

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

(Prof. Dr. med. M. P. Schön)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in der Interleukin-23-induzierten psoriasiformen Dermatitis

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Veit Steffen Manzke

aus

Bremen

Göttingen 2020

Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Brück
Referent:	Prof. Dr. Michael Peter Schön
Ko-Referent:	Prof. Dr. Lutz Walter
Drittreferent:	Prof. Dr. Ralf Dressel
Datum der mündlichen Prüfung:	27. Juli 2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in der Interleukin-23-induzierten psoriasiformen Dermatitis“ 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:

Manzke VS, Beulshausen I, Neubert E, Scheidmann S, Kruss S, Schön MP, Erpenbeck L: Neutrophil extracellular traps (NETs) in the pathogenesis of IL-23- mediated psoriasis-like skin inflammation. Vortrag im Rahmen der 44. ADF (Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung) Tagung, Göttingen, 09.03.2017 – 11.03.2017

Manzke VS, Beulshausen I, Neubert E, Scheidmann S, Kruss S, Schön MP, Erpenbeck L: Neutrophil extracellular traps (NETs) are crucial in the pathogenesis of IL-23-mediated psoriasisiform skin inflammation. Posterpräsentation im Rahmen der 44. ADF (Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung) Tagung, Göttingen, 09.03.2017 – 11.03.2017

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	II
1. EINLEITUNG	1
1.1 PSORIASIS.....	1
1.2 PATHOGENESE DER PSORIASIS	3
1.3 THERAPIE DER PSORIASIS	4
1.4 <i>NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS</i> (NETs).....	5
1.5 DER MECHANISMUS DER NETOSE	6
1.6 TOLL-LIKE REZEPTOREN (TLR) BEI DER PSORIASIS UND NETOSE.....	7
1.7 <i>NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS</i> IN DER PRAXIS	9
1.8 ZIELE DER ARBEIT.....	10
2. MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1 MATERIALLISTE	11
2.2 PUFFER UND LÖSUNGEN	17
2.3 MAUSVERSUCHE	18
2.4 PARAFFINEINBETTUNG	22
2.5 ANFERTIGEN HISTOLOGISCHER PRÄPARATE	23
2.6 ANFÄRBN VON PRÄPARATEN.....	23
2.7 AUSWERTUNG DER FÄRBUNGEN	25
2.8 ISOLIERUNG NEUTROPHILER GRANULOZYTEN	25
2.9 <i>IN-VITRO</i> -INDUKTION VON <i>NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS</i>	28
2.10 HERSTELLEN VON PLASMA AUS MÄUSEBLUT.....	28
2.11 MESSUNG FREIER DNA	28
3. ERGEBNISSE	30
3.1 NETOSE DURCH CALCIUM-IONOPHOR UND PMA <i>IN VITRO</i> ERFOLGT TLR-UNABHÄNGIG.....	30
3.2 NETs SPIELEN EINE WICHTIGE ROLLE IN DER FRÜHEN ENTZÜNDUNGSPHASE	31
3.3 SYSTEMISCHE DNASE-1-APPLIKATION HEMMT DIE PSORIASIFORME ENTZÜNDUNG.....	38
3.4 INTRADERMALE INJEKTIONEN MIT INTERLEUKIN-23 LÖSEN KEINE ERHÖHTE SYSTEMISCHE BEREITSCHAFT ZUR BILDUNG VON <i>NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS</i> AUS	40
4. DISKUSSION.....	41
4.1 NETs ALS MÖGLICHE THERAPEUTISCHE ZIELSTRUKTUREN IN DER PSORIASIS	41
4.2 DAS WECHSELSPIEL ZWISCHEN LL37 UND NETs.....	43
4.3 DER ZUSAMMENHANG ZWISCHEN TOLL-LIKE REZEPTOREN, NETs UND PSORIASIS.....	45
4.4 DER EINFLUSS VON NETs AUF DIE PATHOGENESE DER PSORIASIS.....	46
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	47
6. LITERATURVERZEICHNIS	48

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Acc.	<i>Acceleration</i>
ADAMTSL5	ADAMTS-like Protein 5
ATP	Adenosintriphosphat
AK	Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
CaIo	Calcium-Ionophor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Cl-Amidine	Chloramidine
CXCL	CXC-Motiv-Chemokin
Dec.	<i>Deceleration</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	<i>Extracellular Trap</i>
H3cit	citrulliniertes Histon 3
HBSS	Hank's balanced salt solution
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
i. d.	intradermal
IKK ϵ	I-kappa-B kinase epsilon
IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
IRAK	<i>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase</i>
i. v.	intravenös
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinases</i>
MAP Kinase	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MKK	<i>Dual specificity Mitogen-activated protein Kinase Kinase</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation primary response 88</i>
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NET	<i>Neutrophil Extracellular Trap</i>

NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
n. s.	nicht signifikant
PAD4	Peptidyl-Arginin-Deiminase 4
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PASI	<i>Psoriasis Area and Severity Index</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PSORS	<i>Psoriasis Susceptibility Locus</i>
PUVA	Psoralen plus UV-A
R	Rezeptor
RFU	<i>Relative Fluorescence/Fluorometric Units</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RSV	<i>Respiratory Syncytial Virus</i>
RT	Raumtemperatur
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
TAK	<i>Transforming growth factor beta-Activated Kinase</i>
TC-Zellen	zytotoxische T-Zellen
TH-Zellen	T-Helferzellen
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor
TLR	Toll like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	<i>TNF Receptor Associated Factor</i>
TRAM	<i>TRIF-Related Adapter Molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing Adapter-Inducing Interferon-β</i>
UV-A	Ultraviolettstrahlung-A
UV-B	Ultraviolettstrahlung-B
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung

1. Einleitung

1.1 Psoriasis

Psoriasis (Schuppenflechte) ist eine chronisch entzündliche Systemerkrankung. Ihre Prävalenz beträgt, abhängig von Alter, Geschlecht und Herkunft, etwa 2-4 % in den westlichen Ländern (Parisi et al. 2013). Es werden zwei Inzidenzgipfel beobachtet: ein erster im Alter von etwa 16 (weiblich) beziehungsweise 22 Jahren (männlich) und ein zweiter bei etwa 60 (weiblich) sowie 57 Jahren (männlich) (Henseler und Christophers 1985). Daher werden eine „*early onset*“ und eine „*late onset*“ Psoriasis unterschieden. Männer und Frauen sind etwa gleich häufig betroffen, allerdings zeigen Männer im Mittel schwerere Verläufe (Hägg et al. 2013).

Schuppenflechte befällt in erster Linie die Haut. Bis zu 30 % der Betroffenen leiden zusätzlich unter Psoriasis-Arthritis (Cather et al. 2017), die zu den Spondylarthropathien gehört (Braun und Sieper 2010). Etwa 50 % der Patienten haben Nagelveränderungen, bei den Patienten mit Psoriasis-Arthritis sind es fast 90 % (Reich 2009).

Die Psoriasis ist häufig mit weiteren Krankheiten assoziiert (Komorbidität). Meist sind dies Herz-Kreislauf- und metabolische Begleiterkrankungen: erhöhte Raten an Myokardinfarkten, Schlaganfällen und metabolischem Syndrom sind belegt (Takahashi und Iizuka 2012; Raaby et al. 2017).

Neben der körperlichen Beeinträchtigung leiden Patienten unter der Stigmatisierung ihres äußeren Erscheinungsbildes. So sind psychische Erkrankungen, wie Depressionen, bei Betroffenen häufiger (Griffiths und Barker 2007). Dies lässt sich jedoch nicht allein auf die Stigmatisierung zurückführen; auch ein Einfluss der chronischen Entzündung auf den Gehirnstoffwechsel wird vermutet (Brunoni et al. 2015).

Die Psoriasis weist verschiedene klinische Verläufe auf. Innerhalb des Spektrums werden beispielsweise Psoriasis vulgaris, pustulosa, guttata, inversa und erythrodermica unterschieden. Mit ca. 90 % ist die Psoriasis vulgaris die häufigste Ausprägungsform (Boehncke und Schön 2015). Bei ihr treten unterschiedlich große, silbrig schuppene, erythemato-squamöse Plaques auf. Die Effloreszenzen sind scharf begrenzt und meist monomorph in ihrer Ausprägung.

Auch histologisch weisen psoriatische Hautläsionen typische Merkmale auf. Zu den epidermalen Veränderungen gehören Akanthose (Verdickung des *stratum spinosum* mit ausgeprägter Verlängerung der Reteleisten), Hyperkeratose (Vergrößerung des *stratum corneum*) und Parakeratose (gestörte Ausdifferenzierung der Keratinozyten). Im oberen Korium sind die Blutgefäße deutlich vermehrt, dilatiert, gewunden und reichen bis in die Spitzen der dermalen Papillen. Schließlich besteht in psoriatischer Haut ein ausgeprägtes entzündliches Infiltrat aus Lymphozyten (hauptsächlich in der Dermis, weniger auch in der Epidermis), Makrophagen und Mastzellen (in der oberen Dermis) sowie neutrophilen Granulozyten (insbesondere in epidermalen Munro-Mikroabszessen) (Boehncke und Schön 2015; Kolios und Cozzio 2016).

Psoriatische Plaques finden sich bevorzugt an bestimmten Prädispositionsstellen: perianal, periumbilikal, am Capillitium (besonders retroaurikulär) und an den Streckseiten der Extremitäten (Boehncke und Schön 2015).

Psoriasis hat eine genetische Basis. Zwillingsstudien legen nahe, dass genetische Faktoren zu ca. 68 % für das Auftreten verantwortlich sind. Insgesamt besteht bei monozygoten Zwillingen eine höhere Konkordanz als bei dizygoten (Lønneberg et al. 2013).

Inzwischen sind zahlreiche Genloci bekannt, die mit einer Psoriasis in Verbindung stehen. Der bekannteste und klinisch vermutlich bedeutsamste ist der *Psoriasis susceptibility locus 1* (PSORS 1) auf Chromosom 6. Dort werden *Major Histocompatibility Complex 1* (MHC 1)-Proteine, darunter das für Psoriasis bedeutsame *Human Leucocyte Antigen-CW6* (HLA-CW6) codiert (Nestle et al. 2009). PSORS 1 spielt eine besondere Rolle bei der Psoriasis guttata, einer Form, die vor allem in jungem Alter auftritt (Asumalahti et al. 2003), während es bei der „late onset“ Psoriasis keine prominente Rolle spielt (Allen et al. 2005). PSORS 1 ist für 35-50 % der erblichen Komponente der Erkrankung verantwortlich (Nestle et al. 2009).

Neben der genetischen Komponente spielen auch Provokationen durch Umwelteinflüsse eine große Rolle als Auslöser der Psoriasis. Hierzu zählen Hautverletzungen, Narben nach chirurgischen Eingriffen und Tätowierungen (Weiss et al. 2002), bakterielle Infektionen (vor allem Streptokokken) (Gudjonsson et al. 2003) und Medikamente wie Lithium, Antimalariamittel, Beta-Blocker und nichtsteroidale Antirheumatika (Kim und Del Rosso 2010).

1.2 Pathogenese der Psoriasis

Seit Längerem ist bekannt, dass bei der Psoriasis das Immunsystem eine Schlüsselrolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung einnimmt. Dies wird von Beobachtungen gestützt, bei denen Patienten nach Knochenmarkstransplantationen eine Psoriasis entwickelten oder bei bereits bestehender Erkrankung eine Heilung erfahren haben (Eedy et al. 1990; Gardembas-Pain et al. 1990). Die Pathogenese der Psoriasis wurde noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch sind viele Aspekte bekannt.

Auf molekularer Ebene wird ein Zusammenspiel zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem deutlich. Ein möglicher Beginn einer Psoriasis entsteht durch Komplexe aus LL37 (Spaltprodukt des antimikrobiellen Proteins Cathelicidin) und freier *Deoxyribonucleic acid* (DNA). LL37 stammt dabei von aktivierten Epithelzellen sowie von eingewanderten neutrophilen Granulozyten (Reinholz et al. 2012). Die Komplexe aktivieren plasmazytoide dendritische Zellen. Dendritische Zellen wandern daraufhin in die lokal drainierenden Lymphknoten und fördern dort die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen, beispielsweise zu T-Helferzellen 1 (TH1), zytotoxischen T-Zellen 1 (TC1), TH17- und TC17-Zellen. Unter Stimulation durch Interleukin-23 (IL-23) aus dendritischen Zellen werden von TH17-Zellen IL-17A und IL-22 freigesetzt. IL-17A stimuliert Keratinozyten, die daraufhin weitere Peptide wie LL37 oder Chemokine wie CXCL8 (CXC-Motiv-Chemokin 8), welches die Einwanderung neutrophiler Granulozyten bewirkt, produzieren (Di Meglio et al. 2014). So entsteht ein *Circulus vitiosus*. IL-22 fördert die Hyperproliferation der Keratinozyten und deren mangelnde Ausreifung (Nestle et al. 2009).

Jahrelang ist davon ausgegangen worden, dass IL-17 bei der Psoriasis hauptsächlich von TH17-Zellen stammt. Nach neueren Erkenntnissen spielen aber Zellen des angeborenen Immunsystems eine größere Rolle im Zusammenspiel inflammatorischer Zytokine als bisher angenommen. So setzen auch neutrophile Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen IL-17 frei (Lin et al. 2011; Keijsers et al. 2014a). Es wird sogar postuliert, dass sie die Hauptquellen des IL-17 in psoriatischer Haut seien. Jedoch konnte die Rolle der neutrophilen Granulozyten noch nicht ausreichend geklärt werden. Auf jeden Fall spielt die IL-23/IL-17-Achse eine entscheidende Rolle im Kreislauf der chronischen Entzündung (Schön und Erpenbeck 2018).

Inzwischen wurden auch Autoimmunreaktionen gegen LL37/DNA-Komplexe (Lande et al. 2014) sowie gegen ADAMTSL5 (ADAMTS-like Protein 5) beschrieben (Arakawa et al. 2015).

1.3 Therapie der Psoriasis

Psoriasis ist eine entzündliche Systemerkrankung, die oft einer multimodalen Therapie bedarf. Grundsätzlich kommen lokale und systemische Therapien zum Einsatz.

Laut aktueller S3-Leitlinie ist eine lokale Therapie der chronischen Psoriasis vulgaris bei leichten Formen indiziert, wobei hier der *Psoriasis Area and Severity Index* (PASI) verwendet wird, um den Schweregrad der Erkrankung einzuschätzen (leicht entspricht PASI < 10) (Nast et al. 2017). Zum Einsatz kommen topische Glukokortikosteroide, Vitamin D3-Derivate und Dithranol. Eine ergänzende topische Therapie wird auch bei mittelschweren und schweren Formen der Psoriasis (PASI > 10) durchgeführt (Nast et al. 2017). Dabei sprechen 70-80 % der Patienten gut auf eine solche lokale Therapie an (Schön und Boehncke 2005).

Zudem werden Phototherapien eingesetzt. Hier ist beispielsweise die Psoralen plus UV-A (Ultraviolettstrahlung-A) (PUVA) zu nennen, bei der zuerst die Haut mit Psoralen für UV-A-Strahlung sensibilisiert wird und anschließend mit dieser Strahlung bestrahlt wird. Ein ebenfalls in der Praxis gängiges Verfahren ist die Bestrahlung mit Schmalspektrum UV-B.

Zusätzlich sind systemische Therapien etabliert. Diese werden klassisch mit Fumarsäureestern oder Methotrexat, seit 2015 auch mit Phosphodiesterasehemmern, durchgeführt. Obwohl der Wirkmechanismus noch nicht genau geklärt ist, hemmt Dimethylfumarat verschiedene Schritte der Entzündung und verringert die Anzahl der Lymphozyten im Blut (Höxtermann et al. 1998; Sondermann et al. 2017). Apremilast wirkt durch die indirekte Reduktion von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-12 und IL-23 antientzündlich und antiproliferativ (Schafer et al. 2010).

Einen anderen systemischen Therapieansatz verfolgen Biologika. Hierbei handelt es sich um Antikörper oder Fusionsproteine, die gezielt einzelne Mediatoren inhibieren. Als wichtige Biologika gegen Psoriasis sind vor allem TNF- α -Inhibitoren (Infliximab, Adalimumab, Golimumab, Etanercept) (Leonardi et al. 2003; Chew et al. 2004; Kavanaugh et al. 2012; Torii et al. 2016), Antikörper gegen IL-12/IL-23 (Ustekinumab) (Rich et al. 2014),

Antikörper gegen IL-23 (Guselkumab, Tildrakizumab, Risankizumab) (Papp et al. 2015; Blauvelt et al. 2017; Reich et al. 2019) und Antikörper gegen IL-17A (Secukinumab, Ixekizumab) (Gordon et al. 2016; Gottlieb et al. 2019) oder dessen Rezeptor (Brodalumab) (Papp et al. 2012) zu nennen.

