, 5].

Sind die eingedrungenen Mikroorganismen erfolgreich bekämpft, wird die Entzündung durch anti-entzündliche Signalwege aufgelöst. Dazu wird die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten durch anti-entzündliche Zytokine und Chemokine gestoppt. Die neutrophilen Granulozyten sterben den programmierten Zelltod (Apoptose) und werden schließlich durch andere neutrophile Granulozyten oder Makrophagen beseitigt [2, 6]. Gehen neutrophile Granulozyten in die Apoptose, präsentieren sie sogenannte „iss mich“-Signale auf ihrer Zelloberfläche, z.B. durch Umlagerung des in der inneren Membran liegenden Phosphatidylserins nach außen [7]. Die Phagozytose der apoptotischen neutrophilen Granulozyten hemmt schließlich die Bildung von z. B. CXCL-8 und TNF- α durch Makrophagen und trägt zur Auflösung der Entzündung bei [2].

2.3 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in neutrophilen Granulozyten

Ein wichtiger antimikrobieller Mechanismus neutrophiler Granulozyten ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Abbildung 2). Diese toxischen Sauerstoffmetaboliten tragen zum Abtöten eingedrungener Mikroorganismen bei, können jedoch aufgrund ihrer Reaktivität auch körpereigene Strukturen zerstören. Schlüsselmolekül der ROS-Bildung ist die NADPH-Oxidase. Diese bildet unter Verbrauch von Sauerstoff Superoxidanionradikale ($O_2^{\bullet-}$). Dieser Prozess wird als respiratorische Entladung oder auch als oxidativer *burst* oder *respiratory burst* bezeichnet. Mitochondrien können als Nebenprodukte der Atmungskette auch Superoxidanionradikale bilden. Die anschließende Dismutation der Superoxidanionradikale in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff (O_2) erfolgt spontan oder wird durch die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert. Wasserstoffperoxid reagiert in der Fenton-Reaktion mit Eisenionen (Fe^{2+}) zu Hydroxylradikalen ($\cdot OH$). Des Weiteren dient Wasserstoffperoxid als Substrat für die antimikrobielle Myeloperoxidase (MPO). Diese bildet unter Nutzung von Wasserstoffperoxid und hypohalogene ROS, z. B. Hypochlorit (OCl^-) [1].

Zusätzlich wird Singulett Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) durch Reaktion von Hypochlorit mit H_2O_2 gebildet [8].

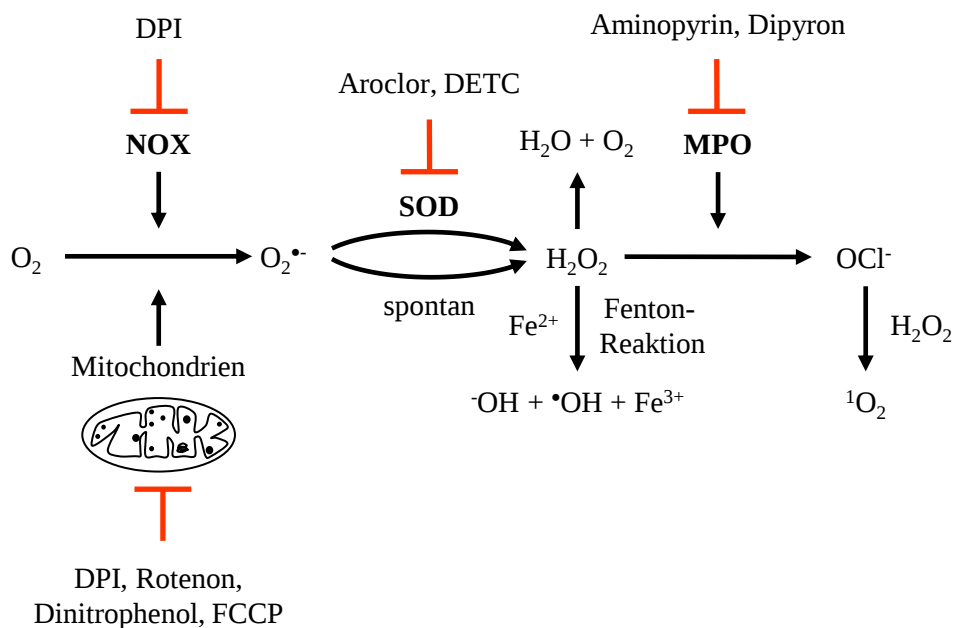


Abbildung 2: Bildung und Hemmung der ROS-Produktion in neutrophilen Granulozyten

Die Bildung von Superoxidanionradikalen ($\text{O}_2^{\bullet-}$) durch Sauerstoff (O_2) erfolgt sowohl durch die NADPH-Oxidase (NOX) als auch durch die Cytochrom C Peroxidase der Mitochondrien. Die anschließende Dismutation der Superoxidanionradikale in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und O_2 läuft spontan oder katalysiert durch die Superoxiddismutase (SOD) ab. H_2O_2 ist die Quelle zur Bildung von Hydroxylradikalen ($\cdot\text{OH}$) durch die Fenton-Reaktion. Zusätzlich nutzt die Myeloperoxidase (MPO) H_2O_2 zur Bildung halogenierter ROS, wie z.B. Hypochlorit (OCl^-). Singulett Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) wird durch Reaktion von hypochloriger Säure mit H_2O_2 gebildet. Die Angriffsorte der in dieser Studie verwendeten Inhibitoren DPI, Rotenon, Dinitrophenol, FCCP, Aroclor, DETC, Aminopyrin und Dipyrin sind dargestellt.

Die Bildung von ROS wird durch die Aktivierung der aus mehreren Untereinheiten bestehenden NADPH-Oxidase ausgelöst. Die auf der Zellmembran oder der Membran von Phagolysosomen lokalisierten Untereinheiten $\text{gp91}^{\text{phox}}$ und $\text{gp22}^{\text{phox}}$ bilden das heterodimere Cytochrom b_{558} . Die anschließende Translokation der zytosolischen Untereinheiten p47^{phox} , p67^{phox} , p40^{phox} zur Plasmamembran bzw. Membran der Phagolysosomen und Bindung an den Cytochrom b_{558} -Komplex ist zur Aktivierung der NADPH-Oxidase erforderlich. Die Phosphorylierung der zytosolischen Untereinheit p47^{phox} ist Voraussetzung zur Translokation und unterstützt die Bindung der anderen Untereinheiten an das Cytochrom b_{558} [9]. Die Proteinkinase C und die mitogen-aktivierten Proteinkinasen p 38 und extrazellulär Signal-regulierende Kinasen ERK1/2 phosphorylieren die Untereinheit p47^{phox} und werden durch z. B. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) aktiviert [10]. Zudem sind sie an der NET-Bildung beteiligt [11, 12].

In dieser Arbeit wurde der oxidative *burst* neutrophiler Granulozyten näher untersucht. Dazu wurden verschiedene Inhibitoren der ROS-bildenden Enzyme NADPH-Oxidase, SOD und MPO, sowie der mitochondrialen Atmungskette verwendet. Diphenyliodoniumchlorid (DPI) hemmt die NADPH-Oxidase und den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette [13]. Die Inhibitoren Dinitrophenol und Carbonylcyanid p-[trifluoromethoxy]-phenyl-hydrazon (FCCP) stören und entkoppeln das Membranpotential der Mitochondrien, während Rotenon Komplex I der mitochondrialen Atmungskette hemmt. Das Membranpotential der Mitochondrien bildet sich als Folge der ablaufenden Elektronentransportketten und dem damit verbundenen Protonentransport von der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum während der Atmungskette aus. Durch die Entkopplungsreagenzien läuft die Elektronentransportkette stärker ab, um den zerstörten Protonengradienten wieder herzustellen. Aufgrund der erhöhten Aktivität der Atmungskette stehen weniger freie Elektronen zur Verfügung, was zu verminderter ROS-Produktion führt [14-16]. Aroclor und Diethyldithiocarbaminsäure (DETC) wurden als Hemmstoffe der SOD eingesetzt [17, 18]. Aminopyrin und Dipyrone senken die ROS-Produktion der MPO durch Abfangen von Hypochlorit [19] und im Fall von Aminopyrin zusätzlich durch Hemmung der MPO [20]. Neben der Betrachtung des Einflusses verschiedener Inhibitoren auf den oxidativen *burst* wurde auch dessen Rolle bei der Bildung von ROS-abhängigen NETs untersucht.

2.4 *Neutrophil extracellular traps* (NETs)

Neutrophile Granulozyten können selbst über ihren Tod hinaus eingedrungene Mikroorganismen extrazellulär durch *neutrophil extracellular traps* (NETs) bekämpfen und abtöten. Dieser Mechanismus neutrophiler Granulozyten wurde erstmals 2004 beschrieben [3]. Dabei sterben neutrophile Granulozyten einen aktiven Zelltod, die NETose [21], wobei sie ein Netzwerk, bestehend aus Chromatinfäden assoziiert mit Peptiden der Granula neutrophiler Granulozyten, auswerfen [5]. NETs können fluoreszenzmikroskopisch durch Markierung der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTOXgreen dargestellt werden (Abbildung 3) und sind als fädige (Pfeil, Abbildung 3) oder wolkenähnliche (Pfeilspitze, Abbildung 3) Strukturen zu erkennen. Aufgrund der netzartigen Struktur von NETs verfangen sich Mikroorganismen, ähnlich wie Insekten in einem Spinnennetz, in ihnen und können durch die mit den NETs assoziierten zahlreichen antibakteriellen Proteine abgetötet werden. Zu diesen Proteinen zählen unter anderem die Myeloperoxidase und neutrophile Elastase (primäre Granula), sowie Lactoferrin und Pentraxin 3 (sekundäre Granula) und die Matrix Metalloproteinase 9 (tertiäre Granula) [22]. Des Weiteren tragen Komponenten des Zellkerns,

wie z. B. Histone, zur antibakteriellen Wirkung der NETs bei [5]. Einige Krankheitserreger haben jedoch Strategien entwickelt, um den NETs zu entkommen. Dazu zählt unter anderem die Maskierung der Krankheitserreger durch Änderung der Oberflächenladung, wodurch die auf Wechselwirkungen verschiedener Ladungen beruhende Bindung an NETs verhindert wird. Des Weiteren besitzen z.B. *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* DNAsen (Nukleinsäure abbauende Nukleasen) an ihrer Oberfläche, wodurch sie die DNA-Grundstruktur der NETs abbauen und sich so von NETs befreien können. Die Freisetzung extrazellulärer Chromatinfallen (*extracellular traps*) wurde auch in anderen Granulozyten wie Eosinophilen und Mastzellen beobachtet [5, 23].

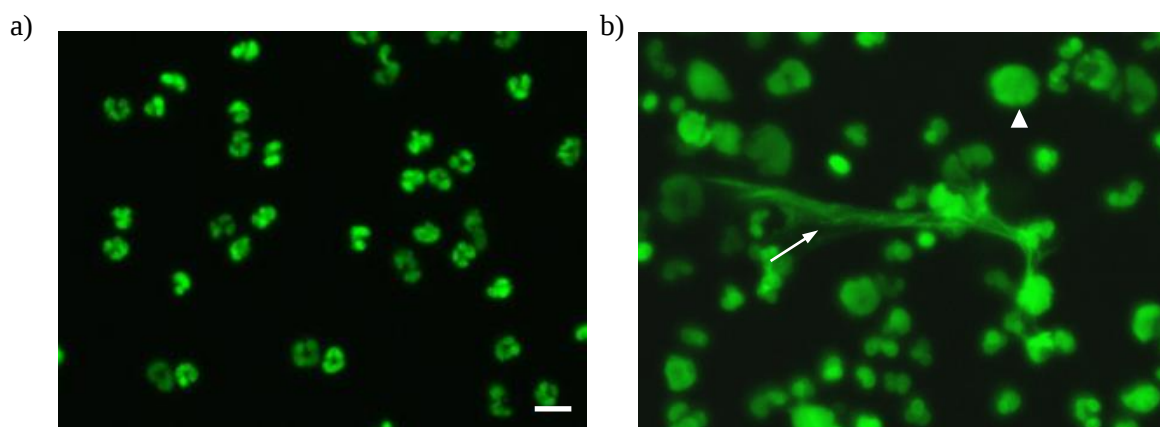


Abbildung 3: Fluoreszenzpräparat neutrophiler Granulozyten und NETs

Nach 3 h Inkubation der neutrophilen Granulozyten im Brutschrank wurden die Präparate fixiert und die DNA mit SYTOXgreen fluoreszenzmarkiert. Es sind a) nicht stimulierte neutrophile Granulozyten und b) mit PMA stimulierte neutrophile Granulozyten dargestellt. Die Pfeilspitze weist auf eine wolkenähnliche NET-Struktur hin, der Pfeil auf eine fädige NET-Struktur. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm. Die dargestellten Fluoreszenzbilder entsprechen alle der gleichen Größe und Auflösung.

Die Bildung von NETs kann durch Infektionen mit Bakterien, Pilzen, Viren und Parasiten ausgelöst werden. Zu den verschiedenen Stimuli der NETose zählen Mikroorganismen und deren mikrobiellen Komponenten, wie z. B. LPS, formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) der Bakterien und Lipophosphoglykane des Parasiten *Leishmania amazonensis*. Die pro-entzündlichen Zytokine TNF und Interferon- γ , sowie die Interaktion zwischen TLR-4 aktivierten Blutplättchen und dem TLR-4-Liganden auf den neutrophilen Granulozyten, führen ebenfalls zur Induzierung von NETs. Außerdem können Stickstoffmonoxid, Mononatrium Harnsäurekristalle und Immunkomplexe (Antikörper-Antigen-Komplexe) die Bildung von NETs induzieren. Der am häufigsten verwendete Stimulus zur Induzierung von NETs *in vitro* ist der synthetische Aktivator PMA [5, 24].

2.4.1 Mechanismus der Bildung von NETs

Nach Aktivierung durch Mikroorganismen oder Proteinkinase C (PKC)-aktivierenden Stimuli, wie z. B. PMA, bilden 20-60 % der isolierten neutrophilen Granulozyten innerhalb von 2 h bis 4 h NETs [24]. Die C-Typ-Proteinkinasen werden in verschiedene PKC-Subtypen, die konventionellen, neuen und atypischen, unterteilt. Der synthetische Stimulus PMA ahmt den zur Aktivierung der PKC notwendigen Liganden Diacylglycerol nach und führt dadurch zur direkten Stimulation der konventionellen (PKC α , PKC β I, PKC β II und PKC γ) und neuen PKC (PKC δ , PKC ϵ , PKC η und PKC θ). PMA ist ein etablierter Stimulus zur Induzierung von NETs. Die Stimulation der konventionellen PKC, insbesondere der PKC β -Isoform, trägt zur Bildung der NETs bei [12]. Die PKC führt zur Aktivierung der NADPH-Oxidase, welche durch Bildung von Superoxidanionradikalen die Produktion weiterer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bewirkt (siehe 2.3) [9, 12]. Die Rolle der essentiellen ROS in der NET-Bildung ist bisher nicht eindeutig geklärt. Vermutlich fungieren sie als sekundäre Botenstoffe für die zur NET-Bildung erforderlichen nachgeschalteten Signalwege.

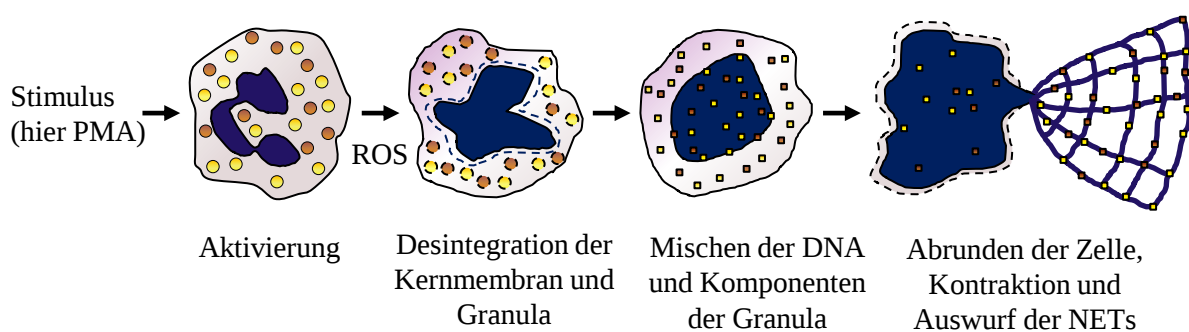


Abbildung 4: Bildung von *neutrophil extracellular traps* (NETs)

Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch Stimulation mit PMA führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Es folgt die Desintegration der Kern- und Granulamembran gefolgt von der Freisetzung der Inhaltsstoffe der Granula (antibakterielle Proteine wie MPO) ins Zytoplasma. Der Kern verliert seine Form, das Chromatin dekontensiert und die Inhalte des Kerns und der Granula füllen das Innere der Zelle. Die Integrität des Kerns und der Granula ist vollständig aufgelöst. Die Zelle rundet sich ab, kontrahiert und wirft den kompletten Zellinhalt in Form von dreidimensionalen Strukturen, den *neutrophil extracellular traps* (NETs), aus. Dabei bildet das Chromatin das Rückgrat der NETs, welches mit den ausgeworfenen Proteinen assoziiert ist.

Nach Aktivierung der neutrophilen Granulozyten bilden diese ROS (Abbildung 4), wobei der *respiratory burst* durch Stimulation mit PMA sein Maximum nach 30 min erreicht. Innerhalb der ersten 60 min desintegrieren die Granula der neutrophilen Granulozyten und der Kern verliert seine Struktur. Die aus den primären Granula freigesetzte neutrophile Elastase

wandert in den Kern und fördert zusammen mit der später zum Kern migrierenden, freigesetzten Myeloperoxidase die Dekondensation des Chromatins. Die Histone werden zusätzlich zum Abbau durch die neutrophile Elastase mit Hilfe der Peptidyl-Arginin-Deiminase 4 citrulliniert. Außerdem lösen sich die inneren und äußeren Kernmembranen voneinander, bis nach 1 h die Kernmembran in kleine Vesikel zerfällt. Es bildet sich eine einheitliche Masse aus Kern- und Zytoplasma, in dem sich Chromatin und Komponenten des Zytoplasmas und der aufgelösten Granula befinden (Abbildung 4). Schließlich rundet sich die Zelle ab, die Zellmembran reißt und die Zelle wirft ihren Zellinhalt in den extrazellulären Raum in Form von NETs aus (Abbildung 4) [5, 25]. Es wurden auch andere Mechanismen der NET-Bildung, wie die extrazelluläre Freisetzung von nuklearer DNA durch Vesikel ohne Lyse der neutrophilen Granulozyten und Zerstörung der Plasmamembran [26], oder die Freisetzung mitochondrialer DNA durch lebende eosinophile und neutrophile Granulozyten [27, 28] beschrieben. Allerdings befindet sich in neutrophilen Granulozyten eine verhältnismäßig geringe Anzahl von Mitochondrien verglichen zu anderen Zellen. Mitochondriale DNA kommt 100 000 fach weniger in *extracellular traps* vor als nukleare DNA [5].

Die Bildung von NETs ist die Folge des „freiwilligen“ Selbstmordes neutrophiler Granulozyten, wobei sie eine neue Form des Zelltodes, die NETose [21], sterben. Dieser Zelltod unterscheidet sich von der Apoptose oder Nekrose [29]. NETotische Zellen präsentieren im Gegensatz zu apoptotischen neutrophilen Granulozyten kurz vor dem Reißen der Plasmamembran keine „iss mich“-Signale wie Phosphatidylserin auf der Plasmamembran. Dadurch umgehen NETotische Zellen einer Beseitigung durch andere Phagozyten [23, 29]. Anders als bei apoptotischen Zellen desintegriert in NETotischen Zellen die Kernhülle, vermischen sich Kern- und Zytoplasmabestandteile, verschwinden zytoplasmatische Organellen und verlieren NETotische Zellen innere Membranen [29]. Die fehlende Caspase-Aktivität der PMA-induzierten NETose grenzt diesen Zelltod weiterhin von dem der Apoptose ab [23]. Im Unterschied zur Nekrose sind die Apoptose und NETose Zelltodprogramme mit regulierter Freisetzung der Bestandteile neutrophiler Granulozyten.

2.4.2 Durch reaktive Sauerstoffspezies-induzierte NETose

Zur Bildung von ROS-induzierten NETs sind die NADPH-Oxidase und MPO essentiell [29, 30]. Stimulierte neutrophile Granulozyten von Patienten mit chronisch granulomatöser Erkrankung (*chronic granulomatous disease*) können weder ROS noch NETs bilden. Diese Patienten besitzen Mutationen in den Untereinheiten der NADPH-Oxidase [31].

Mit Wasserstoffperoxid behandelte neutrophile Granulozyten von Patienten mit chronisch granulomatöser Erkrankung bilden jedoch NETs, was darauf hindeutet, dass auch andere ROS neben den durch Aktivierung der NADPH-Oxidase gebildeten Superoxidanionradikalen eine Rolle spielen [29]. Patienten mit chronisch granulomatöser Erkrankung leiden oft an einer Infektion mit *Candida species*. Dies wird auf die fehlende Bildung der NETs und fehlende abtötende Wirkung der mit den NETs assoziierten MPO zurückgeführt [30, 32]. Aktivierte neutrophile Granulozyten von Patienten mit Mutationen in der MPO produzieren ebenfalls vermindert bis gar keine NETs [30].

Als an der NETose beteiligte ROS wurden Superoxidanionradikale [33], hypochlorige Säure [34, 35] und Singulett Sauerstoff [36] beschrieben. Die reaktive Stickstoffverbindung Stickstoffmonoxid spielt ebenfalls eine Rolle in der NET-Bildung [37]. In Abbildung 5 ist die Bildung von ROS und NETs in stimulierten neutrophilen Granulozyten schematisch dargestellt.

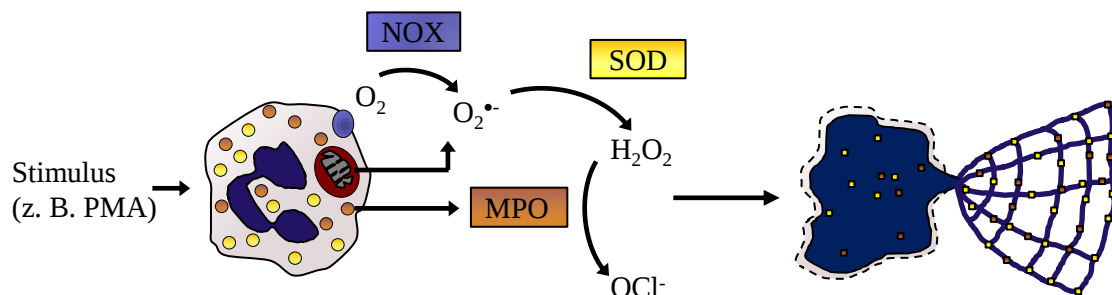


Abbildung 5: ROS-abhängige NET-Bildung

Die Stimulation neutrophiler Granulozyten mit ROS-induzierenden Stimuli (z. B. PMA) führt zur Bildung von NETs. Nach Aktivierung der NADPH-Oxidase (NOX) bildet diese Superoxidanionradikale ($O_2^{\bullet-}$), welche spontan oder katalysiert durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) dismutieren. Wasserstoffperoxid dient wiederum zur Bildung von halogenierten ROS, z. B. Hypochlorit (OCI^-). Die produzierten ROS induzieren weitere Signalkaskaden und tragen zur Bildung von NETs bei.

Es wurde jedoch auch ein anderer Mechanismus der NET-Bildung nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* beschrieben, der innerhalb der ersten zwei Stunden zur ROS unabhängigen NET-Bildung führt [26]. Außerdem führt z. B. der pro-entzündliche Stimulus LPS zwar zur NET-Bildung, kann jedoch selbst nicht direkt die Aktivierung der NADPH-Oxidase auslösen [23]. Es ist daher davon auszugehen, dass die Bildung von NETs durch das Zusammenspiel mehrerer Signalwege, ausgelöst durch verschiedene Stimuli, erfolgt. Welche Rolle dabei die von den Mitochondrien gebildeten Superoxidanionradikale und die Superoxiddismutase spielen, ist unbekannt. Der Einfluss von ROS, gebildet durch die

NADPH-Oxidase, der Mitochondrien, der SOD und der MPO auf die NET-Bildung wurde daher in dieser Arbeit durch Hemmung der einzelnen Enzyme mit spezifischen Inhibitoren untersucht (siehe 2.3, Abbildung 2).

2.4.3 NETs – Strukturen mit zwei Gesichtern

NETs werden durch zahlreiche Bakterien, wie z. B. *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri* und *Mycobacterium tuberculosis*, induziert [24]. Am Ort der Entzündung können NETs durch ihre netzartige Struktur zum Abfangen, Abschwächen, Eindämmen und Abtöten eingedrungener Mikroorganismen, unabhängig von der Aufnahme durch Phagozytose, beitragen. NETs sind mit zahlreichen antimikrobiellen Proteinen der neutrophilen Granulozyten assoziiert. Dazu zählt unter anderem die neutrophile Elastase, welche Virulenzfaktoren von Bakterien wie z. B. *Shigella flexneri*, abbaut [5]. Andere mit NETs verbundene antibakterielle Proteine, welche Mikroorganismen hemmen und töten können, sind Proteasen und Lysozyme. Die antimikrobiellen Defensine, *bactericidal permeability-increasing proteins* und Histone stellen weitere antibakterielle Komponenten der NETs dar [5]. Die essentielle Aktivität der mit NETs assoziierten MPO zur Abtötung von *Staphylococcus aureus* unterstreicht die antimikrobielle Rolle der NETs [32]. Die Kombination aller sich auf NETs befindlichen antimikrobiellen Proteine, aber auch die Wirkung einzelner Enzyme wie der MPO, tragen zur antibakteriellen Effizienz der NETs im Kampf des Immunsystems gegen eingedrungene Pathogene bei.

Neben dieser für die antimikrobielle Abwehr wichtigen Rolle der NETs deuten in den letzten Jahren veröffentlichte Studien auch auf pathologische Wirkungen der NETs hin [38-41]. In zahlreichen Krankheiten wird eine pathophysiologische Rolle der NETs vermutet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Dysregulation der NET-Bildung in pathologischen Situationen [41, 42]

Autoimmunkrankheiten	andere Krankheiten
- Systemischer Lupus erythematoses	- Arteriosklerose
• Lupus nephritis	- Transfusions-bezogene akute
- Vaskulitis der kleinen Gefäße	Lungenverletzung
- Psoriasis	- Zystische Fibrose
	- Thrombose
	- Präeklampsie
	- Peridontitis
	- Appendizitis
	- Sepsis
	- Morbus Crohn

In Autoimmunkrankheiten, bei denen sich der Körper gegen körpereigene Moleküle richtet, wurden ebenfalls NETs nachgewiesen (Tabelle 1). Die Mechanismen und Gründe zur Entstehung von Autoimmunkrankheiten sind bisher weitgehend unverstanden. Die Entdeckung der Verbindung von NETs und Autoimmunkrankheiten wirft viele neue Fragen auf und gibt zugleich einen möglichen neuen Hinweis zur Entstehung von Autoimmunkrankheiten. In den Autoimmunkrankheiten Vaskulitis der kleinen Gefäße (*small vessel vasculitis*, SVV), Systemischer Lupus erythematoses (SLE), Lupus nephritis und Psoriasis wurde eine Beteiligung von NETs beschrieben [41, 42]. Es wird vermutet, dass mit NETs assoziierte Proteine als Autoantigene zur Verschlechterung der Krankheit beitragen. Die Proteine fördern zum einen die Bildung von Autoantikörpern und zum anderen werden die Autoantigene durch Autoantikörper erkannt. Systemischer Lupus erythematoses ist durch Bildung von Autoantikörpern gegen Kernantigene, verbunden mit der Bildung von Immunkomplexen, Entzündung und Organschäden, gekennzeichnet. Im Serum von Patienten mit SLE wurde eine gehemmte Aktivität von DNase I und ein damit verbundener verminderter Abbau von NETs festgestellt. Die detektierte, abnormale NETose in Patienten mit SLE bestätigt diese Ergebnisse [43]. Bei der Autoimmunkrankheit Vaskulitis der kleinen Gefäße wurde erstmals eine Verbindung zwischen NETs und Autoimmunität beschrieben [38]. Diese systemische Autoimmunkrankheit ist durch nekrotische Entzündung kleinerer Blutgefäße und Kapillaren gekennzeichnet. Hierbei sind vor allem die Blutgefäße der Nieren, Lungen, Haut und peripheren Nerven betroffen. Typisch für die Mehrheit der Patienten sind anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) im Blut, welche sich gegen die in den neutrophilen Granulozyten und NETs enthaltenen Granulaproteine Proteinase 3 oder MPO richten. Binden ANCAs an Proteinase 3 oder MPO, aktivieren sie neutrophile Granulozyten. Der damit verbundene oxidative *burst* führt zur Induzierung der NET-Bildung, wodurch erneut Proteinase 3 und MPO extrazellulär präsentiert werden und neue Bindestellen für ANCAs bereitstellen [38, 43]. Unter pathologischen Bedingungen könnte die Hemmung der ROS-abhängigen NET-Bildung zur Verbesserung des Krankheitsbildes bei Autoimmunkrankheiten beitragen.

2.4.4 Interaktion von NETs mit dem Immunsystem

NETs wirken nicht nur antimikrobiell, sondern auch modulatorisch auf das Immunsystem. Das angeborene Immunsystem detektiert über TLRs PAMPs eingedrungener Mikroorganismen und bekämpft diese. Außerdem erkennt es *danger-associated molecular patterns* (DAMPs), endogene Moleküle, welche durch Zell- und Gewebeschädigung gebildet werden. Solche DAMPs sind z. B. die Hitzeschockproteine und die *high-mobility group box 1*

(HMGB1) oder extrazelluläre DNA. Komplexe aus HMGB1 oder dem antimikrobiellen Cathelicidin LL37 und DNA aktivieren dendritische Zellen stärker als DNA allein. NETs besitzen neben DNA auch LL37 und aktivieren TLR-9 in dendritischen Zellen [5]. Weiterhin können NETs auch mit dem adaptiven Immunsystem interagieren, indem sie T-Zellen über einen bisher unbekannten Rezeptor sensibilisieren und ihre Schwelle zur Aktivierung senken [44]. Neben DNA können auch Histone TLR-2 und TLR-4 aktivieren, was vermuten lässt, dass NETs das Immunsystem durch verschiedene Wege aktivieren können [5].

2.5 Antioxidantien

Antioxidantien sind Substanzen, welche einen durch z. B. ROS hervorgerufenen oxidativen Schaden an einem Zielmolekül verhindern, verzögern oder entfernen können [45]. ROS fungieren als sekundäre Botenstoffe in einer Reihe physiologischer Signalkaskaden, unter anderem dem oxidativen *burst* und der Auslösung von NETs, um Bakterien abzutöten. Neben der Abtötung von Mikroorganismen können ROS aber auch körpereigene Zielstrukturen, z.B. Proteine, Lipide oder DNA, angreifen und schädigen. Ursache hierfür ist ein Ungleichgewicht zwischen oxidativen Stress durch extensive ROS-Produktion und antioxidativer Beseitigung durch körpereigene Substanzen.

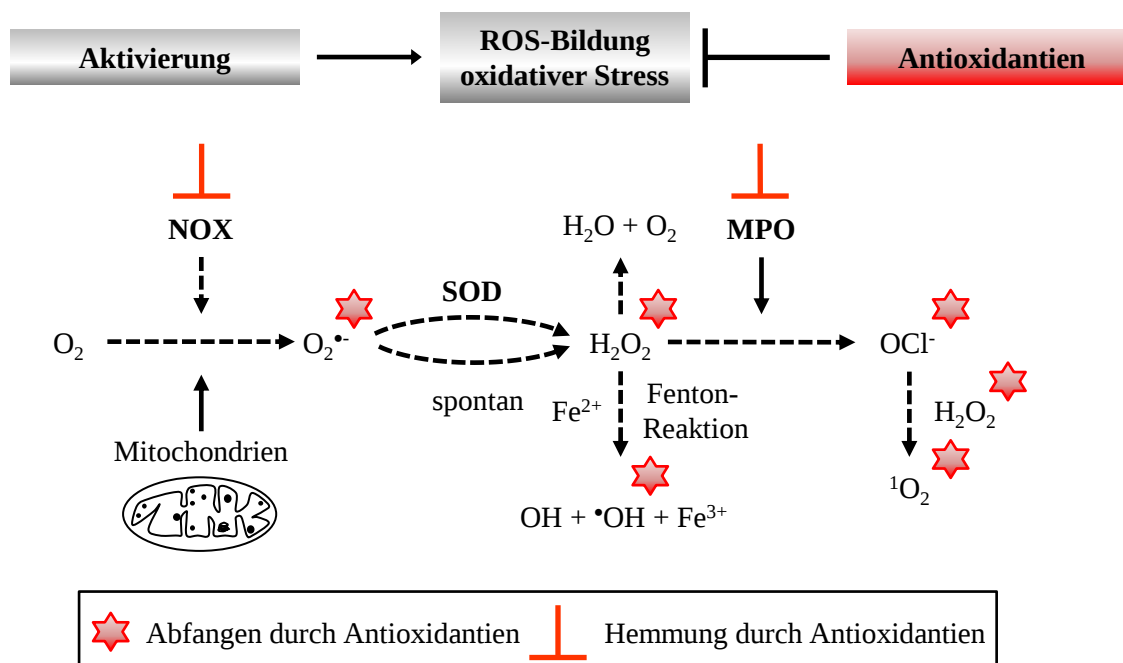


Abbildung 6: Angriffsorte von Antioxidantien

Antioxidantien tragen als Radikalfänger von ROS zur Senkung der ROS-Bildung bei. Des Weiteren können sie als Inhibitoren der NADPH-Oxidase (NOX) und Myeloperoxidase (MPO) zur Senkung des oxidativen Stresses beitragen. SOD: Superoxiddismutase

Natürliche in neutrophilen Granulozyten vorkommende antioxidativ wirkende Substanzen sind unter anderem die SOD, welche Superoxidanionradikale zu Wasserstoffperoxid umwandelt, sowie die Glutathionperoxidase und Katalase, die gebildetes Wasserstoffperoxid abfangen [46]. Der antioxidative Effekt der Substanzen beruht auf ihrer Fähigkeit, ROS, wie Superoxidanionenradikale, Hydroxylradikale oder Hypochlorit, abzufangen (Abbildung 6). Außerdem können einige Antioxidantien zusätzlich die ROS-bildenden Enzyme NADPH-Oxidase und MPO hemmen (Abbildung 6). Dadurch wird der oxidative Stress vermindert.

Wie bereits beschrieben (siehe 2.4.3) wird eine unerwünschte Rolle der NETs in Autoimmunkrankheiten diskutiert. Die ROS-abhängige NETose, ausgelöst durch synthetische (PMA) oder biologische (LPS) Stimuli, benötigt die von den Enzymen NADPH-Oxidase und MPO gebildeten ROS [29, 30]. Eine mögliche Therapieoption in NET-assoziierten Krankheiten könnte die Hemmung der Bildung von NETs durch Abfangen der essentiellen ROS darstellen. Hier könnten Antioxidantien, die als Radikalfänger wirken und ROS neutralisieren, zum Einsatz kommen. Dazu zählen die Flavonoide (+)-Catechinhydrat, (–)-Epicatechin und Rutintrihydrat, die Vitamine Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherol (Vitamin E) und andere pharmakologische Substanzen, wie 5-Aminosalicylsäure, Melatonin und Acetylsalicylsäure. Die Flavonoide gehören zur Klasse der Polyphenole und kommen in sehr vielen Pflanzen vor. Ihnen werden antioxidative und immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben. Die als Radikalfänger beschriebenen Flavonoide wurden auch als Inhibitoren der MPO [47] und NADPH-Oxidase [48] diskutiert. Die im grünen Tee, Kakao und Rotwein vorkommenden Flavonoide (+)-Catechinhydrat und (–)-Epicatechin [49-51] wirken z. B. antikancerogen und positiv bei Entzündungsprozessen. Diese Eigenschaft wird auf den antientzündlichen Effekt der Catechine auf neutrophilen Granulozyten zurückgeführt [52]. Ein weiteres Flavonoid ist Rutintrihydrat, welches in Buchweizen, weißer Maulbeere und wildem Veilchen zu finden ist [53]. Für Rutintrihydrat wurden ebenfalls antientzündliche Effekte auf neutrophile Granulozyten beschrieben [54]. Die Vitamine Ascorbinsäure (Vitamin C) und α -Tocopherol (Vitamin E) sind für viele biologische Funktionen im Menschen wichtige antioxidative Mikronährstoffe [55, 56]. Vitamin C dient z. B. als Kofaktor für Enzyme und Vitamin E wirkt gegen die Lipidperoxidation. Da die essentiellen Vitamine nicht vom Körper selbst synthetisiert werden können, müssen sie über die Nahrung aufgenommen werden. Ein hoher Vitamin C-Gehalt ist z. B. in Pfeffer und Hagebutten zu finden [57, 58], während hohe Vitamin E-Konzentrationen in Weizenkeim- und Olivenöl vorkommen [59, 60]. Neben diesen natürlich vorkommenden Flavonoiden und Vitaminen

können auch pharmakologische Wirkstoffe antioxidativ wirksam sein. Dazu zählt z. B. die antientzündliche 5-Aminosalicylsäure [61], welche neben anderen Medikamenten zur Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (*inflammatory bowel disease*) eingesetzt wird [62]. Für den pharmakologischen Wirkstoff *N*-Acetyl-L-cystein, der Vorstufe des natürlichen Glutathion, wurde eine antientzündliche und antioxidative Wirkung in der Behandlung von Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung beschrieben [63]. Die Verwendung des in der Zirbeldrüse des Menschen gebildeten Hormons Melatonin wirkt positiv in der Therapie von Schlaganfall und Herzinfarkt [64, 65]. Es wurden auch anti-kanzerogene Eigenschaften des Radikalfängers beschrieben [66, 67]. Ein weiterer Wirkstoff mit antioxidativen Eigenschaften ist die nichtsteroidale anti-entzündliche Acetylsalicylsäure, welche unter anderem gegen Schmerzen eingesetzt wird [68]. Neben ihrem antioxidativen Effekt wirken die anti-entzündlichen Wirkstoffe 5-Aminosalicylsäure und Acetylsalicylsäure auch inhibitorisch auf die hypochlorige Säure bildende MPO [20].

2.6 Hypoxie und HIF-1 α vermittelte Zellfunktionen

Die Aufnahme von Sauerstoff und dessen Diffusion in die Gewebe ist essentiell für das Überleben. Unter pathologischen Bedingungen, wie Krebs oder Entzündungen durch infektiöse Pathogene, ist die Balance zwischen Sauerstoffverbrauch und –aufnahme im Gewebe gestört [69]. So weist gesundes Gewebe einen Sauerstoffgehalt von 2,5 - 9 % O₂ auf, während in Wunden und am Ort einer Entzündung ein Sauerstoffmangel mit < 1 % O₂ herrscht. Die physiologische Sauerstoffkonzentration im gesunden Gewebe wird auch als Normoxie bezeichnet, während Hypoxie immer dann herrscht, wenn weniger Sauerstoff vorhanden ist als gebraucht wird. Für Zellkulturexperimente werden der atmosphärische Sauerstoffgehalt (21 % O₂) bzw. der im Brutschrank herrschende Sauerstoffgehalt (20 % O₂) als Normoxie und Sauerstoffmangel (<3 % O₂) als Hypoxie definiert [70].

Die zum Entzündungsort ins Gewebe eingewanderten neutrophilen Granulozyten müssen sich schnell an die dort herrschenden sauerstoffarmen Bedingungen (< 1 % O₂), verglichen zu den sauerstoffreichen Bedingungen im Blut (>10 % O₂), anpassen [70] (Abbildung 7). Die Adaption der neutrophilen Granulozyten an diese Bedingungen wird durch den Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF) gesteuert. HIF kommt in allen Säugerzellen vor und reguliert mehr als 100 Gene. Ausgelöst durch niedrige Sauerstoffkonzentrationen werden sie aufgrund zellulärer und systemischer Antworten HIF-vermittelt hochreguliert [70]. Durch HIF kontrollierte Signalwege führen z. B. zur Hemmung der Apoptose und zur Erhöhung der Permeabilität für erleichtertes Einwandern der

Zellen durch Ausschütten von *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Die Phagozytose wird verstärkt, pro-entzündliche Zytokine, wie z. B. TNF und antimikrobielle Peptide, sowie Granulaproteasen, freigesetzt. Erkennen die Phagozyten durch z. B. TLRs die Mikroorganismen, werden sie aktiviert und lösen über den nuklearen Faktor- κ B (NF- κ B) die verstärkte Transkription von HIF-1 α aus (Abbildung 7).

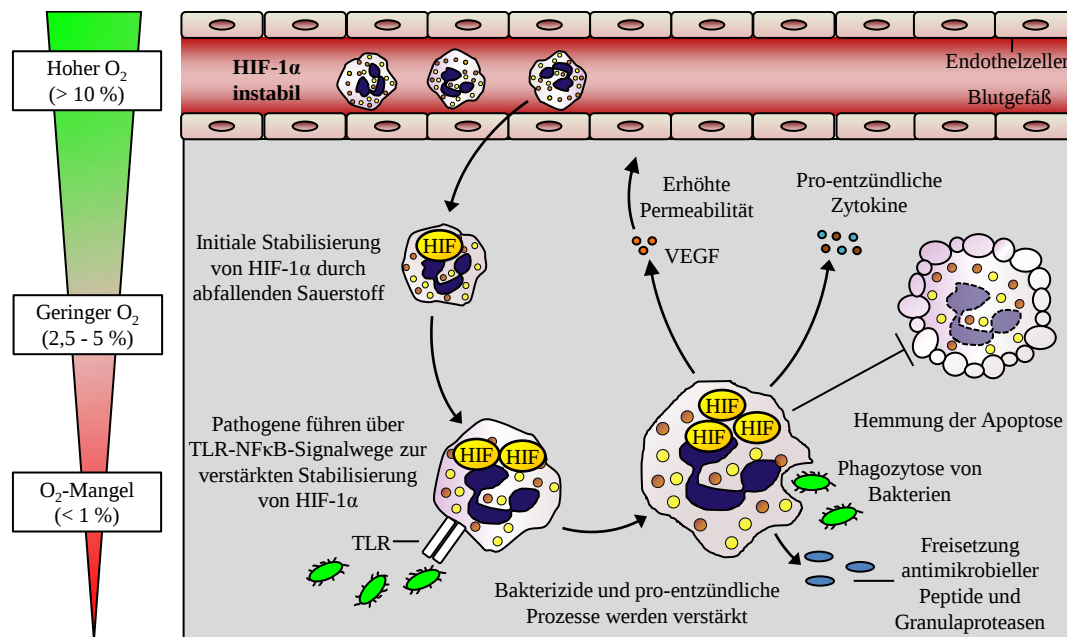


Abbildung 7: HIF reguliert zahlreiche angeborene Immunfunktionen der Phagozyten
(modifiziert nach Nizet und Johnson [70])

Im sauerstoffreichen Blut zirkulierende Phagozyten, wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen, besitzen geringe Level an Hypoxie-induzierbarem Faktor (HIF). Werden sie zum Entzündungsherd rekrutiert, passieren sie die Epithelzellschicht und wandern anschließend durch verschiedene Gewebeschichten, deren Sauerstoffgehalt in Richtung des Infektionsortes abnimmt. Durch die Abnahme des Sauerstoffgehaltes erfolgt die Stabilisierung von HIF-1 α und Bindung an die HIF-1 β -Untereinheit zum Heterodimer. Die Apoptose wird verhindert, die Phagozytose gefördert. Außerdem werden antimikrobielle Peptide, Granulaproteasen, der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) zur Erhöhung der Permeabilität und pro-entzündliche Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF) freigesetzt. Die HIF-1 α -Transkription wird durch Bakterien über auf Phagozyten exprimierte TLR-Rezeptoren und Aktivierung von nuklearem Faktor- κ B (NF- κ B) erhöht.

HIF ist ein Heterodimer, welches aus einer sauerstoffregulierten α -Untereinheit und konstitutiven β -Untereinheit besteht. Als α -Untereinheiten kommen HIF-1 α oder HIF-1 β vor, wobei die Expression von HIF-1 α in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen wurde [70, 71]. Die HIF-1 α -Untereinheit wird unter normoxischen Bedingungen abgebaut. Bei Verfügbarkeit von Sauerstoff katalysieren Prolylhydroxylasen die Hydroxylierung spezifischer Prolylreste von HIF-1 α . Die Hydroxylierung markiert die HIF-1 α -Untereinheit zur Erkennung durch die Ubiquitinligase, welche das von Hippel-Lindau Protein (pVHL) enthält. Dies führt zur Ubiquitin vermittelten Markierung von HIF-1 α für die Zerstörung

durch Proetasomen. Zusätzlich wird ein Asparaginrest von HIF-1 α mittels der Asparaginyhydroxylase, dem *factor inhibiting HIF* (FIH), hydroxyliert (Abbildung 8), wodurch die Rekrutierung von Ko-Aktivatoren von HIF verhindert wird. Unter hypoxischen Bedingungen (Sauerstoffmangel) werden die Prolyl- und Asparagylhydroxylasen gehemmt. HIF-1 α kann durch die Stabilisierung akkumulieren und transloziert zum Zellkern. Dort bindet HIF-1 α an die HIF-1 β -Untereinheit. Das gebildete Heterodimer bindet schließlich an die *hypoxic-response elements* (HRE), Nukleotidsequenzen in der Promotorregion der Zielgene (Abbildung 8). Klassische Zielgene von HIF-1 sind z. B. Glucose Transporter, glycolytische Enzyme und Erythropoietin [70, 72].

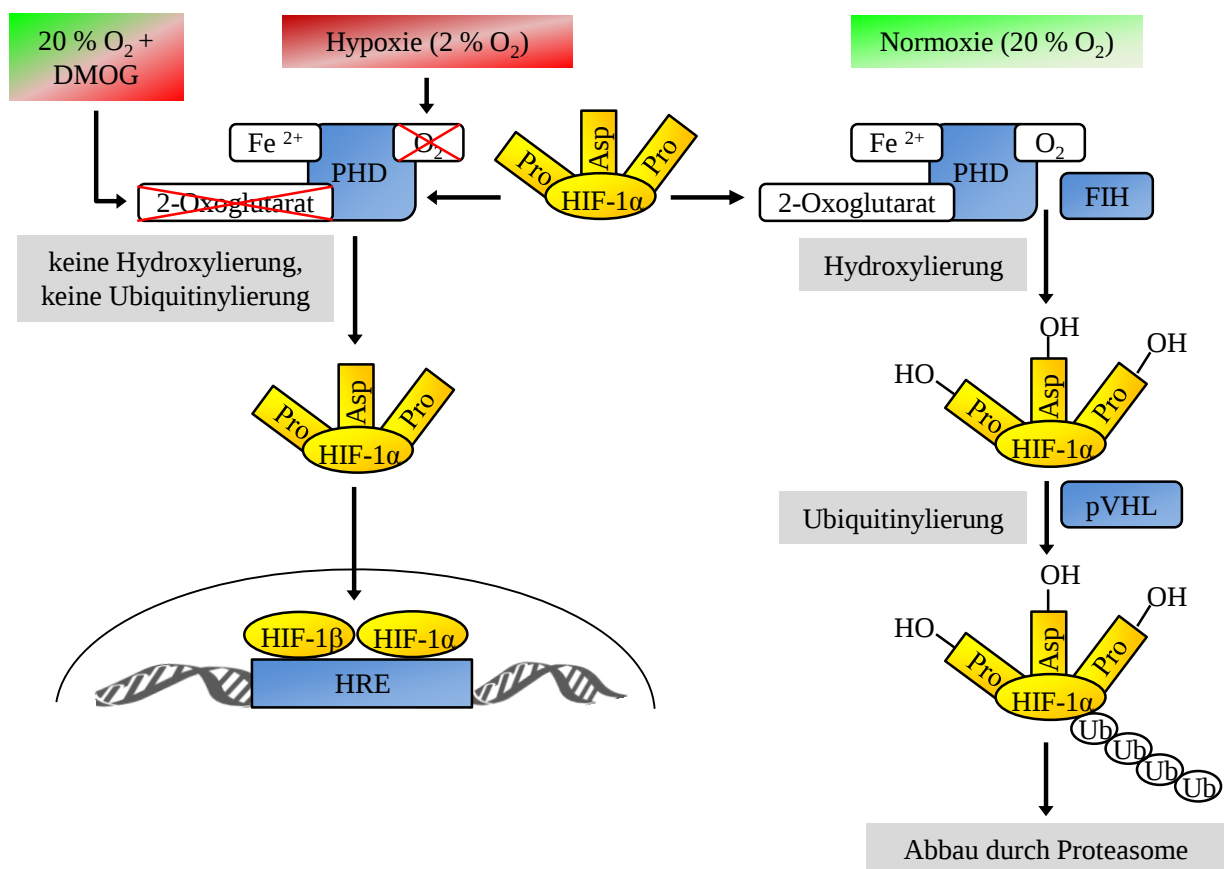


Abbildung 8: Stabilisierung von HIF-1 α

Schematische Darstellung der Stabilisierung von HIF-1 α in Anwesenheit von 20 % O₂ und DMOG sowie Hypoxie (2 % O₂) und des Abbaus von HIF-1 α unter Normoxie (20 % O₂). Erfolgt die Stabilisierung von HIF-1 α , transloziert HIF-1 α in den Zellkern und bindet an die HIF-1 β -Untereinheit zum Heterodimer, welches an *hypoxic-response elements* (HRE) in der Promotorregion der Zielgene bindet. Es folgt die erhöhte Expression von Genen, welche zur Abwehr eingedrungener Mikroorganismen beitragen. Unter Normoxie werden die Asparagin (Asp)- und Prolin (Pro)-Reste von HIF-1 α durch Prolylhydroxylasen (PHD) und *factor inhibiting HIF* (FIH) hydroxyliert. Die folgende Erkennung durch die Ubiquitinligase, welche das von Hippel-Lindau Protein (pVHL) enthält, führt zur Ubiquitinylierung und dem Abbau von HIF-1 α durch Proteasome.

Die für die Stabilisierung von HIF-1 α essentielle Aktivität der Prolylhydroxylasen ist abhängig von Sauerstoff, Eisen- (Fe^{2+}) und 2-Oxoglutarat. Unter Hypoxie führt der fehlende Sauerstoff zur Inaktivierung der Prolylhydroxylasen und verhindert durch die fehlende Hydroxylierung die Degradation von HIF-1 α . Die Prolylhydroxylasen können durch synthetische Verbindungen, wie z. B. Dimethyloxalylglycin (DMOG), unter normoxischen Bedingungen inhibiert werden. Dabei verdrängt DMOG als Ester des *N*-Oxalylglycins das für die Prolylhydroxylasen essentielle 2-Oxoglutarat an seiner Bindungsstelle. Dadurch erfolgt, ähnlich wie unter hypoxischen Bedingungen, die Stabilisierung von HIF-1 α [73].

Es ist bekannt, dass HIF-1 α in neutrophilen Granulozyten unter Hypoxie oder in Anwesenheit von DMOG stabilisiert wird [71]. Welche Rolle HIF-1 α und Hypoxie bei der Bildung von ROS und NETs in PMA-stimulierten neutrophilen Granulozyten spielen, ist bisher nahezu unbekannt. Es gibt bisher eine Studie, die sich auf die ROS-Bildung aktivierter neutrophiler Granulozyten unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie fokussiert hat. Darin wurde gezeigt, dass Hypoxie den oxidativen *burst* aktivierter neutrophiler Granulozyten hemmt [74].

2.7 Zielstellung

Die Bildung von NETs durch stimulierte neutrophile Granulozyten dient einerseits der antimikrobiellen Abwehr, andererseits wird jedoch eine unerwünschte Rolle von NETs in Autoimmunkrankheiten beschrieben. In dieser Arbeit sollten die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der NET-Bildung *in vitro* näher untersucht werden. Insbesondere der Einfluss von ROS und der ROS-produzierenden Enzyme und Mitochondrien auf die NET-Bildung sollte geklärt werden. Die Etablierung von ROS-Detektmethode zur Messung von ROS in PMA-stimulierten neutrophilen Granulozyten bildet die Grundlage dieser Studie. Anschließend soll der Einfluss verschiedener Inhibitoren der ROS-produzierenden Enzyme NADPH-Oxidase, Superoxiddismutase und Myeloperoxidase sowie der mitochondrialen Atmungskette auf die ROS- und NET-Bildung in PMA-stimulierten neutrophilen Granulozyten betrachtet werden. Da ROS einen guten Angriffspunkt zur Hemmung der ROS-abhängigen NET-Bildung darstellen, soll untersucht werden, ob als Radikalfänger wirkende Antioxidantien modulatorisch bezüglich der Hemmung von NETs in aktivierten neutrophilen Granulozyten wirken können.

