

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. M. P. Schön)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Einfluss ultravioletten und sichtbaren Lichts auf die NET (*Neutrophil Extracellular Traps*)-Bildung**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Katharina Marie Bach**

aus

Wolfsburg

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer: Prof. Dr. M. P. Schön

Ko-Betreuerin: Prof. Dr. A. Flügel

### **Prüfungskommission**

Referent: Prof. Dr. M. P. Schön

Korreferent: Prof. Dr. A. Flügel

Drittreferent/in: Prof. Dr. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 09. März 2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Einfluss ultravioletten und sichtbaren Lichts auf die NET (*Neutrophil Extracellular Traps*)-Bildung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....  
.....  
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Neubert E, **Bach KM**, Busse J, Bogeski I, Schön MP, Kruss S, Erpenbeck L (2019): Blue and Long-Wave Ultraviolet Light Induce in vitro Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation. *Front Immunol* 10, 2428



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1.1 Neutrophile Granulozyten .....	7
1.2 Abwehrmechanismen neutrophiler Granulozyten.....	8
1.2.1 Degranulation.....	8
1.2.2 Phagozytose und <i>Respiratory Burst</i> .....	9
1.3 <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> .....	10
1.4 Varianten des Zelltodes .....	13
1.4.1 Nekrose.....	13
1.4.2 Apoptose.....	14
1.4.3 Nekroptose .....	14
1.4.4 Autophagie und Autophagie-abhängiger Zelltod .....	15
1.4.5 Weitere Formen des programmierten Zelltodes .....	15
1.5 Folgen einer Neutropenie oder granulozytären Dysfunktion.....	16
1.6 Bedeutung von <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> in der Entstehung von Autoimmun- Erkrankungen.....	17
1.7 Eigenschaften elektromagnetischer Strahlung .....	19
1.8 Wirkungen des UV-Licht auf menschliche Haut, das Immunsystem und neutrophile Granulozyten .....	20
1.9 <i>In-vitro</i> -Effekt von UV-Licht auf Neutrophile.....	23
1.10 Zielsetzung der Arbeit.....	24
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
2.1 Material .....	26
2.1.1 Chemikalien .....	26
2.1.2 Geräte.....	27
2.1.3 Software .....	29
2.1.4 Verbrauchsmaterialien .....	30
2.1.5 Antikörper .....	31
2.1.6 Nährmedien und Puffer .....	32
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Periphere venöse Blutentnahme.....	33
2.2.2 Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten .....	33
2.2.3 Aktivierung der Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat.....	34
2.2.4 Anfärben der DNA.....	34
2.2.5 Quantifizierung der NETose .....	34
2.2.6 Immunfluoreszenzfärbung von NE und MPO .....	34

---

2.2.7	Detektion reaktiver Sauerstoffspezies .....	35
2.2.8	Statistische Auswertung der Ergebnisse .....	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1	Neu etablierte Methoden.....	37
3.1.1	Entwicklung des Versuchsaufbaus .....	37
3.1.2	Experimentelle Anordnung zur Bestrahlung neutrophiler Granulozyten .....	38
3.1.3	Messung der Strahlungsintensität .....	39
3.1.4	Ausschluss eines Wärmeeffekts durch die Bestrahlung .....	40
3.2	Überlegungen zur physiologischen Exposition der menschlichen Haut mit Sonnenlicht .....	41
3.2.1	Physikalische Überlegungen zur Lichtintensität.....	41
3.2.2	Eindringtiefe des Lichts in die menschliche Haut .....	42
3.3	Dosisabhängigkeit der Aktivierung .....	43
3.4	Wellenspezifische Aktivierung bei angeglichenen Photonenflux und angelichener Gesamtenergie.....	46
3.5	Immunfluoreszenzfärbungen von Myeloperoxidase und neutrophiler Elastase an lichtaktivierten Neutrophilen .....	47
3.6	Inhibitorversuche .....	48
3.6.1	NEC-1, Y27632 und iNE .....	49
3.6.2	ABAH und Cl-Amidine.....	50
3.6.3	Zusammenfassung der Inhibitorexperimente .....	51
3.7	Reaktive Sauerstoffspezies als potenzielle Reaktionsvermittler.....	51
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>56</b>
4.1	Die <i>in-vitro</i> -Entstehung von NETs durch Licht aus dem sichtbaren und ultravioletten Spektrum.....	57
4.2	Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies als Reaktionsvermittler .....	58
4.3	Übertragung der Ergebnisse in einen realistischen Kontext.....	60
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung neutrophiler ROS .....	9
Abbildung 2: Entstehung von NETs.....	11
Abbildung 3: Elektromagnetische Strahlung .....	19
Abbildung 4: Eindringtiefe von UV-Strahlung in die menschliche Haut .....	21
Abbildung 5: Initiale Beobachtung der Lichtaktivierung neutrophiler Granulozyten .....	24
Abbildung 6: Reaktion von Amplex Red zu Resorufin .....	36
Abbildung 7: Versuchsaufbau .....	39
Abbildung 8: Aufnahmen der Wärmebildkamera während der Bestrahlung.....	40
Abbildung 9: Spektrale Strahlung der Sonne .....	41
Abbildung 10: Lichtspektren der genutzten LEDs .....	42
Abbildung 11: Dosisabhängigkeit der Aktivierung .....	44
Abbildung 12: Beispielfotos aktivierter Neutrophiler .....	45
Abbildung 13: Aktivierung der Zellen bei angeglicherer Photonenzahl und Gesamtenergie ...	47
Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbungen an Zellkernen neutrophiler Granulozyten.....	48
Abbildung 15: Inhibitorversuche mit iNE, Nec-1 und Y27632 .....	50
Abbildung 16: Inhibitorversuche mit ABAH und Cl-amidine.....	51
Abbildung 17: Absorptionsspektrum von Riboflavin.....	53
Abbildung 18: ROS Detektion unter verschiedenen Konditionen.....	54
Abbildung 19: Beeinflussung der Lichtaktivierung von NETs durch das gewählte Medium ....	54
Abbildung 20: Potenzieller Mechanismus der Lichtaktivierten Freisetzung von NETs .....	55



---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien .....	26
Tabelle 2: Geräte.....	27
Tabelle 3: Software .....	29
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien .....	30
Tabelle 5: Antikörper .....	31
Tabelle 6: Nährmedium für Neutrophile Granulozyten .....	32
Tabelle 7: PBS .....	32
Tabelle 8: Lösungen für Färbungen.....	32
Tabelle 9: Lösung für ROS Experimente.....	33

## Abkürzungsverzeichnis

ATG	Autophagie-assoziierte Gene
BSA	Bovines Serumalbumin
CGD	<i>chronic granulomatous disease</i>
CIE	<i>Commission Internationale de l'Éclairage</i>
CRP	C-reaktives Protein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	<i>fetal calf serum</i>
H3-Cit/H4-Cit	Hypercitrulliniertes Histon Typ 3/4
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IL	Interleukin
LED	Lichtemittierende Diode
LL-37	Antimikrobielles Peptid der Cathelicidin-Familie
LPS	Lipopolysaccharide
M.	Morbus
MPO	Myeloperoxidase
NADP	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
NCCB	<i>Nomenclature Committee of Cell Death</i>
NE	Neutrophile Elastase
NEC-1	Necrostatin-1
NET	<i>neutrophil extracellular trap</i>
NOX	NADPH (reduziertes Nicotinamid-Adenindinucleotid-Phosphat) Oxidase
PAD 4	Peptidyl-Arginin-Deiminase, Typ 4
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PD	Privatdozent
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin Typ E2
PMA	Phorbol-12-myristat-13- acetat
PMN	Polymorphonukleäre Leukozyten
PR3	Proteinase-3
RA	Rheumatoide Arthritis
RIP	<i>Receptor-interacting protein kinase</i>

RKI	Robert Koch-Institut
ROCK	Rho-assoziierte Proteinkinase
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI-1640	Kulturmedium ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SOD	Superoxiddismutase
S.	Staphylococcus
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF alpha	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
WHO	World Health Organization

# 1 Einleitung

## 1.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten vermitteln wichtige angeborene Immunantworten und werden aufgrund ihrer charakteristischen gelappten Zellkernform auch zu den polymorphkernigen Leukozyten (PMN) gezählt. Sie stellen mit 40–60% aller kernhaltigen Zellen in Knochenmark und peripherem Blut den größten Anteil der weißen Blutzellen im menschlichen Organismus dar. Neutrophile reifen über ungefähr 14 Tage im Knochenmark heran und haben nach ihrem Übertritt in das periphere Blut in der Regel eine vergleichsweise kurze Lebenszeit von weniger als 24 Stunden (Summers et al. 2010). Neueste *in-vitro*-Studien an Neutrophilen aus Schweineblut konnten langlebigere Populationen mit verändertem Cholesteringehalt nachweisen; die meisten scheinen jedoch in der Tat über eine verhältnismäßig kurze Lebensdauer zu verfügen (Bonilla et al. 2020). Lichtmikroskopisch haben zirkulierende, reife Neutrophile einen Durchmesser von 12–15  $\mu\text{m}$  und einen mehrfach gelappten Kern, anhand dessen sich das Reifestadium der Zelle nachvollziehen lässt. Dieser Kern besteht bei gesunden Zellen aus zwei bis fünf Lappchen, verbunden durch dünne, mit Nukleoplasma gefüllte Filamente. Weshalb die Zellen diese nukleäre Besonderheit aufweisen, war lange unklar. Heute weiß man, dass die Lappung des Zellkerns eine wichtige Bedeutung für die effiziente und zügige Zellmigration hat (Hoffmann et al. 2007). Durch die besagte Struktur können sich die Zellen leichter durch enge Interzellularräume und kleinste Gefäße bewegen. Eine Hypersegmentation des Zellkerns in sechs oder mehr Lappchen ist wiederum pathologisch und mit Vitaminmangelzuständen und weiteren Krankheitsbildern assoziiert (Skinner und Johnson 2017).

Das Zytoplasma der Neutrophilen enthält verschiedene Granula, in denen sich wiederum in unterschiedlicher Zusammensetzung Enzyme und antimikrobielle Peptide befinden, die wichtig für die Wirksamkeit dieser Zellen gegen zahlreiche Mikroorganismen sind. Diese Granula lassen sich in vier Unterformen unterteilen (Yin und Heit 2018): die primären, azurophilen Granula entsprechen den Lysosomen der neutrophilen Granulozyten und enthalten antimikrobielle Enzyme wie saure Hydrolasen, Myeloperoxidase (MPO) oder Lysozyme. Auch Serinproteasen wie Neutrophile Elastase (NE), Cathepsin G oder Proteinase 3 befinden sich in diesen primären Granula. Diese Bestandteile werden vor allem bei Infektionen freigesetzt, um extrazellulär wirksam zu sein. Nach der intrazellulären Verschmelzung mit Phagosomen helfen sie zudem, endozytierte Inhalte zu zersetzen.

Die sekundären, spezifischen Granula enthalten, genau wie die tertiären Granula, Proteine zur Zellmigration in das Gewebe, sowie einige antimikrobielle Proteine und werden ebenfalls bei höheren Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren freigesetzt.

Als vierte Kategorie existieren sekretorische Vesikel welche Integrine und andere Proteine, die vor allem für die Adhäsion und die Rekrutierung weiterer neutrophiler Granulozyten wichtig sind, enthalten. Nach ihrer Freisetzung aus den Vesikeln finden sich diese Proteine in der Plasmamembran der Zellen wieder (Borregaard et al. 1992).

Kommt es zu einer Invasion von Mikroorganismen und damit einhergehenden Entzündungsreaktion im Organismus, locken zelluläre Botenstoffe, insbesondere von gewebsständigen Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen produzierte Chemokine, die Neutrophilen an den Ort des Geschehens. Während dieser Chemotaxis bewegen sich die Zellen gegen das Konzentrationsgefälle zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration. Diese Botenstoffe erleichtern durch weitere Wirkungen, wie die Zunahme der Gefäßpermeabilität oder die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, die rasche Einwanderung der Leukozyten. Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems geschieht schnell und es wird angenommen, dass 99% aller Infektionen alleine durch diese weniger spezifischen Abwehrprozesse beherrscht werden können (Hörner et al. 2004), bevor es zur spezifischen Immunabwehr durch T- und B-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems kommt. Zu den chemotaktisch wirksamen Zytokinen gehören neben proinflammatorischen Interleukinen wie IL-1, IL-6 oder IL-8 auch TNF-alpha. Auch das Gewebshormon Leukotrien-B4 als Derivat des Arachidonsäurestoffwechsels entfaltet eine chemotaktische Wirkung auf Granulozyten und stimuliert die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale zur Abwehr von Fremdpartikeln (Kavelaars et al. 2003). Bestandteile der Bakterienwand sowie aktivierte Komplementfaktoren können ebenfalls chemotaktisch wirken. Neutrophile bilden eine frühe zelluläre Bastion gegen mikrobielle Eindringlinge und emigrieren in großer Zahl aktiv aus der Blutbahn durch die Gefäßwand in das entzündete Gewebe (Diapedese) (Mayadas et al. 2014).

## 1.2 Abwehrmechanismen neutrophiler Granulozyten

Neutrophile haben verschiedene effektive Möglichkeiten zur Abwehr eingedrungener Mikroorganismen. Hierzu zählen die Degranulation zytoplasmatischer Granula, die Phagozytose der zumeist vorher durch Komplementfaktoren oder Antikörper opsonierten Fremdkörper und die Generation von *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs).

### 1.2.1 Degranulation

Bei der Degranulation werden in den azurophilen Granula enthaltene antimikrobielle Enzyme in den Extrazellularraum befördert, wo sie gegen Mikroorganismen wirken können. So können Proteasen oder Lysozyme die bakterielle Zellwand degradieren. Diese Abwehrmethode bekämpft Mikroorganismen sehr effektiv, kann aber auch gesundes Gewebe schädigen. Daher unterliegt das physiologische Gleichgewicht der Granulopoese, der Verbleib im und die Freigabe aus dem Knochenmark, die intravasale Passage durch Milz,

Lunge und Knochenmark sowie der programmierte Zelltod dieser Zellen strengen Regeln (Bardoel et al. 2014).

### 1.2.2 Phagozytose und *Respiratory Burst*

Eine weitere Abwehrmethode der Neutrophilen ist die Phagozytose, bei der die opsonierten Partikel zunächst aufgenommen und im Phagolysosom von lysosomalen Enzymen zersetzt werden. Aufgrund dieser Eigenschaft als gehören Neutrophile, zusammen mit Monozyten, Makrophagen und Eosinophilen, zu den Phagozyten. Bei diesem Prozess wird das membrangebundene Enzym NADPH-Oxidase aktiviert, welches das Leitenzym des *Respiratory Burst* darstellt. Dieses aus sechs Untereinheiten bestehende Enzym katalysiert, wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt, die Reduktion von Sauerstoff zu Hydroperoxydradikalen  $O_2^-$ . Als Wasserstoffdonor dient extrazelluläres NADPH, sodass die Reaktion  $NADPH + 2 O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2 O_2^- + H^+$  ablaufen kann. Die Hydroperoxydradikale dismutieren ihrerseits intrazellulär, katalysiert durch die Superoxiddismutase oder spontan zu Wasserstoffperoxid. Letzteres ist membranpermeabel und das Hauptsubstrat der in den azurophilen Granula enthaltenen MPO. In höheren Konzentrationen wirkt Wasserstoffperoxid mikrobizid. Durch MPO und in Anwesenheit der benötigten Substrate können außerdem sekundäre, noch stärker reaktive Sauerstoffspezies entstehen, in Abbildung 1 als letztes Reaktionsprodukt ganz rechts aufgeführt. Sie katalysiert beispielsweise mithilfe von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Chlorid zu Hypochlorit, welches stark antimikrobiell wirkt und an der Zersetzung von Zellmembranen beteiligt ist. In Anwesenheit von Eisen- oder Kupfersalzen entstehen aus Hydroperoxydradikalen außerdem Hydroxylradikale, die DNA-Mutationen, die Peroxidation von Lipiden oder die Inaktivierung von Enzymen verursachen können (Hampton et al. 1998). Insgesamt erschaffen all diese Sauerstoffradikale ein bakterizides Milieu und können gegen viele verschiedene Mikroorganismen wirken.

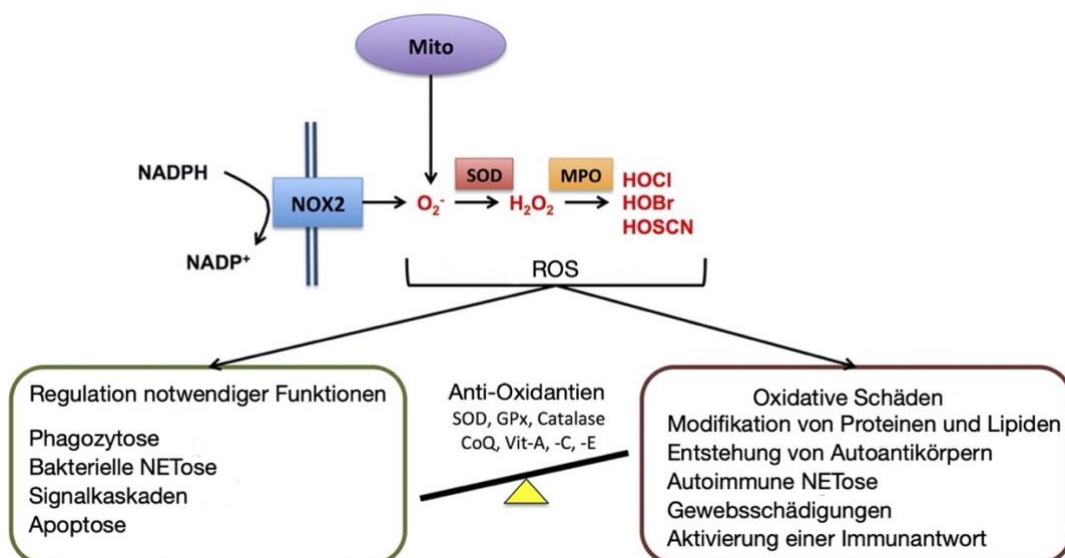


Abbildung 1: Entstehung neutrophiler ROS

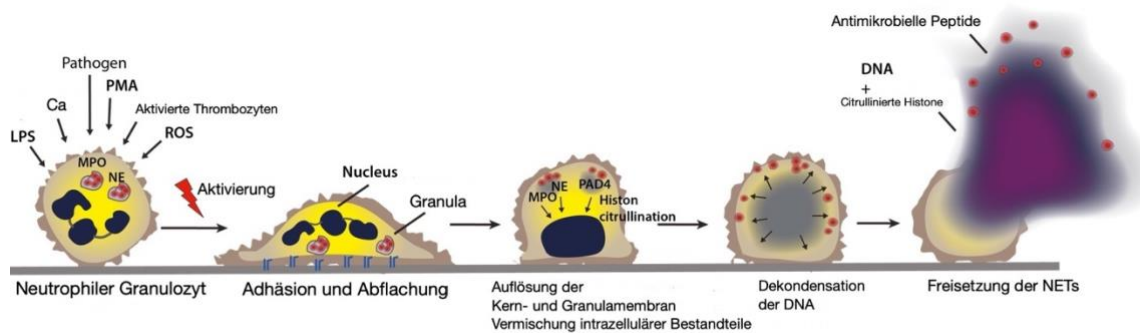
Dieses Schema von (Glennon-Alty et al. 2018) zeigt die Entstehung reaktiver Sauerstoffradikale an der Zellmembran neutrophiler Granulozyten durch die NADPH-Oxidase und ihre enzymatische Untereinheit der NOX2. Die Radikale sind von weitreichender Bedeutung für die normale Funktionsweise der Zellen, tragen aber auch zu Gewebeschädigung oder der Entstehung von Autoimmunkrankheiten bei.

*Respiratory Burst* bedeutet übersetzt in etwa „oxidativer Ausbruch“. Die namensgebende Entstehung reaktiver Sauerstoffradikale, kurz ROS, kann sowohl an den Membranen der Phagosomen stattfinden, wobei die Radikale die endozytierten Mikroorganismen in den Phagosomen angreifen, als auch nach extrazellulär gerichtet sein (Glennon-Alty et al. 2018). Gleichzeitig kann es bei übermäßiger Produktion von Sauerstoffradikalen zu Gewebsschäden und schwerwiegenden Folgen für den Organismus kommen.

Neben der Entstehung von ROS durch die membrangebundene NADPH-Oxidase gibt es weitere Orte, an denen Sauerstoffradikale entstehen können. In den Mitochondrien, den „Atmungsorganellen“ der Zellen, entstehen verhältnismäßig kleine Mengen von Hydroxidradikalen als Nebenprodukt der Zellatmung. Diese können auch hier, katalysiert durch die Superoxiddismutase, zu Wasserstoffperoxid werden. Auch die mitochondrialen ROS unterstehen einem fein regulierten Gleichgewicht. Expressionsänderungen kontrollierender Enzyme können zu überschießender Freisetzung mitochondrialer ROS in das Zytoplasma und damit einhergehenden Schäden führen (Mittal et al. 2014). Der Bildung von ROS stehen im gesunden Organismus mehrere antioxidative Mediatoren gegenüber, um Gewebsschäden zu verhindern. Hierzu gehört die aus den sekretorischen Vesikeln freigesetzte Superoxiddismutase, welche die Reaktion von Sauerstoffradikalen zu Wasserstoffperoxid katalysiert. Wasserstoffperoxid ist das Hauptsubstrat der MPO, kann jedoch ebenfalls durch Katalase und weitere Peroxidasen, wie der zytoplasmatischen Glutathion-Peroxidase, metabolisiert werden und zu Wasser reagieren. Im Blutserum befinden sich zudem weitere antioxidativ wirksame Substanzen, zu denen Vitamin A, C oder E gehören sowie das Coenzym Q 10. Dieses sensible Redox-Gleichgewicht ist bei einigen Krankheiten gestört, sodass sowohl verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies als auch vermindertes Vorkommen der Antioxidantien systemische Folgen haben kann. Die fehlende Produktion von ROS durch einen Enzymdefekt der NADPH-Oxidase führt zur septischen Granulomatose mit oftmals lebensbedrohlich verlaufenden Infektionen.

### ***1.3 Neutrophil Extracellular Traps***

Eine weitere Abwehrmethode Neutrophiler ist die Bildung sogenannter NETs, in seiner Gänze auch NETose genannt (Brinkmann et al. 2004). Neutrophile können nach ihrer Aktivierung eine mehrphasige Veränderung durchlaufen, bei der sich die gesamte innere und äußere Zellmorphologie verändert (Abbildung 2). Die DNA der Zellen dekondensiert fortschreitend, füllt zu einem bestimmten Zeitpunkt das gesamte Zellinnere aus und wird im Anschluss als netzartige Struktur in den Extrazellularraum befördert.



**Abbildung 2: Entstehung von NETs.**

Schematischer Ablauf der Formation von NETs. Nach der Aktivierung beginnt die stadienhafte Veränderung der Zellen. Der Zellkörper flacht ab und adhärert mithilfe von Integrinen an der Gefäßwand, danach folgt die Delobulation des ursprünglich gelappten Kerns. Es kommt zur Auflösung der Kernmembran, sodass zytoplasmatische und nukleäre Enzyme sich vermischen. Die DNA dekondensiert fortlaufend und füllt letztlich den gesamten Zellinnenraum aus. Schließlich kommt es zur Ruptur der Zellmembran und zur Ausbreitung der dekondensierten DNA, an die zytoplasmatische und nukleäre Peptide gebunden sind, in den Extrazellularraum. Quelle Abbildung: Erpenbeck und Schön, (2017)

Hier kann sie Bakterien und andere Eindringlinge fixieren und von weiterer Ausbreitung im Organismus abhalten (Brinkmann und Zychlinsky 2012). Zudem können in den Netzstrukturen enthaltene Peptide lokal bakterizid wirken. Dieser Prozess führt in der Regel zum Untergang der Neutrophilen und dauert, je nach aktivierendem Stimulus, zwischen einer und vier Stunden (Brinkmann und Zychlinsky 2007). Unter anderen Umständen ist auch eine Freigabe der NETs ohne Lyse der Zellmembran möglich, eine sogenannte „vitale NETose“. Diese wurde als deutlich raschere Reaktion beispielsweise bei Infektionen mit dem Bakterium *Staphylococcus (S.) aureus* aber auch nach Kontakt mit dem Hefepilz *Candida albicans* beobachtet. Hierbei kommt es zur Extrusion chromatingefüllter Vesikel, die im Extrazellularraum rupturieren und damit die Integrität der Zellmembran wahren. Dieser Prozess kann bereits innerhalb weniger Minuten nach Aktivierung stattfinden und ist im Gegensatz zu der primär beschriebenen NETose nicht suizidal, die Neutrophilen behalten als anukleäre Cytoplasten ihre Fähigkeit zur Phagozytose und Chemotaxis (Pilszczek et al. 2010). Auch eosinophile Granulozyten, Mastzellen und sogar pflanzliche Zellen sind bei Abwehrprozessen zur vitalen und suizidalen Extrusion ihrer DNA in der Lage. Dies legt nahe, dass die Bildung extrazellulärer DNA-haltiger Netze eine evolutionär konservierte Form der Immunabwehr ist (von Köckritz-Blickwede et al. 2008; Yousefi et al. 2008).