Diese Biologika belegen eindrucksvoll, dass ein genaues Verständnis der Pathophysiologie der Psoriasis dazu beitragen kann, spezifische und wirkungsvolle Medikamente zu entwickeln.

1.4 *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs)

Neutrophil Extracellular Traps wurden erstmalig 2004 als ein extrazelluläres Geflecht aus granulären und nukleären Bestandteilen neutrophiler Granulozyten beschrieben (Brinkmann et al. 2004). Neben Doppelstrang-DNA bestehen sie aus Histonen, Inhalten azurophiler Granula der Neutrophilen, wie neutrophiler Elastase, Cathepsin G und Myeloperoxidase (MPO), sowie Inhalten sekundärer Granula, wie Laktoferrin und Gelatinase (Brinkmann et al. 2004).

Die NET-Bildung wird als NETose bezeichnet. Nachdem herausgefunden wurde, dass auch andere Zellen extrazelluläre *Traps* bilden, wurde der Vorgang verallgemeinernd ETose genannt. Zu den Immunzellen, die ebenfalls ihre DNA ausschleusen können, gehören Mastzellen (von Köckritz-Blickwede et al. 2008), Monozyten und Makrophagen (Chow et al. 2010), eosinophile Granulozyten (Yousefi et al. 2008) und basophile Granulozyten (Morshed et al. 2014), wobei die biologische Bedeutung dieser Vorgänge bisher noch Gegenstand intensiver Forschung ist und die molekularen Mechanismen hier zum Teil unterschiedlich ablaufen.

Ursprünglich wurden NETs als ein Mechanismus im Kampf gegen Bakterien beschrieben (Brinkmann et al. 2004). Dabei fungieren sie als eine Art Fangnetz, das Bakterien einfängt und mit Hilfe antimikrobieller Peptide bekämpft. Mittlerweile ist auch bekannt, dass sich NETs nicht nur gegen Bakterien richten, sondern auch gegen Pilze wie *Aspergillus fumigatus* (McCormick et al. 2010) und *Candida albicans* (Urban et al. 2006). Die Rolle der NETs bei Viruserkrankungen ist dahingegen weniger klar. Obwohl Viren viel kleiner als Bakterien sind, scheinen sie trotzdem durch NETs immobilisiert zu werden (Schönrich und Raftery 2016).

Weitere Stimuli zur Induktion der NETose sind IL-8 (CXCL8), Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), Lipopolysaccharide (LPS) (Brinkmann et al. 2004), Calcium-Ionophor (CaI_o) sowie aktivierte Blutplättchen (Caudrillier et al. 2012). PMA ist ein Phorbol-ester und kann Proteinkinase C aktivieren (Castagna et al. 1982). Letzteres scheint ein wichtiger Schritt in der NETose zu sein (Brinkmann et al. 2004).

Die Wirkung von CaI_o beruht auf einer Inhibition des Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Calcium-Transportes im sarkoplasmatischen Retikulum und einer daraus resultierenden erhöhten Permeabilität für Calcium-Ionen (Beeler et al. 1979).

1.5 Der Mechanismus der NETose

Mit Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie konnten die morphologischen Veränderungen neutrophiler Granulozyten während der NETose beschrieben werden. Die NETose verläuft in drei Phasen (Neubert et al. 2018). In der ersten, die ca. 60 Minuten dauert, dehnt sich das Chromatin bei zunächst erhaltener lobulärer Kernstruktur aus. Der Abstand zwischen innerer und äußerer Kernmembran nimmt dabei zu. In der zweiten Phase, die ebenfalls etwa 60 min dauert, kommt es zu weiterer Ausdehnung des Chromatins und einem Anschwellen der Zelle, in der sie ihre, für NETs typische, sphärische Form erhält. In der dritten Phase reißt die Zellmembran und NETs werden freigesetzt (Fuchs et al. 2007; Neubert et al. 2018). Das Volumen der extrazellulären *Traps* kann dabei 10-15 mal größer sein als das der Zelle, der sie entstammen (Brinkmann und Zychlinsky 2012).

In Abgrenzung zur Apoptose und Nekrose wurde die NETose anfänglich als dritte Form des Zelltodes beschrieben (Fuchs et al. 2007). Mittlerweile ist bekannt, dass die Freisetzung von ETs (*Extracellular Traps*) nicht zwangsläufig zum Tod der Zelle führt, sondern bei einer besonderen Art der NETose („vitale NETose“) einen zwar kernlosen, aber vitalen Granulozyten übrig lassen kann (Yipp und Kubes 2013). Offen ist hierbei jedoch, ob es sich dabei um eine eigenständige Form der NETose oder eine Variante der regulären NETose handelt. Welche Funktion diese besondere Form der NETose hat, ist ebenfalls noch unbekannt. Auch bei eosinophilen Granulozyten wurde die vitale ETose nachgewiesen (Yousefi et al. 2008).

Da durch Stimulation mit PMA oder Bakterien die Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species* (ROS)) durch Neutrophile gefördert wird,

wurde angenommen, dass die NETose nur über eine Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-abhängige ROS-Bildung funktioniert. Eine Hemmung der NADPH-Oxidase führt in diesen Szenarien zum Ausbleiben der NETose. Zusätzlich kann die NETose durch Katalase reduziert werden (Fuchs et al. 2007). Mittlerweile wurden aber auch schon ROS-unabhängige Formen der NETose beschrieben. So werden beispielsweise durch *Leishmania amazonensis* NETs bereits nach 10 Minuten freigesetzt (Rochael et al. 2015). Myeloperoxidase und neutrophile Elastase (NE) spielen wichtige Rollen bei der NETose. NE wandert in den Zellkern und trägt dort durch Abbau der Histone 1 und 4, jedoch nicht 3, zur Dekondensation des Chromatins bei. Später trägt MPO einerseits zum Abbau des Aktin-Zytoskeletts bei und wandert andererseits ebenfalls in den Kern, wo sie die Dekondensation des Chromatins verstärkt, ohne dabei Histone zu verdauen (Papayannopoulos et al. 2010). Der Mechanismus, durch den MPO wirkt, wird noch nicht komplett verstanden. Beide Enzyme, NE und MPO, werden in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten gelagert und ROS-abhängig freigesetzt (Papayannopoulos et al. 2010). Eine weitere wichtige Rolle bei der NETose spielt die Peptidyl-Arginin-Deiminase 4 (PAD4), die für die post-transkriptionelle Veränderung von Histonen zuständig ist. Beim Menschen wurden fünf verschiedene Isotypen der Peptidyl-Deiminasen identifiziert: PAD 1, 2, 3, 4 und 6 (Chavanas et al. 2004). An den Histonen 2A, 3 und 4 wird mit Hilfe dieses Enzyms Arginin zu Citrullin umgewandelt (Hagiwara et al. 2002). Durch die Citrullinierung wird die elektrostatische Ladung der Histone verändert. Der Verlust dieser Ladungen ist mit der Dekondensation des Chromatins assoziiert (Clark und Kimura 1990; Sun et al. 2005; Wang et al. 2009). Versuche an neutrophilen Granulozyten von PAD4^{+/+} (zwei intakte Gene) und PAD4^{-/-} (zwei nicht intakte Gene) Mäusen zeigten eine NET-Bildung bei PAD4^{+/+} Granulozyten, während sie bei PAD4^{-/-} Granulozyten ausblieb (Li et al. 2010; Lewis et al. 2015). Dies suggeriert eine Schlüsselrolle für das Enzym PAD4 für die NETose. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Citrullinierung von Histon 3 durch Calcium ausgelöst wird (Neeli et al. 2008), was erklärt, warum Calcium-Ionophor ein potenter und zuverlässiger Induktor der NETose ist.

1.6 Toll-like Rezeptoren (TLR) bei der Psoriasis und NETose

Humane Toll-like Rezeptoren wurden im Jahr 1997 erstmals beschrieben (Medzhitov et al. 1997). Bis jetzt wurden 10 humane und 13 murine TLR entdeckt (Kawai und Akira 2006).

Ihre Aufgabe besteht darin, Signale weiterzugeben, welche durch die Erkennung sogenannter *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) ausgelöst werden. Zu diesen PAMPs zählen einerseits bakterielle Lipopolysaccharide, aber auch viele weitere Stoffe, wie virale Ribonucleinsäure, Flagellin oder körpereigene Proteine wie Hitzeschockprotein 70 (Vabulas et al. 2002; Sandor und Buc 2005). Die TLR kommen dabei in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle vor.

Während vor allem Nukleinsäure-bindende Rezeptoren (TLR 3, 7, 8, 9) intrazellulär in den Endosomen vorkommen, sind andere in der Plasmamembran lokalisiert (TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10) (Blasius und Beutler 2010). Die zytosolischen Domänen der TLR werden wegen Ähnlichkeiten zu den IL-1 Rezeptoren (IL-1R) als TLR/IL-1R (TIR)-Domänen bezeichnet (Dunne und O'Neill 2003).

Die Aktivierung der TLRs durch PAMPs löst eine weitreichende Signalkaskade aus. Dabei rekrutieren die TIR-Domänen zusätzliche Signalgeber oder Adaptermoleküle, wie MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*), TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) und TRAM (*TRIF-related adapter molecule*). Daraufhin werden unter Einbezug von TRAF (*TNF receptor associated factor*) weitere Kinasen wie IRAK (*Interleukin-1 receptor-associated kinase*) 1, 2, 4, TAK 1 (*Transforming growth factor beta-activated kinase 1*) und IKK ϵ (*I-kappa-B kinase epsilon*) aktiviert. Danach werden NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), Interferon 1, p38 MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinase*), JNK MAPK (*c-Jun N-terminal kinases*) und MKK (*Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase*) aktiviert (Lim und Staudt 2013). Dies führt zu transkriptioneller Induktion inflammatorischer Zytokine. Eine Besonderheit zeigt TLR 3, der ohne MyD88 signalisiert (O'Neill und Bowie 2007).

Abgesehen von Bakterien können auch Viren über eine Aktivierung von Toll-like Rezeptoren eine NETose anregen. So weiß man, dass das Respiratorische Synzytial Virus (RSV) neutrophile Granulozyten über einen TLR 4-abhängigen Weg zur NETose anregt (Funchal et al. 2015). Auch das humane Immundefizienz-Virus (HIV) kann in einem TLR 7- und TLR 8-abhängigen Weg durch NETs eingefangen und inaktiviert werden (Saitoh et al. 2012).

Auch in der Psoriasis spielen TLRs eine Rolle. So wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung plasmazytoider dendritischer Zellen über TLR 9 zur Ausschüttung von TNF α führt (Lande et al. 2007). Es ist somit denkbar, dass TLRs eine Verbindung zwischen Psoriasis und NETose herstellen.

1.7 Neutrophil Extracellular Traps in der Praxis

Inzwischen wurden NETs bei diversen Erkrankungen nachgewiesen, darunter auch Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses (SLE). Hier kommt es zur Bildung von Autoantikörpern gegen körpereigene DNA, Histone und Bestandteile von NETs. Interessanterweise wurden auch Autoantikörper gegen LL37 (Bestandteil der NETs) bei SLE Patienten nachgewiesen (Lande et al. 2011). Zusätzlich wurde bei manchen SLE Patienten ein geringerer Abbau körpereigener DNA festgestellt (Hakkin et al. 2010). Bei Patienten mit zystischer Fibrose (Mukoviszidose) wurde eine erhöhte Anzahl von NETs im Sputum nachgewiesen (Dwyer et al. 2014). Entsprechend werden DNasen (Dornase-alpha, rekombinante humane DNase) inhalativ zur Verbesserung der Lungenfunktion bei Patienten mit Mukoviszidose eingesetzt (Yang et al. 2016). Inwieweit NETs in die Pathogenese der zystischen Fibrose involviert sind, ist allerdings noch unklar.

Auch bei Morbus Alzheimer (Zenaro et al. 2015), Atherosklerose (Knight et al. 2014) und Präeklampsie (Erpenbeck et al. 2016) wurden NETs gefunden. Ebenso scheinen NETs eine Rolle im Alterungsprozess, insbesondere bei der altersbedingten Organ-Dysfunktion durch fibrotische Umwandlung, zu spielen (Martinod et al. 2017)

Bei einigen Erkrankungen hingegen bleibt die NETose aus. Bei Patienten mit septischer Granulomatose ist die Funktion der NADPH-Oxidase gestört. Einerseits führt ROS-Defizienz zu septischen Zuständen, andererseits bilden Granulozyten nach PMA-Stimulation keine NETs (Fuchs et al. 2007). Patienten, die unter kompletter MPO-Defizienz leiden, können ebenfalls keine NETs bilden (Metzler et al. 2011). Diese Ergebnisse bestätigen nochmals die wichtigen Rollen der NADPH-Oxidase und der MPO in der NETose. Andererseits ist noch unklar, inwieweit das Ausbleiben der NETose Einfluss auf Entstehung und Schwere solcher Erkrankungen hat. Patienten mit Papillon-Lefèvre Syndrom können ebenfalls keine NETs bilden und zeigen eine Hyperkeratose mit schweren Parodontitiden (Sørensen et al. 2014).

NETs scheinen auch eine Rolle in der Pathogenese der Psoriasis zu spielen. So wurde eine erhöhte Anzahl IL-17-positiver neutrophiler Granulozyten in psoriatischer Haut gefunden (Lin et al. 2011) und Marker für NETs kolokalisieren in Psoriasis-Plaques mit IL-17 (Lin et al. 2011). Allerdings ist noch unklar, ob IL-17 durch die NETose freigesetzt wurde. Die Beobachtung der Kolokalisation von NETs und IL-17 wurde auch in einem Alzheimer-Modell bestätigt (Zenaro et al. 2015).

Weiterhin wurde bewiesen, dass Patienten mit Psoriasis mehr neutrophile Zellen im peripheren Blut haben als gesunde Personen (Hu et al. 2016). Die Bedeutung der NETs für die Pathogenese der Psoriasis bleibt aber weiterhin unklar.

1.8 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit fokussiert sich auf mögliche Zusammenhänge zwischen NETose und psoriasisartigen Hautentzündungen. Sie dient dazu, den Einfluss der NETs auf die Pathogenese der Psoriasis besser zu verstehen.

Ein Ziel der Arbeit ist es zu evaluieren, ob mögliche Differenzen in einer TLR-Abhängigkeit der NETose *in vitro* bestehen. Hierdurch könnten weitere prädisponierende Faktoren herausgestellt werden.

Weiterhin ist Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob und in welcher Art und Weise IL-23 an der Bildung von NETs *in vivo* beteiligt ist. Ebenso soll dargestellt werden, ob das Auftreten von NETs in der Psoriasis an eine zeitliche Komponente gebunden ist. Die Ergebnisse können genutzt werden, um darzustellen, ob die Therapie der Psoriasis zeitlich angepasst verlaufen sollte.