Orte einer Entzündung sind durch Sauerstoffmangel (Hypoxie) gekennzeichnet, wobei HIF-1 α zur Adaption an hypoxische Bedingungen in den Zellen stabilisiert wird. Daher soll in dieser Arbeit der Effekt von Hypoxie (2 % O_2) auf die Bildung von ROS und NETs in

stimulierten neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu Normoxie (20 % O₂) untersucht werden.

Zusammenfassend soll diese Arbeit dazu dienen, die molekularen Mechanismen der NET-Bildung näher zu verstehen, um gerade im Hinblick auf die pathologische Rolle von NETs in Autoimmunkrankheiten neue Ansatzpunkte für mögliche Therapien zu finden.

3 Materialien

3.1 Chemikalien

Bezeichnung	Firma (Name, Ort, Land)
Aceton	Merck, Darmstadt, D
5-ASA (5-Aminosalicylsäure)	TCI Europe N.V., Eschborn, D
Aminopyrin (4-Dimethylaminoantipyrin)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Annexin V-Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Promokine, Heidelberg, D
APS (Ammoniumpersulfat)	Bio-Rad Laboratories, München, D
Aqua dest.	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Lübeck, D
Aroclor (Aroclor 1242)	Supelco Analytical, Bellefonte, USA
Ascorbinsäure (L-Ascorbinsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
ASS (Acetylsalicylsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Bromphenolblau Na-Salz	Serva, Amstetten, A
Calciumchlorid- Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Catechinhydrat ((+)-Catechinhydrat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Cytochrom C	Sigma, Steinheim, D
D-(+)-Glucose	Sigma, Steinheim, D
DETC (Diethyldithiocarbaminsäure)	Alexis, Lörrach, D
DHR 123 (Dihydrorhodamin 123)	Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, USA
Diff-Quik®-Lösungen	Medion Grifols Diagnostics, Düdingen, Schweiz
Dinitrophenol (2,4-Dinitrophenol)	Supelco Analytical, Bellefonte, USA
Dipyron (Dipyronhydrat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DMEM-High Glucose-Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
DMOG (Dimethyloxalylglycin)	BIOZOL Diagnostica, Eching, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DNAzol	Molecular Research Center, Cincinnati, USA
DPBS, 10 x (Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung)	Gibco, Invitrogen, Paisley, UK
DPI (Diphenyliodoniumchlorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Epicatechin ((-)-Epicatechin)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

EtOH (Ethanol), 100 %, 75 %	Baker, Deventer, NL
FCS (<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum)	Sigma, Steinheim, D
FCCP (Carbonylcyanid p-[trifluoromethoxy]-phenyl-hydrazon)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
fMLP (formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Gelatine aus der Haut von Kaltwasserfischen	Sigma, Steinheim, D
Gentamycin	Sigma, Steinheim, D
Glycerol	Sigma, Steinheim, D
Glycin	Sigma, Steinheim, D
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
HCl (Salzsäure), 25 %	
HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure)- Puffer	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Histopaque 1119	Sigma, Steinheim, D
HSA (Humanes Serumalbumin)	Behring, Marburg, D
ibidi Eindeckmedium	ibidi, Martinsried, D
Immobilon TM Western Chemiluminescent HRP substrat	Millipore, Billerica, USA
Kristallviolett	Sigma, Steinheim, D
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, D
LPS (Lipopolysaccharid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Lucigenin (<i>N,N'</i> -Dimethyl-9,9'-biacridiniumdinitrat)	Alexis, Lörrach, D
Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Lymphozytenisolationsmedium 1077	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Magermilchpulver	Fluka analytical, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Magnesiumchlorid, 1M	Sigma, Steinheim, D
Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i> , HRP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Melatonin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
MeOH (Methanol)	Th. Geyer, Renningen, D
Mnase (Mikrokokken-Nuklease)	Worthington, Lakewood, USA
Monti-Graziadei-Lösung	zur Verfügung gestellt vom Institut für Anatomie, Lübeck, D
NAC (<i>N</i> -Acetylcystein)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natriumchlorid	J. T. Baker, München, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
normales Ziegenserum	Jackson Immuno Research, Newmarket, GB
nukleasefreies Wasser	Sigma, Steinheim, D
PageRuler TM Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

PBS, 1x (<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung)	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Lübeck, D
PBS, 1x	PromoCell, Heidelberg, D
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, D
Percoll TM	GE Healthcare, München, D
Phenolrot Natriumsalz	Sigma, Steinheim, D
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Polyacryl Carrier TM	Molecular Research Center, Cincinnati, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
ProLong Gold® Antifade Reagent	Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, USA
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Quant-iT TM Picogreen®	Invitrogen, Karlsruhe, D
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, D
Rotenon	Calbiochem, Merck, Darmstadt, D
Rotiphorese®Gel 40 (40 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung)	Carl Roth, Karlsruhe, D
RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640-Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
RPMI 1640 Medium, modifiziert	Biochrom, Berlin, D
Rutintrihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, D
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma, Steinheim, D
SYTOXgreen	Invitrogen, Karlsruhe, D
TEMED (Tetramethyldiamin)	Carl Roth, Karlsruhe, D
TE-Puffer, 20 x (Tris-EDTA-Puffer)	Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, USA
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Triton-X	Merck, Darmstadt, D
Tween 20	Serva, Amstetten, Österreich
Tocopherol ((±)-α-Tocopherol)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

3.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma (Name, Ort, Land)
Cellstar 24-well Suspensionszellkulturplatte	Greiner BioOne, Frickenhausen, D
Cellstar Zellkultur-Platten (6, 96-well)	Greiner BioOne, Frickenhausen, D
Cellstar Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
FACS-Röhrchen (1,4 ml, U-Boden)	Micronic B.V., Lelystad, NL
FACS-Röhrchen (5 ml, U-Boden)	Becton Dickson, Heidelberg, D

Falcon-Röhrchen (15, 50 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht, D
Filterpapier (extra dickes Blotfilterpapier)	Bio-Rad Laboratories, München, D
Kanülen BD Microlance™3, 23G	Becton Dickson, Heidelberg, D
μ-Slides 8-well ibi Treat	Ibidi, Martinsried, D
μ-Zellkulturplatte 96-well ibidi Treat	Ibidi, Martinsried, D
Mini Protean 3 Gelkamm	BioRad, München, D
Mini Protean System Glas Platten	BioRad, München, D
Multiple well-Plate (96-well, V-Boden)	Sarstedt, Nürmbrecht, D
Nitrozellulosemembran 0,45 μm	BioRad, München, D
Nuncclon™Delta Surface weiß (96-well)	Nunc, Roskilde, DK
Nuncclon™Delta Surface schwarz (96-well)	Nunc, Roskilde, DK
Objektträger Menzel	Thermo Scientific, Braunschweig, D
Pipettenspitzen (10, 100, 1000 μl)	Sarstedt, Nürmbrecht, D
Pipettenspitzen (10-1000 μl)	Eppendorf, Hamburg, D
Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen	Becton Dickson BioCoat Cellware, Bedford, USA
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht, D
Safety Multifly® Kanülen-Set	Sarstedt, Nürmbrecht, D
S- Monovette 9ml Lithium/Heparin	Sarstedt, Nürmbrecht, D
Spritzen (2, 5 ml)	Becton Dickson, Heidelberg, D
Sterilfilter, 0,2 μm	Whatman, Dassel, D
Thermanoxdeckgläschen	Nunc, Rochester, NY, USA
Transferpipetten (3,5 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht, D

3.3 Geräte und Software

Bezeichnung

Firma (Name, Ort, Land)

Durchflusszytometer

CellQuest Pro Software

BD Biosciences, Heidelberg, D

FACS-Calibur™ Durchflusszytometer

BD, Biosciences, Heidelberg, D

Mikroskope

Axiocam HRc

Carl Zeiss, Jena, D

Axio Vision Rel. 4.8-Software

Carl Zeiss, Jena, D

Axioskop 40

Carl Zeiss, Jena, D

Axiostar Plus

Carl Zeiss, Jena, D

Axiovert 25

Carl Zeiss, Jena, D

BZ9000E All in one Mikroskop

Keyence, Oskana, Japan

BZ II Analyser Software

Keyence, Oskana, Japan

SEM 505 Rasterelektronenmikroskop

Philips, Eindhoven, NL

Platten-Reader

Mikroplattenreader Infinite M200 PRO
i-control 1.8 Software

Tecan, Männerdorf, CH
Tecan, Männerdorf, CH

Pipetten

Accu-Jet Pipettierhilfe
Kolbenhubpipetten (0,5 µl - 1000 µl)
Mehrkanalpipette (Pelpette, 50 µl)
Mehrkanalpipette (Transferpette®-8, 10 – 100 µl)
Mehrkanalpipette (10 - 100 µl)
Mehrkanalpipette (20 - 200 µl)
Multipipette

Brand, Wertheim, D
Eppendorf, Hamburg, D
Peqlab, Erlangen, D
Brand, Wertheim, D
Eppendorf, Hamburg, D
Brand, Wertheim, D
Eppendorf, Hamburg, D

Sonstiges

Forma Series II Water Jacket CO₂ Brutschrank
Hypoxie-Kammer THC08 124
Magnetrührer MR 3003

Minishaker MS2

Neubauer Improved Zählkammer
pH-Meter Inolab

Schüttler KS 250 basic

Software Adobe Photoshop CS2
Software GraphPad Prism 5
Thermomixer Comfort
Vortex-Schüttler
Wasserbad

Werkbank Clean Air EF A6, EN 12469

Thermo Scientific, Braunschweig, D
Toepffer Lab Systems, Göppingen, D
Heidolph, Schwabach, D
IKA-Werke GmbH & Co. KG,
Staufen, D
Karl Hecht, Sondheim, D
WTW GmbH, Weilheim, D
IKA-Werke GmbH & Co. KG,
Staufen, D
Adobe Systems Inc., San Jose, USA
GraphPad Software, La Jolla, USA
Eppendorf, Hamburg, D
Heidolph, Schwabach, D
Köttermann, Uetze/Hänigsen, D
Telstar Laboratory Equipment
(früher CleanAir), Wörden, NL

Waagen

Analysenwaage BP61S
Präzisionswaage BL150

Sartorius, Göttingen, D
Sartorius, Göttingen, D

Western Blot

Elektrophorese-Kammer
Elektrophoresezubehör (Consort pvba)
Imagingsystem Fusion FX7
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Kammer

Bio-Rad, München, D
Peqlab, Erlangen, D
Vilber Lourmat, Eberhardzell, D
Bio-Rad, München, D

Zentrifugen

Cytospin 3 Zentrifuge	Shandon, Frankfurt, D
Megafuge 2.0	Heraeus, Langenselbold, D
Megafuge R 40	Thermo Scientific, Braunschweig, D
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Langenselbold, D
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Multi-Spin MSC-3000	Lab4You GmbH, Berlin, D

3.4 Antikörper

Bezeichnung	Firma (Name, Ort, Land)
Anti-Human-HIF-1 α aus Maus, monoklonal	BD, Heidelberg, D
Anti-Maus IgG HRP-gekoppelt, polyklonal	Cell-Signaling, Frankfurt/Main, D
Anti-Human- β -Aktin aus Kaninchen, polyklonal	Cell-Signaling, Frankfurt/Main, D
Anti-Kaninchen IgG HRP-gekoppelt, polyklonal	Cell-Signaling, Frankfurt/Main, D
Anti-Human-Neutrophil Elastase, aus Kaninchen, polyklonal	Calbiochem, Merck, Darmstadt, D
Cy TM 3-konjugiertes-AffiniPure Anti-Kaninchen IgG aus Ziege, polyklonal	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, GB
Anti-Human-Myleoperoxidase IgG1 aus Maus, monoklonal, Klon: 2C7	AbD Serotec, Düsseldorf, D
Cy TM 3-konjugierte-AffiniPure-F(ab') ₂ -Fragmente Anti-Maus IgG (H+L) aus Ziege, polyklonal	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, GB

3.5 Medien und Puffer

Kristallviolettlösung	0,1 % Kristallviolett in 50 % Methanol
RPMI-Komplettmedium	RPMI 1640 Medium, versetzt mit 10 mM HEPES-Puffer, 50 μ M β -Mercaptoethanol, 10 % hitzeinaktiviertem FCS, 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin
Chemilumineszenz (CL)-Medium	modifiziertes RPMI-Medium ohne Phenolrot und Hydrogenkarbonat, mit 20 mM HEPES-Puffer
NET-Medium	CL-Medium, versetzt mit 0,5 % humanen Serumalbumin und 10 mM HEPES-Puffer

Hep-2 Kulturmedium	DMEM-High Glucose Medium (enthält L-Glutamin und 4,5 g/l Glucose), versetzt mit 10 % FCS, 20 µg/ml Gentamycin, 33,2 mM HEPES-Puffer
Lysispuffer, 4 x	Hep-2 Zellen: 160 mM Tris HCl (pH 7,8), 20 % Glycerol, 4 % SDS, 100 mM DTT, Spatelspitze Bromphenolblau ad 200 ml A. dest. Neutrophile Granulozyten: 160 mM Tris (pH 6,8), 30 % Glycerol, 4 % SDS, 715 mM β-Mercaptoethanol, Spatelspitze Bromphenolblau ad 10 ml Aqua dest.
Trenngel	375 mM Tris (pH 8,4), 10 % Rotiphorese® Gel 40, 0,1 % SDS ad 10 ml Aqua dest. + 0,05 % TEMED und 0,05 % APS
Sammelgel	125 mM Tris (pH 6,8), 5 % Rotiphorese® Gel 40, 0,1 % SDS ad 10 ml Aqua dest. + 0,1 % TEMED, 0,05 % APS
Laufpuffer, 5 x	124 mM Tris, 960 mM Glycin, 0,5 % SDS, einstellen mit 25 % HCl auf pH 8,4 in Aqua dest.
TBS, 10 x	200 mM Tris, 1,4 M NaCl, einstellen mit 25 % HCl auf pH 7,6 in Aqua dest.
T-TBS	0,1 % Tween in 1 x TBS in Aqua dest.
Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol ad 1 l Aqua dest.
Blockierungslösung	5 % Magermilch in T-TBS

4 Methoden

4.1 Isolation neutrophiler Granulozyten aus humanem Vollblut

Alle in dieser Arbeit verwendeten neutrophilen Granulozyten wurden frisch aus humanem Vollblut isoliert. Die Blutentnahme erfolgte nach Aufklärung mit dem Einverständnis jedes Spenders und wurde durch die ethische Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck bewilligt (05-124). Das Blut wurde durch Venenpunktion von gesunden, freiwilligen Erwachsenen zur Vermeidung der Gerinnung in 9 ml Lithium-Heparin-Monovetten abgenommen. Die Isolation der neutrophilen Granulozyten wurde mithilfe von zwei Dichtegradientenzentrifugationen durchgeführt.

Zu Beginn wurde das Blut vorsichtig im Verhältnis 1:1 auf einen bereits vorbereiteten Gradienten, bestehend aus gleichen Teilen Histopaque 1119 und Lymphozytenisolationsmedium 1077 (gesamt 25 ml), geschichtet (Abbildung 9 a). Die anschließende Zentrifugation (ohne Bremse, 34 min, 216 x g) diente zur Auftrennung der einzelnen Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte. Hierbei bildeten die schweren Erythrozyten die unterste Schicht, gefolgt von der zu gewinnenden Phase der neutrophilen Granulozyten und einer Schicht aus Lymphozyten und mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) sowie dem Blutplasma. Das Lymphozytenseparationsmedium 1077 trennte hierbei die Lymphozyten und Monozyten von den schwereren neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten sowie den leichteren Thrombozyten im Plasma ab (Abbildung 9 b).

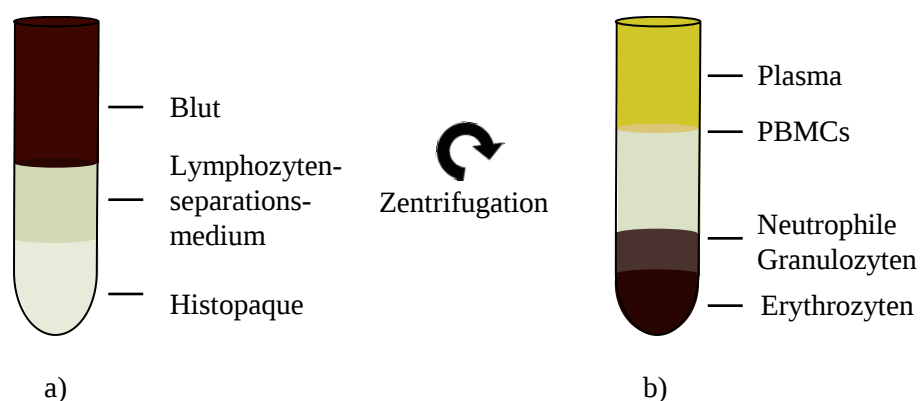


Abbildung 9: Isolierung neutrophiler Granulozyten Teil 1

Die Isolierung der neutrophilen Granulozyten aus dem humanen Blut erfolgte über zwei Dichtegradientenzentrifugationen a) Das Blut wurde auf einen Gradienten, bestehend aus Lymphozytenseparationsmedium und Histopaque geschichtet und zentrifugiert. b) Die dadurch aufgetrennten Schichten sind dargestellt.

Nach Verwerfen der Schichten von Blutplasma und PBMCs wurde die Phase der neutrophilen Granulozyten in ein Röhrchen (50 ml) überführt und mit PBS gewaschen (10 min, 863 x g). Zur besseren Separation der Zellen wurde das von Erythrozyten noch rötlich gefärbte Zellpellet in 2 ml RPMI-Komplettmedium resuspendiert und auf einen zweiten Dichtegradienten (11 ml) gegeben (Abbildung 10 c). Dieser bereits vorbereitete Gradient bestand aus Percoll in 10 x DPBS in den Konzentrationen 85 %, 80 %, 75 %, 70 % und 65 %. Hierfür wurde Percoll mit 10 x DPBS 10:1 vermischt und anschließend mit RPMI-Komplettmedium verdünnt. Die Verdünnungen wurden mit absteigender Dichte übereinander geschichtet (85 % -70 % je 2 ml, 65 % 3 ml). Dieser mit neutrophilen Granulozyten der zuvor gewonnenen Zellsuspension überschichtete Dichtegradient wurde für 25 min, ohne Bremse, bei 863 x g zentrifugiert.

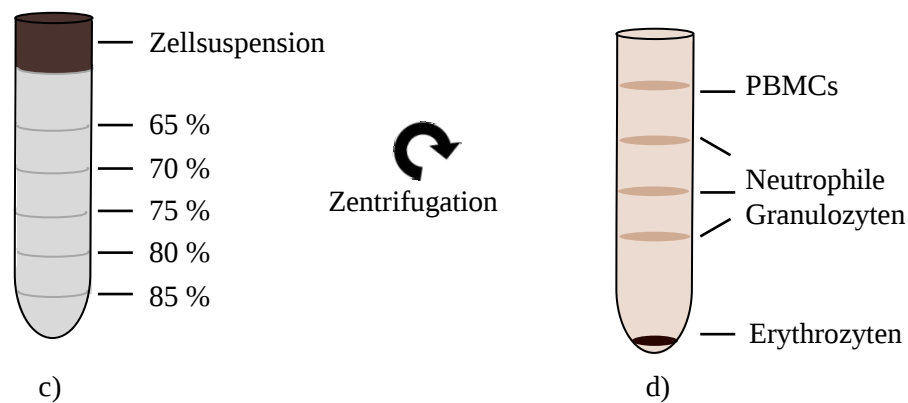


Abbildung 10: Isolierung neutrophiler Granulozyten Teil 2

Nach der ersten Dichtegradientenzentrifugation wurde die Phase der neutrophilen Granulozyten gewonnen und in PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension in 2 ml RPMI-Komplettmedium resuspendiert und c) auf einen Percollgradienten bestehend aus übereinandergeschichteten Percollverdünnungen unterschiedlicher Dichte aufgetragen und erneut zentrifugiert. Die Percollverdünnungen wurden mit absteigender Dichte übereinander geschichtet (85 %, 80 %, 75 %, 70 % je 2 ml, 65 % 3 ml). d) Der nach der Zentrifugation gebildete Gradient ist dargestellt. Die einzelnen Zellen wurden entsprechend ihrer Dichte in verschiedenen Schichten aufgetrennt. Die neutrophilen Granulozyten wurden gewonnen, in PBS gewaschen und anschließend die Zellzahl bestimmt.

Danach wurde die obere Schicht, welche die PBMCs enthielt (Abbildung 10 d), entfernt und die darunter liegenden 2-3 Ringe der neutrophilen Granulozyten mit einer Transferpipette zügig in ein neues Röhrchen (50 ml) überführt. Durch Erythrozyten rötlich gefärbte, verunreinigte Ringe neutrophiler Granulozyten wurden jedoch verworfen. Die gewonnenen neutrophilen Granulozyten wurden mit PBS gewaschen (10 min, 863 x g) und das entstandene, weiße Pellet in 5 -10 ml RPMI-Komplettmedium aufgenommen. Anschließend erfolgte die Bestimmung und Einstellung der Zellzahl im jeweiligen Versuchsmedium.

4.1.1 Bestimmung und Einstellung der Zellzahl

In eine Neubauer-Zählkammer wurden 10 µl eines Gemisches aus Zellsuspension, PBS und Kristallviolett (1:6:3) pipettiert und die angefärbten Zellen in den vier äußeren Großquadranten ausgezählt. Durch Multiplikation des Mittelwertes der vier Großquadrate, des Verdünnungsfaktors 10 der Zellsuspension und des Volumenfaktors 10 000 der Zählkammer, wurde die Zellzahl pro ml errechnet.

Anschließend wurde die Zellzahl auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Für die Aufnahme der Zellen in einem anderen Medium als das RPMI-Komplettmedium wurden die Zellen in PBS gewaschen (10 min, 1045 x g). Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet im entsprechenden Versuchsmedium in der gewünschten Konzentration aufgenommen.

4.1.2 Überprüfung der Reinheit der isolierten neutrophilen Granulozyten

Die Reinheit der frisch isolierten neutrophilen Granulozyten wurde durch ein mit Diff-Quik gefärbten Zytospin-Präparat analysiert. Hierfür wurden 100 000 Zellen für 5 min bei 28,23 x g mit der Zytocentrifuge auf einem Objektträger zentrifugiert und mit der methanolhaltigen Diff-Quik Färbelösung fixiert (3 min). Anschließend wurden für je 3 min die eosinophilen Granula mit Eosin Y (Diff-Quik I) rot und die Zellkerne durch Thiazin (Diff-Quik II) blau angefärbt. Nach Abspülen der Färbelösungen in Aqua dest. wurde das Präparat mit Ölimmersion unter dem Mikroskop betrachtet. Die Reinheit der neutrophilen Granulozyten lag durchschnittlich bei $\geq 99\%$. Je nach Spender wurden 2 - 5 % eosinophile Granulozyten festgestellt.

4.2 Zellkulturbedingungen

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente wurden ausschließlich mit frisch isolierten humanen neutrophilen Granulozyten *in vitro* durchgeführt. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei 37 °C und einer Konzentration von 5 % CO₂ sowie 20 % O₂ im Brutschrank. Für die Messung der Apoptose- und Nekroserate (siehe 4.6.1) und Experimente zur Detektion intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (siehe 4.7.1) der in dieser Arbeit benutzten Substanzen wurden 5 x 10⁶/ml neutrophile Granulozyten, eingestellt in NET-Medium, verwendet. Je Ansatz wurden 100 µl Zellsuspension eingesetzt. Die Detektion intra- und extrazellulärer ROS mit der Luminol-Methode (siehe 4.7.2) sowie extrazellulärer ROS anhand der Lucigenin-Methode (siehe 4.7.3), erfolgte mit 2 x 10⁶/ml neutrophilen Granulozyten in CL-Medium (siehe 3.5). Je Ansatz wurden 200 µl Zellsuspension eingesetzt.

Alle Experimente zur Detektion und Analyse von NETs wurden im NET-Medium durchgeführt. Hierfür wurden die neutrophilen Granulozyten auf eine Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt. Die Induzierung des oxidativen *burst* und der NETs erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit 20 nM Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA). Alle in dieser Arbeit genannten Konzentrationen entsprechen den finalen Endkonzentrationen. Sofern von den in diesem Abschnitt genannten Versuchsbedingungen abgewichen wurde, wird darauf hingewiesen.

4.3 Inhibitoren der ROS-bildenden Enzyme und der mitochondrialen Atmungskette

In dieser Arbeit wurden verschiedene Inhibitoren verwendet, um den oxidativen *burst* aktivierter neutrophiler Granulozyten näher zu untersuchen. Die eingesetzten Inhibitoren hemmen die ROS produzierenden Enzyme NADPH-Oxidase, Superoxiddismutase (SOD), Myeloperoxidase (MPO) und die mitochondriale Atmungskette. Diphenyleniodiniumchlorid (20 μM , DPI) hemmt neben der NADPH-Oxidase auch Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Inhibitoren der SOD waren Diethyldithiocarbaminsäure (10 μM , DETC) und Aroclor 1242 (38 μM , Aroclor). Als Inhibitoren der MPO wurden Dipyronehydrat (200 μM , Dipyrone) oder 4-Dimethylaminoantipyrin (200 μM , Aminopyrin) verwendet. Der Elektronentransport der mitochondrialen Atmungskette wurde durch Hemmung von Komplex I mit Rotenon (10 μM) gestört. Mit den Entkopplungsreagenzien 2,4-Dinitrophenol (10 μM , Dinitrophenol) und Carbonylcyanid p-[trifluoromethoxy]-phenyl-hydrazon (500 nM, FCCP) wurde das durch die Bildung von ATP entstandene Membranpotential der Mitochondrien abgebaut. Um den Protonengradienten wieder aufzubauen, läuft die Elektronentransportkette verstärkt ab. Dadurch wird der Stoffwechsel und Sauerstoffverbrauch erhöht und die Bildung der ROS reduziert.

Frisch isolierte neutrophile Granulozyten wurden in den jeweiligen Experimenten für 30 min mit den Inhibitoren im Brutschrank vorinkubiert, bevor die PMA-Stimulation zur Induzierung der ROS bzw. NETs erfolgte. Als Kontrollen wurden nicht stimulierte neutrophile Granulozyten mit und ohne Inhibitoren sowie die Lösungsmittelkontrollen DMSO (0,01 %) und Methanol (1 %) mitgeführt. Die Bestimmung des Einflusses der verwendeten Inhibitoren auf die Apoptose, Nekrose und Zellvitalität der neutrophilen Granulozyten und die Detektion intrazellulärer ROS durch die DHR 123-Methode (siehe 4.7.1, 4.6.1) wurde mit im RPMI-Komplettmedium eingestellten neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Die

Induzierung der ROS-Produktion zur Detektion mittels der DHR 123-Methode erfolgte mit 4 μ M PMA.

4.4 Antioxidantien

Antioxidantien sind Radikalfänger reaktiver Sauerstoffspezies. Sie wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet, um ihren Einfluss auf die ROS-Produktion und NET-Freisetzung in PMA stimulierten neutrophilen Granulozyten zu untersuchen. In allen Experimenten wurden die frisch isolierten neutrophilen Granulozyten für 30 min mit den Antioxidantien im Brutschrank vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit PMA. Es wurden die Antioxidantien L-Ascorbinsäure (0,2 - 2 mM, Ascorbinsäure), ($\pm$)- α -Tocopherol (50 μ M, Tocopherol) und die zu der Klasse der Flavonoide gehörenden Substanzen (-)-Epicatechin (4 - 100 μ M, Epicatechin), (+)-Catechinhydrat (4 - 100 μ M, Catechinhydrat) sowie Rutintrihydrat (0,1 - 150 μ M) verwendet. Pharmakologische Antioxidantien wie Melatonin (10×10^{-9} - 2×10^{-3} M), 5-Aminosalicylsäure (0,25, 0,05 mM, 5-ASA), Acetylsalicylsäure (0,02 - 1 mM, ASS) und N-Acetylcystein (0,01 - 10 mM, NAC) wurden ebenfalls eingesetzt. Als Kontrollen wurden nicht stimulierte und stimulierte neutrophile Granulozyten, vorinkubiert mit oder ohne Antioxidans mitgeführt. Harnstoff (1 mM) hat selbst keinen Einfluss auf die ROS-Bildung und diente als Kontrolle. DMSO (1:667) und Ethanol (EtOH, 1:4400, 1:76) wurden als Lösungsmittelkontrollen für Epicatechin, Catechinhydrat, Rutintrihydrat, ASS sowie Tocopherol und Melatonin mitgeführt. Alle Antioxidantien wurden am Tag des Experimentes frisch hergestellt und steril filtriert. Alle Versuche wurden unter sterilen Bedingungen und ohne Licht durchgeführt. Die Experimente mit den Antioxidantien Ascorbinsäure, Tocopherol, 5-ASA und Harnstoff wurden teilweise im Rahmen einer Bachelorarbeit unter meiner Anleitung durchgeführt [75].

4.5 Hypoxie und Nachahmung hypoxieähnlicher Bedingungen mit DMOG

Um den Einfluss von verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen auf die Bildung von ROS und NETs durch neutrophile Granulozyten zu untersuchen, wurden die Experimente unter Hypoxie (2 % O₂) und Normoxie (20 % O₂) sowie in An- bzw. Abwesenheit von Dimethyloxalylglycin (DMOG) bei 20 % O₂ durchgeführt.

4.5.1 Versuche bei 2 % O₂ (Hypoxie) und 20 % O₂ (Normoxie)

Es wurden in allen Experimenten immer Versuche unter Hypoxie und Normoxie durchgeführt. Die Experimente unter Hypoxie erfolgten in der Hypoxie-Kammer bei 2 % O₂,

5 % CO₂ und 37 °C. Die Versuche unter Normoxie wurden im Brutschrank bei 20 % O₂, 5 % CO₂ und 37 °C durchgeführt. Neutrophile Granulozyten und Zellkulturmedium wurden vor dem Start der Experimente für 2 h in der Hypoxie-Kammer vorinkubiert, um sich an die hypoxischen Bedingungen zu adaptieren.

Die Detektion der intrazellulären Produktion reaktiver Sauerstoffspezies nicht stimulierter und stimulierter neutrophiler Granulozyten erfolgte mit Hilfe der DHR 123-Methode (siehe 4.7.1) in CL-Medium. Zur Induzierung der Bildung von ROS wurden verschiedene Stimuli eingesetzt. Hierzu zählten neben PMA (20 nM, 20 µM) auch 125 ng/ml LPS und 1 µM fMLP. Die Kombination von LPS mit fMLP wurde gewählt, da die beiden Substanzen allein nicht ausreichen, um eine starke ROS-Produktion hervorzurufen. Die neutrophilen Granulozyten wurden mit LPS in den entsprechenden Ansätzen 1 h vorinkubiert, wobei eine Vorstimulation der Zellen erfolgte.

Zur Quantifizierung der NET-Bildung wurden je Ansatz 0,5 x 10⁶ neutrophile Granulozyten, eingestellt auf eine Konzentration von 1 x 10⁶/ml in NET-Medium, in 24-well-Zellkulturplatten vorgelegt und für 2 h bei 2 % O₂ bzw. 20 % O₂ im Brutschrank inkubiert. Als Kontrollen wurden nicht stimulierte neutrophile Granulozyten mitgeführt. Nach Stimulation mit 20 nM PMA für 30, 60, 90 und 150 min, wurde die gebildete extrazelluläre DNA mit 2 mM CaCl₂ und 0,5 U/ml MNase für 10 min gespalten. Durch Zugabe von 10 mM EDTA, welches die für die MNase Aktivität erforderlichen Ca²⁺ Ionen chelatierte, wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Proben nach starkem Durchmischen in kleine Reaktionsgefäße überführt und bei 425 x g für 5 min zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene, fragmentierte NET-DNA wurde bis zur Messung bei 4 °C gelagert. Die DNA Quantifizierung (siehe 4.9) erfolgte durch Fluoreszenzmessung mit dem DNA Farbstoff QuantIt-Picogreen (Anregung: 485 nm, Emission: 535 nm) am Tecan Plattenreader. Dazu wurden die Proben der NET Überstände und die genomische DNA 1:2,5 in 1 x TE Puffer verdünnt und mit der Picogreen Lösung (1:200 in 1 x TE Puffer) 1:5 – 1:10 versetzt. Aus der detektierten Fluoreszenz der genomischen DNA (100 %) wurde der Anteil der gebildeten NET DNA prozentual berechnet.

Um zu zeigen, dass die in der Hypoxie-Kammer durchgeführten Versuche tatsächlich unter hypoxischen Bedingungen stattfanden, musste der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF)-1α als Marker für Hypoxie mittels Western Blot (siehe 4.11) nachgewiesen werden. Da bisher in dieser Arbeitsgruppe HIF-1α in neutrophilen Granulozyten noch nicht im Western Blot detektiert werden konnte, wurde zunächst eine Positivkontrolle vorbereitet. Hierfür dienten

unter Hypoxie inkubierte HEp-2 Zellen, kultiviert aus der epidermoiden Larynxkarzinom-Zelllinie (Nummer CCL-23, von ATCC, Manassas, USA). Dazu wurden je 250 000 HEp-2 Zellen in HEp-2 Kulturmedium (siehe 3.2) in 6-well-Zellkulturplatten über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zusammen mit Medium für 1 h in der Hypoxie-Kammer an das hypoxische Milieu adaptiert. Parallel dazu wurden Ansätze unter Normoxie mit und ohne DMOG (0,5 mM) zur Nachahmung hypoxischer Bedingungen bei 20 % O₂ im Brutschrank für 1 h inkubiert. Anschließend wurde sowohl unter 2 % O₂ als auch unter 20 % O₂ ein Teil der Ansätze mit 20 nM PMA für 4 h stimuliert. Danach erfolgte die Lyse aller Ansätze sowie die Durchführung des Western Blot zur Detektion des Signals von HIF-1 α (siehe 4.11). Die unter Hypoxie gewonnenen, nicht stimulierten Lysate der HEp-2 Zellen wurden in der folgenden Studie zur Untersuchung des Einflusses der Sauerstoffkonzentration auf die Funktionen neutrophiler Granulozyten als Positivkontrolle für das HIF-1 α -Signal verwendet.

4.5.2 Nachahmung hypoxieähnlicher Bedingungen mit DMOG

In allen Experimenten wurden die frisch isolierten neutrophilen Granulozyten mit DMOG (0,5 mM und 1 mM) für 1 h im Brutschrank inkubiert. Dies diente der Adaption der neutrophilen Granulozyten an die durch DMOG induzierten hypoxieähnlichen Bedingungen. Es wurden immer Experimente parallel unter Normoxie mit und ohne DMOG durchgeführt, wobei die Ansätze ohne DMOG während der Inkubationszeit ebenfalls im Brutschrank belassen wurden. Es wurden Kontrollansätze mit DMSO mitgeführt, da DMOG in DMSO gelöst wurde. Teile dieser Studie wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit mit meiner Unterweisung durchgeführt [76].

Mittels der DHR 123-Methode (siehe 2.7.1) wurde die intrazelluläre ROS-Produktion im NET-Medium gemessen. Als Ansätze wurden stimulierte und nicht stimulierte Neutrophile, vorinkubiert mit oder ohne 0,5 mM DMOG, verwendet. Die Induzierung der ROS-Produktion erfolgte mit PMA (20 nM, 20 μ M) und LPS (125 ng/ml) mit fMLP (1 μ M). Bei LPS-Stimulation wurden die neutrophilen Granulozyten mit LPS für 1 h im Brutschrank vorinkubiert und dann mit fMLP stimuliert.

Zur Quantifizierung der NET-Bildung wurden $0,2 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten, eingestellt auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml in NET-Medium, in schwarze 96 Nunclon delta Zellkulturplatten vorgelegt. Als Kontrollen wurden nicht stimulierte und stimulierte neutrophile Granulozyten mit oder ohne DMSO mitgeführt. Die genomische DNA eines Ansatzes wurde isoliert. Nach 1 h Inkubation der neutrophilen Granulozyten mit 0,5 mM

DMOG wurden die Ansätze mit 5 μM SYTOXgreen versetzt und die NET-Bildung durch Zugabe von 20 nM PMA induziert. Der detektierte Fluoreszenzwert der genomischen DNA wurde als 100 % Wert zur Quantifizierung der NET-Bildung nach 30 min, 60 min, 90 min und 150 min herangezogen.

4.6 Durchflusszytometrische Analyse von Zellsuspensionen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, die Eigenschaften einzelner Zellen zu analysieren, sowie verschiedene Zelltypen innerhalb einer Zellpopulation zu definieren. Durch hydrodynamische Fokussierung wird die Zellsuspension in einen Strahl einzelner Zellen bzw. Partikel aufgetrennt (Abbildung 11 a), welche anschließend durch einen Laser, der Licht einer definierten Wellenlänge produziert, angestrahlt werden. Die daraus resultierende Lichtstreuung oder Ausstrahlung (Emission) von Fluoreszenz im Falle fluoreszenzmarkierter Zellen gibt Aufschluss über die Größe und Beschaffenheit der einzelnen Zelle. Das vorwärts gestreute Licht, Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), ist ein Maß für die Größe der Zelle und dient der Unterscheidung zwischen verschiedenen Zelltypen oder zwischen Zelltrümmern und lebenden Zellen.

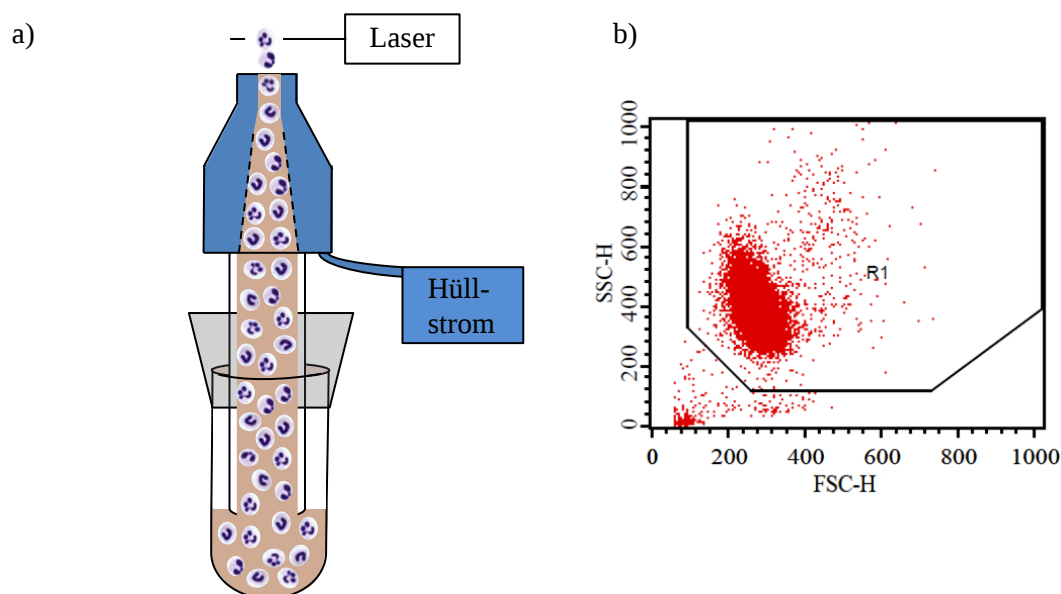


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse neutrophiler Granulozyten

Mittels der Durchflusszytometrie ist die Analyse einzelner Zellen möglich. a) Der um die Zellsuspension geleitete Hüllstrom und die konische Anordnung des Kanals bewirken einen Sogeffekt. Durch diese hydrodynamische Fokussierung wird die Zellsuspension in einzelne Zellen aufgetrennt. Dadurch trifft und analysiert der Laser genau eine Zelle. b) Repräsentatives, Punktdiagramm neutrophiler Granulozyten in dem der FSC gegen den SSC aufgetragen ist. Das gelegte Ausschnitt R1 markiert die Population der neutrophilen Granulozyten.

Das seitlich gestreute Licht, Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC), gibt Aufschluss über die Granularität und Komplexität der Zelle. In Abbildung 11 b ist der FSC gegen den SSC aufgetragen, wobei jeder Punkt ein detektiertes Ereignis darstellt. Durch legen eines Ausschnittes (*Gate*) wird die Zellpopulation definiert, welche analysiert werden soll. In Abbildung 11 b ist der Ausschnitt R1 um die Population der neutrophilen Granulozyten gelegt. Alles außerhalb des Ausschnittes stellen, je nach FSC und SSC, andere Zelltypen oder Zellschrott dar. Bei fluoreszenzmarkierten Zellen wird deren Fluorochrom durch das Laserlicht angeregt. Das neben freigewordener Wärme vom Fluorochrom ausgesendete Licht längerer Wellenlänge (Emission) wird elektronisch umgewandelt und mittels Computer gemessen. Die Versuche dieser Arbeit erfolgten durch Anregung der Fluorochrome mit dem Argon-Laser bei 488 nm (blaues Licht) und Messung der Emission in den dem Fluorochrom entsprechenden Fluoreszenzkanälen FL-1 (grünes Licht, 530 ± 15 nm) und FL-2 (gelbes Licht, 585 ± 21 nm). Durch teilweise Überlagerung der Emissionsspektren der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe wurden zu Beginn jeder Messung Einzelfärbungen durchgeführt und gegeneinander kompensiert.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Messung der Zellvitalität der neutrophilen Granulozyten durch Fluoreszenzmarkierung mit Annexin V-FITC und Propidiumiod genutzt. Dies ist möglich, weil die verwendeten Fluorochrome zwar im gleichen Wellenlängenbereich angeregt werden (488 nm, blau), aber in unterschiedlichen Wellenlängen ihr Licht aussenden (Annexin V-FITC: 530 nm, grün, FL-1 und Propidium iodid ab 550 nm, Maximum: 617 nm, gelb, FL-2). Des Weiteren erfolgte die Detektion intrazellulär gebildeter ROS mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Dihydrorhodamin 123 (Anregung: 488 nm, Emission: ~ 550 nm) (siehe 4.6.1 und 4.7.1). Es wurden je Ansatz jeweils 10 000 Ereignisse am Durchflusszytometer BD FACSCalibur mit Hilfe der CellQuest Pro Software eingelesen.

4.6.1 Bestimmung der Apoptose, Nekrose und Zellvitalität

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen zur Modulation der Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten wurden auf ihre Wirkung auf die Apoptose und Vitalität der Zellen getestet. Hierzu wurden die neutrophilen Granulozyten im entsprechenden Medium (siehe 3.2) aufgenommen und auf eine Konzentration von 5×10^6 /ml eingestellt. Je Ansatz wurden $0,5 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in eine transparente 96-well-Flachbodenzellkulturplatte pipettiert und für 4 h bzw. 5 h mit den jeweiligen Substanzen (Inhibitoren, DMOG, Antioxidantien) und über 18 h bzw. 19 h (Inhibitoren,

Antioxidantien) im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurden Versuche mit Stimulation der neutrophilen Granulozyten durch 20 nM PMA für 4 h durchgeführt. Die Reaktion wurde auf Eis abgestoppt und 90 µl je Ansatz in kleine FACS-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Färbung apoptotischer Zellen mittels Annexin V-FITC und nekrotischer Zellen mit Propidiumiodid. Apoptotische neutrophile Granulozyten exponieren an der Außenseite ihrer Membran Phosphatidylserin, an welches Annexin V calciumabhängig bindet. Das nicht membrangängige Propidiumiodid kann aufgrund der defekten Zellmembran nekrotischer neutrophiler Granulozyten diese passieren. Dort lagert sich Propidiumiodid in die DNA ein und färbt diese an [7]. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran kann Propidiumiodid somit nicht durchdringen. Die Färbelösung bestehend aus Annexin V-FITC, Propidiumiodid, Calciumchlorid und dem jeweiligen Versuchsmedium (1:1:1:10) wurde für 10 min bei 4 °C lichtgeschützt mit den Zellen im Verhältnis 1:10 inkubiert. Nach Verdünnung der Proben mit dem jeweiligen Versuchsmedium (1:2) erfolgte die sofortige Analyse der eingelesenen Ereignisse. Die jeweiligen Fluoreszenzen wurden im Kanal FL-1 bzw. FL-2 gemessen (siehe 4.6). Es wurden Ansätze mit neutrophilen Granulozyten im jeweiligen Medium ohne Substanz (Inhibitor, DMOG, Antioxidans) als Kontrollen mitgeführt. Einige Substanzen wurden anstelle von PBS in den Lösungsmitteln DMSO, Methanol oder EtOH gelöst (siehe 4.3 - 4.4). Für diese wurde eine zusätzliche Lösungsmittelkontrolle durchgeführt.

4.7 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden nach der Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch PMA oder die Kombination von LPS mit fMLP intra- und extrazellulär gebildet. Intrazellulär gebildete ROS können aus der Zelle heraus diffundieren. Um intra- und extrazelluläre ROS unterscheiden zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit vier verschiedene Methoden zur Detektion der ROS *in vitro* etabliert. Intrazellulär gebildete ROS (hauptsächlich H₂O₂) wurden mittels Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) gemessen. Extrazelluläre ROS (vor allem Superoxidationradikale) wurden durch die Cytochrom C- und Lucigenin-Methode detektiert. Des Weiteren wurden die Phenolrot- und Luminol-Methode zur Detektion intra- und extrazellulärer ROS (speziell H₂O₂) etabliert und angewendet. Die einzelnen Methoden werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

4.7.1 Messung der intrazellulären ROS

DHR 123-Methode

Dihydrorhodamin 123 diffundiert in die Zellen und wird dort durch ROS zum grün fluoreszierenden Rhodamin 123 oxidiert. Mittels Durchflusszytometrie können hiermit intrazellulär gebildete ROS, speziell H_2O_2 , gemessen werden. Des Weiteren ermöglicht diese Methode die Detektion der ROS-Produktion individueller Zellen. Die Fluoreszenz des oxidierten Rhodamin 123 wurde im Fluoreszenzkanal FL-1 eingelesen.

Für die Versuche wurden die frisch isolierten neutrophilen Granulozyten auf eine Konzentration von $5 \times 10^6/\text{ml}$ im entsprechenden Medium (siehe 4.2) eingestellt. Je Ansatz wurden $0,5 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 96-*well*-Flachbodenzellkulturplatten vorgelegt und entsprechend der Versuchsbedingung (siehe 4.3 und 4.5.) für 30 min bis 120 min im Brutschrank inkubiert. Mit LPS (125 ng/ml) vorstimulierte neutrophile Granulozyten wurden 60 min im Brutschrank vorinkubiert (siehe 4.5). Nach anschließender Färbung mit 2 μM DHR 123 wurden die Zellen mit PMA (20 nM, 4 μM , 20 μM) bzw. fMLP (1 μM) für 5 min bzw. 30 min bei 37 °C im Brutschrank stimuliert (siehe 4.3 und 4.5). Daraufhin wurde die Reaktion auf Eis abgestoppt und die Fluoreszenzintensität von 10 000 Zellen sofort durchflusszytometrisch mittels des FACS Calibur und der CellQuest Pro Software analysiert. Die Detektion der Fluoreszenz des Rhodamin 123 erfolgte im Fluoreszenzkanal FL-1, da das gebildete Fluorophor Licht der Wellenlänge 536 nm emittiert.

4.7.2 Nachweis der intra- und extrazellulären ROS

Phenolrot-Methode

Diese Methode dient der Detektion von intra- und extrazellulären ROS, wobei hierbei Wasserstoffperoxid (H_2O_2) detektiert wird. Es wird das Enzym Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) als Substrat für H_2O_2 genutzt, welches das Enzym oxidiert. Durch eine Redoxreaktion wird anschließend Phenolrot als Wasserstoffgeber durch das Enzym oxidiert, wobei dieses wieder mittels Reduktion regeneriert wird [77]. Das oxidierte Phenolrot führt zu einer erhöhten Absorption bei 610 nm. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 N Natriumhydroxid gestoppt. Die Messung stellt eine Endpunktmessung dar, da das zugesetzte Natriumhydroxid toxisch für die neutrophilen Granulozyten ist. Zur Etablierung der Methode wurden angelehnt an Pick *et al.* [77] verschiedene Konzentrationen der Zellzahl, von Phenolrot und dem Enzym Meerrettichperoxidase getestet. Die isolierten neutrophilen Granulozyten wurden in PBS aufgenommen, welches 10 mM Glucose, 1,5 mM

Magnesiumchlorid und 1 mM Calciumchlorid enthält. Die besten Ergebnisse zur Detektion von ROS wurden mit einer Zellzahl von $5 \times 10^6/\text{ml}$ neutrophilen Granulozyten, sowie 1 U/ml HRP und 0,28 mM Phenolrot erzielt. Die 200 μl Ansätze wurden in einer transparenten 96-well-Flachbodenzellkulturplatte vorgelegt und mit 20 μM PMA stimuliert. Nach 20 min Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit 1 N Natriumhydroxid abgestoppt. Die Zusammenfassung aus 3 Versuchen ist in Abbildung 12 dargestellt.

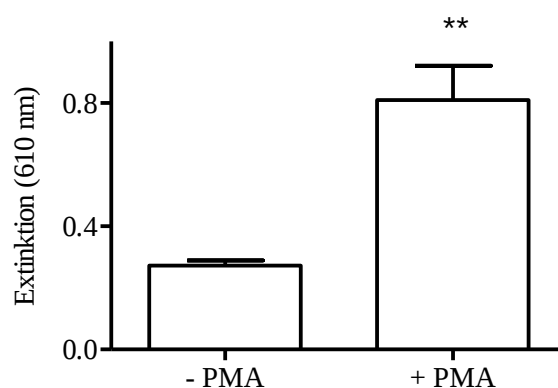


Abbildung 12: Detektion von ROS mit der Phenolrot-Methode in stimulierten neutrophilen Granulozyten

Intra- und extrazelluläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies neutrophiler Granulozyten, detektiert durch die Phenolrot-Methode. Frisch isolierte neutrophile Granulozyten wurden mit Phenolrot (0,28 mM) und HRP (1 U/ml) für 20 min mit PMA (20 μM) stimuliert und bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 1 N Natriumhydroxid abgestoppt und die Absorption bei 610 nm gemessen. Es sind die Daten von drei unabhängigen Experimenten mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. **: $p < 0.01$ verglichen mit den nicht stimulierten Ansätzen.

Die Phenolrot-Methode ist weniger sensitiv im Vergleich zu anderen Detektionsmethoden. Des Weiteren stören andere reduzierende Substanzen, wie z.B. Ascorbinsäure, diese Methode [77, 78]. Daher wurde die Chemilumineszenz-Messung mit Luminol im Labor etabliert, welche nicht nur sensitiver ist, sondern auch die Möglichkeit einer kontinuierlichen Messung der Produktion von ROS bietet.

Luminol-Methode

Luminol reagiert spezifisch mit ROS, die durch die Myeloperoxidase produziert werden, wie Hypochlorit (OCl^-), unter Emission von bläulichem Licht (Chemilumineszenz) [79]. Nach Stimulation degranulieren neutrophile Granulozyten und setzen MPO aus den azurophilen Granula frei. Da Luminol die Zellmembran durchdringen kann, sind sowohl intra- als auch extrazelluläre ROS anhand der Chemilumineszenz-Messung mit Luminol messbar. In allen Versuchen wurden die neutrophilen Granulozyten auf eine Konzentration von $2 \times 10^6/\text{ml}$ in CL-Medium (siehe 3.1) eingestellt. Danach wurden $0,4 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in

weiße 96-Nunclon Delta *Microwell*-Platten vorgelegt und mit oder ohne Inhibitoren bzw. Antioxidantien (siehe 4.2-4.4) für 30 min bei 37 °C im Brutschrank (5 % CO₂, 20 % O₂) vorinkubiert. Daraufhin wurden die Ansätze mit 0,06 mM Luminol versetzt und mit 20 nM PMA stimuliert. Die sofort einsetzende ROS-Produktion, sichtbar am Anstieg der Chemilumineszenz von Luminol, wurde kontinuierlich über 1 h bei 37 °C mittels des Infinite M200 PRO Plattenreaders und der Tecan i-control Software gemessen. Proben ohne PMA-Stimulation (Medium) mit den entsprechenden Inhibitoren bzw. Antioxidantien dienten als Kontrollen. Einige Substanzen wurden anstelle von PBS in den Lösungsmitteln DMSO, Methanol oder EtOH gelöst (siehe 4.3 - 4.4). Für diese wurde eine zusätzliche Lösungsmittelkontrolle durchgeführt.