Bis heute wurden viele physiologische und unphysiologische Stimuli gefunden, die zur Aktivierung der Zellen und zur Bildung von NETs führen können. Zudem scheinen unterschiedliche Schlüsselenzyme und Signalwege von tragender Bedeutung zu sein, je nachdem welcher Stimulus die Zellen aktiviert (Mesa und Vasquez 2013; Mayadas et al. 2014). Von immenser Bedeutung für die Entstehung der NETs nach einer Aktivierung mit dem künstlichen Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) ist beispielsweise die



Proteinkinase C (PKC) (Gray et al. 2013), deren Abwesenheit auf eine Aktivierung der Zellen durch Calcium Ionophor wiederum keine Auswirkungen hat (Kenny et al. 2017). Die intrazelluläre Calcium-Konzentration und die Entstehung von ROS scheint ausschlaggebend für manche Aktivatoren zu sein (Stoiber et al. 2015). Der Weg der NETose ist sowohl morphologisch als auch molekular von vielen anderen Wegen des programmierten Zelltodes, wie Apoptose oder Nekroptose gut abgrenzbar (Fuchs et al. 2007). In einigen Studien zeigten sich allerdings starke Überschneidungen zwischen Autophagie und NETose. Zellen, die *in vitro* nicht zur Autophagie befähigt sind, konnten ebenfalls keine NETs produzieren (Dąbrowska et al. 2016). Auch der Ras-MEK-ERK Signalweg (Hakim et al. 2011) sowie die mTOR-Kinase (Itakura und McCarty 2013), beides gut beschriebene Regulatoren der Autophagie, sind in die Entstehung von NETs einbezogen.

Als erste Aktivatoren wurden Interleukin-8 (IL-8), Lipopolysaccharide (LPS) und PMA genutzt (Brinkmann et al., 2004). Das proinflammatorische IL-8 und bakterielles LPS aktivieren Neutrophile während einer Entzündung im menschlichen Körper. Der künstliche PKC-Aktivator PMA ist der bislang stärkste und *in vitro* zuverlässigste, nicht-physiologische Aktivator der NETose. Je nach Aktivator unterscheidet sich auch die zeitliche Dynamik und finale Morphologie der NET-Formation voneinander. So findet die Aktivierung durch Calcium-Ionophor, welches zu einem massiven Calciumflux in die Zellen führt, im Gegensatz zur Aktivierung durch PMA, unabhängig von der NADPH-Oxidase (NOX) statt. Im Zuge dieser NOX-unabhängigen NETose wird die Peptidyl-Arginin-Deiminase Typ 4 (PAD 4) aktiviert, was zur Hypercitrullinierung der Histone Typ H3 und H4 führt. Dieser Schritt ist bei dieser speziellen Variante der NET-Bildung essentiell für die Dekondensation des Chromatins und H3-Cit und H4-Cit gelten als NET-spezifische Biomarker (Wang et al. 2009; Thålin et al. 2017). Ebenso scheinen mitochondriale ROS bei dieser Calcium-abhängigen, NOX-unabhängigen Variante eine wichtige Rolle zu spielen (Douda et al. 2015).

Intrazelluläre ROS sind in vielen Reaktionskaskaden, die zur Bildung von NETs führen, an unterschiedlichen Stellen von umfangreicher Bedeutung. Sie erhöhen beispielsweise die Membranpermeabilität durch die Oxidation von Lipiden und erleichtern dadurch die selektive Freigabe von neutrophiler Elastase und Myeloperoxidase aus den zytoplasmatischen Granula (Nguyen et al. 2017). Wie die molekularen Wirkmechanismen oder Rezeptoräquivalente der reaktiven Sauerstoffspezies innerhalb der Zellen genau aussehen, ist bislang nicht hinreichend geklärt. Der Vorgang der Autophagie ist, wie bereits erwähnt, molekular enger mit der NETose verknüpft als andere Signalwege, sodass die Sauerstoffradikale nachweislich Prozesse auslösen, die beim Ablauf der Autophagie notwendig sind. Zuletzt veröffentlichte Experimente in diesem Bereich legen nahe, dass die absolute Konzentration intrazellulärer ROS dafür Sorge trägt, ob es zur Bildung von NETs oder zur Autophagie der Zellen kommt (Stoiber et al. 2015).

Damit die Schlüsselvorgänge der NETose ablaufen können, zu denen die Dekondensation des Chromatins, die Lyse der Kernmembran und die Ruptur der Zellmembran gehören, sind

zwei Enzyme unverzichtbar: Neutrophile Elastase und Myeloperoxidase. Beide Leitenzyme der NET-Bildung werden nacheinander aus den azurophilen Granula der Neutrophilen in das Zytoplasma freigegeben (Metzler et al. 2011), um an ihren Wirkort im Zellkern zu gelangen. Auf welchem Wege die selektive Freigabe der Enzyme aus den Granula und die Translokation in den Zellkern stattfinden, gilt es noch zu klären. NE spielt im Zellkern eine wichtige Rolle bei der Degradierung der Histone, was zur Dekondensation des Chromatins führt (Papayannopoulos et al. 2010). Histone, im Kern als Oktamere angeordnet, sind notwendig zur Organisierung und Stabilisierung der DNA und gehen als positiv geladene Proteine starke ionische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen DNA ein. Auch die zeitlich später freigesetzte MPO ist wichtig für die NET-Bildung, interessanterweise anscheinend zum Teil auch unabhängig von ihrer enzymatischen Funktion (Parker und Winterbourn 2013). MPO lagert sich im Verlauf des Prozesses an die DNA an und scheint die Dekondensation ebenfalls stereotaktisch und nicht nur enzymatisch zu fördern.

## 1.4 Varianten des Zelltodes

Neben der hier im Vordergrund stehenden NETose existieren für Neutrophile sowie für die meisten Blutzellen eine Reihe weiterer Zelltod-Varianten, die zum Teil seit vielen Jahren bekannt sind und bereits detailliert erforscht wurden. Grundlegend unterschieden werden Formen des programmierten Zelltods von der Nekrose, dem traumatischen Zelluntergang. Die früheren morphologischen Unterscheidungen der programmierten Zelltodwege wurden durch eine im Jahr 2012 veröffentlichte Definition des internationalen Nomenklatur-Komitees für Zelltod (NCCB) abgelöst: seither stehen die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen im Vordergrund (Galluzzi et al. 2012). Zwischen Auslösern und Abläufen der verschiedenen Signalkaskaden bestehen grundlegende Unterschiede, bezüglich der NETose wurden jedoch auch Gemeinsamkeiten zu einzelnen Komponenten festgestellt. Um einen Überblick zu geben, wird im Folgenden kurz auf die Nekrose sowie die Hauptmechanismen der programmierten Zelltodwege und einige Sonderformen eingegangen.

### 1.4.1 Nekrose

Nekrose ist eine passive, unkontrollierte und im Gegensatz zur Apoptose inflammatorische Form des Zelltodes. Sie unterliegt keiner homöostatischen Regulation und bedarf nur eines minimalen Energieaufwands. Verschiedene Stressoren wie toxische Substanzen, starke Hitzeeinwirkung, länger anhaltende Ischämie oder mechanischer sowie osmotischer Stress können sie auslösen. Auch ROS sind konzentrationsabhängig dazu in der Lage, Nekrose auszulösen. Interessanterweise scheinen vor allem die Intensität auslösender Faktoren und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu entscheiden, ob die Zellen apoptotisch oder nekrotisch werden (Yamashima 2000). Nekrose ist eine zügig voranschreitende Form des Zelltodes und *in vitro* durch den Integritätsverlust der Plasmamembran und die Zunahme des Zellvolumens, die sogenannte Onkose gekennzeichnet. Die Zellorganellen schwellen an, es

kommt zur Endozytose der Plasmamembran, Autophagie und letztlich zum zellulären Kollaps. Die bei Apoptose typische internukleosomale Fragmentation der DNA kommt bei der Nekrose nicht vor (Walker et al. 1988). Bei der Nekrose entstehen viele proinflammatorische Substanzen die zur Migration weiterer Entzündungszellen, in erster Linie neutrophiler Granulozyten, führen und so die lokale Ausbreitung der Entzündungsreaktion beschleunigen (Syntichaki und Tavernarakis 2002). Diese Substanzen werden gemeinsam als *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) bezeichnet und erfüllen normalerweise als nukleosomale, mitochondriale und zytosolische Bestandteile physiologische Aufgaben in der Zelle. Bei ihrer Freigabe in den Extrazellulärraum bekommen sie jedoch eine neue Funktion und alarmieren das Immunsystem, vergleichbar mit der Funktionsweise der gut erforschten *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) (Vénéreau et al. 2015). Durch zahlreiche Experimente mit den Nekrose-assoziierten TNF- und FAS-Rezeptoren wurde in den vergangenen Jahren eine regulierte Variante der Nekrose gefunden und der Begriff der Nekroptose geprägt (Moquin und Chan 2010).

#### 1.4.2 Apoptose

Apoptose ist eine essenzielle Komponente der Zellhomöostase, um geschädigte oder defekte Zellen zu eliminieren. Sie ist stark reguliert, energieabhängig und erfordert die Aktivität von Caspasen als Leitenzymen. Apoptose ist gekennzeichnet durch das Schrumpfen des Zellkerns, die Fragmentation von Kernbestandteilen, die zelluläre Kondensation, das sogenannte „*Blebbing*“ der Zellmembran und letztlich die Bildung apoptotischer Körperchen. Eine Entzündung tritt dabei nicht auf. Für die Homöostase des Immunsystems spielt der fehlerlose Ablauf der Apoptose als physiologische Form des Zelltods eine extrem wichtige Rolle (McCracken und Allen 2014). Lange Zeit ging man davon aus, dass Neutrophile nach dem Verlassen des Knochenmarks nur für 12–16 Stunden im Blut zirkulieren, bevor sie reguliert zu Grunde gehen. Neuere Ergebnisse legen eine Lebensdauer der Zellen von circa 5 Tagen nahe und es wird vermutet, dass die gealterten Zellen zu gleichen Teilen in Leber, Milz und Knochenmark abgebaut werden (Pillay et al. 2010). Die Apoptose kann durch intrinsische Ursachen wie DNA-Schädigungen und oxidativen Stress ausgelöst werden, es können jedoch auch extrinsische Signale über sogenannte Todesrezeptoren die Mechanismen der Apoptose auslösen (Galluzzi et al. 2018).

#### 1.4.3 Nekroptose

Nekroptose vereint Elemente der Apoptose und der Nekrose und gilt als regulierte Form des nekrotischen Zelltodes. Verschiedene Enzyme und molekulare Pfade wurden bereits mit der Aktivierung der regulierten Nekrose in Zusammenhang gebracht. Eine große Bedeutung wird hier ebenfalls ROS und  $\text{Ca}^{2+}$  zugeschrieben, die zu Schäden an DNA, Proteinen und Lipiden sowie zum Integritätsverlust der Zelle führen. So wurde ein durch TNF-aktivierter und *Serin-Threonin Kinase Receptor Interacting Protein 1* und *-3* (RIP-1 und -3)-abhängiger Pfad beschrieben, der bei der Inaktivierung Apoptose-induzierender Caspasen zur Vereinigung

eines Komplexes aus RIP-1 und RIP-3, zusammen dann als Nekrosom bezeichnet, und zur Nekroptose führt (Belizário et al. 2015). Eine weitere Variante beinhaltet die Aktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) (Jog und Caricchio 2014). Diese führt bei übermäßiger Aktivierung durch DNA-Schädigungen zum Abbau des NAD<sup>+</sup> in seine Bestandteile Nicotinamid und Poly-(ADP-Ribose)-Polymere, was bei größerem Vorkommen durch Fehlen des Energieträgers zum bioenergetischen Kollaps und zur Nekroptose führt. Durch tiefere Experimente mit dem RIP1-Inhibitor *Necrostatin-1* konnte die weitreichende pathophysiologische Bedeutung von Nekroptose als Zelltodweg veranschaulicht werden. Dieser ist beispielsweise mit dem entstehenden Hirnschaden nach hämorrhagischen oder ischämischen Schlaganfällen, mit Folgeschäden nach Myokardinfarkt sowie mit dem Chemotherapie-induzierten Zelltod assoziiert (Shen et al. 2017).

#### 1.4.4 Autophagie und Autophagie-abhängiger Zelltod

Die Autophagie (griechisch *autophagos* „sich selbst verzehrend“) ist ein Prozess der Selbst-Degradierung eukaryotischer Zellen zum Abbau und zur Verwertung eigener Bestandteile. Hierbei werden Zellorganellen oder einzelne Proteine intrazellulär mit einer Lipidmembran umschlossen und als Autophagosomen nach der Verschmelzung mit einem Lysosom verdaut (Glick et al. 2010). Die Autophagozytose ist ein energiesparender Mechanismus der Zellen zur Bereitstellung von Aminosäuren, dem Abbau fehlgefalteter Proteine, veralteter Organellen oder endozytierter Pathogene. Sie wird in Zeiten nutritiven Mangels sowie durch hypoxischen, biochemischen oder infektiösen Stress verstärkt ausgelöst. In zunehmendem Alter nimmt die Fähigkeit zur Autophagozytose normalerweise ab, Experimente mit Inhibitoren Autophagie-assoziiierter-Gene (ATG) zeigten einen Zusammenhang zwischen der verminderten Fähigkeit zur Autophagie und der Zunahme verschiedener Krankheiten wie Krebs, neurodegenerativer sowie autoimmuner Krankheiten oder Diabetes mellitus auf (Galluzzi et al. 2018). Die Autophagie als solche führt also nicht zum Zelltod, sondern wurde lange als Überlebensmechanismus wahrgenommen. Neuere Studien belegten jedoch, dass die zugrundeliegenden Mechanismen kontextabhängig eine besondere Form des Autophagie-abhängigen Zelltodes regulieren (Denton und Kumar 2019).

#### 1.4.5 Weitere Formen des programmierten Zelltodes

Es gibt weitere Formen des programmierten Zelltodes, von denen zwei im Folgenden kurz umrissen werden.

##### 1.4.5.1 Mitotische Katastrophe

Kommt es während der Mitose zu irreparablen Fehlern durch das Versagen der Zellzyklus-Kontrollpunkte entsteht die Gefahr einer aberranten Chromosomenverteilung. Um resultierende Folgeschäden zu verhindern wird durch die Aktivierung von Apoptose-spezifischen Mechanismen der Zelltod eingeleitet und in diesem Falle als mitotische Katastrophe bezeichnet (Castedo et al. 2004).

#### 1.4.5.2 Anoikis

Viele Zellen des menschlichen Organismus sind zum Überleben auf die Integrität der extrazellulären Matrix angewiesen. Fehlt diese, kommt es zum Zelltod im Sinne der Anoikis. Sie ähnelt der intrinsischen Apoptose. Für die Metastasierung von Tumorzellen ist ein Umgehen dieser Variante des Zelltodes von besonderer Bedeutung (Valentijn et al. 2004).

### 1.5 Folgen einer Neutropenie oder granulozytären Dysfunktion

Um die schwerwiegenden Folgen einer Dysfunktion oder eines Mangels an Neutrophilen zu betonen, werden im Folgenden einige Krankheiten kurz präsentiert. Das Verständnis der Funktionsweise dieser Zellen hat große klinische Bedeutung.

Wie erwähnt, stellen Neutrophile eine frühe zelluläre Bastion gegen Krankheitserreger dar und werden bei einer Infektion in großer Zahl zum Ort der Entzündung gelockt. Bei einem Mangel an neutrophilen Granulozyten, einer Dysfunktion oder der inadäquaten Aktivierung der Zellen kommt es zu schwerwiegenden bakteriellen Infektionen (Bardoel et al. 2014), insbesondere durch *S. aureus*, ein ubiquitär vorkommendes Bakterium. Dieser Keim besiedelt bei etwa einem Drittel der Bevölkerung die Nasenschleimhäute und eine Infektion ist bei fehlerhaftem Immunsystem sehr wahrscheinlich. Bei intaktem Immunsystem stellt dieses Bakterium zumeist keine Gefahr dar. Auch Pilze wie *Candida albicans* oder *Aspergillus fumigatus* können bei neutropenen Personen zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen mit pulmonalen oder zerebralen Abszessen führen.

Besonders bedeutend für Abwehrmechanismen wie NETose und *Respiratory Burst* ist die Produktion von ROS durch die NADPH-Oxidase. Ein Defekt der normalen Funktion der NADPH-Oxidase, und damit der hauptsächlichen Quelle der Sauerstoffradikale, kommt bei Patienten mit der seltenen CGD, *chronic granulomatous disease*, vor. Diese Patienten haben durch einen Gendefekt eine massiv reduzierte oder völlig fehlende Aktivität der Untereinheit NOX2 in ihren Phagozyten und können dementsprechend nicht oder nur in sehr geringem Maße reaktive Sauerstoffspezies produzieren. Betroffene leiden unter lebensbedrohlichen Infektionen, etwa ein Drittel verursacht durch *S. aureus*, und benötigen dauerhaft antibiotische und antifungale Prophylaxen. Die Schwere der Infektionen hängt mit der Restaktivität der NOX2 zusammen. Interessanterweise lässt sich die NET-Bildung durch exogen zugeführte Sauerstoffradikale *in vitro* wiederherstellen (Bianchi et al. 2009).

Auch in Experimenten mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Diphenylen-Idodonium (DPI) konnte die ROS-Produktion sowie die NET-Bildung durch neutrophile Granulozyten gesunder Probanden vollständig verhindert werden (Fuchs et al. 2007; Bardoel et al. 2014).

Von Bedeutung sind in diesem Zusammenhang auch die Folgen einer Dysfunktion der NE. Dazu kommt es beispielsweise bei einem Gendefekt, der die Funktionsfähigkeit der Dipeptidyl-Peptidase 1 (DPP1/ Cathepsin C) einschränkt. Cathepsin C ist essenziell für die posttranslationale Aktivierung mehrerer Serinproteasen aus den azurophilen Granula der

Neutrophilen, zu denen auch Cathepsin G, Proteinase 3 sowie NE gehören. Ein Gendefekt ist mit dem Papillon-Lefèvre Syndrom (PLS) assoziiert. Das PLS ist eine seltene ektodermale Dysplasie, bei der es schon im Kindesalter zu übermäßiger palmoplantarer Verhornung kommt. Bei dieser autosomal-rezessiv vererbten Palmoplantarkeratose liegen meistens zusätzlich periodontale Probleme vor, die in der Regel zu einer Parodontitis und im Verlauf zum Verlust der Zähne führen können. Die Abwehr der isolierten periodontalen Infektionen ist bei Patienten mit PLS eingeschränkt. Die Immunreaktion auf Bakterien wie *S. aureus* oder *Escherichia (E.) coli* ist jedoch in den meisten Fällen nicht gemindert, weshalb es seltener zu systemischen Infektionen kommt. Eine Fähigkeit zur NET-Bildung ist, vermutlich durch die Abwesenheit von NE, jedoch nicht gegeben. Der milde Phänotyp der Erkrankung lässt jedoch vermuten, dass die Immundefizienz der PLS Patienten effizient durch alternative Abwehrmethoden kompensiert werden kann (Sørensen et al. 2014).

Gendefekte, die die Funktionsfähigkeit der neutrophilen Granulozyten einschränken, sind sehr selten. Dies darf jedoch nicht davon ablenken, dass im Falle eines Defekts der Neutrophilen-Funktion schwerwiegende Folgen für die betroffenen Individuen entstehen.

Die viel häufigere iatrogene Reduktion neutrophiler Granulozyten bei Chemotherapien mit peripherer Toxizität oder bei Knochenmarkschädigungen kann bei Infektionen zu einem intensivmedizinischen Notfall werden und bedarf der strikten Umkehrisolierung der Patienten. Aufgrund einer potenziellen Granulozytopenie als unerwünschte Arzneimittelwirkung ist die medizinische Anwendung des hierzulande gebräuchlichen Metamizols in über 30 Ländern verboten, darunter den Vereinigten Staaten von Amerika, Frankreich und Großbritannien (Kötter et al. 2015).

## **1.6 Bedeutung von *Neutrophil Extracellular Traps* in der Entstehung von Autoimmun-Erkrankungen**

Autoimmunität bedeutet gestörte Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Zellen. Die Folge können schwerwiegende Gewebs- und Organschäden sein. Diese gestörte Immuntoleranz kann verschiedene Ursachen haben und ihr Ursprung ist noch nicht gut verstanden. Ein Zusammenhang mit vorhergehenden Infektionen wurde für einige Autoimmunerkrankungen wie der reaktiven Arthritis beschrieben (Söderlin et al. 2003), für viele andere Erkrankungen sind die Pathogenese und die Bedeutung von vorhergehenden Infektionen jedoch unklar. Für die Entstehung des systemischen Lupus erythematodes (SLE) scheint das molekulare Mimikry mancher Bakterien zum Verhängnis werden zu können. Dieses Phänomen im Zuge der Immunevasion beschreibt die Fähigkeiten von Bakterien, eigene Proteine und Kohlenhydrate an die des Wirtsorganismus äußerlich anzugleichen. Viele Bakterien nutzen folglich den Körperzellen ähnliche Moleküle auf ihrer Oberfläche, um der Erkennung und Bekämpfung durch das Immunsystem zu entgehen. Durch dieses „Versteckspiel“ der Bakterien kann es zur Bildung autoreaktiver Antikörper kommen (Radic und Marion 2013). T-Zellen und Antikörper, die ihrerseits an körpereigene Strukturen

binden, werden normalerweise im Thymus oder Knochenmark eliminiert – überstehen sie jedoch diese Selektion und erkennen bakterielle Mimikry-Moleküle, kann es zur Produktion autoreaktiver Antikörper und zum Angriff auf körpereigene Strukturen kommen.

Die Bildung autoreaktiver Antikörper bei Autoimmunerkrankungen wirft heute noch einige Fragen auf. So richten sich die Antikörper häufig gegen nukleäre Bestandteile wie Doppelstrang-DNA (dsDNA), Histone oder ribonukleäre Proteine und sind als diagnostische Marker zum Teil relevant für bestimmte Krankheiten. Autoantikörper können demnach zur Diagnosestellung beitragen. Eine häufig diskutierte Frage behandelt die Herkunft der Antigene, gegen die Autoantikörper reagieren, da Kernbestandteile physiologischerweise gut geschützt vom Extrazellularraum vorliegen und auch beim Untergang der Zellen durch Apoptose oder Nekrose nicht direkt mit Zellen des Immunsystems in Kontakt kommen. Die Klärung dieser Frage wurde durch die Entdeckung von NETs deutlich vorangebracht. Da bei der NETose nukleäres Material „absichtlich“ in den Extrazellularraum befördert und damit zugänglich für Antikörper-bildende Immunzellen wird, könnte der Vorgang der NETose zur Entstehung von Autoimmunität beitragen. Außerdem lassen sich bei vielen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis (RA), (Khandpur et al. 2013), SLE (Kaplan 2011) sowie primären, ANCA-assoziierten Vaskulitiden kleiner Gefäße (Kessenbrock et al. 2009), Autoantikörper gegen Bestandteile von NETs nachweisen. Insbesondere posttranslational veränderte Proteine scheinen hier von Bedeutung zu sein. So spielen citrullinierte Proteine eine große Rolle in der Pathogenese der RA und anti-ubiquitinierte MPO-Antikörper weisen eine positive Korrelation zum Schweregrad von SLE auf (Barnado et al. 2016). Eine weitere interessante Beobachtung konnte mit Neutrophilen aus dem Blut von Patienten mit RA oder SLE gemacht werden. Die Neutrophilen dieser Patienten generieren NETs viel eher als diejenigen gesunder Probanden. Bei Patienten mit SLE wurde diese Form der Neutrophilen erstmals benannt, die im Gegensatz zu Neutrophilen gesunder Probanden nach Dichtegradienten-Zentrifugation in der Schicht der mononukleären Zellen des Blutes (Lymphozyten, Monozyten) verbleiben. Aufgrund ihrer demnach geringeren Dichte wurde dieser Zelltyp als *Low Density Granulocyte* (LDG) bezeichnet (Carmona-Rivera und Kaplan 2013). Sie unterscheiden sich nicht nur durch ihre Kernmorphologie von reifen Neutrophilen, sondern haben weitere Eigenschaften, die dazu führen, dass die Konzentration von LDGs im Patientenblut mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert und Patienten mit vielen LDGs eher Läsionen an Haut und Gefäßen bekommen. So produzieren LDGs mehr proinflammatorische Zytokine, vor allem Typ-1-Interferon, und bilden, wie erwähnt, leichter NETs. Auch eine höhere Konzentration an Autoantigenen und immunostimulatorischen Proteinen wie IL-17 und LL-37 konnte in LDGs nachgewiesen werden (Lee et al. 2017).

Der verlangsamte oder gestörte Abbau von NETs durch DNase I wurde in unterschiedlichen Experimenten bei SLE Patienten beobachtet (Yasutomo et al. 2001). Dieser gestörte Abbau scheint verschiedene Ursachen haben zu können, sowohl eine Mutation in dem für DNase

I kodierenden Gen wurde beschrieben als auch eine verminderte Aktivität des Enzyms durch autoreaktive Antikörper im Zuge von Autoimmunerkrankungen.