Zusätzlich soll dargestellt werden, inwiefern eine pharmazeutische Intervention die Entwicklung der phänotypischen Ausbildung der Psoriasis beeinflussen und darüber hinaus therapeutisch genutzt werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Materialliste

Tabelle 1: Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Herstellerland/ Hauptsitz
Acculab (Waage)	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Appliskan	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Autoklav	Sanyo	Moriguchi, Osaka, Japan
Axiocam MRc	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Axiocam MRm	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Axiovert 40 C	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Brutschrank HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Cool Snap ES	Photometrics	Tucson, Arizona, USA
Cytospin 2	Shandon	Runcorn, England
Elektronischer Außenschnelltaster IP 67 (C-Serie)	Kroeplin Längenmesstechnik	Schlüchtern, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5417 R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop AXIO	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Imager M1	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Integra PipetBoy acu	IBS Integra Biosciences	Fernwald, Deutschland
Inverses Mikroskop, Axiovert 200	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Isofluran Narkosegerät	Visualsonics	Toronto, Ontario, Kanada
Kühlschrank 4°C	Liebherr	Bulle, Freiburg, Schweiz
Kühlschrank -20°C	Liebherr	Bulle, Freiburg, Schweiz
Leica RM 2235 (Mikrotom)	Leica	Wetzlar, Deutschland
Leica TP 1020	Leica	Wetzlar, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller	Herstellerland/ Hauptsitz
Mikroliterspritze	Hamilton Bonaduz AG	Bonaduz, Graubünden, Schweiz
Mikroskop Axioskop 2	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Neubauer Zählkammer improved	Brand	Wertheim, Deutschland
Reinstwasserpumpe Sartorius arium® 611VF	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Rotina 35 (Zentrifuge)	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen, Deutschland
Safe 2020 (Werkbank)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Tierkäfigwechslerstation NU-629	IBS Integra Biosciences	Fernwald, Deutschland
Transferpette® S 10, 20,100, 200, 1000 Mikroliter (µl) (Einfachpipette)	Brand	Wertheim, Deutschland
Transferpette® S-12; 200 µl (Multipipette)	Brand	Wertheim, Deutschland
Vacusaft comfort (Vakuum Pumpe)	IBS Integra Biosciences	Fernwald, Deutschland
Wecker	Roth	Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Herstellerland/ Hauptsitz
100 Sterican Einmal- Injektions-Kanüle 0,30 x 12 mm, 30G x 0,5“	Braun	Melsungen, Deutschland
100 Sterican Einmal- Injektions-Kanüle 0,55 x 25 mm, 24G x 1“	Braun	Melsungen, Deutschland
96-Glasboden Kulturplatten- #1 Glass	In Vitro Scientific	Sunnyvale, Kalifornien, USA

Bezeichnung	Hersteller	Herstellerland/ Hauptsitz
Anästhesiefilter	Drägerwerk AG und CoKGaA	Lübeck, Deutschland
DAKO PEN	Dako	Glostrup, Hovedstaden, Dänemark
Durapore™	3M	St. Paul, Minnesota, USA
Filtropur S plus 0.2	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Handschuhe	(Sempermed) Semperit AG	Wien, Österreich
Injekt®-F0,01 ml-1 ml (Einmalspritze 1 ml)	Braun	Melsungen, Deutschland
Klappkassette für Gewebe	Kartell	Noviglio, Italien
Labortücher 20.5 x 20 cm	(Kimtech Science) Kimberly-Clark	Dallas, Texas, USA
Menzel-Gläser (Coverslips) 15 mm #1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Objektträger	Thermo Scientific Gerhard Menzel B.V. Co KG	Braunschweig, Deutschland
Omnifix® 20 ml	Braun	Melsungen, Deutschland
Parafilm	Bemis Company, Inc.	Neenah, Wisconsin, USA
Pasteur Capillary Pipettes	WU Mainz	Mainz, Deutschland
Pipettenspitzen	Star Lab GmbH	Hamburg, Deutschland
Safe Lock Tubes 1; 1,5; 2 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Sarstedt Serological Pipette 5; 10 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Shandon Filter Cards (Cytospin)	Fisher scientific	Loughborough, Leicestershire, UK
Transferpipetten (Eyedropper) 1 ml	VWR	Radnor, Pennsylvania, USA
Wattestäbchen 15 cm/ 4-5 mm	NoBA Verbandmittel Danz GmbH und CoKG	Wetter/ Ruhr, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, 15 ml CELLSTAR® Polypropylen	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich

Tabelle 3: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Herstellerland/ Hauptsitz
10 x Phosphate Buffered Saline (PBS) steril (ohne CaCl ₂ , MgCl ₂)	Lonza	Basel, Basel Stadt, Schweiz
1 x PBS steril (ohne CaCl ₂ , MgCl ₂)	Lonza	Basel, Basel Stadt, Schweiz
Bovines Serumalbumin (BSA) (Albumin Fraktion V, biotinfrei)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Calciumacetat	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Chlorwasserstoff (HCL)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Diff Quik® Färbeset	Medion Diagnostics	Miami, Florida, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,5 M	(GIBCO) Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Faramount Mounting Medium, Aqueous	Dako	Glostrup, Hovedstaden, Dänemark
Hank's balanced salt solution (HBSS) (ohne CaCl ₂ , MgCl ₂)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Isofluran	AbbVie	Ludwigshafen, Deutschland
Isopropylalkohol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Leuko Tic	Bioanalytic	Umkirch/ Freiburg, Deutschland
Mono-Natriumcitrat	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Paraffin	(McCormick Scientific) VWR	Radnor, Pennsylvania, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Percoll™ Plus	GE Healthcare	Chalfont St Giles, UK
Quant-iT™PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits	(Invitrogen) Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA

Bezeichnung	Hersteller	Herstellerland/ Hauptsitz
RPMI 1640	Lonza	Basel, Schweiz
Tris-Base	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Triton X	Merck	Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Zinkacetat	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Zinkchlorid	Roth	Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 4: Enzyme, Zytokine, Aktivatoren, Färbung

Bezeichnung	Hersteller	Herstellerland/ Hauptsitz
DNase 1	Roche	Grenzach Wyhlen, Deutschland
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Interleukin-23	Affymetrix eBioscience	San Diego, Kalifornien, USA
Ionomycin Calcium Salz	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
PMA	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Trypan Blue Solution	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 5: Antikörper

Bezeichnung	Quelle	Gerichtet gegen	Hersteller	Herstellerland/ Hauptsitz
AK anti-Histone H3, polyklonal, anti Maus/Mensch	Kaninchen	Maus/Mensch	Abcam	Cambridge, UK
AK anti-Kaninchen, polyklonal, IgG (H+L), Ziege, Alexa 488	Ziege	Kaninchen	Invitrogen	Waltham, Massachusetts, USA

Bezeichnung	Quelle	Gerichtet gegen	Hersteller	Herstellerland/ Hauptsitz
AK anti-Ratte, polyklonal, IgG (H+L), Ziege Alexa 555	Ziege	Ratte	(Life technologie s) Thermo Fischer Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
AK Ly-6G, monoclonal	Ratte	Maus	Biolegend	San Diego, Kalifornien, USA
Isotyp Kaninchen, IgG	Kaninchen		Zymed	Waltham, Massachusetts, USA
Isotyp Ratte, IgG	Ratte		Sigma- Aldrich	St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 6: Software

Programm	Anbieter	Herstellerland/ Hauptsitz
AxioVision Rel.4.7	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Graphpad Prism	GraphPad Software, Inc.	La Jolla, Kalifornien, USA
Imagej	National Institutes of Health	Bethesda, Maryland, USA
Metamorph 6.3r2.	Molecular Devices	Sunnyvale, Kalifornien, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft	Redmond, Washington, USA
Microsoft Excel 2016	Microsoft	Redmond, Washington, USA

2.2 Puffer und Lösungen

Zink-Puffer:

12,1 g Trisbase, 81,5 ml 1 N HCl und 900 ml H₂O zusammenfügen, pH-Wert 7,4 einstellen, dann 0,5 g Calciumacetat, 5 g Zinkacetat und 5 g Zinkchlorid hinzufügen.

EDTA-Puffer:

1 % BSA, 15 mM EDTA in 1 x PBS

Citrat-Puffer:

3,2 % Natriumcitrat in H₂O

BSA-Lösungen (Blockierlösungen):

Je nach Konzentration BSA in 1 x PBS lösen.

Permeabilisationspuffer:

0,1 % Natriumcitrat

0,1 % Triton X

In H₂O

Färbelösung:

5 µl Tween 20

1 ml 3 % BSA

8,995 ml 1 x PBS

DNase 1-Puffer:

8,77 mg/ml NaCl

0,15 mg/ml CaCl₂ in H₂O

2.3 Mausversuche

Für die Maus-Versuchsreihen eins bis drei wurden Mäuse der Linie C57BL/6 und für die Versuchsreihe vier wurden Mäuse der Linie C57BL/6, MyD88-defizient (MyD88^{-/-}) und MyD88/TLR3-defizient (MyD88^{-/-}/TLR3^{-/-}) verwendet. Sie wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen gezüchtet und gehalten. Alle Tierversuche entsprachen den Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen an der Universitätsmedizin Göttingen. Sie wurden durch das Niedersächsische Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (LAVES) bewilligt (Nr. G12/836).

Alle Versuche wurden in einem S2-Labor durchgeführt. Die Mäuse wurden mit Isofluran betäubt. Dazu wurde ein Isofluran-Narkosegerät benutzt, welches flüssiges Isofluran verdampfte. Außerdem bot es die Möglichkeit, die Mäuse in einer Kammer zu betäuben und sie dann über ein Mundstück während der Behandlungen unter Narkose zu halten. Die Mäuse lagen dabei auf einer Schicht von Einmaltüchern.

Zu Beginn wurde die Dicke beider Ohren der Mäuse standardisiert und mit Hilfe eines elektronischen Tasters an jeweils zwei Punkten mittig und am rostral gelegenen Teil des Ohres gemessen. Bis zu diesem Schritt verliefen alle Mausversuchslinien in der gleichen Folge ab.

Nach dem Messen der Ohrdicke wurden die Ohren mit einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen und Durapore™ Klebestreifen fixiert (Abb. 1), wie dies zuvor publiziert wurde (Li et al. 2012). Für die intradermale (i. d.) Injektion wurde eine Mikroliterspritze mit feiner Kanüle (0,30 x 12 mm, 30 G x 0,5“) verwendet. Sie wurde mit der zu injizierenden Flüssigkeit gefüllt und durch mehrmaliges Pumpen wurde die restliche Luft aus dem System entfernt. Die Injektion erfolgte in das fixierte Ohr; die Kanüle wurde mit Schliff nach oben in flachem Winkel intradermal eingeführt. Die makroskopisch sichtbare Quaddelbildung und das Trockenbleiben des Klebestreifens bestätigten die erfolgreiche intradermale Injektion.

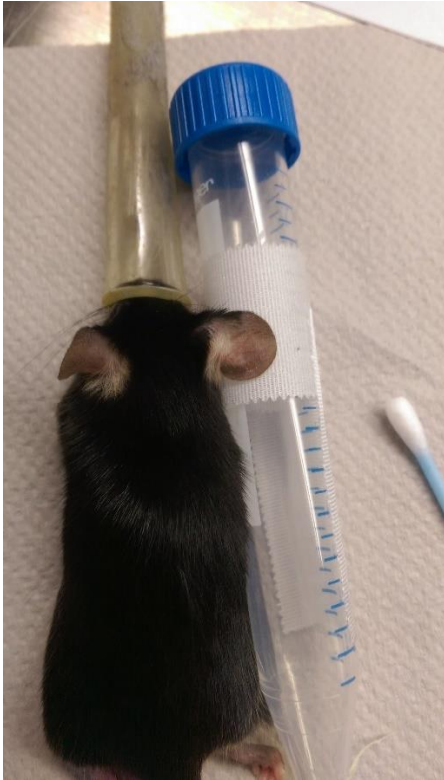


Abbildung 1: Abgebildet ist eine Maus unter Isofluran-Narkose und fixiertem Ohr.

Für die Injektion von DNase 1 oder deren Pufferlösung wurden Einmalspritzen (1 ml) mit Kanülen der Größe 0,55 x 25 mm, 24 G x 1“ benutzt. Die Injektion an Tag eins erfolgte unter Isofluran-Narkose und nach Messen der Ohrdicke in den retrobulbären Venenplexus.

An den Tagen zwei, drei und vier erfolgte die Applikation von DNase 1/Puffer intraperitoneal (i. p.). Dazu wurde die Maus in einer Hand fixiert. Der Nacken wurde mit Daumen und Zeigefinger gegriffen und die Maus mit dem Rücken auf der Handinnenfläche gehalten. Der kleine Finger fixierte dann den unteren Teil der Maus. Als Injektionsort eignete sich einer der beiden unteren Bauchquadranten, um das Risiko für Organverletzungen zu minimieren.

Die Blutentnahme erfolgte unter Isofluran-Narkose. Dazu wurde die Maus mit Zeigefinger und Daumen am Nacken fixiert. Mit selbst gefertigten Kapillaren aus Pasteurpipetten wurde der retrobulbäre Venenplexus punktiert. Das Blut wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit Antikoagulantien (Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)- oder Citrat-Puffer) gesammelt.

Für die Bestimmung der Leukozytenzahlen im peripheren Blut wurde das Leuko-Tic® Set benutzt. Dazu wurde eine 20 µl-Kapillare mit Blut aus Mäusen blasenfrei befüllt und in dem mitgelieferten Gefäß kräftig geschüttelt.

Nach 30 Sekunden konnte das Blut entnommen werden und in einer Neubauer Zählkammer mit einem Lichtmikroskop ausgewertet werden (Summe aus allen 4 großen Quadranten x 50 = Leukozyten/ μ l Blut).

In der Mausversuchsreihe 1 waren neun Mäuse im Versuch. Fünf von ihnen wurden 500 ng IL-23 in 20 μ l PBS i. d. in das rechte Ohr injiziert. Das linke Ohr erhielt 20 μ l PBS. Die anderen vier Mäuse dienten als Kontrollen. Ihnen wurde in beide Ohren jeweils 20 μ l PBS i. d. injiziert. Der Versuch dauerte zehn Tage. Die Injektionen erfolgten an jedem Tag, außer am zehnten. Die Ohrdicke wurde jeden Tag gemessen (Abb. 2). An Tag zehn wurden die Mäuse getötet, die Ohren für die histologische Aufarbeitung präpariert und Blut entnommen.

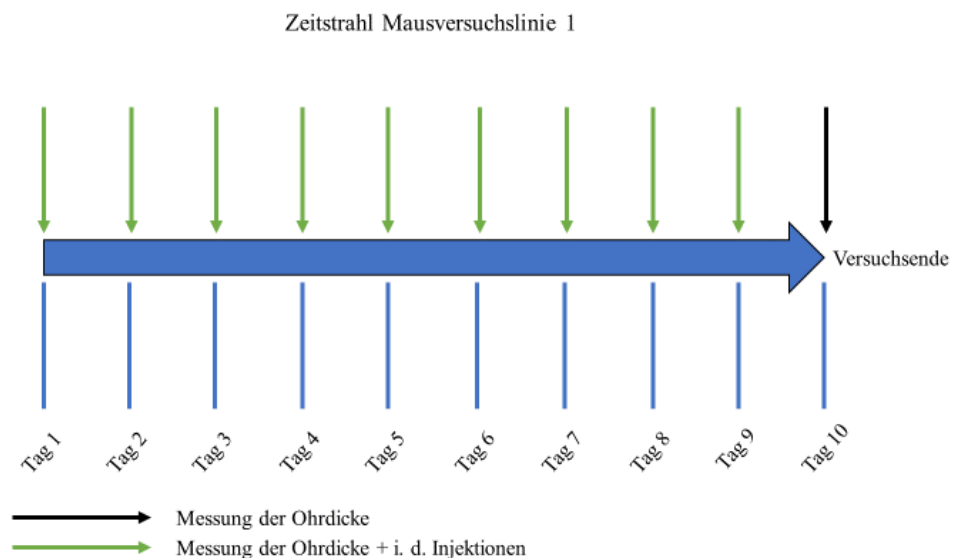


Abbildung 2: Zeitstrahl der ersten Mausversuchsreihe.

Die Mausversuchsreihe 2 erfolgte mit zehn Mäusen; fünf von ihnen erhielten wie in Versuchsreihe 1 je 500 ng IL-23 in das rechte Ohr. Die anderen fünf dienten als Kontrollen. Der Versuch dauerte fünf Tage. Die Injektionen erfolgten an jedem Tag, außer am fünften. Die Ohrdicke wurde jeden Tag gemessen (Abb. 3). Am fünften Tag wurden die Mäuse, wie in Versuchsreihe 1, getötet und die Gewebe für Untersuchungen entnommen.

Zeitstrahl Mausversuchslinie 2

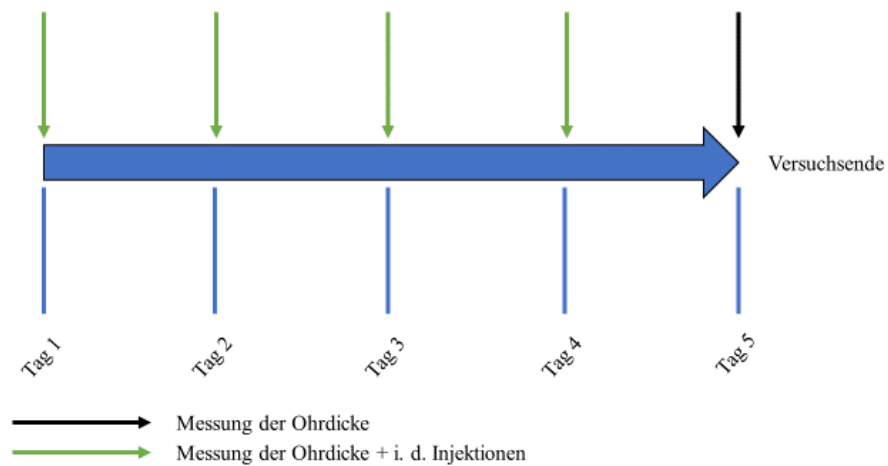


Abbildung 3: Zeitstrahl der zweiten Mausversuchsreihe.

In der dritten Mausversuchslinie wurden zehn Mäuse behandelt. Der Versuch dauerte fünf Tage. Allen Mäusen wurde in das rechte Ohr 500 ng IL-23 in 20 μ l PBS i. d. und in das linke 20 μ l PBS i. d. injiziert. Die Injektionen erfolgten an jedem, außer am fünften Tag. Sechs Mäuse erhielten an Tag eins 10 μ g DNase 1 in 100 μ l DNase 1-Puffer intravenös (i. v.). An den Tagen zwei, drei und vier wurde ihnen 50 μ g DNase 1 in 100 μ l DNase 1-Puffer i. p. injiziert. Die anderen vier Mäusen erhielten an Tag eins 100 μ l DNase 1-Puffer i. v. und an den Tagen zwei, drei und vier 100 μ l DNase 1-Puffer i. p..

Die Ohrdicke wurde jeden Tag gemessen. An Tag fünf wurden die Mäuse getötet und die Ohren und Blut wurden für weitere Untersuchungen entnommen (Abb. 4).