4.7.3 Detektion der extrazellulären ROS

Cytochrom C-Methode

Anhand dieser Methode können extrazellulär vorliegende ROS detektiert werden [80]. Besonders sensitiv ist die Reduktion von Cytochrom C durch Superoxidanionradikale (O₂^{•-}).

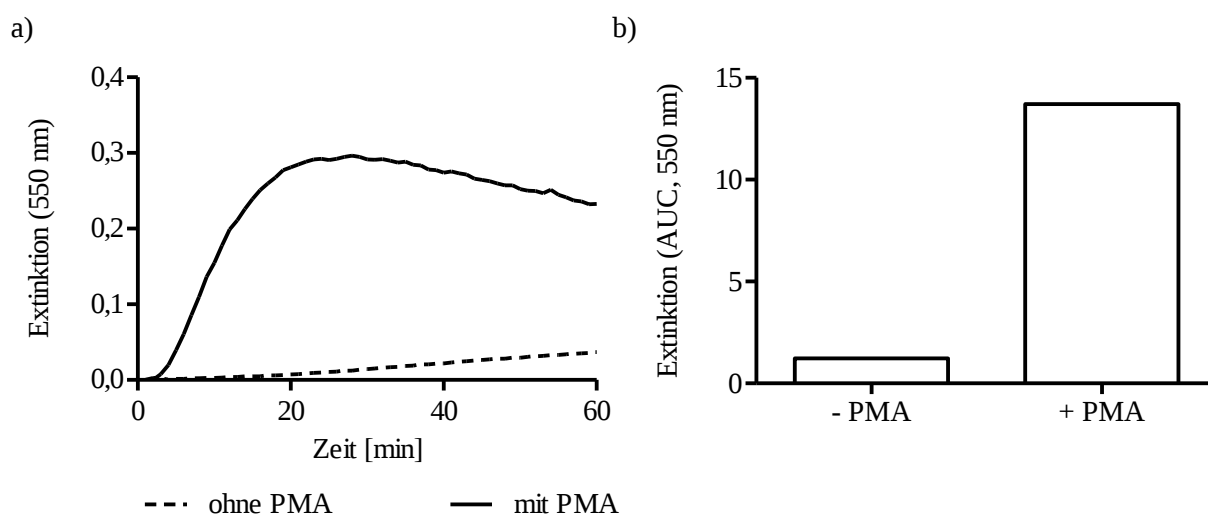


Abbildung 13: Messung extrazellulärer ROS stimulierter neutrophiler Granulozyten mit der Cytochrom C-Methode

Detektion extrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies von neutrophilen Granulozyten, detektiert durch die Cytochrom C-Methode. Neutrophile Granulozyten ($2 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit Cytochrom C (0,1 mM) versetzt und anschließend die ROS-Produktion mit PMA (10 μM) bei 37 °C induziert. (a) Freisetzung von O₂^{•-}, detektiert durch den Extinktionsanstieg von Cytochrom C bei 550 nm. Der Anfangswert wurde von den darauffolgenden abgezogen. (b) Quantifizierung der O₂^{•-}-Freisetzung durch Berechnung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

Der neu entstandene Peak des reduzierten Cytochrom C ist bei einer Wellenlänge von 550 nm messbar (siehe Abbildung 13). Optimale Bedingungen wurden mit 2×10^6 /ml neutrophile Granulozyten in CL-Medium, 0,1 mM Cytochrom C und einer Stimulation mit 10 μ M PMA erzielt. Die Absorptionsänderung über die Zeit wurde über 1 h bei 37 °C jede Minute in einer transparenten 96-well-Flachbodenzellkulturplatte gemessen. Ein beispielhaftes Experiment ist in Abbildung 13 dargestellt. Es ist die $O_2^{\bullet-}$ -Freisetzung, sichtbar durch den Extinktionsanstieg bei 550 nm, dargestellt. Des Weiteren wurde die Fläche unter der jeweiligen Kurve entsprechend der Ansätze berechnet. Die Absorptionsänderung an reduziertem Cytochrom C bei 550 nm ist wenig sensitiv für die Detektion kleinster Mengen an $O_2^{\bullet-}$ [78]. Deshalb wurde eine weitere Methode, die Chemilumineszenz-Messung mit Lucigenin, durchgeführt.

Lucigenin-Methode

Lucigenin wird spezifisch durch Superoxidanionradikale oxidiert, wobei ähnlich wie bei der Luminol-Methode (siehe Abschnitt Luminol-Methode), Energie in Form von Licht freigesetzt wird (Chemilumineszenz). Myeloperoxidase spezifische ROS (z.B. OCl^-) werden nicht durch Lucigenin reduziert [79, 81]. Aufgrund der Molekülgröße von Lucigenin kann es nicht die Zellmembran der neutrophilen Granulozyten durchdringen [82] und somit auch nicht intrazelluläre ROS detektieren. Daher wurde diese Methode zur Messung von extrazellulären ROS (Superoxidanionradikale, $O_2^{\bullet-}$) gewählt. Die neutrophilen Granulozyten wurden, wie bereits in Abschnitt Luminol-Methode (siehe 4.7.2) beschrieben, behandelt. Anstelle von 0,06 mM Luminol wurden jedoch 0,2 mM Lucigenin zugesetzt.

4.8 Induzierung und Detektion von *neutrophil extracellular traps*

Der nicht zellpermeable DNA-Farbstoff SYTOXgreen wurde zur kinetischen Analyse der NET-Bildung verwendet. SYTOXgreen bindet an die extrazellulär freigesetzte DNA während der Bildung von NETs und kann nicht in lebende Zellen eindringen. Die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes SYTOXgreen an die Nukleinsäuren der extrazellulären DNA führt zu einer 500-fach erhöhten Fluoreszenzemission. Je Ansatz wurden 2×10^5 neutrophile Granulozyten, eingestellt auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml in NET-Medium, in schwarze 96 Nunclon delta Zellkulturplatten vorgelegt und je nach Fragestellung mit oder ohne Substanzen im Brutschrank inkubiert. Nach der Zugabe von 5 μ M SYTOXgreen erfolgte die Stimulation der Ansätze mit 20 nM PMA. Die Fluoreszenz des NET-gebundenen SYTOXgreen-Farbstoffes (Anregung: 488 nm, Emission: 510 nm) wurde über 4-5 h alle 5 min bei 37 °C am infinite M200 PRO Plattenreader mit der Tecan i-control 1.8 Software gemessen. Neutrophile Granulozyten allein (Medium) und die Lösungsmittelkontrollen der

jeweiligen Substanzen (DMSO, EtOH, EtOH:PBS, siehe 4.3 - 4.4) wurden als Kontrollen mitgeführt.

4.9 Quantifizierung von NET-DNA

In der Studie zu Hypoxie und Nachahmung hypoxischer Bedingungen durch DMOG (siehe 4.5) wurden aus technischen Gründen Endzeitmessungen statt kinetischer Analysen durchgeführt. Die gebildete NET-DNA der einzelnen Ansätze und die gesamte genomische DNA eines Ansatzes wurden gewonnen. Durch Berechnung der prozentualen-NET-DNA von der gesamten genomischen DNA wurde die gebildete NET-DNA quantifiziert. Die einzelnen Versuchsansätze wurden bereits in den Abschnitten 4.5.1 und 4.5.2 beschrieben.

Zur prozentualen Berechnung der gebildeten NET-DNA wurde die gesamte genomische DNA in einer Doppelbestimmung isoliert. Hierfür wurden $0,5 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten für 5 min bei $425 \times g$ abzentrifugiert und das Zellpellet mit 500 µl DNAzol und 20 µl Polyacryl Carrier zur Lyse der Zellen resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl 100 % EtOH präzipitierte die DNA und wurde bei $5000 \times g$ für 5 min pelletiert. Anschließend wurde das Pellet zweimal in 75 % EtOH gewaschen und für 1 min bei $1000 \times g$ erneut zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Pellet im gleichen Volumen 1 x TE-Puffer (1:20 in nukleasefreiem Wasser aus 20 x TE-Puffer) aufgenommen, welches für den Versuch mit den neutrophilen Granulozyten verwendet wurde.

Die DNA-Quantifizierung erfolgte je nach Versuchsbedingung durch Fluoreszenzmessung der DNA-Farbstoffe Quant-it™ Picogreen oder SYTOXgreen am infinite M200 PRO Plattenreader mit der Tecan i-control 1.8 (siehe 4.5). Aus der detektierten Fluoreszenz der genomischen DNA (100 %) wurde der Anteil der gebildeten NET-DNA prozentual berechnet.

4.10 Mikroskopische Analyse der NETs

Zur Visualisierung der NETs wurden fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopische Präparate angefertigt. Zum Nachweis der NETs wurden die NET-spezifischen Granulaproteine MPO und neutrophile Elastase immunhistochemisch und die DNA mit SYTOXgreen angefärbt.

4.10.1 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Detektion der NETs unter dem Einfluss von DMOG, Hypoxie, Normoxie und Inhibitoren wurden 5×10^5 neutrophile Granulozyten, welche auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml in NET-Medium eingestellt wurden, mit den entsprechenden Substanzen (Medium oder DMOG)

auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen in einer 24-well-Suspensionszellkulturplatte gegeben und für 30 - 60 min im Brutschrank sedimentiert. Die NET-Bildung wurde durch 20 nM PMA für 150 min induziert. Proben ohne PMA (nicht stimuliert, Medium) dienten als Kontrolle. Nach Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd (10 min, Raumtemperatur), wurde der Überstand verworfen und die luftgetrockneten Deckgläschen mit PBS rehydriert. Nach 30 minütiger Färbung mit 100 nM SYTOXgreen (im Dunkeln, Raumtemperatur) wurden die Ansätze mit nukleasefreiem Wasser gewaschen (3 x). Abschließend wurden die Proben mit Pro-Long Gold antifade Reagent eingedeckt und unter dem Axioskop 40-Fluoreszenzmikroskop mit der Axio Vision Rel. 4.8-Software betrachtet und ausgewertet.

Zur Detektion der gebildeten NETs in Anwesenheit von Antioxidantien wurden 3×10^5 neutrophile Granulozyten, eingestellt auf eine Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in NET-Medium, auf einer 96-well μ -Zellkulturplatte ausgesät und für 30 min mit Antioxidantien oder Medium/Lösungsmittelkontrolle im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 100 nM SYTOXgreen gefärbt und die NET-Bildung mit 10 nM PMA über 3 h (im Brutschrank) induziert. Proben ohne PMA dienten als Kontrolle. Danach wurden die Ansätze für 10 min mit 4 % Paraformaldehyd fixiert (bei Raumtemperatur), der Überstand abgenommen und mit nukleasefreiem Wasser gewaschen. Zuletzt wurden die mit Ibidi Eindeckmedium fixierten Proben mit dem Fluoreszenzmikroskop BZ9000E unter Nutzung der BZ II Analyser Software ausgewertet.

4.10.2 Immunhistochemie

Die neutrophilen Granulozyten wurden auf eine Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in NET-Medium eingestellt. Es wurden 5×10^5 neutrophile Granulozyten auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen oder 3×10^5 neutrophile Granulozyten auf 8-well μ -Slides vorgelegt. Die jeweiligen Versuche erfolgten bis zur Abnahme des Überstandes von den fixierten Proben wie bereits im oberen Abschnitt beschrieben. Alle Proben wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen.

Zur Färbung der neutrophilen Elastase wurden die Proben über Nacht mit einer PBS-Lösung, versetzt mit 10 % normalem Ziegenerum, 5 % Gelatine aus der Haut von Kaltwasserfischen und 0,05 % Tween 20, blockiert. Anschließend wurden die Ansätze mit PBS gewaschen und mit dem polyklonalen Primärantikörper Anti-Human-Neutrophil-Elastase aus dem Kaninchen (1:200 in PBS mit 0,5 % Rinderserumalbumin) für 1 h im Brutschrank inkubiert. Nach dreifachem Waschen mit PBS wurde der Primärantikörper durch den Sekundärantikörper Cy3-AffiniPure anti-Kaninchen IgG aus der Ziege (1:100 in PBS mit 0,5 %

Rinderserumalbumin) für 1 h im Brutschrank detektiert. Nach dreifachem Waschen der Ansätze mit PBS wurde zum Schluss die DNA mit 100 nM SYTOXgreen gefärbt.

Zur Färbung der Myeloperoxidase wurden die Ansätze mit 0,5 % Triton-X für 1 min permeabilisiert und anschließend mit PBS dreimal gewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden durch eine Blockierungslösung aus normalem Ziegen serum in PBS (1:20) 30 min im Brutschrank geblockt. Anschließend wurde erneut mit PBS dreimal gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-human Myeloperoxidase aus der Maus (1:500 in Blockierungslösung) und nach dreimaligem Waschen mit PBS die Detektion mit dem Sekundärantikörper CyTM3 konjugierte-AffiniPure-F(ab')₂-Fragmente Anti-Maus IgG (H+L) aus der Ziege (1:500 in Blockierungslösung) jeweils für 1 h im Brutschrank. Die weitere Färbung der DNA mit SYTOXgreen wurde wie im vorherigen Abschnitt beschrieben durchgeführt.

4.10.3 Rasterelektronenmikroskopie

Zur rasterelektronischen Analyse wurden 5×10^5 bzw. 1×10^6 neutrophile Granulozyten, eingestellt auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml in NET-Medium, je Ansatz auf Thermanoxdeckgläschen in 24-well-Suspensionszellkulturplatten sedimentiert. Nach 30 minütiger Inkubation mit Inhibitoren oder Antioxidantien und den Kontrollen Medium, DMSO und EtOH wurde die NET-Bildung durch 20 nM PMA induziert. Nach 4 h Inkubation im Brutschrank wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Präparate mit 1 ml Monti-Graziadei-Lösung (2 % Glutaraldehyd, 0,6 % Paraformaldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,2) für 2 Tage bei 4 °C fixiert. Die weitere Verarbeitung der Proben für die Rasterelektronenmikroskopie erfolgte im Institut der Anatomie der Universität zu Lübeck in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. M. Klinger. Hierbei wurden die Ansätze in einer ansteigenden Alkoholreihe (je 15 min in 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100 %) dehydriert. Nach der kritischen Punkt-Trocknung zur Entfernung restlicher Flüssigkeit aus den Präparaten wurden die Proben schließlich auf Aluminiumdeckgläschen gegeben und mit Gold oder Platin besprüht. Die Analyse der Proben erfolgte mit dem SEM 505 Rasterelektronenmikroskop.

4.11 Nachweis von HIF-1 α im Western Blot

Die Western Blot-Technik dient dem Nachweis eines spezifischen Proteins innerhalb eines durch Zelllyse gewonnenen Proteingemisches. In dieser Arbeit wurde sie zum Nachweis von HIF-1 α angewendet. Dessen Stabilisierung erfolgt nur unter hypoxischen Bedingungen und

belegt bei positivem Nachweis des Signales vorherrschende Hypoxie in den durchgeführten Experimenten in der Hypoxie-Kammer oder in Anwesenheit von DMOG (siehe 4.5).

Die Zellen werden zunächst nach dem Ende des Versuches zur Lösung und Freisetzung der zellulären Proteine lysiert. Danach erfolgt die Separierung der Proteine mittels Gelelektrophorese mit anschließender Übertragung der Proteine auf eine Membran. Abschließend wird das Zielprotein durch spezifische Antikörper detektiert.

4.11.1 Versuchsdurchführung und Zelllyse

Die isolierten neutrophilen Granulozyten wurden auf $5 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt und jeweils 1 ml je Ansatz in 24-well- Suspensionszellkulturplatten vorgelegt. Je nach Versuchsaufbau wurden die Proben mit und ohne DMOG vorinkubiert und mit 20 nM PMA oder 100 ng/ml LPS für 3 h bzw. 4 h stimuliert (siehe 4.5). Die Probenvorbereitung der Positivkontrolle mit HEp-2 Zellen sowie die experimentellen Bedingungen der Versuche, welche unter Hypoxie, Normoxie, DMOG stattfanden, wurden bereits in Abschnitt 4.5.1 beschrieben.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze gut resuspendiert und für 5 min bei $800 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl kaltem PBS gelöst, sowie für 5 min bei $800 \times g$ gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen mit 500 µl 10 % iger eiskalter Trichloressigsäure für 5 min auf Eis. Die nächsten Schritte erfolgten auch bei Versuchen, welche in der Hypoxie-Kammer durchgeführt wurden, bei Raumtemperatur und atmosphärischem O_2 - und CO_2 -Gehalt. Der nach der Lyse gewonnene Proteincocktail wurde für 5 min bei $14000 \times g$ und 4°C zentrifugiert und das entstandene Pellet mit 500 µl Aceton gewaschen (5 min, $14000 \times g$, 4°C). Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Danach wurden die Proteine mit 100 µl Probenpuffer (siehe 3.2) resuspendiert und für 7 min bei 100°C denaturiert. Nach Entfernung möglicher Zellreste durch Zentrifugation (5 min, $15800 \times g$) wurden die erhaltenen Überstände der gelösten Proteine bei -20°C bis zur weiteren Benutzung aufbewahrt.

4.11.2 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Durch das im Probenpuffer enthaltene SDS (Natriumdodecylsulfat) wurden die Proteine denaturiert und negativ geladen. Hierdurch wandern sie im elektrischen Feld durch das Gelgeflecht zur positiven Kathode und werden entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Kleinere Proteine wandern dabei schneller durch das Gelgeflecht als größere.

Das 10 % ige Trenngel wurde in die Gelkammer pipettiert und für 15 min auspolymerisiert. Das anschließend darüber geschichtete 5 % ige Sammelgel wurde ebenfalls für 15 min auspolymerisiert. Dieses hergestellte SDS-Gel wurde in die mit 1 x Laufpuffer gefüllte Laufkammer eingesetzt und durch Auftragen von je 20 µl der Proben in die Geltaschen beladen. Die Proben wurden hierfür vorher 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Um später die Größe der detektierten Proteine bestimmen zu können, wurden 10 µl eines Proteinmarkers auf das Gel aufgetragen (10 - 250 kDa). Bei einer Spannung von 75 V wanderten die Proteine für 15 min vom Sammelgel zum Trenngel, in welchem dann bei 125 V über 1,5 h die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe stattfand. Nachdem die vordere Laufront das Gel verlassen hatte, wurde es aus der Apparatur entnommen und zusammen mit der Membran und dem Filterpapier für 20 min für das spätere Übertragen der Proteine vom Gel auf die Membran in eiskaltem Transferpuffer eingeweicht.

4.11.3 Blotting

Die aufgetrennten Proteine wurden durch eine senkrecht zum Gel angelegte elektrische Spannung vom SDS-Gel zur stabileren Nitrocellulose-Membran übertragen. Dieser Schritt diente zur späteren Detektion der Proteine mit spezifischen Antikörpern.

In die Blottingkammer wurde unter Beachtung der korrekten Polarität ein Sandwich in der Reihenfolge Filterpapier, Nitrocellulose-Membran, Gel, Filterpapier geschichtet und mit Transferpuffer feucht gehalten. Das Feucht-Blotten zur Proteinübertragung erfolgte anschließend bei 25 V, 145 mA für 100 min. Danach wurde die Membran (Blot) zweimal mit T-TBS gewaschen und der Transfer der Proteine auf die Membran wurde mittels Ponceau Rot, welches unspezifisch Proteine färbt, überprüft. Die Färbung wurde im Anschluss daran mit T-TBS ausgewaschen.

4.11.4 Immunodetektion

Nach dem Blotting wurde das Zielprotein durch Markierung mit spezifischen Antikörpern detektiert. Hierfür wurden zuerst die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit Blockierungslösung für 1 h blockiert. Danach wurde die Membran mit dem Primärantikörper gegen humanes HIF-1α aus der Maus über Nacht bei 4 °C im ständigen Kontakt mit der Antikörperlösung (1:500 in Blockierungslösung) inkubiert. Nach mehrfachem Waschen mit T-TBS für 15 min erfolgte die Färbung mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper anti-Maus IgG (1:4000 in Blockierungslösung) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem mehrfachem Waschen in T-TBS erfolgte die Detektion des HIF-1α Signales am Western Blot Imager mit der FUSION-Software. Hierfür wurde der Blot mit einem

Detektionslösungsgemisch aus Wasserstoffperoxid-Lösung und Luminol-Reagenz (ImmobilonTM Western) entsprechend der Angaben des Herstellers versetzt. Die entstehende Lumineszenz, hervorgerufen durch die HRP katalysierte Oxidation des Luminols durch H₂O₂, ist der Beleg für das Vorhandensein des nachzuweisenden Proteins HIF-1 α . Die gleichmäßige Proteinbeladung wurde anschließend durch die Detektion der β -Aktin Bande nach dem eben beschriebenen Prinzip überprüft. Hierfür wurden der Primärantikörper gegen β -Aktin aus dem Kaninchen (1:2000 in Blockingpuffer) und der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper anti-Kaninchen IgG (1:4000 in Blockingpuffer) verwendet.

4.12 Statistische Auswertung

Die Experimente zur Bestimmung der ROS- und NET-Freisetzung mittels des Tecan-Plattenreaders wurden durch Berechnung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) jeder Probe ausgewertet. Diese AUCs wurden in Form von Balkendiagrammen dargestellt (siehe Abbildung 13). Die statistische Analyse der Daten wurde mit der Software GraphPad Prism 5 unter Nutzung des Einweg Anova (Analyse der Varianz) mit dem Bonferroni posttest durchgeführt. Aufgrund von spenderabhängigen Unterschieden wurde ein Teil der Experimente auf die unbehandelten, stimulierten neutrophilen Granulozyten normalisiert. Zur Bestimmung der Signifikanz wurden in der Studie zum Einfluss der Antioxidantien auf die ROS- und NET-Bildung neutrophiler Granulozyten stimulierte neutrophilen Granulozyten als Vergleichswert herangezogen. Wurde das untersuchte Antioxidans in DMSO oder EtOH gelöst, dienten die mit dem jeweiligen Lösungsmittel inkubierten stimulierten neutrophilen Granulozyten als Referenzwert.

5 Ergebnisse

5.1 Wirkung von ROS auf die Bildung von NETs

5.1.1 Einfluss von Inhibitoren auf die Apoptose und Zellvitalität von neutrophilen Granulozyten

NET-Medium

Es wurde beschrieben, dass NETs nur bei geringen Serumkonzentrationen gebildet werden. Weiterhin werden NETs vom im RPMI-Komplettmedium zugesetzten fetalen Kälberserum (FCS) abgebaut [83]. Vorversuche in der Arbeitsgruppe bestätigten, dass Konzentrationen über 5 % FCS die Bildung der NETs unterbinden. Des Weiteren stört das enthaltene Phenolrot die Messung von reaktiven Sauerstoffspezies mit der Luminol- bzw. Lucigenin-Methode. Um eine optimale Bildung der NETs zu ermöglichen, wurde daher ein spezielles NET-Medium verwendet. Als Grundlage für dieses Medium diente speziell angefertigtes, modifiziertes RPMI-Komplettmedium ohne Phenolrot und ohne Hydrogenkarbonat. Optimale Bedingungen zur Bildung von NETs wurden unter Zusatz von HEPES-Puffer (10 mM) und humanen Serumalbumin (0,5 %) zum NET-Medium erreicht. Es wurde humanes Serumalbumin verwendet, da die in dieser Arbeit durchgeführten Studien mit frisch isolierten humanen neutrophilen Granulozyten erfolgten. Alle im Folgenden beschriebenen NET-Studien wurden in diesem NET-Medium durchgeführt. Daher wurde zunächst geklärt, ob dieses einen Einfluss auf die Apoptose und/ oder Vitalität der neutrophilen Granulozyten hat. Als Vergleich diente das für die Zellkultur verwendete RPMI-Komplettmedium. Die auf eine Konzentration von $5 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellten neutrophilen Granulozyten wurden für 4 h im Brutschrank im jeweiligen Medium inkubiert. Ein Teil der Ansätze wurde zusätzlich mit 20 nM PMA stimuliert. Die Bestimmung der Apoptose und Zellvitalität wurde wie im Abschnitt 4.6.1 beschrieben mittels Annexin V-FITC- und Propidiumiodid-Färbung durchgeführt.

Das NET-Medium erhöht weder die Apoptose noch die Nekrose neutrophiler Granulozyten. Nach 4 h wiesen die im NET-Medium inkubierten Zellen eine Nekroserate von 3 % im Vergleich zum RPMI-Komplettmedium mit 0,3 % auf. Der Anteil apoptotischer Zellen betrug 8 % im RPMI-Komplettmedium und 10 % im NET-Medium (Abbildung 14). In den mit PMA stimulierten Proben wurde eine Apoptoseserate von 6 % im NET-Medium bzw. 3 % im RPMI-Komplettmedium festgestellt. Die Nekroseraten unterschieden sich nur geringfügig

(15 % zu 13 %). Alle Unterschiede waren nicht signifikant. Somit eignet sich das NET-Medium zur Kultur von neutrophilen Granulozyten über mehrere Stunden.

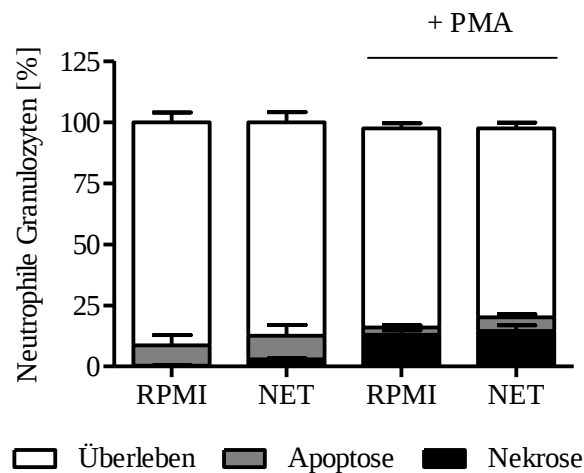


Abbildung 14: Apoptose und Vitalität von neutrophilen Granulozyten im RPMI-Komplettmedium und NET-Medium

Es wurden je Ansatz $0,5 \times 10^6$ nicht stimulierte oder mit 20 nM PMA stimulierte neutrophile Granulozyten in 100 μ l für 4 h in RPMI-Komplett- bzw. NET-Medium (RPMI, NET) im Brutschrank inkubiert. Die Apoptose- und Nekroserate wurden mittels Annexin V-FITC- und Propidiumiodid-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Es sind die Daten der Mittelwerte und die Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Einfluss der Inhibitoren auf die Apoptose und Zellvitalität neutrophiler Granulozyten

Alle in der Studie verwendeten Inhibitoren greifen an verschiedenen Stellen der ROS-Bildung ein. Die gewählten Konzentrationen basierten auf den bereits in anderen Studien verwendeten Konzentrationen [17, 19, 29, 84-86] oder auf eigenen Vorversuchen. Um einen Einfluss der Inhibitoren auf die Apoptose und die Vitalität der neutrophilen Granulozyten auszuschließen, wurden $0,5 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten, eingestellt auf eine Konzentration von 5×10^6 /ml, für 4 h mit oder ohne Inhibitoren bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Annexin V-FITC- und Propidiumiodid-Doppelfärbung durchgeführt (siehe 4.6.1). Als Lösungsmittelkontrollen für Rotenon und Aroclor wurden DMSO und Methanol mitgeführt. Keiner der getesteten Inhibitoren zeigte nach 4 h einen Nekrose- oder Apoptose-induzierenden Effekt (Abbildung 15 a). Auch nach längerer Inkubation (18 h) wurden keine erhöhte Nekrose und Apoptose detektiert (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 15 b wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten von Propidiumiodid (FL-2) gegen Annexin V-FITC einer Probe neutrophiler Granulozyten ohne Inhibitor als Beispiel aufgetragen. Während das nicht membrangängige Propidiumiodid nur die DNA toter neutrophiler Granulozyten anfärben kann, bindet Annexin V-FITC calciumabhängig an Phosphatidylserin, welches nur von

apoptotischen Zellen an der äußeren Membranseite exponiert wird [7]. Die beiden oberen Quadranten repräsentieren daher die nekrotischen neutrophilen Granulozyten (0,6 %), während der untere rechte Quadrant die apoptotischen (1,1 %) und der untere linke die vitalen neutrophilen Granulozyten (98,4 %) darstellt (Abbildung 15 b).

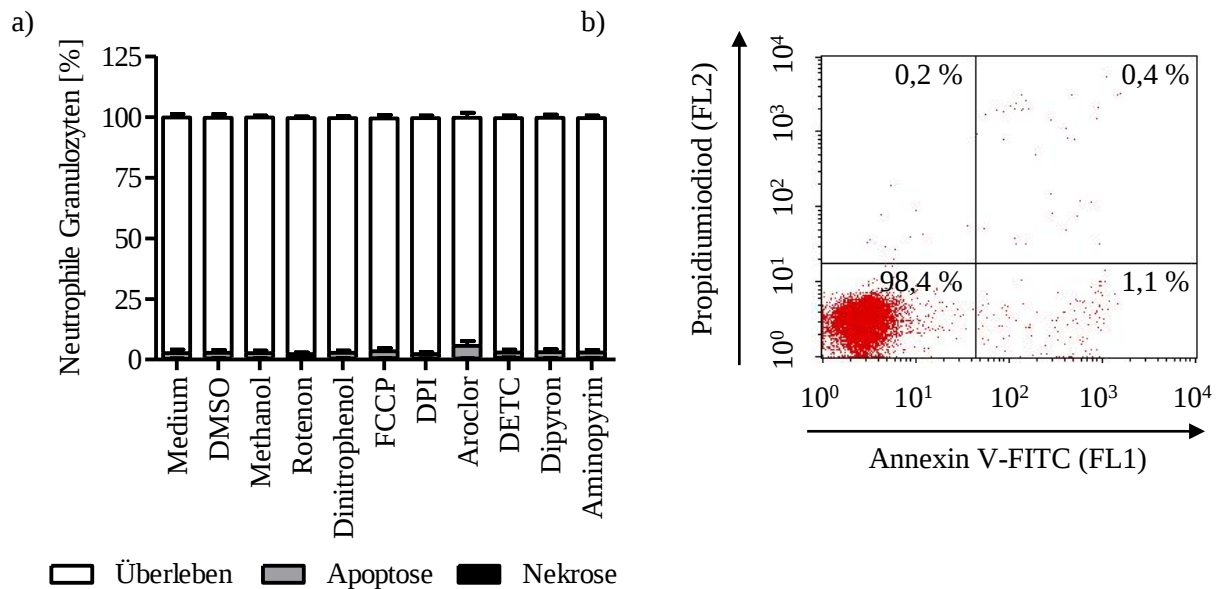


Abbildung 15: Apoptose und Vitalität von neutrophilen Granulozyten, inkubiert mit Inhibitoren der verschiedenen Stufen der ROS Bildung

Es wurden je Ansatz $0,5 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 100 μ l mit oder ohne Inhibitoren (10 μ M Rotenon, 10 μ M Dinitrophenol, 500 nM FCCP, 20 μ M DPI, 38 μ M Aroclor, 10 μ M DETC, 200 μ M Dipyron und 200 μ M Aminopyrin) für 4 h bei 37 °C inkubiert. DMSO und Methanol dienen als Lösungsmittelkontrollen für Rotenon und Aroclor. Die Apoptose- und Nekroseraten wurden durchflusszytometrisch durch Färbung mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid bestimmt. a) Effekt der verwendeten Inhibitoren auf die Apoptose und Nekrose. Es wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. b) Repräsentatives Punkte-Diagramm einer durchflusszytometrischen Bestimmung der Zellvitalität neutrophiler Granulozyten, die ohne Inhibitor inkubiert wurden. Es wurde die Annexin V-FITC-Fluoreszenz auf der x-Achse gegen die Propidiumiodid-Fluoreszenz auf der y-Achse aufgetragen. Die Ereignisse im unteren, rechten Quadranten (1,1 %) repräsentieren die apoptotischen Zellen, während die in den oberen Quadranten (0,6 %) die nekrotische Population darstellen. Die Population der lebenden, ungefärbten Zellen befindet sich im unteren linken Quadranten (98,4 %).

5.1.2 Effizienz der verschiedenen Inhibitoren auf die ROS-Bildung in neutrophilen Granulozyten

Zunächst wurde getestet, inwieweit die verwendeten Inhibitoren die PMA-induzierte Bildung von ROS in neutrophilen Granulozyten hemmen. Hierfür wurden drei Methoden zur Detektion von ROS angewendet. In allen getesteten Methoden führten mit den Inhibitoren inkubierte nicht stimulierte neutrophile Granulozyten zu keiner ROS-Bildung (Daten nicht gezeigt).

Effekt verschiedener Inhibitoren auf die intrazelluläre ROS-Produktion

Zuerst wurde die DHR 123-Methode zur Detektion intrazellulär gebildeter ROS gewählt. Die mit DHR 123 beladenen neutrophilen Granulozyten ($5 \times 10^6/\text{ml}$, $100 \mu\text{l}$ je Ansatz) wurden durchflusszytometrisch analysiert. Das Prinzip beruht auf der Oxidation von DHR 123 durch ROS, wie H_2O_2 , zum fluoreszierenden Rhodamin 123-Derivat [87]. Die Produktion der ROS wurde durch Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit $4 \mu\text{M}$ PMA induziert. In einem Vorversuch wurden Konzentrationen von 20 nM bis $20 \mu\text{M}$ PMA für die DHR 123-Methode getestet. Im Konzentrationsbereich von 20 nM bis $4 \mu\text{M}$ PMA stieg die ROS-Bildung parallel zur Konzentration an, während unter hohen PMA-Konzentrationen ($10 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$) die gemessene ROS-Produktion kaum größer wurde und ein Plateau erreichte (Abbildung 16 a). Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurde die Konzentration von $4 \mu\text{M}$ PMA verwendet (Abbildung 16).

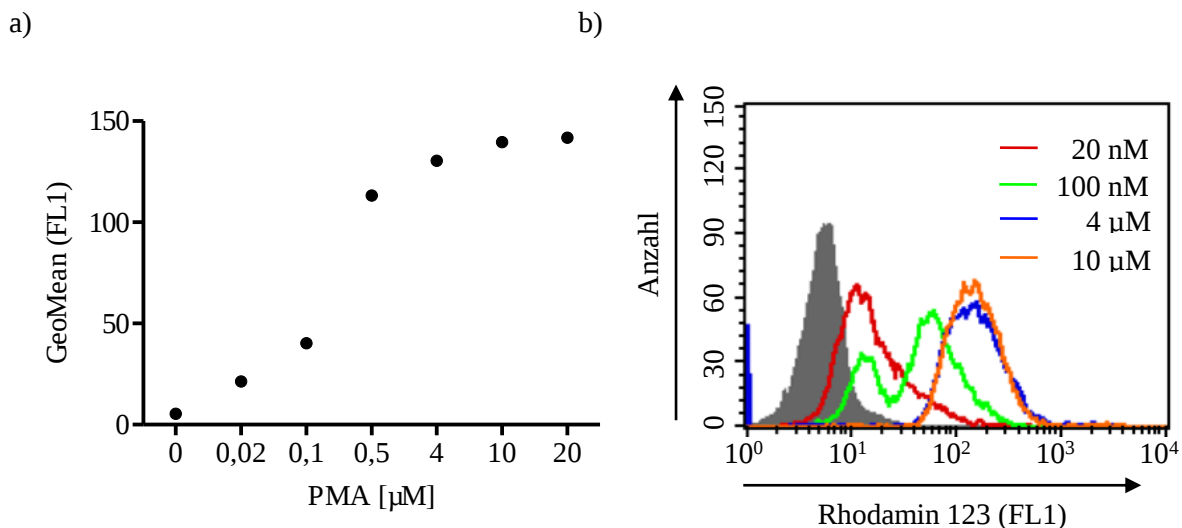


Abbildung 16: Detektion gebildeter ROS in neutrophilen Granulozyten mit der DHR 123-Methode in Abhängigkeit von der PMA-Konzentration

In einem Vorversuch wurden je Ansatz $0,5 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in $100 \mu\text{l}$ mit DHR 123 gefärbt und für 5 min mit 20 nM - $20 \mu\text{M}$ PMA stimuliert. Die PMA-induzierte Bildung der intrazellulären ROS wurde durchflusszytometrisch bestimmt. a) Es wurden die jeweiligen PMA-Konzentrationen auf der x-Achse gegen die geometrischen Mittelwerte (GeoMean) der Fluoreszenzintensitäten auf der y-Achse dargestellt. b) Überlagerte Histogramme der Fluoreszenzintensitäten des oxidierten Rhodamin 123 nicht stimulierter neutrophiler Granulozyten (grau, ausgefüllt) und mit 20 nM (rot), 100 nM (grün), $4 \mu\text{M}$ (blau) und $10 \mu\text{M}$ PMA (orange) stimulierter neutrophiler Granulozyten. Es wurde die Anzahl der detektierten neutrophilen Granulozyten gegen die Fluoreszenzintensität des oxidierten Rhodamin 123 aufgetragen.

DPI, der Inhibitor des Enzyms NADPH-Oxidase und des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, wirkte stark hemmend auf die intrazelluläre ROS-Bildung (Abbildung 17). Die Verschiebung der Fluoreszenzintensitäten hin zu niedrigeren Werten auf der x-Achse

(Linksverschiebung), verglichen mit der stimulierten Kontrolle (Medium mit PMA), zeigte eine verminderte ROS-Bildung an (Abbildung 17 b).

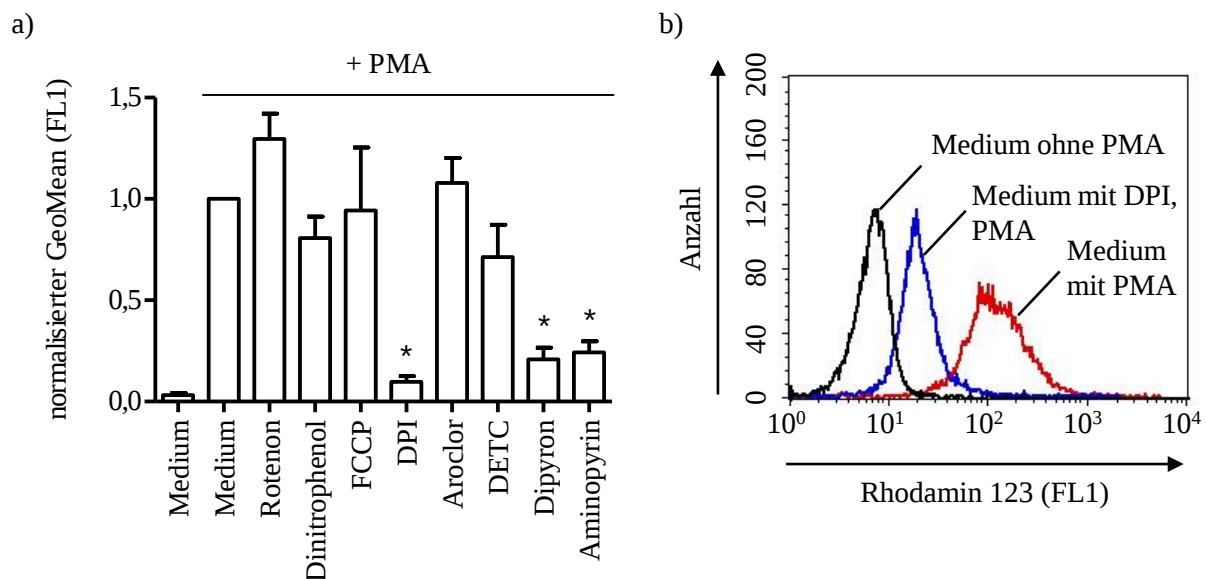


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären ROS-Produktion neutrophiler Granulozyten nach Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren

Es wurden $0,5 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten je 100 μ l-Ansatz mit oder ohne Inhibitoren (10 μ M Rotenon, 10 μ M Dinitrophenol, 500 nM FCCP, 20 μ M DPI, 38 μ M Aroclor, 10 μ M DETC, 200 μ M Dipyron und 200 μ M Aminopyrin) bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Färbung mit DHR 123 wurden die Ansätze mit 4 μ M PMA für 5 min stimuliert. Die PMA-induzierte Bildung der intrazellulären ROS wurde durchflusszytometrisch bestimmt. a) Es wurden die geometrischen Mittelwerte (GeoMean) der Fluoreszenzintensitäten, normalisiert auf die PMA-induzierte ROS-Bildung in der Abwesenheit von Inhibitoren (Medium), dargestellt. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten wurden aufgetragen. *p: <0,001, verglichen zur PMA-stimulierten Kontrolle ohne Inhibitor (Medium). b) Repräsentative überlagerte Histogramme der Fluoreszenzintensitäten nicht stimulierter neutrophiler Granulozyten (Medium ohne PMA), PMA-stimulierter neutrophiler Granulozyten ohne Inhibitor (Medium mit PMA) und beispielhaft für den hemmenden Effekt, PMA-stimulierte neutrophile Granulozyten nach Behandlung mit DPI (Medium mit DPI, PMA). Die Daten sind aus einem Experiment, repräsentativ für 4 unabhängige. Es wurde die Anzahl der detektierten neutrophilen Granulozyten gegen die Fluoreszenzintensität des oxidierten Rhodamin 123 aufgetragen.

Die Inhibitoren der SOD, Aroclor und DETC, wiesen keinen hemmenden Effekt auf. Dipyron und Aminopyrin senkten als Inhibitoren der MPO die Bildung von ROS drastisch um 79 % beziehungsweise 76 % (Abbildung 17 a). Die DHR 123-Methode ist zwar einfach und schnell durchzuführen, aber nicht sehr sensitiv [88]. Die zur Detektion des oxidativen *burst* nötige relativ hohe PMA-Konzentration (4 μ M) und die nicht eindeutigen Ergebnisse zum Einfluss der Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette Rotenon, Dinitrophenol und FCCP bezüglich ihrer Hemmung der ROS-Bildung (Abbildung 17 a) bestätigten dies. Daher wurden weitere Experimente durch die sensitiveren Bestimmungen anhand der Luminol- und Lucigenin-Methode zur Detektion von ROS etabliert und durchgeführt.

Einfluss von Inhibitoren der ROS-Produktion auf intra- und extrazelluläre ROS

Zunächst wurde die Luminol-amplifizierte Chemilumineszenz-Methode als sensitivere Technik zur Analyse der Bildung von ROS in PMA stimulierten neutrophilen Granulozyten etabliert und durchgeführt. Mit der Luminol-Methode wurde der Einfluss der verwendeten Inhibitoren der ROS-Produktion auf die Bildung intra- und extrazellulärer ROS in neutrophilen Granulozyten untersucht.

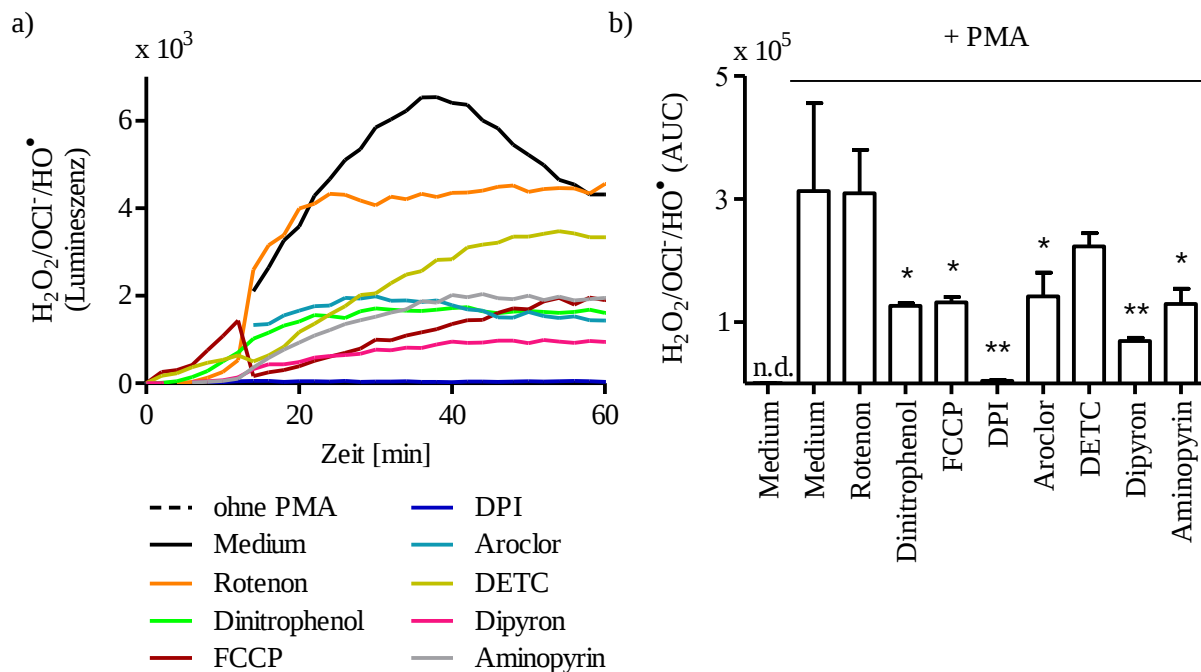


Abbildung 18: Detektion intra- und extrazellulärer ROS neutrophiler Granulozyten nach Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren

Es wurden je Ansatz $0,4 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 200 μl mit oder ohne Inhibitoren (10 μM Rotenon, 10 μM Dinitrophenol, 500 nM FCCCP, 20 μM DPI, 38 μM Aroclor, 10 μM DETC, 200 μM Dipyrone und 200 μM Aminopyrin) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde Luminol zugegeben und die ROS-Bildung mit 20 nM PMA induziert. Die Detektion der ROS erfolgte durch Messung der gebildeten Chemilumineszenz über 1 h bei 37 °C. Die Kontrolle ohne PMA zeigt die ROS nicht stimulierter neutrophiler Granulozyten. a) Zeitkinetik der detektierten intra- und extrazellulären ROS (Lumineszenz) von einem repräsentativen Experiment. b) Durch Berechnung der Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) quantifizierte ROS-Bildung. Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. **p: <0,001; *p< 0,01 verglichen zur PMA-stimulierten Probe ohne Inhibitor (Medium), n.d.: nicht detektierbar.

Nach Inkubation der neutrophilen Granulozyten ($2 \times 10^6/\text{ml}$) mit den Inhibitoren wurde Luminol zugegeben und mit PMA (20 nM) die ROS-Bildung induziert. Luminol wird durch H_2O_2 , $\text{HO}^\bullet$ und MPO-spezifische ROS wie OCl^- oxidiert. Die während dieser Reaktion freigesetzte Energie wurde in Form von Chemilumineszenz gemessen. Mit zunehmender Bildung von ROS stieg die detektierte Chemilumineszenz aufgrund der Oxidation von Luminol (Abbildung 18 a, schwarze Linie). Nicht stimulierte neutrophile Granulozyten

wiesen keine ROS-Bildung auf (Abbildung 18 a). Die Ergebnisse der Luminol-Methode zeigten eine komplette Hemmung des oxidativen *burst* durch DPI (Abbildung 18). Die mitochondrialen Entkopplungsreagenzien Dinitrophenol und FCCP wiesen ebenfalls einen signifikant hemmenden Effekt auf (Abbildung 18 b). Rotenon hingegen hemmte die PMA-induzierte ROS-Produktion nicht. Aroclor senkte signifikant die Chemilumineszenz von Luminol während der zweite getestete Inhibitor der SOD, DETC, keinen statistisch signifikanten Effekt aufwies (Abbildung 18 b). Die beiden MPO-Inhibitoren Dipyrone und Aminopyrin verhinderten die MPO-induzierte Oxidation von Luminol sehr effizient (Abbildung 18).

Beeinflussung extrazellulärer ROS durch Inhibitoren der ROS-Produktion

Als dritte Technik wurde die Lucigenin-amplifizierte Chemilumineszenz-Methode angewendet, um den Einfluss der verschiedenen Inhibitoren auf die PMA-induzierte ROS-Bildung zu untersuchen. Mit dieser Methode werden extrazelluläre ROS, vor allem Superoxidanionradikale ($O_2^{\bullet-}$), gemessen [79, 81]. Hierfür wurden je Ansatz $0,4 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 200 μ l (2×10^6 /ml) mit je einem Inhibitor vorinkubiert und nach anschließender Zugabe von Lucigenin, sowie PMA (20 nM), die extrazellulären ROS gemessen. Die Oxidation von Lucigenin durch PMA-induziertes, gebildetes $O_2^{\bullet-}$ ist proportional zu dem Anstieg der detektierten Chemilumineszenz (Abbildung 19 a). Mit der Lucigenin-Methode wurde bestätigt, dass DPI die extrazellulären ROS komplett hemmt (Abbildung 19). Des Weiteren wurde eine signifikant verminderte Oxidation von Lucigenin in Anwesenheit von den Entkopplungsreagenzien der mitochondrialen Atmungskette FCCP und Dinitrophenol detektiert (Abbildung 19 b). Rotenon zeigte auch mit dieser Methode keinen hemmenden Effekt auf die extrazellulären ROS der neutrophilen Granulozyten. Die Inhibitoren der SOD, Aroclor und DETC, hatten keinen sichtbaren Effekt auf die extrazellulären ROS (Abbildung 19). Die MPO-Inhibitoren Dipyrone und Aminopyrin hatten keinen hemmenden Effekt in der Lucigenin-Methode, was darauf hindeutet, dass sie auch keinen hemmenden Einfluss auf die NADPH-Oxidase haben. Da die Oxidation von Luminol jedoch effektiv durch die MPO-Inhibitoren Dipyrone und Aminopyrin verhindert wurde (Abbildung 18) wird deutlich, dass Luminol durch MPO-induzierte ROS oxidiert wird und die MPO-spezifischen ROS keinen Effekt auf die Oxidation von Lucigenin haben. Daher konnte auch kein Einfluss von Dipyrone und Aminopyrin auf die Lucigenin-Methode gemessen werden. Die nicht stimulierten neutrophilen Granulozyten produzierten auch in dieser Methode keine detektierbaren ROS (nicht detektierbar, n.d., Abbildung 19).

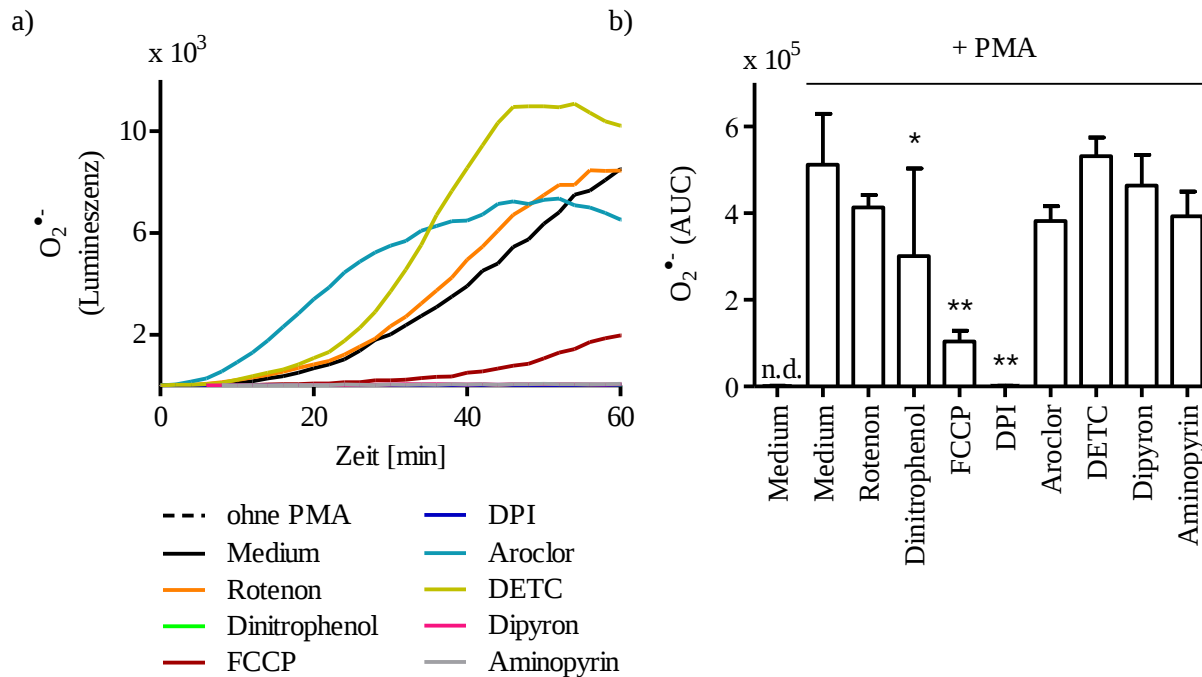


Abbildung 19: Detektion extrazellulärer ROS neutrophiler Granulozyten, inkubiert mit verschiedenen Inhibitoren

Es wurden je Ansatz $0,4 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 200 μ l mit oder ohne Inhibitoren (10 μ M Rotenon, 10 μ M Dinitrophenol, 500 nM FCCP, 20 μ M DPI, 38 μ M Aroclor, 10 μ M DETC, 200 μ M Dipyrone und 200 μ M Aminopyrin) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde Lucigenin zugegeben und die ROS-Bildung mit 20 nM PMA induziert. Die Detektion des extrazellulären $O_2^{\bullet-}$ erfolgte durch Messung der gebildeten Chemilumineszenz über 1 h bei 37 °C. Die Probe nicht stimulierter neutrophiler Granulozyten (ohne PMA) diente als Kontrolle. a) Zeitkinetik der extrazellulär vorliegenden $O_2^{\bullet-}$ (Lumineszenz) von einem repräsentativen Experiment. b) Extrazelluläre $O_2^{\bullet-}$, quantifiziert durch die Berechnung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC). Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten dargestellt. **p: <0,001; *p< 0,01 verglichen zur PMA-stimulierten Probe ohne Inhibitor (Medium), n.d.: nicht detektierbar.