All diese Ergebnisse legen nahe, dass der positiven Bedeutung neutrophiler Granulozyten bei der Abwehr von Mikroorganismen auch potenziell schädigende Prozesse gegenüberstehen können. NETs im Extrazellularraum tragen demnach zur Pathogenese mancher Autoimmunkrankheiten bei.

## 1.7 Eigenschaften elektromagnetischer Strahlung

Licht ist eine Form elektromagnetischer Energie. Das sichtbare Sonnenlicht macht nur einen Teil des gesamten Spektrums aus, welches von der Sonne ausgesandt wird. Der sichtbare Teil befindet sich im Wellenlängenbereich zwischen 380–750 nm (Abbildung 3) und trifft fast ungefiltert auf der Erdoberfläche auf.

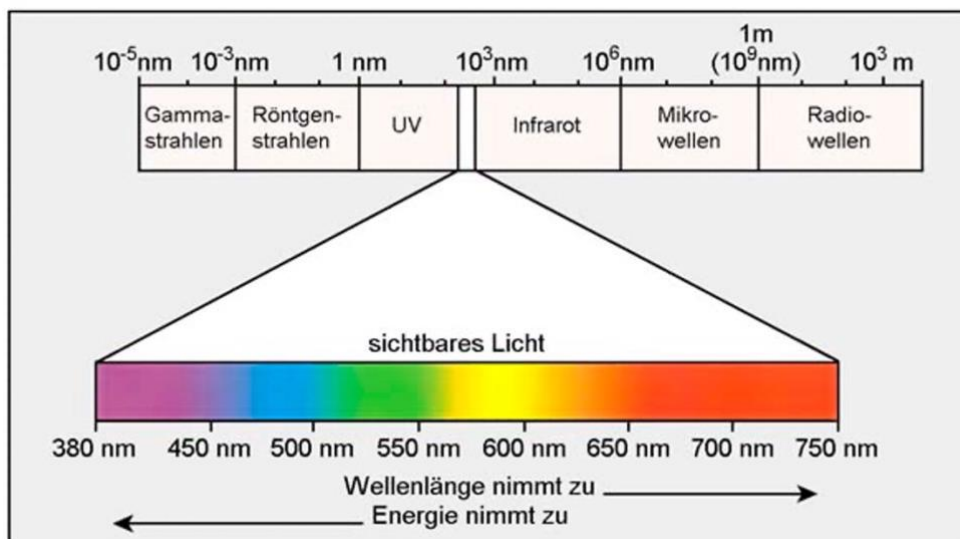


Abbildung 3: Elektromagnetische Strahlung

Das für das menschliche Auge sichtbare Licht macht nur einen kleinen Teil des gesamten elektromagnetischen Spektrums aus und befindet sich auf Wellenlängen zwischen 380–750 nm. Die Wellenlänge des Lichts verhält sich umgekehrt proportional zum Energiegehalt ihrer Strahlung. Somit ist kurzwellige Gammastrahlung deutlich energiereicher als längerwellige Radiowellen.

Der für diese Arbeit besonders relevante, ultraviolette Anteil des elektromagnetischen Spektrums hat, gemäß der Definition der Internationalen Strahlungskommission CIE (*Commission Internationale de l'Éclairage*), Wellenlängen zwischen 190 und 400 nm. Diese UV-Strahlung wird wiederum in UV-A (315–400 nm), UV-B (280–315 nm) und UV-C-Strahlung (190–280 nm) unterteilt, wobei sich der Energiegehalt der Strahlung umgekehrt proportional zu ihrer Wellenlänge verhält. Das bedeutet, UV-C-Strahlung ist die energiereichste Form der UV-Strahlung. Sie wird vor dem Eintreten in unsere Stratosphäre vollkommen von Ozon- und Sauerstoffmolekülen absorbiert, sodass sie die Erdoberfläche nicht erreicht und ihre biologische Bedeutung im Gegensatz zur längerwelligen UV-Strahlung zu vernachlässigen

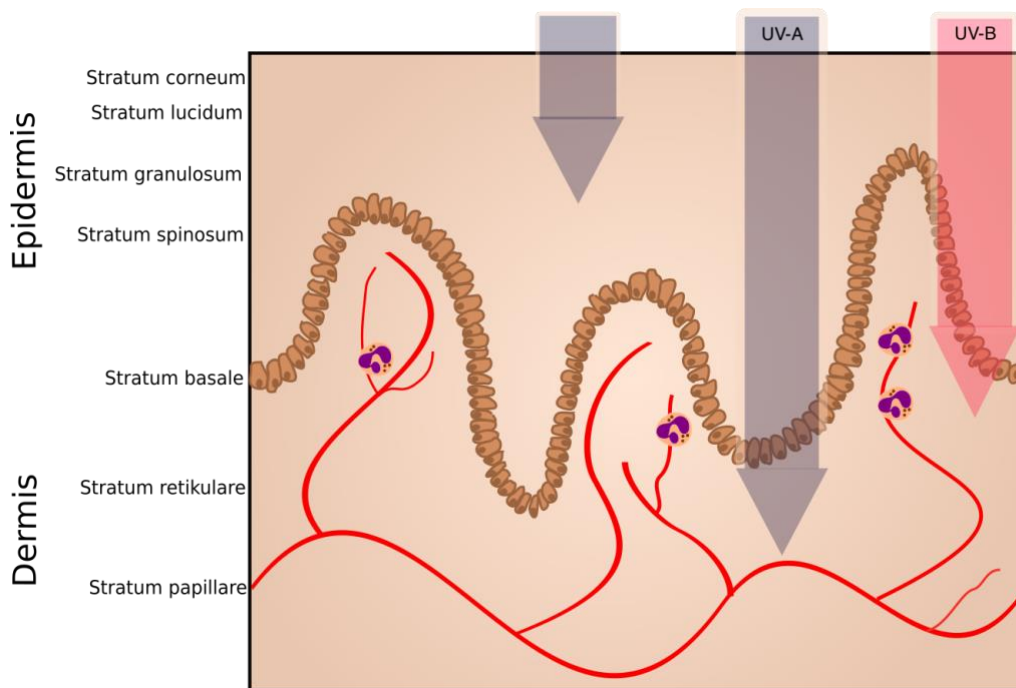


ist. Ein großer Teil der UV-B Strahlung wird ebenfalls von der Ozonschicht absorbiert, ein gewisser Prozentsatz erreicht jedoch zusammen mit der gesamten UV-A- Strahlung und dem sichtbaren Licht die Erdoberfläche. Der Anteil der auftreffenden UV-B Strahlung unterliegt je nach geographischer Lage, Tages- und Jahreszeit Schwankungen, die zu variierenden UV-Intensitäten auf der Erdoberfläche führen. Sie ist im Sommer generell höher als im Winter und nimmt in den Bergen, aufgrund des kürzeren Weges durch die Atmosphäre, pro Höhenkilometer um 10–20% zu. Die UV-Strahlung ist in den Tropen unabhängig von der Jahreszeit am höchsten und nimmt zu den Polen hin ab. Wolken, Aerosole und Abgase verringern durch Streuung und Absorption den Anteil der durchdringenden UV-B-Strahlung. Durch den Klimawandel und die Abnahme der Ozonschicht erhöht sich der Anteil dieser energiereicheren Strahlung weltweit. Dies hat weitreichende Folgen für die Zusammensetzung der Sonnenstrahlung auf der Erdoberfläche (Baldermann und Lorenz 2019).

Die Eindringtiefe des Lichts in die menschliche Haut verhält sich wieder entsprechend ihrer Wellenlänge: Je größer die Wellenlänge, desto tiefer dringt die Strahlung in die Haut ein (Clydesdale et al. 2001).

## **1.8 Wirkungen des UV-Licht auf menschliche Haut, das Immunsystem und neutrophile Granulozyten**

Andauernde oder repetitive Sonnenlichtexposition der Haut führt zu komplexen immunologischen und inflammatorischen Reaktionen. Vor allem der UV-A- und UV-B-Strahlung werden besonders schädliche biologische Wirkungen zugesprochen, zum Teil können diese pathologischen Effekte sehr präzise dem kürzer- oder längerwelligen UV-Bereich zugeordnet werden. Sowohl UV-A, -B als auch -C-Strahlung kann theoretisch in Zellen der menschlichen Haut zur Entstehung von Sauerstoffradikalen zu führen, was ein Ungleichgewicht des oxidativen Systems auslösen und den Untergang von Zellen bedeuten kann (Sun et al. 2016). UV-A Strahlung entwickelt dabei eine größere biologische Wirkung auf Melanozyten und Fibroblasten als UV-B- oder -C-Licht (Yamaba et al. 2016).



**Abbildung 4: Eindringtiefe von UV-Strahlung in die menschliche Haut**

UV-A-Strahlung, im Bereich zwischen 315–400 nm, dringt in tiefere dermale Hautschichten vor, während die kurzwelligere UV-B-Strahlung nur bis in die Epidermis penetriert. Schematisch eingezeichnet ist der subpapilläre Gefäßplexus mit bis zur epidermo-dermalen Junctionszone reichenden Kapillargefäßen, in denen sich neutrophile Granulozyten befinden können.

Diese biologischen Effekte kommen nur zustande, wenn die jeweilige UV-Strahlung in ausreichender Dosis in die Hautschichten vordringt, in denen sich die entsprechenden Zellen befinden. Die Eindringtiefe der UV-Strahlung variiert je nach Wellenlänge stark (Abbildung 4). Da in sonnenbestrahlter Haut die Permeabilität der kutanen Gefäße und die Zahl der Neutrophilen, Mastzellen, Makrophagen und anderer Immunzellen innerhalb weniger Minuten drastisch ansteigen können, erhöht sich der mögliche Effekt des Sonnenlichts auf diese Zellen. UV-C Strahlung spielt (patho)biologisch keine Rolle, weil es nicht bis zur Erdoberfläche kommt und zusätzlich die Epidermis nicht überwinden kann.

Die Haut reagiert auf Sonneneinstrahlung bereits nach wenigen Minuten mit einem Soforterythem, das subjektiv mit Brennen oder Stechen verbunden ist. Bei andauernder Bestrahlung entsteht nach wenigen Stunden eine schmerzhafte, intensivere und verbleibende Rötung und bei übermäßiger Intensität oder bei Menschen mit empfindlicher Haut kann es als Steigerung der Reaktion nach einigen Tagen zu Blasenbildung (Verbrennung zweiten Grades) und zum Ablösen der beschädigten epidermalen Hautschicht kommen. Gleichzeitig mit diesen makroskopisch sichtbaren Veränderungen kommt es zu Reaktionen des Immunsystems. Hierzu gehört die Dilatation der kutanen Gefäße, die das Korrelat des sichtbaren Erythems ist und je nach Hauttyp und abhängig von weiteren Einflussfaktoren wie Wetter oder Außentemperatur stärker oder schwächer ausfallen kann. Geschädigte Keratinozyten können mit einer Latenz von einigen Stunden ödematös anschwellen.

In hohen Dosen kann UV-Licht durch die Entstehung freier Sauerstoffradikale direkt zur Apoptose der Keratinozyten führen oder mit einer Latenz von mehreren Stunden zu einer verzögerten Form der Apoptose, die auf DNA-Schäden zurückgeführt wird (D’Orazio et al. 2013). Des Weiteren induziert UV-Licht inflammatorisch wirkende Zytokine, wie IL-1, die die autokrine Sekretion weiterer Zytokine wie GM-CSF, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-alpha oder anderer Mediatoren wie PGE 2 anregen (Bashir et al. 2009). Diese mehrfach *in vitro* und in Tierversuchen belegten Wirkungen unterstreichen den bedeutsamen Einfluss des Sonnenlichtes auf das Immunsystem.

Bei geringen Lichtintensitäten kann sich die Haut durch Melaninsynthese, Antioxidantien und DNA-Reparatur gut vor schweren Schäden schützen. Allerdings sind vor allem die UV-Anteile im Sonnenlicht zellschädigend (Clydesdale et al. 2001). Insbesondere dem UV-B-Licht wird seit langem eine herausragende Rolle in der kutanen Karzinogenese zugesprochen (de Gruijl 1996). Neben akuten Zellschäden kann es langfristig zu Genmutationen in Stammzellen des epidermalen Stratum basale kommen. Diese Mutationen können in ungebremstem Zellwachstum und damit der Entstehung von Karzinomen resultieren. Der im Alter zunehmende Verlust und die Reorganisation dermalen Kollagenfasern werden vor allem durch jahrelange Exposition mit UV-A-Licht verstärkt (Kakasheva-Mazhenkovska et al. 2011). Durch übermäßige Exposition der Haut mit Sonnenlicht kommt es zur Dermatoheliosis (Lichtalterung über das natürliche Maß hinaus).

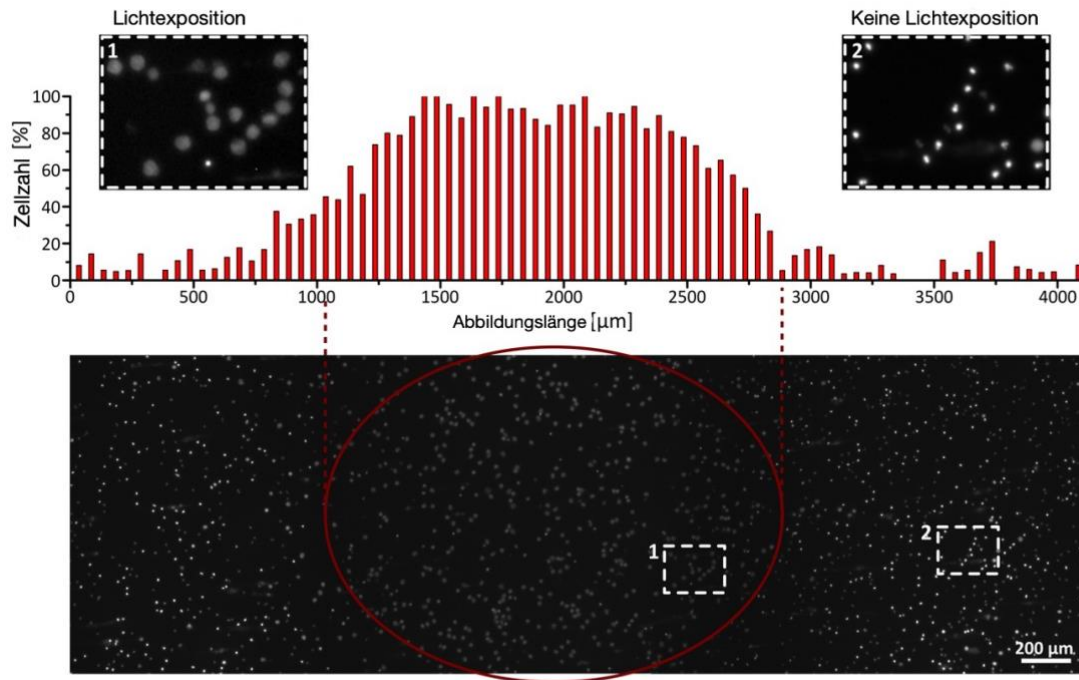
Durch die Entzündungsreaktion und konsekutive Dilatation oberflächlicher Blutgefäße tritt intravasale Flüssigkeit in den Extrazellularraum aus und Leukozyten einschließlich der neutrophilen Granulozyten wandern in das Gewebe ein. Der direkte Einfluss von UV-Strahlung auf neutrophile Granulozyten ist bereits Inhalt vieler Forschungsarbeiten und angesichts zunehmender UV-Intensitäten auf der Erdoberfläche von großer Bedeutung. Experimente konnten zeigen, dass das UV-Licht, als massiver Stressfaktor, auch in diesen Zellen Apoptose auslösen kann. Dies geschieht beispielsweise durch Aktivierung der p38 MAP-Kinase (Frasch et al. 1998). Außerdem wird die Apoptose-induzierende Caspase-3 dosisabhängig gespalten. Licht aus dem blauen Spektralbereich (490–450 nm) scheint einen Einfluss auf Nekroptose zu haben (Del Olmo-Aguado et al. 2016). Neuere Ergebnisse belegen sogar, dass UV-C-Licht gleichzeitig durch Caspase-3-Spaltung Apoptose und auf unbekanntem Wege NETose in ein und derselben Zelle auslösen kann (Azzouz et al. 2018). Da jedoch UV-C Strahlung nicht in die menschliche Haut penetriert, ist diese Beobachtung nur *in vitro* bedeutsam.

Neutrophile Granulozyten können sich bei gesunden Menschen physiologischerweise in den kleinsten kutanen Gefäßen der Haut befinden, die sich bis in die dermal-epidermale Junktionszone erstrecken. Diese sägezahnartige Junktionszone zwischen Stratum basale der Epidermis und Stratum papillare der Dermis ist wichtig für die Verankerung der Basalmembran an der papillären Dermis und bei verschiedenen Krankheiten verändert. Bei einer durchschnittlich dicken Epidermis könnte man also ab ca. 80 µm Tiefe in den ersten

dermalen Gefäßen auf neutrophile Granulozyten stoßen. Kommt es nun durch Sonnenbestrahlung zu Weitstellung und Permeabilitätszunahme der Gefäße, könnten die Zellen bereits in weiter außen gelegenen Hautschichten mit der Strahlung in Kontakt kommen. Natürlich muss hier die unterschiedliche Dicke der Epidermis und Dermis an verschiedenen Stellen des Körper beachtet werden, die beispielsweise am Augenlid 0,04 mm und an den Handflächen bis zu 3 mm messen kann (Ha et al. 2005). Die inter- und intraindividuellen Unterschiede beruhen vor allem auf verschiedenen Dicken der Dermis, die Epidermis mit ihrem Stratum corneum trägt vor allem an Handflächen und Fußsohlen dazu bei. Die Veränderungen in der Dermis finden vor allem im Stratum reticulare statt, in dem sich im Zuge des Alterns die Anordnung der Kollagenfasern quantitativ und strukturell stark verändert und zur Zunahme der Hautdicke führt. Zusätzlich variiert die Dicke des Stratum corneum durch weitere Faktoren. Sie korreliert beispielsweise positiv mit der Zunahme der Pigmentierung und negativ mit der Anzahl der Jahre, in denen Zigaretten geraucht wurden (Sandby-Møller et al. 2003). Insbesondere die pigmentierten Zellen des Stratum granulosum sind für die Abschwächung der UV-Strahlung wichtig und verleihen einen natürlichen Sonnenschutz (Brenner und Hearing 2008).

## 1.9 *In-vitro*-Effekt von UV-Licht auf Neutrophile

Während der Lebendzelleexperimente zur Untersuchung der Dynamik der NETs trat nach einer Aktivierung mit PMA die erwartete Dekondensation der Neutrophilen-DNA auf. Bemerkenswerterweise beschränkte sich die Aktivierung der Zellen in mehreren Experimenten dabei jedoch nicht nur auf die vorher mit PMA-aktivierten-Zellen – auch theoretisch unstimulierte Kontrollzellen durchliefen NETose (Abbildung 5). Diese „Aktivierung“ wurde vor allem in den häufiger mit dem Lichtmikroskop beleuchteten Arealen beobachtet und erfolgte nach repetitiver Exposition der Zellen mit dem DAPI-Filter des inversen Mikroskops (300–400 nm).



**Abbildung 5: Initiale Beobachtung der Lichtaktivierung neutrophiler Granulozyten**

Initiale Beobachtung lichtinduzierter Veränderungen neutrophiler Granulozyten während des *Live-Cell-Imaging*-Experiments; (Färbung: Hoechst, Bestrahlung: 300–400 nm, ca.  $0,3 \text{ J/m}^2$ ). Unten: dekondensierte Kerne sind nur innerhalb des bestrahlten Areals (roter Kreis) erkennbar. Oben: Ausgezählte dekondensierte (rote Balken) Zellkerne der Abbildung unten als Funktion bezogen auf die Länge der Abbildung. In der Mitte erreicht die Zahl der dekondensierten Zellkerne beinahe 100%. Ausschnitt 1: Dekondensierte Zellen in Vergrößerung aus dem Zentrum der bestrahlten Zellen. Ausschnitt 2: Zellen in Vergrößerung aus der unbestrahlten Peripherie (aus: Neubert et. al 2019).

Durch diese Beobachtung, der erfolgreichen „Stimulation“ der Zellen durch das Licht des Mikroskops entstand die Hypothese, dass Lichtstrahlung alleine neutrophile Granulozyten zur Durchführung der NETose aktivieren kann. Weiter zu klären blieb, in welche Kategorie der Zellaktivierung der beobachtete Prozess einzuordnen sei und ob es sich hierbei wirklich, wie vermutet, um NETose handelte. Des Weiteren kamen Fragen zum genauen Ablauf der Aktivierung auf, beispielsweise ob diese Aktivierung sich auf spezifische Wellenlängen zurückführen ließe und was für molekulare Wege die Aktivierung nutzte.

## 1.10 Zielsetzung der Arbeit

Die Forschung bringt NETs mit sehr unterschiedlichen vaskulären und autoimmunen Krankheiten, wie tiefen Beinvenenthrombosen (Fuchs et al. 2012), systemischem Lupus erythematoses (Kaplan 2011), rheumatoide Arthritis (Khandpur et al. 2013), chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Gottlieb et al. 2018) und sogar Krebs (Erpenbeck und Schön 2017) in Verbindung. Seit langem ist außerdem bekannt, dass Sonnenlicht eine Reihe

der eben aufgezählten Erkrankungen verschlimmern oder sogar auslösen kann. Die zugrundeliegende Pathogenese ist in diesem Kontext jedoch nicht hinreichend erforscht. Das primäre Ziel dieser Arbeit soll darin bestehen, einen reproduzierbaren Zusammenhang zwischen der Exposition neutrophiler Granulozyten mit sichtbarem und UV-Licht und der Entstehung von NETs herzustellen. Wissenschaftlich belegt wurde bereits ein Zusammenhang zwischen der Exposition mit UV-B Licht und Apoptose (D’Orazio et al. 2013). Zur Überprüfung der zugrundeliegenden Hypothese sollen daher Zellen gesunder Probanden isoliert und mit verschiedenen Dosierungen von Licht ausgewählter Wellenlängen des sichtbaren- und UV-Lichts bestrahlt werden. Im weiteren Verlauf gilt es zu prüfen, ob es sich bei den licht-induzierten morphologischen Veränderungen der Zellen tatsächlich um NETs handelt und nicht um eine andere Variante des programmierten Zelltodes wie beispielsweise Nekroptose, Apoptose oder Autophagie. Hierzu soll mit Inhibitoren verschiedener Enzyme gearbeitet werden, die an definierten Stellen im NETose-Signalweg nach Stimulation durch etablierte NET-Aktivatoren relevant sind. Durch diese Inhibitor-Experimente sollen im Umkehrschluss Aussagen über zugrundeliegende Signalwege getroffen werden, die bei dieser besonderen Art der Zellaktivierung eine Rolle spielen könnten. Schließlich soll noch die Bedeutung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) im Kontext lichtinduzierter Zellveränderungen näher betrachtet werden. Als Vermittler multipler biologischer Reaktionen und im menschlichen Organismus ubiquitär vorkommend liegt ein Zusammenhang nahe, zudem konnten frühere Experimente bereits einen Einfluss der ROS-Entstehung durch UV-B Licht nachweisen (Clydesdale et al. 2001).