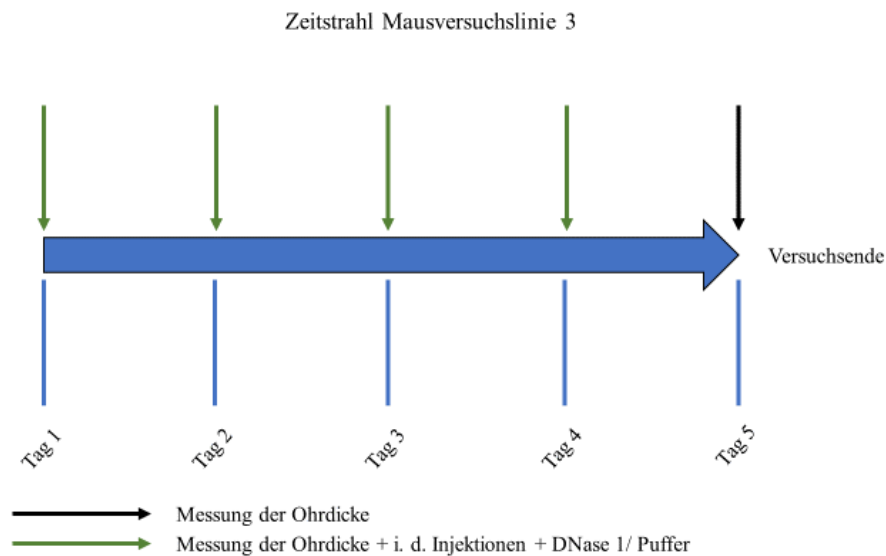


Abbildung 4: Zeitstrahl der dritten Mäusversuchsreihe.

Zuletzt wurde die Mäusversuchsreihe 4 durchgeführt. Diese Versuche wurden mit C57BL/6, MyD88-defizienten und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen durchgeführt. Ihnen wurde lediglich Blut abgenommen.

Die Dokumentation der Ergebnisse der Dicken-Differenz zwischen rechtem und linkem Ohr erfolgte mit Microsoft Excel. Zusätzlich fand eine Nullung der Ohrdickendifferenz der anfangs gemessenen Ohrdicken statt.

2.4 Paraffineinbettung

Die Mäuseohren wurden für 24-72 h im Zink-Puffer fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Kassetten unter Leitungswasser abgespült. Die Paraffineinbettung erfolgte maschinell mit einem Leica TP 1020 Einbettautomaten. Die Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (für jeweils 60 min in 50 %, 70 %, 80 %, 80 %, 96 %, 96 %) entwässert. Dem folgten zwei Inkubationen in 100 % Isopropylalkohol für je 90 min sowie zwei Inkubationen für ebenfalls je 90 min in Xylol.

Als letzter Schritt erfolgten zwei 120-minütige Inkubationen in Paraffin bei 60°C. Zum Schluss wurden die Präparate in einem Metallrahmen mit Paraffin ausgegossen. Nach der Aushärtung wurden Metallrahmen und Kassette entfernt.

2.5 Anfertigen histologischer Präparate

Die fertigen Paraffinblöcke wurden mit einem Mikrotom in Scheiben von 3 µm Dicke geschnitten. Die Schnitte wurden mit einer Pinzette vorsichtig auf ein Wasserbad gelegt und daraus faltenfrei auf einem Objektträger platziert.

2.6 Anfärben von Präparaten

Die Präparate wurden durch indirekte Immunfluoreszenz gefärbt. Dabei bindet der primäre Antikörper an die Strukturen, die man sichtbar machen möchte. Der sekundäre Antikörper bindet an den primären Antikörper und kann wegen seiner kovalenten Bindung an ein Fluorochrom im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Die Anfärbung der Präparate begann mit Waschen der Zellen in 100 µl PBS in Kulturplatten mit 96 Vertiefungen (96-well-Platten) für 15 min bei Raumtemperatur (RT). Die für intrazelluläre Färbungen nötige Permeabilisation erfolgte in 100 µl Permeabilisationspuffer und nach Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 3 % BSA (in PBS) für 90 min bei 37°C und 5 % CO₂.

Ein nicht bindender Isotyp-gleicher Kontrollantikörper diente als Referenz für die Stärke des Fluoreszenz-Signals des primären Antikörpers (Tab. 7). Die Inkubation erfolgte mit je 100 µl Antikörper-Lösung pro well bei 4°C über Nacht.

Danach erfolgten zwei Waschschrte mit je 100 µl PBS für 15 min sowie die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Tab. 8) für 2 h bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Anschließend wurde eine DNA-Färbung mit Hoechst® (1:10.000 in 100 µl PBS pro well) für 15 min bei Dunkelheit durchgeführt. Nach einem letzten Waschschrte wurden die Zellen bei 4°C gelagert.

Tabelle 7: Primäre Antikörper I

Antikörper	Verdünnung
Anti-H3cit (1 mg/ml)	1:1.500
Isotyp anti-Kaninchen (0,5 mg/ml)	1:750

Tabelle 8: Sekundäre Antikörper I

Antikörper	Verdünnung
Ziege-anti-Kaninchen	1:750

Die Schnitte der in Paraffin eingebetteten Mausohren wurden zunächst dreimal für je 5 min in Xylol entparaffiniert. Danach wurden sie jeweils für 5 Minuten in einer 1:1 Mischung aus Xylol und Ethanol, dann 100 %, 95 %, 90 %, 70 % und 50 % Ethanol sowie zweimal in H₂O rehydriert. Nach dem Trocknen wurde das Gewebe mit einem DAKO PEN umrahmt.

Es folgte die Permeabilisierung mit dem Permeabilisationspuffer bei 4°C für 10 min. Danach wurden die Präparate dreimal für 5 min mit PBS und einmal für 90 min mit 3 % BSA (in PBS) inkubiert.

Die primären Antikörper (Tab. 9) wurden in der Färbelösung gelöst und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Inkubationskammer auf die Präparate gegeben. Anschließend wurden die Präparate dreimal für 5 min mit PBS gewaschen.

Die Präparate wurden dann für zwei Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (Tab. 10) inkubiert, dreimal für 5 min mit PBS gewaschen, für 15 min mit Hoechst (1:10.000 in PBS) gefärbt und abschließend dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Die Objektträger wurden mit Eindeckmedium benetzt und anschließend mit Deckgläschen abgedeckelt.

Tabelle 9: Primäre Antikörper II

Antikörper	Verdünnung
H3cit (1 mg/ml)	1:1.500
Ly6G (0,5 mg/ml)	1:250
Isotyp anti-Kaninchen (0,5 mg/ml)	1:750
Isotyp anti-Ratte (5 mg/ml)	1:2.500

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper II

Antikörper	Verdünnung
Ziege-anti-Kaninchen	1:500
Ziege-anti-Ratte	1:500

2.7 Auswertung der Färbungen

Fotografien der gefärbten Zellen in den Kulturplatten wurden mit einem inversen Mikroskop (Zeiss) angefertigt und mit dem Programm ImageJ ausgewertet. Die Auszählung erfolgte einfach verblindet. Als Marker für die NETose wurde citrulliniertes Histon 3 (H3cit) genutzt. Die Gesamtzellzahl wurde durch Hoechst-Färbung der nukleären DNA bestimmt. Mit diesen Werten wurde der Anteil H3cit-positiver zu H3cit-negativen Zellkernen berechnet. Es wurden nur Zählungen berücksichtigt, wenn in den Isotyp-Kontrollen weniger als 5 % der Zellkerne positiv markiert waren. Pro *well* wurden drei Fotografien angefertigt. Gefärbte Paraffinschnitte wurden mikroskopisch fotografiert (Zeiss). Als Marker der NETose diente auch hier H3cit und als Marker für neutrophile Granulozyten eine indirekte Immunfluoreszenz gegen Ly6G. Die DNA wurde mit der Hoechst-Färbung dargestellt.

2.8 Isolierung neutrophiler Granulozyten

Die folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur unter einer Werkbank durchgeführt. Die Isolierung neutrophiler Granulozyten aus dem Blut von Mäusen erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation.

Das Blut wurde bei der Entnahme in einem 2-ml-Zentrifugenröhrchen mit 1 ml EDTA-Puffer vermischt. Das antikoagulierte Blut wurde dann bei 450 x G (Acceleration (Acc.):9; Deceleration (Dec.):9) für 12 min zentrifugiert. Danach wurde der flüssige Überstand abgenommen, wobei eine Vakuumpumpe mit Pasteurpipetten verwendet wurde. Das Sediment wurde dann mit 1 ml EDTA-Puffer resuspendiert.

Für den Aufbau des Gradienten benötigte man mehrere Schichten unterschiedlicher Dichte, durch die das zu trennende Medium bei der Zentrifugation wandern kann. Dazu wurde ein Basis-Gradient aus 10 x PBS und Percoll in einem Verhältnis von 1:10 hergestellt und steril filtriert.

Der Basis-Gradient wurde mit PBS vermischt, sodass drei Lösungen mit jeweils 78 %, 69 % und 52 % der Basis-Konzentration vorhanden waren. Der eigentliche Gradient wurde dann so aufgebaut, dass zuerst 3 ml der 78%igen, dann 3 ml der 69%igen und zuletzt 3 ml der 52%igen Lösung hinzugefügt wurden. Entscheidend dabei war, dass sich die verschiedenen Phasen beim Pipettieren nicht miteinander vermischten.

Das in EDTA resuspendierte Zellsediment wurde mit einer Augenpipette durch langsames Ablassen am Rand des Gefäßes auf den Percoll-Gradienten pipettiert. Das Gefäß mit dem Gradienten und den resuspendierten Zellen wurde dann bei 1500 x G (Acc.:3; Dec. 0) für 32 min zentrifugiert. Die Schichtung nach der Zentrifugation ist in Abb. 5 dargestellt.

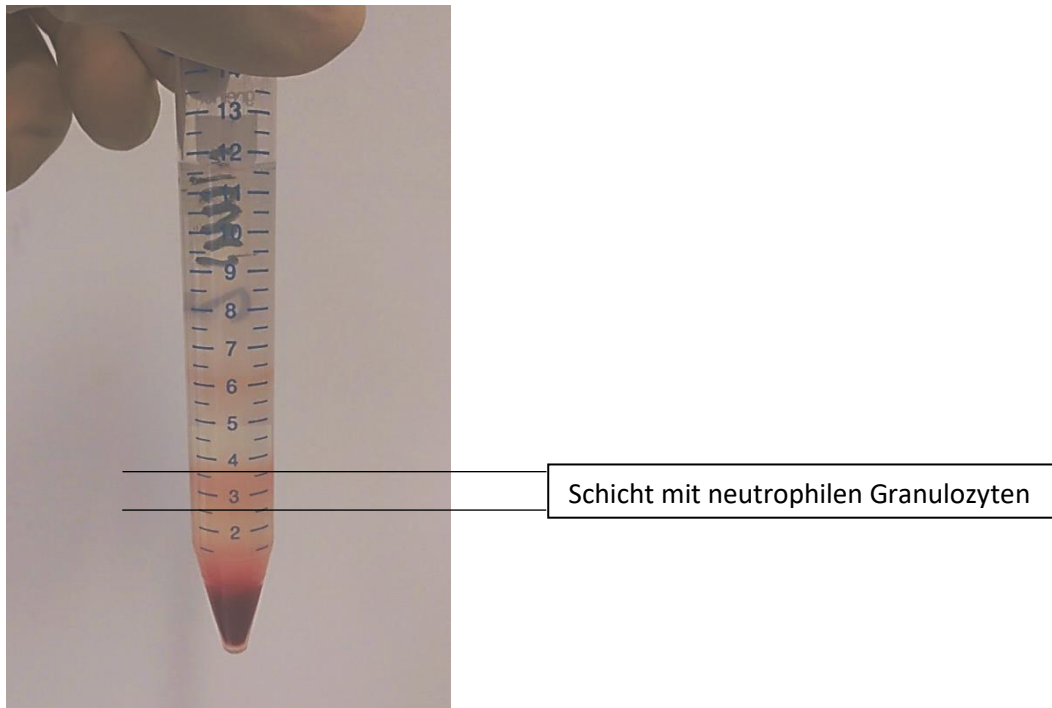


Abbildung 5: Zentrifugenröhrchen mit Percoll-Gradient und Mäuseblut nach Zentrifugation. Es lassen sich mehrere Schichten erkennen. In der rötlich schimmernden Schicht bei etwa 2,5-3,5 ml befinden sich die neutrophilen Granulozyten.

Mit der Vakuumpumpe wurde der Überstand bis zur zweituntersten Schicht (Grenze zwischen 78 % und 69 % Percoll) abgesaugt, diese Schicht mit einer Transferpipette entnommen und in einem Reagenzröhrchen mit 8 ml PBS gemischt. Dieses Reagenzröhrchen wurde dann mit PBS auf 14 ml Flüssigkeitsstand aufgefüllt und für 10 min bei 500 x G (Acc.:9; Dec.:9) zentrifugiert. Im Sediment befanden sich dann nur noch die neutrophilen Granulozyten und rote Blutkörperchen. Letztere wurden durch Zugabe von 1 ml H₂O osmotisch lysiert. Die Lyse wurde durch 1 ml 2 x PBS gestoppt.

Es folgte eine letzte Zentrifugation bei 500 x G für 11 min. Das Zellsediment wurde in HBSS resuspendiert (100 µl bei wenig und 500 µl bei viel Sediment).

Um die Zahl der isolierten Leukozyten zu bestimmen, wurde die Zellsuspension mit Trypanblau gemischt (Verhältnis 1:100). 10 µl dieses Gemisches wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt (gezählte Zellen/4 x 100 x 10⁴ = Gesamtzahl der Leukozyten).

Danach erfolgte die Überprüfung der Reinheit der Zellsuspension. Der Anteil neutrophiler Granulozyten wurde in einer 1:100 Verdünnung der HBSS-Zellsuspension mit einer 15%igen BSA-Lösung bestimmt. 100 µl dieser Verdünnung wurden in einem *Cytospin* (400 rpm für 10 min) auf einem Deckgläschen fixiert. Der Objektträger wurde staubgeschützt bei Raumtemperatur getrocknet, mit einer Methanol-haltigen Lösung fixiert, mit der Diff Quik®-Lösung angefärbt, mit H₂O gereinigt, erneut getrocknet und mit einem Deckgläschen abgedeckelt. Unter einem Lichtmikroskop wurden die Zellen ausgezählt. Bei sämtlichen Versuchen überstieg der Anteil der Neutrophilen 95 % aller Zellen (Erythrozyten nicht mitgezählt; Beispiel eines *Cytospins* in Abb. 6).

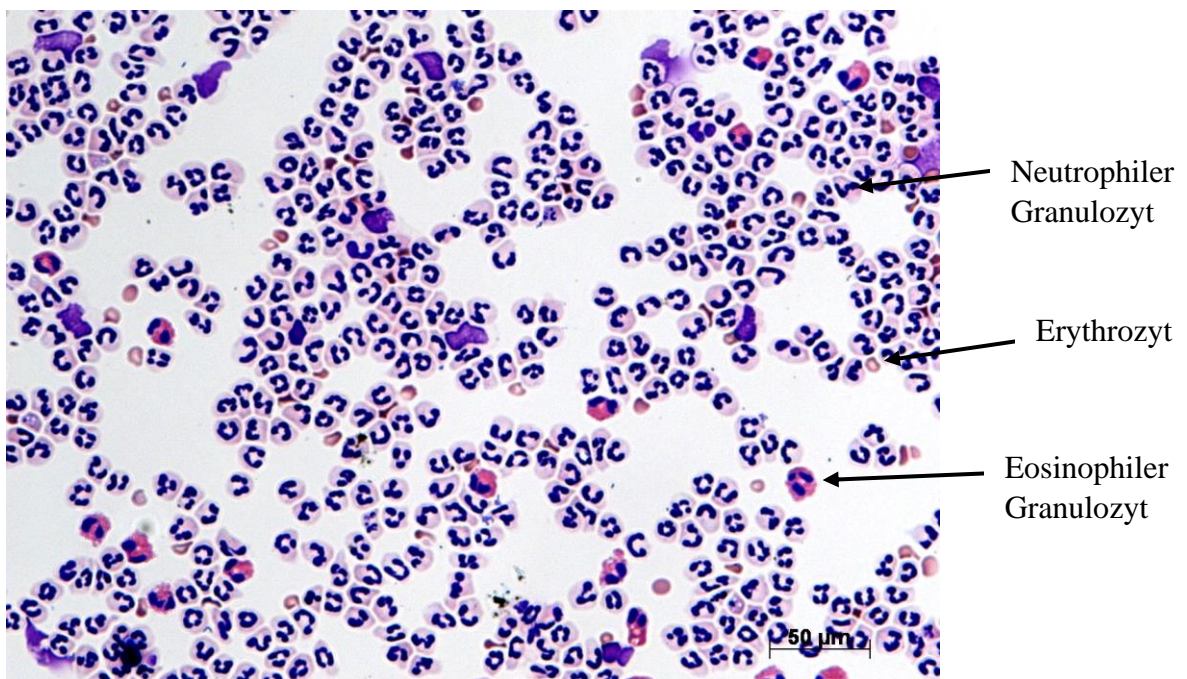


Abbildung 6: Cytospin der aufgereinigten Zellen aus Mäuseblut. Färbung: Diff Quik®, entspricht Pappenheim-Färbung. Neutrophile Granulozyten sind an ihren typischen segmentierten Kernen und taubengrauem Zytoplasma zu erkennen. Eosinophile Granulozyten erscheinen mit rötlichem Zytoplasma. Erythrozyten sind kleiner als Granulozyten und kernlos.