5.1.3 Einfluss verschiedener Inhibitoren der ROS-Produktion auf die Bildung von NETs

Die PMA-induzierte NET-Bildung ist von ROS abhängig [3]. Es ist daher zu erwarten, dass eine Hemmung der an der ROS-Bildung involvierten Signalwege zur verminderten Bildung von NETs führt. Ein hemmender Effekt auf die Bildung von ROS in neutrophilen Granulozyten wurde für DPI, Dinitrophenol, FCCP, Aroclor, Dipyrone und Aminopyrin mit den in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Methoden nachgewiesen. Es wurde der Einfluss auf die NET-Bildung jener Inhibitoren getestet, welche in den durchgeführten Methoden zur Detektion von ROS einen hemmenden Effekt auf die ROS-Bildung zeigten.

Detektion der NET-Freisetzung

Die frisch isolierten humanen neutrophilen Granulozyten ($1 \times 10^6/\text{ml}$) wurden vor der Induzierung der NETs durch 20 nM PMA für 30 min mit den Inhibitoren inkubiert. Die Bildung der NETs wurde quantitativ anhand der Fluoreszenz des DNA gebundenen SYTOXgreen über 4 h gemessen. SYTOXgreen ist nicht zellpermeabel und detektiert extrazelluläre DNA. Mit Inhibitoren inkubierte, nicht stimulierte neutrophile Granulozyten zeigten keine NET-Bildung (Daten nicht gezeigt). Die Hemmung der NADPH-Oxidase durch DPI verhinderte die NET-Bildung (Abbildung 20). DPI hemmt jedoch neben der NADPH-Oxidase auch die Elektronentransportkette der Mitochondrien. Um zu untersuchen, ob der beobachtete Effekt auf die Hemmung der NADPH-Oxidase oder die Inhibierung der mitochondrialen Atmungskette zurückzuführen war, wurden Studien mit den mitochondrialen Entkopplungsreagenzien Dinitrophenol und FCCP durchgeführt. Die Entkopplungsreagenzien der mitochondrialen Atmungskette, Dinitrophenol und FCCP, dienten zusätzlich zur Feststellung eines Einflusses der mitochondrialen ROS auf die PMA-induzierte NET-Bildung. Sie bauen das mitochondriale Membranpotential ab und stören dadurch die ablaufenden Oxidations- und Phosphorylierungsprozesse in der Atmungskette. Obwohl Dinitrophenol und FCCP die Bildung der ROS hemmten (Abbildung 18, Abbildung 19), wurde keine Reduktion der NET-Bildung detektiert (Abbildung 20). Die mitochondrialen ROS scheinen daher keinen Einfluss auf die Bildung von NETs zu haben. Weiterhin deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die durch DPI verursachte Hemmung der NET-Bildung durch die Inhibierung der NADPH-Oxidase verursacht wurde. Aroclor, eingesetzt als Inhibitor der SOD, zeigte in der durchgeführten Luminol-Methode eine deutliche Senkung der ROS-Bildung (Abbildung 18). Die Inkubation von neutrophilen Granulozyten mit SOD bewirkte jedoch keinen signifikanten Effekt auf die PMA-induzierte NET-Bildung (Abbildung 20 b). Die SOD scheint daher für die Bildung von NETs keine entscheidende Rolle zu spielen. Die neutrophilen Granulozyten einiger Spender zeigten allerdings eine erhöhte NET-Bildung bei der Behandlung mit Aroclor (Abbildung 20 a). Wie bereits beschrieben wurde spielt die MPO eine wichtige Rolle in der Bildung von NETs [30]. Um einen genaueren Einblick in die Rolle der MPO-gebildeten ROS bei der Bildung von NETs zu erhalten, wurden die Inhibitoren der MPO, Dipyrone und Aminopyrin, getestet. Dipyrone fängt Hypochlorit (OCl^-) und Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$) ab, während Aminopyrin zusätzlich die MPO hemmt [19, 20]. In den bereits vorgestellten Studien zur Messung der gebildeten ROS wurde gezeigt, dass Dipyrone und Aminopyrin die MPO-induzierte Oxidation von DHR 123 und Luminol bewirken (Abbildung 17 a, Abbildung 18), aber keine Hemmung der superoxidationabhängigen Oxidation von

Lucigenin (Abbildung 19). Beide Inhibitoren hemmten die NET-Bildung signifikant (Abbildung 20 b). Dies bestätigt, dass den MPO-spezifischen ROS eine wichtige Rolle bei der NET-Bildung zukommt.

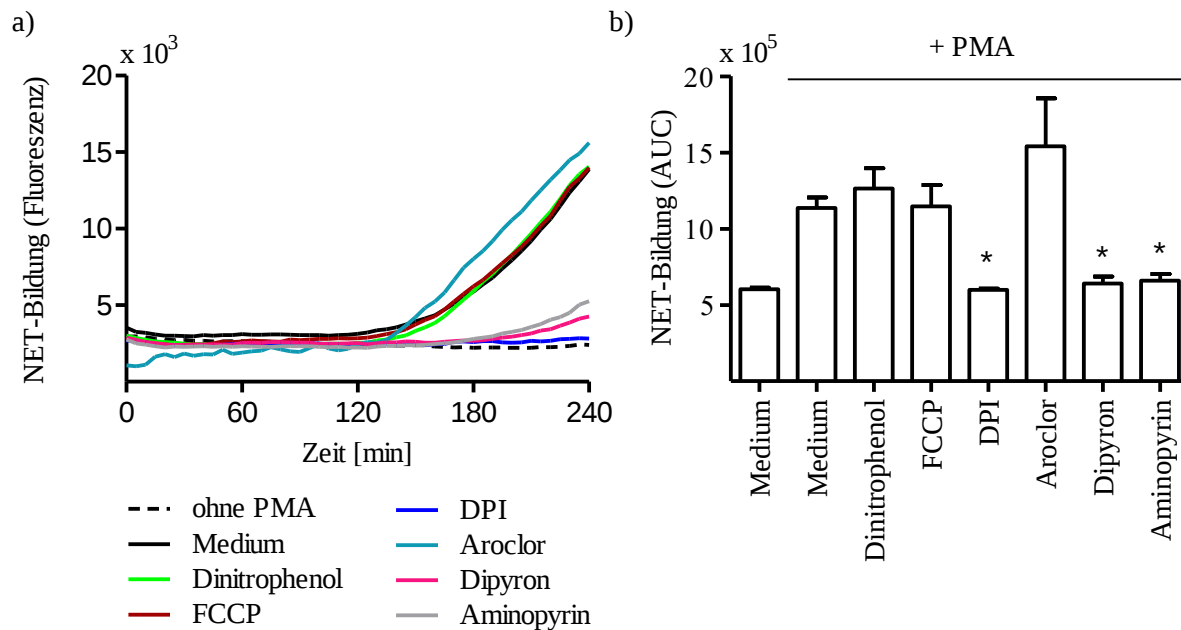


Abbildung 20: Bildung von NETs durch neutrophile Granulozyten, inkubiert mit Inhibitoren

Je Ansatz wurden $0,2 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 200 μ l mit oder ohne Inhibitoren (10 μ M Dinitrophenol, 500 nM FCCP, 20 μ M DPI, 38 μ M Aroclor, 200 μ M Dipyron und 200 μ M Aminopyrin) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde SYTOXgreen zu den Proben gegeben und die Bildung der NETs mit 20 nM PMA induziert. Proben ohne PMA dienten als Kontrolle. Die Detektion der NET-Bildung erfolgte über 4 h bei 37 °C durch Messung der Fluoreszenz des DNA gebundenen SYTOXgreen. a) Zeitkinetik der NET-Bildung (Fluoreszenzintensität) von einem repräsentativen Experiment. b) NET-Bildung, quantifiziert durch die Berechnung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC). Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. *p: <0,01 verglichen zur PMA-stimulierten Probe ohne Inhibitor (Medium).

Mikroskopische Analyse der gebildeten NETs

Zur Verifizierung der mittels der SYTOXgreen-Methode detektierten Effekte der Inhibitoren auf die NET-Bildung wurden Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie durchgeführt. Zunächst wurden immunfluoreszenzmikroskopische Präparate nach 4 h PMA-Stimulation zur Detektion der typischen NET-Struktur angefertigt (Abbildung 21). Hierbei erfolgte die Färbung der DNA mit SYTOXgreen und des mit den NETs assoziierten Proteins neutrophile Elastase mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper. Die typische dreidimensionale Struktur, bestehend aus einem DNA-Rückgrat, auf welchem neutrophile Elastase gebunden ist, wurde deutlich sichtbar. Weiterhin waren auch intakte neutrophile Granulozyten mit gelappten Zellkern zu erkennen (Abbildung 21 a, untere Reihe). Die nicht stimulierten neutrophilen Granulozyten wiesen keine NET-Bildung auf (Abbildung 21 a, obere Reihe). In

den parallel angefertigten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten die neutrophilen Granulozyten eine intakte Struktur, die stimulierten bildeten ein flächiges Netz aus NETs (Abbildung 21 b).

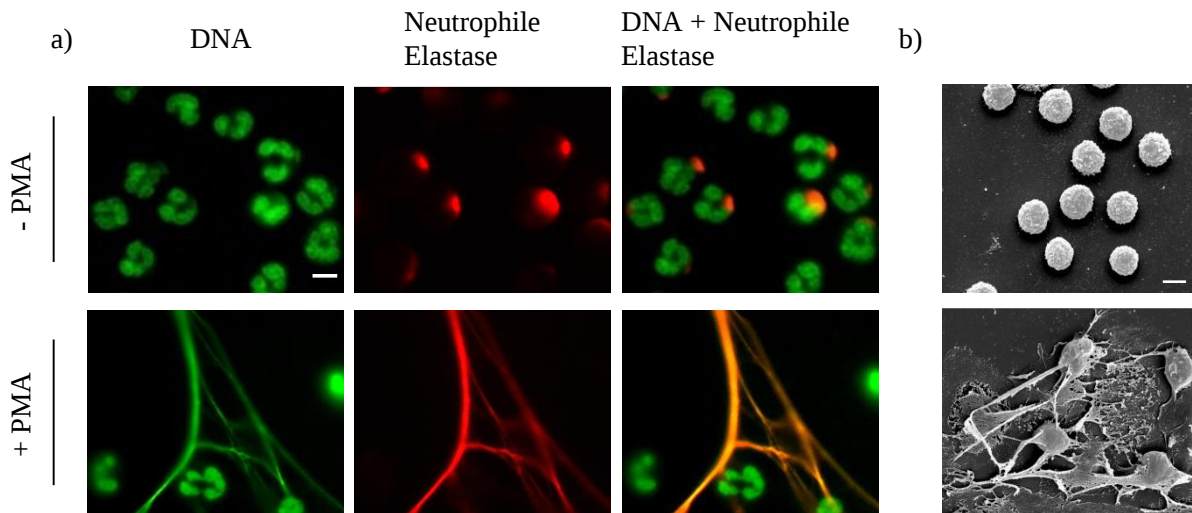


Abbildung 21: NET-Bildung, dargestellt durch Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie

Es wurden je Ansatz 5×10^5 neutrophile Granulozyten ($1 \times 10^6/\text{ml}$) mit 20 nM PMA bei 37 °C für 4 h stimuliert und anschließend fixiert. Die obere Reihe zeigt nicht stimulierte neutrophile Granulozyten, die untere mit PMA stimulierte neutrophile Granulozyten. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μm (Fluoreszenzmikroskopie) beziehungsweise 5 μm (Rasterelektronenmikroskopie, REM) a) Die DNA wurde mit SYTOXgreen (grün) und das Protein neutrophile Elastase durch einen Antikörper immunfluoreszent (rot) angefärbt. b) Rasterelektronenmikroskopische Darstellung nicht stimulierter und PMA-stimulierter neutrophiler Granulozyten.

Die NET-Bildung der neutrophilen Granulozyten unter Einfluss der Inhibitoren wurde nach 4 h Stimulation mit PMA mikroskopisch betrachtet. Der Fluoreszenzfarbstoff SYTOXgreen diente zur Markierung der DNA. Die Inhibitoren allein induzierten in nicht stimulierten neutrophilen Granulozyten keine NETs (Daten nicht gezeigt). In Anwesenheit von DPI und Dipyrone war keine NET-Bildung bei PMA-stimulierten neutrophilen Granulozyten detektierbar (Abbildung 22 b, d). Des Weiteren bestätigte die mikroskopische Analyse, dass der SOD-Inhibitor Aroclor die PMA-induzierte NET-Bildung nicht hemmt (Abbildung 22 c). Die mikroskopischen Präparate stimulierter neutrophiler Granulozyten (Medium) und mit Aroclor inkubierter stimulierter neutrophiler Granulozyten wiesen eine vergleichbare NET-Bildung auf (Abbildung 22 a, c). Die parallel angefertigten, rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten die gleichen Tendenzen (Abbildung 22, untere Reihe).

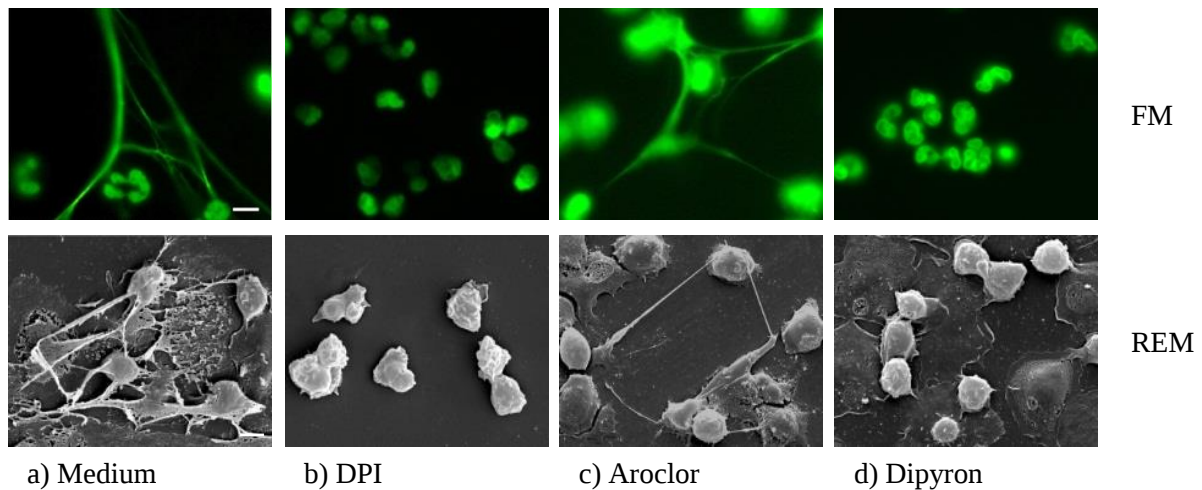


Abbildung 22: Bildung von NETs durch neutrophile Granulozyten, inkubiert mit Inhibitoren

Es wurden je Ansatz 5×10^5 neutrophile Granulozyten ($1 \times 10^6/\text{ml}$) für 30 min mit oder ohne Inhibitoren (20 μM DPI, 38 μM Aroclor, 200 μM Dipyrone) bei 37 °C inkubiert. Die PMA-induzierte NET-Bildung wurde nach 4 h durch Fixieren abgestoppt und fluoreszenzmikroskopisch durch Färbung der DNA mit SYTOXgreen (obere Reihe, FM, Fluoreszenzmikroskopie) bzw. rasterelektronenmikroskopisch (untere Reihe, REM, Rasterelektronenmikroskopie) visualisiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μm (Fluoreszenzmikroskopie) beziehungsweise 5 μm (Rasterelektronenmikroskopie). Alle Fluoreszenzbilder wurden in der gleichen Größe und Auflösung dargestellt. Dies gilt auch für die abgebildeten REM-Aufnahmen.

In der hier durchgeführten Studie wurde erstmals gezeigt, dass die mitochondrialen ROS und die Superoxiddismutase keine Rolle in der Bildung von NETs spielen. ROS, gebildet durch die NADPH-Oxidase und MPO, sind jedoch für die Bildung der NETs essentiell. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die als Radikalfänger wirkenden Inhibitoren der MPO Dipyrone und Aminopyrin die NET-Bildung effizient unterdrücken können.

5.2 Wirkung von Antioxidantien auf die Bildung von NETs

NETs scheinen eine pathophysiologische Rolle in verschiedenen Autoimmunkrankheiten zu spielen [38, 39, 42, 89, 90]. Eine Inhibierung der NET-Bildung könnte ein neuer therapeutischer Ansatz in diesen Krankheiten sein. Da die Bildung von NETs in PMA-stimulierten neutrophilen Granulozyten abhängig von der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies ist, könnten Antioxidantien die NET-Bildung vermindern. Die zuvor beobachtete Hemmung der Bildung von NETs in stimulierten neutrophilen Granulozyten durch die Radikalfänger Dipyrone und Aminopyrin unterstützt die These. Daher wurde in der folgenden Studie analysiert, ob Antioxidantien die NET-Bildung hemmen können. Die untersuchten Antioxidantien lassen sich in drei Gruppen einteilen: Flavonoide, Vitamine und weitere pharmakologische Substanzen.

5.2.1 Einfluss der Antioxidantien auf die Zellvitalität und Apoptose der neutrophilen Granulozyten

Zunächst wurde geprüft, ob die verwendeten Antioxidantien die Zellvitalität beeinflussen und die Apoptose oder Nekrose der neutrophilen Granulozyten induzieren. Hierfür wurden je Ansatz $0,5 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 100 μ l für 5 h mit oder ohne Antioxidantien bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde eine Annexin V-FITC und Propidiumiodid-Färbung durchgeführt (siehe 4.6.1) und diese anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Mitgeführte Lösungsmittelkontrollen waren DMSO und Ethanol.

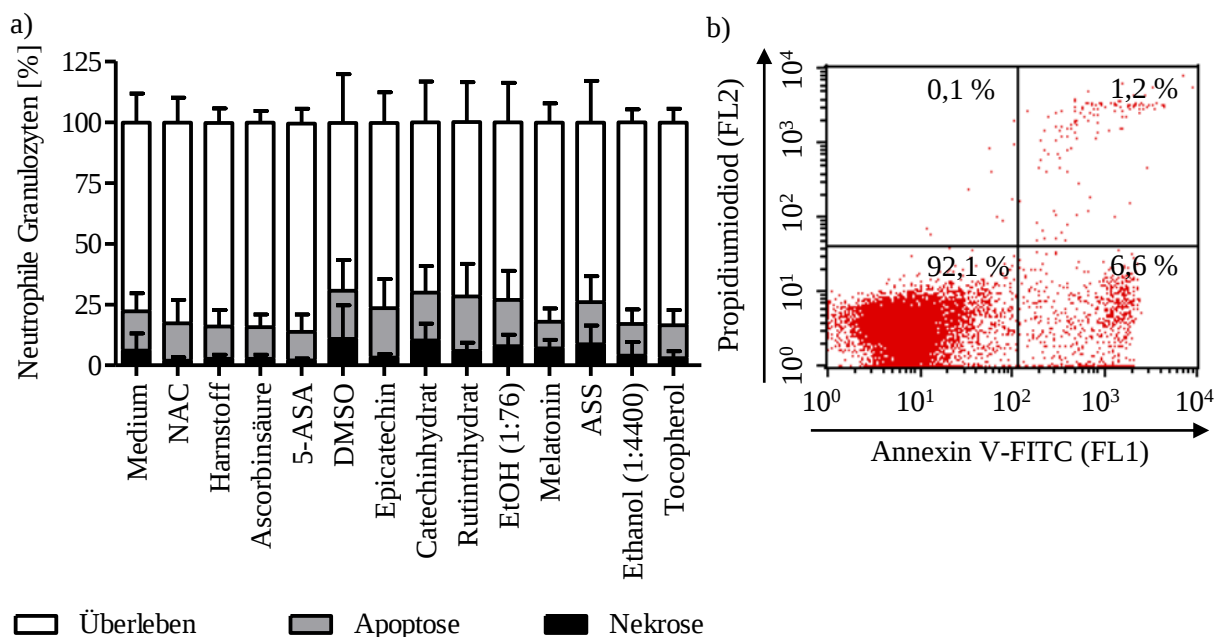


Abbildung 23: Effekt verschiedener Antioxidantien auf die Apoptose- und Nekroseraten neutrophiler Granulozyten, bestimmt mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Je Ansatz wurden $0,5 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 100 μ l mit oder ohne Antioxidantien (10 mM *N*-Acetylcystein, NAC, 1 mM Harnstoff, 2 mM Ascorbinsäure, 0,5 mM 5-Aminosalicylsäure, 5-ASA, 0,1 mM Epicatechin, 0,1 mM Catechinhydrat, 0,15 mM Rutintrihydrat, 1 mM Acetylsalicylsäure, ASS, 2 mM Melatonin und 0,05 mM Tocopherol) für 5 h bei 37 °C inkubiert. Überleben, Apoptose und Nekrose wurden nach Färbung mit Annexin-V-FITC und Propidiumiodid durchflusszytometrisch bestimmt. Als Lösungsmittelkontrolle für Epicatechin, Catechinhydrat, Rutintrihydrat diente DMSO und für ASS, Melatonin und Tocopherol Ethanol (1:76 bzw. 1:4400). a) Es wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. b) Repräsentatives Punkte-Diagramm einer durchflusszytometrischen Bestimmung von nicht mit Antioxidantien vorinkubierten neutrophilen Granulozyten (Medium). Es wurde die Propidiumiodid-Fluoreszenz auf der y-Achse gegen die Annexin V-FITC-Fluoreszenz auf der x-Achse aufgetragen. Die Ereignisse im unteren, rechten Quadranten (6,6 %) repräsentieren apoptotische, die in den beiden oberen Quadranten die nekrotische (1,3 %) und die im unteren rechten Quadranten die lebende Population (92,1 %).

Die verwendeten Konzentrationen der verschiedenen Substanzen wurden der Literatur entnommen [20, 37, 54, 63, 68, 91-98] oder durch eigene Versuche ermittelt. Keines der getesteten Antioxidantien erhöhte die Nekrose oder Apoptose nach 5 h verglichen zum

Medium oder der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 23 a). Auch nach 19 h war kein Nekrose- oder Apoptose-induzierender Effekt der verwendeten Antioxidantien detektierbar (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 23 b wurden beispielhaft die in einem Experiment gemessenen Fluoreszenzintensitäten von Propidiumiodid (FL-2) gegen die von Annexin V-FITC (FL-1) von gefärbten neutrophilen Granulozyten ohne Antioxidans aufgetragen. Die beiden oberen Quadranten repräsentieren die nekrotischen neutrophilen Granulozyten (1,3 %), während der untere rechte Quadrant die apoptotischen (6,6 %) und der untere linke die vitalen (92,1 %) neutrophilen Granulozyten darstellt (Abbildung 23 b).

5.2.2 Effizienz der eingesetzten Antioxidantien auf die ROS-Bildung in neutrophilen Granulozyten

Zunächst wurde der Einfluss der Antioxidantien auf die Bildung von ROS in PMA-stimulierten neutrophilen Granulozyten untersucht. Dafür wurden die Luminol- und die Lucigenin-Methode zur Detektion der ROS angewendet. Die intra- und/oder extrazellulären ROS wurden in mit PMA stimulierten neutrophilen Granulozyten, welche mit den Antioxidantien vorinkubiert wurden, über einen Zeitraum von 1 h gemessen. In den durchgeführten Methoden wiesen nicht stimulierte neutrophile Granulozyten, inkubiert mit Medium oder Antioxidantien (Daten nicht gezeigt), keine ROS-Bildung auf. Die bei diesen Methoden gewonnenen Kinetikkurven der detektierten ROS wurden durch Berechnung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) ausgewertet und in einem Balkendiagramm dargestellt.

Intra- und extrazelluläre ROS-Bildung der neutrophilen Granulozyten in Anwesenheit von Antioxidantien

Es wurde die Luminol-amplifizierte Chemilumineszenz-Methode angewendet, um den Effekt der Antioxidantien auf die intra- und extrazelluläre ROS-Produktion zu bestimmen. Nachdem die neutrophilen Granulozyten ($2 \times 10^6/\text{ml}$) mit den Antioxidantien inkubiert wurden, erfolgte die Zugabe von Luminol und Induzierung der Bildung von ROS durch 20 nM PMA. Bei dieser Methode wird Luminol durch H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ und MPO-spezifische ROS, wie OCl^- , oxidiert [99, 100]. Dabei wird die entstandene Reaktionsenergie in Form von Licht als Chemilumineszenz freigesetzt. Wirken die verwendeten Antioxidantien hemmend auf ROS, werden diese abgefangen und Luminol dadurch weniger stark oxidiert. Die detektierte Intensität der Chemilumineszenz wird gegenüber den neutrophilen Granulozyten, welche nur mit PMA stimuliert aber nicht mit Antioxidantien vorinkubiert wurden (Med. mit PMA, bzw. Lösungsmittelkontrolle mit PMA), vermindert.

Einfluss von Flavonoiden auf intra- und extrazelluläre ROS

Zunächst wurden die Flavonoide Epicatechin, Catechinhydrat und Rutintrihydrat bezüglich ihrer Wirkung auf die intra- und extrazellulären ROS PMA-stimulierter neutrophiler Granulozyten untersucht. Die Antioxidantien Epicatechin und Rutintrihydrat hemmten konzentrationsabhängig stark die gebildeten ROS (Abbildung 24).

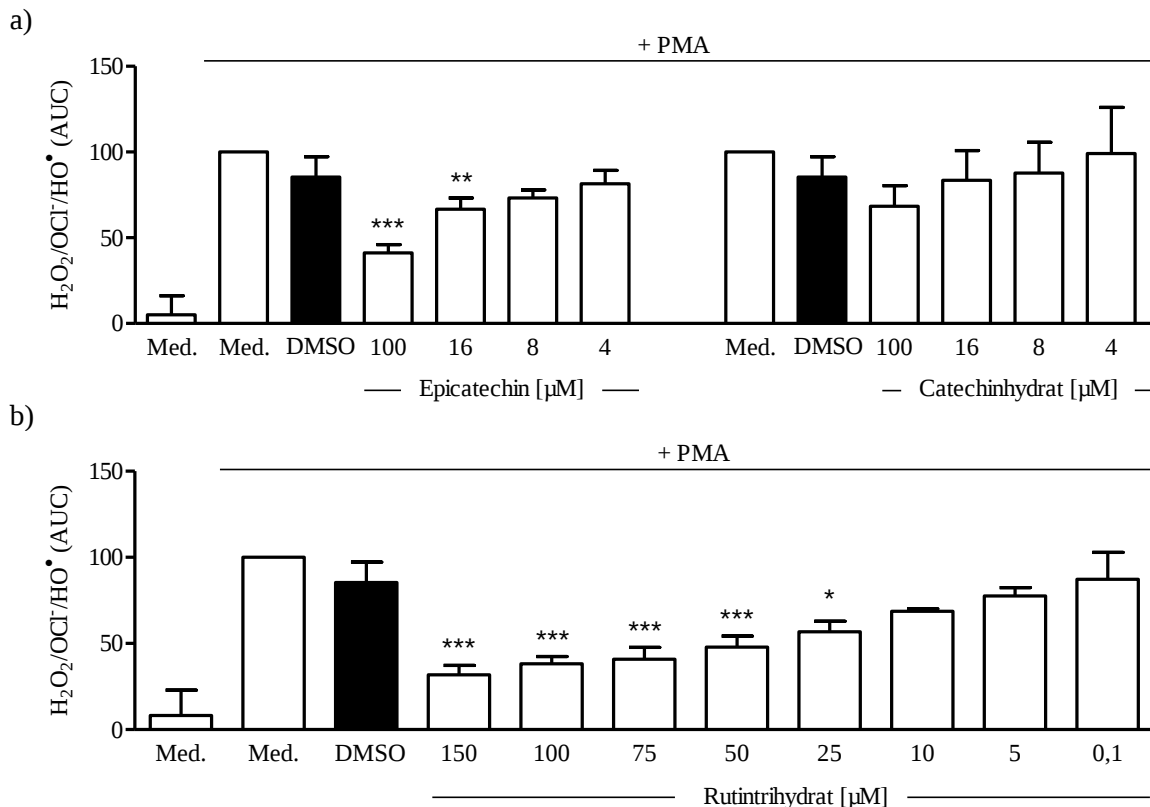


Abbildung 24: Einfluss der Antioxidantien Epicatechin, Catechinhydrat und Rutintrihydrat auf die intra- und extrazelluläre ROS-Bildung neutrophiler Granulozyten

Je Ansatz wurden $0,4 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 200 μ l mit oder ohne Antioxidantien bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Luminol wurden die neutrophilen Granulozyten zur Induzierung der ROS-Bildung mit 20 nM PMA stimuliert und die Kinetik der ROS-Bildung über 1 h bei 37 °C gemessen. Die ROS-Bildung der neutrophilen Granulozyten, inkubiert mit (a) Epicatechin, Catechinhydrat und (c) Rutintrihydrat, wurde durch Berechnung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) ermittelt und anhand eines Balkendiagrammes dargestellt. Die Kontrolle ohne PMA (Medium, Med.) repräsentiert unbehandelte, nicht stimulierte neutrophile Granulozyten. Die Daten wurden auf die stimulierten neutrophilen Granulozyten ohne Antioxidans (Med. mit PMA) normalisiert. Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 5 (Epicatechin, Rutintrihydrat) beziehungsweise 7 (Catechinhydrat) unabhängigen Experimenten dargestellt. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, verglichen zur schwarz markierten Säule (PMA-stimulierte Probe ohne Antioxidans in Medium mit DMSO (DMSO) als Lösungsmittelkontrolle).

Eine signifikante Hemmung der ROS wurden bei neutrophilen Granulozyten, inkubiert mit 16 μ M und 100 μ M Epicatechin oder 25-150 μ M Rutintrihydrat, detektiert (Abbildung 24). Dies deutet darauf hin, dass diese Antioxidantien MPO-spezifische ROS abfangen können.

Mit Catechinhydrat inkubierte stimulierte neutrophile Granulozyten zeigten keinen signifikanten hemmenden Effekt auf ROS (Abbildung 24 a).

Bildung intra- und extrazellulärer ROS neutrophiler Granulozyten, inkubiert mit Vitaminen als Antioxidantien

Die Vitamine Ascorbinsäure (Vitamin C) und Tocopherol (Vitamin E) wurden hinsichtlich ihrer Effekte auf die Bildung von intra- und extrazellulärer ROS in stimulierten neutrophilen Granulozyten untersucht. Ascorbinsäure wirkte als starker Radikalfänger der MPO-spezifischen ROS und hemmte konzentrationsabhängig die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (Abbildung 25 a).

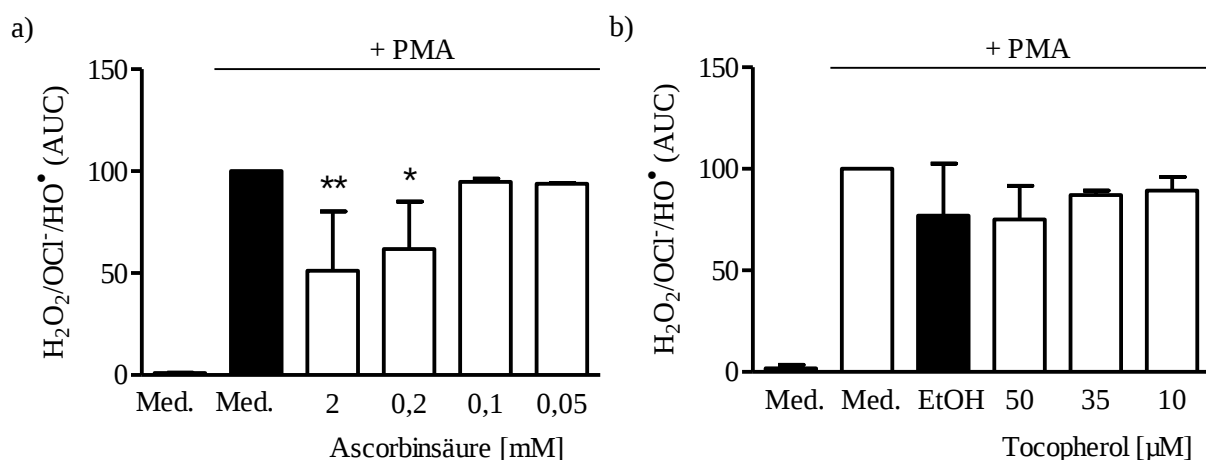


Abbildung 25: Intra- und extrazelluläre ROS-Bildung neutrophiler Granulozyten, inkubiert mit den Antioxidantien Ascorbinsäure oder Tocopherol

Je Ansatz wurden $0,4 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 200 µl mit oder ohne Antioxidantien bei 37 °C inkubiert. Nach anschließendem Zusatz von Luminol wurden die neutrophilen Granulozyten zur Induzierung der ROS-Bildung mit 20 nM PMA stimuliert. Die Messung der Kinetik der gebildeten ROS erfolgte über 1 h bei 37 °C. Die ROS-Bildung der neutrophilen Granulozyten, inkubiert mit (a) Ascorbinsäure und (b) Tocopherol, wurde durch Berechnung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) ermittelt und anhand eines Balkendiagrammes dargestellt. Die Kontrolle ohne PMA (Medium, Med.) repräsentiert unbehandelte, nicht stimulierte neutrophile Granulozyten. Die Daten wurden auf die stimulierten neutrophilen Granulozyten ohne Antioxidans (Med. mit PMA) normalisiert. Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten dargestellt. **:p<0,01, *:p<0,05, verglichen zur schwarz markierten Säule (PMA-stimulierte Probe ohne Antioxidans in Medium (Med.) beziehungsweise Medium mit Ethanol (EtOH) als Lösungsmittelkontrolle).

Die Luminol-amplifizierte Chemilumineszenz wurde mit 0,2 mM und 2 mM Ascorbinsäure signifikant gegenüber der von stimulierten neutrophilen Granulozyten in Medium (Medium, Med., mit PMA) gehemmt (Abbildung 25 a). Das Vitamin E Tocopherol hatte keinen Einfluss auf die ROS in stimulierten neutrophilen Granulozyten (Abbildung 25 b).

Einfluss pharmakologisch wirksamer antioxidativer Substanzen auf die intra- und extrazelluläre ROS-Bildung neutrophiler Granulozyten

Neben den Flavonoiden und Vitaminen wurden noch weitere pharmakologisch relevante, antioxidative Substanzen bezüglich ihrer Wirkung auf die Produktion von intra- und extrazellulären ROS in stimulierten neutrophilen Granulozyten untersucht.

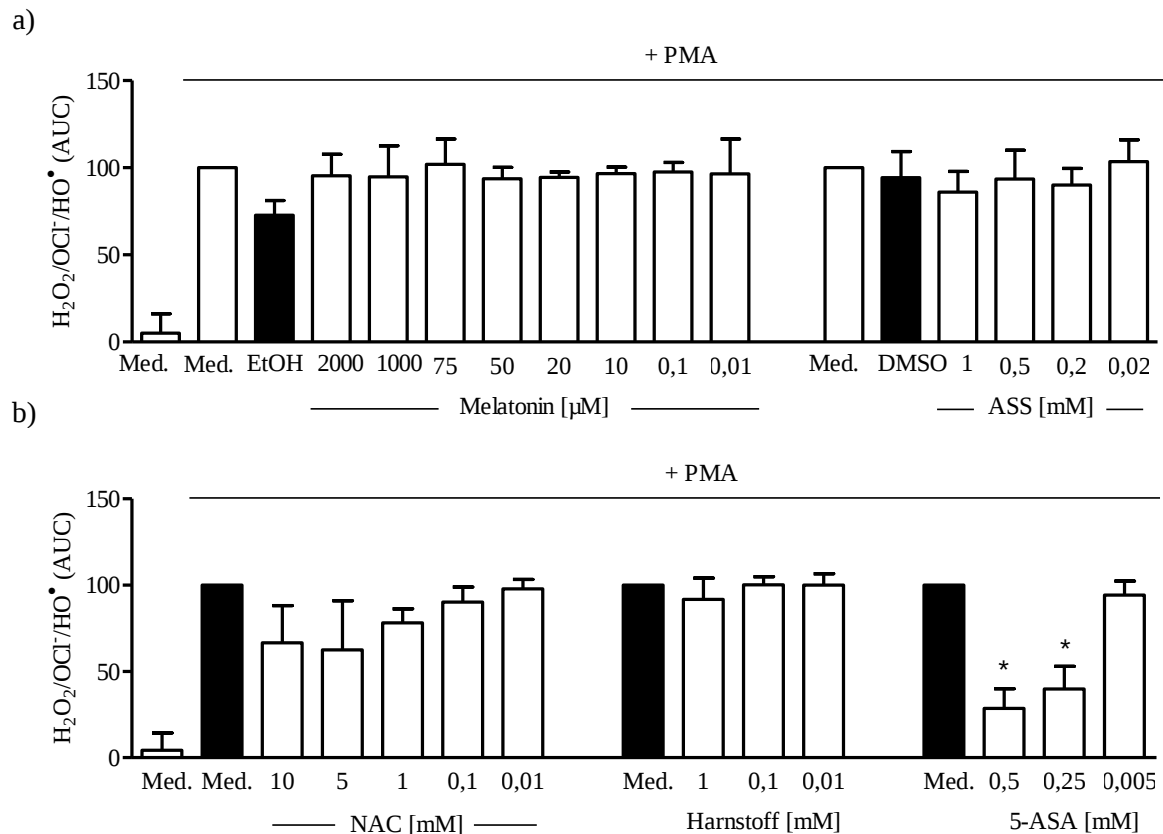


Abbildung 26: Intra- und extrazelluläre ROS-Bildung neutrophiler Granulozyten, inkubiert mit verschiedenen Antioxidantien

Je Ansatz wurden $0,4 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 200 μ l mit oder ohne Antioxidantien bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Färbung mit Luminol wurden die neutrophilen Granulozyten mit 20 nM PMA stimuliert und die Kinetik der ROS-Bildung über 1 h bei 37 °C gemessen. Die ROS-Bildung der neutrophilen Granulozyten, inkubiert mit (a) Melatonin, Acetylsalicylsäure (ASS) und (b) *N*-Acetyl-L-cystein (NAC), Harnstoff und 5-Aminosalicylsäure (5-ASA), wurde durch Berechnung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) ermittelt und anhand eines Balkendiagrammes dargestellt. Die Kontrolle ohne PMA (Medium, Med.) repräsentiert unbehandelte, nicht stimulierte neutrophile Granulozyten. Die Daten wurden auf die stimulierten neutrophilen Granulozyten ohne Antioxidans (Med. mit PMA) normalisiert. Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 3 (NAC), 6 (Harnstoff) und 5 (5-ASA) unabhängigen Experimenten dargestellt. *: $p < 0,001$, verglichen zur schwarz markierten Säule (PMA-stimulierte Probe ohne Antioxidans in Medium (Med.) bzw. Medium mit Ethanol (EtOH) oder DMSO (DMSO) als Lösungsmittelkontrolle).

Hierfür wurden neutrophile Granulozyten mit Melatonin, Acetylsalicylsäure (ASS), *N*-Acetylcystein (NAC), Harnstoff und 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) vorinkubiert und nach anschließender Stimulation die gebildeten ROS mittels der Luminol-Methode analysiert. Der

entzündungshemmende Arzneistoff 5-ASA wirkte konzentrationsabhängig antioxidativ und zeigte eine signifikante Hemmung (0,25 mM, 0,5 mM) der Luminol-Chemilumineszenz verglichen zur Mediumkontrolle (Med. mit PMA) (Abbildung 26 b). NAC zeigte die Tendenz einer konzentrationsabhängigen Inhibierung der ROS, die jedoch nicht signifikant war (Abbildung 26 b). Melatonin, ASS und Harnstoff hatten keinen signifikanten Effekt auf die ROS-Bildung stimulierter neutrophiler Granulozyten (Abbildung 26).

Einfluss von Antioxidantien auf extrazelluläre ROS neutrophiler Granulozyten

Als weitere Methode wurde die Lucigenin-amplifizierte Chemilumineszenz-Methode angewendet, um den Effekt der Antioxidantien auf extrazelluläre ROS zu bestimmen. Es wurden je Ansatz 200 µl $0,4 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten, inkubiert mit den Antioxidantien, mit Lucigenin versetzt und die Bildung von ROS durch 20 nM PMA induziert. Bei dieser Methode werden vor allem $O_2^{\bullet-}$ detektiert, welche Lucigenin oxidieren [79, 81, 99]. Die Reaktionsenergie wird in Form von Licht als Chemilumineszenz freisetzt und gemessen. Die Hemmung der ROS wird sichtbar durch eine geringere Intensität der Lucigenin-Chemilumineszenz stimulierter neutrophiler Granulozyten, vorinkubiert mit Antioxidantien, gegenüber stimulierten neutrophilen Granulozyten ohne Antioxidans (Medium, Med. mit PMA, bzw. Lösungsmittelkontrolle mit PMA).

Einfluss von Flavonoiden auf extrazelluläre ROS

Es wurden die Flavonoide Epicatechin, Catechinhydrat und Rutintrihydrat bezüglich ihrer Wirkung auf die Bildung von ROS in stimulierten neutrophilen Granulozyten untersucht. Wie bereits in der Luminol-Methode detektiert (Abbildung 24), hemmten die Antioxidantien Epicatechin und Rutintrihydrat signifikant und konzentrationsabhängig die extrazellulären ROS (Abbildung 27). Die beiden Flavonoide hemmen daher nicht nur die Produktion von MPO-spezifischen ROS wie OCI^- , $HO^\bullet$, sondern auch $O_2^{\bullet-}$. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Luminol-Methode (Abbildung 24 a) wies auch Catechinhydrat einen inhibitorischen Effekt in der höchsten getesteten Konzentration von 100 µM auf (Abbildung 27 a).

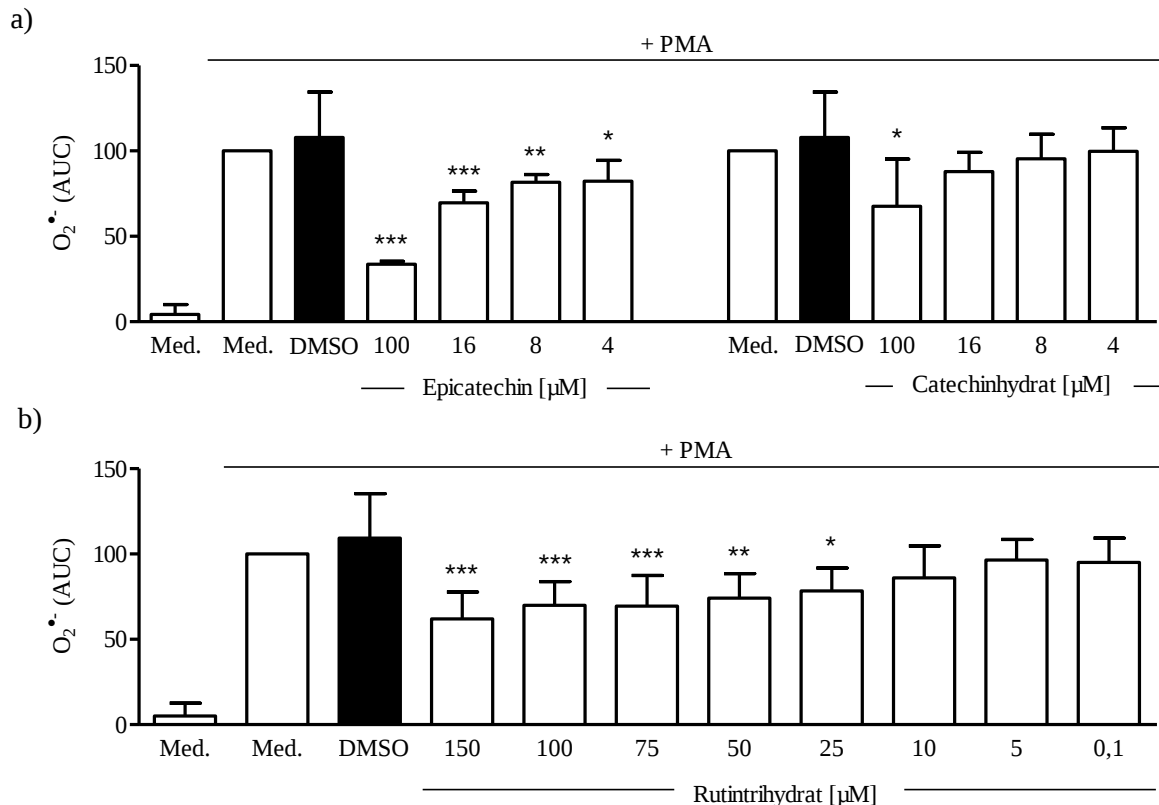


Abbildung 27: Detektion extrazellulärer ROS neutrophiler Granulozyten, inkubiert mit den Antioxidantien Epicatechin, Catechinhydrat und Rutintrihydrat

Je Ansatz wurden $0,4 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 200 μ l mit oder ohne Antioxidantien bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Zugabe von Lucigenin wurden die neutrophilen Granulozyten zur Induzierung der ROS-Bildung mit 20 nM PMA stimuliert. Die Kinetik der gebildeten, extrazellulären $O_2^{\bullet-}$ wurde über 1 h bei 37 °C gemessen. Die detektierten extrazellulären $O_2^{\bullet-}$ der neutrophilen Granulozyten, inkubiert mit (a) Epicatechin, Catechinhydrat und (b) Rutintrihydrat, wurden durch Berechnung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) ermittelt und anhand eines Balkendiagrammes dargestellt. Die Kontrolle ohne PMA (Medium, Med.) repräsentiert unbehandelte, nicht stimulierte neutrophile Granulozyten. Die Daten wurden auf die stimulierten neutrophilen Granulozyten ohne Antioxidans (Med. mit PMA) normalisiert. Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 5 (Epicatechin), 6 (Rutintrihydrat) beziehungsweise 7 (Catechinhydrat) unabhängigen Experimenten dargestellt. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, verglichen zur schwarz markierten Säule (PMA-stimulierte Probe ohne Antioxidans in Medium mit DMSO (DMSO) als Lösungsmittelkontrolle).

Detektion extrazellulärer ROS von mit Vitaminen als Antioxidantien inkubierten neutrophiler Granulozyten

Ascorbinsäure hemmte signifikant die extrazellulär vorliegenden ROS (2 mM, Abbildung 28 a), während die Inkubation neutrophiler Granulozyten mit Tocopherol keinen Einfluss auf die Produktion der ROS hatte (Abbildung 28 b). Diese Ergebnisse stimmten mit denen der Luminol-Methode überein, womit eine signifikante Hemmung der ROS durch Ascorbinsäure detektiert wurde, während unter Inkubation mit Tocopherol kein Einfluss auf die Bildung von MPO-spezifischen ROS festgestellt wurde (Abbildung 25).

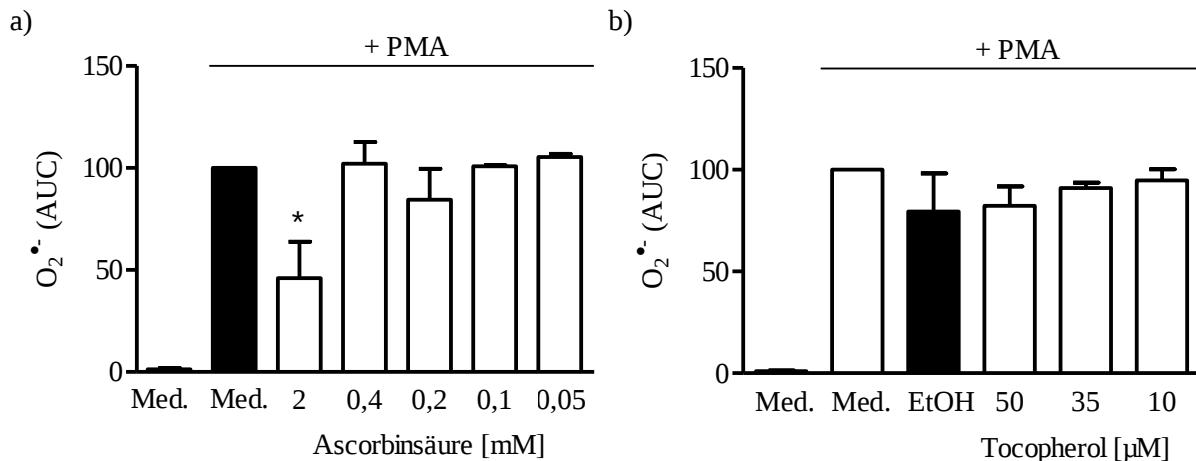


Abbildung 28: Detektion extrazellulärer ROS neutrophiler Granulozyten, inkubiert mit den Antioxidantien Ascorbinsäure oder Tocopherol

Je Ansatz wurden $0,4 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 200 µl mit oder ohne Antioxidantien bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Zugabe von Lucigenin wurden die neutrophilen Granulozyten zur Induzierung der ROS-Bildung mit 20 nM PMA stimuliert. Die Messung der Kinetik der gebildeten, extrazellulären O₂^{•-} erfolgte über 1 h bei 37 °C. Die detektierten extrazellulären O₂^{•-} der neutrophilen Granulozyten, inkubiert mit (a) Ascorbinsäure und (b) Tocopherol, wurden durch Berechnung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) ermittelt und anhand eines Balkendiagrammes dargestellt. Die Kontrolle ohne PMA (Medium, Med.) repräsentiert unbehandelte, nicht stimulierte neutrophile Granulozyten. Die Daten wurden auf die stimulierten neutrophilen Granulozyten ohne Antioxidans (Med. mit PMA) normalisiert. Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten dargestellt. *:p< 0,001, verglichen zur schwarz markierten Säule (PMA-stimulierte Probe ohne Antioxidans in Medium (Med.) beziehungsweise Medium mit Ethanol (EtOH) als Lösungsmittelkontrolle).

Einfluss pharmakologisch antioxidativer Substanzen auf extrazelluläre ROS in neutrophilen Granulozyten

Weiterhin wurde die Wirkung der pharmakologischen Substanzen Melatonin, ASS, NAC, Harnstoff und 5-ASA auf die extrazellulär vorliegende ROS stimulierter neutrophiler Granulozyten anhand der Lucigenin-Methode betrachtet. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Luminol-Methode (Abbildung 26 b) hemmte 5-ASA die ROS signifikant und konzentrationsabhängig (Abbildung 29 b). Außerdem inhibierte NAC die Oxidation von Lucigenin durch O₂^{•-} signifikant (5 mM, 10 mM) und konzentrationsabhängig (Abbildung 29 b). Im Gegensatz zu den mit der Luminol-Methode erhaltenen Ergebnissen hemmte das Hormon und Antioxidans Melatonin konzentrationsabhängig und signifikant (50 µM - 2000 µM) die extrazellulären ROS, detektiert durch die Lucigenin-Methode (Abbildung 29 a). Kein inhibitorischer Effekt wurde auf die extrazellulären ROS nach Inkubation neutrophiler Granulozyten mit ASS und Harnstoff detektiert (Abbildung 29). Dies stimmt mit den in der Luminol-Methode erhaltenen Ergebnissen überein (Abbildung 26).