Sollte sich ein Zusammenhang zwischen der Exposition mit Licht und der Entstehung von NETs nachweisen lassen, könnten die Erkenntnisse deutlich zum Verständnis komplexer Krankheiten beitragen. Dies wiederum könnte Bedeutung für zukünftige medikamentöse Therapien vaskulärer oder autoimmuner Krankheiten haben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

10 x PBS <sup>-Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup></sup>	Lonza, Basel, Schweiz
1 x PBS <sup>-Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup></sup>	Lonza, Basel, Schweiz
<i>4-aminobenzoic acid hydrazide</i> (4-ABAH)	Cayman Chemicals, Ann-Arbor, Michigan, USA
<i>Amplex UltraRed reagent</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Cl-Amidine	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Cutasept F Haut-Desinfiziens	BODE Chemie GmbH, Hartmann, Hamburg, Deutschland
Diff Quik	Medion Diagnostics, Miami, Florida, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
HBSS <sup>-Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup></sup>	ThermoFisher Scientific/Gibco, Waltham, Massachusetts, USA
HBSS ohne Phenolrot	Lonza, Basel, Schweiz
Hepes	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Histopaque	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Hoechst 33342	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>Horseradish Peroxidase</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>Horseradish Peroxidase</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
iNE	Axon medchem, Groningen, Niederlande
Necrostatin-1	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Percoll Plus	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien
PFA (Paraformaldehyd)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
RPMI 1640 mit L-Glutamin ohne Phenolrot	Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA
<i>Superoxidedismutase bovine</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Triton X	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Y-27632 dihydrochloride	Abcam, Cambridge, Großbritannien

### 2.1.2 Geräte

Tabelle 2: Geräte

Absaugsystem Vacusafe comfort	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Autoklav	Sanyo, Moriguchi, Osaka, Japan



Brutschrank HERAcell 150	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>Cytospin-2</i> -Zentrifuge	Shandon, Runcorn, Cheshire, England
Flir one Infrarotkamera	Flir System GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Floureszenzmikroskop Axio Imager M1	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Ibidi Heizsystem	Ibidi, Planegg/ Martinsried, Deutschland
Inverses Mikroskop, Axiovert 200	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr; Miele, Bulle, Schweiz; Gütersloh, Deutschland
M375L3 <i>Mounted</i> LED	Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland
M470L3 <i>Mounted</i> LED	Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland
M565L3 <i>Mounted</i> LED	Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland
<i>Microplate reader Clario Star</i>	BMG labtech, Ortenberg, Deutschland
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe <i>Pipetboy acu</i>	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
PLANO-CONVEX LA1131, $f = 50.0$ mm, uncoated	Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland
<i>PM16-122 Compact USB Power Meter</i>	Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland
<i>T-Cube LED Driver LEDD1B</i>	Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland
Tischzentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Wecker	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturbank BDK	BDK Luft- und Raumfahrttechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Zellkulturbank HERAsafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zellkulturbank Safe 2020	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge Rotina 35	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

### 2.1.3 Software

**Tabelle 3: Software**

AxioVision Rel.4.7	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Excel (14.3.0 for mac)	Microsoft, Redmond, Washington, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA
ImageJ 1.46r	National Institutes of Health Bethesda, Maryland, Washington, USA
Metamorph 6.3r2.	Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Thorlabs Power Meter Software	Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland
Clario Star 5.40.R3	BMG labtech, Ortenberg, Deutschland
MARS Version 3.32	BMG labtech, Ortenberg, Deutschland

## 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

10- <i>Well</i> -Platten CELLview <sup>Th</sup>	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
96- <i>Glassbottom-Well</i> -Platten	In vitro Scientific, Sunnyvale, California, USA
96- <i>Well</i> -Platte <i>black</i>	BRANDplates, BRAND GMBH
Falcons, 15 ml CELLSTAR® Polypropylen	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Falcons, 50 ml CELLSTAR® Polypropylen	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Filtropur S plus 2.0	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Labortücher 20,5 x 20 cm	Kimtech Science, Kimberly-Clark, Dallas, USA
Nitril Einmalhandschuhe S, M, L	LLG Labware, Hambuch, Meckenheim
Omnifix Einmalspitzen 3-teilig	B Braun, Melsungen, Deutschland
Original-Perfusor-Spritze OPA 50ml	B Braun, Melsungen, Deutschland
Parafilm	Bemis Company, Inc., Neenah, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Pur-Zellin Zellstofftupfer 4 cm x 5 cm	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
S-Monovetten 7.5 ml 1,6 mg EDTA/ml Blut	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safety-Multifly-Kanülen (Blutentnahme)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Transferpipetten ( <i>Eyedropper</i> ) 1 ml	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA

Vernichtungsbeutel Polypropylen

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

### 2.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Antikörper

Primäre Antikörper	Ursprung (Spezies)	Isotyp	Ziel (Spezies)	Hersteller
Anti-Myeloperoxidase	Maus	Monoklonales IgG1 Klon: 2C7	Mensch	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-Neutrophile Elastase	Kaninchen	Monoklonales IgG Klon:EPR7479	Mensch	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Sekundäre Antikörper	Ursprung	Isotyp	Ziel	Hersteller
S50 Alexa 488	Ziege	Polyklonale IgG	Maus	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
S49 Alexa 555	Ziege	Polyklonale IgG	Kaninchen	Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Isotyp-Kontrollen	Ursprung	Isotyp	Ziel	Hersteller
I-71	Kaninchen	Isotyp IgG Klon: EPR25A		Abcam, Cambridge, Großbritannien
I-14	Maus	Isotyp IgG1		Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA

## 2.1.6 Nährmedien und Puffer

**Tabelle 6: Nährmedium für Neutrophile Granulozyten**

Medium mit 0,5 % FCS und 10 mM Hepes	50 µl 0,5 % FCS in 9,95 ml Hepes+RPMI
	500 µl Hepes
	49,5 ml RPMI 1640 ohne Phenolrot

**Tabelle 7: PBS**

10 x PBS	400 g NaCl
	10 g KCL
	72 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	10 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	5000 ml Aqua Bidest
1 x PBS	100 ml 10x PBS
	900 ml Aqua Bidest
	100 µl 32 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

**Tabelle 8: Lösungen für Färbungen**

Permeabilisierungspuffer	0,05 g 0,1 % NaCitrat
	0,5 ml 0,1 % TritonX- (10 %)
	ad 50 ml 1x PBS
Färbelösung	500 µl 3 % BSA
	4,5 ml 1x PBS
	25 µl Tween 20 (10 %)
Blocklösung	400 µl 15 % BSA
	1,6 ml 1x PBS

**Tabelle 9: Lösung für ROS Experimente**

AmplexRed Lösung	50 $\mu$ M AmplexRed Lösung
	0,5 U/ml HRP
	10 U/ml SOD

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Periphere venöse Blutentnahme

Vor der Prozedur wurden die Teilnehmenden über Ablauf und Risiken der Blutentnahme aufgeklärt. Sie stimmten der Entnahme zuvor freiwillig und schriftlich zu; die Prozeduren und Versuche wurden von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen genehmigt (Nr. 29/1/17). Keiner der Teilnehmenden hatte zum Blutentnahmezeitpunkt Krankheitssymptome oder schwerwiegende, chronische Krankheiten. Alle Probanden waren Nichtraucher, nicht schwanger und fühlten sich körperlich und seelisch zur Teilnahme in der Lage. Während der Entnahme wurde zum Eigen- und Fremdschutz mit Einmalhandschuhen gearbeitet. Nach dreimaliger alkoholischer Desinfektion der Haut wurde mithilfe eines Stauschlauchs am Oberarm das Blut in den peripheren Venen gestaut. Eine optimale Entnahmestelle konnte vorher zumeist in der Ellenbeuge der Probanden palpirt werden. Mithilfe einer Flügelkanüle konnte anschließend Blut für jeweils zwei 7,5 ml S-Monovetten pro Proband gewonnen werden (EDTA-Röhrchen). Das Blut wurde unmittelbar ( $< 5$  min) weiterverarbeitet.

### 2.2.2 Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation aus frisch gewonnenem venösem Blut in folgenden Arbeitsschritten isoliert:

Zuerst wurde das Vollblut bei Raumtemperatur vorsichtig im Verhältnis 1:1 auf Histopaque 1119 geschichtet und anschließend bei 1100 RCF für 21 Minuten zentrifugiert, um die Zellen entsprechend ihres spezifischen Gewichts zu separieren. Nach der Zentrifugation erfolgte das erste Waschen der Zellen. Hierzu wurde die nach der Zentrifugation resultierende, transparente Flüssigkeitsschicht verarbeitet, das restliche Material wurde verworfen. Diese Schicht wurde mit HBSS<sup>-Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup></sup> auf insgesamt 14 ml aufgefüllt und erneut bei 400 RCF für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das am Boden verbliebene Sediment in 2 ml HBSS<sup>-Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup></sup> vorsichtig suspendiert. Diese Mischung wurde auf den vorbereiteten fünfschichtigen Percoll-Gradienten mit den Konzentrationen 65 %, 70 %, 75 %, 80 % und 85 % geschichtet. Anschließend wurde für weitere 22 Minuten bei

1100 RCF zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde mit der 75 %-Schicht weitergearbeitet. Diese wurde vorsichtig in 15 ml Schraubröhrchen pipettiert und mit HBSS auf 14 ml aufgefüllt. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 400 RCF zentrifugiert. Das nun entstandene Sediment wurde nach vorsichtigem Auflösen in 1 ml HBSS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) zum Mischen in den benötigten Medien und für die folgenden Experimente genutzt.

Die Reinheit der neutrophilen Granulozyten wurde mithilfe eines *Cytospin* und einer *Diff-Quik*-Färbung geprüft und betrug in allen Experimenten > 95 %.

### 2.2.3 Aktivierung der Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat

Die Zellen wurden jeweils in einer Dichte von 10.000 Zellen/50  $\mu\text{l}$  in die *Wells* gesät und vor den Experimenten für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Für die Positivkontrollen wurden die Neutrophilen nach der 30-minütigen-Pause mit jeweils 50  $\mu\text{l}$  PMA, verdünnt in den gleichen Medien wie die Zellen, versetzt. PMA wurde in einer Endkonzentration von 100 nM genutzt. Nach einer 3-stündigen-Reaktionszeit wurden die Versuche im Verhältnis 1:1 mit Paraformaldehyd in einer 2 % Endkonzentration abgestoppt und die Zellen über Nacht bei 4 °C gelagert.

### 2.2.4 Anfärben der DNA

Die DNA der Neutrophilen wurde mit 1,62  $\mu\text{M}$  des DNA-Interkalators Hoechst 33342 angefärbt. Dieser Farbstoff wird unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge zwischen 340–355 nm angeregt, und gebunden an DNA emittiert er Licht von ca. 465 nm, was der Farbe Blau entspricht. Ohne DNA-Bindung entsteht keine sichtbare Färbung.

Zum Färben der DNA wurden die Zellen für 15 Minuten mit je 100  $\mu\text{l}$  PBS pro *Well* gewaschen. Anschließend wurde das PBS entfernt und für 15 Minuten mit je 100  $\mu\text{l}$  Hoechst pro *Well* in einer Verdünnung von 1:10.000 mit PBS ausgetauscht. Nach dem Färben folgte, Schritt Eins entsprechend, eine Waschung mit PBS. Die Färbung erfolgte lichtgeschützt.

### 2.2.5 Quantifizierung der NETose

Zur Auswertung der Aktivierung wurden die mit Hoechst gefärbten Zellen für weitere Analysen in PBS gelagert. Zur Quantifizierung der NETose wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop standardisiert mit jeweils 5–6 Fotos pro *Well* fotografiert und anschließend verblindet ausgezählt. Der prozentuale Anteil der NETs sowie apoptotischer und unstimulierter Zellkerne wurde nach dem Zählen der Zellkerne berechnet und ausgewertet.

### 2.2.6 Immunfluoreszenzfärbung von NE und MPO

Zum Nachweis der Kolokalisation der für NETs spezifischen Enzyme NE und MPO an den aktivierten Zellen wurde eine Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern wie folgt vollzogen:

Die über Nacht mit PFA fixierten Zellen wurden mit je 100  $\mu\text{l}$  PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Alle folgenden Lösungen wurden im gleichen Volumen genutzt. Nach dem Abpipettieren des PBS wurde bei 4 °C für 10 Minuten mit Permeabilisierungspuffer behandelt. Der folgende Waschschrift mit PBS entsprach dem ersten. Danach wurde die 3 % BSA-Blocklösung auf die Zellen pipettiert und bei 37 °C für 90 Minuten inkubiert. Schließlich wurden die jeweiligen Medien mit den primären Antikörpern auf die Zellen pipettiert und bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Lösung mit den primären Antikörpern entfernt und die Zellen erneut zweimal vorsichtig für je 15 Minuten bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen. Anschließend folgte die Hoechst-Färbung wie oben beschrieben. Nun wurde die Lösung mit den sekundären, fluoreszierenden Antikörpern für zwei Stunden auf die Zellsuspension gegeben. Als abschließender Schritt erfolgte erneut eine Waschung mit PBS.

Nun konnten die Zellen als Luft- oder Ölpräparate unter dem Fluoreszenzmikroskop mit den entsprechenden Wellenlängen angeregt und fotografiert werden.

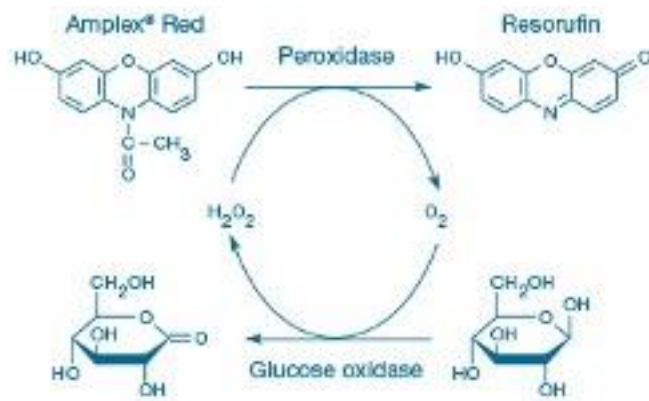
### 2.2.7 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies

Zur Detektion reaktiver Sauerstoffspezies bei verschiedenen Konditionen wurden 10.000 Neutrophile pro *Well* wie in den vorherigen Versuchen behandelt. Die Zellen adhärten initial 30 Minuten am Gefäßboden, bevor die Aktivierung entweder mit 50  $\mu\text{l}$  PMA oder mit einer bestimmten Dosis Licht stattfand. Die Negativkontrolle enthielt lediglich mit Licht bestrahltes Medium ohne Zellen.

Auch in diesem experimentellen System befanden sich die Kulturplatten während des Experiments in der Hitzekammer bei 37 °C. Null, 10, 20, 30 oder 40 Minuten nach der Aktivierung wurden jeweils 5  $\mu\text{l}$  der Lösung entnommen und in eine vorbereitete Platte überführt, in der sich die ROS-Indikatorlösung *Amplex Red* im Mikroplatten Lesegerät befand. Die 5  $\mu\text{l}$  wurden jeweils an vergleichbaren Orten im unteren Drittel der Wells entnommen. Bei den Positiv- und Negativkontrollen wurde gleichermaßen verfahren.

Die vorbereiteten *Wells* zur Messung der ROS Konzentration befanden sich auf einer schwarzen 96-*Well*-Platte und enthielten eine Mischung aus PBS mit jeweils 50  $\mu\text{M}$  *Amplex Red*-Lösung. Die *Amplex Red*-Lösung enthielt 0,5 U/ml Meerrettich-Peroxidase, sowie 10 U/ml Superoxiddismutase, um die entstandenen Radikale vollständig zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  umzusetzen, da nur  $\text{H}_2\text{O}_2$  von *Amplex Red* detektiert wird. Die farblose *Amplex Red*-Lösung reagiert im Verhältnis 1:1 mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Resorufin mit Exzitations/Emissionsmaximum bei 570/585 nm (Abbildung 6).





**Abbildung 6: Reaktion von Amplex Red zu Resorufin**

Reaktion von *Amplex Red* zu fluoreszierendem Resorufin. Die Peroxidase katalysiert die Reaktion von *Amplex Red* und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Resorufin. Bei der Reaktion entsteht molekularer Sauerstoff. Quelle: Thermofisher

Während der Messung durch das Gerät wurde die Wellplatte außerdem vorsichtig in Bewegung gehalten, um eine gleichmäßige Verteilung der Radikale sicherzustellen.

Die absolute H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration konnte anhand einer vorher vermessenen Kalibrierkurve mit HBSS und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in definierten Konzentrationen berechnet werden. Nach der Detektion im Mikroplatten-Lesegerät wurden die Zellen inkubiert und nach 3 h mit PFA abgestoppt. Am folgenden Tag konnten die relativen NETose-Raten mithilfe der oben beschriebenen Hoechst-Färbung der DNA mikroskopisch bestimmt werden.

### 2.2.8 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Für die statistischen Auswertungen der Ergebnisse wurde Graph Pad Prism 6 genutzt. Als statistische Tests wurden parametrische *One-Way*-Analysen der Varianz (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur sowie t-Tests durchgeführt. Die Fehlerbalken in den graphischen Auswertungen stehen für  $\pm$ SEM. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Neu etablierte Methoden

#### 3.1.1 Entwicklung des Versuchsaufbaus

Um ein reproduzierbares experimentelles System für die Bestrahlung der Neutrophilen mit bestimmten Intensitäten und Wellenlängen zu entwickeln, mussten in vorbereitenden Experimenten viele Störfaktoren ausgeschlossen und verschiedene Möglichkeiten ausprobiert und evaluiert werden. In den folgenden Unterpunkten wird auf die jeweiligen Überlegungen eingegangen.

##### 3.1.1.1 Differenzierte und selektive Bestrahlung der Zellen

Aufgrund der Transparenz allgemein gebräuchlicher Kulturplatten wurden die Experimente in 96- oder 10-*Well*-Kulturplatten mit lichtundurchlässigen, schwarzen Trennwänden zwischen den *Wells* und lichtdurchlässigen Borosilikatglas-Böden mit bekanntem Transmissiosspektrum durchgeführt.

##### 3.1.1.2 Temperaturstabilität während der Bestrahlung

Weitere Überlegungen galten der Umgebungstemperatur, in der Neutrophile durch Licht zur Bildung von NETs angeregt werden sollten. Um physiologische Bedingungen zu simulieren, wurde in einer Wärmekammer ein Milieu von 36–37°C, ähnlich der menschlichen Körperkerntemperatur, geschaffen. Da die Temperatur der Körperperipherie oft deutlich niedriger liegt, wurden ebenfalls Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt. Hier konnte jedoch keine reproduzierbare Aktivierung erzielt werden (unveröffentlichtes Material). Die Wärmekammer fasst nur Objektträger-Platten mit 10 *Wells*, weshalb alle aufgeführten Experimente in 10-*Well*-Platten stattfanden.

Die Wärmekammer erlaubt die Adjustierung der Innenraum-Temperatur durch separate Einstellung der Temperaturen der Deck- und Bodenplatte. Durch ausführliche Testungen mit identischen Flüssigkeitsständen konnte mithilfe eines Temperatursensors die optimale Einstellung für Boden- und Deckplatte gefunden werden, um die Flüssigkeit bei 36–37°C zu halten. Diese Einstellungen wurden in jedem weiteren Experiment beibehalten.

##### 3.1.1.3 Wellenlängen des verwendeten Lichts

Um die Wirkungen des Lichts auf die Zellen konkret einzelnen Wellenlängenbereichen zuordnen zu können, wurden LEDs mit definierten Spektralbereichen genutzt. Die LEDs wurden anhand der Wellenlängenbereiche der vorher genutzten Filter des inversen Lichtmikroskops, mit denen die Aktivierung der Zellen durch Licht initial beobachtet wurde, ausgewählt. Dementsprechend wurden LEDs mit Wellenlängen um den Bereich zwischen 300 und 400 nm gewählt. In Vorexperimenten mit vier unterschiedlichen Filtern des inversen

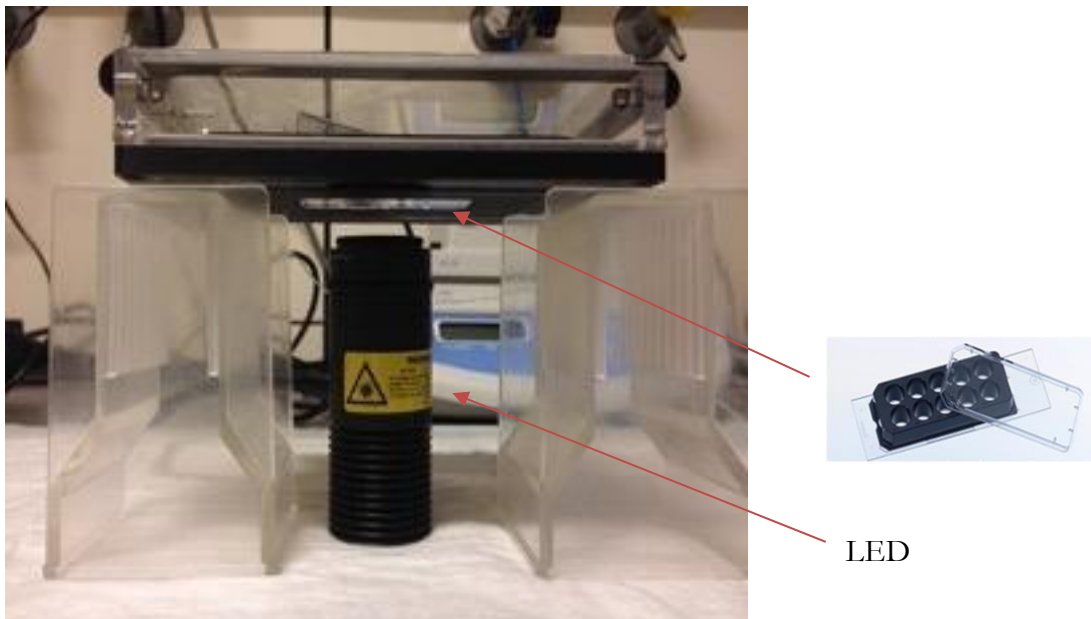
Mikroskops und LEDs mit Emissionen bis 630 nm (orangenes Licht) wurde eine tendenziell stärkere Aktivierung der Zellen bei kürzerwelligem Licht beobachtet. Deshalb wurden die folgenden Experimente mit kürzerwelligem Licht durchgeführt. Für die Experimente standen letztlich drei LEDs mit Wellenlängenmaxima bei 565 nm (grün), 470 nm (blau) und 375 nm (UV-A) zur Verfügung.

#### 3.1.1.4 Absorption des Lichts durch das Material

Lichtstrahlung wird von Material in unterschiedlich starker Weise absorbiert. Um zu prüfen, inwiefern diese Absorption die mit dem Sensor gemessene Lichtintensität in der Nähe der Zellen verändert, wurde das Absorptionsspektrum der Bodenplatten der 10-Well-Platten ausgewertet. Mit den verwendeten Borosilikatböden beträgt die Absorption durch das hochtransparente achromatische Borosilikatglas bei Wellenlängen ab ca. 340 nm ca. 10%. Das bedeutet, dass ca. 90% der gemessenen Lichtintensität die Neutrophilen am Boden der Wells erreichen kann. Diese Abschwächung des Lichts von ca. 10% wurde in die weiteren Berechnungen der Intensitäten einbezogen.

### 3.1.2 Experimentelle Anordnung zur Bestrahlung neutrophiler Granulozyten

Das in Abbildung 7 dargestellte System wurde zur Bestrahlung der Neutrophilen unter verschiedenen Konditionen entwickelt. Um die Lichtstreuung und -absorption möglichst gering zu halten, wurde ein Aufbau gewählt, in dem die Lichtquellen in möglichst nahem und gleichbleibend definiertem Abstand zu den Zellen standen. Diese wurden von unten bestrahlt. Während der Bestrahlung befanden sich die Zellen in den 10-Well-Platten in der Ibidi-Wärmekammer, kalibriert auf Temperaturen zwischen 36–37 °C. Vor, während und nach der Durchführung der Experimente wurde darauf geachtet, die Zellen in den Kammern keiner weiteren Lichtexposition auszusetzen.



**Abbildung 7: Versuchsaufbau**

Experimenteller Aufbau zur Bestrahlung der Neutrophilen. Die Zellen wurden nach der Isolierung aus venösem Vollblut in einem geeigneten Nährmedium suspendiert und in die abgebildeten 10-Well Platten gesetzt. Diese 10-Well Platten konnten während der Bestrahlung in der Hitzekammer zwischen 36–37 °C gelagert werden.

Zur Bestrahlung wurden die Zellen in RPMI ohne Zugabe von Phenolrot, mit 10 mM HEPES und 0,5 % FCS gelöst suspendiert. Pro Well wurden 10.000 Zellen ausgesät und vor den Experimenten für 30 Minuten bei 37 °C zum Adhärenz inkubiert. Anschließend wurden weitere 50 µl Medium hinzugefügt, sodass in allen Wells die gleiche Flüssigkeitsmenge sichergestellt war. Die LEDs wurden mit einer konvexen Linse verbunden und mithilfe eines entsprechenden LED-Treibers in Funktion genommen.

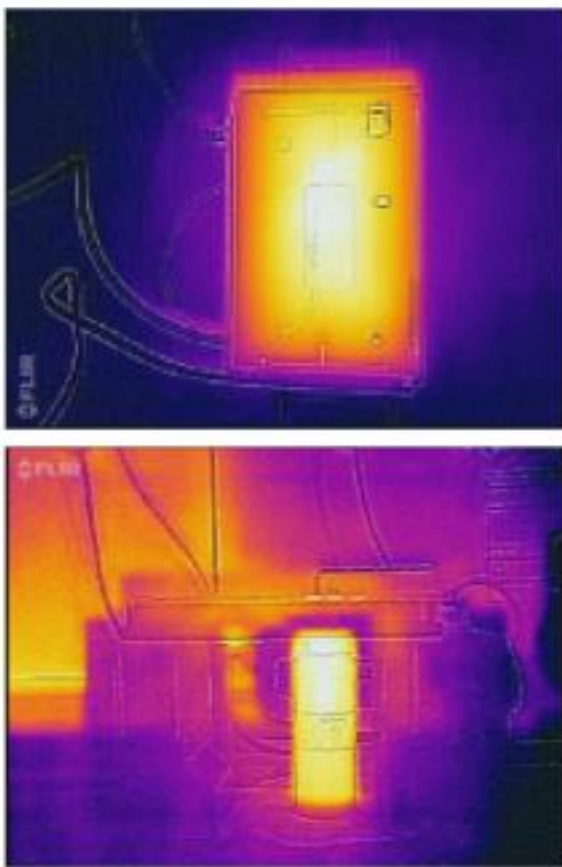
### 3.1.3 Messung der Strahlungsintensität

Um die Strahlungsintensitäten, denen die Zellen während der Versuche ausgesetzt waren, in einen physiologischen Kontext zu bringen, wurden die Leistungen der LEDs in Watt, also in Energie beziehungsweise Arbeit pro Zeit, ermittelt. Für die Versuche wurden LEDs mit Emissionsmaxima von 375 nm, 470 nm und 565 nm genutzt. Mithilfe eines Energiesensors konnten die Leistungen der LEDs gemessen werden. Hierzu wurde der Energiesensor in eine den LEDs gegenüberliegende Position gebracht und anschließend mit derselben Lichtintensität wie die Zellen in den Versuchen über mehrere Minuten bestrahlt. Mithilfe der dazugehörigen Software konnten die erbrachten Leistungen der drei benutzten LEDs in Watt abgelesen werden. Zur spezifischen Messung der Intensitäten der jeweiligen Wellenlängen mussten die entsprechenden Maximalwellenlängen der drei LEDs in der Software angepasst werden. Alle drei LEDs wurden mehrmals vermessen. Die jeweiligen Leistungen konnten anschließend mithilfe der technischen Zeichnungen des Energiesensors auf Watt pro Quadratmeter umgerechnet werden, um vergleichbare Intensitäten zu erhalten.

und rechnerisch ermitteln zu können, mit wieviel Watt die einzelnen Neutrophilen in der gewählten Zelldichte in unserem experimentellen Aufbau bestrahlt werden würden.