2.9 *In-vitro*-Induktion von *Neutrophil Extracellular Traps*

Um die NETose auszulösen, wurden aufgereinigte neutrophile Granulozyten in Kulturplatten pipettiert. Pro *well* wurden 10.000 Zellen schonend in 100 µl RPMI-Medium ausgesät und für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Aktivatoren (ebenfalls in 100 µl RPMI gelöst) auf die Zellen gegeben (Endkonzentration: 100 nM PMA; 4 µM Calcium-Ionophor). Unstimulierte Kontrollen erhielten nur das RPMI-Trägermedium. Die Inkubationszeiten betragen 2 h für Calcium-Ionophor und 3 h für alle anderen Bedingungen. Die Aktivierung wurde durch 200 µl 4 % Paraformaldehyd abgestoppt. Anschließend wurde entweder direkt gefärbt oder die Zellen wurden bei 4°C gelagert. Hierfür wurde die Kulturplatte mit Parafilm® eingehüllt und mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt.

2.10 Herstellen von Plasma aus Mäuseblut

Blut wurde mit Citrat-Puffer antikoaguliert (Volumenverhältnis 10:1), für 5 min bei 6.000 rpm (rounds per minute) in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues, steriles Reaktionsgefäß umpipettiert und für 5 min bei 13.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann abgenommen, in ein neues steriles Reaktionsgefäß pipettiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Plasma wurde bei -80°C gelagert.

2.11 Messung freier DNA

Die Messung der freien DNA erfolgte aus Plasma der Mäuse mit dem Quant-iT™ PicoGreen® Kit und einem Mikroplattenphotometer (Appliskan). Die Bestimmung der freien DNA beruhte dabei auf Immunfluoreszenz. Dabei korreliert die Stärke der Fluoreszenz positiv mit der Menge freier DNA im Plasma. Das Quant-iT™ PicoGreen® Kit bestand aus den Komponenten A (dsDNA Reagenz in DMSO), B (20 x TE-Puffer aus 200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7,5) und C (DNA Standard; 100 µg/ml in TE).

Zunächst wurde eine Arbeitslösung aus den Komponenten A und B (letztere 1 : 19 mit H₂O verdünnt) in einem Verhältnis von 1:20 gemischt und die DNA Standardreihe (aus 2 µg/ml DNA Grundlösung) hergestellt. Sieben Standard-Konzentrationen wurden verwendet: 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,125 µg/ml, 62,5 ng/ml und 31,25 ng/ml.

Danach wurden die Plasma-DNA-Proben in einem Verhältnis von 1:4 mit TE-Puffer verdünnt und je 50 µl des DNA-Standards und der zu untersuchenden DNA Proben in die 96-*well*-Platten pipettiert. Es kamen jeweils 50 µl der Arbeitslösung aus Komponente A hinzu. Bei Dunkelheit ließ man das Reagenz zwei bis fünf Minuten inkubieren. Die Proben wurden im Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Emission wurde bei 538 nm gemessen. Die Messdauer betrug 500 ms. Aus den Rohdaten wurde die Konzentration freier DNA im Plasma berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 NETose durch Calcium-Ionophor und PMA *in vitro* erfolgt TLR-unabhängig

Wildtyp (C57/BL6)-, MyD88- defizienten und MyD88/TLR-defizienten Mäusen wurde Blut abgenommen und daraus neutrophile Granulozyten isoliert. Letztere wurden mit PMA oder CaIo stimuliert sowie mit Antikörpern gegen H3cit und Hoechst gefärbt. Der Anteil H3cit-positiver an allen Zellkernen wurde fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. So wurde evaluiert, ob MyD88 beziehungsweise TLR eine Rolle bei der NETose spielen (Abb. 7).

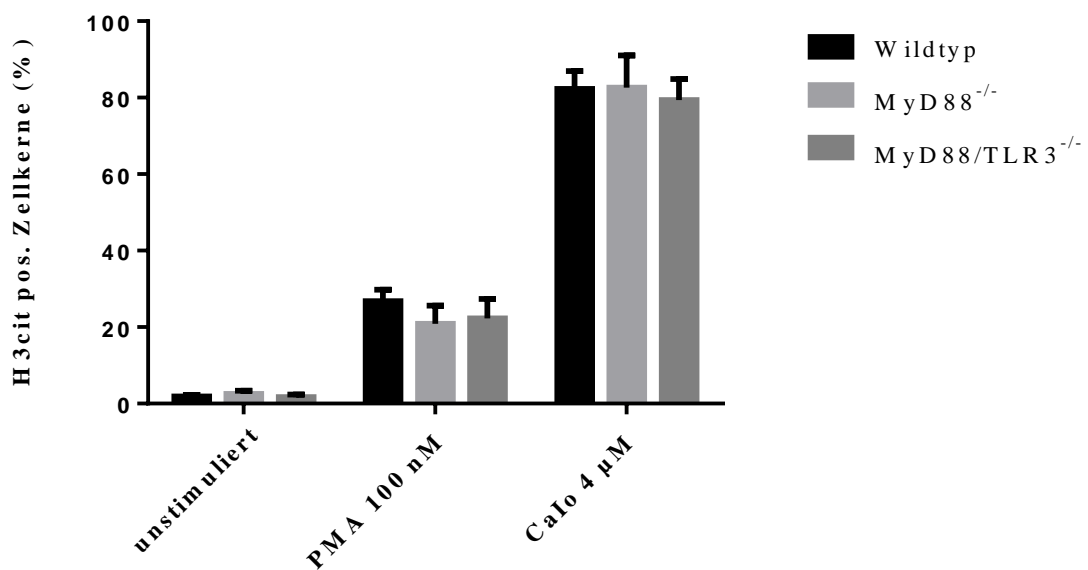


Abbildung 7: Mittelwerte der H3cit-Positivität der Granulozyten verschiedener Mauslinien unter dem Einfluss von Aktivatoren. Der Standardfehler wird als Fehlerbalken dargestellt. Die Zahlen der für jede Bedingung untersuchten Versuchstiere sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Zahlen der Versuchstiere zu Abbildung 7

Behandlung der Neutrophilen	Wildtyp	MyD88-defizient	MyD88/TLR3-defizient
unstimuliert	12	7	6
PMA (100 nm)	12	7	6
CaIo (4 µM)	10	4	6

Die H3cit-Aktivierung unstimulierter Granulozyten beträgt durchschnittlich weniger als 5 %. Dies legt nahe, dass keine mechanische Aktivierung der NETs bei der Aufbereitung stattgefunden hat. Mit PMA und CaIo wird eine konstante Stimulation der Granulozyten erreicht.

Bei der Stimulation mit PMA haben sich keine signifikanten ($p > 0,05$) Unterschiede herausgestellt. Die Aktivierungsraten betragen 20,91 % (MyD88-defizient), 26,82 % (Wildtyp) und 22,28 % (MyD88/TLR3-defizient). PMA als potenter und zuverlässiger Aktivator der Proteinkinase C induziert NETose also unabhängig von TLRs oder MyD88. Somit ist hier von der alleinigen Wirkung als Struktur analogon zu Diacylglycerin auszugehen, die zu einer Aktivierung der Proteinkinase C führt.

Calcium-Ionophor induziert NETose ebenfalls sehr stark. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und mutierten Mäusen festgestellt werden. Die Aktivierungsraten betragen 82,63 % (MyD88-defizient), 82,26 % (Wildtyp) und 79,36 % (MyD88/TLR3-defizient). Auch CaIo stimuliert die NETose somit unabhängig von TLR.

3.2 NETs spielen eine wichtige Rolle in der frühen Entzündungsphase

Um den Einfluss der NETs auf Psoriasis besser zu verstehen, ist der Zeitpunkt ihres Auftretens im IL-23-induzierten Mausmodell untersucht worden. Dazu sind Mausohren intradermal mit IL-23 oder PBS für unterschiedliche Zeitdauern behandelt worden (Versuchsreihe 2 in Abb. 8). Zusätzlich sind die Ohrdickenunterschiede bis einschließlich Tag fünf der Mausversuchsreihe 1 hinzugefügt worden.

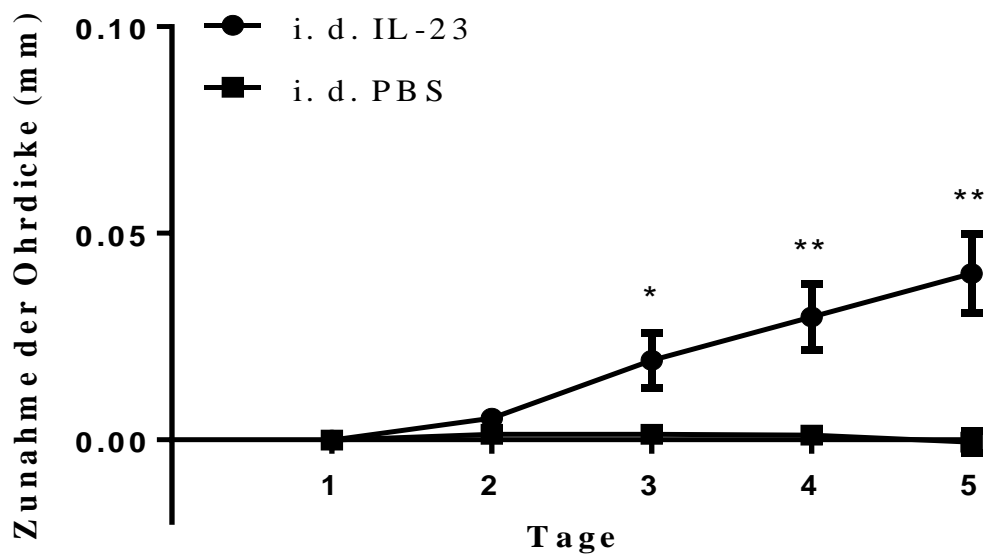


Abbildung 8: Unterschiede in der Ohrdickenzunahme zwischen IL-23- und PBS-behandelten Wildtyp C57/B16-Mäusen. Die Werte der Y-Achse zeigen die Differenzen der Dicken der jeweils rechten und linken Ohren. Der Fehlerbalken entspricht dem Standardfehler. Intradermale Injektionen fanden jeden Tag, außer Tag fünf statt. (n (IL-23) = 10 Mäuse, n (PBS) = 9 Mäuse).

IL-23-behandelte Mäuse zeigen im Vergleich zu PBS-behandelten Mäusen eine signifikante Zunahme der Ohrdicke. Die Signifikanz der Ohrdickenzunahme besteht durchgängig von Tag drei bis zum Versuchsende an Tag fünf. Zusätzlich sind am Versuchsende (Tag fünf) histologische Präparate angefertigt worden (Abb. 9 und Abb. 10; PBS-Kontrolle in Abb. 11). H3cit positive Kerne (als NETose-Marker) sind diffus über das gesamte Ohr verteilt. H3cit positive Areale sind außerdem mit Ly6G-positiven Zellen (neutrophilen Granulozyten) kolokalisiert. Dieses Muster deutet auf die Bildung von NETs hin.

Abb. 10 zeigt einerseits die Überlagerung H3cit-positiver Strukturen und neutrophiler Granulozyten. Andererseits wird das typische Aussehen extrazellulärer *Traps* deutlich: ein sphärisches Aussehen mit intensiven und weniger intensiv angefärbten Arealen. Außerdem wirken sie, für NETs typisch, leicht unscharf und verteilen sich diffus in der Umgebung.

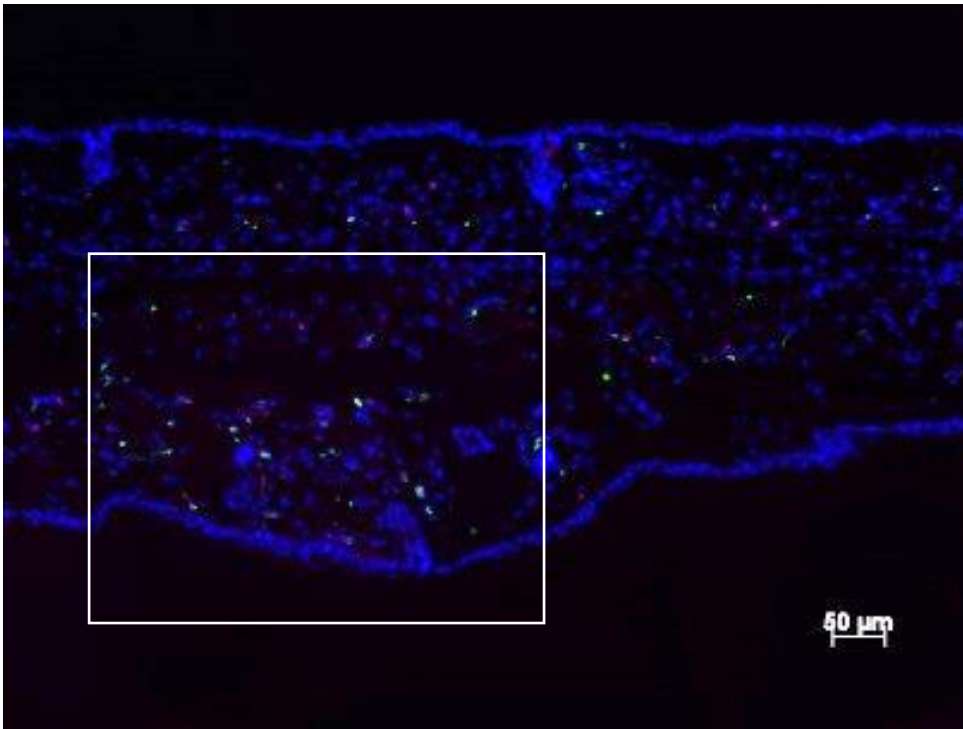


Abbildung 9: Ausschnitt eines histologischen Präparates eines für fünf Tage IL-23-behandelten Mausohres. Angefärbt wurde DNA (blau), H3cit (grün) und Ly6G (rot). Maßstabsbalken = 50 μm . Der weiß markierte Bereich wird in Abb. 10 vergrößert dargestellt.

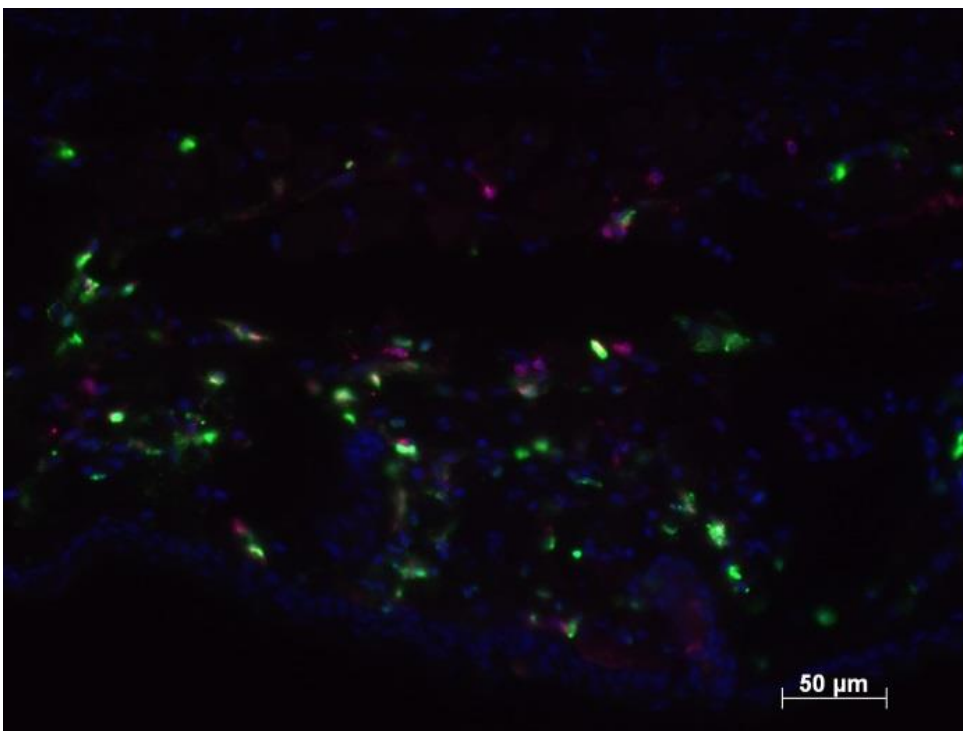


Abbildung 10: Vergrößerter Ausschnitt von Abbildung 9 (weiße Markierung). Maßstabsbalken = 50 μm .