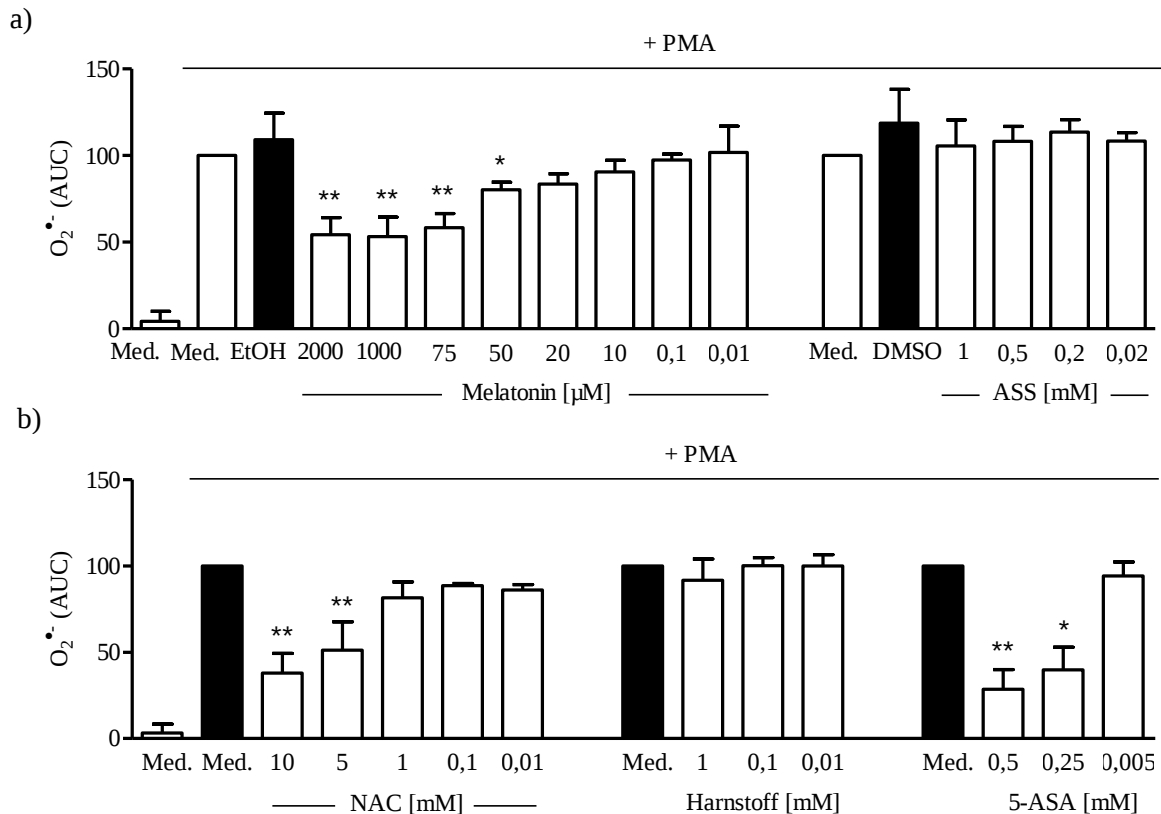


Abbildung 29: Detektion extrazellulärer ROS neutrophiler Granulozyten, inkubiert mit verschiedenen Antioxidantien

Je Ansatz wurden $0,4 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 200 μ l mit oder ohne Antioxidantien bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Zugabe von Lucigenin erfolgte die Stimulation der neutrophilen Granulozyten zur Induzierung der ROS-Bildung mit 20 nM PMA. Die Kinetik der gebildeten, extrazellulären $O_2^{\bullet-}$ wurde über 1 h bei 37 °C gemessen. Die detektierten extrazellulären $O_2^{\bullet-}$ der neutrophilen Granulozyten, inkubiert mit (a) Melatonin, Acetylsalicylsäure (ASS) und (b) N-Acetyl-L-cystein (NAC), Harnstoff und 5-Aminosalicylsäure (5-ASA), wurden durch Berechnung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) ermittelt und anhand eines Balkendiagrammes dargestellt. Die Kontrolle ohne PMA (Medium, Med.) repräsentiert unbehandelte, nicht stimulierte neutrophile Granulozyten. Die Daten wurden auf die unbehandelten, stimulierten neutrophilen Granulozyten (Med. mit PMA) normalisiert. Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 3 (NAC), 5 (Melatonin, ASS, 5-ASA), 6 (Harnstoff) unabhängigen Experimenten dargestellt. **: $p < 0,001$, *: $p < 0,05$, verglichen zur schwarz markierten Säule (PMA-stimulierte Probe ohne Antioxidans in Medium (Med.) beziehungsweise Medium mit Ethanol (EtOH) oder DMSO (DMSO) als Lösungsmittelkontrolle).

5.2.3 Einfluss verschiedener Antioxidantien auf die Bildung von NETs

Da die Bildung von NETs ROS-abhängig ist [34, 36], wurde untersucht, ob Radikalfänger die NET-Bildung hemmen. Die vorher beschriebenen ROS-Detektionsmethoden zeigten, dass Epicatechin, Catechinhydrat, Rutinrihydrat, Ascorbinsäure, sowie Melatonin, NAC und 5-ASA ROS in Kulturen PMA-stimulierter neutrophiler Granulozyten reduziert. Zur Untersuchung des Einflusses auf die NET-Bildung wurden nur die Konzentrationen an Antioxidantien verwendet, welche intra- und/oder extrazelluläre ROS signifikant gehemmt

haben. Der Einfluss auf die Bildung von NETs wurde bei Antioxidantien, welche keinen Einfluss auf die Bildung von ROS hatten, mit der höchsten getesteten Konzentration untersucht.

Detektion der gebildeten NETs

Vor der Induzierung der NET-Bildung durch 20 nM PMA wurden je Ansatz 200 µl $0,2 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten mit den angegebenen Antioxidantien bei 37° C inkubiert. Nach Zusatz von SYTOXgreen erfolgte anschließend die Analyse der NETs durch Messung der Fluoreszenz von DNA-gebundenem SYTOXgreen über 5 h. Alle getesteten Substanzen induzierten allein keine Bildung von NETs in nicht stimulierten neutrophilen Granulozyten (Daten nicht gezeigt). Aus den erhaltenen Kurven der ansteigenden Fluoreszenz von SYTOXgreen wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) berechnet. Diese wurde für jeden Ansatz auf stimulierte neutrophile Granulozyten ohne Antioxidans normalisiert und mittels Balkendiagramm dargestellt. Die Probe stimulierter neutrophiler Granulozyten in Medium stellte den 100 % Wert dar. Zur Analyse der Unterschiede in der NET-Bildung dienten jeweils die Ansätze stimulierter neutrophiler Granulozyten in Medium beziehungsweise Lösungsmittelkontrolle als Vergleichswerte (schwarze Balken).

Bildung von NETs in Anwesenheit von Epicatechin, Catechinhydrat und Rutintrihydrat

Die Inkubation neutrophiler Granulozyten mit Epicatechin, Catechinhydrat und Rutintrihydrat führte zur signifikanten Reduktion der detektierten Fluoreszenz von SYTOXgreen und somit der NET-Bildung (Abbildung 30). Dies steht mit der signifikanten Hemmung der ROS-Bildung im Einklang (Abbildung 24, Abbildung 27).

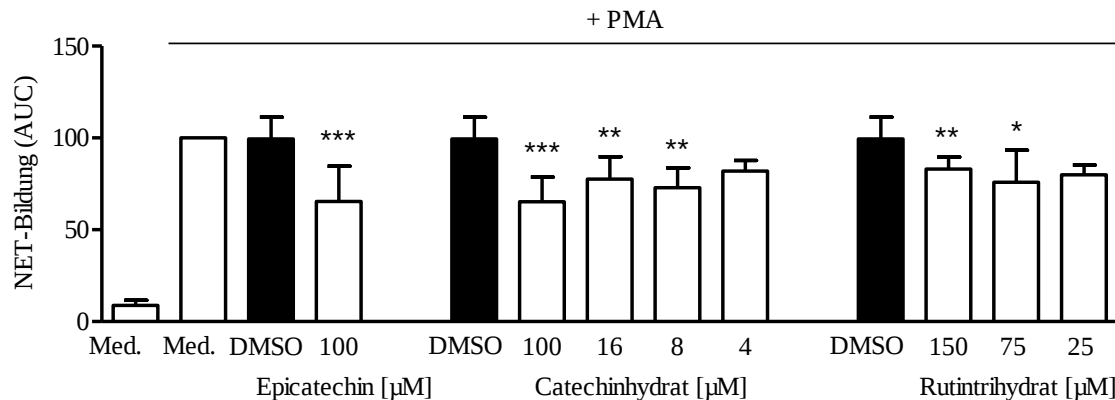


Abbildung 30: Bildung von NETs durch PMA stimulierte neutrophile Granulozyten, vorinkubiert mit verschiedenen Flavonoiden

Es wurden je Ansatz $0,2 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 200 µl mit oder ohne Antioxidans vorinkubiert und danach mit SYTOXgreen versetzt. Anschließend wurde die NET-Bildung durch Stimulation mit 20 nM PMA induziert und die fluoreszierte DNA über 5 h bei 37 °C durch Detektion des DNA-Farbstoffes SYTOXgreen gemessen. Die Bildung der NETs in Anwesenheit von den Flavonoiden Epicatechin, Catechinhydrat und Rutintrihydrat wurde durch Berechnung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) ermittelt. Diese wurde anhand eines Balkendiagrammes dargestellt. Die Kontrolle ohne PMA (Medium, Med.) repräsentiert unbehandelte, nicht stimulierte neutrophile Granulozyten. Die Daten wurden auf die unbehandelten, stimulierten neutrophilen Granulozyten (Med. mit PMA) normalisiert. Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 6 (Epicatechin, Catechinhydrat) beziehungsweise 8 (Rutintrihydrat) unabhängigen Experimenten dargestellt. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, verglichen zur schwarz markierten Säule (PMA-stimulierte Probe ohne Antioxidans in Medium mit DMSO (DMSO) als Lösungsmittelkontrolle).

Einfluss von Ascorbinsäure und Tocopherol auf die Bildung von NETs

Von den untersuchten antioxidativen Vitaminen Ascorbinsäure und Tocopherol hemmte die höchste Konzentration von Ascorbinsäure die Bildung der NETs, während Tocopherol keinen Effekt aufwies (Abbildung 31). Stimulierte neutrophile Granulozyten, welche mit Ascorbinsäure inkubiert worden waren, bildeten weniger ROS als unbehandelte, stimulierte neutrophile Granulozyten (Abbildung 25 a, Abbildung 28 a). Tocopherol hatte keinen Einfluss auf die ROS-Bildung in aktivierten neutrophilen Granulozyten (Abbildung 25 b, Abbildung 28 b). Erfolgte eine Hemmung der ROS-Bildung, wurde auch die NET-Bildung inhibiert.

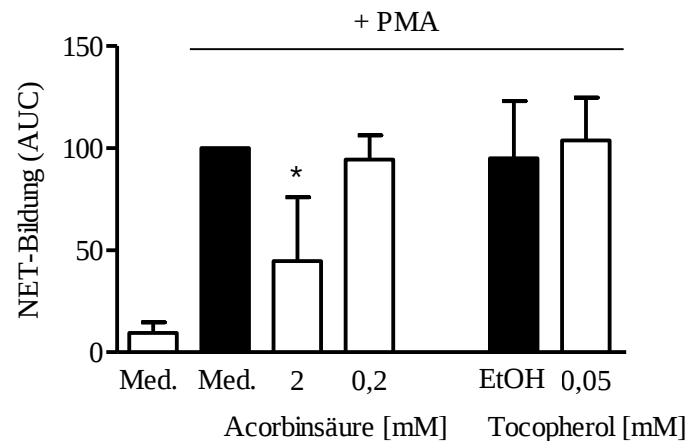


Abbildung 31: Bildung von NETs durch PMA stimulierte neutrophile Granulozyten, vorinkubiert mit Ascorbinsäure oder Tocopherol

Es wurden je Ansatz $0,2 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 200 μ l mit oder ohne Antioxidans vorinkubiert und danach mit SYTOXgreen versetzt. Anschließend wurde die NET-Bildung durch Stimulation mit 20 nM PMA induziert und die fluoreszierende DNA durch SYTOXgreen über 5 h bei 37 °C gemessen. Die Bildung der NETs in Anwesenheit von den Vitaminen Ascorbinsäure oder Tocopherol wurde durch Berechnung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) ermittelt und anhand eines Balkendiagrammes dargestellt. Die Kontrolle ohne PMA (Medium, Med.) repräsentiert unbehandelte, nicht stimulierte neutrophile Granulozyten. Die Daten wurden auf die stimulierten neutrophilen Granulozyten ohne Antioxidans (Med. mit PMA) normalisiert. Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten dargestellt. *: $p < 0,01$ verglichen zur schwarz markierten Säule (PMA-stimulierte Probe ohne Antioxidans in Medium (Medium) mit DMSO (DMSO) beziehungsweise Ethanol (EtOH) als Lösungsmittelkontrolle).

Antioxidative, pharmakologische Substanzen und deren Effekt auf die NET-Bildung

Neutrophile Granulozyten, welche mit NAC und 5-ASA vorinkubiert wurden, reduzierten signifikant die NET-Bildung (Abbildung 32 b). Im Gegensatz zur hemmenden Wirkung von Melatonin auf extrazelluläre ROS (Abbildung 29 a) war keine inhibitorische Wirkung auf NETs messbar (Abbildung 32 a). Harnstoff und ASS hatten keinen Einfluss auf die Bildung der NETs (Abbildung 32 b). Dies ist übereinstimmend mit den erhaltenen Daten der ROS-Detektionsmethoden. Sowohl in der Luminol-, als auch in der Lucigeninmethode hatten Harnstoff und ASS keinen Einfluss auf die ROS-Bildung stimulierter neutrophiler Granulozyten (Abbildung 26, Abbildung 29).

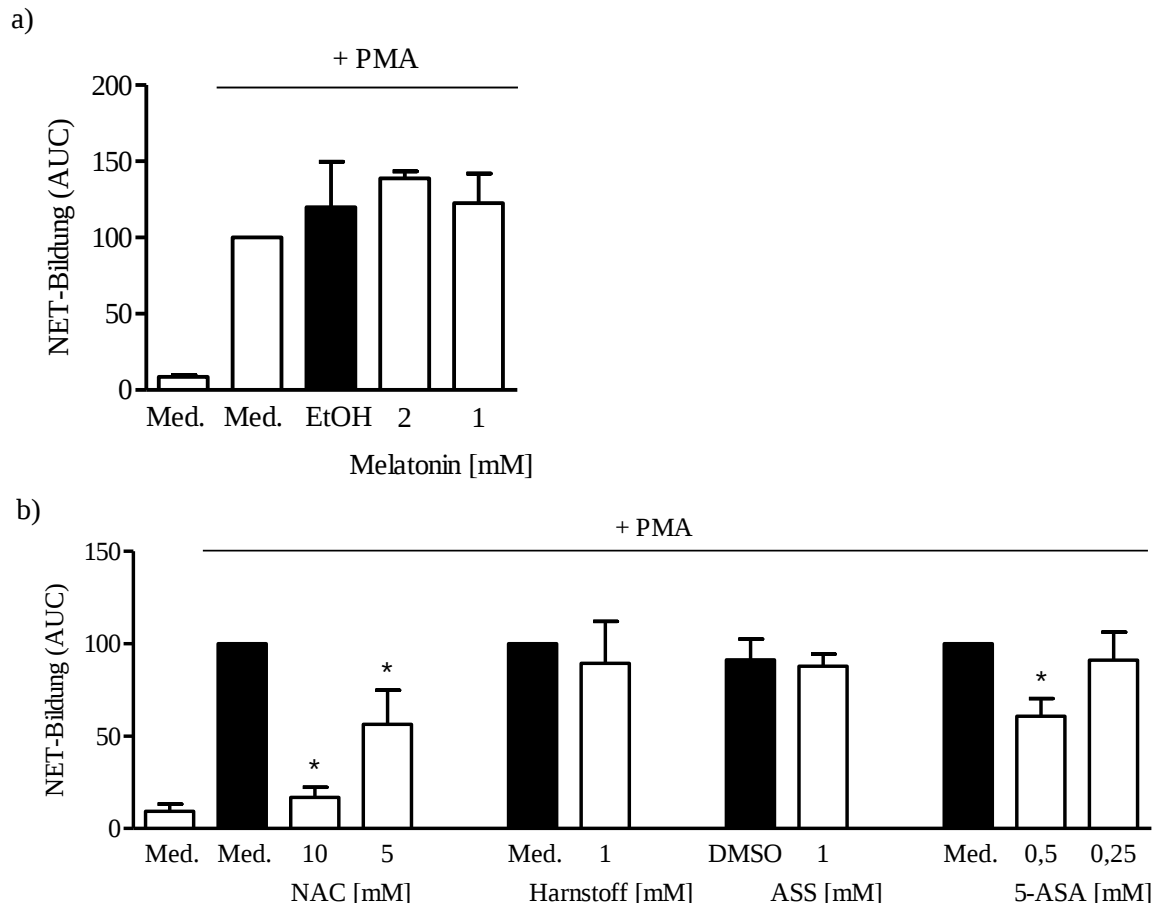


Abbildung 32: Bildung von NETs durch PMA stimulierte neutrophile Granulozyten, vorinkubiert mit verschiedenen Antioxidantien

Es wurden je Ansatz $0,2 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 200 μ l mit oder ohne Antioxidans vorinkubiert und danach mit SYTOXgreen versetzt. Anschließend wurde die NET-Bildung durch Stimulation mit 20 nM PMA induziert und die fluoreszierte DNA durch SYTOXgreen über 5 h bei 37 °C gemessen. Die Bildung der NETs in Anwesenheit von den pharmakologischen Substanzen a) Melatonin, (b) *N*-acetyl-L-cystein (NAC), Harnstoff, Acetylsalicylsäure (ASS), 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) wurde durch Berechnung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) ermittelt. Diese wurde anhand eines Balkendiagrammes dargestellt. Die Kontrolle ohne PMA (Medium, Med.) repräsentiert unbehandelte, nicht stimulierte neutrophile Granulozyten. Die Daten wurden auf die stimulierten neutrophilen Granulozyten ohne Antioxidans (Med. mit PMA) normalisiert. Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten dargestellt. *: $p < 0,001$, verglichen zur schwarz markierten Säule (PMA-stimulierte Probe ohne Antioxidans in Medium (Medium) oder wenn nötig in Medium mit Ethanol (EtOH) oder DMSO (DMSO) als Lösungsmittelkontrolle).

Mikroskopische Betrachtung der NETs

Um die bei der SYTOXgreen-Methode erhaltenen Ergebnisse zu validieren, wurden Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie (FM und REM) zur Analyse der NETs durchgeführt. Die NET-Bildung unbehandelter oder mit Antioxidantien behandelter neutrophiler Granulozyten (FM: 3×10^5 , REM: 1×10^6) wurde nach 3 h (FM)

beziehungsweise 3,5 h (REM) Stimulation mit PMA (20 nM) durch Fixieren gestoppt und analysiert.

Zunächst wurde die DNA mit SYTOXgreen und das mit NETs assoziierte Protein Myeloperoxidase mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper immunhistochemisch angefärbt. Nach der Stimulation mit PMA wurden die neutrophilen Granulozyten aktiviert und setzten NETs frei (Abbildung 33). Die immunhistochemische Färbung für Myeloperoxidase und DNA bestätigte die typische Struktur der NETs. Es war das DNA-Grundgerüst, assoziiert mit dem antimikrobiellen Protein MPO, sichtbar (Abbildung 33). Die NETs waren entweder als fädige (Abbildung 33 a, großer Pfeil und Abbildung 33 b) oder wolkenähnliche Strukturen (Abbildung 33 a, kleiner Pfeil) zu erkennen. Diese wolkenähnlichen Strukturen hatten ein vielfach größeres Volumen als das der lebenden Zellen, aus denen sie entstanden waren (Abbildung 33) [5, 25].

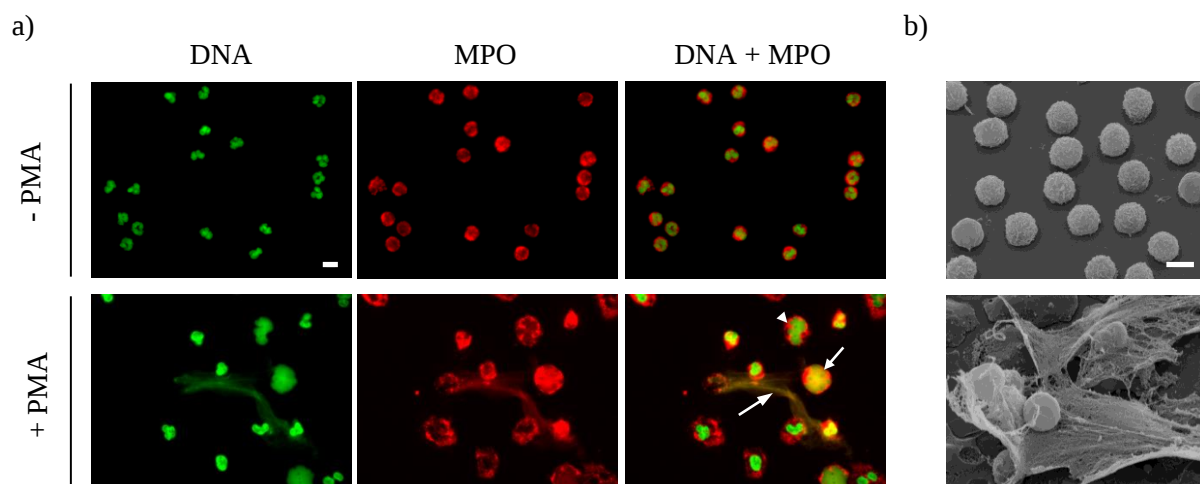


Abbildung 33: NET-Bildung nach PMA-Stimulation, visualisiert durch Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie

Es wurden je Ansatz $0,3 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 300 μl mit oder ohne Antioxidans bei 37°C vorinkubiert und danach die NET-Bildung durch Stimulation mit PMA induziert. In der oberen Reihe sind nicht stimulierte neutrophile Granulozyten abgebildet, in der unteren Reihe stimulierte neutrophile Granulozyten, welche NETs bilden. a) Es wurde die DNA mit SYTOXgreen (grün) und die Myeloperoxidase (MPO, rot) durch einen fluoreszenzmarkierten Antikörper angefärbt. Dargestellt sind die jeweiligen Einzelfärbungen sowie deren Überlagerung. Die NET-Freisetzung wurde nach 3 h PMA-Stimulation (10 nM) durch Fixieren gestoppt und die Präparate anschließend immunhistochemisch gefärbt. Die Pfeile markieren die typische fädige (großer Pfeil) oder wolkenähnliche (kleiner Pfeil) Strukturen der NETs. Die Pfeilspitze verdeutlicht die Durchmischung von Chromatin und zellulären Komponenten. Die Maßstabskala entspricht 10 μm . Die dargestellten Fluoreszenzbilder entsprechen alle der gleichen Größe und Auflösung. b) Rasterelektronenmikroskopische Analyse der NET-Bildung, induziert durch PMA (20 nM) und fixiert nach 3,5 h. Die dargestellten REM-Aufnahmen sind gleich groß und der Maßstabsbalken entspricht 5 μm .

Neutrophile Granulozyten, welche in die NETose gehen, unterscheiden sich stark von lebenden oder apoptotischen neutrophilen Granulozyten. Typisch ist die Durchmischung der zellulären Komponenten wie Nukleus und Granula. Dies konnte auch in der durchgeführten immunhistochemischen Färbung gezeigt werden (Abbildung 33 a, Pfeilspitze). Die nicht stimulierten neutrophilen Granulozyten, welche nicht in die NETose gingen, zeigten eine klare Trennung zwischen Nukleus und Chromatin sowie Granula und Myeloperoxidase (Abbildung 33 a).

Die durchgeführte fluoreszenzmikroskopische Analyse zur Untersuchung des Einflusses der Flavonoide Epicatechin, Catechinhydrat und Rutintrihydrat zeigten einen klaren inhibitorischen Effekt auf die NET-Bildung, verglichen zu den stimulierten neutrophilen Granulozyten, welche nicht mit den Flavonoiden behandelt wurden (DMSO, Lösungsmittelkontrolle) (Abbildung 34 a). Es waren weniger und zarte NETs sowie mehr intakte neutrophile Granulozyten in den PMA stimulierten neutrophilen Granulozyten sichtbar, welche mit Epicatechin, Catechinhydrat und Rutintrihydrat inkubiert worden waren. Die dazugehörige Probe der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) wies breitflächige, kompakte NETs auf (Abbildung 34 a). Die verwendeten Antioxidantien 5-ASA, NAC und Ascorbinsäure bestätigten einen starken hemmenden Effekt auf die NET-Bildung (Abbildung 34 b). Verglichen zur Kontrolle der stimulierten neutrophilen Granulozyten (Medium mit PMA) wurden fast keine NETs durch mit 5-ASA, NAC oder Ascorbinsäure inkubierte und stimulierte neutrophile Granulozyten freigesetzt (Abbildung 34 b). Des Weiteren blieben die mit diesen Antioxidantien behandelten stimulierten neutrophilen Granulozyten intakt (Abbildung 34 b). Die parallel dazu angefertigten REM-Bilder stimmten mit denen der fluoreszenzmikroskopischen Analyse überein (Abbildung 34). Die Antioxidantien, welche keinen signifikanten Einfluss auf die quantifizierte NET-Bildung hatten, zeigten auch in den durchgeführten FM- und REM-Analysen keinen Effekt auf die NET-Bildung (Daten nicht gezeigt).

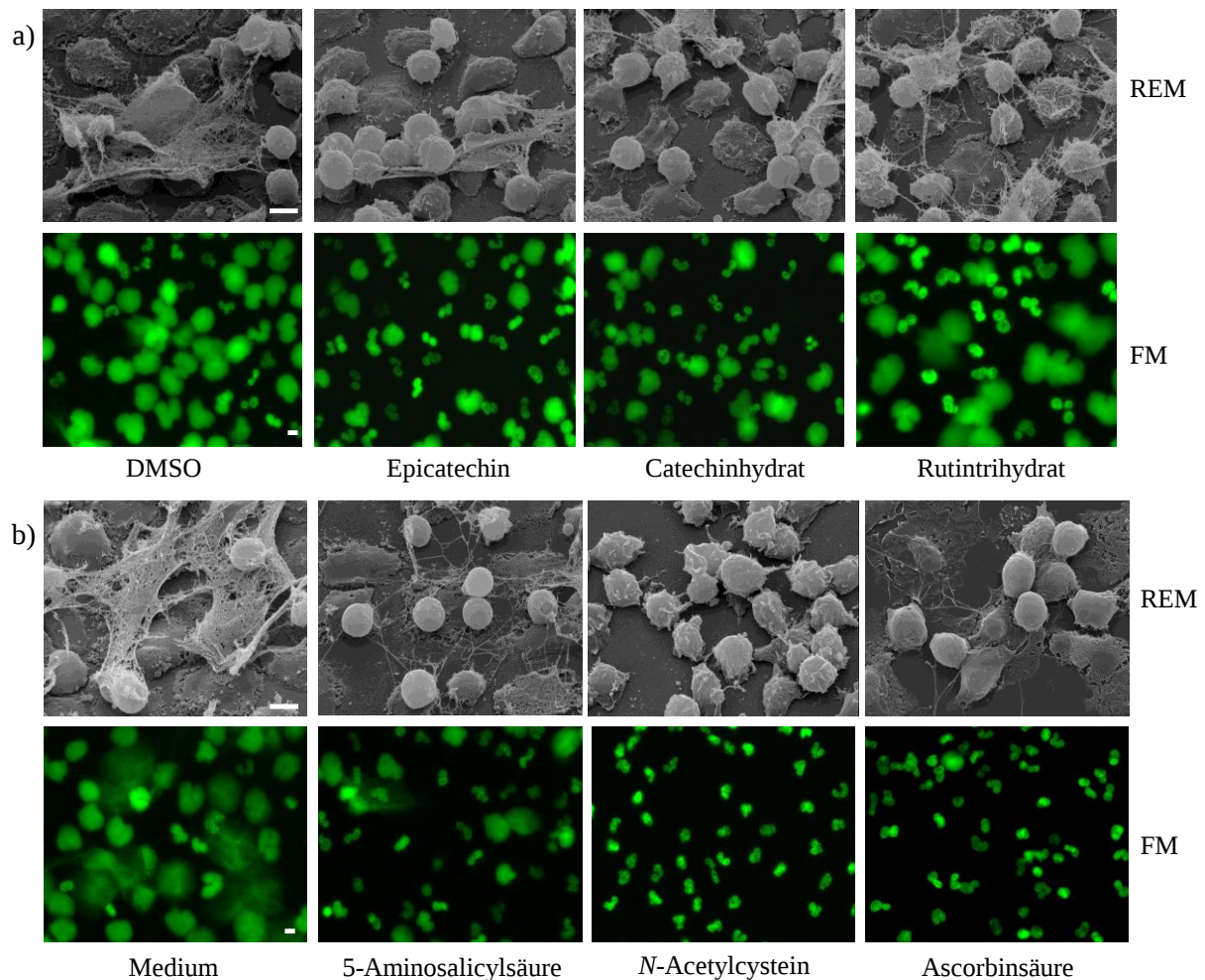


Abbildung 34: Bildung von NETs in PMA stimulierten neutrophilen Granulozyten, inkubiert mit verschiedenen Antioxidantien

Die Bildung der NETs wurde durch Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie (FM und REM) visualisiert. Die isolierten neutrophilen Granulozyten (FM: $0,3 \times 10^6/300 \mu\text{l}$, REM: $1 \times 10^6/1000 \mu\text{l}$) wurden mit oder ohne Antioxidans bei 37°C vorinkubiert. Die DNA wurde durch SYTOXgreen zur FM-Analyse versetzt. Die Induzierung von NETs erfolgte anschließend durch Zugabe von PMA (10 nM FM, 20 nM REM). Die Proben wurden nach 3 h (FM) und 3,5 h (REM) fixiert. Die Maßstabsbalken entsprechen $5 \mu\text{m}$ (REM) beziehungsweise $10 \mu\text{m}$ (FM). Alle Bilder wurden innerhalb der durchgeführten Technik (REM oder FM) in der gleichen Auflösung und Größe dargestellt. a) NET-Bildung von 0,1 mM Epicatechin, 0,1 mM Catechinhydrat und 0,075 mM Rutintrihydrat. Neutrophile Granulozyten, stimuliert mit PMA und koinkubiert mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle (DMSO) dienten als Vergleichskontrolle. b) Bildung von NETs stimulierter neutrophiler Granulozyten in Anwesenheit von 0,5 mM 5-Aminosalicylsäure, 10 mM *N*-acetylcystein und 2 mM Ascorbinsäure. Mit PMA stimulierte neutrophile Granulozyten (Medium) dienten als Vergleichskontrolle.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Antioxidantien wie (–)-Epicatechin und (+)-Catechinhydrat, Rutintrihydrat, Ascorbinsäure, *N*-acetyl-L-cystein und 5-Aminosalicylsäure die ROS-abhängige NET-Bildung in neutrophilen Granulozyten hemmen. Mit der Ausnahme von Melatonin hemmten alle Antioxidantien, welche signifikant

die ROS in neutrophilen Granulozyten inhibierten, auch die NET-Bildung. Dieser hemmende Effekt auf NETs wurde hier erstmals für die meisten Antioxidantien gezeigt.

5.3 Einfluss von Hypoxie und hypoxieähnlichen Bedingungen auf die Funktionen neutrophiler Granulozyten

Während gesundes Gewebe einen Sauerstoffgehalt von 2,5 - 9 % aufweist, herrscht in Wunden und am Ort einer Entzündung eine deutlich geringere Sauerstoffkonzentration ($< 1 \% \text{O}_2$) [101]. In Zellkulturexperimenten wird Hypoxie bei Vorliegen einer Sauerstoffkonzentration von $< 3 \% \text{O}_2$ definiert und der atmosphärische Sauerstoffgehalt ($21 \% \text{O}_2$) beziehungsweise der im Brutschrank herrschende Sauerstoffgehalt ($20 \% \text{O}_2$) als Normoxie bezeichnet [70]. Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe wiesen auf eine erhöhte ROS- und NET-Bildung der neutrophilen Granulozyten unter Hypoxie ($2 \% \text{O}_2$) im Vergleich zur Normoxie im Brutschrank ($20 \% \text{O}_2$) hin [102]. Um zu klären, inwieweit Hypoxie die Bildung von ROS und NETs beeinflusst, wurden parallel Versuche unter $2 \% \text{O}_2$ (Hypoxie) und $20 \% \text{O}_2$ (Normoxie) durchgeführt. Zusätzlich wurden Experimente bei $20 \% \text{O}_2$, in Anwesenheit von DMOG, welches hypoxische Bedingungen nachahmt, ausgeführt.

5.3.1 Einfluss von Hypoxie auf die Funktionen neutrophiler Granulozyten

Nachweis hypoxischer Bedingungen durch Stabilisierung von HIF-1 α

In den folgenden Studien wurden neutrophilen Granulozyten ($5 \times 10^6/\text{ml}$) in der Hypoxie-Kammer bei $2 \% \text{O}_2$, $5 \% \text{CO}_2$, 37°C unter Hypoxie inkubiert. Die Detektion des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF)-1 α mittels Western Blot beweist das Vorhandensein hypoxischer Bedingungen. HIF-1 α wird unter Hypoxie in Zellen stabilisiert, wo er maßgeblich zur zellulären Anpassung an den Sauerstoffstress beiträgt [70, 101]. Um sicher zu stellen, dass die Zellen sich an die Hypoxie adaptiert haben und tatsächlich hypoxische Bedingungen während des Experimentes vorherrschten, wurde ein Western Blot zur Detektion des stabilisierten HIF-1 α etabliert und durchgeführt.

Als Positivkontrolle für HIF-1 α wurden Lysate von HEp-2-Zellen hergestellt. Dazu wurden $0,25 \times 10^6$ HEp-2-Zellen für 2 h bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen ($2 \% \text{O}_2$, $20 \% \text{O}_2$) oder in Anwesenheit von DMOG ($0,5 \text{ mM}$, 1 h Vorinkubation) zur Nachahmung hypoxieähnlicher Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 4 h mit 20 nM PMA stimuliert und danach lysiert. Es wurden nicht stimulierte und mit PMA (20 nM) stimulierte Ansätze verwendet (Abbildung 35). Die Detektion von HIF-1 α erfolgte mittels

SDS-PAGE und Western Blot-Analyse des mit spezifischen Antikörpern markierten Proteins. Bei der anschließend durchgeführten Detektion von β -Aktin wurde sichergestellt, dass die Menge an aufgetragenem Protein zwischen den Proben vergleichbar war (Abbildung 35).

Alle bei 2 % O_2 oder mit DMOG inkubierten und anschließend lysierten Ansätze der HEp-2-Zellen wiesen ein Signal für HIF-1 α auf. In den Ansätzen mit HEp-2-Zellen, welche bei 20 % O_2 inkubiert wurden, konnte hingegen erwartungsgemäß kein Signal für HIF-1 α detektiert werden. Die stärksten Banden des Proteins wurden hierbei durch Inkubation der HEp-2-Zellen mit DMOG erhalten (Abbildung 35).

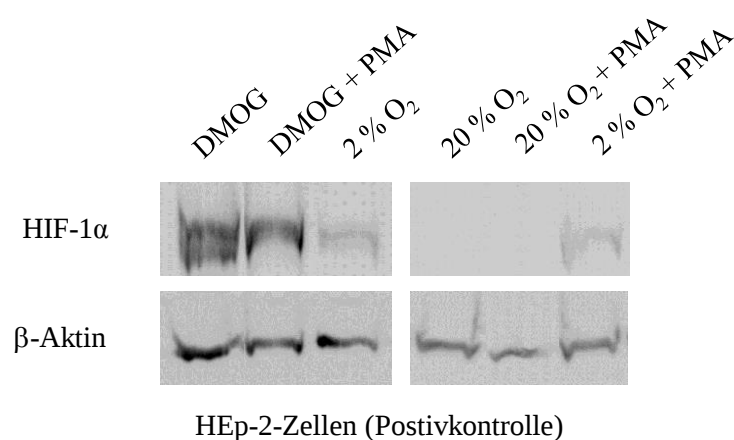


Abbildung 35: Detektion von HIF-1 α in lysierten HEp-2-Zellen mittels Western Blot

Nach 2 h Inkubation von $0,25 \times 10^6$ HEp-2-Zellen bei einem O_2 -Gehalt von 2 %, 20 % O_2 oder 20 % O_2 mit DMOG-Vorinkubation (0,5 mM, 60 min), erfolgte die Stimulation mit 20 nM PMA für 4 h. Danach erfolgte die Lyse der Ansätze und die Durchführung des Western Blots. Der Nachweis von β -Aktin wurde als Kontrolle des gleichmäßigen Proteingehaltes zwischen den aufgetragenen Proben durchgeführt.

Als Positivkontrolle für alle folgenden Western Blot-Analysen zum Nachweis der Stabilisierung von HIF-1 α in neutrophilen Granulozyten wurden Lysate nicht stimulierter, unter 2 % O_2 inkubierter HEp-2-Zellen, verwendet. Für die Detektion von HIF-1 α in neutrophilen Granulozyten mittels Western-Blot wurden alle Ansätze vor der Versuchsdurchführung für 2 h bei 2 % O_2 bzw. 20 % O_2 inkubiert. Danach wurden die neutrophilen Granulozyten je nach Versuchsansatz für 4 h mit bzw. ohne PMA bei 2 % O_2 bzw. 20 % O_2 inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der nicht stimulierten und für 4 h mit PMA stimulierten neutrophilen Granulozyten. Um einen möglichen Einfluss von ROS auf die Stabilisierung von HIF-1 α zu untersuchen, wurden neutrophile Granulozyten (5×10^6 /ml) vor der Induzierung der ROS-Bildung durch PMA (20 nM) mit DPI unter 2 % O_2 inkubiert. DPI hemmt die NADPH-Oxidase und die Atmungskette der Mitochondrien, wodurch auch die

durch PMA induzierte ROS-Produktion neutrophiler Granulozyten inhibiert wird. Die Proteine der gewonnenen Zelllysate wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und nach dem anschließenden Blotting das HIF-1 α -Protein detektiert.

Erstmals wurde in dieser Arbeitsgruppe ein Signal für HIF-1 α von nicht stimulierten neutrophilen Granulozyten, kultiviert unter 2 % O₂, detektiert (Abbildung 36). Des Weiteren wurde die Stabilisierung des Proteins von PMA-stimulierten neutrophilen Granulozyten sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie nachgewiesen. In einem Pilotversuch wurden bei einer Stimulation mit 100 ng/ml LPS ähnliche Ergebnisse erzielt (Daten nicht gezeigt). In Makrophagen wurde bereits die Induzierung des Proteins HIF-1 α unter Normoxie durch LPS beschrieben [103]. Das Signal unter Hypoxie (2 % O₂) kultivierter neutrophiler Granulozyten für HIF-1 α mit PMA-Stimulation war deutlich stärker als die Bande der mit DPI inkubierten PMA-stimulierten neutrophilen Granulozyten in Anwesenheit von 2 % O₂ (Abbildung 36, obere Reihe). Die als Negativkontrolle mitgeführten unter Normoxie (20 % O₂) kultivierten nicht stimulierten neutrophilen Granulozyten wiesen erwartungsgemäß keine Bande für HIF-1 α auf (Abbildung 36).

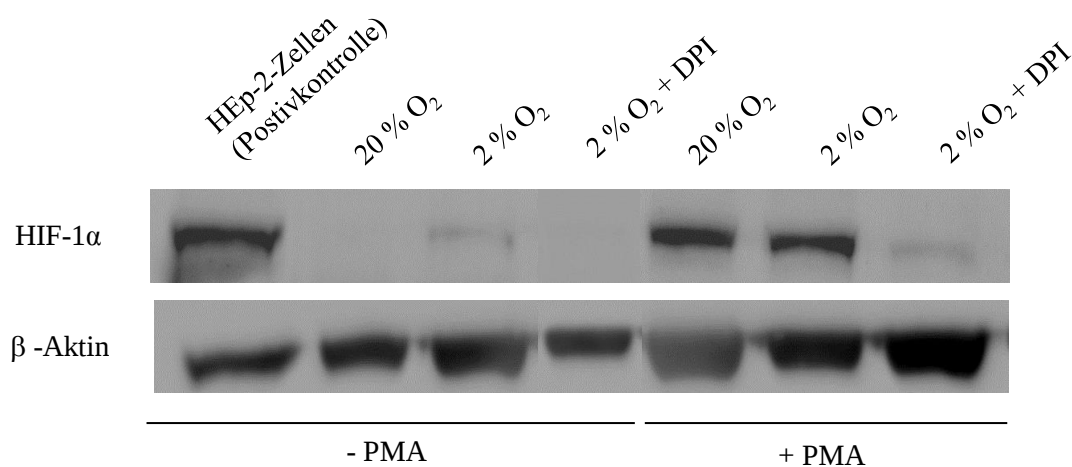


Abbildung 36: Nachweis von HIF-1 α in Lysaten neutrophiler Granulozyten mittels Western Blot

Nach 2 h Inkubation von 5×10^6 /ml neutrophilen Granulozyten bei einem O₂-Gehalt von 2 % bzw. 20 % O₂ und je nach Ansatz Vorinkubation mit DPI (20 μ M, 30 min) erfolgte die Stimulation mit 20 nM PMA für 4 h. Danach erfolgte die Lyse der Ansätze und die Durchführung des Western Blots. Lysate nicht stimulierter und unter Hypoxie inkubierter HEp-2-Zellen dienten als Positivkontrolle für das HIF-1 α -Signal. Der Nachweis von β -Aktin wurde als Kontrolle des gleichmäßigen Proteingehaltes zwischen den aufgetragenen Proben durchgeführt.

Die Ergebnisse deuten auf eine ROS-abhängige Stabilisierung von HIF-1 α hin. Die Proben nicht stimulierter neutrophiler Granulozyten, welche mit DPI vorinkubiert wurden, wiesen unter Hypoxie (Abbildung 36) keine Stabilisierung von HIF-1 α auf. Die Banden des zur

Beladungskontrolle markierten β -Aktins belegen, dass die Proben gleichmäßig aufgetragen wurden. Die β -Aktin-Bande der aufgetragenen, unter Hypoxie gewonnenen HEp-2-Zellysate, war aufgrund der verwendeten geringeren Zellzahl ($0,25 \times 10^6$) im Vergleich zu den Lysaten der neutrophilen Granulozyten (5×10^6) dünner (siehe Abbildung 36, untere Reihe).

Detektion intrazellulärer ROS unter Hypoxie (2 % O₂)

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist ein wichtiger Abwehrmechanismus neutrophiler Granulozyten gegenüber Pathogenen. Der Einfluss von niedriger (2 %) und hoher (20 %) Sauerstoffkonzentration auf diesen wichtigen Effektormechanismus der neutrophilen Granulozyten wurde daher untersucht. Hierfür wurde die DHR 123-Methode zur Detektion intrazellulärer ROS angewendet. Die neutrophilen Granulozyten ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden 2 h bei 2 % O₂ bzw. 20 % O₂ inkubiert. Bei Kostimulation mit LPS und fMLP wurden die Ansätze zunächst 1 h mit LPS (125 ng/ml) im Brutschrank vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit fMLP (1 μM). Alle anderen Proben wurden mit PMA (20 nM, 20 μM) zur Induzierung der ROS-Produktion versetzt. Die intrazelluläre ROS-Bildung wurde nach 5 min bzw. 30 min analysiert. Als Kontrolle wurden nicht stimulierte neutrophile Granulozyten mitgeführt.

Die in der DHR 123-Methode gemessene Fluoreszenzintensität ist proportional der Menge an gebildeten intrazellulären ROS in den stimulierten neutrophilen Granulozyten. Eine Rechtsverschiebung der Fluoreszenzkurven hin zu höheren Intensitäten des gebildeten Rhodamins 123 bedeutet eine stärkere Bildung von ROS. In Abbildung 37 a, b sind die Histogramme der Fluoreszenzen eines Experimentes beispielhaft dargestellt. Hierbei wurden jeweils die Kurven der verschiedenen Stimuli unter 20 % und 2 % O₂ nach 5 min und 30 min aufgetragen. Das errechnete geometrische Mittel (GeoMean) wurde als Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung in Balkendiagrammen aufgetragen (Abbildung 37 c, d). Nach 5 min Stimulation in Anwesenheit von 2 % O₂ mit 20 μM PMA war die ROS-Bildung gegenüber der 20 % igen O₂-Konzentration stark und signifikant erhöht (Abbildung 37 a, c). Jedoch kehrte sich dieser Effekt nach 30 min Stimulation deutlich um. Hier war die Bildung der ROS unter Normoxie höher und signifikant stärker als unter Hypoxie (20 μM PMA, Abbildung 37 b, d). Die Proben unter fMLP und LPS-Kostimulation wiesen ähnliche, aber nicht signifikante Tendenzen zwischen den verschiedenen O₂-Konzentrationen in der ROS-Bildung nach 5 min und 30 min auf (Abbildung 37 c, d). Mit 20 nM PMA stimulierte neutrophile Granulozyten wiesen keine detektierbare ROS-Bildung verglichen zu den nicht stimulierten Ansätzen auf (Abbildung 37).

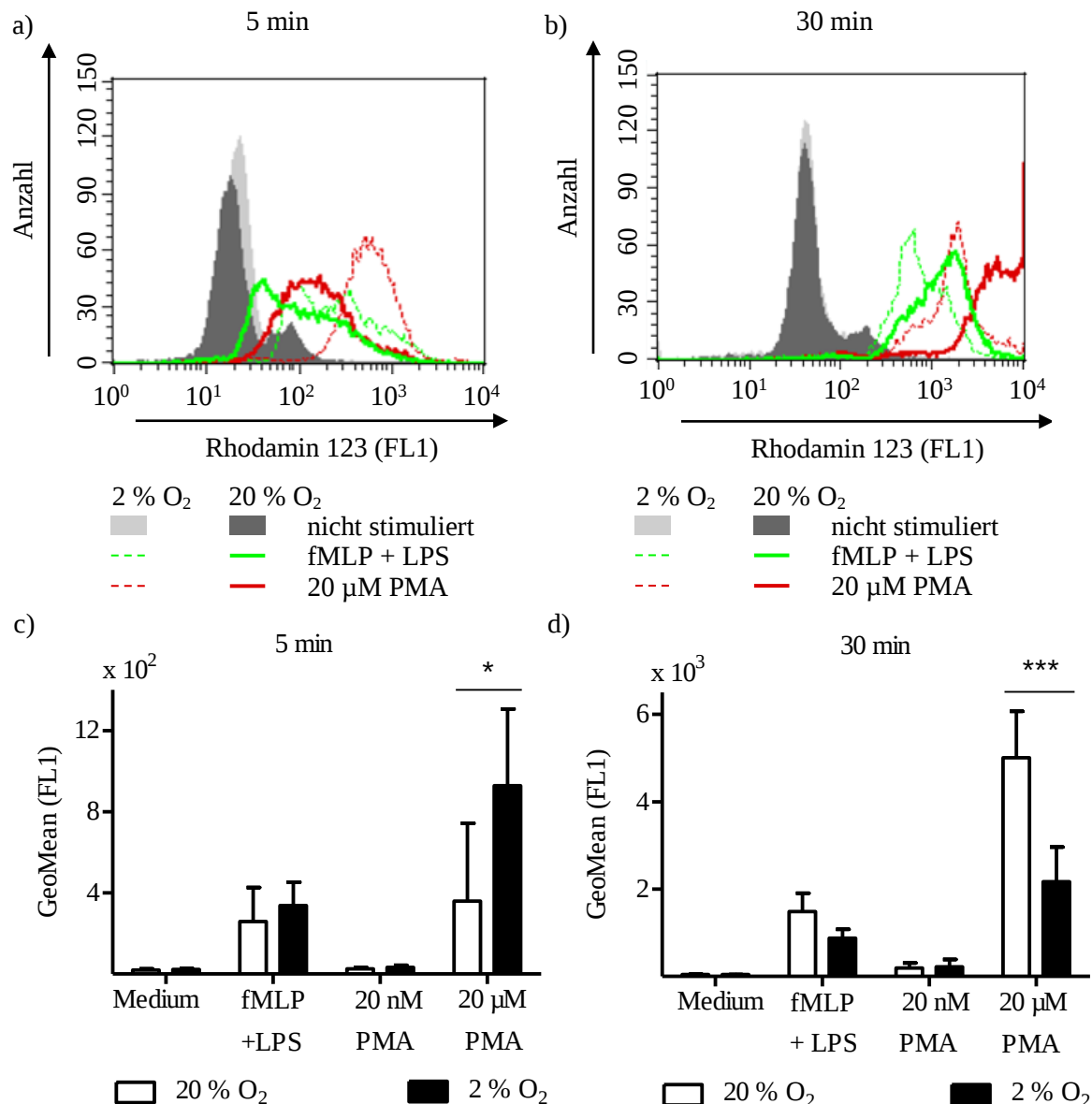


Abbildung 37: Produktion intrazellulärer ROS unter verschiedenen O₂-Konzentrationen

Nach 2 h Inkubation von $0,5 \times 10^6$ neutrophilen Granulozyten in 100 µl je Ansatz bei einem Gehalt von 2 % bzw. 20 % O₂ und Stimulation wurde die intrazelluläre ROS-Produktion anhand der DHR 123-Methode analysiert. Die Zellen wurden mit fMLP + LPS (1 µM + 125 ng/ml) oder PMA (20 nM, 20 µM) zur Bildung von ROS für 5 min bzw. 30 min angeregt. (a, b) Beispielhafte Darstellung der überlagerten Histogramme der Fluoreszenzintensitäten von Rhodamin 123 (FL1) als Maß für die Bildung von ROS nach 5 und 30 min Stimulation von einem Experiment in Anwesenheit von 2 % O₂ (hellgrau; gestrichelte Linien) und 20 % O₂ (dunkelgrau; durchgezogene Linien). Es wurden die Fluoreszenzintensitäten neutrophiler Granulozyten stimuliert mit fMLP + LPS (1 µM + 125 ng/ml, grün) bzw. mit PMA (20 µM, rot) sowie als Kontrolle die nicht stimulierte Probe (grau, ausgefüllt) dargestellt. (c, d) Auswertung der intrazellulären ROS-Produktion nach 5 und 30 min. Es wurden die geometrischen Mittelwerte (GeoMean) und die Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$.

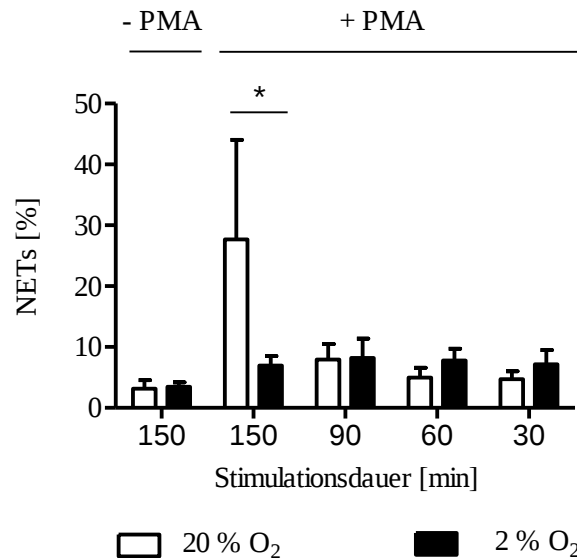
Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf die Bildung von NETs

Es wurde eine erhöhte ROS-Produktion nach 5 min und eine gehemmte ROS-Produktion nach 30 min Stimulation unter 2 % O₂ gegenüber 20 % O₂ detektiert. Der Einfluss verschiedener Sauerstoffkonzentrationen auf die ROS-abhängige NET-Bildung bis 150 min wurde daher als nächstes untersucht. Hierfür wurden $0,5 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten, eingestellt auf eine Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$, zur Adaption für 2 h unter Hypoxie bzw. Normoxie vorinkubiert. Durch anschließende Zugabe von PMA (20 nM) wurde die NET-Bildung induziert. Nach dem Abstoppen der Reaktion (30, 60 und 150 min) erfolgte die Quantifizierung der gebildeten NET-DNA. Die im Experiment isolierte genomische DNA der neutrophilen Granulozyten wurde hierfür als 100 % Wert angenommen.