### 3.1.4 Ausschluss eines Wärmeeffekts durch die Bestrahlung

Bei der Bestrahlung mit Licht entsteht Wärme. In den Herstellerangaben der genutzten LEDs wird auf die Thermostabilität und die Wärmeableitung durch einen eingebauten Kühlkörper hingewiesen. Zur Verifizierung dieser Angaben und um eine Verfälschung durch Wärmeentwicklung auszuschließen, wurde die Wärmeausbreitung vor, während und nach der Bestrahlung mit den LEDs mithilfe einer Infrarotkamera fotografiert.



**Abbildung 8: Aufnahmen der Wärmebildkamera während der Bestrahlung**

Aufnahmen der Wärmekamera während der Bestrahlung der Neutrophilen; das Bild oben zeigt die von oben aufgenommene Wärmekamera und eine gleichmäßige Wärmeverteilung durch die Bestrahlung der LED. Das Bild unten zeigt den Aufbau von der Seite während der Bestrahlung, die Erwärmung der LED (hellgelbe Farbe) bei gleichmäßiger Verteilung der Wärme in der Hitzekammer (orangene Farbkennzeichnung)

Da Temperaturschwankungen stören oder die Ergebnisse verzerren könnten, war die Prüfung dieses Problems relevant. Mithilfe der Fotos der Infrarotkamera wurde eine gleichmäßige Wärmeverteilung über die gesamte Wärmekammer beobachtet, ohne lokale Unterschiede vor oder nach der Bestrahlung durch die LEDs (Abbildung 8). Dies konnte

eine Verzerrung der Ergebnisse durch eine übermäßig starke Wärmeentwicklung ausschließen.

Zusätzlich wurden Temperaturunterschiede vor, während und nach der Bestrahlung in den einzelnen *Wells* mithilfe eines in der Flüssigkeit platzierten Temperatur-Sensors untersucht. Die Temperaturschwankungen in den einzelnen *Wells* betragen im Verlauf der Experimente und auf Höhe der Zellen lediglich 0,5–1 °C.

## 3.2 Überlegungen zur physiologischen Exposition der menschlichen Haut mit Sonnenlicht

Viele Faktoren beeinflussen die tägliche Sonnenexposition. Die Dosis des Lichts auf der Haut variiert je nach Ort, Zeit und individueller Disposition. Zu den relevanten Parametern zählen sowohl Ort, Jahreszeit, Wetterlage und täglicher Aufenthalt im Freien, als auch komplexere physikalische Variablen. Auf die wichtigsten wird im Folgenden eingegangen.

### 3.2.1 Physikalische Überlegungen zur Lichtintensität

Licht kommt in Abhängigkeit von seiner Wellenlänge in unterschiedlich starker Intensität auf der Erdoberfläche an. Um die physiologische Relevanz der genutzten Intensitäten besser einschätzen zu können, wurde die ungefähre Strahlungsintensität des Sonnenlichts für die experimentell genutzten Wellenlängen einzeln berechnet. Hierzu wurde die Strahlung in  $W/m^3$  für einzelne Wellenlängen in einem entsprechenden *Code* formuliert (Abbildung 9).

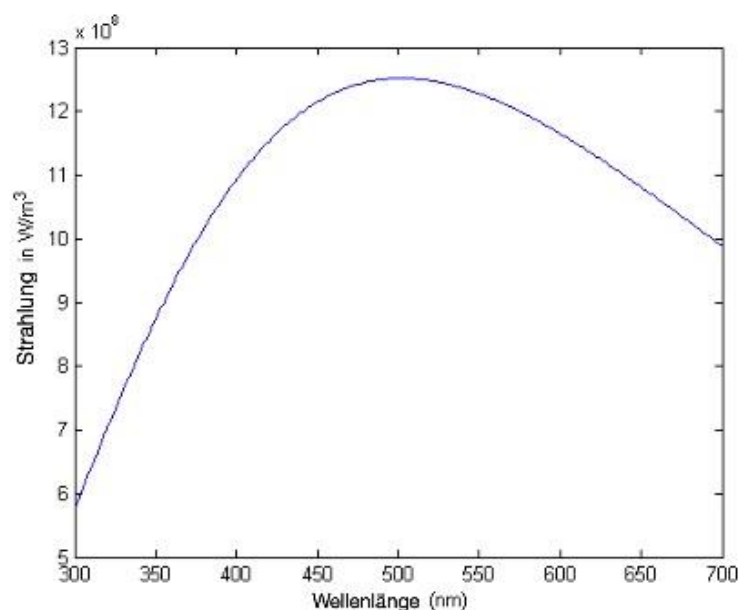


Abbildung 9: Spektrale Strahlung der Sonne

Spektrale Strahlung der Sonne bezogen auf jeweilige Wellenlängen im Bereich zwischen 300 und 700 nm Wellenlänge.

Da das Licht der LEDs nicht streng monochromatisch ist, musste die jeweilige spektrale Breite der LEDs abgeschätzt werden (Abbildung 10). Hierzu wurde ein 90 % Konfidenzintervall für die theoretisch überlegten, physiologischen Strahlungsintensitäten berechnet.

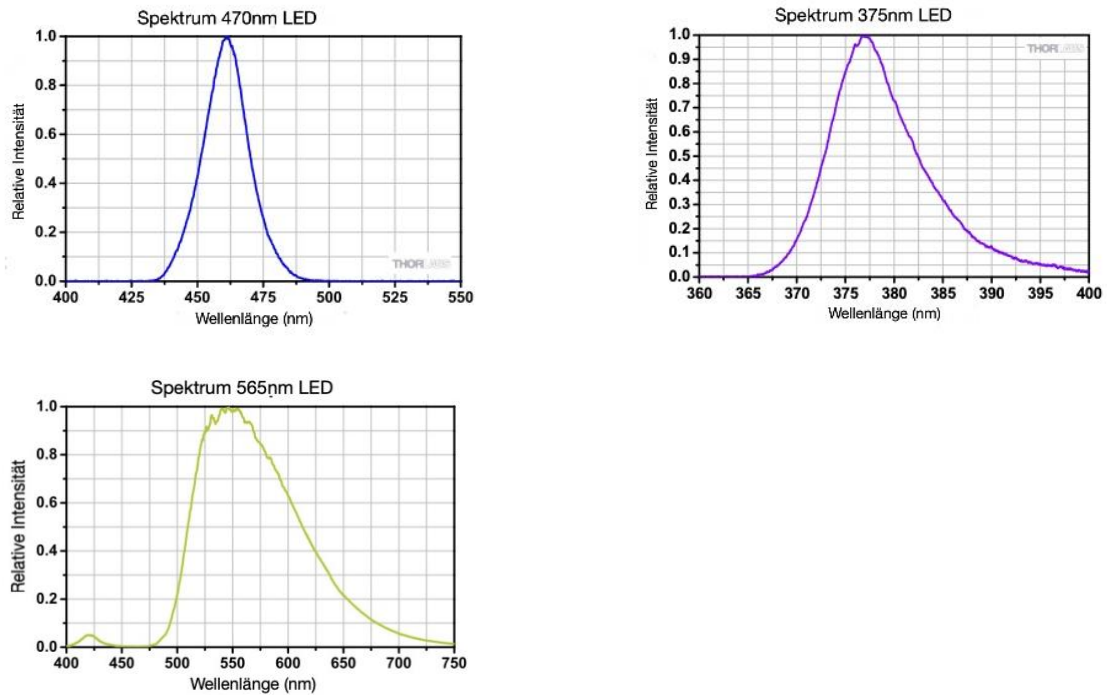


Abbildung 10: Lichtspektren der genutzten LEDs

### 3.2.2 Eindringtiefe des Lichts in die menschliche Haut

Wie in Abbildung 4 skizziert, variiert die Eindringtiefe der Lichtstrahlung abhängig von der Wellenlänge stark, sodass nur ein gewisser Prozentsatz der theoretisch berechneten Intensität tiefer in die menschliche Haut eindringt (Anderson und Parrish 1981). Außerdem spielen die Beschaffenheit der Haut selbst sowie der Gehalt an Melanin und anderen lichtabsorbierenden und streuenden Molekülen eine entscheidende Rolle (Sandell und Zhu 2011). Zusätzlich muss intraindividuell die unterschiedliche Dicke der Haut an verschiedenen Körperstellen beachtet werden, die etwa am Augenlid nur einen Bruchteil der Dicke an den Handflächen beträgt (Ha et al. 2005). Unter den lichtabsorbierenden Substanzen hat vor allem das Melanin eine protektive Rolle gegenüber Sonnenstrahlung und wird durch den Einfluss des UV-Lichts in der menschlichen Haut durch die Melanozyten vermehrt produziert (Brenner und Hearing 2008). Die wahre Intensität des Sonnenlichts in der Haut unterliegt also vielen „externen“ und „internen“ Einflüssen, weshalb die Übertragung

experimenteller Ergebnisse auf die *in-vivo*-Situation nur näherungsweise möglich ist (Sandby-Møller et al. 2003).

Nach dem Austritt aus dem Knochenmark zirkulieren neutrophile Granulozyten im Blut. In der Haut gesunder Menschen kommen sie dementsprechend frühestens in den Kapillargefäßen unterhalb der dermo-epidermalen Junktionszone vor. Bei durchschnittlich dicker Epidermis würden sie sich ca. 80  $\mu\text{m}$  tief in der Haut befinden.

Um die genutzten Intensitäten an physiologisch vorkommende Intensitäten anzupassen, wurde mithilfe von Eindringsschemata wie Abbildung 4 die jeweilige Lichtdosis in der dermo-epidermalen Junktionszone geschätzt und rechnerisch umgesetzt. Für die in diesen Experimenten genutzten Wellenlängen wurde dementsprechend für 375 nm mit ca. 10–15 % der ursprünglichen Intensität kalkuliert, für 470 nm mit ca. 50–60 % und für 565 nm mit ungefähr 60 % verbleibender Intensität (Svobodová und Vostálová 2010).

Kommt es im Organismus zu einer Entzündung, treten neutrophile Granulozyten aus den Gefäßen aus und befinden sich je nach Ort der Entzündung auch in oberflächlicheren Hautschichten. Hier können sie auch höheren Lichtdosen ausgesetzt sein. Diese starke Varianz der Ausgangssituation ist zu beachten, da sie zu verschiedenen Interpretationen der erhöhten Sensibilität der Zellen auf Licht und möglichen Konsequenzen für gesunde und kranke Menschen führt.

### 3.3 Dosisabhängigkeit der Aktivierung

Zur Untersuchung der Dosisabhängigkeit der Lichtaktivierung wurden neutrophile Granulozyten stufenweise mit steigenden Lichtdosen mit der 375 nm LED und der 470 nm LED bestrahlt. Die Aktivierung der Zellen wurde anschließend anhand des prozentualen Anteils dekondensierter Zellkerne ausgewertet. Die Veränderung der Zellkerne, sichtbar durch die Anfärbung mit Hoechst, vollzog sich innerhalb von 1–2 Stunden nach der Lichtexposition. Um einen zytotoxischen Effekt durch die Hoechst-Färbung auszuschließen, wurden die Zellen erst nach der vollständigen Inkubationszeit von 3 Stunden gefärbt. Mikroskopisch glich diese Veränderung der NET-Formation in vorherigen Lebendzellexperimenten und den durch PMA induzierten Veränderungen im selben experimentellen System. Die exakten Lichtdosen für 375 nm entsprachen 3,4  $\text{J}/\text{cm}^2$ , 18  $\text{J}/\text{cm}^2$ , 35  $\text{J}/\text{cm}^2$  und 70  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Für 470 nm ergaben sich 21,4  $\text{J}/\text{cm}^2$ , 54  $\text{J}/\text{cm}^2$ , 107  $\text{J}/\text{cm}^2$  und 214  $\text{J}/\text{cm}^2$ .



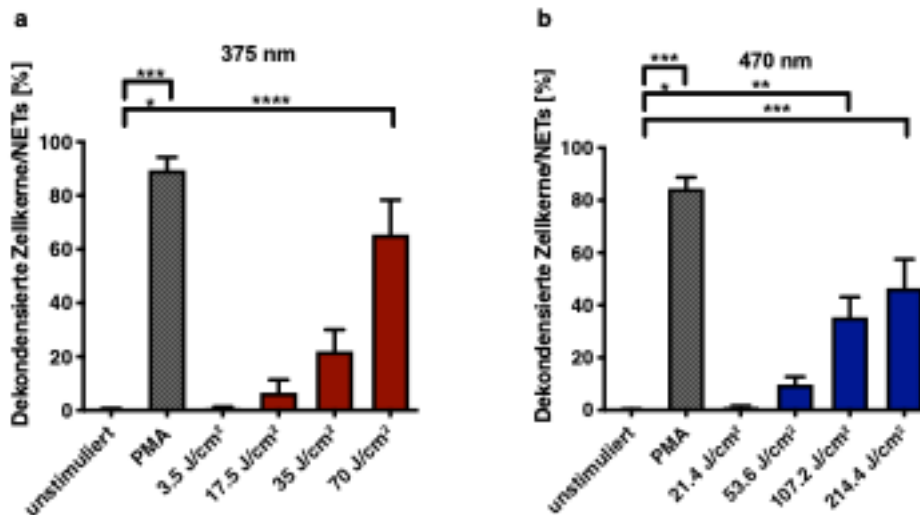


Abbildung 11: Dosisabhängigkeit der Aktivierung

Bestrahlung der Neutrophilen mit stufenweise steigender Lichtintensität durch steigende Bestrahlungsdauern mit den zwei LEDs von 375 nm (a) und 470 nm (b) Wellenlänge. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen ( $\pm$ SEM). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ , jeweils im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle

Wie in Abbildung 11 abgebildet, wurden die signifikantesten Ergebnisse mit den jeweils höchsten aufgeführten Lichtdosen erzielt, in weiteren Experimenten mit noch höheren Lichtdosen konnte keine weitere Steigerung der Anzahl dekodensierter Zellkerne erreicht werden. Die jeweils minimal notwendigen Intensitäten zum Erzielen eines Effekts wurden durch Vorexperimente bestimmt. Die beispielhaften Fotos aus Abbildung 12 zeigen die morphologischen Veränderungen der Zellkerne durch die Aktivierung mit PMA und durch die Bestrahlung mit Licht, auf deren Grundlage eine Auswertung der Experimente stattfinden konnte.

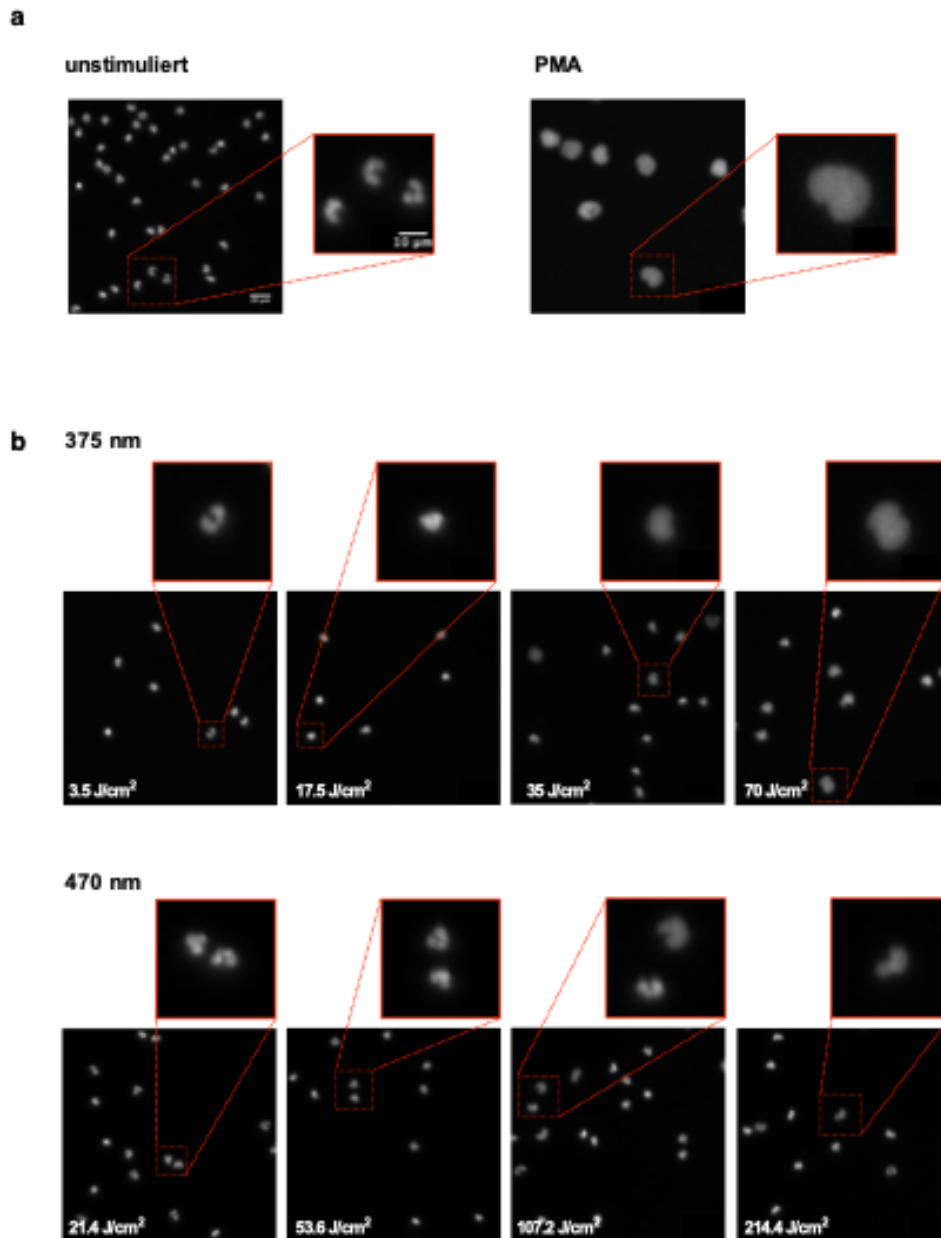


Abbildung 12: Beispielfotos aktivierter Neutrophiler

Beispielfotos von aktivierten Neutrophilen aus Experimenten mit stufenweise steigenden Lichtintensitäten, die DNA der Zellen wurde mit Hoechst gefärbt. Anhand der unstimulierten oder mit PMA aktivierten Kontrollzellen in (a) lässt sich gut erkennen, wie die Zellen in den Experimenten mit steigenden Lichtintensitäten (b) aktiviert werden. Während die Zellkerne bei niedrigen Intensitäten überwiegend noch einen gelappten Zellkern aufweisen, dekondensiert eine größer werden Zahl von Zellkernen bei steigenden Lichtintensitäten sowohl bei 375 nm als auch bei 470 nm.

Physiologische Lichtintensitäten führen bei gesunden Menschen in der Regel nicht zu erhöhten NETose-Raten in der Haut. Die experimentell eingesetzten Lichtdosen wurden schrittweise bis zu unphysiologischen Werten gesteigert, um eventuell schädliche Einflüsse übermäßiger Sonnenexposition oder eine leichtere Aktivierung „vorgeschädigter“

Neutrophiler von Patienten mit lichtprovozierbaren Krankheiten zu erfassen. Außerdem ist die direkte Bestrahlung der Zellen im Medium ohne schützende Hautschichten artifiziell und unterscheidet sich klar von physiologischen Gegebenheiten. Im physiologischen Kontext existieren vielfältige wechselseitige Einflüsse zwischen Neutrophilen, anderen Zellen und extrazellulären Komponenten. Im experimentellen System hingegen befinden sich lediglich weitere neutrophile Granulozyten in der Umgebung, weshalb die durch das Licht induzierten Reaktionen möglicherweise moduliert werden könnten.

### **3.4 Wellenspezifische Aktivierung bei angeglichenen Photonenflux und angelichener Gesamtenergie**

Zur näheren Auswertung der Lichtaktivierung der Zellen wurde die mögliche Abhängigkeit der Aktivierung von spezifischen Wellenlängen untersucht. Durch vorbereitende Experimente mit längerwelligen LEDs mit signifikant geringerer Auswirkung auf die Neutrophilen kam bereits früh der Verdacht eines Zusammenhangs auf. Um diesen Verdacht weiter zu quantifizieren, galt es, die drei genutzten Wellenlängen miteinander vergleichbar zu machen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden zum einen der Photonenflux und zum anderen die berechnete Gesamtenergie genutzt.

Ein Photon ist ein elektrisch neutrales und masseloses Elementarteilchen. Licht ist eine Form der elektromagnetischen Strahlung und kann betrachtet werden als der Bereich des elektromagnetischen Spektrums, der mit bloßen Augen gesehen werden kann. In der Quantenphysik wird Licht als ein Strom von Quantenobjekten beschrieben, diese Quantenobjekte entsprechen Photonen. Der sogenannte Photonenflux bezieht außerdem eine zeitliche Komponente mit ein und ist definiert als Anzahl an Photonen pro Sekunde pro Flächeneinheit. Für den ersten Versuchsaufbau wurde zuerst die absolute Anzahl an Photonen bei einer Bestrahlung von 10 Minuten mit der 375 nm LED berechnet. Zusammen mit der vorher gemessenen Intensität der LED von  $9,3036 \cdot 10^{-3}$  W ergibt sich eine somit Gesamtenergie von 5,58216 J. Bezieht man diese Gesamtenergie auf die berechnete Energie eines einzelnen Photons bei 375 nm von  $5,2831 \cdot 10^{-19}$  J/Photon, ergibt sich eine absolute Photonenzahl von  $1,05661 \cdot 10^{19}$ . Die Energie pro Photon lässt sich durch die Formel  $E(\text{ph}) = h \cdot f$  berechnen, wobei  $h$  das Planck'sche Wirkungsquantum ( $h = 6,626\,070\,040 \cdot 10^{-34}$  J\*s) darstellt und  $f$  die Frequenz des Photons. Die Bestrahlungsdauer der anderen genutzten LEDs wurde nun dahingehend angeglichen, dass die absolute Photonenzahl übereinstimmte. Für 470 nm ergab sich bei einer Energie pro Photon von  $4,3089 \cdot 10^{-19}$  J multipliziert mit der absoluten Photonenzahl  $1,05661 \cdot 10^{19}$  eine Gesamtenergie von 4,5529 J. Diese Gesamtenergie, bezogen auf die gemessene Leistung der LED von 0,0142591 W, wird dementsprechend nach 319,19 s erreicht. Für die dritte LED von 565 nm mit einer Energie pro Photon von  $3,6342 \cdot 10^{-19}$  J und einer gemessenen Intensität von  $6,9143 \cdot 10^{-3}$  W ergibt sich eine Bestrahlungsdauer von 555,36 s um dieselbe Anzahl an Photonen zu erreichen. Auf

dieselbe Weise wurde die Gesamtenergie der drei LEDs an eine Bestrahlung von 10 Minuten mit 375 nm angeglichen.