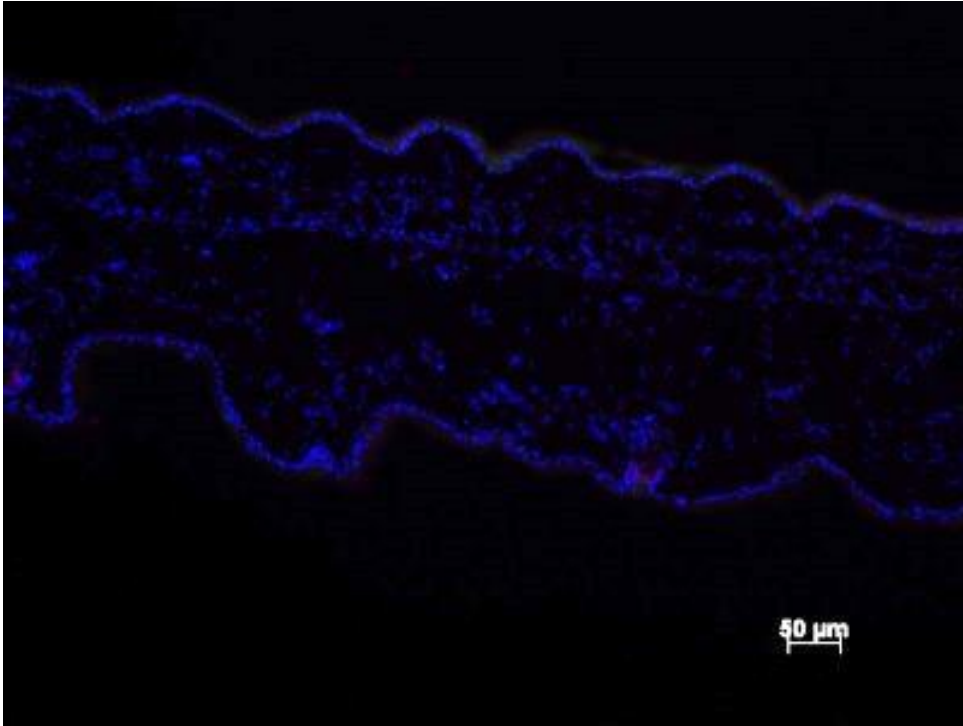


Abbildung 11: Histologisches Präparat eines für 5 d PBS-behandelten Mausohres. Angefärbt wurde wieder DNA (blau), H3cit (grün) und Ly6G (rot). Maßstabsbalken = 50 μm .

In den PBS-behandelten Ohren zeigen sich keine H3cit-positiven Kerne und keine Überlagerung mit Ly6G-positiven Zellen (Abb. 11). Für NETose typische Strukturen sind somit nicht nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die tägliche Applikation von IL-23 über fünf Tage zu einer signifikanten Zunahme der Ohrdicke, verglichen zur täglichen Applikation von PBS, führt. Zudem sind nach fünf Tagen keine NETs in den histologischen Präparaten der PBS-behandelten Ohren zu erkennen. Die IL-23-behandelten Mäuse hingegen zeigen eine diffuse Verteilung von NETs im geschwollenen Ohr. Intradermale Injektionen führen also neben einer Entzündungsreaktion in Form einer Ohrdickenzunahme zu einem vermehrten Vorkommen von NETs.

Zur Evaluierung der zeitlichen Komponente erfolgte eine Verlängerung der intradermalen Injektionen auf insgesamt zehn Tage.

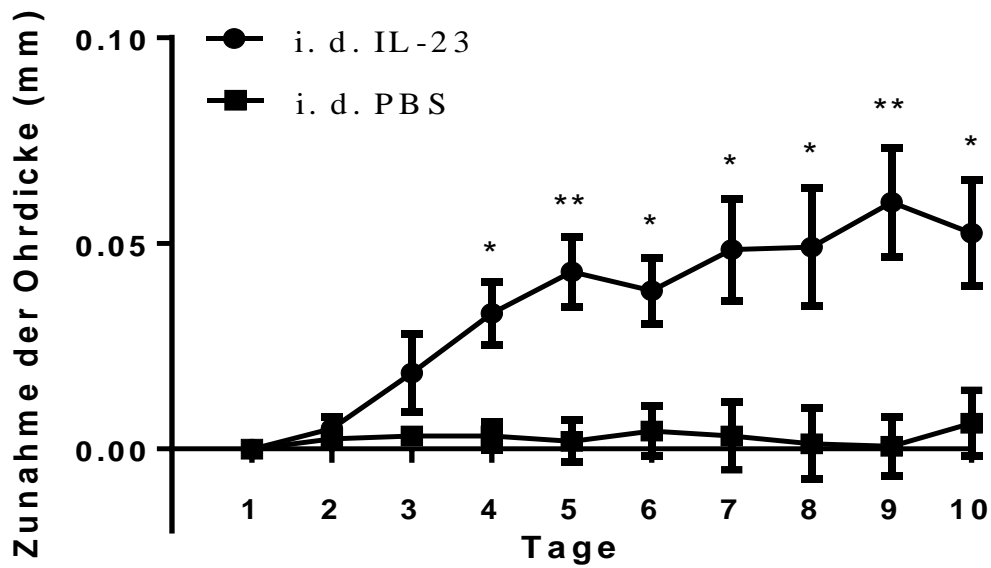


Abbildung 12: Unterschiede in der Ohrdickenzunahme zwischen IL-23-behandelten und PBS-behandelten Mäusen. Die Zunahme entspricht der Differenz der Ohrdicke zwischen rechtem und linkem Ohr. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler. Intradermale Injektionen haben jeden Tag, außer Tag zehn, stattgefunden. (n (IL-23) = 5, n (PBS) = 4)

Die IL-23-behandelten Mäuse zeigen, wie im fünftägigen Versuch, im Vergleich zu den PBS-behandelten Mäusen eine signifikante Zunahme der Ohrdicke (Abb. 12). Signifikante Ohrdickenunterschiede bestehen ab Tag vier bis zum Versuchsende an Tag zehn. Auch hier sind am Versuchsende (Tag zehn) histologische Präparate angefertigt worden (Abb. 13 und Abb. 14)

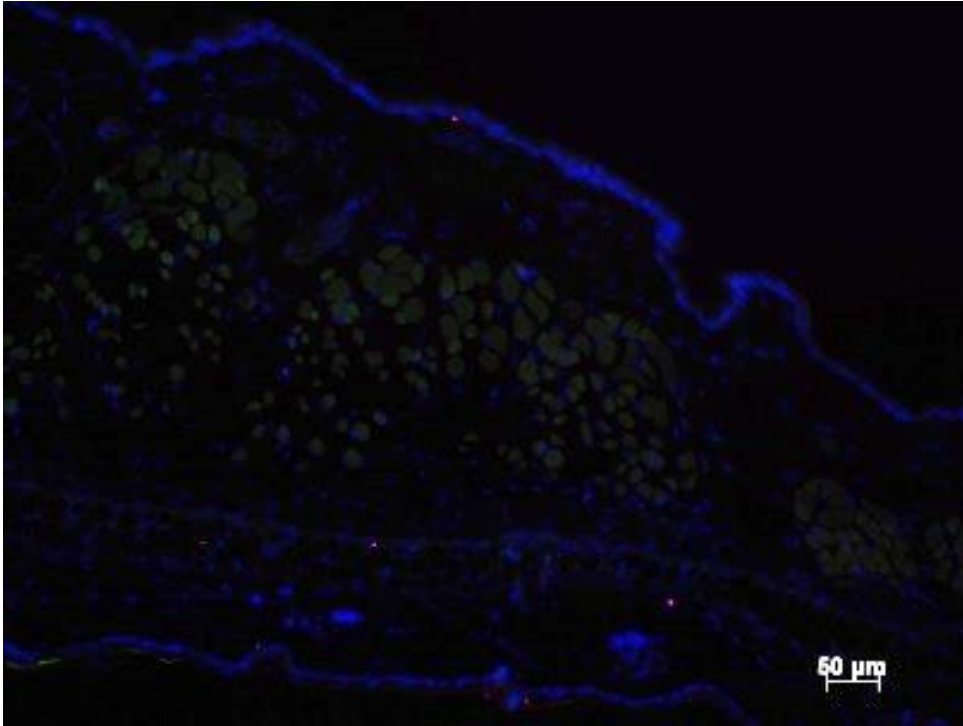


Abbildung 13: Histologisches Präparat eines für zehn Tage IL-23-behandelten Mausohres. Gefärbt wurde DNA (blau), H3cit (grün) und Ly6G (rot). Maßstabsbalken = 50 μm .

Das in Abbildung 13 dargestellte histologische Präparat des Ohres zeigt einzelne neutrophile Granulozyten im Sichtfeld. Extrazelluläre *Traps* kommen nachweislich nicht vor. Somit kann ein wesentliches Vorkommen von *Neutrophil Extracellular Traps* ausgeschlossen werden.

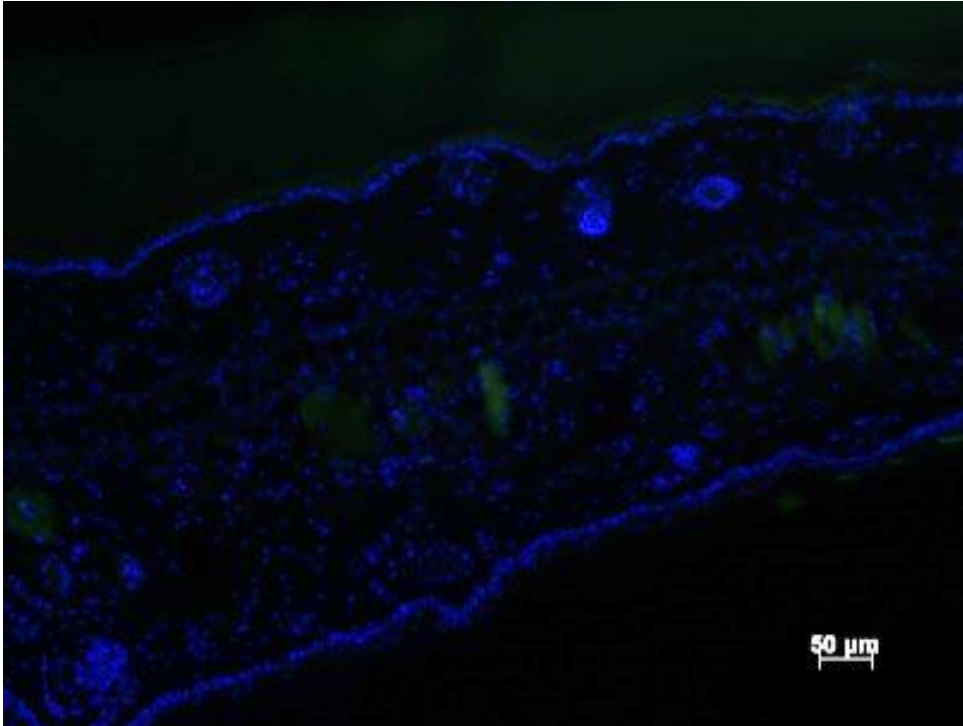


Abbildung 14: Histologisches Präparat eines für zehn Tage PBS-behandelten Mausohres. Gefärbt wurde DNA (blau), H3cit (grün) und Ly6G (rot). Maßstabsbalken = 50 μm .

In dem in Abbildung 14 dargestellten Präparat können ebenfalls keine extrazellulären *Traps* nachgewiesen werden. Zudem zeigen sich keine mit Ly6G angefärbten Strukturen. Neutrophile Granulozyten kommen somit ebenfalls nicht maßgeblich vor.

IL-23-behandelte Mäuse und PBS-behandelte Mäuse zeigen nach zehntägiger Behandlung signifikante Unterschiede hinsichtlich einer Ohrdickenschwellung. Histologisch zeigen sich jedoch keine wesentlichen Vorkommen von NETs oder neutrophilen Granulozyten.

Als Resümee der über fünf und zehn Tage verlaufenden Versuche können somit folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

Zum einen führt die intradermale Injektion von IL-23 zu einer signifikanten Ohrdickenzunahme im Vergleich zu einer intradermalen Injektion von PBS. Zum anderen können im fünf Tage andauernden Versuch in den IL-23-behandelten Mausohren NETs nachgewiesen werden. Im zehn Tage andauernden Versuch können dagegen keine NETs mehr nachgewiesen werden.

Es zeigt sich also, dass NETs innerhalb der frühen Phase der Entzündung präsent gewesen sind, während sie in der späteren zeitlichen Folge nicht nachgewiesen wurden.

3.3 Systemische DNase-1-Applikation hemmt die psoriasiforme Entzündung

Um die funktionelle Bedeutung der in der frühen Entzündungsphase nachgewiesenen NETs zu klären, ist DNA als Hauptbestandteil der NETs *in vivo* (in C57/Bl6-Mäusen) mit DNase 1 hydrolysiert worden.

Während die Dicke der intradermal mit IL-23-behandelten Mausohren zunimmt, bleibt dieser Anstieg in den mit IL-23 und (systemisch) mit DNase 1-behandelten Ohren vollständig aus. Signifikante Unterschiede bestehen ab Tag zwei bis zum Versuchsende an Tag fünf. Der frühe zusätzliche Einsatz der DNase 1 führt also zu einer Inhibition der Ausprägung des psoriasiformen Phänotyps (Abb. 15, 16 und 17).

IL-23-Behandlung führt zu vielen H3cit positiven Kernen und NETs, die diffus über das gesamte Ohr verbreitet sind (Abb. 16). DNase 1 verhindert die NETose vollständig (Abb. 17). Somit liegt nahe, dass die Ohrdickenzunahme mit der Präsenz von NETs zusammenhängt.

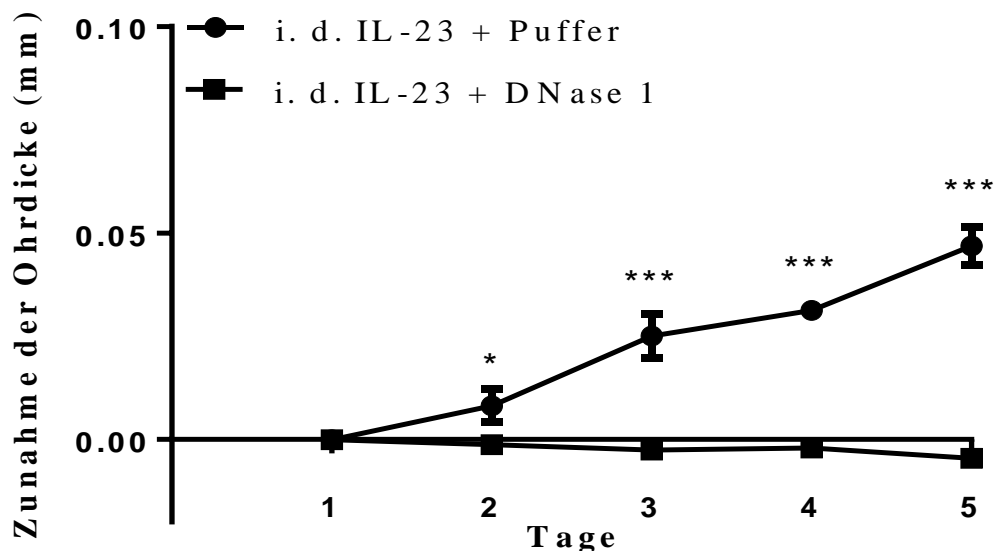


Abbildung 15: Unterschiede in der Ohrdickenzunahme zwischen IL-23 und DNase 1-behandelten Mäusen und IL-23 + Puffer-behandelten Mäusen. Der Fehlerbalken spiegelt den Standardfehler wieder. Intradermale Injektionen haben jeden Tag, außer Tag fünf stattgefunden. (n IL-23 + DNase 1: 6, n IL-23 + Puffer:4)

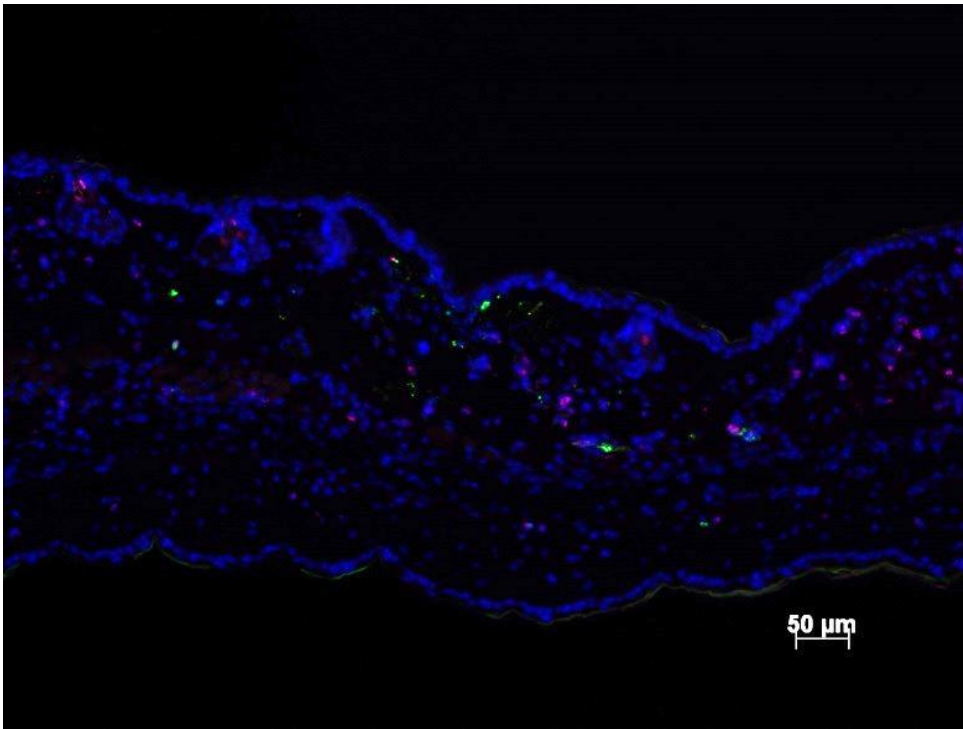


Abbildung 16: Histologisches Präparat eines IL-23-behandelten Mausohres. Zusätzlich ist die Applikation von DNase 1-Vehikel erfolgt. Angefärbt ist DNA (blau), H3cit (grün) und Ly6G (rot). Maßstabsbalken = 50 µm.