Nach 150 min bei 2 % O₂ wurde die Bildung von NETs im Vergleich zu 20 % O₂ signifikant gehemmt. Während nach 150 min die NET-Bildung bei 20 % O₂ bereits ~ 28 % betrug, lag sie bei 2 % O₂ bei 7 % (Abbildung 38 a). Nach 150 min bei 2 % O₂ wurde keine erhöhte NET-Bildung verglichen mit den nicht stimulierten neutrophilen Granulozyten unter 2 % O₂ (3 %) gemessen. Es wurde nach 30 min, 60 min und 90 min Induzierung von NETs durch PMA keine signifikante NET-Bildung sowohl unter 2 % O₂ als auch bei 20 % O₂ detektiert (Abbildung 38 a). Die mikroskopischen Analysen deuten ebenfalls auf die Hemmung der NET-Bildung unter 2 % O₂, verglichen zu 20 % O₂, hin (Daten nicht gezeigt). Eine Induzierung von NETs von nicht stimulierten neutrophilen Granulozyten konnte bei 2 % O₂ nicht nachgewiesen werden (Abbildung 38 a).

Zusätzlich wurden neben PMA auch Pilotversuche mit Glucoseoxidase (5 mU/ml) und *Staphylococcus aureus* (RN 4220, 5 Mio/ml) als weitere Stimuli zur Induzierung von NETs durchgeführt (Abbildung 39). Auch hier schien die NET-Bildung, induziert durch Glucoseoxidase, bei 2 % O₂ im Vergleich zu 20 % O₂ gehemmt zu werden (Abbildung 39 a). Bei der Induzierung von NETs nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* konnte jedoch unter 2 % O₂ eine tendentiell erhöhte NET-Bildung, verglichen zu den nicht stimulierten Ansätzen nach 210 min, detektiert werden (Abbildung 39 b). Es wurde beschrieben, dass nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* innerhalb der ersten zwei Stunden ROS unabhängig NETs gebildet werden [26]. Da in dieser Arbeit die ROS-abhängige NET-Bildung im Vordergrund stand, wurde die *Staphylococcus aureus* induzierte NET-Bildung neutrophiler Granulozyten nicht näher untersucht. Die Daten dieser Arbeit deuten allerdings darauf hin, dass Hypoxie die ROS-abhängige Bildung von NETs inhibiert.

a)



b)

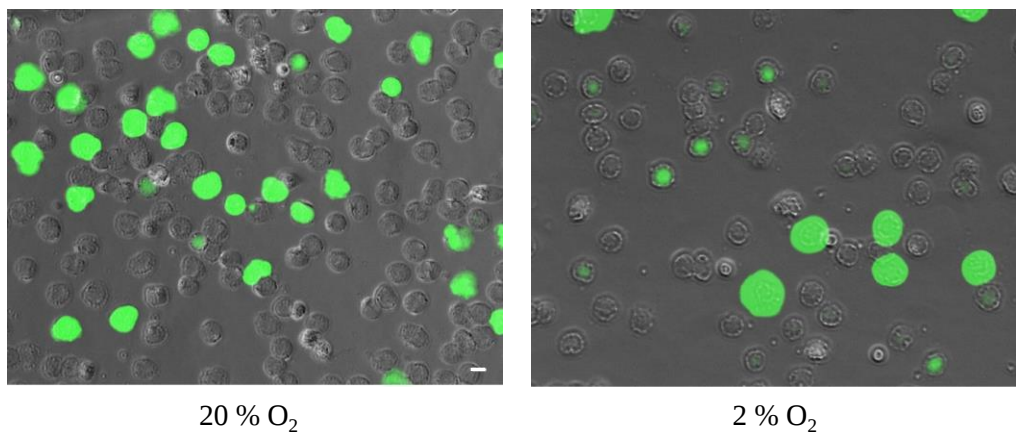


Abbildung 38: Einfluss von Hypoxie (2 % O₂) auf die NET-Bildung

(a) Je Ansatz wurden $0,5 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 500 μ l 2 h unter 2 % O₂ bzw. 20 % O₂ vorinkubiert und anschließend zur Induzierung von NETs mit PMA (20 nM) für 30 - 150 min stimuliert. Die gebildete NET-DNA wurde prozentual zur parallel gewonnenen gesamten genomischen DNA errechnet. Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 7 unabhängigen Experimenten dargestellt. ***: $p < 0,001$. (b) Zur Visualisierung der NETs wurden $0,2 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten (1×10^6 /ml) mit SYTOXgreen (200 nM) angefärbt und anschließend mit PMA (10 nM) stimuliert. Die Ansätze wurden über 10 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 20 % bzw. 2 % O₂ inkubiert. Über diesen Zeitraum wurde alle 10 min ein Bild im Durchlicht- und Fluoreszenzkanal aufgenommen. Die Überlagerungen des Durchlichtbildes mit dem Fluoreszenzbild nach 150 min bei 20 % O₂ beziehungsweise 2 % O₂ wurden dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. Beide Bilder entsprechen gleicher Größe und Auflösung.

In den durchgeführten Experimenten zur Rolle von Hypoxie auf die NET-Bildung konnten aus technischen Gründen nur Endpunktzeitmessungen durchgeführt werden. Da die Bildung von NETs je nach Spender unterschiedlich schnell verläuft würde eine Zeitkinetik zur Detektion der NET-Bildung unter Hypoxie klarere Ergebnisse liefern. Um einen Hinweis zur Rolle von Hypoxie auf die NET-Bildung über einen längeren Zeitraum zu erhalten, wurden über 4 h alle 30 min ein Durchlicht- und Fluoreszenzbild mit dem BZ9000E-Mikroskop von

stimulierten (10 nM PMA) und mit dem DNA-Farbstoff SYTOXgreen (200 nM) versetzten neutrophilen Granulozyten ($1 \times 10^6/\text{ml}$) erstellt. Der Versuch wurde an einem Tag unter Hypoxie und am darauffolgenden Tag unter Normoxie durchgeführt. Hierfür wurden die vom gleichen Spender isolierten neutrophilen Granulozyten in einer speziellen Inkubatorkammer des Mikroskopes während des Experimentes inkubiert. Diese wurde je nach Experiment auf 2 % O_2 bzw. 20 % O_2 und 5 % CO_2 , 37 °C eingestellt. Als Kontrolle dienten nicht stimulierte neutrophile Granulozyten. Die übereinandergelegten Durchlicht- und Fluoreszenzbilder nach 150 min Inkubation von stimulierten neutrophilen Granulozyten sind in Abbildung 38 b dargestellt und zeigen eine verringerte NET-Bildung in Anwesenheit von 2 % O_2 verglichen zur Probe unter 20 % O_2 . Dies stimmt mit den vorherigen Daten überein und bestätigt, dass Hypoxie die Bildung von NETs inhibiert.

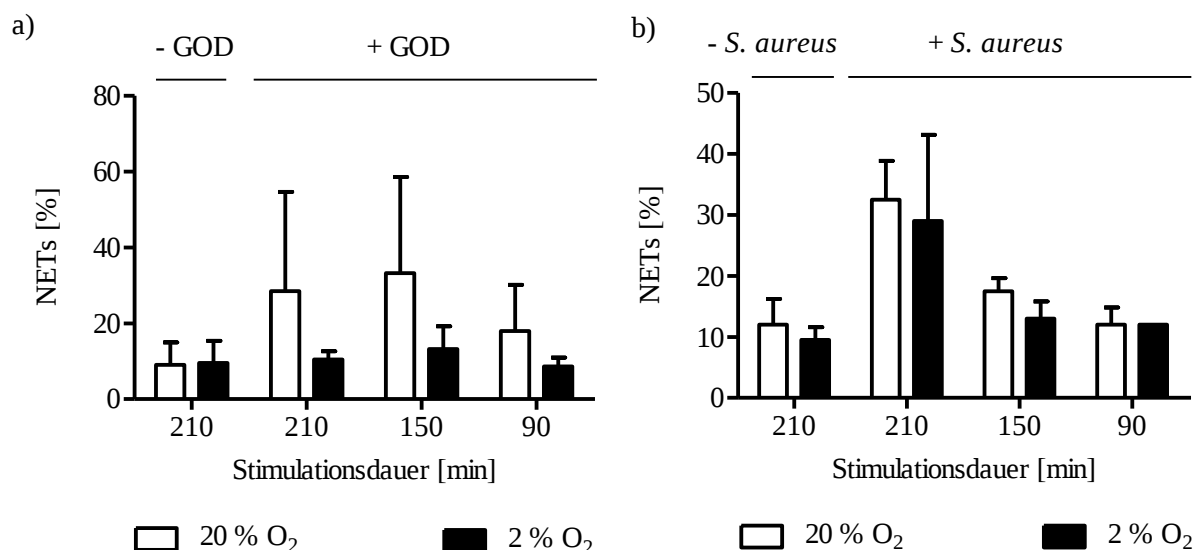


Abbildung 39: Einfluss von Hypoxie (2 % O_2) auf die NET-Bildung, induziert durch Glucoseoxidase und *Staphylococcus aureus*

Je Ansatz wurden $0,5 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 500 μl 2 h unter 2 % O_2 bzw. 20 % O_2 vorinkubiert und anschließend zur Induzierung von NETs mit a) Glucoseoxidase (GOD, 5 mU/ml) oder b) *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, RN 4220, 5 Mio/ml) für 90 - 210 min stimuliert. Die gebildete NET-DNA wurde prozentual zur parallel gewonnenen gesamten genomischen DNA errechnet. Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 3 (GOD) beziehungsweise 2 (*S. aureus*) unabhängigen Pilotversuchen dargestellt.

5.3.2 Nachahmung hypoxischer Bedingungen durch DMOG und dessen Einfluss auf die Funktionen neutrophiler Granulozyten

In den in dieser Arbeit vorgestellten Studien bewirkt Hypoxie (2 % O_2) in PMA stimulierten neutrophilen Granulozyten eine Hemmung der Produktion von ROS und der Bildung von NETs. Die in Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe gemessene Induzierung von NETs durch

Hypoxie steht im Gegensatz zu den hier detektierten Ergebnissen. Daher wurde eine weitere Studie mittels DMOG durchgeführt, um die Rolle von Hypoxie beziehungsweise HIF-1 α auf NETs zu untersuchen. DMOG stabilisiert HIF-1 α unter Normoxie (20 % O₂) und bewirkt daher hypoxieähnliche Bedingungen für die Zellen.

Einfluss von DMOG auf die Apoptose und Zellvitalität neutrophiler Granulozyten

Um einen schädlichen Einfluss von DMOG auf die neutrophilen Granulozyten ($5 \times 10^6/\text{ml}$) auszuschließen, wurden die Apoptose- und Nekroseraten in Anwesenheit von DMOG bestimmt. Hierfür wurden die neutrophilen Granulozyten mit DMOG (0,5 mM, 1 mM) für 4 h in NET-Medium inkubiert. Um den Effekt von PMA (20 nM) in Kombination mit DMOG zu untersuchen, wurde ein Teil der Proben 3 h mit PMA stimuliert. DMOG beeinflusst weder die Apoptose noch die Nekrose neutrophiler Granulozyten verglichen zu unbehandelten Zellen. Nach 4 h Inkubation der neutrophilen Granulozyten mit DMOG wurden keine erhöhten Apoptose- und Nekroseraten gegenüber den Zellen, die in Medium allein oder mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle inkubiert wurden, festgestellt (DMOG: ~ 10 % Apoptose, 2 % Nekrose, Medium und DMSO: ~ 13 % Apoptose, 2 % Nekrose; Abbildung 40 a). Wurden die neutrophilen Granulozyten währenddessen zusätzlich für 3 h mit PMA stimuliert, erhöhte sich der Anteil nekrotischer neutrophiler Granulozyten gegenüber den nicht stimulierten Ansätzen (Abbildung 40). Des Weiteren wurde bei 1 mM DMOG-Inkubation in Kombination mit Stimulation durch PMA eine erhöhte Nekroserate von 1 mM DMOG im Vergleich zur 0,5 mM DMOG-Konzentration (0,5 mM: 5 %, 1 mM: 10 %) gemessen. Die Nekroserate der stimulierten neutrophilen Granulozyten inkubiert mit 1 mM DMOG (10 %) war gegenüber unbehandelten Kontrolle stimulierter neutrophiler Granulozyten (Medium: 4 %) ebenfalls erhöht (Abbildung 40 b). Daher wurde für die weiteren Versuche die Konzentration von 0,5 mM DMOG gewählt, welches die Apoptose und Nekrose sowohl nicht stimulierter als auch stimulierter neutrophiler Granulozyten nicht beeinflusst.

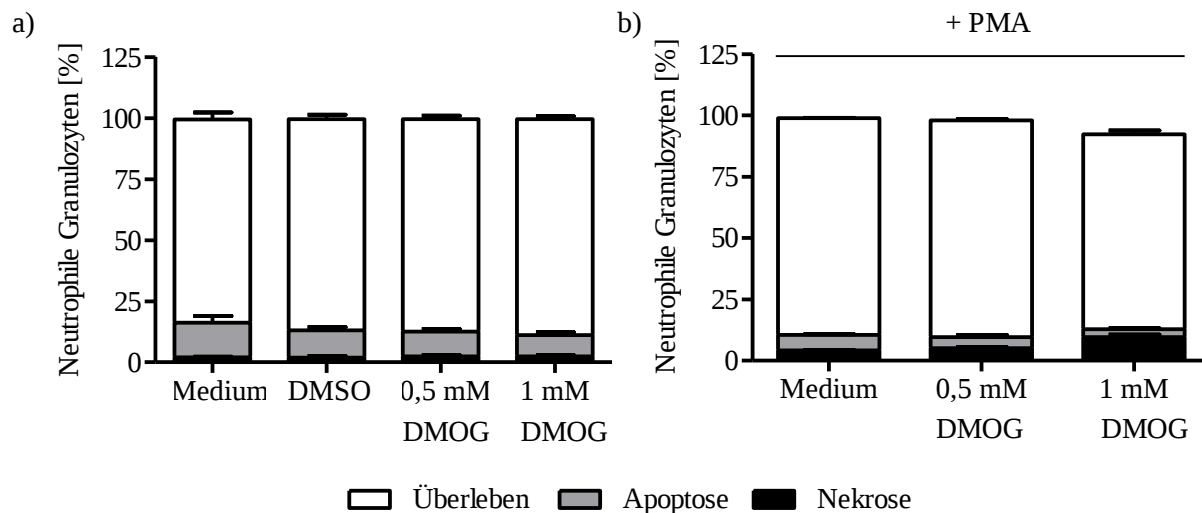


Abbildung 40: Bestimmung der Apoptose-, Nekrose- und Überlebensrate in neutrophilen Granulozyten unter Einfluss von DMOG

Je Ansatz wurden $0,5 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 100 μ l 4 h mit DMOG (0,5 mM, 1 mM) bei 37 °C inkubiert. Durch anschließende Färbung apoptotischer Zellen mit Annexin V-FITC und nekrotischer Zellen mit Propidiumiodid wurde der Anteil lebender, apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt. Als Kontrollen dienten Zellen ohne DMOG (Medium) und mit DMSO (Lösungsmittelkontrolle). a) Anteil lebender, apoptotischer und nekrotischer Zellen nach 4 h Inkubation mit DMOG (n = 3) und b) gleichzeitiger Stimulation mit PMA für 3 h (n = 2). Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt.

Stabilisierung von HIF-1 α durch DMOG

Zunächst wurde verifiziert, dass nach 1 stündiger Inkubation der neutrophilen Granulozyten mit DMOG der Transkriptionsfaktor HIF-1 α stabilisiert vorliegt. Dies belegt das Vorhandensein hypoxieähnlicher Bedingungen. Um das Signal für HIF-1 α nachzuweisen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Dafür wurden die für 1 h mit DMOG (0,5 mM) oder Medium (Kontrolle) vorinkubierten neutrophilen Granulozyten (5×10^6 /ml) für 3 h stimuliert (20 nM PMA) und anschließend lysiert. Als Kontrolle wurden nicht stimulierte, mit DMOG inkubierte neutrophile Granulozyten mitgeführt. Die Detektion der Bande von HIF-1 α und der Beladungskontrolle β -Aktin mittels Western Blot erfolgte wie bereits unter 5.3.1 beschrieben.

Es wurden Banden für HIF-1 α in allen mit DMOG behandelten Ansätzen sowie in der Positivkontrolle lysierter HEp-2-Zellen detektiert. Zusätzlich wurde auch ein Signal für stimulierte neutrophile Granulozyten detektiert (Abbildung 41). Die gleichmäßigen Banden des Proteins β -Aktin deuten auf eine einheitlich aufgetragene Menge an Zelllysaten hin. Die Lysate der HEp-2-Zellen wiesen aufgrund der geringeren Zellzahl im Ansatz im Vergleich zu den neutrophilen Granulozyten eine dünnere Bande auf (Abbildung 41).

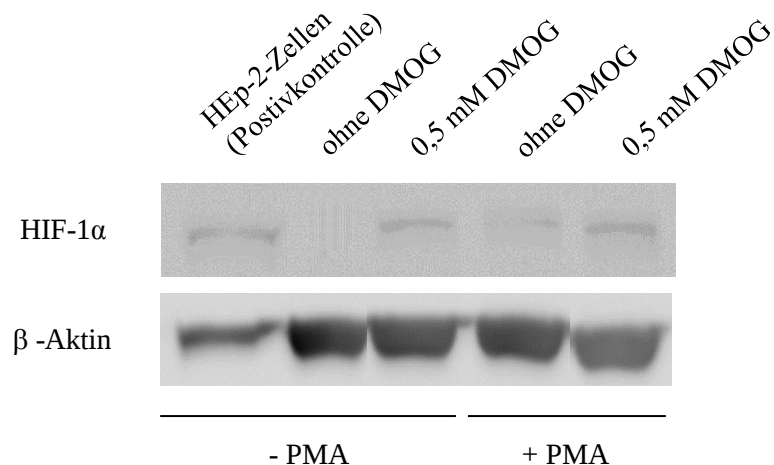


Abbildung 41: Nachweis von HIF-1 α in Lysaten von mit DMOG inkubierten neutrophilen Granulozyten mittels Western Blot

Je Ansatz wurden 5×10^6 neutrophile Granulozyten in 1 ml mit bzw. ohne 0,5 mM DMOG bei 20 % O₂ für 1 h inkubiert und anschließend mit 20 nM PMA 3 h stimuliert. Danach erfolgte die Lyse der Ansätze und die Durchführung des Western Blots. Ein Zelllysate von nicht stimulierten unter Hypoxie inkubierten HEp-2-Zellen ($0,25 \times 10^6$) diente als Positivkontrolle. Der gleichmäßige Probenaufrag wurde mit der Detektion von β -Aktin überprüft.

Detektion intrazellulärer ROS in Anwesenheit von DMOG

Einfluss verschiedener Zellkulturmedien auf intrazelluläre ROS, detektiert mit DHR 123

Da sich das NET-Medium vom bisher in der DHR 123-Methode verwendeten CL-Medium durch das zugesetzte humane Serumalbumin und HEPES unterscheidet (siehe Abschnitt 5.1), wurde in einem Vorversuch getestet, ob das NET-Medium für die DHR 123-Methode geeignet ist. Aus dem in Abbildung 42 dargestellten Vorversuch ergeben sich keine Unterschiede bezüglich der Detektion der intrazellulär gebildeten ROS. Daher wurde für die folgenden Experimente dieser Arbeit das NET-Medium in der DHR 123-Methode verwendet.

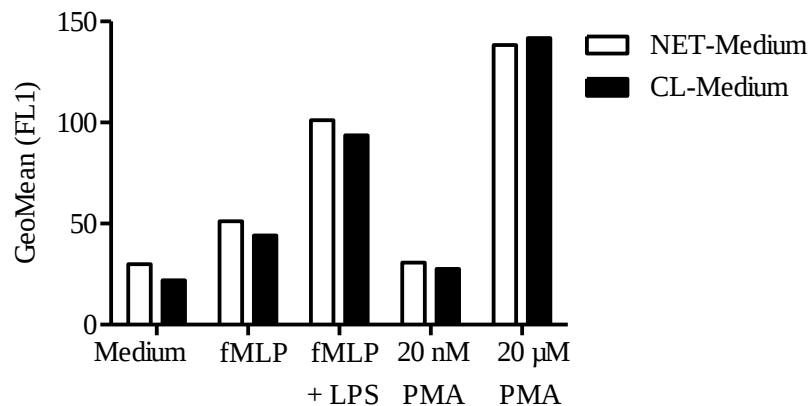


Abbildung 42: Vergleich der intrazellulären ROS-Produktion zwischen NET- und CL-Medium

Durchflusszytometrische Bestimmung der intrazellulären Produktion reaktiver Sauerstoffspezies neutrophiler Granulozyten, detektiert durch die DHR 123-Methode. Die frisch isolierten neutrophilen Granulozyten ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für 3 h bei 37°C im Brutschrank in NET- bzw. CL-Medium inkubiert. Nach 2 h Inkubation erfolgte die Vorstimulation mit 125 ng/ml LPS. Anschließend wurden die Zellen mit DHR 123 gefärbt und mit fMLP ($1 \mu\text{M}$) bzw. PMA (20 nM , $20 \mu\text{M}$) für 5 min stimuliert. Es wurden die Werte des geometrischen Mittelwertes (GeoMean) der gemessenen Fluoreszenzintensitäten von Rhodamin 123 eines Vorversuches im Balkendiagramm dargestellt.

Intrazelluläre ROS-Bildung von DMOG-behandelten neutrophilen Granulozyten

Um die bereits in der Hypoxie-Studie erhaltenen Ergebnisse zu validieren, wurde die DHR 123-Methode zur Messung der gebildeten ROS von neutrophilen Granulozyten ($5 \times 10^6/\text{ml}$) unter $20\% \text{ O}_2$, inkubiert mit und ohne DMOG, nach 5 min und 30 min, gemessen. Die Bildung der ROS wurde durch die Stimulation mit LPS und fMLP ($1 \mu\text{M}$ und 125 ng/ml) oder PMA (20 nM) induziert.

Im Gegensatz zu den unter Hypoxie gewonnenen Ergebnissen ergab sich unabhängig vom Stimulus in Anwesenheit von DMOG nach 5 min kein Unterschied in der Produktion von ROS zwischen den mit und ohne DMOG-inkubierten neutrophilen Granulozyten. Auch nach 30 min Stimulation wurde kein signifikanter Einfluss von DMOG auf die Produktion der ROS festgestellt (Abbildung 43). Nach 30 min Stimulation zeigte DMOG bei einzelnen Spendern eine tendenzielle Hemmung der ROS-Bildung, was die repräsentative Grafik in Abbildung 43 b bestätigt.

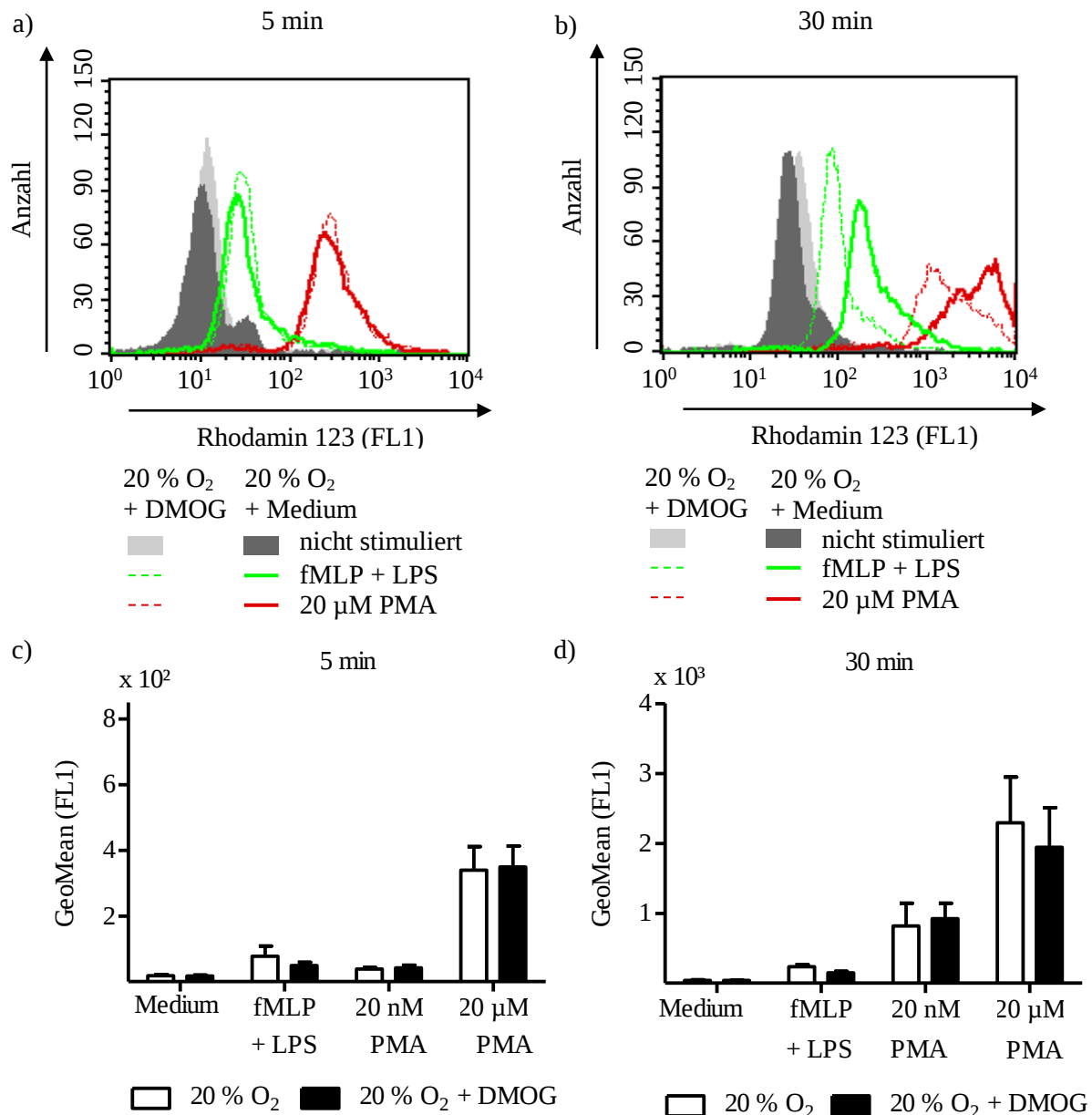


Abbildung 43: Intrazelluläre ROS-Produktion von neutrophilen Granulozyten unter Nachahmung hypoxischer Bedingungen durch DMOG

Nach 1 h Inkubation von $0,5 \times 10^6$ neutrophilen Granulozyten in 100 µl bei einem Gehalt von 20 % O₂ mit oder ohne DMOG und Stimulation wurde die intrazelluläre ROS-Produktion anhand der DHR 123-Methode analysiert. DMOG diente zur Nachahmung hypoxieähnlicher Bedingungen durch Stabilisierung von HIF-1α. Die Zellen wurden mit fMLP + LPS (1 µM + 125 ng/ml) oder PMA (20 nM, 20 µM) zur Bildung von ROS für 5 min bzw. 30 min angeregt. (a,b) Beispielhafte Darstellung der überlagerten Histogramme der Fluoreszenzintensitäten von Rhodamin 123 als Maß für die Bildung von ROS nach 5 und 30 min Stimulation von einem Experiment in Anwesenheit von DMOG (hellgrau; gestrichelte Linien) oder Medium (dunkelgrau, durchgezogene Linien). Es wurden die Überlagerungen mit PMA (rot) und fMLP + LPS (grün) stimulierter sowie nicht stimulierter neutrophiler Granulozyten (grau, ausgefüllt) aufgetragen. (c,d) Auswertung der intrazellulären ROS-Produktion nach 5 min und 30 min. Es wurden die geometrischen Mittelwerte (GeoMean) und die Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten dargestellt.

Einfluss von DMOG auf die Bildung von NETs

In der durchgeführten DHR 123-Methode zur Detektion intrazellulärer ROS wurde kein Unterschied in der Bildung von ROS zwischen mit Medium oder DMOG behandelten stimulierten neutrophilen Granulozyten gemessen. Um zu klären, ob DMOG dennoch einen Einfluss auf die Bildung von NETs hat, wurde die NET-Bildung mittels SYTOXgreen quantifiziert. Hierfür wurden $0,2 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten ($1 \times 10^6/\text{ml}$) mit DMOG (0,5 mM) für 1 h bei 37° C zur Anpassung der Zellen an die durch DMOG eingestellten hypoxieähnlichen Bedingungen inkubiert.

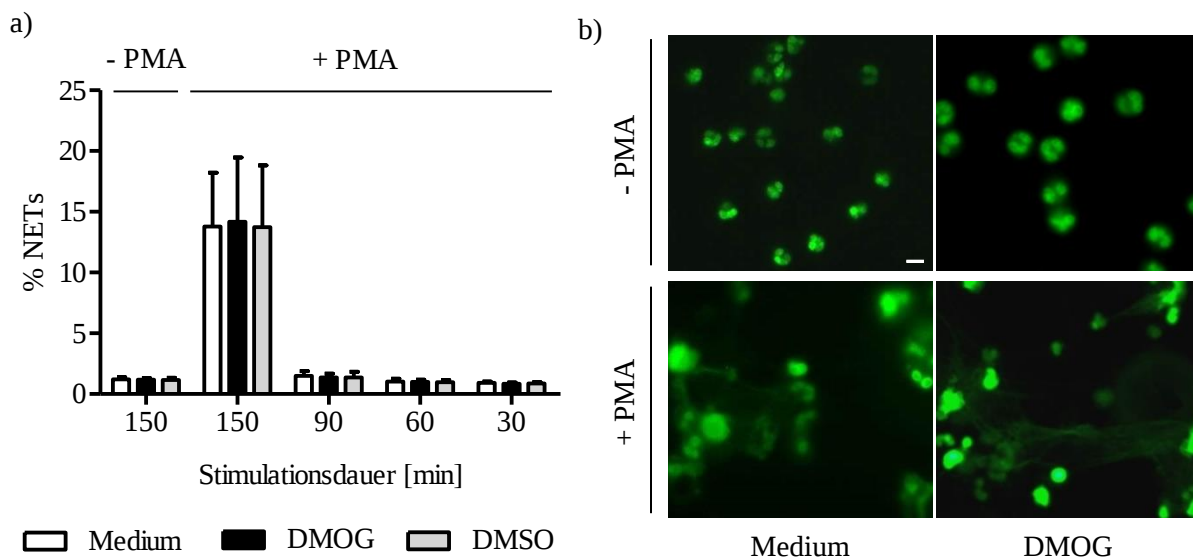


Abbildung 44: Einfluss von DMOG auf die NET-Bildung

(a) Je Ansatz wurden $0,2 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten in 200 μl mit Medium oder DMOG (0,5 mM) für 1 h bei 37° C vorinkubiert, mit SYTOXgreen (5 μM) versetzt und zur Induzierung von NETs mit PMA (20 nM) für 30 min - 150 min stimuliert. Die gebildete NET-DNA wurde prozentual zur parallel gewonnenen gesamten genomischen DNA errechnet. Es wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. (b) NET-Bildung nach 150 min PMA-Stimulation in unbehandelten (Medium) oder mit DMOG behandelten (DMOG) neutrophilen Granulozyten. Zur Visualisierung der NETs wurden $0,5 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten ($1 \times 10^6/\text{ml}$) mit Medium oder DMOG (0,5 mM) für 1 h im Brutschrank vorinkubiert. Nach anschließender Stimulation der Ansätze für 150 min mit PMA (20 nM), wurde die Reaktion durch Fixieren abgestoppt und mit SYTOXgreen zur mikroskopischen Analyse versetzt. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm . Nicht stimulierte neutrophile Granulozyten dienten als Kontrolle. Alle Bilder wurden in der gleichen Größe und Auflösung dargestellt.

Als Kontrollen wurden Ansätze mit Medium beziehungsweise DMSO als Lösungsmittelkontrolle für DMOG durchgeführt. Nach anschließender Zugabe von SYTOXgreen zu den Ansätzen wurde die NET-Bildung durch 20 nM PMA induziert. Zur späteren Quantifizierung der NETs wurde die genomische DNA entsprechend der Zellzahl der Ansätze ($0,2 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten) isoliert und durch Detektion der Fluoreszenz mit SYTOXgreen ermittelt. Die erhaltenen Werte für SYTOXgreen nach 30, 60, 90 und

150 min wurden zur genomischen DNA ins Verhältnis gesetzt und die prozentuale NET-Bildung zum jeweiligen Zeitpunkt errechnet. Nach 150 min wurden je nach Spender zwischen 12 - 20 % NETs gebildet (Abbildung 44 a). Zwischen den mit Medium, DMOG oder DMSO behandelten stimulierten neutrophilen Granulozyten war kein Unterschied in der Bildung von NETs sichtbar (Abbildung 44 a). Zur Validierung der mit der SYTOXgreen-Methode quantifizierten NET-Bildung erfolgte parallel eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der NETs. Hierfür wurden $0,5 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten, eingestellt auf eine Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$, nach einstündiger Vorinkubation mit DMOG (0,5 mM) oder Medium mit 20 nM PMA zur Induzierung von NETs stimuliert. Nach 150 min PMA-Stimulation wurde die Bildung der NETs durch Fixieren abgestoppt und nach anschließender Färbung der DNA mit SYTOXgreen fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Die nicht stimulierten neutrophilen Granulozyten wiesen keine NETs nach 150 min auf, während in den mit PMA behandelten Ansätzen eine deutliche NET-Bildung sichtbar war (Abbildung 44 b). Visuell waren jedoch keine Unterschiede zwischen den mit DMOG oder Medium behandelten stimulierten neutrophilen Granulozyten sichtbar (Abbildung 44 b).

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigten, dass HIF-1 α in nicht stimulierten neutrophilen Granulozyten sowohl unter 2 % O₂ (Hypoxie) als auch unter Inkubation mit DMOG bei 20 % O₂ (Normoxie) stabilisiert wird. Außerdem wurde eine Stabilisierung von HIF-1 α in stimulierten neutrophilen Granulozyten auch unter 20 % O₂ gezeigt. Weiterhin führten 2 % O₂ zur Hemmung von ROS und NETs in PMA-stimulierten neutrophilen Granulozyten. DMOG führt durch Hemmung der Prolylhydroxylasen zur Stabilisierung von HIF-1 α . Unter Inkubation PMA-stimulierter neutrophiler Granulozyten mit DMOG unter 20 % O₂ wurde im Gegensatz zur Inkubation unter 2 % O₂ keine Inhibierung der ROS und NETs beobachtet.

6 Diskussion

6.1 Hemmung von ROS und NETs durch Inhibitoren

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in neutrophilen Granulozyten erfolgt hauptsächlich durch die enzymatischen Reaktionen der Enzyme NADPH-Oxidase und MPO [19, 104]. Weiterhin werden ROS unter anderem in der Elektronentransportkette der Mitochondrien (Atmungskette) gebildet. Es ist bekannt, dass biologische (z. B. LPS) und synthetische (z. B. PMA) Stimuli zur ROS-abhängigen NET-Bildung führen [5]. Die molekularen Mechanismen, insbesondere die Rolle der wahrscheinlich als Botenstoffe fungierenden ROS, sind bisher noch weitgehend unverstanden.

In der vorliegenden Studie wurde systematisch und umfassend die Beteiligung verschiedener ROS und ROS-bildender Signalwege an der PMA-induzierten NET-Bildung neutrophiler Granulozyten untersucht. Dazu wurden spezifische Inhibitoren der ROS-bildenden Enzyme und der Elektronentransportkette der Mitochondrien verwendet (Abbildung 2). Die Superoxidanionbildende NADPH-Oxidase wurde durch DPI gehemmt. DPI wirkt auch hemmend auf den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Die Mitochondrien bilden während der ablaufenden Prozesse der Atmungskette Superoxidanionradikale. Die Elektronentransportkette der Mitochondrien wurde durch die Entkopplungsreagenzien Dinitrophenol und FCCP und durch Hemmung von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette von Rotenon gestört. Die Superoxiddismutase katalysiert die auch spontan ablaufende Dismutation der Superoxidanionradikale zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Aroclor und DETC wurden zur Hemmung der SOD eingesetzt. Das Enzym Myeloperoxidase nutzt Wasserstoffperoxid zur Bildung hypohalogener ROS, z. B. hypochlorige Säure. Aminopyrin und Dipyrone wurden zur Inhibierung dieses Prozesses verwendet.

Die in dieser Studie eingesetzten Inhibitoren induzierten weder die Apoptose noch erhöhten sie die Nekrose in neutrophilen Granulozyten. Dies wurde anhand der Doppelfärbung mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid mittels anschließender durchflusszytometrischer Analyse der neutrophilen Granulozyten festgestellt.

6.1.1 Intra- und/ oder extrazelluläre ROS werden durch Inhibitoren signifikant gehemmt

Zunächst wurden alle Inhibitoren dieser Studie bezüglich ihrer Effektivität, die ROS-Bildung stimulierter neutrophiler Granulozyten zu hemmen, getestet. Zur Detektion der ROS wurden die DHR 123-, Luminol- und Lucigenin-Methode verwendet.

Das nicht fluoreszierende DHR 123 wird durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zum fluoreszierenden Derivat Rhodamin 123 oxidiert [87]. Diese Reaktion wird durch Enzyme mit Peroxidaseaktivität, wie der MPO, katalysiert. Aufgrund der spontanen oder durch die SOD katalysierten Dismutation von Superoxidanionradikalen ($\text{O}_2^{\bullet-}$) zu H_2O_2 und O_2 kann die DHR 123-Methode auch zur Detektion von $\text{O}_2^{\bullet-}$ herangezogen werden [87].

DPI hemmte als Inhibitor der Superoxidanionradikalbildenden NADPH-Oxidase und Hemmstoff von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette stark und signifikant die intrazelluläre ROS-Bildung. Die Oxidation von DHR 123 durch MPO-spezifische ROS (z. B. OCl^-) wurde anhand der verwendeten Inhibitoren der MPO (Aminopyrin und Dipyrone) verhindert. Trotz der einfach und schnell durchzuführenden DHR 123-Methode ist diese Technik nicht sehr sensitiv [88]. So zeigten die Inhibitoren der SOD (Aroclor und DETC) sowie der mitochondrialen Atmungskette (Rotenon, Dinitrophenol und FCCP) keinen Effekt auf die PMA-induzierte ROS-Bildung in neutrophilen Granulozyten. Außerdem waren hohe PMA-Konzentrationen ($4 \mu\text{M}$) notwendig, um einen ausreichend hohen und damit detektierbaren oxidativen *burst* zu erzeugen. Deswegen wurden zwei weitere, sensitivere Techniken, die Luminol- und die Lucigenin-Methode, zur Detektion von ROS in stimulierten neutrophilen Granulozyten durchgeführt.

Die Luminol-Methode zur Messung intra- und extrazellulärer ROS beruht auf der Oxidation von Luminol durch H_2O_2 , Hydroxylradikale ($\text{HO}^\bullet$) und MPO-spezifischen ROS, wie OCl^- [99, 100]. In der Lucigenin-Methode oxidieren extrazelluläre ROS (vor allem $\text{O}_2^{\bullet-}$) Lucigenin. Das dabei freigesetzte Licht wird als Chemilumineszenz detektiert [79, 81]. Übereinstimmend mit den in der DHR 123-Methode gewonnenen Ergebnissen wurde eine signifikante Hemmung der Oxidation von Luminol und Lucigenin in Anwesenheit des NADPH-Oxidase-Inhibitors DPI detektiert. In beiden Methoden verhinderte DPI komplett die Bildung von intra- und extrazellulären ROS. Die Inhibitoren der MPO, Dipyrone und Aminopyrin, reduzierten die MPO-induzierte Oxidation von Luminol und DHR 123 signifikant, zeigten jedoch keinen Effekt in der Lucigenin-Methode. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass Dipyrone und Aminopyrin zwar inhibitorisch auf die MPO wirken, jedoch

keinen Einfluss auf die NADPH-Oxidase ausüben. Das eisenhaltige, native Enzym MPO bildet durch Reaktion mit Wasserstoffperoxid Komplex I der MPO. Dieser wird durch Reaktion mit Chloridionen unter Bildung von hypochloriger Säure wieder zum nativen Enzym regeneriert [105]. Aminopyrin hemmt diesen Peroxidasezyklus durch Reaktion mit Komplex I der MPO zu Komplex II der MPO. Komplex II der MPO ist für die Chlorierungsaktivität inaktiv, sodass die Bildung hypohalogener Säuren, wie z. B. hypochlorige Säure, unterbunden wird [20]. Außerdem können Dipyrone und Aminopyrin Hydroxylradikale und MPO-generierte hypochlorige Säure abfangen [19]. Die Studie von Costa *et al.* bestätigt die Hemmung der PMA-induzierten ROS-Bildung durch Dipyrone und Aminopyrin. In dieser Studie wurde, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, die Hemmung der Oxidation von Luminol durch Hydroxylradikale und MPO-generierte hypochlorige Säure gemessen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen wurde kein Einfluss der MPO-Inhibitoren auf die Lucigenin-Methode detektiert [19].

Die Entkopplungsreagenzien der mitochondrialen Atmungskette FCCP und Dinitrophenol führten zur starken Inhibierung der ROS-Produktion, detektiert durch die Luminol- und Lucigenin-Methode. Die fehlende nachweisbare Hemmung der Inhibitoren mit der DHR 123-Methode lässt sich durch die geringere Sensitivität erklären [88]. Für die hier verwendeten Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette (Dinitrophenol und FCCP) wurde bereits eine Hemmung der ROS-Produktion in PMA-stimulierten neutrophilen Granulozyten gezeigt [106, 107]. Die durch FCCP vermittelte Reduktion der ROS wird durch die Störung und Entkopplung des Membranpotentials der Mitochondrien ausgelöst [106]. Entkopplungsreagenzien bauen das Membranpotential der Mitochondrien ab. Das Membranpotential der Mitochondrien bildet sich als Folge der ablaufenden Elektronentransportketten während der Atmungskette aus. Dinitrophenol wird als schwache Säure im Membranzwischenraum an der inneren Mitochondrienmembran aufgrund des durch den Protonengradienten vorliegenden erhöhten pH Wertes protoniert. Danach gelangt Dinitrophenol entlang des Protonengradienten in die Matrix und wird dort wegen des vorliegenden niedrigeren pH Wertes wieder deprotoniert. Die bei der Deprotonierung frei werdenden Elektronen führen dazu, dass Entkopplungsreagenzien die Übertragung der Elektronen erhöhen. Der aufgebaute Protonengradient wird zerstört. Um den Gradienten wieder aufzubauen, laufen die Schritte der Atmungskette in den Komplexen I bis IV der Mitochondrien schneller ab. Dies hat einen verstärkten Stoffwechsel, Sauerstoffverbrauch und reduzierte ROS-Bildung zur Folge [14, 16].

Rotenon hemmt Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Zum Einfluss von Rotenon auf die Bildung von ROS gibt es kontroverse Daten. Zum einen führte Rotenon zur erhöhten ROS-Bildung in isolierten neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark von männlichen C57BL/6 Mäusen und isolierten Mitochondrien von HL-60-Zellen [84, 85]. Zum anderen wurde die Hemmung der PMA-induzierten ROS-Produktion in humanen neutrophilen Granulozyten durch Rotenon beschrieben. Die Detektion der ROS erfolgte dort mit der Cytochrom C-Methode [107]. In der durchgeführten Studie dieser Arbeit zeigte Rotenon in keiner der drei durchgeführten ROS-Detektionsmethoden (DHR 123-, Luminol- und Lucigenin-Methode) einen Einfluss auf die ROS. Die Verwendung humaner neutrophiler Granulozyten anstelle von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark der Maus oder isolierten Mitochondrien aus HL-60-Zellen zur Analyse des Effektes von Rotenon auf die ROS-Bildung könnte ursächlich für die verschiedenen Ergebnisse sein. Des Weiteren wurde eine andere ROS-Detektionsmethode (Cytochrom C-Methode) sowie niedrigere Konzentrationen an Rotenon und PMA als in dieser Arbeit verwendet. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die mitochondrialen Entkopplungsreagenzien FCCP und Dinitrophenol zur starken Inhibierung intra- und extrazellulärer ROS in aktivierten neutrophilen Granulozyten führten, während die Hemmung von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette durch Rotenon keinen Einfluss auf die Bildung der ROS hatte.

Unter Nutzung der Luminol-Methode wurde für den SOD-Inhibitor Aroclor eine signifikante Reduzierung intra- und extrazellulärer ROS detektiert, während der SOD-Inhibitor DETC keinen nachweisbaren Effekt zeigte. Dies stimmt mit den in der Literatur berichteten Daten überein, in denen bei Inkubation humaner neutrophiler Granulozyten mit Aroclor die PMA-induzierte ROS-Freisetzung durch Hemmung der SOD verschlechtert wird [17]. Aroclor und DETC hatten keinen Einfluss auf die extrazellulär vorliegenden ROS. Die fehlende hemmende Wirkung von DETC kann durch Unterschiede im Versuchsaufbau, wie z.B. der Stimulation mit PMA anstelle von fMLP, begründet sein [108]. Auch der nicht detektierbare Einfluss von Aroclor auf die extrazellulären ROS kann durch die unterschiedliche Stimulation verursacht worden sein. Außerdem wurde in dieser Studie die Cytochrom C-Methode anstelle der hier verwendeten Lucigenin-Methode zur Detektion extrazellulärer ROS verwendet [109].

6.1.2 NADPH-Oxidase- und MPO-gebildete ROS sind für die Bildung von NETs erforderlich, während mitochondriale und SOD gebildete ROS keine Rolle in der Bildung von NETs spielen

In den durchgeführten Methoden zur Detektion von ROS wurde in Anwesenheit von DPI, Dinitrophenol, FCCP, Aroclor und Dipyrin, Aminopyrin ein hemmender Effekt auf die ROS-Bildung stimulierter neutrophiler Granulozyten nachgewiesen. Der Einfluss dieser Inhibitoren auf die Freisetzung von ROS-induzierten NETs in PMA-stimulierten neutrophilen Granulozyten wurde daher untersucht.

Die Inhibierung der NADPH-Oxidase durch DPI verhinderte die NET-Bildung nahezu komplett. Da DPI auch die Atmungskette der Mitochondrien hemmen kann [13], könnte dieser hemmende Effekt sowohl auf die Hemmung der mitochondrialen-, als auch der NADPH-Oxidase-produzierten ROS zurückzuführen sein. Um zu klären, welche der beiden möglichen Ziele durch DPI wirklich für die Hemmung der NETs verantwortlich sind, wurden weitere Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette eingesetzt. Diese Studie diente gleichzeitig zur Klärung der bisher unbeantworteten Frage, ob mitochondriale ROS die Bildung der NETs beeinflussen. Als Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette wurden Dinitrophenol und FCCP eingesetzt. Beide stören die ROS-Bildung in Mitochondrien, indem sie die Phosphorylierung der mitochondrialen Atmungskette entkoppeln [106, 110]. Obwohl die Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette Dinitrophenol und FCCP die ROS-Bildung signifikant gehemmt haben, wurde kein hemmender Effekt der Inhibitoren auf die Bildung von NETs beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die in den Mitochondrien gebildeten ROS wie $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 [14, 111] keine wesentliche Rolle in der ROS-induzierten NET-Bildung spielen. Weiterhin deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der hemmende Effekt von DPI auf die NETs durch den Effekt von DPI auf die NADPH-Oxidase zurückzuführen ist. Es gibt kontroverse Daten zur Rolle von ROS in der Bildung von NETs [26, 29, 112]. Während für die meisten biologischen und synthetischen Stimuli eine ROS-abhängige NET-Bildung beschrieben wurde [3, 29, 30], werden nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* innerhalb der ersten zwei Stunden ROS unabhängig NETs gebildet [26]. In der vorliegenden Arbeit wurde PMA als artifizieller Stimulus zur Induzierung von NETs verwendet. Die in dieser Arbeit gezeigte ROS-abhängige Bildung von NETs durch PMA bestätigen bereits bekannte Daten aus der Literatur [3, 29, 30, 112]. Die Hemmung der NETs durch Blockade der NADPH-Oxidase mit DPI stimmt mit den Ergebnissen der Literatur überein [29, 33, 34].

Es wurde bereits beschrieben, dass die MPO bei der PMA-induzierten Bildung von NETs eine wesentliche Rolle spielt [30, 112, 113]. Welche Rolle die durch das Enzym Myeloperoxidase gebildeten ROS hierbei spielen, wurde durch die Inhibitoren Dipyrone und Aminopyrin näher untersucht. Dipyrone und Aminopyrin verhinderten die MPO-induzierte Oxidation von DHR 123 und Luminol, hemmten jedoch nicht die von Superoxidanionen vermittelte Oxidation von Lucigenin. Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein [19] und zeigen, dass Dipyrone und Aminopyrin die MPO-spezifischen ROS beeinflussen. Außerdem deuten die Daten darauf hin, dass Aminopyrin und Dipyrone keine Radikalfängereigenschaften gegen Superoxidanionen besitzen und keine hemmende Wirkung auf die NADPH-Oxidase ausüben. Dipyrone und Aminopyrin hemmten signifikant die NET-Bildung. Diese Ergebnisse liefern den experimentellen Beweis, dass die enzymatische Aktivität der MPO und die gebildeten ROS des Enzyms für die Bildung von NETs erforderlich sind. Die von der MPO gebildete hypochlorige Säure scheint hierbei eine wesentliche Rolle in der Bildung von NETs zu spielen. Andere Studien bestätigten die Regulation der NET-Freisetzung durch hypochlorige Säure [34, 35]. Das Salz der hypochlorigen Säure, Hypochlorit (OCl^-), reagiert zusammen mit H_2O_2 unter Bildung von Singulett Sauerstoff ($^1\text{O}_2$). Singulett Sauerstoff wurde neben H_2O_2 als essentielle ROS für die NET-Bildung beschrieben [34, 36]. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur Rolle der MPO in NETs bestätigt die wichtige Rolle der MPO in der NET-Bildung. Neutrophile Granulozyten von Patienten mit chronischer granulomatöser Erkrankung bilden keine NETs [29]. Die neutrophilen Granulozyten dieser Patienten besitzen Mutationen in der NADPH-Oxidase, wodurch keine ROS-Bildung möglich ist [31]. Unter Inkubation der neutrophilen Granulozyten dieser Patienten mit der MPO-gebildeten hypochlorigen Säure bildeten sich jedoch NETs [29]. Die Bildung von NADPH-Oxidase unabhängigen NETs durch MPO-spezifische ROS könnte ein neuer Therapieansatz für Patienten mit chronisch granulomatöser Erkrankung sein.

Als Inhibitor der SOD wurde Aroclor, ein Mix aus polychlorinierten Biphenylen, verwendet. Während Aroclor H_2O_2 , $\text{HO}^\bullet$ und MPO-spezifische ROS deutlich verminderte, hatte es keinen Einfluss auf die extrazellulär vorliegenden Superoxidanionradikale. Die Anwesenheit von Aroclor in Kultur mit stimulierten neutrophilen Granulozyten hatte keinen Effekt auf die ROS-induzierte Bildung von NETs. Die SOD ist für die Bildung von H_2O_2 nicht essentiell. Superoxidanionradikale können spontan ohne die enzymatische Dismutaseaktivität der SOD in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff dismutieren [114]. Diese spontane Dismutations-Reaktion steigt mit sinkendem pH-Wert an und kann signifikante Mengen von $\text{O}_2^\bullet$ in H_2O_2 und O_2 im neutralen pH mit einer Rate von $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ umsetzen [114]. Des

Weiteren ist die SOD für die PMA-induzierte Produktion von OCI^- durch die MPO nicht notwendig [115]. Obwohl Aroclor die H_2O_2 -Bildung signifikant senkte, hatte es keinen signifikanten Effekt auf die Bildung von NETs. Allerdings zeigten neutrophile Granulozyten einiger Spender eine erhöhte NET-Bildung. Dies könnte an einem Ungleichgewicht zwischen der Produktion an freien Radikalen liegen, welches durch die Hemmung der SOD hervorgerufen wird. So wurde bereits gezeigt, dass in Anwesenheit von Aroclor parallel zum Abfall der H_2O_2 -Bildung die $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Bildung anstieg [17]. Ein in der DHR 123-Methode mittels Rhodamin 123-Fluoreszenz gemessener geringer, statistisch nicht signifikanter Anstieg der $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Produktion unterstützt diese These. Dieser Effekt könnte für die in einigen Experimenten beobachtete leicht erhöhte NET-Bildung verantwortlich sein.

Die Ergebnisse der durchgeführten Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie zeigten die Hemmung der NET-Bildung durch DPI und Dipyrone. Übereinstimmend mit den bereits indirekt durch die SYTOXgreen-Methode erhaltenen Ergebnissen wurde bestätigt, dass der Inhibitor der SOD Aroclor keinen Einfluss auf die NET-Bildung ausübt.