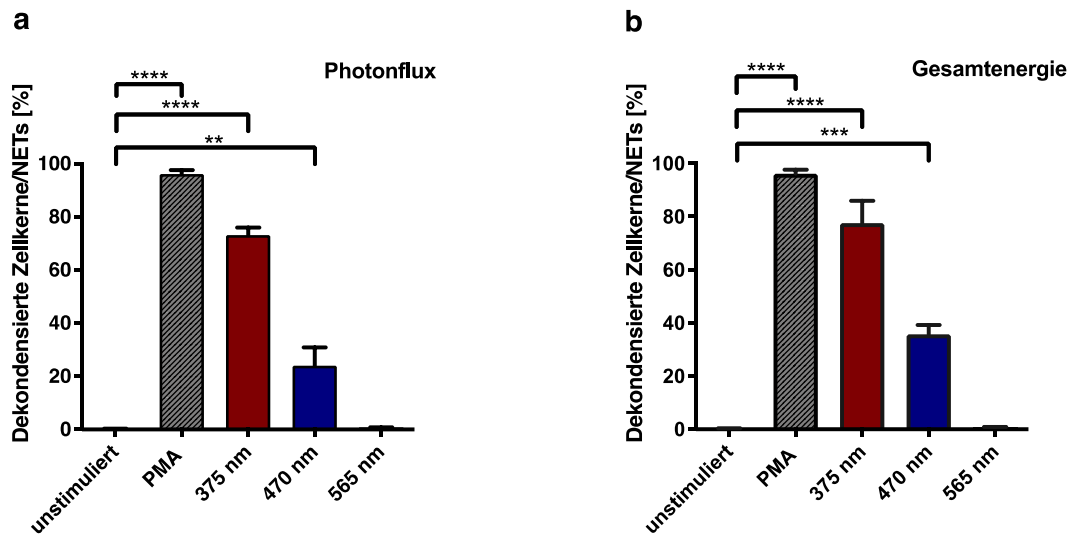


Abbildung 13: Aktivierung der Zellen bei angeglichener Photonenzahl und Gesamtenergie

Aktivierung der Zellen bei angeglichener Photonenzahl (a) und angeglichener Gesamtenergie (b). Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen ( $\pm$ SEM).  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ;  $****p < 0,0001$ , jeweils im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle

Wie in Abbildung 13 zu erkennen, waren bei angeglichener Photonenzahl unterschiedliche Aktivierungen zu beobachten. Während die Zellkerne bei 375 nm eine Aktivierung zwischen 60–80 % zeigten, war bei der gleichen Photonenzahl und einer Wellenlänge von 565 nm keine morphologische Veränderung der Zellkerne zu erkennen. Bei einer Wellenlänge von 470 nm konnte man eine um 20–40 % geringere Dekondensation beobachten. Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen daher einen starken Effekt der spezifischen Wellenlänge auf die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten in unserem experimentellen System vermuten.

### 3.5 Immunfluoreszenzfärbungen von Myeloperoxidase und neutrophiler Elastase an lichtaktivierten Neutrophilen

Ein charakteristisches Merkmal früher Phasen der NETose ist die starke Abhängigkeit der Dekondensation des Chromatins von enzymatischer Aktivität (Neubert et al. 2018). Die involvierten Enzyme unterscheiden sich je nach Stimulus, jedoch sind NE, MPO und Enzyme der PAD-Familie, insbesondere PAD 4, unersetzbar. Dass die dekondensierten Zellkerne der Neutrophilen NETs entsprechen, wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen dieser Leitenzyme gezeigt.

Wie in Abbildung 14 zu erkennen, war tatsächlich eine starke Kolo-kalisation des Chromatins insbesondere mit MPO zu erkennen. NE-Färbungen ließen ebenfalls eine Anreicherung

innerhalb des Bereichs der dekondensierten DNA erkennen, jedoch subtiler als die der MPO. Die Ko-Lokalisation der Enzyme ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der experimentelle Einfluss des Lichts auf die Zellen zur NET-Formation führt.

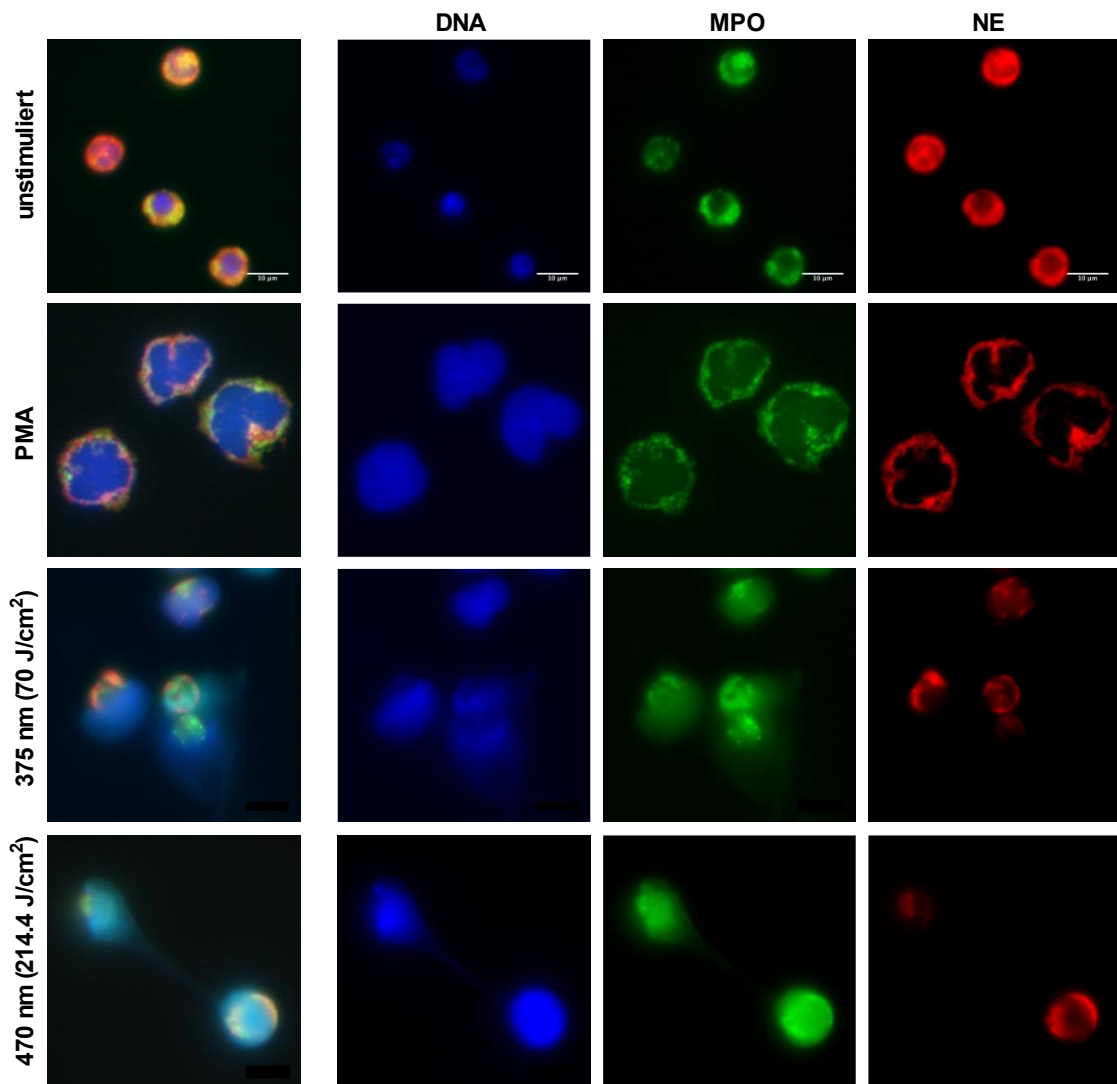


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbungen an Zellkernen neutrophiler Granulozyten

Immunfluoreszenzfärbungen von Zellkernen neutrophiler Granulozyten. Gefärbt wurden exemplarisch gewählte unstimulierte Zellen, PMA-aktivierte Zellen und solche, die für 10 Minuten mit 375 nm Wellenlänge oder für 20 Minuten mit 470 nm Wellenlänge aktiviert wurden. Blau (Hoechst) stellt die DNA der Zellen dar, grün Myeloperoxidase und rot neutrophile Elastase. Vor allem bei der Färbung der Myeloperoxidase ist bei den aktivierten Zellen mit 375 nm oder 470 nm klar die Ko-Lokalisation mit der dekondensierten und nach extrazellulär ausgetretenen DNA zu erkennen.

### 3.6 Inhibitorversuche

Da die Lichtaktivierung offenbar von enzymatischer Aktivität abhängt, galten die folgenden Experimente vor allem der Inhibition spezifischer Enzymwege zum tiefergehenden Verständnis der Lichtreaktion. Zunächst wurden die Inhibitoren iNE und ABAH der

Leitenzyme der „klassischen“ NET-Formation NE und MPO verwendet. Daneben kamen weitere Inhibitoren zum Einsatz, die breiter gefächert mögliche enzymatische Wege bestätigen oder ausschließen sollten. So wurde Nekrostatin-1 (NEC-1) genutzt, als spezifischer Nekroptose Inhibitor, um Aufschluss darüber zu geben, ob die Aktivierung der Zellen durch Licht eventuell nicht „nur“ eine Formation von NETs zeigte, sondern simultan eine andere Form des Zelltodes ausgelöst wurde. Des Weiteren kam Cl-Amidine als Pan-PAD-Inhibitor zum Einsatz. Cl-Amidine inhibiert irreversibel vorzugsweise die Calciumgebundene Form von PAD-4 und verhindert damit die Citrullinierung und posttranslationale Veränderung von Proteinen, die zur Dekondensation und damit zur NET-Bildung beitragen (Wang et al. 2009; Rohrbach et al. 2012). In Experimenten, in denen PAD-4 durch Cl-Amidine inhibiert wurde, war nach einer Aktivierung mit PMA die NETose-Rate reduziert (Knight et al. 2015). Interessant ist in diesem Zusammenhang die gesteigerte PAD-Aktivität und damit Vermehrung posttranslational modifizierter Proteine bei Patienten mit M. Alzheimer, M. Parkinson, Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis und systemischem Lupus erythematoses (Bicker und Thompson 2013). Ein pathologischer Zusammenhang zwischen der Aktivität von PAD-4, der NETose-Rate und den oben aufgeführten systemischen Krankheiten liegt demnach nahe.

Zusätzlich wurde der *Rho-associated coil kinase 1/2 (ROCK 1/2)*-Inhibitor Y-27632 verwendet. Beide ROCK-Varianten sind in die Reorganisation des Zytoskeletts während der PMA-aktivierten NET-Formation involviert (Neubert et al. 2018).

Die Inhibitoren wurden außerdem einzeln und unabhängig von den eigentlichen Experimenten auf ihre Lichtstabilität getestet. In den Kontrollen ergaben sich keine Hinweise auf Reaktionen durch das Licht. Alle Inhibitoren waren auch nach der Test-Bestrahlung mit Licht dazu in der Lage, die PMA-aktivierte NET-Formation zu inhibieren.

### 3.6.1 NEC-1, Y27632 und iNE

Bei beiden Wellenlängen reduzierte iNE die NET-Formation nach Lichtaktivierung deutlich. Wie Abbildung 15 zeigt, verhindert der Inhibitor effektiv die Dekondensation des Chromatins, was schließen lässt, dass die Translokation von NE in den Zellkern während der Lichtaktivierung ein notwendiger Schritt zur weiteren Ausführung der NET-Formation ist.

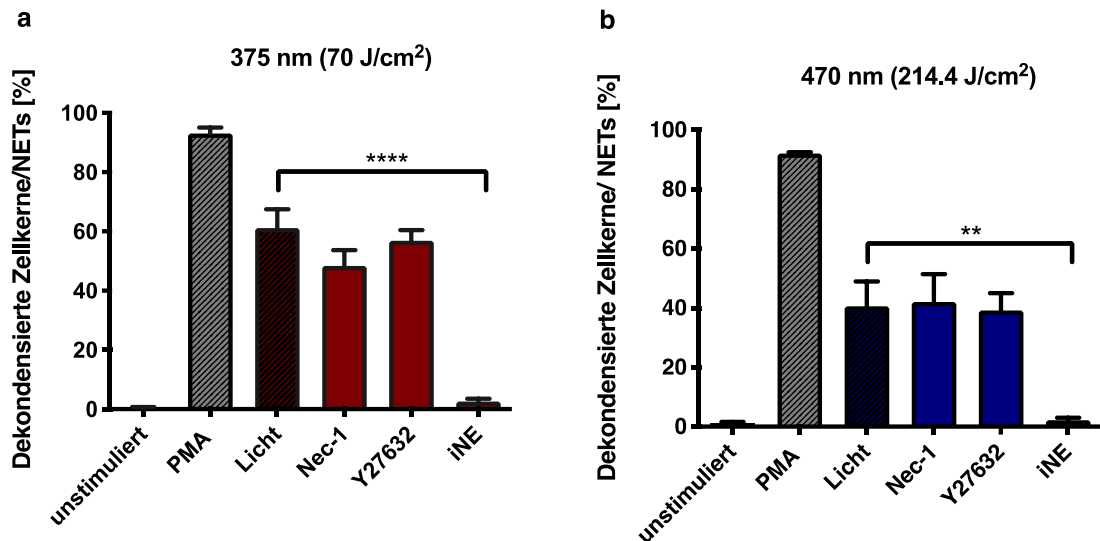


Abbildung 15: Inhibitorversuche mit iNE, Nec-1 und Y27632

Ergebnisse der Experimente mit folgenden Inhibitoren: Nec-1 inhibiert RIP-1 und ist damit assoziiert mit Nekroptose. Y27632-Dihydrochlorid ein Inhibitor der ROCK 1/2 und iNE als Inhibitor der neutrophilen Elastase. Die jeweiligen Endkonzentrationen betragen für Nec-1 50  $\mu$ M, für Y27632 20  $\mu$ M und für iNE 5  $\mu$ M. Dargestellt sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen ( $\pm$ SEM). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ , jeweils im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle und einer Positivkontrolle mit PMA.

Zum Ausschluss anderer Zelltodwege wie Nekroptose wurde der *receptor-interacting protein kinase 1 Inhibitor* Nec-1 eingesetzt, der in den Experimenten keinen Einfluss auf die Aktivierung der Zellen mit Licht erkennen ließ. Auch die Inhibition der erst kürzlich mit PMA-aktivierter NET-Formation in Zusammenhang gebrachten *Rho-associated coil kinase 1* und 2 beeinflusste die Dekondensation der Zellkerne nicht.

### 3.6.2 ABAH und Cl-Amidine

Die Inhibition von MPO beeinflusste die Dekondensation der Zellkerne nach Aktivierung mit beiden Wellenlängen. Der Inhibitor ABAH reduzierte die Aktivierung der Zellen nach der Bestrahlung um ca. 50 %. MPO wird bei der Dekondensation des Chromatins weniger ein enzymatischer als vielmehr ein allosterischer Effekt zugeschrieben, was vielleicht den relativ stärkeren Effekt der Inhibition von NE erklärt. Nichtsdestotrotz wurde die herausragende Bedeutung beider Enzyme für die NET-Formation und die spezifische Aktivierung durch Licht bestätigt (Abbildung 16).

Der Pan-PAD Inhibitor Cl-Amidine hatte einen geringeren Effekt. Die Zahl dekondensierter Zellkerne nach der Bestrahlung mit beiden Wellenlängen wurde um 20 – 25% reduziert. Dies lässt schlussfolgern, dass die Aktivität des PAD-Enzyms die Licht-induzierte NET-Formation verstärkt, die Reaktion jedoch nicht zu größeren Anteilen trägt (Abbildung 16).

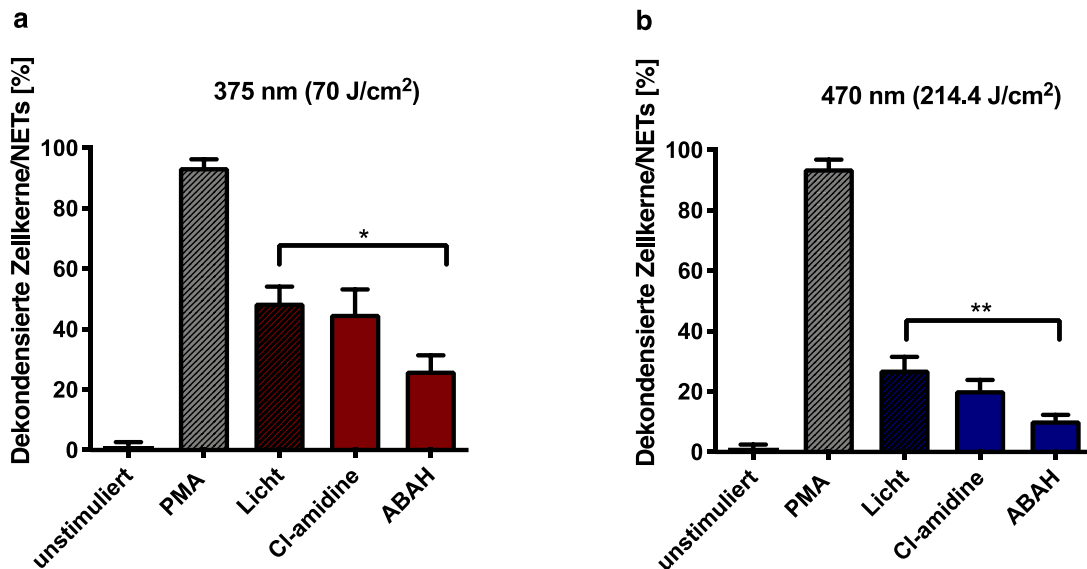


Abbildung 16: Inhibitorversuche mit ABAH und Cl-amidine

Inhibitortests mit Cl-Amidine als Inhibitor von PAD-4 und Aminobenzoesäure-Hydrazid (ABAH), einem Inhibitor der Myeloperoxidase. Endkonzentrationen der Inhibitoren waren für Cl-Amidine [100  $\mu$ M] und für ABAH [100  $\mu$ M]. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ( $\pm$ SEM). \* $p < 0,1$ ; \*\* $p < 0,01$ , jeweils im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

### 3.6.3 Zusammenfassung der Inhibitorexperimente

Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch UV-Licht hängt in hohem Maße von der Aktivität der Enzyme MPO und NE ab. Der Prozess scheint außerdem durch PAD-4 unterstützt zu werden, jedoch unabhängig von RIPK-1 und ROCK 1/2 abzulaufen.

## 3.7 Reaktive Sauerstoffspezies als potenzielle Reaktionsvermittler

Neben der erfolgreichen Aktivierung der NETose durch Licht galt unsere Aufmerksamkeit dem tieferen Verständnis eines möglichen, zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus.

Bei den Überlegungen zu möglichen reaktionsvermittelnden Stoffen schien die Involvierung von reaktiven Sauerstoffspezies eine plausible Möglichkeit. Reaktive Sauerstoffspezies sind wichtige Signalmoleküle bei biologischen Reaktionen (Mittal et al. 2014). Sie entstehen beispielsweise als Nebenprodukt der Zellatmung in den Mitochondrien sowie ebenfalls durch den Einfluss von UV-B-Strahlung durch Immunzellen wie neutrophile Granulozyten selbst (Clydesdale et al. 2001). Dieses System aus Sauerstoffradikalen und Antioxidantien unterliegt einem sensiblen Gleichgewicht, welches bei einer Auslenkung dramatische Folgen für den Organismus haben kann (Wagener et al. 2013). Die Aktivierung der PMA-aktivierten NETose durch reaktive Sauerstoffspezies wie  $H_2O_2$  ist bereits bekannt (Stoiber et al. 2015), sodass die reaktiven Moleküle auch hier im Versuchsaufbau näher betrachtet wurden.



Außerdem war die starke Abhängigkeit der Dekondensation der Zellkerne von spezifischen Wellenlängen des genutzten Lichts auffällig. So waren die für Vorexperimente getesteten längerwelligen LEDs auch trotz ausgiebiger Bestrahlungsdauer mit höherer Gesamtenergie nicht in der Lage, eine Aktivierung der Neutrophilen auszulösen (unveröffentlichtes Material). Die Übertragung von Lichtenergie auf Materie steht im Wechselspiel mit Absorption, Transmission und Streuung der bestrahlten Materie. Für jedes Molekül ergibt sich ein individueller Absorptions- sowie Streuungskoeffizient, der je nach energetischem Niveau variieren kann (Sandell und Zhu 2011). Da nur bestimmte Wellenlängen in den Experimenten effektiv waren, lag der Fokus im weiteren Verlauf auf Substanzen, die lichtreagibel und biologisch relevant waren sowie zusätzlich Absorptionsspektren in den entsprechenden Wellenlängen-Bereichen hatten. Bei der Analyse der Zusammensetzung des genutzten Mediums wurde folglich gezielt nach Molekülen gesucht, die diese Ansprüche erfüllten, hierzu zählten die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, vor allem jedoch das Vitamin Riboflavin.

Viele Substanzen, die in höheren Konzentrationen in der menschlichen Haut vorliegen, können Licht unterschiedlicher Wellenlängen im UV-Vis Bereich absorbieren und durch die folgende Reaktion einen Gewebsschaden katalysieren. Ein wichtiger Vertreter dieser sogenannten Photosensibilisatoren ist Riboflavin, auch bekannt als Vitamin B<sub>2</sub>, Lactoflavin oder ehemals Vitamin G (Cardoso et al. 2012). Umgangssprachlich auch als „Wachstumsvitamin“ bezeichnet, kommt Riboflavin in vielen Lebensmitteln wie Milch und Milchprodukten, aber auch grünem Gemüse wie Spargel, Spinat oder Brokkoli vor. Riboflavin ist außerdem in menschlichen Geweben mit permanenter Lichtexposition wie Haut und Augen zu finden und hat eine Vielzahl biologischer Funktionen. In seiner wohl prominentesten Rolle dient Riboflavin als Vorläufer für die Flavo-Koenzyme Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavin-Mononukleotid (FMN), die in Oxidoreduktasen wie der NADH-Dehydrogenase vorkommen. Damit hat Riboflavin eine große Bedeutung für das oxidative Gleichgewicht im menschlichen Organismus. Das Molekül kann durch die Absorption von Lichtstrahlung aus dem UV-A und blauen Spektrum mit den jeweiligen Absorptionsmaxima von 373 nm und 445 nm in einen höherenergetischen Zustand versetzt werden (Abbildung 17). In diesem Zustand kann Riboflavin direkt mit Sauerstoff oder mit anderen reaktiven Substanzen reagieren, was durch Redox-Reaktionen zur Entstehung sauerstoffhaltiger Radikale sowie radikaler Anionen führt. Diese können wiederum mit molekularem Sauerstoff zu Hydrogenperoxid oder Hydroxylradikalen reagieren.

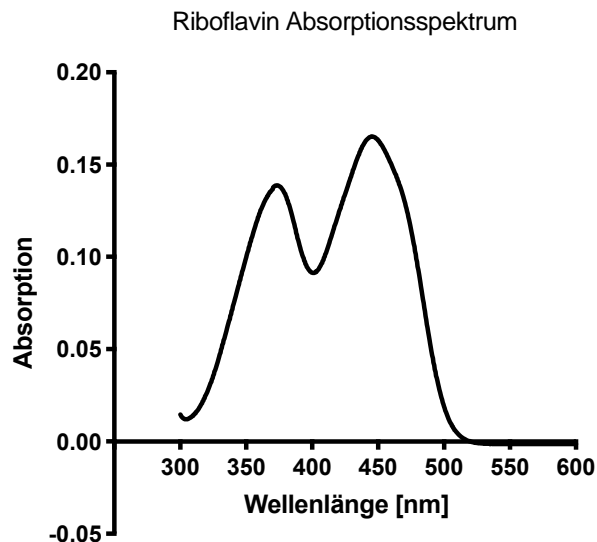


Abbildung 17: Absorptionsspektrum von Riboflavin

Absorptionsspektrum von Riboflavin in PBS, aufgenommen mithilfe eines UV-VIS-NIR Spektrometers (JASCO V-670) von Elsa Neubert und Daniel Meyer mit einer 10 mm Cuvette.

Um die Hypothese der Involvierung von Sauerstoffradikalen zu stützen, wurde in Kooperation mit dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Georg-August-Universität Göttingen ein entsprechender Versuchsaufbau konzipiert. So konnten Neutrophile mit Licht bestrahlt und anschließend mithilfe eines Mikroplatten-Lesegeräts sowie einer *Amplex Red*-Indikatorlösung die Konzentration von  $H_2O_2$  in verschiedenen experimentellen Konditionen über einen bestimmten Zeitraum verfolgt und miteinander verglichen werden.

Die Bestrahlung von Neutrophilen mit UV-A Licht führte zu einem massiven Anstieg an extrazellulären ROS auf ca.  $50 \mu M$  mit folgendem, konsekutivem Abfall der ROS Konzentration über die Zeit der Messung auf ca.  $30 \mu M$  (Abbildung 18). Eine Bestrahlung des Mediums allein zeigte einen ebenfalls starken Anstieg der ROS Konzentration auf bis zu über  $60 \mu M$  bei gleichbleibend hoher Konzentration der Radikale über die Zeit. Im Gegensatz hierzu konnte bei den Negativkontrollen, also den Zellen in Medium ohne jegliche Lichtbestrahlung, keine ROS Erhöhung gemessen werden. Die mit PMA aktivierten Zellen zeigten initial eine geringe Zunahme der ROS Konzentration, die mit der Zeit weiter Anstieg. Diese Beobachtung deckt sich mit bisherigen Beschreibungen (Björnsdóttir et al. 2015). Die Experimente wurden in unserem Standardmedium mit RPMI und HEPES ohne Phenolrot durchgeführt.