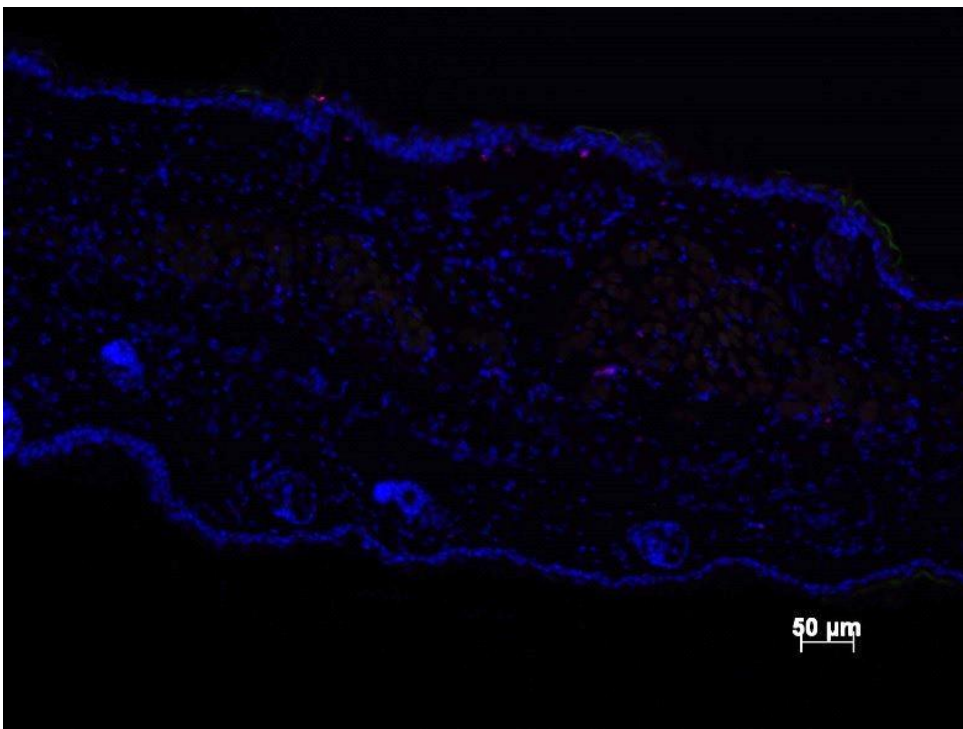


Abbildung 17: Histologisches Präparat eines Mäuseohres. Die Maus ist i. d. mit IL-23 behandelt worden. Zusätzlich ist die Applikation von DNase 1 erfolgt (vgl. Mausversuchlinie 3) Angefärbt ist DNA (blau), H3cit (grün) und Ly6G (rot). Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

3.4 Intradermale Injektionen mit Interleukin-23 lösen keine erhöhte systemische Bereitschaft zur Bildung von *Neutrophil Extracellular Traps* aus

Die Psoriasis ist, wie in 1.1 beschrieben, eine Systemerkrankung. Somit ist eine wichtige Frage, inwiefern die NETs bei dem verwendeten Mausmodell Einfluss auf den Gesamtorganismus nehmen. Daher ist die Konzentration der freien DNA als Surrogat-Parameter für systemische NETose im Serum der Mäuse gemessen worden. Dabei ist zu beachten, dass es noch weitere Quellen freier DNA im Serum gibt (beispielsweise apoptotische Zellen). Weder Injektionen von IL-23 noch von IL-23 und DNase 1 führen zu einer signifikanten Veränderung der freien DNA (Abb. 18). Im Gegensatz führt auch die systemische Applikation von DNase 1 zu keiner Reduktion der Konzentration von freier DNA im Serum der Mäuse. Die NETs zeigen sich somit spezifisch in dem Organ, in diesem Fall dem Ohr, in welchem die Behandlung mit IL-23 stattgefunden hat. Der Einfluss der NETs auf die Pathogenese der psoriasisformen Entzündung ist in diesem Modell somit lokal begrenzt. Dieser lokale Prozess hat sich durch systemische Applikation von DNase 1 effektiv verhindern lassen.

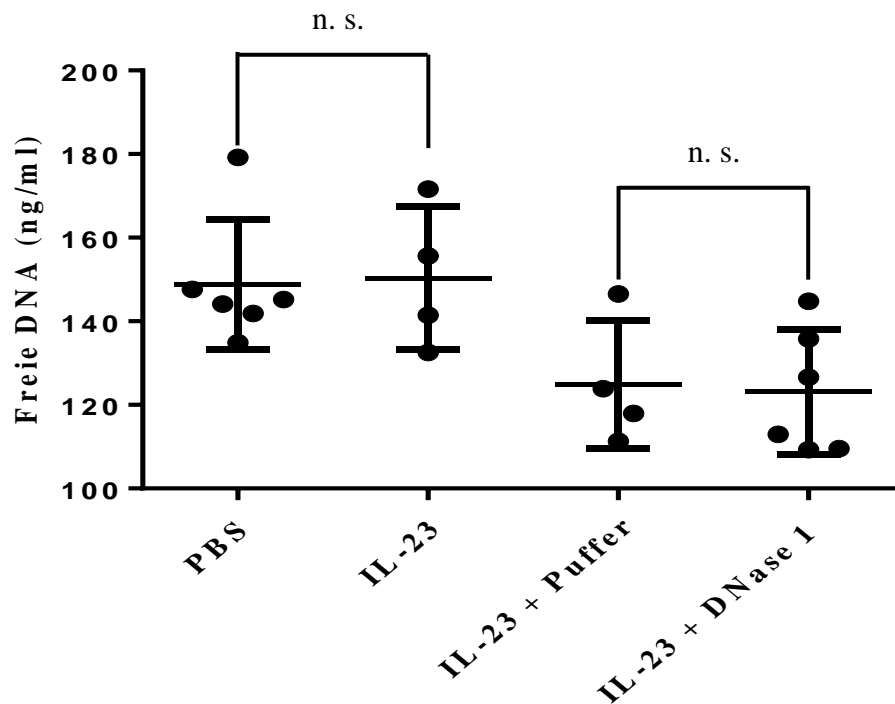


Abbildung 18: Ergebnisse der Messung der freien DNA in Serumproben der Mäuse. Der Standardfehler wird als Fehlerbalken dargestellt. (n (PBS) = 6, n (IL-23) = 4, n (IL-23 + Vehikel) = 4, n (IL-23 + DNase 1) = 6), n. s.: nicht signifikant.

4. Diskussion

Die Erkenntnis, dass IL-17 eine Hauptrolle in der chronischen Entzündung der Psoriasis spielt, hat die medikamentöse Therapie dieser Erkrankung revolutioniert. So wurden Antikörper gegen IL-17A (Secukinumab, Ixekizumab) und seinen Rezeptor (Brodalumab) entwickelt, die hervorragend wirken. Dieses Beispiel zeigt, dass grundlegendes Wissen zur Pathogenese die Entwicklung neuer Therapien entscheidend verbessern kann.

Die Rolle der NETs bei der Pathogenese der Psoriasis ist noch nicht vollends geklärt, weswegen kontinuierliche Forschung unabdingbar ist, um auch hier weitere Therapieansätze zu identifizieren. Diese Arbeit hat gezeigt, dass NETs in einem Mausmodell der frühen Phase einer psoriasiformen Erkrankung vorkommen. Dies ist mit der phänotypischen Ausprägung der Entzündung assoziiert. NETs könnten also auch bei der Psoriasis eine therapeutische Zielstruktur sein.

4.1 NETs als mögliche therapeutische Zielstrukturen in der Psoriasis

NETose ist mit vielen Erkrankungen assoziiert. Diese Zusammenhänge sind bislang oft lediglich deskriptiv. Es gibt jedoch auch Krankheiten, bei denen ein funktioneller Zusammenhang hergestellt und aufgezeigt werden kann. Eine davon ist der systemische Lupus erythematoses, bei dem der mangelnde Abbau der NETs gemeinsam mit weiteren pathologischen Prozessen zu der Lupusnephritis führen kann (Hakkim et al. 2010). Der Einfluss auf die Pathogenese bietet somit die Möglichkeit einer gezielten pharmakologischen Intervention. Prinzipiell kann man dabei verschiedene Ansätze unterscheiden: Zum einen ist es möglich, die NETose als solche zu inhibieren oder zu reduzieren. Somit kommt es erst gar nicht zur Freisetzung der NETs. Zum anderen besteht die Möglichkeit, bereits freigesetzte NETs in ihrer Funktion einzuschränken oder sie abzubauen.

Bezüglich der Inhibition der NETose liegt es nahe, bereits bekannte Schlüsselenzyme, beispielsweise PAD4, zu adressieren. PAD4 spielt in der Entstehung der NETs durch die Citrullinierung der Histone eine wichtige Rolle. PAD4-defiziente Mäuse sind nicht in der Lage, NETs zu bilden (Li et al. 2010). Auch die pharmakologische Inhibition von PAD4 scheint eine große Wirkung auf die Entstehung von NETs zu haben. Chloramidin ist ein potenter Inhibitor aller Peptidyl-Arginin-Deiminasen (pan-PAD4-Inhibitor), vornehmlich PAD1-4.

Es inhibiert auch PAD4 und in der Folge die Histon-3-Citrullinierung sowie die NETose humaner neutrophiler Granulozyten (Kusunoki et al. 2016).

Auch die Wirkung kleinmolekularer spezifischer PAD4-Inhibitoren wie GSK199 und GSK484 konnte gezeigt werden. *In vitro* Versuche belegen, dass humane und murine neutrophile Granulozyten nach Behandlung mit GSK199 und GSK484 durch CaIo oder *Staphylococcus aureus* keine NETs bilden können (Lewis et al. 2015). Dies untermauert, dass PAD4 wichtig für die NETose ist.

Es können jedoch auch unerwünschte Nebenwirkungen durch PAD-Inhibitoren auftreten. In Mausversuchen führte Defizienz oder Inhibition von PAD4 zu einer reduzierten Abwehrlage gegen Streptokokken der Gruppe A (Li et al. 2010).

Ob PAD4 einen unmittelbaren Einfluss auf die Pathogenese der Psoriasis nimmt, ist unklar. In der menschlichen Epidermis selbst sind PAD1-3 nachzuweisen (Méchin et al. 2007). In psoriatischen Hautläsionen, insbesondere Munro-Mikroabszessen, finden sich zahlreiche neutrophile Granulozyten. Diese Zellen können PAD4 auf ihrer Oberfläche präsentieren (Zhou et al. 2017). Es ist somit denkbar, dass durch das vermehrte extrazelluläre Vorkommen von PAD4 eine konzentrationsabhängige Überaktivierung stattfinden könnte. Falls dies zutrifft, könnten, ähnlich wie bei rheumatoider Arthritis, Antikörper gegen citrullinierte Peptide auch bei Psoriasis vorhanden sein.

Beim systemischen Lupus erythematoses, als Beispiel für eine durch NETs stark beeinflusste Erkrankung, bauen einige Patienten NETs vermindert ab (Hakkim et al. 2010). Die in den NETs freigesetzte DNA wäre eine mögliche pharmakologische Zielstruktur, beispielsweise für DNasen. Bezogen auf den SLE konnten mehrere Arbeitsgruppen weitere Erkenntnisse im Umgang mit DNase gewinnen. Studien an Mäusen zeigten dabei unterschiedliche Resultate, von einem verlängertem Überleben bis hin zu unveränderten Ergebnissen im Vergleich zur Placebo Gruppe (Macanovic et al. 1996; Verthelyi et al. 1998). Eine Phase 1b Studie an 17 Patienten mit SLE, die mit rekombinanter humaner DNase behandelt wurden, zeigte keine nennenswerten Nebenwirkungen, allerdings auch keinen klinischen Nutzen (Davis et al. 1999). Bei der Mukoviszidose, bei der NETs in den Atemwegen nachgewiesen wurden und mutmaßlich eine Rolle bei der Ausprägung der Erkrankung spielen, wird DNase als inhalatives Therapeutikum angewandt.

Bei Psoriasis, bei der freie DNA mit LL37 komplexiert und dann durch Aktivierung von TLR9 pathogen wirkt, ist denkbar, dass Patienten auch einen reduzierten NET-Abbau oder eine vermehrte NET-Bildung aufweisen könnten.

Tatsächlich gibt es bereits Hinweise darauf, dass Patienten mit Psoriasis im Vergleich zu Kontrollgruppen eine erhöhte Neigung zur NETose nach Stimulation zeigen (Hu et al. 2016). Freie DNA und NET-gebundene DNA könnte als Ziel für DNase 1 fungieren. In dieser Arbeit war DNase 1 in Mäusen ein potentes Therapeutikum gegen NETs in der akuten Phase der Entzündung. Freigesetzte Zytokine hingegen würden von der DNase 1 nicht erfasst. Als denkbarer Applikationszeitpunkt wäre somit eine akute Exazerbation der Psoriasis, aber auch anderer Erkrankungen wie akuter Thrombose oder Infektionen.

Ein weiteres Medikament, welches bereits seit Jahrzehnten bei der Psoriasis eingesetzt wird, ist Dimethylfumarat. Dieses Therapeutikum ist dosisabhängig in der Lage, eine durch PMA ausgelöste NET-Freisetzung zu reduzieren (Müller et al. 2016). Es könnte also sein, dass NETs beim Menschen in der Pathogenese der Psoriasis involviert sind und (indirekt) durch etablierte Therapeutika gehemmt werden.

4.2 Das Wechselspiel zwischen LL37 und NETs

LL37 und DNA bilden Komplexe, die plasmazytoide Zellen aktivieren und so eine inflammatorische Kaskade in Gang setzen. Es scheint daher, dass ein Überschuss an freier DNA, beispielsweise durch eine hohe NETose-Rate und einer damit verbunden höheren Konzentration von LL37/DNA-Komplexen, zur Auslösung oder Exazerbation einer Psoriasis führen kann, da diese Komplexe pDCs aktivieren. Die Komplexe aus DNA und LL37 können auch als Autoantigen wirken. Durch Komplexe mit LL37 sowie durch erhöhte zytosolische DNA-Konzentrationen wird durch Aktivierung von Inflammasomen eine Erhöhung von IL-1 β ausgelöst (Dombrowski et al. 2011; Lande et al. 2014). Interessanterweise kommt LL37 in NETs auch unabhängig von Psoriasis vor (Kessenbrock et al. 2009). Es ist somit möglich, dass erst eine erhöhte Präsentation von LL37 mit eigener DNA zu einer Exazerbation führt (Abb. 19).