Neben ihrer antimikrobiellen Wirkung wird für NETs auch eine unerwünschte Rolle bei Autoimmunkrankheiten diskutiert. In Autoimmunkrankheiten, wie systemischer Lupus erythematodes und ANCA assoziierter Vaskulitis kleiner Gefäße, können die mit den NETs assoziierten Proteine als Autoantigene und Mediatoren eine unerwünschte Rolle zur Bildung von Autoantikörpern beitragen. Außerdem wurde in diesen Autoimmunkrankheiten auch der verminderte Abbau der NETs festgestellt [38, 40, 43]. Ein umfassenderes Wissen über die Abläufe zur Bildung von NETs trägt zum besseren Verständnis der Pathophysiologie der Selbstentzündungsprozesse in Autoimmunkrankheiten bei. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass NADPH-Oxidase- und MPO-gebildete ROS wichtig für die Freisetzung von NETs sind. Des Weiteren wurde in dieser Studie erstmals gezeigt, dass die mitochondrialen ROS und die Superoxiddismutase keine Rolle in der NET-Bildung spielen. Außerdem konnte eine Hemmung der NET-Bildung durch die Radikalfänger Aminopyrin und Dipyrone dargelegt werden. Radikalfänger könnten daher einen potentiellen neuen Therapieansatz zur Unterdrückung von NETs darstellen. Ob Radikalfänger wie Antioxidantien die NET-Bildung hemmen können wurde daher in einer weiteren Studie dieser Arbeit untersucht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abbildung 45 dargestellt.

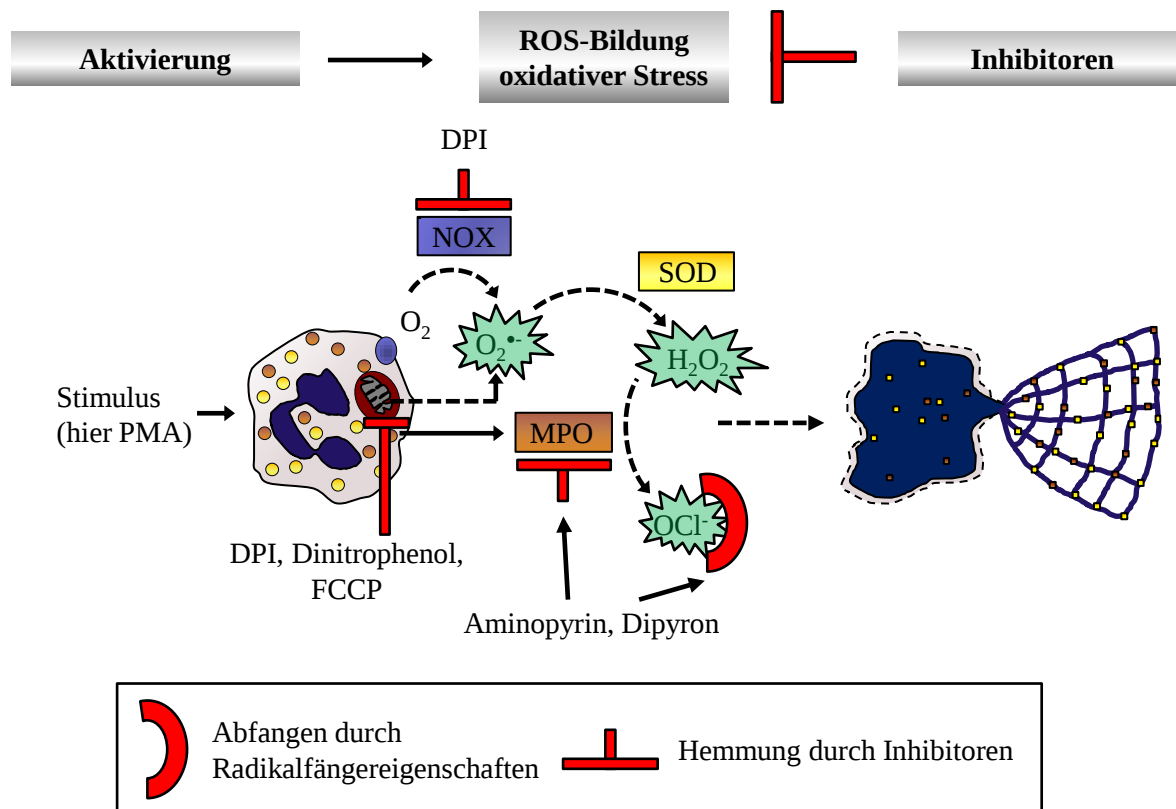


Abbildung 45: Hemmung der ROS-Bildung aktivierter neutrophiler Granulozyten durch Inhibitoren der ROS-bildenden Enzyme und mitochondrialen Atmungskette

Die Effekte der verschiedenen Inhibitoren ROS-bildender Enzyme und der Atmungskette der Mitochondrien auf die Bildung von ROS und NETs in stimulierten neutrophilen Granulozyten sind dargestellt. DPI hemmt die NADPH-Oxidase (NOX) und Atmungskette der Mitochondrien. Dinitrophenol und FCCP inhibieren ebenfalls die mitochondriale Atmungskette. Aroclor hemmt die Superoxiddismutase (SOD). Die hypohalogene Säuren bildende Myeloperoxidase (MPO) wird durch die Radikalfänger Aminopyrin und Dipyrone gehemmt. Die NET-Bildung wird durch Inhibierung der MPO und NADPH-Oxidase unterdrückt, während mitochondriale ROS und die SOD die NET-Bildung nicht beeinflussen.

6.2 Antioxidantien reduzieren ROS und verhindern die NET-Bildung in neutrophilen Granulozyten

Einerseits besitzen NETs die antimikrobielle Funktion Mikroorganismen zu fangen, abzuschwächen und abzutöten [5]. Andererseits können während der NETose extrazellulär freigesetzte Moleküle selbst Ziele von Auto-Antikörpern in Autoimmunkrankheiten sein. In den Autoimmunkrankheiten systemischer Lupus erythematoses [116, 117], Lupus nephritis [42], Vaskulitis der kleinen Gefäße [38, 90] und Psoriasis [89] wurde eine pathophysiologische Rolle der NETs beschrieben. In anderen Krankheiten wie zystische

Fibrose [118], Präeklampsie [119] und Periodontitis [120] scheinen NETs ebenfalls eine unerwünschte Wirkung zu haben. NADPH-Oxidase- und MPO-gebildete ROS sind für die ROS-abhängige NETose, ausgelöst durch synthetische und biologische Stimuli, essentiell [29, 30, 37].

In dieser Studie wurde gezeigt, dass diejenigen antioxidativen Substanzen, welche die ROS-Bildung stimulierter neutrophiler Granulozyten signifikant hemmten, auch die Bildung von NETs inhibierten. Sowohl alle getesteten Flavonoide (Epicatechin, Catechinhydrat und Rutintrihydrat), das Vitamin Ascorbinsäure, als auch die Arzneistoffe 5-ASA und NAC hatten einen inhibitorischen Effekt auf die NET-Bildung PMA-aktivierter neutrophiler Granulozyten. Ursache der hemmenden Wirkung der Antioxidantien auf die NET-Bildung könnte ihre Fähigkeit, Radikale abzufangen und den oxidativen *burst* neutrophiler Granulozyten zu hemmen, sein. Zusätzlich können einige Antioxidantien die ROS-produzierenden Enzyme MPO und NADPH-Oxidase hemmen und dadurch zur Hemmung der NET-Bildung beitragen. Alle in dieser Studie getesteten Antioxidantien induzierten weder die Apoptose noch Nekrose in neutrophilen Granulozyten.

6.2.1 Flavonoide hemmen ROS und NETs in neutrophilen Granulozyten

Flavonoide sind beschrieben als Radikalfänger von Stickstoff, reaktivem Sauerstoff, Superoxidanionradikalen, Hydroxylradikalen, Peroxylradikalen, Wasserstoffperoxid und Chlorspezies, wie hypochlorige Säure [121, 122]. Des Weiteren wurden sie als Inhibitoren der MPO [47] und NADPH-Oxidase [48] diskutiert. Das Flavonoid Quercetin (Abbildung 46 a) und dessen Metabolite binden an die hydrophobe Region der distalen Hämtasche der MPO, was zur Hemmung der MPO und zum Abfall der MPO-abhängigen gebildeten ROS führt [47]. Die Aktivität der MPO sowie MPO-abhängigen ROS sind für die NETose essentiell [30, 32]. Für die Bindung und den hemmenden Effekt auf die MPO benötigen die Flavonoide die C₂-C₃-Doppelbindung und die Hydroxylgruppen an den 3, 5 und 4'-Positionen (Abbildung 46) [47]. Das in dieser Studie verwendete Rutintrihydrat ist das Glykosid des Quercetins und erfüllt bis auf die fehlende Hydroxylgruppe am C₃ diese strukturellen Voraussetzungen (Abbildung 46 b). Ein konzentrationsabhängiger hemmender Effekt durch Rutintrihydrat auf ROS wurde mittels der Luminol-Chemilumineszenzmethode detektiert und es ist generell anerkannt, dass die Oxidation von Luminol in neutrophilen Granulozyten hauptsächlich von der Reaktion des MPO-H₂O₂-Systems unter Bildung von z.B. OCl⁻ abhängt [68, 79, 99]. Daher könnten die ROS- und NET-reduzierenden Effekte von Rutintrihydrat nicht nur durch

dessen Eigenschaft Superoxidanionradikale abzufangen [123], sondern auch durch einen MPO-inhibierenden Effekt hervorgerufen worden sein.

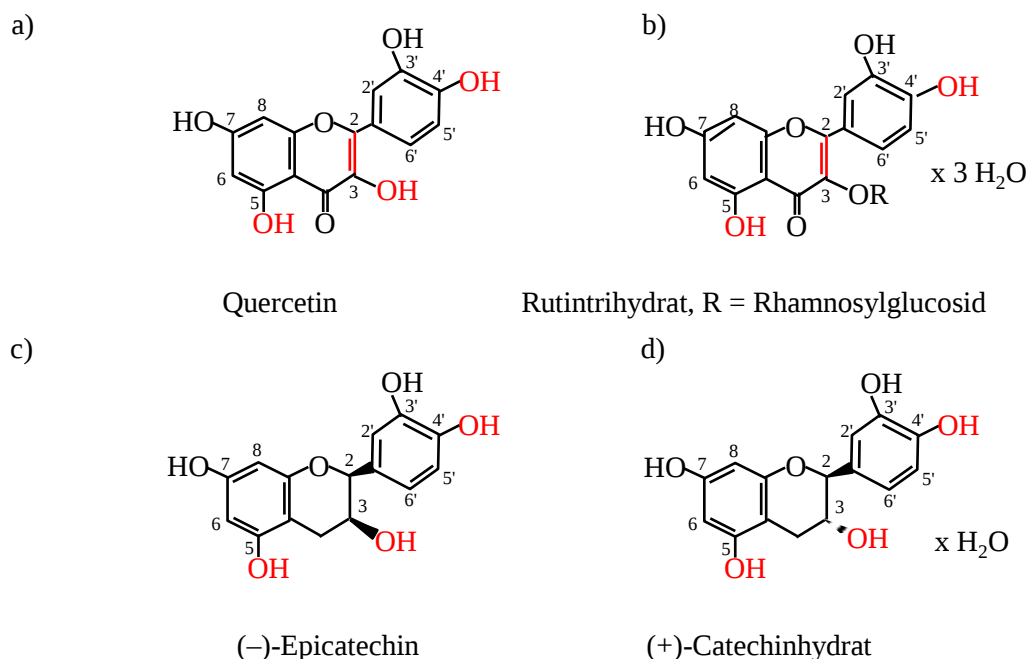


Abbildung 46: Strukturformeln der verwendeten Flavonoide

Die Strukturformeln der Referenzstruktur a) Quercetin und der verwendeten Flavonoide b) Rutintri-hydrat, c) (-)-Epicatechin und d) (+)-Catechinhydrat sind dargestellt.

Epicatechin und Catechinhydrat (Abbildung 46 c, d) besitzen viele physiologische und pharmakologische Funktionen. Sie sind antioxidativ, Radikalfänger und wirken antibakteriell [124]. Catechin, Epicatechin und zahlreiche Metabolite sind im Plasma nach dem Konsum von Flavanol-haltigem Kakao nachweisbar [125, 126]. Sie wurden als Radikalfänger für OCl^- [127] und Inhibitoren der NADPH-Oxidase-Translokation und intrazellulären ROS-Produktion beschrieben [128]. Ihre hemmende Wirkung bei Krebs, Allergien und Entzündungsprozessen wird auf den antientzündlichen Effekt der Catechine auf neutrophile Granulozyten zurückgeführt. So hemmen Catechine die ROS-Bildung und Expression der Adhäsions- und Aktivierungsmoleküle CD11b, CD18, CD62 [52, 128, 129]. In einem Tiermodell zur intestinalen Entzündung wurde durch Hemmung des oxidativen *burst* mittels Aufrechterhaltung des antioxidativen Glutathionlevels die antioxidative Aktivität Epicatechins auf neutrophile Granulozyten bestätigt [52]. Des Weiteren schützte die Inhibierung des oxidativen *burst* durch Epicatechin die Mucosa gegen Schäden durch einwandernde neutrophile Granulozyten [52]. Diese Ergebnisse deuten auf Epicatechin als nützliches Agens in der Vorbeugung und Behandlung intestinaler Entzündungen hin. In der in

dieser Arbeit durchgeführten Studie wurde ein signifikant hemmender Effekt für Epicatechin und Catechinhydrat auf Superoxidanionradikale, sowie zusätzlich für Epicatechin auf MPO-abhängige ROS gemessen. Da diese ROS eine essentielle Rolle bei der NET-Bildung spielen und Epicatechin und Catechinhydrat die NETs ebenfalls signifikant hemmten, scheinen Epicatechin und Catechinhydrat die NETose durch ihre antioxidativen Funktionen zu beeinflussen. Allerdings wurde für Flavonoide auch die Hemmung der Proteinkinase C (PKC) und Phosphoinositid-3-Kinase beschrieben [130]. Da dies in der vorliegenden Studie mit humanen neutrophilen Granulozyten nicht getestet wurde, kann dieser zusätzliche Effekt als Ursache für die Hemmung der ROS- und NET-Bildung nicht ausgeschlossen werden. Zusammenfassend könnten die hemmenden Effekte von Epicatechin und Catechinhydrat auf die ROS- und NET-Bildung therapeutisch als antientzündliche Aktivität gegen durch neutrophile Granulozyten vermittelte Entzündungen, wie die intestinale Entzündung, beitragen.

6.2.2 Ascorbinsäure reduziert im Gegensatz zu Tocopherol die Produktion von ROS und NETs in neutrophilen Granulozyten

Ascorbinsäure (Vitamin C) und Tocopherol (Vitamin E) sind für eine Reihe biologischer Funktionen im Menschen wichtige antioxidative Mikronährstoffe. Sie besitzen die Fähigkeit, als Radikalfänger gegen oxidative Schäden von Proteinen und Lipiden zu schützen und scheinen zelluläre Schäden zu verhindern [55, 56]. Ascorbinsäure akkumuliert in ihrer oxidierten Form in großen Mengen in humanen neutrophilen Granulozyten (10-40 fach höher verglichen zur Serumkonzentration) [131]. Die Aufnahme von Ascorbinsäure in humane neutrophile Granulozyten wird durch Aktivierung zusätzlich erhöht, was ihre Wichtigkeit in diesen Zellen bestätigt [92, 94, 131]. Ein Mangel an Ascorbat, dem Salz der Ascorbinsäure, führt zu reduzierter Chemotaxis und Phagozytose [132], sowie zur verschlechterten Apoptose und Beseitigung der neutrophilen Granulozyten [133]. Die Daten bezüglich des Effektes von Ascorbat auf die Produktion von ROS in neutrophilen Granulozyten sind kontrovers. So wurden einerseits pro-oxidative Effekte auf neutrophile Granulozyten berichtet, indem Ascorbat die intrazelluläre Produktion von Superoxidanionradikalen nach Stimulation mit fMLP, PMA oder Bakterien aufrechterhält [134]. Andererseits wurden signifikante antioxidative Effekte auf die intra- und extrazelluläre ROS-Bildung nach Stimulation mit PMA und auf extrazelluläre ROS (H_2O_2 und OCl^-) als Antwort auf die Aktivierung durch Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLR) beschrieben [135]. Generell ist die Oxidation von Ascorbinsäure durch zelluläre ROS anerkannt [92]. In den in dieser Arbeit gewählten experimentellen Bedingungen wurde ein signifikant hemmender Effekt von

Ascorbinsäure auf die ROS sowohl mit der Lucigenin-, als auch mit der Luminol-Methode gemessen. Die Daten deuten daher auf einen hemmenden Effekt von Ascorbinsäure auf die extrazellulären Superoxidanionradikale und die intra- und extrazellulären MPO-spezifischen ROS, OCl^- und $\text{HO}^\bullet$ hin. Da Superoxidanionradikale und MPO-spezifische ROS, wie OCl^- , die NET-Freisetzung regulieren [33, 34], ist die in dieser Arbeit detektierte Hemmung der NETs durch Ascorbinsäure nicht überraschend. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Studie wurde die Hemmung der durch Harnsäurekristalle ausgelösten ROS-abhängigen NET-Bildung durch Ascorbinsäure kürzlich beschrieben [95]. ROS und NETs sind in anti-neutrophilen zytoplasmatischen Antikörper (ANCA)-assoziierten Krankheiten wie Vaskulitis der kleinen Gefäße beteiligt [38, 136]. Die hier erhaltenen Ergebnisse lassen vermuten, dass Ascorbinsäure als therapeutisches Ziel in diesen Krankheiten fungieren könnte. Dies wird durch eine Studie unterstützt, wonach die adjuvante Behandlung von Patienten mit ANCA-assoziiierter Vaskulitis mit Vitamin C und E zur reduzierten Bildung von Superoxidanionradikalen führte [137].

Obwohl auch Tocopherol (Vitamin E) als Radikalfänger sowie Inhibitor der PKC und NADPH-Oxidase in Phagozyten (Fresszellen) beschrieben wurde [96, 138], hatte Tocopherol in dieser Arbeit keinen hemmenden Effekt auf die ROS- und NET-Produktion neutrophiler Granulozyten. Weiterhin konnte auch kein bereits in anderen Studien beschriebener additiver Effekt von Ascorbinsäure in Kombination mit Tocopherol (Daten nicht gezeigt) detektiert werden [55, 135]. Ursache für den fehlenden Effekt von Tocopherol könnte die verwendete synthetische Form des $(\pm)$ - α -Tocopherols, welches eine gleiche Mischung von 8 verschiedenen Stereoisomeren besitzt [55], sein. Obwohl all diese Stereoisomere antioxidative Eigenschaften aufweisen, sind nur die natürlich in der 2R-Konfiguration vorkommenden α -Tocopherole hoch biologisch aktiv [55]. Demnach könnte für den hier verwendeten starken synthetischen Stimulus PMA zur Induzierung von ROS und NETs die Aktivität des genutzten synthetischen Tocopherols nicht effektiv genug gewesen sein, um die PMA-induzierten ROS und NETs zu inhibieren.

6.2.3 5-Aminosalicylsäure und N-Acetylcystein inhibieren die ROS- und NET-Bildung neutrophiler Granulozyten

5-Aminosalicylsäure (5-ASA) ist auch unter dem Namen Mesalazin bekannt und wird als zelldurchlässiger antientzündlicher Wirkstoff in der Behandlung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen, wie Colitis ulcerosa (*ulcerative colitis*) und Morbus Crohn eingesetzt [139]. Diese Krankheiten sind durch die Einwanderung zahlreicher neutrophiler Granulozyten

in die unter den Epithelien liegende Schicht aus Bindegewebe, der Lamina propria, gekennzeichnet. Die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten, sowie deren Synthese und Freisetzung von ROS, führt zur Verletzung und Beschädigung der Epithelzellen [140]. Obwohl es bisher nicht beschrieben ist, könnten NETs auch eine Rolle in der Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen spielen. Diese Hypothese wird durch den Nachweis extrazellulärer DNA im Darmgewebe von Patienten mit Morbus Crohn, sowie Patienten mit einer bakteriellen gastrointestinalen Infektion, unterstützt [27]. Die Aktivierung der NET-Freisetzung durch Pentraxin 3, welches als Protein der Akuten-Phase-Antwort wirkt und mit aktiver Colitis ulcerosa assoziiert ist [141, 142], gibt einen zusätzlichen Hinweis einer möglichen Rolle von NETs in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. 5-ASA ist ein effektiver Radikalfänger der von neutrophilen Granulozyten gebildeten ROS, wie Superoxidanionradikale, Hypochlorit, Hydroxylradikale und Aminochloride [61, 62, 97] und damit auch hoch effizient im Schutz von Membranen gegen Lipidperoxidation [143]. In dieser Studie wurde ein hemmender Effekt von 5-ASA auf Superoxidanionradikale und MPO-gebildete ROS, wie OCl^- und $\text{HO}^\bullet$, beobachtet. Des Weiteren konnte die Hemmung der NET-Bildung in Anwesenheit von 5-ASA detektiert werden. Neben der Eigenschaft als Radikalfänger wurde für 5-ASA die Hemmung der Aktivierung von NF- κ B diskutiert [144]. Die beobachtete NET-Hemmung durch 5-ASA kann daher nicht nur durch dessen Eigenschaft als Radikalfänger verursacht worden sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen den therapeutischen Nutzen von 5-ASA in Krankheiten, welche mit neutrophilen Granulozyten assoziiert sind und erweitern dessen Nutzung auch auf NET-assoziierte Krankheiten.

Für den pharmakologischen Wirkstoff *N*-Acetylcystein (NAC) wurde die Hemmung der ROS- und NET-Bildung detektiert. NAC ist die wasserlösliche Vorstufe des nicht membrandurchlässigen Antioxidans Glutathion [145]. Glutathion reagiert mit Wasserstoffperoxid zum Glutathion-Disulfid, welches durch die Glutathion-Reduktase wieder zum Glutathion regeneriert wird. Die Glutathion-Reduktase ist an der Bildung von NETs involviert [146]. Einige Studien belegten die Erhöhung der Glutathionsynthese, Reduktion des oxidativen *burst* und Hemmung der extrazellulär lokalisierten MPO-abhängigen Aktivitäten durch NAC [145, 147]. Außerdem wurde eine antientzündliche Wirkung von NAC auf neutrophile Granulozyten von Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung beobachtet [63]. Der bereits beschriebene inhibitorische Effekt von NAC auf die Stickstoffmonoxid- und PMA-induzierte NET-Freisetzung [34, 37] wurde durch die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigt. Die Daten dieser Arbeit und die Ergebnisse anderer Studien lassen daher eine hemmende Rolle von NAC auf neutrophile Granulozyten vermuten.

6.2.4 Acetylsalicylsäure hat keinen Einfluss auf die ROS- und NET-Bildung und Melatonin hemmt nur extrazelluläre ROS in neutrophilen Granulozyten

Nach intraperitonealer Injektion von 100 µg/g (0,55 mM) Acetylsalicylsäure (ASS) wurde in der Mikrozirkulation der Lunge von Mäusen, welche an Transfusions-bezogener akuter Lungenverletzung litten, ein hemmender Effekt auf NETs festgestellt [148]. Eine inhibierende Wirkung des nicht steroidalen anti-entzündlichen Wirkstoffes ASS auf die Bildung von ROS und NETs PMA-stimulierter neutrophiler Granulozyten *in vitro* konnte jedoch in der hier vorliegenden Arbeit bis zu einer Konzentration von 1 mM nicht detektiert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit der vor Kurzem veröffentlichten *in vitro*-Studie mit neutrophilen Granulozyten überein, wonach ein hemmender Effekt von ASS auf PMA- und Tumornekrosefaktor (TNF)- α induzierte NETs erst ab einer Konzentration von 5 mM beobachtet wurde, aber nicht für eine Konzentration von 1 mM [149]. Zusammenfassend scheinen daher hohe Konzentrationen an ASS notwendig zu sein, um die ROS- und NET-Bildung neutrophiler Granulozyten zu beeinflussen.

Das Hormon Melatonin trägt zur Synchronisation der biologischen zirkadianen Uhr bei und ist an der Regulation von zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt [66]. Zu diesen zählen Immunität, die Antwort auf oxidativen Stress und Alterungsprozesse. Melatonin hat eine starke antioxidative Aktivität aufgrund der Eigenschaft als direkter Radikalfänger oder durch Effekte auf die Zellaktivierung. Die Induzierung der Translokation von Proteinkinase C vom Zytosol zur Plasmamembran kann durch Melatonin ausgelöst werden. Melatonin reagiert als direkter Radikalfänger von ROS mit Hydroxyl- und Peroxylradikalen, aber nicht mit Wasserstoffperoxid oder Sauerstoff [66, 98]. Des Weiteren wird Melatonin abhängig von Superoxidanionenradikalen durch die MPO oxidiert, was zur Verminderung der Produktion von Superoxidanionradikalen führt [150]. Zusätzlich hemmt Melatonin die MPO [151]. Durch seine antioxidativen Eigenschaften wird Melatonin eine positive Rolle in der Alzheimer- und Parkinson-Krankheit, sowie bei kardiovaskulären, gastrointestinalen und renalen Funktionsstörungen zugeschrieben [152]. Außerdem wurden mehrfache Wirkungen von Melatonin auf das Immunsystem beschrieben [153]. Melatonin reduziert dosisabhängig intrazelluläre ROS in neutrophilen Granulozyten [98, 154]. In dieser Arbeit wurde die Reduzierung von extrazellulären Superoxidanionradikalen in mit Melatonin behandelten neutrophilen Granulozyten detektiert. Jedoch konnte kein hemmender Effekt von Melatonin auf die MPO-abhängigen intra- und extrazellulären ROS und die NET-Bildung beobachtet werden. Die fehlende Reduzierung der MPO-abhängigen ROS kann verschiedene Gründe haben. Zum einen wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass in Ethanol gelöstes Melatonin

weniger inhibitorisch auf die durch Luminol detektierte Lumineszenz wirkt als wässriges Melatonin [154]. Zum anderen erfolgten alle vorherigen Studien bezüglich eines Effekts von Melatonin auf die MPO und/oder ROS unter verschiedenen experimentellen Bedingungen, wie z.B. unterschiedliche Konzentrationen an Luminol oder die Nutzung eines zellfreien Systems. Die hemmende Wirkung von Melatonin in dem in dieser Arbeit gewählten experimentellen Aufbau auf Superoxidanionradikale, aber nicht auf MPO-abhängige ROS, schien nicht stark genug zu sein, um die Bildung der NETs zu hemmen. Die Ergebnisse unterstützen die bereits vorher in dieser Arbeit und von Metzler *et al.* erhaltenen Ergebnisse, wonach die MPO und MPO-abhängige ROS wichtige Spieler in der NETose sind [30].

Der in dieser umfassenden Studie beobachtete Effekt von Antioxidantien auf die ROS- und NET-Bildung in neutrophilen Granulozyten wird in Abbildung 47 veranschaulicht. Es wurde gezeigt, dass ein breites Spektrum antioxidativer Substanzen, welche die ROS-Bildung neutrophiler Granulozyten signifikant hemmen, auch die Bildung von NETs inhibiert. Für die meisten dieser Antioxidantien wird hier erstmals ein hemmender Effekt auf NETs gezeigt. Anhand dieser Ergebnisse könnten Antioxidantien als therapeutische Strategien bei Autoimmunkrankheiten, welche mit aktivierten neutrophilen Granulozyten und der Bildung von ROS und NETs assoziiert sind, in Betracht gezogen werden.

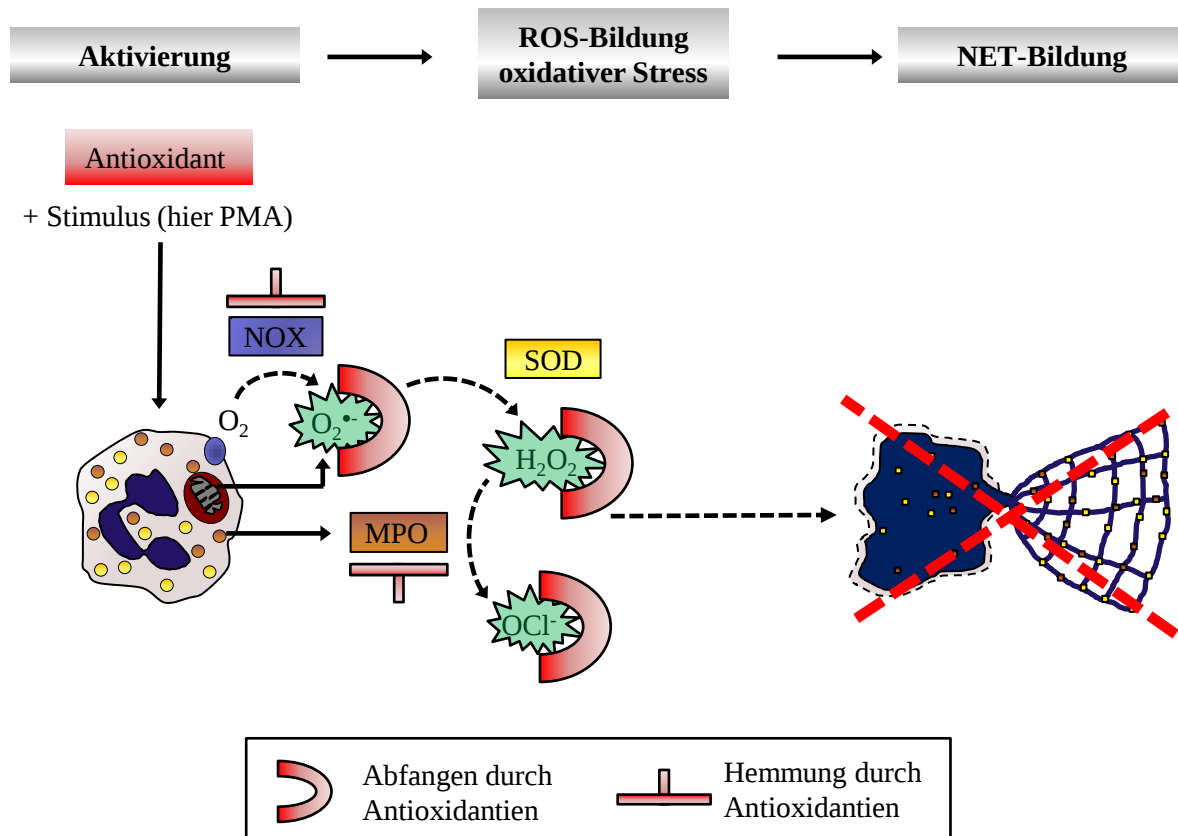


Abbildung 47: Antioxidantien hemmen die ROS und NET Freisetzung aktivierter neutrophiler Granulozyten

Durch Stimulation (hier PMA) werden neutrophile Granulozyten aktiviert und bilden reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Sauerstoff (O_2) wird dabei durch den NADPH (NOX) -Oxidase-Komplex zu Superoxidanionradikalen ($O_2^{\bullet-}$) umgesetzt. Neben der NADPH-Oxidase können auch Mitochondrien $O_2^{\bullet-}$ bilden. Die $O_2^{\bullet-}$ dismutieren spontan oder mit Hilfe der Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und O_2 . Die Myeloperoxidase (MPO) bildet unter Nutzung von H_2O_2 schließlich hypohalogene Säuren, wie z. B. Hypochlorit ($OCI^{\bullet}$), das Salz der hypochlorigen Säure. Die Bildung von ROS führt zur Freisetzung von NETs durch neutrophile Granulozyten. Antioxidantien fangen die einzelnen ROS-Spezies ab und können zusätzlich die NADPH-Oxidase und MPO hemmen. Dies hat die Hemmung der ROS- und damit die verminderte NET-Bildung zur Folge.

6.3 Hypoxie und die Stabilisierung von HIF-1 α durch DMOG erhöhen weder den oxidativen *burst* noch die NET-Bildung neutrophiler Granulozyten

Orte einer Entzündung sind unter anderem durch Sauerstoffmangel (Hypoxie), verringerte Glucosekonzentration im Blut (Hypoglycämie), erhöhten pH-Wert (Azidose) und erhöhte ROS-Produktion gekennzeichnet [70]. Neutrophile Granulozyten sind essentielle

Effektorzellen und migrieren als eine der ersten Zelltypen der angeborenen Immunabwehr aus dem Blut zum Entzündungsherd [155]. Eine Anpassung an die dort herrschenden Bedingungen ist für neutrophile Granulozyten daher unabdingbar. Die zelluläre Adaption an Hypoxie wird durch den Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbaren Faktor (HIF) gesteuert. Die Untereinheit von HIF, HIF-1 α , wird unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert, akkumuliert und führt nach Verschmelzen mit der HIF-1 β -Untereinheit zur Expression zahlreicher Gene, welche unter anderem die Apoptose und bakterielle Aktivität regulieren [69-71]. Der Einfluss von Sauerstoffmangel durch Hypoxie (2 % O₂) und der Stabilisierung von HIF-1 α entweder durch Hypoxie oder durch DMOG auf die Bildung von ROS und NETs durch neutrophile Granulozyten wurde hier erstmals zusammenfassend untersucht. Die in dieser Studie verwendete Konzentration von 0,5 mM DMOG induzierte weder die Apoptose noch erhöhte sie die Nekrose in neutrophilen Granulozyten.

6.3.1 Hypoxie, DMOG und PMA-Stimulation führen zur Stabilisierung von HIF-1 α in neutrophilen Granulozyten

Zunächst wurde überprüft, ob die experimentellen Bedingungen sowohl unter Hypoxie (2 % O₂) als auch unter DMOG zur Stabilisierung von HIF-1 α führen. Erstmals konnte in dieser Arbeitsgruppe die Stabilisierung von HIF-1 α durch nicht stimulierte neutrophile Granulozyten, inkubiert in Anwesenheit von 2 % O₂, etabliert werden. Des Weiteren wurde im durchgeführten Western Blot ein HIF-1 α -Signal für stimulierte neutrophile Granulozyten sowohl unter Hypoxie (2 % O₂) als auch Normoxie (20 % O₂) detektiert. Dieser Effekt wurde sowohl unter Stimulation mit PMA als auch in einem Pilotversuch mit fMLP und LPS (Daten nicht gezeigt) beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die Stabilisierung von HIF-1 α während Infektionen auch sauerstoffunabhängig erfolgen kann. Dabei führt die Aufnahme von Eisen durch Bakterien, wie z.B. *Staphylococcus aureus*, zur Schwächung der für den Abbau von HIF-1 α wichtigen Aktivität der eisenabhängigen Prolylhydroxylasen, wodurch HIF-1 α stabilisiert wird [69, 156]. Die Induzierung des Proteins HIF-1 α unter Normoxie durch Bakterien und durch das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) wurde bereits in Makrophagen beschrieben [103, 156]. LPS führt zur Aktivierung des proinflammatorischen Mustererkennungsrezeptors TLR-4 in Phagozyten und somit zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems. LPS scheint TLR-4-abhängig die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α zu erhöhen und die Prolylhydroxylase-Aktivität zu senken, was zum verminderten Abbau von HIF-1 α führt [103]. Da TLR-4 auch in neutrophilen Granulozyten exprimiert ist [157], scheint die Stabilisierung von HIF-1 α durch LPS, ähnlich wie bereits bei Makrophagen beobachtet, logisch. Andere Stimuli, wie PMA, wirken zwar

TLR-4 unabhängig, können jedoch über die Aktivierung der Proteinkinase C Signalwege auslösen, wie z.B. die Bildung von ROS, welche auch nachfolgend der Aktivierung von TLR-4 ausgelöst werden. Die detektierte Stabilisierung von HIF-1 α durch PMA unter Normoxie könnte daher über ähnliche, TLR-4 unabhängige Signalwege und durch ROS hervorgerufen worden sein.

DMOG (Dimethyloxallylglycin) ist ein Ester des *N*-Oxallylglycins und hemmt die Prolylhydroxylasen [73]. Prolylhydroxylasen sind von den vier Faktoren 2-Oxoglutarat, Sauerstoff, Eisen und Ascorbat abhängig [158]. Durch kompetitive Hemmung der Prolylhydroxylasen führt DMOG zur Stabilisierung von HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen [73]. Die Inkubation nicht stimulierter als auch mit PMA stimulierter neutrophiler Granulozyten mit DMOG führte dementsprechend zur Stabilisierung von HIF-1 α . Neutrophile Granulozyten, welche nur in atmosphärischem Sauerstoff (20 % O₂) ohne DMOG inkubiert wurden, zeigten erwartungsgemäß kein Signal von HIF-1 α .

Der Zusatz von DPI, dem Hemmstoff der NADPH-Oxidase, verminderte deutlich die Stabilisierung von HIF-1 α in stimulierten neutrophilen Granulozyten. Dies bestätigt, dass ROS an der Stabilisierung von HIF-1 α beteiligt sind. Eine Stabilisierung von HIF-1 α durch ROS wird in der Literatur gegensätzlich diskutiert [69, 72].

6.3.2 Die Bildung von ROS wird unter Hypoxie gehemmt und durch DMOG nicht beeinflusst

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies im oxidativen *burst* ist ein wichtiger Effektormechanismus neutrophiler Granulozyten im Kampf gegen Pathogene. Dabei gebildete mikrobizide Sauerstoffmetabolite und Radikale dienen der Abtötung aufgenommener Erreger, wobei Sauerstoff stets die Quelle zur Bildung von ROS darstellt. Interessant ist es daher, die Bildung von ROS durch neutrophile Granulozyten unter Entzündungsbedingungen mit Sauerstoffmangel (Hypoxie) und Stabilisierung von HIF-1 α (Hypoxie, DMOG) zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür die Bildung intrazellulärer ROS anhand der DHR 123-Methode analysiert.

Abhängig vom Stimulus findet die Bildung von ROS unterschiedlich schnell statt [159]. Während der oxidative *burst* nach der Kostimulation mit fMLP und LPS bereits innerhalb der ersten 5 min ablief, erreichte er unter PMA (20 μ M) erst nach $\sim$ 30 min sein Maximum. Daher wurde die Bildung der intrazellulären ROS nach 5 min und 30 min gemessen. Die Vorstimulation mit LPS führt zur erhöhten stimulierenden Wirkung von fMLP (*priming*). Das

physiologische Agens und bakterielle Peptid fMLP bindet an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf der Zellmembran und führt über intrazelluläre Signalkaskaden zur Aktivierung von Proteinkinase C. Die aktivierte PKC löst über weitere Signalwege die Phosphorylierung verschiedener Komponenten der NADPH-Oxidase, vor allem p47^{phox} und damit die Aktivierung der NADPH-Oxidase aus. PMA ist ein Modellstimulus, welcher eine intensive und langanhaltende Aktivität der NADPH-Oxidase durch Phosphorylierung über die Stimulation der Proteinkinase C hervorruft [159]. Die deutlich höheren gemessenen Werte an gebildeten ROS durch PMA im Vergleich zur fMLP und LPS-Stimulation lassen sich dadurch erklären. Das dabei hohe Konzentrationen an PMA erforderlich waren, um eine ausreichende ROS-Bildung zu detektieren, liegt an der geringen Sensitivität der verwendeten Methode [88] und wurde bereits im Abschnitt 6.1 erwähnt.

Die in dieser Arbeit dargestellten Daten zeigen, dass Hypoxie je nach Stimulus einen Einfluss auf die Bildung von ROS hat. Unter der Kostimulation mit fMLP und LPS war zu keinem der gemessenen Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied in der Bildung von ROS unter Hypoxie, verglichen zur Normoxie, detektierbar. Wurden die neutrophilen Granulozyten jedoch mit einer hohen PMA-Konzentration stimuliert, war die ROS-Bildung nach 5 min unter Hypoxie signifikant erhöht, während nach 30 min die Produktion an ROS unter Hypoxie signifikant geringer war als die ROS-Produktion unter Normoxie. Ursache für die Stimuli-abhängigen Ergebnisse liegen wahrscheinlich in der unterschiedlichen Aktivierung der NADPH-Oxidase (siehe vorheriger Abschnitt). Interessanterweise führte die Stimulation mit PMA nach 30 min zur signifikant verminderten ROS-Produktion, die Kostimulation von fMLP und LPS zeigte ähnliche, jedoch nicht signifikante Tendenzen. Sauerstoff ist neben NADPH essentiell für das Superoxidanionradikal produzierende Enzym NADPH-Oxidase. Superoxidanionradikale legen die Grundlage für den oxidativen *burst*. Vorhergehende Studien in dieser Arbeitsgruppe deuteten darauf hin, dass die Hemmung des oxidativen *burst* bei Hypoxie (2 % O₂) nicht durch die limitierte Verfügbarkeit des Substrats NADPH hervorgerufen wurde [102]. Eine Hemmung der NADPH-Oxidase durch den vorherrschenden Sauerstoffmangel (2 % O₂) unter Hypoxie ist daher als Ursache für die reduzierte ROS-Bildung unter Hypoxie wahrscheinlich. Mc Govern *et al.* zeigten eine Inhibierung der extrazellulären ROS-Bildung unter Hypoxie (3 % O₂) im Vergleich zu Normoxie nach 30 min PMA- und fMLP-Stimulation [74]. Die dort gemessene nicht veränderte Expression der NADPH-Oxidase-Komponenten unter Hypoxie bestätigt die These, dass der fehlende Sauerstoff als Substrat der NADPH-Oxidase für die verminderte Bildung von ROS verantwortlich ist. Weitere Funktionen neutrophiler Granulozyten, wie Phagozytose und Chemotaxis, waren nicht durch Hypoxie beeinflusst.

Jedoch wurde die Abtötung von *Staphylococcus aureus* durch neutrophile Granulozyten unter Hypoxie deutlich geschwächt. Vieles spricht dafür, dass ROS zur Stabilisierung von HIF-1 α beitragen. So wurde beschrieben, dass ROS das zweiwertige Eisen der Prolyldihydroxylasen hemmen und diese dadurch blockieren. Zusätzlich könnten ROS die HIF-Hydroxylasen durch irreversible Oxidation der sich an der aktiven Seite befindenden Aminosäuren hemmen [160]. Die reduzierte ROS-abhängige Oxidation von DHR 123 durch den Verbrauch der ROS unter Hypoxie, sowie die im Western Blot gemessenen, erhöhten Signale für HIF-1 α unter Stimulation, stimmen mit dieser Theorie überein.

Es wurden unabhängig vom Stimulus (fMLP + LPS, PMA) und Zeitpunkt (5 min, 30 min) keine Unterschiede der ROS-Bildung zwischen mit DMOG behandelten und unbehandelten neutrophilen Granulozyten gemessen. Die gebildeten ROS wurden anhand der Fluoreszenzintensitäten von Rhodamin 123 detektiert. Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den unter Hypoxie gewonnenen Daten, wonach die ROS-Bildung nach 30 min gehemmt wird. DMOG führt durch kompetitive Hemmung der Prolyldihydroxylasen zur sauerstoffunabhängigen Stabilisierung von HIF-1 α [73]. Da Sauerstoff als Substrat der NADPH-Oxidase unter Inkubation mit DMOG nicht minimiert ist, scheint die gleiche Produktion an ROS in neutrophilen Granulozyten mit oder ohne DMOG logisch. Die Literatur zur Rolle von Hypoxie bzw. HIF auf die Bildung von ROS ist kontrovers. Hierbei muss genau unterschieden werden, ob die Experimente unter Hypoxie oder stabilisierenden Substanzen wie z.B. DMOG bzw. Agonisten von HIF-1 α durchgeführt wurden. Eine Studie mit Krebszellen wies eine erhöhte ROS-Produktion durch Stabilisierung von HIF-1 α mit dem Metallchelator CoCl₂ nach [161]. Die Deletion von HIF-1 α oder Überexpression durch Eliminierung des für die Degradation wichtigen von Hippel-Lindau Proteins beeinflusste die Produktion von ROS durch den oxidativen *burst* jedoch nicht. Dies stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Die Expression zahlreicher anderer Effektormoleküle der angeborenen Immunabwehr wie die antimikrobiellen Proteine Cathepsin G, Elastase und Stickstoffmonoxid, TNF- α wurden in HIF-1 α -defizienten neutrophilen Granulozyten signifikant reduziert [156]. Paradoxerweise wurde gezeigt, dass Makrophagen durch Aktivierung von HIF-1 α unter hypoxischen Bedingungen Bakterien besser phagozytieren und abtöten können als unter Normoxie. Zusätzlich scheint der bakterielle Stimulus stärker zur Stabilisierung von HIF-1 α beizutragen als Hypoxie allein [101]. Die Inhibierung der Prolyldihydroxylase 2 durch das Pharmakon AKB-4924 erhöhte jedoch die antimikrobielle Aktivität unter Stabilisierung von HIF-1 α [162].

6.3.3 Die NET-Bildung wird unter Hypoxie gehemmt und durch die Anwesenheit von DMOG nicht beeinflusst

Die in dieser Arbeit erstmals durchgeführte Studie zur Rolle von Hypoxie auf die Bildung von NETs zeigt eine Hemmung der NET-Bildung durch Hypoxie. Die PMA-induzierte NET-Bildung ist ROS-abhängig [3] und die Bildung von ROS unter Hypoxie wurde, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, gehemmt. Die Inhibierung der NET-Bildung ist daher wahrscheinlich auf die fehlende essentielle Produktion von ROS zurückzuführen. In Pilotversuchen dieser Arbeit schien die NET-Bildung, induziert durch das Enzym Glucoseoxidase, bei Hypoxie ebenfalls gehemmt zu werden. Glucose und Sauerstoff reagieren, katalysiert durch Glucoseoxidase, zu Gluconolacton und Wasserstoffperoxid [163]. Eine erhöhte NET-Bildung erfolgte erwartungsgemäß bei beiden Stimuli (PMA, Glucoseoxidase) unter Normoxie. Der Substratmangel des für die NADPH-Oxidase zur Induzierung des oxidativen *burst* wichtigen Sauerstoffes bewirkte damit gleichzeitig die Unterdrückung der Bildung von NETs. Die in Pilotversuchen dieser Arbeit durchgeführte Induzierung der NET-Bildung durch Stimulation mit *Staphylococcus aureus* (RN4220) deuten auf eine *Staphylococcus aureus*-induzierte NET-Bildung neutrophiler Granulozyten unabhängig von der vorherrschenden Sauerstoffkonzentration hin. Es konnte eine tendentiell erhöhte NET-Bildung unter Hypoxie, verglichen zu den nicht stimulierten Ansätzen nach 210 min, detektiert werden. Es wurde beschrieben, dass die Induzierung der NET-Bildung durch *Staphylococcus aureus* innerhalb der ersten zwei Stunden ROS-unabhängig erfolgt [26]. Nach 3 h wurde die NET-Bildung durch Inhibierung der NADPH-Oxidase mit DPI jedoch gehemmt. Die Autoren spekulierten, dass dieser spätere scheinbar ROS-abhängige Effekt durch den Abbau der NETs durch die DNAsen von *Staphylococcus aureus* hervorgerufen wurde [26]. Die in Pilotversuchen der vorliegenden Arbeit beobachtete durch *Staphylococcus aureus* induzierte NET-Bildung unter Hypoxie könnte auf die ROS-unabhängige NET-Bildung zurückzuführen sein. Der fehlende Sauerstoff unter Hypoxie führte daher wahrscheinlich zur Inhibierung der ROS und infolgedessen zur Hemmung der ROS-abhängigen NET-Bildung.

Um einen Effekt von HIF-1 α auf die NET-Bildung zu untersuchen, wurden die neutrophilen Granulozyten mit dem HIF-1 α -Stabilisator DMOG inkubiert und anschließend mit PMA stimuliert. Es wurden keine Unterschiede in der Bildung von NETs zwischen mit DMOG behandelten und unbehandelten neutrophilen Granulozyten detektiert. Unter beiden Bedingungen wurden NETs gebildet. Auch diese Beobachtung bestätigt, dass Sauerstoff essentiell für die Bildung der PMA-induzierten NETs ist. Des Weiteren kann daraus

geschlossen werden, dass HIF-1 α keine Rolle bei der ROS-abhängigen Induzierung von NETs spielt. Zur Rolle von HIF-1 α während der NET-Bildung gibt es verschiedene Daten. So bewiesen Zinkernagel *et al.*, dass ein Agonist von HIF-1 α , Mimosin, die durch *Staphylococcus aureus* induzierte NET-Bildung sowie den oxidativen *burst* nicht erhöht [164]. Der Eisenchelator Mimosin hemmt ähnlich wie DMOG die Aktivität der Prolylhydroxylasen. Die von HIF-1 α unabhängige ROS- und NET-Bildung, induziert durch *Staphylococcus aureus*, stimmt mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten der PMA-induzierten NETs in Anwesenheit von DMOG überein. Eine andere Studie wies die Regulation der LPS induzierten NET-Bildung durch HIF-1 α nach [165]. Eine Inhibierung der ROS-Bildung durch DPI hatte keinen Einfluss auf die HIF-1 α induzierte Bildung der NETs. Dies deutet auf zusätzliche, ROS-unabhängige Signalwege während der NET-Bildung hin. Des Weiteren scheint HIF-1 α in nachgeschalteten Signalwegen durch das Enzym *mamalian target of rapamycin* (mTOR) in neutrophilen Granulozyten reguliert zu werden [165]. Das Enzym mTOR spielt eine wichtige Rolle in der Initiierung der Proteinsynthese, Autophagozytose (Autophagie) und Apoptose [72]. Die Abhängigkeit der NET-Bildung von der Autophagie [33] unterstützt die These der Regulation von NETs durch mTOR. Neben neutrophilen Granulozyten können auch andere Zellen wie Mastzellen *extracellular traps*, sogenannte *mast cell extracellular traps* bilden [166, 167]. Auch in Mastzellen spielt HIF-1 α eine entscheidende Rolle für die antimikrobielle Aktivität. Die Stabilisierung von HIF-1 α durch Hemmung der Prolylhydroxylase mit dem neuen pharmakologischen Agens AKB-4924 führte zur Induzierung von MCETs [166]. Die unterschiedlichen Daten bezüglich der Rolle von HIF-1 α in der NET-Bildung lassen sich durch die unterschiedlichen Stimuli zur Induzierung der NETs und verschiedenen Ansätze zur Stabilisierung von HIF-1 α erklären.

In diese Studie wurde bestätigt, dass HIF-1 α in nicht stimulierten neutrophilen Granulozyten sowohl unter 2 % O₂ als auch bei 20 % O₂ in Anwesenheit von DMOG stabilisiert wird. Die nachgewiesene Stabilisierung von HIF-1 α in neutrophilen Granulozyten unter 20 % O₂ durch Stimulation mit PMA deutet auf Stabilisierung von HIF-1 α durch ROS hin. Die Stabilisierung von HIF-1 α in PMA-stimulierten neutrophilen Granulozyten unter 2 % O₂ wurde bei Inkubation mit DPI vermindert. DPI führt als Inhibitor der NADPH-Oxidase zur Hemmung der ROS-Produktion. Das unterstützt die Theorie der ROS-abhängigen Stabilisierung von HIF-1 α . Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass neben der Bildung von ROS auch noch andere durch PMA ausgelöste Signalwege zur Stabilisierung von HIF-1 α beitragen. Die nicht detektierte Bildung von ROS unter 2 % O₂ könnte durch deren Verbrauch zur Stabilisierung von HIF-1 α hervorgerufen worden sein. Der fehlende Sauerstoff als

Substratmangel für die zur Produktion von ROS essentiellen NADPH-Oxidase könnte jedoch auch ursächlich für die detektierte Inhibierung der ROS unter 2 % O₂ gewesen sein. Dafür spricht, dass die ROS-Produktion sowohl unter 20 % O₂ als auch bei DMOG mit 20 % O₂ nicht beeinträchtigt war. Die gehemmte Bildung der NETs unter 2 % O₂ im Vergleich zu 20 % O₂ und DMOG mit 20 % O₂ ist die Konsequenz aus der vorher beobachteten Inhibierung der ROS-Bildung unter Sauerstoffmangel (2 % O₂). Die erhaltenen Ergebnisse zur ROS- und NET-Bildung unter 2 % O₂, DMOG mit 20 % O₂ sowie 20 % O₂ sind in der untenstehenden Grafik noch einmal zusammenfassend dargestellt (Abbildung 48).