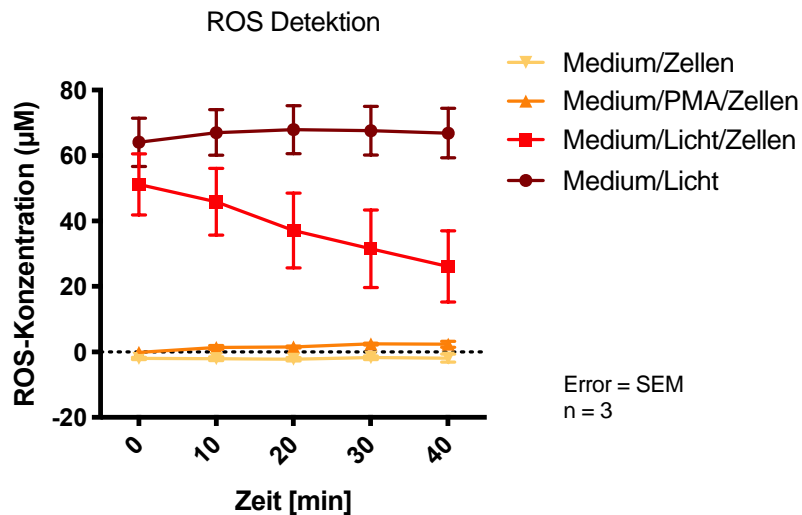


Abbildung 18: ROS Detektion unter verschiedenen Konditionen

Gemessene Konzentration von ROS unter verschiedenen Konditionen über einen Zeitraum von 40 Minuten. Die Inkubationen unstimulierter sowie mit PMA aktivierter Zellen in Medium zeigten keine Produktion von ROS. Bei der Bestrahlung von Zellen mit Licht gab es einen deutlichen Anstieg mit konsekutivem Abfall der ROS-Konzentration durch die puffernde Wirkung der Zellen. Bei der Bestrahlung des Mediums allein entstanden ebenfalls Sauerstoffspezies, jedoch in gleichbleibend hoher Konzentration.

Um ebenfalls die Wirkung des Riboflavins zu untersuchen, wurden Neutrophile wie zuvor durch die Bestrahlung mit Licht aktiviert und die Zusammensetzung des Kulturmediums insofern verändert. Die Zellen wurden zum Teil in reinem RPMI bestrahlt, daneben wurde unter folgenden Konditionen die Konzentration an Riboflavin erhöht und zuletzt fand eine Lichtaktivierung in unserem Standardmedium statt. Tatsächlich konnte durch die Zugabe von Riboflavin eine dramatisch gesteigerte Anzahl an NETs detektiert werden. Interessanterweise hatte die Zugabe von Hepes einen vergleichbaren Effekt (Abbildung 19)

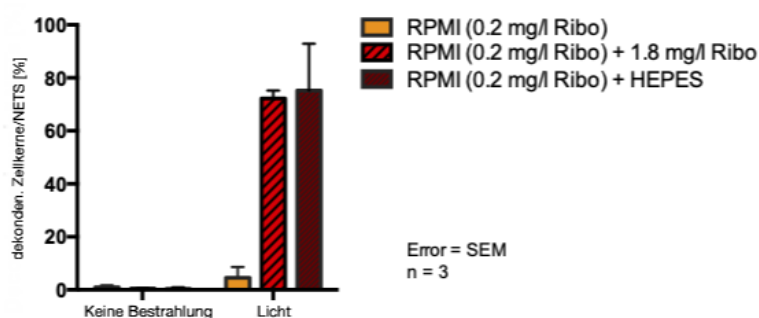
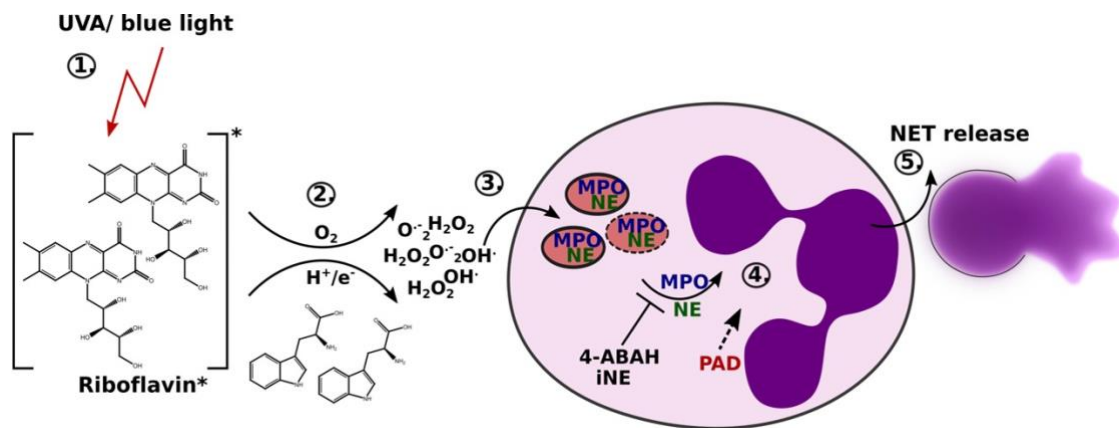


Abbildung 19: Beeinflussung der Lichtaktivierung von NETs durch das gewählte Medium

Prozentualer Anteil dekodensierter Zellkerne nach der Bestrahlung mit Licht bei unterschiedlichen Konditionen. Sowohl die Zugabe von einer höheren Menge Riboflavin als auch die Zugabe eines Hepes Puffers zeigten deutliche Effekte auf die Lichtaktivierung der neutrophilen Granulozyten.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse dieser letzten Experimente sowie das Absorptionsspektrum von Riboflavin die Hypothese, dass die Bestrahlung mit Licht zu einer Anregung lichtabsorbierender Stoffe wie Riboflavin führen könnte. Riboflavin könnte wiederum, im angeregten Zustand, mit weiteren biologischen Stoffen wie Tryptophan oder Tyrosin reagieren, wobei reaktive Sauerstoffspezies entstehen würden. Diese wären ihrerseits dazu befähigt, neutrophile Granulozyten zur NETose zu aktivieren. Dieser Prozess, wie in Abbildung 20 skizziert, könnte auch in der menschlichen Haut stattfinden.



**Abbildung 20: Potenzieller Mechanismus der Lichtaktivierten Freisetzung von NETs**

Schematische Darstellung eines potenziellen Mechanismus der lichtaktivierten NET-Freisetzung. Der Einfluss von UV-A / blauem Licht versetzt Riboflavin in einen angeregten Zustand, in dem bestimmte chemische Reaktion zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies wie  $H_2O_2$  führen. Die Wirkung dieser Radikale kann bei neutrophilen Granulozyten zur Formation von NETs führen. Abbildung von Elsa Neubert.

## 4 Diskussion

NETs hängen mit verschiedenen vaskulären sowie autoimmunen Krankheiten zusammen. Anerkannt und klinisch unumstritten ist zudem der schädliche Einfluss der UV-Strahlung des Sonnenlichts im Kontext einer Vielzahl entzündlicher und autoimmuner Erkrankungen. Das American College of Rheumatology (ACR) inkludierte „Photosensitivität“ von 1997 bis 2019 sogar als eines der Hauptkriterien zur Diagnosesicherung des systemischen Lupus erythematoses. Zum Erfüllen des Kriteriums reichte eine eigenanamnestisch berichtete „untypische“ Reaktion und die Entwicklung eines Hautausschlags nach Sonnenlicht-Exposition. Aufgrund dieser sehr unscharf definierten klinischen Merkmale und der zum Teil mit zeitlicher Verzögerung in Erscheinung tretenden Hautveränderungen blieb die Photosensitivität lange Zeit als Diagnosekriterium umstritten (Kim und Chong 2013). In den überarbeiteten ACR/EULAR Kriterien von 2019 wurde eine Lichtempfindlichkeit daher zugunsten besser objektivierbarer molekularer und klinischer Merkmale wieder fallen gelassen (Aringer 2019). In der Prävention und Therapie des systemischen sowie auch beim subakut-kutanen Lupus erythematoses, bei Rosacea, Lichturtikaria oder der polymorphen Lichtdermatose bleibt jedoch der konsequente Sonnenschutz eine essenzielle therapeutische Basismaßnahme.

Der Mechanismus, der bei diesen und anderen Krankheiten hinter den dermatologischen Veränderungen steht, ist bislang nicht hinreichend erforscht. Experimentell belegt wurden mehrfach entzündliche und immunologische Veränderungen in der menschlichen Haut als Reaktion auf eine Penetration von UV-Strahlung und sogar sichtbarem Licht durch die obersten Schichten der Epidermis (Clydesdale et al. 2001). Durch die *in-vitro*-Bestrahlung neutrophiler Granulozyten mit UV-B- und UV-C-Licht konnte aufgrund akkumulierender DNA- und Zellschädigungen Apoptose ausgelöst werden (Aragane et al. 1998; D’Orazio et al. 2013), eine Exposition mit UV-A Licht führte zusätzlich experimentell zu erhöhter Produktion reaktiver Sauerstoffradikale (Azzouz et al. 2018).

Die Beantwortung der Frage, ob NETose als direkte Reaktion auf UV-Strahlung induziert werden kann und welche Bedeutung dieser Vorgang in der Pathogenese der erwähnten Krankheiten einnimmt, sollte Ziel dieser Arbeit sein. Eine Eingliederung der Erkenntnisse in den aktuellen Forschungsstand und Ausweitung der Experimente mit Neutrophilen von erkrankten Patienten sowie in *in-vivo*-Experimenten könnte zukünftig ein wichtiges Bindeglied zwischen der Photosensitivität, der Entstehung von NETs und der Pathogenese autoimmuner Krankheiten darstellen. Im weiteren Verlauf könnte dies für Therapiezwecke und konkrete Behandlungsmaßnahmen genutzt werden, zum Verständnis dieser komplexen Krankheiten beitragen und die Bedeutung des Sonnenschutzes in Zeiten zunehmender UV-Intensitäten erneut unterstreichen.

#### 4.1 Die *in-vitro*-Entstehung von NETs durch Licht aus dem sichtbaren und ultravioletten Spektrum

Die Experimente konnten zeigen, dass durch die *in-vitro*-Bestrahlung von Neutrophilen gesunder Probanden mit Wellenlängen aus dem UV-A1-Bereich und Licht aus dem blauen Spektralbereich NETs entstehen. Die Bildung der NETs in diesem experimentellen Versuchsaufbau ging außerdem mit deutlich und stabil erhöhten Spiegeln von ROS einher. Erhöhte ROS-Konzentrationen konnten bis zu 30 Minuten nach der Lichtexposition gemessen werden. Bei der „klassischen“ NETose translozieren NE und MPO der azurophilen Granula in den Zellkern; sie sind unverzichtbar für die fortschreitende Dekondensation des Chromatins. Auch in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimenten zeigte sich eine Abhängigkeit der NETose von den besagten Schlüsselenzymen, wobei der Einfluss der NE im Vergleich zur MPO von höherer Signifikanz zu sein scheint. Auch die Inhibition von PAD-Enzymen durch Cl-Amidine während der Bestrahlung führte zu signifikanter Reduktion der NETose, was ebenfalls einen funktionellen Zusammenhang suggeriert.

Interessanterweise wurde kürzlich die Bildung von NETs als Reaktion auf Infrarotlicht (980 nm) beschrieben, hierbei konnte eine Aktivierung des Autophagie-Signalwegs beobachtet werden (Migliario et al. 2018). Obwohl NETs unter bestimmten experimentellen Konditionen die Wundheilung beeinträchtigen können (Avci et al. 2013), wurde durch die Bestrahlung mit diesem Infrarotlaser eine explizite Verbesserung der Wundheilung durch die licht-aktivierten NETs beobachtet. Jedoch blieb auch in diesen Experimenten der Wirkungsmodus des Laserlichts unklar. Auch die Frage, ob Autophagie in dem hier beschriebenen Mechanismus von weiterer Bedeutung ist bleibt letztendlich zu klären.

Eine weitere Studie bewies, dass UV-C-Licht dosisabhängig Apoptose und/oder NOX-unabhängige, suizidale NETose induzieren kann (Azzouz et al. 2018). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass hoch energetisches UV-C-Licht, abhängig von mitochondrialen ROS und der Aktivierung der p38 MAP-Kinase, NETose auslöst. Die UV-C-abhängige NETose war durch biochemische Eigenschaften, die bislang nur im Zusammenhang mit Apoptose bekannt waren, gekennzeichnet. Daher wurde der Begriff „ApoNETosis“ geprägt (Brinkmann et al. 2010). Allerdings wird UV-C-Licht zu fast 100 % durch die Ozonschicht absorbiert und kommt daher praktisch nicht auf der Erdoberfläche an (Gueymard et al. 2002). Auch wenn künstliche Lichtquellen durchaus UV-C-Licht produzieren, ist zusätzlich die Eindringtiefe dieser kurzwelligen Strahlung in die menschliche Haut sehr gering (s. Abb. 4). Dementsprechend kann die physiologische Relevanz der UV-C-induzierten NETose kritisch hinterfragt werden; für weitere mechanistische *ex vivo*-Studien an neutrophilen Granulozyten und Licht könnte sie jedoch von Interesse sein.

Der Mechanismus der Licht-abhängigen NETose ist, ähnlich wie „ApoNETosis“, NOX-unabhängig. Ob die Aktivierung der Zellen zur NETose durch UV-A und blaues Licht ebenfalls vornehmlich durch mitochondriale ROS induziert wird, sowie im Rahmen der UV-

C-Aktivierung beobachtet, konnte in folgenden Experimenten in unserer Arbeitsgruppe, die nicht mehr Teil dieser Dissertation sind, nicht bestätigt werden. Vielmehr imponierte ein Überwiegen von extrazellulären ROS.

Zusammengenommen lässt sich anhand der Bedeutung von NE, MPO und PAD-Enzymen vermuten, dass die lichtabhängige Form der NETose im klassischen und detailliert beschriebenen Weg der suizidalen NETose gipfelt (Papayannopoulos et al. 2010).

## **4.2 Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies als Reaktionsvermittler**

Nach der Bestrahlung mit UV-A- und blauem Licht wurde eine für mindestens 30 Minuten stabil erhöhte Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies sowohl im bestrahlten Medium als auch in der mit Zellen versetzten Lösung festgestellt. Die genutzten Medien enthielten mehrere lichtempfindliche Substanzen, wie Riboflavin und Aminosäuren wie Tryptophan oder Tyrosin. In weiterführenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe zu diesem Thema, die nicht mehr Teil dieser Dissertation waren, konnte eine Auswirkung der spezifischen Zusammensetzung des Mediums beobachtet werden. So führte eine Reduktion des Riboflavins zu deutlichen Einschränkungen in der Entstehung der NETs, im Umkehrschluss wurde bei zunehmenden Konzentrationen eine Steigerung der NETose-Rate beobachtet (Neubert et al. 2019). Zusammenfassend implizieren diese Ergebnisse die Entstehung extrazellulärer ROS durch die Anregung lichtempfindlicher Substanzen wie Riboflavin und die folgende Reaktion mit weiteren Substanzen wie Tryptophan oder Tyrosin. Das lipophile  $H_2O_2$  kann durch Zellwände diffundieren und könnte die Freisetzung von Serin-Proteasen wie NE und MPO aus den azurophilen Granula der Neutrophilen bewirken. Folglich wäre die zusätzliche ROS-Produktion durch NADPH-Oxidase nicht notwendig, was sich mit der Beobachtung deckt, dass die Licht-induzierte NETose unabhängig von NADPH ablaufen kann.

In einem gesunden menschlichen Organismus unterliegt die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies einem sensiblen Gleichgewicht, reguliert durch enzymatische und nicht-enzymatische anti-oxidative Systeme. Hierzu gehört beispielsweise die Glutathion-Peroxidase, die Katalase, Vitamin C oder Vitamin E. Da in der menschlichen Haut und in unserem Medium eine signifikante Konzentration von Riboflavin vorhanden ist, könnte hier durchaus eine Interaktion mit der UV-Strahlung entstehen. Riboflavin würde hierbei durch die Lichtenergie in einen angeregten Zustand überführt werden, in dem es mit weiteren Substanzen wie beispielsweise den Aminosäuren Tryptophan oder Tyrosin reagieren kann, was zur Produktion von ROS führen würde (Cardoso et al. 2012; Shen et al. 2017). In ausbalancierten, gesunden Systemen würden solche Reaktionen durch die oben genannten antioxidativen Systeme abgefangen werden. In vielen Situationen, wie beispielsweise bei Entzündungen, chronischen Erkrankungen oder Tumorleiden, kann dieses empfindliche Gleichgewicht jedoch gestört sein. Auch die übermäßige Exposition mit Sonnenlicht führt zu deutlich erhöhten Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies und ist assoziiert mit

entzündlichem Gewebsschaden, sogar bei sonst gesunden Individuen (Wagener et al. 2013). Dieser ROS-assoziierte, oxidative Gewebsschaden ist zumeist durch UV-A-Licht verursacht. Interessanterweise kommt es bei Autoimmunkrankheiten zu erhöhten extrazellulären Spiegeln reaktiver Sauerstoffspezies. Das empfindliche Gleichgewicht der kurzlebigen Moleküle ist zugunsten eines oxidativen Übergewichts verschoben und resultiert in Gewebsschäden mit modifizierten Proteinen oder Lipiden, DNA-Schädigungen und einer fortschreitenden Aktivierung des Immunsystems (Glennon-Alty et al. 2018). Dieses Ungleichgewicht lässt sich sowohl anhand erniedrigter antioxidativer Systeme sowie mithilfe erhöhter Antikörpertiter gegen oxidativ modifizierte Proteine messen (Shah et al. 2014). Tatsächlich reagieren neutrophile Granulozyten von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses auch mit einem deutlich stärkeren „oxidativen Burst“ bei gleichzeitig erniedrigten intrazellulären anti-oxidativen Systemen (Li et al. 2012).

Zusätzlich ist die Tendenz der neutrophilen Granulozyten von Patienten mit Lupus erythematoses, im Rahmen einer Abwehrreaktion NETs zu generieren, stärker ausgeprägt, als die der Zellen gesunder Teilnehmender (Villanueva et al. 2011; Hu et al. 2016). Im Extrazellulärraum scheinen die Bestandteile der NETs als Antigen zu dienen und damit zur Entstehung von Autoantikörpern beizutragen (Sollberger et al. 2018). So wurden Autoantikörper gegen NET Bestandteile im Serum von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses detektiert (Carmona-Rivera und Kaplan 2013). Auch eine unvollständige Beseitigung der Bestandteile der NETs durch entsprechende Enzyme wurde im Rahmen der Krankheitsentstehung von Lupus erythematoses erwähnt. Die nicht degradierten Anteile der NETs wie dekondensiertes Chromatin und Histone können im Extrazellulärraum akkumulieren und stellen hier die Entstehung der Autoantikörper fördern (Hakim et al. 2010). Wahrscheinlich spielen beide Sachverhalte bei der Pathogenese der Erkrankung in betroffenen Individuen eine Rolle und führen gemeinsam zu einem sich verstärkenden Kreislauf der ROS-vermittelten Entzündungsreaktion. Inwiefern auch die Licht-induzierte Variante der NETose zu diesen Mechanismen beiträgt, gilt es in weiteren *in-vivo*-Experimenten zu untersuchen.

Manche Autoimmunkrankheiten sind durch eine reproduzierbare Photosensitivität gekennzeichnet. Neben dermatologischen Symptomen konnten bei Patienten mit Lupus erythematoses nach der Exposition mit Sonnenlicht auch systemische Reaktionen festgestellt werden, beispielsweise *Fatigue* oder Gelenkschmerzen (Kim und Chong 2013). Der exakte pathophysiologische Zusammenhang dieser Beobachtung wurde bislang experimentell nicht nachvollzogen, umfasst jedoch sicherlich ein komplexes Zusammenspiel mehrerer, lichtinduzierter biologischer Effekte. Die Reaktion des Organismus auf Sonnenlicht wird nicht monokausal mit der Aktivierung neutrophiler Granulozyten zu erklären sein. Bedenkt man jedoch die herausragende Rolle der NETs für diese und weitere autoimmune Krankheiten, erscheint es durchaus plausibel, dass die abnorme Reaktion der Zellen in einem wichtigen Zusammenhang mit der Krankheitsentstehung und Exazerbation



steht. Ob nun eine grundlegende Abnormalität neutrophiler Granulozyten von Patienten mit Lupus erythematoses vorliegt, die zu verstärkter Produktion der NETs führt und ob es weiterhin eine pharmakologische Möglichkeit gibt, diese überschießende Reaktion zu verhindern, gilt es in weiteren Experimenten zu untersuchen. Auch die Frage, in welchem Ausmaß die Licht-induzierten NETs als Ursache der Entstehung von Autoantikörpern dienen, bedarf weiterer Nachforschungen.

Möglicherweise entstehen NETs als Reaktion auf moderate Lichtdosen nicht oder nur in geringem Maße und entstandene NETs werden in gesunden Individuen rasch durch natürliche Schutzmechanismen wie DNAsen und Phagozyten abgebaut (Farrera und Fadeel 2013; Kolaczowska et al. 2015). Dementsprechend erscheint es unwahrscheinlich, dass eine Exposition mit moderaten Lichtdosen bei gesunden Individuen zu einer pathologischen Entzündungsreaktion führen würde.

Im Umkehrschluss käme auch eine Instrumentalisierung der lichtinduzierten, ROS-vermittelten NETose zur Therapie bakterieller Erkrankungen in Frage, da in diesem Fall die positiven, antibakteriellen Eigenschaften der NETs zum Tragen kämen. Dies konnte vor kurzem durch beeindruckende Ergebnisse im Zusammenhang mit bakterieller Keratitis gezeigt werden. Hierzu wurde die Kombination aus UV-A-Strahlung und Riboflavin als "photochemische", bakterizide Therapie der bakteriellen Keratitis verwendet (Makdoui et al. 2012).

Spekulationen im Rahmen dieser neuen Erkenntnisse mögen soweit gehen, dass die Licht-induzierte NETose vielleicht sogar eine Teilerklärung der Wirkung der photodynamischen Therapie liefert. Die Bestrahlung mit sichtbarem Licht, insbesondere solches aus dem roten und blauen Spektrum, wird in Kombination mit topischen Photosensibilisatoren wie Aminolävulinsäure (ALA) oder Methyl-Aminolävulinat (MAL) bereits lange zur Therapie des Basalzellkarzinoms, des M. Bowen sowie aktinischer Keratose genutzt (Wan und Lin 2014). Der zugrundeliegende Mechanismus beinhaltet die Anregung photosensitiver Moleküle mit resultierender ROS Produktion. Damit zeigt dieser Mechanismus deutliche Parallelen zu unseren Überlegungen. Ob es in diesem Zusammenhang ebenfalls zur Entstehung von NETs kommt, wurde bislang nicht erforscht.

### 4.3 Übertragung der Ergebnisse in einen realistischen Kontext

Die Entstehung von NETs wurde nach einer Bestrahlung mit  $18 \text{ J/cm}^2$  bei einer Wellenlänge mit 375 nm Maximum sowie bei  $54 \text{ J/cm}^2$  bei einer Wellenlänge von 470 nm Maximum beobachtet. Diese Lichtdosen entsprächen, in einem fiktiven Modell, einer ca. 40-stündigen Sonnenlichtexposition bei 375 nm Wellenlänge und ca. 9 Stunden Sonnenbad im 470 nm Lichtspektrum. Demzufolge sind die Ergebnisse nicht direkt als realistisches Modell übertragbar, da eine Sonnenlichtexposition in diesem zeitlichen Umfang nicht natürlich stattfindet und zudem nicht auf spezifische enge Spektren reduziert ist. Vielmehr kommt im

natürlichen Umfeld in unterschiedlichen Intensitäten das gesamte Wellenlängenspektrum des sichtbaren und UV-Lichts zum Tragen. Zudem spielen Faktoren wie die individuelle Hautdicke des bestrahlten Areals oder die entsprechende Dicke der Ozonschicht und damit die Strahlenexposition auf der Erdoberfläche wichtige Rollen. Auch die aktuelle Wetterlage, der Winkel, in dem die Strahlung auf der Haut auftrifft und damit die jeweilige Tages- sowie Jahreszeit beeinflussen die Intensität einer möglichen Lichtexposition der Neutrophilen in der menschlichen Haut massiv (Gueymard et al. 2002). Die Eindringtiefe der Lichtstrahlen hängt von vielen externen und internen Faktoren wie der lokalen Zusammensetzung der bestrahlten Hautstelle ab. Schätzungsweise erreichen 10–15 % des UV-A-Lichts und ca. 40–50 % des blauen Lichts das Stratum papillare der Dermis (Anderson und Parrish 1981; Svobodová und Vostálová 2010). In einem physiologischen Zustand befinden sich neutrophile Granulozyten in nicht entzündlich-veränderter Haut frühestens in dem arterio-venösen Gefäßplexus des Stratum papillare der Dermis (Swerlick 1997).

Für Patienten, die eine generell erhöhte Neigung zur Bildung von NETs in entzündlichen Situationen haben, könnte diese Licht-induzierte Bildung von größerer Bedeutung sein als für Patienten, bei denen vordringlich andere Abwehrmechanismen zum Tragen kommen.