	20 % O ₂	DMOG + 20 % O ₂	2 % O ₂
- PMA	Keine Stabilisierung von HIF-1 α	Stabilisierung von HIF-1 α	Stabilisierung von HIF-1 α
+ PMA	Stabilisierung von HIF-1 α Bildung von ROS und NETs	Stabilisierung von HIF-1 α Bildung von ROS und NETs	Stabilisierung von HIF-1 α Keine Bildung von ROS und NETs

Abbildung 48: Bildung von ROS und NETs unter verschiedenen experimentellen Bedingungen

Es sind die Bildung von ROS und NETs neutrophiler Granulozyten mit oder ohne Stimulation mit PMA in Anwesenheit von 20 % O₂, DMOG und 20 O₂ sowie 2 % O₂ dargestellt. Keine Stabilisierung von HIF-1 α erfolgte nur in nicht stimulierten neutrophilen Granulozyten in Anwesenheit von 20 % O₂. 2 % O₂ führten zur Hemmung der ROS und NETs während unter den anderen experimentellen Bedingungen keine veränderte ROS- und NET-Bildung beobachtet werden konnte.

6.4 Schlussbetrachtung und Ausblick

Die molekularen Mechanismen, welche zur Ausbildung von NETs führen, sind komplex und noch weitgehend ungeklärt. Bekannt ist unter anderem, dass die Auslösung der NETs durch biologische (z. B. LPS) und synthetische (z. B. PMA) Stimuli ROS-abhängig abläuft. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, die Rolle der dabei essentiellen ROS, ROS-produzierenden Enzyme und Mitochondrien näher zu verstehen. Es wurde gezeigt, dass die Superoxiddismutase und mitochondriale ROS keinen Einfluss auf die Bildung von NETs ausüben. Die Daten bestätigten, dass die NADPH-Oxidase und Myeloperoxidase zur Bildung von NETs wichtig sind. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein breites Spektrum antioxidativer Substanzen die ROS- und NET-Bildung aktivierter neutrophiler Granulozyten hemmt. Die Hemmung der NETs ist besonders in NET-assoziierten Krankheiten eine

therapeutische Option. So wird spekuliert, dass NETs z. B. in Autoimmunkrankheiten wie Vaskulitis der kleinen Gefäße oder systemischer Lupus erythematoses eine Rolle spielen, indem sie die Bildung von Autoantikörpern induzieren und durch Exposition toxischer Moleküle (ROS, Granulaproteine) Gewebeschäden verursachen. Zugleich werden die NET-Strukturen von Autoantikörpern erkannt, verzögert abgebaut und tragen so zur Verschlechterung der Autoimmunkrankheit bei. In den Autoimmunkrankheiten Epidermolysis bullosa acquisita und bullöses Pemphigoid führen Autoimmunkomplexe zur Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Es wurde gezeigt, dass die NADPH-Oxidase und neutrophile Elastase zur Schädigung von Gewebe beitragen und so bei der Pathogenese dieser Krankheiten eine wichtige Rolle spielen. Da die NADPH-Oxidase und neutrophile Elastase für die ROS-abhängige NET-Bildung essentiell sind, könnten NETs auch in diesen Autoimmunkrankheiten eine krankheitsfördernde Rolle spielen. Die im Rahmen dieser Arbeit erlangten neuen Erkenntnisse tragen zum einen zum Verständnis der ablaufenden Prozesse während der NET-Bildung bei, zum anderen bieten sie neue Ansatzpunkte im Kampf gegen Autoimmunkrankheiten.

Der synthetische Stimulus PMA führt durch Aktivierung der Proteinkinase C zur ausgeprägten ROS-Bildung in neutrophilen Granulozyten. Die Hemmung der ROS- und NET-Bildung PMA-stimulierter neutrophiler Granulozyten unter Sauerstoffkonzentrationen, die am Entzündungsherd vorherrschen (2 % O₂, Hypoxie), könnte an der Verwendung des synthetischen Stimulus gelegen haben. Wichtig wäre die Betrachtung des Einflusses von Hypoxie vergleichend mit DMOG und Normoxie auf die ROS- und NET-Bildung neutrophiler Granulozyten mit physiologischeren Stimuli, wie z. B. Immunkomplexen. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob Antioxidantien in Immunkomplex-induzierten NETs immunmodulatorisch eingesetzt werden können.

Literaturverzeichnis

1. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2009. 7th edition.
2. Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli, *Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects*. Lab Invest, 2000. 80: p. 617-53.
3. Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D.S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky, *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. 303: p. 1532-5.
4. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. 4: p. 499-11.
5. Brinkmann, V. and A. Zychlinsky, *Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?*, in *J Cell Biol* 2012. p. 773-83.
6. Hellberg, L., S. Fuchs, C. Gericke, A. Sarkar, M. Behnen, W. Solbach, and T. Laskay, *Proinflammatory stimuli enhance phagocytosis of apoptotic cells by neutrophil granulocytes*. ScientificWorldJournal, 2011. 11: p. 2230-36.
7. Homburg, C.H., M. de Haas, A.E. von dem Borne, A.J. Verhoeven, C.P. Reutelingsperger, and D. Roos, *Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro*. Blood, 1995. 85: p. 532-40.
8. Klebanoff, S.J., *Myeloperoxidase: friend and foe*. J Leukoc Biol, 2005. 77: p. 598-625.
9. Sheppard, F.R., M.R. Kelher, E.E. Moore, N.J. McLaughlin, A. Banerjee, and C.C. Silliman, *Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation*. J Leukoc Biol, 2005. 78: p. 1025-42.
10. El Benna, J., J. Han, J.W. Park, E. Schmid, R.J. Ulevitch, and B.M. Babior, *Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK*. Arch Biochem Biophys, 1996. 334: p. 395-400.
11. Keshari, R.S., A. Verma, M.K. Barthwal, and M. Dikshit, *Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils*. J Cell Biochem, 2013. 114: p. 532-40.
12. Gray, R.D., C.D. Lucas, A. Mackellar, F. Li, K. Hiersemenzel, C. Haslett, D.J. Davidson, and A.G. Rossi, *Activation of conventional protein kinase C (PKC) is*

- critical in the generation of human neutrophil extracellular traps.* J Inflamm (Lond), 2013. 10: p. 12.
13. Li, Y. and M.A. Trush, *Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. 253: p. 295-9.
 14. Boveris, A. and B. Chance, *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen.* Biochem J, 1973. 134: p. 707-16.
 15. Boveris, A., N. Oshino, and B. Chance, *The cellular production of hydrogen peroxide.* Biochem J, 1972. 128: p. 617-30.
 16. Cino, M. and R.F. Del Maestro, *Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: the effect of reoxygenation following postdecapitative ischemia.* Arch Biochem Biophys, 1989. 269: p. 623-38.
 17. Narayanan, P.K., W.O. Carter, P.E. Ganey, R.A. Roth, S.L. Voytik-Harbin, and J.P. Robinson, *Impairment of human neutrophil oxidative burst by polychlorinated biphenyls: inhibition of superoxide dismutase activity.* J Leukoc Biol, 1998. 63: p. 216-24.
 18. Heikkila, R.E., F.S. Cabbat, and G. Cohen, *In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate.* J Biol Chem, 1976. 251: p. 2182-5.
 19. Costa, D., A.P. Marques, R.L. Reis, J.L. Lima, and E. Fernandes, *Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives.* Free Radic Biol Med, 2006. 40: p. 632-40.
 20. Kettle, A.J. and C.C. Winterbourn, *Mechanism of inhibition of myeloperoxidase by anti-inflammatory drugs.* Biochem Pharmacol, 1991. 41: p. 1485-92.
 21. Steinberg, B.E. and S. Grinstein, *Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death.* Sci STKE, 2007. 2007: p. pe11.
 22. Mantovani, A., M.A. Cassatella, C. Costantini, and S. Jaillon, *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity.* Nat Rev Immunol, 2011. 11: p. 519-31.
 23. Remijsen, Q., T.W. Kuijpers, E. Wirawan, S. Lippens, P. Vandenabeele, and T. Vanden Berghe, *Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality.* Cell Death Differ, 2011. 18: p. 581-8.
 24. Kaplan, M.J. and M. Radic, *Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity.* J Immunol, 2012. 189: p. 2689-95.

25. Brinkmann, V. and A. Zychlinsky, *Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs*. Nat Rev Microbiol, 2007. 5: p. 577-82.
26. Pilsczek, F.H., D. Salina, K.K. Poon, C. Fahey, B.G. Yipp, C.D. Sibley, S.M. Robbins, F.H. Green, M.G. Surette, M. Sugai, M.G. Bowden, M. Hussain, K. Zhang, and P. Kubes, *A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus*. J Immunol, 2010. 185: p. 7413-25.
27. Yousefi, S., J.A. Gold, N. Andina, J.J. Lee, A.M. Kelly, E. Kozlowski, I. Schmid, A. Straumann, J. Reichenbach, G.J. Gleich, and H.U. Simon, *Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense*. Nat Med, 2008. 14: p. 949-53.
28. Yousefi, S., C. Mihalache, E. Kozlowski, I. Schmid, and H.U. Simon, *Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps*. Cell Death Differ, 2009. 16: p. 1438-44.
29. Fuchs, T.A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky, *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2007. 176: p. 231-41.
30. Metzler, K.D., T.A. Fuchs, W.M. Nauseef, D. Reumaux, J. Roesler, I. Schulze, V. Wahn, V. Papayannopoulos, and A. Zychlinsky, *Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity*. Blood, 2011. 117: p. 953-9.
31. Segal, B.H., P. Veys, H. Malech, and M.J. Cowan, *Chronic granulomatous disease: lessons from a rare disorder*. Biol Blood Marrow Transplant, 2011. 17: p. S123-31.
32. Parker, H., A.M. Albrett, A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, *Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide*. J Leukoc Biol, 2011. 91: p. 396-76.
33. Remijsen, Q., T. Vanden Berghe, E. Wirawan, B. Asselbergh, E. Parthoens, R. De Rycke, S. Noppen, M. Delforge, J. Willems, and P. Vandenabeele, *Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation*. Cell Res, 2010. 21: p. 290-304.
34. Palmer, L.J., P.R. Cooper, M.R. Ling, H.J. Wright, A. Huissoon, and I.L. Chapple, *Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans*. Clin Exp Immunol, 2012. 167: p. 261-8.

35. Akong-Moore, K., O.A. Chow, M. von Kockritz-Blickwede, and V. Nizet, *Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation*. PLoS One, 2012. 7: p. e42984.
36. Nishinaka, Y., T. Arai, S. Adachi, A. Takaori-Kondo, and K. Yamashita, *Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. 413: p. 75-9.
37. Patel, S., S. Kumar, A. Jyoti, B.S. Srinag, R.S. Keshari, R. Saluja, A. Verma, K. Mitra, M.K. Barthwal, H. Krishnamurthy, V.K. Bajpai, and M. Dikshit, *Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation*. Nitric Oxide, 2010. 22: p. 226-34.
38. Kessenbrock, K., M. Krumbholz, U. Schonermarck, W. Back, W.L. Gross, Z. Werb, H.J. Grone, V. Brinkmann, and D.E. Jenne, *Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis*. Nat Med, 2009. 15: p. 623-5.
39. Radic, M. and M.J. Kaplan, *Jumbled NETs promote vasculitis*. Arthritis Rheum, 2012. 64: p. 3498-501.
40. Lande, R., D. Ganguly, V. Facchinetti, L. Frasca, C. Conrad, J. Gregorio, S. Meller, G. Chamilos, R. Sebasigari, V. Riccieri, R. Bassett, H. Amuro, S. Fukuhara, T. Ito, Y.J. Liu, and M. Gilliet, *Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus*. Sci Transl Med, 2011. 3: p. 73ra19.
41. Saffarzadeh, M. and K.T. Preissner, *Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection*. Curr Opin Hematol, 2013. 20: p. 3-9.
42. Hakkim, A., B.G. Furnrohr, K. Amann, B. Laube, U.A. Abed, V. Brinkmann, M. Herrmann, R.E. Voll, and A. Zychlinsky, *Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107: p. 9813-8.
43. Knight, J.S., C. Carmona-Rivera, and M.J. Kaplan, *Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases*. Front Immunol, 2012. 3: p. 380.
44. Tillack, K., P. Breiden, R. Martin, and M. Sospedra, *T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses*. J Immunol, 2012. 188: p. 3150-9.

45. Halliwell, B., *Biochemistry of oxidative stress*. Biochem Soc Trans, 2007. 35: p. 1147-50.
46. Kinnula, V.L., Y. Soini, K. Kvist-Makela, E.R. Savolainen, and P. Koistinen, *Antioxidant defense mechanisms in human neutrophils*. Antioxid Redox Signal, 2002. 4: p. 27-34.
47. Shiba, Y., T. Kinoshita, H. Chuman, Y. Taketani, E. Takeda, Y. Kato, M. Naito, K. Kawabata, A. Ishisaka, J. Terao, and Y. Kawai, *Flavonoids as substrates and inhibitors of myeloperoxidase: Molecular actions of aglycone and metabolites*. Chemical Research in Toxicology, 2008. 21: p. 1600-9.
48. Tauber, A.I., J.R. Fay, and M.A. Marletta, *Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase*. Biochem Pharmacol, 1984. 33: p. 1367-9.
49. Singleton, V.L., Noble, A.C., *Wine flavour and phenolic substances*. In: *Phenolic, sulfur and nitrogen compounds in food flavors* (G. Charalambous and I. Katz, eds.). ACS Symp. Ser., Washington, DC., 1976: p. 47-70.
50. Kofink, M., M. Papagiannopoulos, and R. Galensa, *(-)-Catechin in cocoa and chocolate: occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol enantiomer*. Molecules, 2007. 12: p. 1274-88.
51. Balentine, D.A., *Manufacturing and Chemistry of Tea*. In: *Phenolic compounds in food and their effects on health I: Analysis, occurrence and chemistry* (C.T. Ho, C.Y. Lee, M.T. Huang). ACS Symp. Ser., Washington, DC, 1992: p. 102-17.
52. Vasconcelos, P.C., L.N. Seito, L.C. Di Stasi, C. Akiko Hiruma-Lima, and C.H. Pellizzon, *Epicatechin used in the treatment of intestinal inflammatory disease: an analysis by experimental models*. Evid Based Complement Alternat Med, 2012. 2012: p. 508902.
53. Duke, J.A., *Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992.
54. Selloum, L., H. Bouriche, C. Tigrine, and C. Boudoukha, *Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation*. Exp Toxicol Pathol, 2003. 54: p. 313-8.
55. Traber, M.G. and J.F. Stevens, *Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective*. Free Radic Biol Med, 2011. 51: p. 1000-13.
56. Niki, E., *Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals*. Am J Clin Nutr, 1991. 54: p. 1119S-24S.

57. Biacs, P.A., C. B., and H. A., *Factors Affecting Stability of Colored Substances in Paprika Powders*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992. 40: p. 363-7.
58. Ziegler, S.J., B. Meier, and O. Sticher, *Fast and Selective Assay of l-Ascorbic Acid in Rose Hips by RP-HPLC Coupled with Electrochemical and/or Spectrophotometric Detection*. Planta Med, 1986: p. 383-7.
59. Hassanein, M.M. and A.G. Abedel-Razek, *Chromatographic quantitation of some bioactive minor components in oils of wheat germ and grape seeds produced as by-products*. J Oleo Sci, 2009. 58: p. 227-33.
60. Servili, M., S. Esposto, R. Fabiani, S. Urbani, A. Taticchi, F. Mariucci, R. Selvaggini, and G.F. Montedoro, *Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure*. Inflammopharmacology, 2009. 17: p. 76-84.
61. Tamai, H., J.F. Kachur, M.B. Grisham, and T.S. Gaginella, *Scavenging effect of 5-aminosalicylic acid on neutrophil-derived oxidants. Possible contribution to the mechanism of action in inflammatory bowel disease*. Biochem Pharmacol, 1991. 41: p. 1001-6.
62. Allgayer, H., S. Rang, U. Klotz, P. Bohne, J. Retey, W. Kruis, and R. Gugler, *Superoxide inhibition following different stimuli of respiratory burst and metabolism of aminosalicylates in neutrophils*. Dig Dis Sci, 1994. 39: p. 145-51.
63. Milara, J., G. Juan, T. Peiro, A. Serrano, and J. Cortijo, *Neutrophil activation in severe, early-onset COPD patients versus healthy non-smoker subjects in vitro: effects of antioxidant therapy*. Respiration, 2012. 83: p. 147-58.
64. Reiter, R.J., R.M. Sainz, S. Lopez-Burillo, J.C. Mayo, L.C. Manchester, and D.X. Tan, *Melatonin ameliorates neurologic damage and neurophysiologic deficits in experimental models of stroke*. Ann N Y Acad Sci, 2003. 993: p. 35-47; discussion 48-53.
65. Reiter, R.J. and D.X. Tan, *Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart*. Cardiovasc Res, 2003. 58: p. 10-9.
66. Marshall, K.A., R.J. Reiter, B. Poeggeler, O.I. Aruoma, and B. Halliwell, *Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro*. Free Radic Biol Med, 1996. 21: p. 307-15.
67. Reiter, R.J., D.X. Tan, J.C. Mayo, R.M. Sainz, J. Leon, and Z. Czarnocki, *Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans*. Acta Biochim Pol, 2003. 50: p. 1129-46.

68. Parij, N., A.M. Nagy, P. Fondu, and J. Neve, *Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of human neutrophils*. Eur J Pharmacol, 1998. 352: p. 299-305.
69. Eltzschig, H.K. and P. Carmeliet, *Hypoxia and inflammation*. N Engl J Med, 2011. 364: p. 656-65.
70. Nizet, V. and R.S. Johnson, *Interdependence of hypoxic and innate immune responses*. Nat Rev Immunol, 2009. 9: p. 609-17.
71. Walmsley, S.R., C. Print, N. Farahi, C. Peyssonnaud, R.S. Johnson, T. Cramer, A. Sobolewski, A.M. Condliffe, A.S. Cowburn, N. Johnson, and E.R. Chilvers, *Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity*. J Exp Med, 2005. 201: p. 105-15.
72. Gale, D.P. and P.H. Maxwell, *The role of HIF in immunity*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. 42: p. 486-94.
73. Jaakkola, P., D.R. Mole, Y.M. Tian, M.I. Wilson, J. Gielbert, S.J. Gaskell, A. von Kriegsheim, H.F. Hebestreit, M. Mukherji, C.J. Schofield, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, and P.J. Ratcliffe, *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation*. Science, 2001. 292: p. 468-72.
74. McGovern, N.N., A.S. Cowburn, L. Porter, S.R. Walmsley, C. Summers, A.A. Thompson, S. Anwar, L.C. Willcocks, M.K. Whyte, A.M. Condliffe, and E.R. Chilvers, *Hypoxia selectively inhibits respiratory burst activity and killing of Staphylococcus aureus in human neutrophils*. J Immunol, 2011. 186: p. 453-63.
75. Hermann, E., *Einfluss von Antioxidantien auf die Bildung von neutrophil extracellular traps (NETs)*. Bachelorarbeit, Bachelorstudiengang Molecular Life Science (MLS), Universität zu Lübeck, 2012.
76. Metzner, M., *Funktionen neutrophiler Granulozyten unter Nachahmung hypoxischer Bedingungen durch DMOG*. Bachelorarbeit, Bachelorstudiengang Molecular Life Science (MLS), Universität zu Lübeck, 2011.
77. Pick, E. and D. Mizel, *Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader*. J Immunol Methods, 1981. 46: p. 211-26.
78. Tarpey, M.M., D.A. Wink, and M.B. Grisham, *Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. 286: p. R431-44.

79. Stevens, P. and D. Hong, *The role of myeloperoxidase and superoxide anion in the luminol-and lucigenin-dependent chemiluminescence of human neutrophils*. Microchem J, 1984. 30: p. 135-46.
80. Murrant, C.L. and M.B. Reid, *Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle*. Microsc Res Tech, 2001. 55: p. 236-48.
81. Gyllenhammar, H., *Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production*. J Immunol Methods, 1987. 97: p. 209-13.
82. Caldefie-Chezet, F., S. Walrand, C. Moinard, A. Tridon, J. Chassagne, and M.P. Vasson, *Is the neutrophil reactive oxygen species production measured by luminol and lucigenin chemiluminescence intra or extracellular? Comparison with DCFH-DA flow cytometry and cytochrome c reduction*. Clin Chim Acta, 2002. 319: p. 9-17.
83. von Kockritz-Blickwede, M., O.A. Chow, and V. Nizet, *Fetal calf serum contains heat-stable nucleases that degrade neutrophil extracellular traps*. Blood, 2009. 114: p. 5245-6.
84. Zmijewski, J.W., E. Lorne, X. Zhao, Y. Tsuruta, Y. Sha, G. Liu, G.P. Siegal, and E. Abraham, *Mitochondrial respiratory complex I regulates neutrophil activation and severity of lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. 178: p. 168-79.
85. Li, N., K. Ragheb, G. Lawler, J. Sturgis, B. Rajwa, J.A. Melendez, and J.P. Robinson, *Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production*. J Biol Chem, 2003. 278: p. 8516-25.
86. Myhre, O., J.M. Andersen, H. Aarnes, and F. Fonnum, *Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation*. Biochem Pharmacol, 2003. 65: p. 1575-82.
87. Henderson, L.M. and J.B. Chappell, *Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation?* Eur J Biochem, 1993. 217: p. 973-80.
88. Lieberman, M.M., D.M. Sachanandani, and C.A. Pinney, *Comparative study of neutrophil activation by chemiluminescence and flow cytometry*. Clin Diagn Lab Immunol, 1996. 3: p. 654-62.
89. Lin, A.M., C.J. Rubin, R. Khandpur, J.Y. Wang, M. Riblett, S. Yalavarthi, E.C. Villanueva, P. Shah, M.J. Kaplan, and A.T. Bruce, *Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis*. J Immunol, 2011. 187: p. 490-500.

90. Sangaletti, S., C. Tripodo, C. Chiodoni, C. Guarnotta, B. Cappetti, P. Casalini, S. Piconese, M. Parenza, C. Guiducci, C. Vitali, and M.P. Colombo, *Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity*. Blood, 2012. 120: p. 3007-18.
91. Dallegri, F., L. Ottonello, A. Ballestrero, F. Bogliolo, F. Ferrando, and F. Patrone, *Cytoprotection against neutrophil derived hypochlorous acid: a potential mechanism for the therapeutic action of 5-aminosalicylic acid in ulcerative colitis*. Gut, 1990. 31: p. 184-6.
92. Washko, P.W., Y. Wang, and M. Levine, *Ascorbic acid recycling in human neutrophils*. J Biol Chem, 1993. 268: p. 15531-5.
93. Kirchner, T., J. Flemmig, P.G. Furtmuller, C. Obinger, and J. Arnhold, *(-)-Epicatechin enhances the chlorinating activity of human myeloperoxidase*. Arch Biochem Biophys, 2010. 495: p. 21-7.
94. Washko, P., D. Rotrosen, and M. Levine, *Ascorbic acid in human neutrophils*. Am J Clin Nutr, 1991. 54: p. 1221S-7S.
95. Schorn, C., C. Janko, V. Krenn, Y. Zhao, L.E. Munoz, G. Schett, and M. Herrmann, *Bonding the foe - NETting neutrophils immobilize the pro-inflammatory monosodium urate crystals*. Front Immunol, 2012. 3: p. 376.
96. Varga, Z., E. Kosaras, E. Komodi, M. Katko, I. Karpati, J. Balla, G. Paragh, M.C. Aisa, and F. Galli, *Effects of tocopherols and 2,2'-carboxyethyl hydroxychromans on phorbol-ester-stimulated neutrophils*. J Nutr Biochem, 2008. 19: p. 320-7.
97. Nielsen, O.H., P.N. Bouchelouche, D. Berild, and I. Ahnfelt-Ronne, *Effect of 5-aminosalicylic acid and analogous substances on superoxide generation and intracellular free calcium in human neutrophilic granulocytes*. Scand J Gastroenterol, 1993. 28: p. 527-32.
98. Pieri, C., R. Recchioni, F. Moroni, F. Marcheselli, M. Marra, S. Marinoni, and R. Di Primio, *Melatonin regulates the respiratory burst of human neutrophils and their depolarization*. J Pineal Res, 1998. 24: p. 43-9.
99. Hasegawa, H., K. Suzuki, S. Nakaji, and K. Sugawara, *Analysis and assessment of the capacity of neutrophils to produce reactive oxygen species in a 96-well microplate format using lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence*. J Immunol Methods, 1997. 210: p. 1-10.

100. Briheim, G., O. Stendahl, and C. Dahlgren, *Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes*. Infect Immun, 1984. 45: p. 1-5.
101. Zinkernagel, A.S., R.S. Johnson, and V. Nizet, *Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection*. J Mol Med (Berl), 2007. 85: p. 1339-46.
102. Jung, F., *Funktionsanalyse neutrophiler Granulozyten unter Hypoxie und Normoxie*. Masterarbeit, Masterstudiengang Molecular Life Science (MLS), Universität zu Lübeck, 2008.
103. Peyssonnaud, C., P. Cejudo-Martin, A. Doedens, A.S. Zinkernagel, R.S. Johnson, and V. Nizet, *Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis*. J Immunol, 2007. 178: p. 7516-9.
104. O'Donnell, B.V., D.G. Tew, O.T. Jones, and P.J. England, *Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase*. Biochem J, 1993. 290 (Pt 1): p. 41-9.
105. Furtmüller, P.G., M. Zederbauer, W. Jantschko, J. Helm, M. Bogner, C. Jakopitsch, and C. Obinger, *Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases*. Arch Biochem Biophys, 2006. 445: p. 199-213.
106. Fossati, G., D.A. Moulding, D.G. Spiller, R.J. Moots, M.R. White, and S.W. Edwards, *The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis*. J Immunol, 2003. 170: p. 1964-72.
107. Alba, G., R. El Bekay, M. Alvarez-Maqueda, P. Chacon, A. Vega, J. Monteseirin, C. Santa Maria, E. Pintado, F.J. Bedoya, R. Bartrons, and F. Sobrino, *Stimulators of AMP-activated protein kinase inhibit the respiratory burst in human neutrophils*. FEBS Lett, 2004. 573: p. 219-25.
108. Izumi, Y., K. Ogino, T. Murata, H. Kobayashi, and T. Hobara, *Effects of diethyldithiocarbamate on activating mechanisms of neutrophils*. Pharmacol Toxicol, 1994. 74: p. 280-6.
109. Tithof, P.K., M.L. Contreras, and P.E. Ganey, *Aroclor 1242 stimulates the production of inositol phosphates in polymorphonuclear neutrophils*. Toxicol Appl Pharmacol, 1995. 131: p. 136-43.
110. Skulachev, V.P., A.A. Sharaf, and E.A. Liberman, *Proton conductors in the respiratory chain and artificial membranes*. Nature, 1967. 216: p. 718-9.

111. Turrens, J.F., *Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain*. Biosci Rep, 1997. 17: p. 3-8.
112. Parker, H., M. Dragunow, M.B. Hampton, A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, *Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus*. J Leukoc Biol, 2012. 92: p. 841-9.
113. Papayannopoulos, V., K.D. Metzler, A. Hakkim, and A. Zychlinsky, *Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2010. 191: p. 677-91.
114. Arnhold, J. and J. Flemmig, *Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity*. Arch Biochem Biophys, 2010. 500: p. 92-106.
115. Winterbourn, C.C. and A.J. Kettle, *Reactions of superoxide with myeloperoxidase and its products*. Jpn J Infect Dis, 2004. 57: p. S31-3.
116. Villanueva, E., S. Yalavarthi, C.C. Berthier, J.B. Hodgins, R. Khandpur, A.M. Lin, C.J. Rubin, W. Zhao, S.H. Olsen, M. Klinker, D. Shealy, M.F. Denny, J. Plumas, L. Chaperot, M. Kretzler, A.T. Bruce, and M.J. Kaplan, *Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2011. 187: p. 538-52.
117. Garcia-Romo, G.S., S. Caielli, B. Vega, J. Connolly, F. Allantaz, Z. Xu, M. Punaro, J. Baisch, C. Guiducci, R.L. Coffman, F.J. Barrat, J. Banchereau, and V. Pascual, *Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus*. Sci Transl Med, 2011. 3: p. 73ra20.
118. Manzenreiter, R., F. Kienberger, V. Marcos, K. Schilcher, W.D. Krautgartner, A. Obermayer, M. Huml, W. Stoiber, A. Hector, M. Griesse, M. Hannig, M. Studnicka, L. Vitkov, and D. Hartl, *Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy*. J Cyst Fibros, 2012. 11: p. 84-92.
119. Gupta, A.K., P. Hasler, W. Holzgreve, and S. Hahn, *Neutrophil NETs: a novel contributor to preeclampsia-associated placental hypoxia?* Semin Immunopathol, 2007. 29: p. 163-7.
120. Vitkov, L., M. Klappacher, M. Hannig, and W.D. Krautgartner, *Extracellular neutrophil traps in periodontitis*. J Periodontal Res, 2009. 44: p. 664-72.
121. Daels-Rakotoarison, D.A., B. Gressier, F. Trotin, C. Brunet, M. Luyckx, T. Dine, F. Bailleul, M. Cazin, and J.C. Cazin, *Effects of Rosa canina fruit extract on neutrophil respiratory burst*. Phytother Res, 2002. 16: p. 157-61.

122. Ciz, M., P. Denev, M. Kratchanova, O. Vasicek, G. Ambrozova, and A. Lojek, *Flavonoids inhibit the respiratory burst of neutrophils in mammals*. *Oxid Med Cell Longev*, 2012. 2012: p. 181295.
123. Selloum, L., S. Reichl, M. Muller, L. Sebihi, and J. Arnhold, *Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils*. *Arch Biochem Biophys*, 2001. 395: p. 49-56.
124. Suzuki, M., K. Yoshino, M. Maeda-Yamamoto, T. Miyase, and M. Sano, *Inhibitory effects of tea catechins and O-methylated derivatives of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate on mouse type IV allergy*. *J Agric Food Chem*, 2000. 48: p. 5649-53.
125. Heiss, C., P. Kleinbongard, A. Dejam, S. Perre, H. Schroeter, H. Sies, and M. Kelm, *Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 46: p. 1276-83.
126. Schroeter, H., C. Heiss, J. Balzer, P. Kleinbongard, C.L. Keen, N.K. Hollenberg, H. Sies, C. Kwik-Urbe, H.H. Schmitz, and M. Kelm, *(-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103: p. 1024-9.
127. Kawai, Y., Y. Matsui, H. Kondo, H. Morinaga, K. Uchida, N. Miyoshi, Y. Nakamura, and T. Osawa, *Galloylated catechins as potent inhibitors of hypochlorous acid-induced DNA damage*. *Chem Res Toxicol*, 2008. 21: p. 1407-14.
128. Nishikawa, H., K. Wakano, and S. Kitani, *Inhibition of NADPH oxidase subunits translocation by tea catechin EGCG in mast cell*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 362: p. 504-9.
129. Heptinstall, S., J. May, S. Fox, C. Kwik-Urbe, and L. Zhao, *Cocoa flavanols and platelet and leukocyte function: recent in vitro and ex vivo studies in healthy adults*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006. 47 Suppl 2: p. S197-205; discussion S206-9.
130. Gamet-Payrastre, L., S. Manenti, M.P. Gratacap, J. Tulliez, H. Chap, and B. Payrastre, *Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase*. *Gen Pharmacol*, 1999. 32: p. 279-86.
131. Gerber, C.E., D. Niethammer, and G. Bruchelt, *Differences in the accumulation of ascorbic acid in normal, myeloperoxidase deficient and NADPH-oxidase deficient granulocytes*. *Int J Vitam Nutr Res*, 2002. 72: p. 251-6.
132. Goldschmidt, M.C., *Reduced bactericidal activity in neutrophils from scorbutic animals and the effect of ascorbic acid on these target bacteria in vivo and in vitro*. *Am J Clin Nutr*, 1991. 54: p. 1214S-20S.

133. Vissers, M.C. and R.P. Wilkie, *Ascorbate deficiency results in impaired neutrophil apoptosis and clearance and is associated with up-regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha*. J Leukoc Biol, 2007. 81: p. 1236-44.
134. Chatterjee, M., R. Saluja, V. Kumar, A. Jyoti, G. Kumar Jain, M. Kumar Barthwal, and M. Dikshit, *Ascorbate sustains neutrophil NOS expression, catalysis, and oxidative burst*. Free Radic Biol Med, 2008. 45: p. 1084-93.
135. Chapple, I.L., J.B. Matthews, H.J. Wright, A.E. Scott, H.R. Griffiths, and M.M. Grant, *Ascorbate and alpha-tocopherol differentially modulate reactive oxygen species generation by neutrophils in response to FcgammaR and TLR agonists*. Innate Immun, 2013. 19: p. 152-9.
136. Falk, R.J., R.S. Terrell, L.A. Charles, and J.C. Jennette, *Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87: p. 4115-9.
137. Harper, L., S.L. Nuttall, U. Martin, and C.O. Savage, *Adjuvant treatment of patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis with vitamins E and C reduces superoxide production by neutrophils*. Rheumatology (Oxford), 2002. 41: p. 274-8.
138. Kanno, T., T. Utsumi, Y. Takehara, A. Ide, J. Akiyama, T. Yoshioka, A.A. Horton, and K. Utsumi, *Inhibition of neutrophil-superoxide generation by alpha-tocopherol and coenzyme Q*. Free Radic Res, 1996. 24: p. 281-9.
139. Hanauer, S.B. and D.H. Present, *The state of the art in the management of inflammatory bowel disease*. Rev Gastroenterol Disord, 2003. 3: p. 81-92.
140. Fournier, B.M. and C.A. Parkos, *The role of neutrophils during intestinal inflammation*. Mucosal Immunol, 2012. 5: p. 354-66.
141. Savchenko, A.S., A. Inoue, R. Ohashi, S. Jiang, G. Hasegawa, T. Tanaka, T. Hamakubo, T. Kodama, Y. Aoyagi, T. Ushiki, and M. Naito, *Long pentraxin 3 (PTX3) expression and release by neutrophils in vitro and in ulcerative colitis*. Pathol Int, 2011. 61: p. 290-7.
142. Magrone, T. and E. Jirillo, *Mechanisms of neutrophil-mediated disease: innovative therapeutic interventions*. Curr Pharm Des, 2012. 18: p. 1609-19.
143. Dinis, T.C., V.M. Maderia, and L.M. Almeida, *Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers*. Arch Biochem Biophys, 1994. 315: p. 161-9.

144. Baltazar, M.T., R.J. Dinis-Oliveira, J.A. Duarte, M.L. Bastos, and F. Carvalho, *Antioxidant properties and associated mechanisms of salicylates*. Curr Med Chem, 2011. 18: p. 3252-64.
145. Peake, J. and K. Suzuki, *Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress*. Exerc Immunol Rev, 2004. 10: p. 129-41.
146. Yan, J., X. Meng, L.M. Wancket, K. Lintner, L.D. Nelin, B. Chen, K.P. Francis, C.V. Smith, L.K. Rogers, and Y. Liu, *Glutathione Reductase Facilitates Host Defense by Sustaining Phagocytic Oxidative Burst and Promoting the Development of Neutrophil Extracellular Traps*. J Immunol, 2012. 188: p. 2316-27.
147. Ohman, L., C. Dahlgren, P. Follin, D. Lew, and O. Stendahl, *N-acetylcysteine enhances receptor-mediated phagocytosis by human neutrophils*. Agents Actions, 1992. 36: p. 271-7.
148. Caudrillier, A., K. Kessenbrock, B.M. Gilliss, J.X. Nguyen, M.B. Marques, M. Monestier, P. Toy, Z. Werb, and M.R. Looney, *Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury*. J Clin Invest, 2012. 122: p. 2661-71.
149. Lapponi, M.J., A. Carestia, V.I. Landoni, L. Rivadeneyra, J. Etulain, S. Negrotto, R.G. Pozner, and M. Schattner, *Regulation of neutrophil extracellular trap formation by anti-inflammatory drugs*. J Pharmacol Exp Ther, 2013. 345: p. 430-7.
150. Ximenes, V.F., S.O. Silva, M.R. Rodrigues, L.H. Catalani, G.J. Maghzal, A.J. Kettle, and A. Campa, *Superoxide-dependent oxidation of melatonin by myeloperoxidase*. J Biol Chem, 2005. 280: p. 38160-9.
151. Allegra, M., P.G. Furtmuller, G. Regelsberger, M.L. Turco-Liveri, L. Tesoriere, M. Perretti, M.A. Livrea, and C. Obinger, *Mechanism of reaction of melatonin with human myeloperoxidase*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 282: p. 380-6.
152. Malhotra, S., G. Sawhney, and P. Pandhi, *The therapeutic potential of melatonin: a review of the science*. MedGenMed, 2004. 6: p. 46.
153. Carrillo-Vico, A., J.M. Guerrero, P.J. Lardone, and R.J. Reiter, *A review of the multiple actions of melatonin on the immune system*. Endocrine, 2005. 27: p. 189-200.
154. Keithahn, C. and A. Lerchl, *5-hydroxytryptophan is a more potent in vitro hydroxyl radical scavenger than melatonin or vitamin C*. J Pineal Res, 2005. 38: p. 62-6.
155. Nathan, C., *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities*. Nat Rev Immunol, 2006. 6: p. 173-82.

156. Peyssonnaud, C., V. Datta, T. Cramer, A. Doedens, E.A. Theodorakis, R.L. Gallo, N. Hurtado-Ziola, V. Nizet, and R.S. Johnson, *HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes*. J Clin Invest, 2005. 115: p. 1806-15.
157. Sabroe, I., E.C. Jones, L.R. Usher, M.K. Whyte, and S.K. Dower, *Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses*. J Immunol, 2002. 168: p. 4701-10.
158. Escribese, M.M., M. Casas, and A.L. Corbi, *Influence of low oxygen tensions on macrophage polarization*. Immunobiology, 2012. 217: p. 1233-40.
159. Decoursey, T.E. and E. Ligeti, *Regulation and termination of NADPH oxidase activity*. Cell Mol Life Sci, 2005. 62: p. 2173-93.
160. Dehne, N. and B. Brune, *HIF-1 in the inflammatory microenvironment*. Exp Cell Res, 2009. 315: p. 1791-7.
161. Hervouet, E., A. Cizkova, J. Demont, A. Vojtiskova, P. Pecina, N.L. Franssen-van Hal, J. Keijer, H. Simonnet, R. Ivanek, S. Kmoch, C. Godinot, and J. Houstek, *HIF and reactive oxygen species regulate oxidative phosphorylation in cancer*. Carcinogenesis, 2008. 29: p. 1528-37.
162. Okumura, C.Y., A. Hollands, D.N. Tran, J. Olson, S. Dahesh, M. von Kockritz-Blickwede, W. Thienphrapa, C. Corle, S.N. Jeung, A. Kotsakis, R.A. Shalwitz, R.S. Johnson, and V. Nizet, *A new pharmacological agent (AKB-4924) stabilizes hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) and increases skin innate defenses against bacterial infection*. J Mol Med (Berl), 2012. 90: p. 1079-89.
163. Gerber, C.E., G. Bruchelt, U.B. Falk, A. Kimpfler, O. Hauschild, S. Kuci, T. Bachi, D. Niethammer, and R. Schubert, *Reconstitution of bactericidal activity in chronic granulomatous disease cells by glucose-oxidase-containing liposomes*. Blood, 2001. 98: p. 3097-105.
164. Zinkernagel, A.S., C. Peyssonnaud, R.S. Johnson, and V. Nizet, *Pharmacologic augmentation of hypoxia-inducible factor-1alpha with mimosine boosts the bactericidal capacity of phagocytes*. J Infect Dis, 2008. 197: p. 214-7.
165. McInturff, A.M., M.J. Cody, E.A. Elliott, J.W. Glenn, J.W. Rowley, M.T. Rondina, and C.C. Yost, *Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha*. Blood, 2012. 120: p. 3118-25.

166. Branitzki-Heinemann, K., C.Y. Okumura, L. Vollger, Y. Kawakami, T. Kawakami, H.Y. Naim, V. Nizet, and M. Von Kockritz-Blickwede, *A novel role for the transcription factor HIF-1alpha in the formation of mast cell extracellular traps*. Biochem J, 2012. 446: p. 159-63.
167. von Kockritz-Blickwede, M., O. Goldmann, P. Thulin, K. Heinemann, A. Norrby-Teglund, M. Rohde, and E. Medina, *Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation*. Blood, 2008. 111: p. 3070-80.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Isolierte neutrophile Granulozyten, angefärbt mittels Diff-Quik-Färbung.....	4
Abbildung 2: Bildung und Hemmung der ROS-Produktion in neutrophilen Granulozyten.....	7
Abbildung 3: Fluoreszenzpräparat neutrophiler Granulozyten und NETs.....	9
Abbildung 4: Bildung von <i>neutrophil extracellular traps</i> (NETs)	10
Abbildung 5: ROS-abhängige NET-Bildung	12
Abbildung 6: Angriffsorte von Antioxidantien.....	15
Abbildung 7: HIF reguliert zahlreiche angeborene Immunfunktionen der Phagozyten	18
Abbildung 8: Stabilisierung von HIF-1 α	19
Abbildung 9: Isolierung neutrophiler Granulozyten Teil 1.....	29
Abbildung 10: Isolierung neutrophiler Granulozyten Teil 2.....	30
Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse neutrophiler Granulozyten	36
Abbildung 12: Detektion von ROS mit der Phenolrot-Methode in stimulierten neutrophilen Granulozyten	40
Abbildung 13: Messung extrazellulärer ROS stimulierter neutrophiler Granulozyten mit der Cytochrom C-Methode.....	41
Abbildung 14: Apoptose und Vitalität von neutrophilen Granulozyten im RPMI-Komplettmedium und NET-Medium	50
Abbildung 15: Apoptose und Vitalität von neutrophilen Granulozyten, inkubiert mit Inhibitoren der verschiedenen Stufen der ROS Bildung.....	51
Abbildung 16: Detektion gebildeter ROS in neutrophilen Granulozyten mit der DHR 123-Methode in Abhängigkeit von der PMA-Konzentration	52
Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären ROS-Produktion neutrophiler Granulozyten nach Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren.....	53
Abbildung 18: Detektion intra- und extrazellulärer ROS neutrophiler Granulozyten nach Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren.....	54
Abbildung 19: Detektion extrazellulärer ROS neutrophiler Granulozyten, inkubiert mit verschiedenen Inhibitoren	56
Abbildung 20: Bildung von NETs durch neutrophile Granulozyten, inkubiert mit Inhibitoren	58
Abbildung 21: NET-Bildung, dargestellt durch Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie	59

Abbildung 22: Bildung von NETs durch neutrophile Granulozyten, inkubiert mit Inhibitoren	60
Abbildung 23: Effekt verschiedener Antioxidantien auf die Apoptose- und Nekroseraten neutrophiler Granulozyten, bestimmt mit Hilfe der Durchflusszytometrie	61
Abbildung 24: Einfluss der Antioxidantien Epicatechin, Catechinhydrat und Rutintrihydrat auf die intra- und extrazelluläre ROS-Bildung neutrophiler Granulozyten	63
Abbildung 25: Intra- und extrazelluläre ROS-Bildung neutrophiler Granulozyten, inkubiert mit den Antioxidantien Ascorbinsäure oder Tocopherol	64
Abbildung 26: Intra- und extrazelluläre ROS-Bildung neutrophiler Granulozyten, inkubiert mit verschiedenen Antioxidantien.....	65
Abbildung 27: Detektion extrazellulärer ROS neutrophiler Granulozyten, inkubiert mit den Antioxidantien Epicatechin, Catechinhydrat und Rutintrihydrat	67
Abbildung 28: Detektion extrazellulärer ROS neutrophiler Granulozyten, inkubiert mit den Antioxidantien Ascorbinsäure oder Tocopherol	68
Abbildung 29: Detektion extrazellulärer ROS neutrophiler Granulozyten, inkubiert mit verschiedenen Antioxidantien	69
Abbildung 30: Bildung von NETs durch PMA stimulierte neutrophile Granulozyten, vorinkubiert mit verschiedenen Flavonoiden.....	71
Abbildung 31: Bildung von NETs durch PMA stimulierte neutrophile Granulozyten, vorinkubiert mit Ascorbinsäure oder Tocopherol	72
Abbildung 32: Bildung von NETs durch PMA stimulierte neutrophile Granulozyten, vorinkubiert mit verschiedenen Antioxidantien.....	73
Abbildung 33: NET-Bildung nach PMA-Stimulation, visualisiert durch Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie.....	74
Abbildung 34: Bildung von NETs in PMA stimulierten neutrophilen Granulozyten, inkubiert mit verschiedenen Antioxidantien.....	76
Abbildung 35: Detektion von HIF-1 α in lysierten HEp-2-Zellen mittels Western Blot.....	78
Abbildung 36: Nachweis von HIF-1 α in Lysaten neutrophiler Granulozyten mittels Western Blot	79
Abbildung 37: Produktion intrazellulärer ROS unter verschiedenen O ₂ -Konzentrationen	81
Abbildung 38: Einfluss von Hypoxie (2 % O ₂) auf die NET-Bildung.....	83
Abbildung 39: Einfluss von Hypoxie (2 % O ₂) auf die NET-Bildung, induziert durch Glucoseoxidase und <i>Staphylococcus aureus</i>	84

Abbildung 40: Bestimmung der Apoptose-, Nekrose- und Überlebensrate in neutrophilen Granulozyten unter Einfluss von DMOG.....	86
Abbildung 41: Nachweis von HIF-1 α in Lysaten von mit DMOG inkubierten neutrophilen Granulozyten mittels Western Blot	87
Abbildung 42: Vergleich der intrazellulären ROS-Produktion zwischen NET- und CL-Medium	88
Abbildung 43: Intrazelluläre ROS-Produktion von neutrophilen Granulozyten unter Nachahmung hypoxischer Bedingungen durch DMOG	89
Abbildung 44: Einfluss von DMOG auf die NET-Bildung	90
Abbildung 45: Hemmung der ROS-Bildung aktivierter neutrophiler Granulozyten durch Inhibitoren der ROS-bildenden Enzyme und mitochondrialen Atmungskette	99
Abbildung 46: Strukturformeln der verwendeten Flavonoide	101
Abbildung 47: Antioxidantien hemmen die ROS und NET Freisetzung aktivierter neutrophiler Granulozyten	107
Abbildung 48: Bildung von ROS und NETs unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.....	114

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Dysregulation der NET-Bildung in pathologischen Situationen	13
--	----

A.1 Publikationen

Kirchner, T., J. Flemmig, P.G. Furtmüller, C. Obinger., and J. Arnhold, *(–)-Epicatechin enhances the chlorinating activity of human myeloperoxidase*. Arch Biochem Biophys, 2010. 495: p. 21-7.

Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen

Kirchner, T., E. Hermann, S. Möller, M. Klinger, W. Solbach, T. Laskay, and M. Behnen, *Antioxidants inhibit the formation of neutrophil extracellular traps (NETs)*, eingereicht in Free Radical Biology & Medicine, 2013.

Hellberg, L., U.K. Samavedam, K. Holdorf, M. Hänsel, A. Recke, T. Beckmann, K. Steinhorst, W.H. Boehncke, **T. Kirchner**, N. Möckel, W. Solbach, D. Zillikens, E. Schmidt, R.J. Ludwig, and T. Laskay, *Methylprednisolone Blocks Autoantibody-Induced Tissue Damage in Experimental Models of Bullous Pemphigoid and Epidermolysis Bullosa Acquisita through Inhibition of Neutrophil Activation*. J Invest Dermatol, 2013. doi: 10.1038/jid.2013.91. Epub ahead of print.

Kirchner, T., E. Hermann, S. Möller, W. Solbach, T. Laskay, and M. Behnen, *Antioxidants prevent the formation of neutrophil extracellular traps*. Eur J Clin Invest, 2013. 43 Suppl 1: p. 19 Albufeira, Portugal (Meeting Abstract).

Behnen, M., C. Leschczyk, S. Möller, **T. Kirchner**, W. Solbach, and T. Laskay, *Immobilized immune complexes stimulate release of neutrophil extracellular traps from human neutrophils via Fc gamma RIIIb by induction of reactive oxygen species*. Eur J Clin Invest, 2013. 43 Suppl 1: p. 5 Albufeira, Portugal (Meeting Abstract).

Kirchner T., S. Möller, M. Klinger, W. Solbach, T. Laskay, and M. Behnen, *The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps*. Mediators Inflamm, 2012. 2012:849136. doi: 10.1155/2012/849136. Epub 2012.

Kirchner, T., M. Klinger, W. Solbach, T. Laskay, and M. Behnen, *Reactive oxygen species and their role in the formation of neutrophil extracellular traps (NETs.)* Eur J Clin Invest, 2012. 42 Suppl 1: p. 32 Budapest, Ungarn (Meeting Abstract).

Kirchner, T., M. Behnen, W. Solbach, and T. Laskay, *The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps*. Eur J Clin Invest, 2011. 41 Suppl. 1: p. 44-5 Heraklion, Griechenland (Meeting Abstract).

A.2 Kongressbeiträge

Antioxidants prevent the formation of neutrophil extracellular traps (NETs). 47th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, 2013. Albufeira, Portugal (Poster).

Reactive oxygen species drive the formation of neutrophil extracellular traps (NETs). 46th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, 2012. Budapest, Ungarn (Poster).

Fangnetze – Fresszellen begehen Kamikaze Welche molekularen Mechanismen stecken dahinter? Lübecker Doktorandentag, 2012. Lübeck, Deutschland (Poster).

Antioxidants influence the formation of neutrophil extracellular traps. Science Retreat des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, 2012, Wismar, Deutschland (Vortrag).

Antioxidants prevent the formation of neutrophil extracellular traps (NETs). 35th Symposium of the North-German Immunologists, 2012. Borstel, Deutschland (Poster).

The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps (NETs). 45th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, 2011. Heraklion, Griechenland (Poster).

ROS and neutrophil extracellular traps as targets for an anti-inflammatory therapy in autoimmune-diseases? Retreat des Schwerpunktprogrammes Autoimmunität der Universität zu Lübeck und des IRN H des Exzellenzclusters Inflammation at Interfaces, 2010, Boltenhagen, Deutschland (Vortrag).

The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps (NETs). 33th Symposium of the North-German Immunologists, 2010. Borstel, Deutschland (Poster).

Danksagung

Während der Anfertigung meiner Dissertation haben mich viele Personen unterstützt. Auf diesem Weg möchte ich mich bei allen ganz herzlich für Ihre Hilfe bedanken.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Werner Solbach für die Aufnahme in das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck und die zahlreichen konstruktiven Ratschläge während meiner Promotionszeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Tamás Laskay, Ph.D., für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die wissenschaftliche Betreuung. Seine stetige Unterstützung und hilfreichen Ratschläge haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Für die Durchsicht meiner Arbeit möchte ich ihm ganz herzlich danken. Des Weiteren bin ich ihm für die zahlreichen Tipps und Tricks für das Verfassen wissenschaftlicher Schriften dankbar.

Ohne die gute Betreuung durch Frau Dr. Martina Behnen-Härer wäre die Arbeit in ihrer jetzigen Form nicht möglich gewesen. Ich möchte Ihr ganz herzlich für Ihre stetige Unterstützung, zahlreichen Kommentare und Anregungen, sowie für das kritische Lesen meiner Arbeit danken. Sie hatte immer ein offenes Ohr für mich und hat mich stets unterstützt.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Schaible für die Begutachtung der Arbeit. Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Diese Arbeit wurde gefördert durch Mittel der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck, E14-2010. Daher möchte ich der Universität zu Lübeck für die finanzielle Unterstützung danken. Ein besonderer Dank gilt auch den zahlreichen freiwilligen Blutspendern, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Jan Rupp danke ich für die Bereitstellung der Geräte und Hilfe in praktischen Fragestellungen. Herrn PD Dr. med. Matthias Klinger und Herrn Örün Christo aus dem Institut für Anatomie danke ich für die Bearbeitung der Präparate zur Rasterelektronenmikroskopie. Für die Bereitstellung des Protokolls der Luminol-Methode und der Medienzusammensetzung des CL-Mediums bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Frank Petersen und Dr. Xinhua Yu aus dem Forschungszentrum Borstel.

Meinen Kollegen Maja Kohler, Sara Roth, Sonja Möller, Ludmila Skrum und ehemaligen Kollegen Lars Hellberg und Inga Wilde danke ich für die fruchtbaren Gespräche und Diskussionen. Sie unterstützen mich auch in schwierigen Situationen und sorgen für eine angenehme Arbeitsatmosphäre. Sonja Möller möchte ich auch für die Unterstützung in einigen Experimenten danken. Den Bachelorstudentinnen Marlen Metzner und Eva Hermann danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Zum Schluss möchte ich besonders meiner Familie danken, die in der ganzen Zeit für mich da war und immer an mich geglaubt hat. Sie hat mir auch in schweren Zeiten Rückhalt gegeben und mich liebevoll unterstützt. Eure Unterstützung hat mir sehr geholfen.