Außerdem besteht die Möglichkeit eines stärkeren Einflusses der Lichtstrahlung auf Zellen, wenn sich diese aufgrund stattgefundener entzündlicher lokaler Veränderungen bereits in oberflächlicheren Schichten der menschlichen Haut befinden. Tatsächlich gehen entzündliche Hauterkrankungen mit Vasodilatation, perivaskulärem Entzündungsinfiltrat und bei chronischen Situationen sogar mit Neoangiogenese einher. In vielen Fällen bedeuten diese entzündlichen Veränderungen auch eine stärkere Infiltration der oberen Hautschichten mit neutrophilen Granulozyten, was wiederum die Entstehung von NETs begünstigen könnte. Interessanterweise scheint insbesondere die Exposition der Haut mit Strahlung aus dem UV-B Bereich zu stärkerer Rekrutierung von Neutrophilen in die oberen Hautschichten zu führen (Lee et al. 2008). Ein Erklärungsansatz für diese Beobachtung beschreibt, dass die Rekrutierung der Neutrophilen insbesondere durch Zytokine wie IL-8 und TNF-alpha stattfindet, welche wiederum von Fibroblasten oder Keratinozyten produziert werden, die ihrerseits auf die UV-B-Bestrahlung reagieren (Bashir et al. 2009).

Zusammengefasst konnte ein Zusammenhang zwischen sichtbarem Licht aus dem blauen Spektralbereich und UV-A-Strahlung mit einer NE-, MPO- und PAD-abhängigen NET-Bildung neutrophiler Granulozyten gesunder Probanden gezeigt werden. Dieser Zusammenhang könnte zum Verständnis der Pathogenese verschiedener lichtsensitiver Autoimmunkrankheiten beitragen, insbesondere des systemischen Lupus erythematoses.

## 5 Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten sind ein unverzichtbarer Teil des angeborenen Immunsystems und häufig die erste Form der Abwehr gegen Pathogene. Sie besitzen verschiedene Möglichkeiten zur Bekämpfung schädigender Mikroorganismen. Eine verhältnismäßig neue Art der Immunabwehr ist die Bildung von NETs. Viele unterschiedliche Substanzen können Granulozyten dergestalt aktivieren, dass das Chromatin der Zellen decondensiert, die Granula aufgelöst werden und letztlich ein netzartiges Gebilde aus Zellbestandteilen nach extrazellulär befördert wird. Hiermit werden die Mikroorganismen fixiert, ihre Ausbreitung im Wirtsorganismus wird verhindert und durch eine lokal hohe Konzentration bakterizider Substanzen tragen die NETs zur Elimination bei.

Dieser Abwehrmechanismus der Neutrophilen wurde in den letzten Jahren ausführlich erforscht und seine Bedeutung für die Bekämpfung pathogener Erreger überzeugend belegt. Allerdings stehen übermäßige Entstehung der NETs oder gestörte Degradierung des Chromatins auch im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten. Dazu gehören thromboembolische Erkrankungen, autoinflammatorische und autoimmune Krankheiten sowie auch maligne Tumoren.

Autoimmunkrankheiten liegen pathologisch fehlregulierte Immunreaktionen zugrunde. Es kommt zur „Autoreaktivität“, bei der Antikörper und/oder Immunzellen körpereigene Strukturen schädigen. Zu diesen Krankheiten gehören Dermatomyositis, rheumatoide Arthritis sowie systemischer Lupus erythematoses. Die Therapie vieler dieser Krankheiten ist oft auch deshalb schwierig, weil ihre Pathogenese noch nicht ausreichend geklärt wurde. Verschiedene Ursachen und Auslöser, im Wesentlichen genetische und Umweltfaktoren, bewirken den Ausbruch der Krankheit. Zu letzteren Faktoren gehört manchmal auch der Einfluss von Sonnenlicht.

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen ultraviolettem (UV) und sichtbarem Licht mit der Entstehung von NETs untersucht. Dazu wurden neutrophile Granulozyten gesunder Probanden mit sichtbarem oder UV-Licht definierter Intensitäten und Wellenlängen bestrahlt. Die morphologischen Veränderungen der Zellen durch die Bestrahlung konnten zur Quantifizierung der NET-Bildung genutzt werden. Um nachzuweisen, dass es sich tatsächlich um NETs handelt, wurden auch Experimente mit spezifischen NETose-Inhibitoren durchgeführt. Zusätzlich wurden NET-spezifische Enzyme nach der Licht-Aktivierung durch Immunfluoreszenz-Färbungen nachgewiesen.

Mithilfe der dargestellten Experimente konnte ein signifikanter und reproduzierbarer Zusammenhang zwischen Licht bestimmter Wellenlängen und der NET-Bildung neutrophiler Granulozyten aufgezeigt werden. So fand sich eine Wellenlängen-spezifische sowie Dosierungs-abhängige Zunahme der Dekondensation des Chromatins der Zellen. Durch Zugabe spezifischer NET-Inhibitoren (iNE, ABAH) wurden die entsprechenden Zellveränderungen durch die Bestrahlung unterbunden. Der

Immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis der orthotopen Expression von NE und MPO bestätigte die NET-Bildung. Nach weiteren Überlegungen zu möglichen molekularen Reaktionsvermittlern konnte mithilfe einer Indikatorlösung die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies nachgewiesen werden. Der Verdacht, dass diese Substanzen als Reaktionsvermittler dienen könnten, ist in Anbetracht derzeitiger Erkenntnisse sehr wahrscheinlich, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zur wissenschaftlichen Untermauerung der klinischen Beobachtung, dass Patientinnen und Patienten mit verschiedenen Autoimmun-Krankheiten lichtempfindlich sind, bei. Licht kann unter geeigneten Bedingungen die NETose neutrophiler Granulozyten induzieren. Diese Erkenntnisse zeigen ein neues Element in der Pathogenese-Kaskade dieser Krankheiten auf.



## 6 Literaturverzeichnis

- Anderson RR, Parrish JA (1981): The optics of human skin. *J Invest Dermatol* 77, 13–19
- Aragane Y, Kulms D, Metze D, Wilkes G, Pöppelmann B, Luger TA, Schwarz T (1998): Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* 140, 171–182
- Aringer M (2019): EULAR/ACR classification criteria for SLE. *Semin Arthritis Rheum* 49, S14–S17
- Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, Hamblin MR (2013): Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg* 32, 41–52
- Azzouz D, Khan MA, Swezey N, Palaniyar N (2018): Two-in-one: UV radiation simultaneously induces apoptosis and NETosis. *Cell Death Discov* 4, 51
- Baldermann C, Lorenz S (2019): UV-Strahlung in Deutschland: Einflüsse des Ozonabbaus und des Klimawandels sowie Maßnahmen zum Schutz der Bevölkerung. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 62, 639–645
- Bardoel BW, Kenny EF, Sollberger G, Zychlinsky A (2014): The balancing act of neutrophils. *Cell Host Microbe* 15, 526–536
- Barnado A, Crofford LJ, Oates JC (2016): At the Bedside: Neutrophil extracellular traps (NETs) as targets for biomarkers and therapies in autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 99, 265–278
- Bashir MM, Sharma MR, Werth VP (2009): TNF-alpha production in the skin. *Arch Dermatol Res* 301, 87–91
- Belizário J, Vieira-Cordeiro L, Enns S (2015): Necroptotic Cell Death Signaling and Execution Pathway: Lessons from Knockout Mice. *Mediators Inflamm* 2015, 128076
- Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, Reichenbach J (2009): Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* 114, 2619–2622
- Bicker KL, Thompson PR (2013): The protein arginine deiminases: Structure, function, inhibition, and disease. *Biopolymers* 99, 155–163
- Björnsdóttir H, Welin A, Michaëlsson E, Osla V, Berg S, Christenson K, Sundqvist M, Dahlgren C, Karlsson A, Bylund J (2015): Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 89, 1024–1035
- Bonilla MC, Fingerhut L, Alfonso-Castro A, Mergani A, Schwennen C, von Köckritz-

- Blickwede M, de Buhr N (2020): How Long Does a Neutrophil Live?-The Effect of 24 h Whole Blood Storage on Neutrophil Functions in Pigs. *Biomedicines* 8, 278
- Borregaard N, Kjeldsen L, Rygaard K, Bastholm L, Nielsen MH, Sengeløv H, Bjerrum OW, Johnsen AH (1992): Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils. *J Clin Invest* 90, 86–96
- Brenner M, Hearing VJ (2008): The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol* 84, 539–549
- Brinkmann V, Zychlinsky A (2007): Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* 5, 577–582
- Brinkmann V, Zychlinsky A (2012): Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 198, 773–783
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004): Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535
- Brinkmann V, Laube B, Abu Abed U, Goosmann C, Zychlinsky A (2010): Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J Vis Exp* 36, 1724
- Cardoso DR, Libardi SH, Skibsted LH (2012): Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. *Food Funct* 3, 487–502
- Carmona-Rivera C, Kaplan MJ (2013): Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol* 35, 455–463
- Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G (2004): Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23, 2825–2837
- Clydesdale GJ, Dandie GW, Muller HK (2001): Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol Cell Biol* 79, 547–568
- Dąbrowska D, Jabłońska E, Garley M, Ratajczak-Wrona W, Iwaniuk A (2016): New Aspects of the Biology of Neutrophil Extracellular Traps. *Scand J Immunol* 84, 317–322
- de Gruijl FR (1996): Photobiology of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol* 63, 372–375
- Del Olmo-Aguado S, Núñez-Álvarez C, Osborne NN (2016): Blue Light Action on Mitochondria Leads to Cell Death by Necroptosis. *Neurochem Res* 41, 2324–2335
- Denton D, Kumar S (2019): Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ* 26, 605–616
- D’Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T (2013): UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci* 14, 12222–12248

- Douda DN, Khan MA, Grasemann H, Palaniyar N (2015): SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 2817–2822
- Erpenbeck L, Schön MP (2017): Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene* 36, 2483–2490
- Farrera C, Fadeel B (2013): Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J Immunol* 191, 2647–2656
- Frasch SC, Nick JA, Fadok VA, Bratton DL, Worthen GS, Henson PM (1998): p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils. *J Biol Chem* 273, 8389–8397
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A (2007): Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176, 231–241
- Fuchs TA, Brill A, Wagner DD (2012): Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 1777–1783
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, et al. (2012): Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19, 107–120
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, et al. (2018): Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25, 486–541
- Glennon-Alty L, Hackett AP, Chapman EA, Wright HL (2018): Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease. *Free Radic Biol Med* 125, 25–35
- Glick D, Barth S, Macleod KF (2010): Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 221, 3–12
- Gottlieb Y, Elhasid R, Berger-Achituv S, Brazowski E, Yerushalmy-Feler A, Cohen S (2018): Neutrophil extracellular traps in pediatric inflammatory bowel disease. *Pathol Int* 68, 517–523
- Gray RD, Lucas CD, MacKellar A, Li F, Hiersemenzel K, Haslett C, Davidson DJ, Rossi AG (2013): Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps. *J Inflamm (Lond)* 10, 12
- Gueymard CA, Myers D, Emery K (2002): Proposed reference irradiance spectra for solar



energy systems testing. *Solar Energy* 73, 443–467

Ha RY, Nojima K, Adams WPJ, Brown SA (2005): Analysis of facial skin thickness: defining the relative thickness index. *Plast Reconstr Surg* 115, 1769–1773

Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A (2010): Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 9813–9818

Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, Hess S, Prinz H, Zychlinsky A, Waldmann H (2011): Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol* 7, 75–77

Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998): Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92, 3007–3017

Hoffmann K, Sperling K, Olins AL, Olins DE (2007): The granulocyte nucleus and lamin B receptor: avoiding the ovoid. *Chromosoma* 116, 227–235

Hörner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA (2004): [Role of the innate immune response in sepsis]. *Anaesthesist* 53, 10–28

Hu SC S, Yu H S, Yen F L, Lin C L, Chen G S, Lan C-CE (2016): Neutrophil extracellular trap formation is increased in psoriasis and induces human  $\beta$ -defensin-2 production in epidermal keratinocytes. *Sci Rep* 6, 31119

Itakura A, McCarty OJT (2013): Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neutrophil extracellular traps via regulation of autophagy. *Am J Physiol Cell Physiol* 305, C348-354

Jog NR, Caricchio R (2014): The role of necrotic cell death in the pathogenesis of immune mediated nephropathies. *Clin Immunol* 153, 243–253

Kakasheva-Mazhenkovska L, Milenkova L, Kostovska N, Gjokik G (2011): Histomorphometrical characteristics of human skin from capillitium in subjects of different age. *Prilozi* 32, 105–118

Kaplan MJ (2011): Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nat Rev Rheumatol* 7, 691–699

Kavelaars A, Vroon A, Raatgever RP, Fong AM, Premont RT, Patel DD, Lefkowitz RJ, Heijnen CJ (2003): Increased acute inflammation, leukotriene B<sub>4</sub>-induced chemotaxis, and signaling in mice deficient for G protein-coupled receptor kinase 6. *J Immunol* 171, 6128–6134

Kenny EF, Herzig A, Krüger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR, Brinkmann V, Bernuth H von, Zychlinsky A (2017): Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife* 6, e24437

- Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne H-J, Brinkmann V, Jenne DE (2009): Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 15, 623–625
- Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, Friday S, Li S, Patel RM, Subramanian V, et al. (2013): NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 5, 178ra40
- Kim A, Chong BF (2013): Photosensitivity in cutaneous lupus erythematosus. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 29, 4–11
- Knight JS, Subramanian V, O'Dell AA, Yalavarthi S, Zhao W, Smith CK, Hodgins JB, Thompson PR, Kaplan MJ (2015): Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice. *Ann Rheum Dis* 74, 2199–2206
- Kolaczowska E, Jenne CN, Surewaard BGJ, Thanabalasuriar A, Lee W-Y, Sanz M-J, Mowen K, Opdenakker G, Kubes P (2015): Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat Commun* 6, 6673
- Kötter T, da Costa BR, Fässler M, Blozik E, Linde K, Jüni P, Reichenbach S, Scherer M (2015): Metamizole-associated adverse events: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 10, e0122918
- Lee Keum Hwa, Kronbichler A, Park DD-Y, Park Y, Moon H, Kim Hyungdo, Choi JH, Choi Y, Shim S, Lyu IS, et al. (2017): Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Autoimmun Rev* 16, 1160–1173
- Lee PL, van Weelden H, Bruijnzeel PLB (2008): Neutrophil infiltration in normal human skin after exposure to different ultraviolet radiation sources. *Photochem Photobiol* 84, 1528–1534
- Li K-J, Wu C-H, Hsieh S-C, Lu M-C, Tsai C-Y, Yu C-L (2012): Deranged bioenergetics and defective redox capacity in T lymphocytes and neutrophils are related to cellular dysfunction and increased oxidative stress in patients with active systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2012, 548516
- Makdoui K, Mortensen J, Sorkhabi O, Malmvall B-E, Crafoord S (2012): UVA-riboflavin photochemical therapy of bacterial keratitis: a pilot study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 250, 95–102
- Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA (2014): The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol* 9, 181–218
- McCracken JM, Allen L-AH (2014): Regulation of human neutrophil apoptosis and

lifespan in health and disease. *J Cell Death* 7, 15–23

Mesa MA, Vasquez G (2013): NETosis. *Autoimmune Dis* 2013, 651497

Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, Wahn V, Papayannopoulos V, Zychlinsky A (2011): Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 117, 953–959

Migliario M, Tonello S, Rocchetti V, Rizzi M, Renò F (2018): Near infrared laser irradiation induces NETosis via oxidative stress and autophagy. *Lasers Med Sci* 33, 1919–1924

Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB (2014): Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* 20, 1126–1167

Moquin D, Chan FK-M (2010): The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. *Trends Biochem Sci* 35, 434–441

Neubert E, Meyer D, Rocca F, Günay G, Kwaczala-Tessmann A, Grandke J, Senger-Sander S, Geisler C, Egner A, Schön MP, et al. (2018): Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. *Nat Commun* 9, 3767

Neubert E, Bach KM, Busse J, Bogeski I, Schön MP, Kruss S, Erpenbeck L (2019): Blue and Long-Wave Ultraviolet Light Induce in vitro Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation. *Front Immunol* 10, 2428

Nguyen GT, Green ER, Mecsas J (2017): Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 373

Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A (2010): Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 191, 677–691

Parker H, Winterbourn C (2013): Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Front Immunol* 3, 424

Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JAM, Tesselaar K, Koenderman L (2010): In vivo labeling with  $^2\text{H}_2\text{O}$  reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116, 625–627

Pilszczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FHY, Surette MG, Sugai M, et al. (2010): A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 185, 7413–7425

Radic M, Marion TN (2013): Neutrophil extracellular chromatin traps connect innate immune response to autoimmunity. *Semin Immunopathol* 35, 465–480

Rohrbach AS, Slade DJ, Thompson PR, Mowen KA (2012): Activation of PAD4 in NET

formation. *Front Immunol* 3, 360

Sandby-Møller J, Poulsen T, Wulf HC (2003): Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits. *Acta Derm Venereol* 83, 410–413

Sandell JL, Zhu TC (2011): A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT. *J Biophotonics* 4, 773–787

Shah D, Mahajan N, Sah S, Nath SK, Paudyal B (2014): Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci* 21, 23

Shen H, Liu C, Zhang D, Yao X, Zhang K, Li H, Chen G (2017): Role for RIP1 in mediating necroptosis in experimental intracerebral hemorrhage model both in vivo and in vitro. *Cell Death Dis* 8, e2641

Skinner BM, Johnson EEP (2017): Nuclear morphologies: their diversity and functional relevance. *Chromosoma* 126, 195–212

Söderlin MK, Kautiainen H, Puolakkainen M, Hedman K, Söderlund-Venermo M, Skogh T, Leirisalo-Repo M (2003): Infections preceding early arthritis in southern Sweden: a prospective population-based study. *J Rheumatol* 30, 459–464

Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A (2018): Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. *Dev Cell* 44, 542–553

Sørensen OE, Clemmensen SN, Dahl SL, Østergaard O, Heegaard NH, Glenthøj A, Nielsen FC, Borregaard N (2014): Papillon-Lefèvre syndrome patient reveals species-dependent requirements for neutrophil defenses. *J Clin Invest* 124, 4539–4548

Stoiber W, Obermayer A, Steinbacher P, Krautgartner W-D (2015): The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. *Biomolecules* 5, 702–723

Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER (2010): Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 31, 318–324

Sun X, Kim A, Nakatani M, Shen Y, Liu L (2016): Distinctive molecular responses to ultraviolet radiation between keratinocytes and melanocytes. *Exp Dermatol* 25, 708–713

Svobodová A, Vostálová J (2010): Solar radiation induced skin damage: review of protective and preventive options. *Int J Radiat Biol* 86, 999–1030

Swerlick RA (1997): The structure and function of the cutaneous vasculature. *J Dermatol* 24, 734–738

Syntichaki P, Tavernarakis N (2002): Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Rep* 3, 604–609

- Thålin C, Daleskog M, Göransson SP, Schatzberg D, Lasselin J, Laska A-C, Kallner A, Helleday T, Wallén H, Demers M (2017): Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of citrullinated histone H3 as a marker for neutrophil extracellular traps in human plasma. *Immunol Res* 65, 706–712
- Valentijn AJ, Zouq N, Gilmore AP (2004): Anoikis. *Biochem Soc Trans* 32, 421–425
- Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME (2015): DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol* 6, 422
- Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, Rubin CJ, Zhao W, Olsen SH, Klinker M, et al. (2011): Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 187, 538–552
- von Köckritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, Medina E (2008): Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood* 111, 3070–3080
- Wagener FADTG, Carels CE, Lundvig DMS (2013): Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions. *Int J Mol Sci* 14, 9126–9167
- Walker NI, Harmon BV, Gobé GC, Kerr JF (1988): Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* 13, 18–54
- Wan MT, Lin JY (2014): Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 7, 145–163
- Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, et al. (2009): Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol* 184, 205–213
- Yamaba H, Haba M, Kunita M, Sakaida T, Tanaka H, Yashiro Y, Nakata S (2016): Morphological change of skin fibroblasts induced by UV Irradiation is involved in photoaging. *Exp Dermatol* 25 Suppl 3, 45–51
- Yamashima T (2000): Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog Neurobiol* 62, 273–295
- Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, Kuroda Y (2001): Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 28, 313–314
- Yin C, Heit B (2018): Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules. *Cell Tissue Res* 371, 455–471
- Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, Schmid I, Straumann A, Reichenbach J, Gleich GJ, Simon H-U (2008): Catapult-like release of mitochondrial

DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* 14, 949–953

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael P. Schön und Frau Prof. Dr. Luise Erpenbeck für die ausgezeichnete Betreuung während der Erstellung der gesamten Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Elsa Neubert bedanken, die mir während der Durchführung der Experimente zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mit produktiven Gesprächen, Anregungen und lieben Worten maßgeblich zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen hat.

Des Weiteren möchte ich Julia Grandke und mit ihr dem gesamten Laborteam der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsmedizin Göttingen Danke sagen, die während meiner Zeit dort für ein kollegiales und fröhliches Arbeitsklima gesorgt haben.

Ich danke zudem Herrn Prof. Dr. Sebastian Kruss und Herrn Prof. Dr. Ivan Bogeski sowie deren Arbeitsgruppen für die produktive Zusammenarbeit und Kreativität während der Ideenfindung und Durchführung mancher Versuche.

# Lebenslauf

Mein Name ist Katharina Marie Bach und meine aktuelle Adresse lautet Alsterdorfer Straße 2 in 22299 Hamburg. Geboren wurde ich am 15. Juli 1992 in Wolfsburg und bin somit 29 Jahre alt. Telefonisch zuverlässig erreichbar bin ich unter 0151-43103941 oder per E-Mail unter [kathi.bach@gmx.de](mailto:kathi.bach@gmx.de) Meine Staatsbürgerschaft ist deutsch und ich bin unverheiratet (ledig).

Im Jahr 2011 bestand ich mein Abitur am Otto-Hahn-Gymnasium Gifhorn mit der Note 1,4. Meine Leistungsfächer waren Geschichte und Englisch. Da ich nach der Beendigung meiner schulischen Laufbahn nicht sicher wusste, für welches Studium ich mich entscheiden wollte beschloss ich ein freiwilliges soziales Jahr (FSJ) einzulegen. Dieses absolvierte ich im evangelischen Kindergarten der St. Johannis Gemeinde in Braunschweig.

Nach dem FSJ begann ich das Studium der Humanmedizin zum Wintersemester 2012/13 an der Georg-August-Universität Göttingen. Im Sommersemester 2014 bestand ich dort erfolgreich das erste Staatsexamen (Note 2,0), im Wintersemester 2018 das zweite Staatsexamen (Note 2,0) und im November 2019 das dritte und letzte Staatsexamen (Note 1,0). Im Winter 2016 pausierte ich mein Studium, um eine experimentelle Doktorarbeit in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie mit dem Titel „Einfluss ultravioletten und sichtbaren Lichts auf die NET (*Neutrophil Extracellular Traps*)-Bildung“ zu beginnen. Der experimentelle Teil der Arbeit ließ sich größtenteils während des Forschungssemesters beenden, die Verschriftlichung erfolgte zum größten Teil nach dem zweiten Examen. Im Jahr 2018 durfte ich als Teilnehmerin der ADF (Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung)-Winterschule im Schneefernerhaus auf der Zugspitze meine Forschungsergebnisse präsentieren und in einen produktiven Austausch mit Forschenden aus unterschiedlichen Orten der ganzen Welt treten. Im März 2022 plane ich meine Dissertation offiziell einzureichen.

Während meines Studiums arbeitete ich in unterschiedlichen Nebenjobs. So war ich von 2012-2013 als studentische Hilfskraft am evangelischen Klinikum Weende angestellt und von 2013-2019 in der Asklepios Klinik für Psychiatrie. Zudem durfte ich als Mitglied der Fachschaftsgruppe „unabhängige Mediziner“ die politische Struktur des Studiums an der Georg-August-Universität Göttingen mitgestalten.

Während des praktischen Jahrs sammelte ich unter anderem für 4 Monate Arbeitserfahrungen im Bereich der Neurologie in der Schön Klinik Hamburg Eilbek. Die klinische Erfahrung dort begeisterte mich so sehr, dass ich im Januar 2020 dort meine Vollzeitstelle als Assistenzärztin antreten durfte. Die ersten zwölf Monate arbeitete ich auf der Station für Akutneurologie, seit Januar 2021 bin ich auf der neurologischen Intensivstation/Phase B Frühreha eingesetzt. Während all dieser Zeit konnte ich sowohl meine neurologischen sowie interventionellen und akutmedizinischen Fähigkeiten ausbauen



und möchte in den kommenden drei Jahren meine Ausbildung zur Fachärztin für Neurologie vervollständigen. Hierzu werde ich ab Januar 2022 für insgesamt 12 Monate in der Klinik für Psychiatrie des jüdischen Krankenhaus Berlin arbeiten.

Das Schicksal von Menschen ohne festen Wohnort oder Krankenversicherung in meiner derzeitigen Heimatstadt liegt mir sehr am Herzen, weshalb ich seit März 2020 im Krankenmobil der Caritas im Rahmen eines Ehrenamts zur grundlegenden medizinischen Versorgung dieser Personen beitrage.

Meine Muttersprache ist Deutsch, darüber hinaus spreche und schreibe ich fließend Englisch. Während der Schulzeit konnte ich zudem Grundkenntnisse in Französisch erwerben. In einem Volkshochschulkurs im Jahr 2019 erzielte ich zudem das Sprachlevel A1 in Dänisch zur Vorbereitung eines zweimonatigen Aufenthalts in Kopenhagen während des praktischen Jahrs.