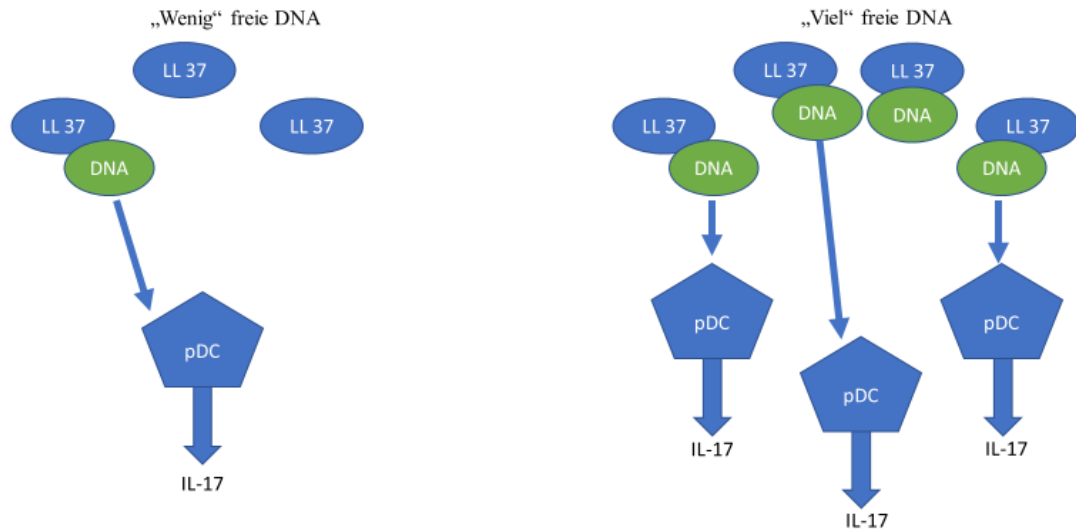


Abbildung 19: Komplexe aus LL37 und freier DNA aktivieren pDCs. Vermehrte freie DNA könnte zu vermehrter Komplexbildung mit LL37 und somit zu einer erhöhten IL-17- Freisetzung führen.

Auch LL37 selbst kann NETose auslösen (Neumann et al. 2014b; Hosoda et al. 2017). Dies ist ein äußerst interessanter Ansatz, der erklärbar macht, wie die chronische Entzündung bei Psoriasis aufrechterhalten werden könnte. Durch das in psoriatischer Epidermis vermehrt gebildete LL37 könnten immer wieder NETs entstehen, welche DNA freisetzen und wieder Komplexe mit LL37 bilden. So käme es zu einer kontinuierlichen Aktivierung der Entzündungskaskade. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Komplexe aus LL37 und DNA eine erhöhte Resistenz gegen bakterielle Nukleasen im Vergleich zu freier DNA ohne LL37-Anwesenheit aufweisen (Neumann et al. 2014a). Somit ist auch eine längere Lebensdauer dieser Komplexe denkbar und eine andauernde Aktivierung der pDCs mit folglich Mehrausschüttung inflammatorischer Zytokine anzunehmen.

Demgegenüber stehen Erkenntnisse, dass LL37 auch drosselnd auf autoimmune Reaktionen des Körpers wirken kann. So bindet LL37 DNA im Zytosol von Keratinozyten und reduziert damit die Freisetzung von IL-1 β (Dombrowski et al. 2011)

Zudem steht LL37 im direkten Kontakt zu PADs. PAD2 und PAD4 können LL37 citrullinieren (Kozziel et al. 2014; Wong et al. 2018). LL37 bindet auch Lipopolysaccharide und vermindert so deren Präsentation an Immunzellen. PAD4-behandeltes LL37 ist dagegen nicht mehr in der Lage dieses LPS zu binden (Kozziel et al. 2014), wodurch die antimikrobielle Wirkung von LL37 reduziert wird. Ebenso wird durch Citrullinierung die Fähigkeit von LL37 vermindert, pDCs zu aktivieren (Wong et al. 2018).

Einerseits ist somit denkbar, dass durch das Freisetzen von NETs proinflammatorische Kaskaden, von denen der Organismus primär profitieren soll, wie der Infektionsabwehr, in Gang gesetzt werden. Andererseits werden bereits bei der NETose regulatorische Enzyme wie PADs freigesetzt, um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern. Eine ausgeglichene PAD-Aktivität erscheint somit wichtig, um das Gleichgewicht zwischen ausreichend hoher Immunantwort und zu starker Immunantwort mit eventuell erhöhter NET-Bildung zu wahren.

4.3 Der Zusammenhang zwischen Toll-like Rezeptoren, NETs und Psoriasis

Mehrere Aktivatoren der NETose, beispielsweise Lipopolysaccharide und Imiquimod, agieren über die Stimulierung von TLRs. Klinische Beobachtungen haben einen Zusammenhang zwischen bakteriellen Infektionen und der Exazerbation von Psoriasis gezeigt. Somit könnte durch übermäßige TLR-Stimulation eine Psoriasis ausgelöst oder verschlimmert werden. Bei bakteriellen Infektionen mit Exazerbation einer Psoriasis ist somit denkbar, dass Pharmaka gegen NETs oder deren Bestandteile, wie DNase 1, therapeutisch wirken könnten. Dies ist jedoch eine sehr eingeschränkte Sicht. Antimalariamittel wie Chloroquin sind einerseits in der Lage, die NET-Produktion *in vitro* zu inhibieren (Smith et al. 2014), andererseits können sie auch eine Psoriasis provozieren. Antimalariamittel wirken teilweise über eine TLR-Inhibition (Yasuda et al. 2008). Dies ist von Bedeutung, weil NETs sowohl NADPH-abhängig als auch NADPH-unabhängig ausgelöst werden können. Ob nun bei einer Chloroquin-induzierten Psoriasis initial NETs nachzuweisen sind, ist nicht bekannt. Neben der aktivierenden Funktion der TLRs bei der NETose liegen keine weiteren Daten über eventuelle regulatorische Eigenschaften für die NETose vor. Allerdings erfolgt die Aktivierung der NETose über PMA und CaIo unabhängig von TLRs, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. TLRs wirken unterschiedlich auf entzündliche Signalwege. So bewirkt die Stimulation von TLR 2/6, 2/1 und 7 eine erhöhte CXCL16-Freisetzung (ein Chemoattraktans bei der Psoriasis), eine Stimulation von TLR 4 und 7/8 hingegen eine deutliche Reduktion der Ausschüttung von CXCL16 im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen (Steffen et al. 2017). Insgesamt ist eine TLR-vermittelte Regulation denkbar, bei der einerseits TLR-Stimulation zur Aktivierung neutrophiler Granulozyten und NET-Bildung führt, gleichzeitig aber inhibitorische Signale anderer TLRs überschießende Immunreaktionen verhindern.

4.4 Der Einfluss von NETs auf die Pathogenese der Psoriasis

Früher wurden TH17-Zellen als Hauptquelle des IL-17 bei der Psoriasis betrachtet. Im Jahr 2011 kamen dann Hinweise auf, dass neutrophile Granulozyten und Mastzellen sehr viel IL-17 freisetzen. Zunächst wurde die Kolokalisation von NETs und IL-17 in psoriatischen Hautschnitten entdeckt (Lin et al. 2011). Darüber hinaus wurde postuliert, dass durch die NETose das IL-17 freigesetzt wird (Lin et al. 2011) und dass neutrophile Granulozyten selbst IL-17 produzieren und während der NETose freisetzen (Keijsers et al. 2014b).

Diese Arbeit zeigt, dass NETs mit einer IL-23-induzierten murinen psoriasiformen Entzündung zusammenhängen. Somit kann gefolgert werden, dass durch die NETose IL-17 freigesetzt wird und zur Ohrschwellung beiträgt. Das hier verwendete IL-23-induzierte Modell spiegelt damit einen wichtigen pathogenetischen Aspekt der menschlichen Psoriasis wieder (Schön und Erpenbeck 2018). Beim häufig genutzten und einfach zu generierenden Imiquimod-induzierten Modell sind nämlich $\gamma\delta$ -Zellen die Hauptquellen des IL-17 (Cai et al. 2011) und die Penetranz hängt sehr von Mausstamm und Geschlecht ab (Swindell et al. 2017). Fragen für zukünftige Studien sind beispielsweise, ob IL-23 direkt NETose auslösen kann und inwieweit die Inhibition der NETose auch auf menschliche Psoriasis wirkt.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Evidenz zur Rolle von *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) bei der Psoriasis verdichtet sich, aber viele Aspekte sind noch unklar.

Zunächst ist im Zuge dieser Arbeit die TLR-Abhängigkeit der NETose durch PMA und CaIo untersucht worden. Hierzu sind *In-vitro*-Versuche mit Wildtyp-, MyD88- und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen erfolgt. Innerhalb der unterschiedlichen Mausreihen zeigen sich keine signifikanten Differenzen bezüglich eines vermehrten Auftretens von NETs nach Stimulierung von PMA und CaIo.

Weiterhin ist im Zuge dieser Arbeit ein Mausmodell etabliert worden, welches eine Hautentzündung auslöst und die makroskopischen, histologischen und pathophysiologischen Charakteristika der Psoriasis aufweist. Zur Evaluierung einer zeitlichen Komponente ist die Durchführung an zwei verschiedenen Mausreihen erfolgt. Einerseits über fünf Tage, andererseits über zehn Tage. Hier zeigt sich ein Vorkommen von NETs in histologischen Präparaten im fünftägigen Versuch. Im zehntägigen Versuch ist kein relevantes Vorkommen von NETs beobachtet worden. In diesem Modell ist somit das Vorkommen von NETs in frühen Phasen der psoriasiformen Entzündung nachgewiesen worden. Darauf aufbauend hat die therapeutische Hydrolyse der DNA durch systemisch verabreichte DNase 1 zum Abbau der NETs stattgefunden. Dies führt zu einer signifikanten Reduktion der Hautentzündung, sowohl auf makroskopischer als auch auf histologischer Ebene.

Ebenso ist nachweisbar, dass das NET-Vorkommen lokal begrenzt ist. Eine erhöhte systemische Neigung zur NETose findet sich nicht. Ebenso zeigt sich keine Reduktion der freien DNA durch DNase 1 in den Kontrollmäusen.

Insgesamt lässt sich also feststellen, dass die NETs beides sind: Freund und Feind. Einerseits nützlich im Kampf gegen Bakterien und Viren, andererseits in bestimmten Konstellationen schädigend für den eigenen Organismus. Ob die NETs dabei selbst pathologisch wirken, weil sie mit LL37 oder anderen Molekülen assoziiert sind und interagieren oder alleine durch ihre freigesetzten Enzyme proinflammatorisch und als Autoantigene wirken, ist weiterhin nicht komplett erforscht.

Ebenso ist weiterhin unklar, welches nun die Hauptquelle des proinflammatorisch wirkenden IL-17 ist. Diese Arbeit positioniert sich jedoch dahingehend, dass neutrophile Granulozyten durch die Bildung von NETs einen entscheidenden Einfluss auf die Pathogenese der Psoriasis haben.

6. Literaturverzeichnis

- Allen MH, Ameen H, Veal C, Evans J, Ramrakha-Jones VS, Marsland AM, Burden AD, Griffiths CEM, Trembath RC, Barker JNWN (2005): The major psoriasis susceptibility locus PSORS1 is not a risk factor for late-onset psoriasis. *J Invest Dermatol* 124, 103–106
- Arakawa A, Siewert K, Stöhr J, Besgen P, Kim SM, Rühl G, Nickel J, Vollmer S, Thomas P, Krebs S et al. (2015): Melanocyte antigen triggers autoimmunity in human psoriasis. *J Exp Med* 212, 2203–2212
- Asumalahti K, Ameen M, Suomela S, Hagforsen E, Michaëlsson G, Evans J, Munro M, Veal C, Allen M, Leman J et al. (2003): Genetic analysis of PSORS1 distinguishes guttate psoriasis and palmoplantar pustulosis. *J Invest Dermatol* 120, 627–632
- Beeler TJ, Jona I, Martonosi A (1979): The effect of ionomycin on calcium fluxes in sarcoplasmic reticulum vesicles and liposomes. *J Biol Chem* 254, 6229–6231
- Blasius AL, Beutler B (2010): Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32, 305–315
- Blauveit A, Papp KA, Griffiths CEM, Randazzo B, Wasfi Y, Shen YK, Li S, Kimball AB (2017): Efficacy and safety of guselkumab, an anti-interleukin-23 monoclonal antibody, compared with adalimumab for the continuous treatment of patients with moderate to severe psoriasis: Results from the phase III, double-blinded, placebo- and active comparator-controlled VOYAGE 1 trial. *J Am Acad Dermatol* 76, 405–417
- Boehncke WH, Schön MP (2015): Psoriasis. *Lancet* 386, 983–994
- Braun J, Sieper J (2010): Spondyloarthritis. *Z Rheumatol* 69, 425–434
- 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
- Brunoni AR, Lotufo PA, Sabbag C, Goulart AC, Santos IS, Benseñor IM (2015): Decreased brain-derived neurotrophic factor plasma levels in psoriasis patients. *Braz J Med Biol Res* 48, 711–714
- Cai Y, Shen X, Ding C, Qi C, Li K, Li X, Jala VR, Zhang HG, Wang T, Zheng J et al. (2011): Pivotal role of dermal IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in skin inflammation. *Immunity* 35, 596–610
- Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y (1982): Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257, 7847–7851
- Cather JC, Young M, Bergman MJ (2017): Psoriasis and psoriatic arthritis. *J Clin Aesthetic Dermatol* 10, S16–S25
- Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, Toy P, Werb Z, Looney MR (2012): Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 122, 2661–2671
- Chavanas S, Méchin MC, Takahara H, Kawada A, Nachat R, Serre G, Simon M (2004): Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6. *Gene* 330, 19–27

- Chew AL, Bennett A, Smith CH, Barker J, Kirkham B (2004): Successful treatment of severe psoriasis and psoriatic arthritis with adalimumab. *Br J Dermatol* 151, 492–496
- Chow OA, von Köckritz-Blickwede M, Bright AT, Hensler ME, Zinkernagel AS, Cogen AL, Gallo RL, Monestier M, Wang Y, Glass CK, Nizet V (2010): Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. *Cell Host Microbe* 8, 445–454
- Clark DJ, Kimura T (1990): Electrostatic mechanism of chromatin folding. *J Mol Biol* 211, 883–896
- Davis JC Jr, Manzi S, Yarboro C, Rairie J, Mcinnes I, Averthelyi D, Sinicropi D, Hale VG, Balow J, Austin H et al. (1999): Recombinant human DNase I (rhDNase) in patients with lupus nephritis. *Lupus* 8, 68–76
- Di Meglio P, Villanova F, Nestle FO (2014): Psoriasis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4, a015354
- Dombrowski Y, Peric M, Koglin S, Kammerbauer C, Göß C, Anz D, Simanski M, Gläser R, Harder J, Hornung V et al. (2011): Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. *Sci Transl Med* 3, 82ra38
- Dunne A, O’Neill LAJ (2003): The interleukin-1 receptor/toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003, re3
- Dwyer M, Shan Q, D’Ortona S, Maurer R, Mitchell R, Olesen H, Thiel S, Huebner J, Gadjeva M (2014): Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by migration-inhibitory factor. *J Innate Immun* 6, 765–779
- Eedy DJ, Burrows D, Bridges JM, Jones FG (1990): Clearance of severe psoriasis after allogenic bone marrow transplantation. *BMJ* 300, 908
- Erpenbeck L, Chowdhury CS, Zsengellér ZK, Gallant M, Burke SD, Cifuni S, Hahn S, Wagner DD, Karumanchi SA (2016): PAD4 deficiency decreases inflammation and susceptibility to pregnancy loss in a mouse model. *Biol Reprod* 95, 132
- 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
- Funchal GA, Jaeger N, Czepielewski RS, Machado MS, Muraro SP, Stein RT, Bonorino CBC, Porto BN (2015): Respiratory syncytial virus fusion protein promotes TLR-4-dependent neutrophil extracellular trap formation by human neutrophils. *PLoS One* 10, e0124082
- Gardembas-Pain M, Ifrah N, Foussard C, Boasson M, Saint Andre JP, Verret JL (1990): Psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation. *Arch Dermatol* 126, 1523
- Gordon KB, Blauvelt A, Papp KA, Langley RG, Luger T, Ohtsuki M, Reich K, Amato D, Ball SG, Braun DK et al. (2016): Phase 3 Trials of ixekizumab in moderate-to-severe plaque psoriasis. *N Engl J Med* 375, 345–356
- Gottlieb AB, Kubanov A, van Doorn M, Sullivan J, Papp KA, You R, Regnault P, Frueh JA (2019): Sustained efficacy of secukinumab in subjects with moderate-to-severe palmoplantar psoriasis: 2·5-year results from GESTURE, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Br J Dermatol* (in Druck)
- Griffiths CEM, Barker JNWN (2007): Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 370, 263–271

- Gudjonsson JE, Thorarinsson AM, Sigurgeirsson B, Kristinsson KG, Valdimarsson H (2003): Streptococcal throat infections and exacerbation of chronic plaque psoriasis: a prospective study. *Br J Dermatol* 149, 530–534
- Hägg D, Eriksson M, Sundström A, Schmitt-Egenolf M (2013): The higher proportion of men with psoriasis treated with biologics may be explained by more severe disease in men. *PLoS One* 8, e63619
- Hagiwara T, Nakashima K, Hirano H, Senshu T, Yamada M (2002): Deimination of arginine residues in nucleophosmin/B23 and histones in HL-60 granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 979–983
- 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
- Henseler T, Christophers E (1985): Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 13, 450–456
- Hosoda H, Nakamura K, Hu Z, Tamura H, Reich J, Kuwahara-Arai K, Iba T, Tabe Y, Nagaoaka I (2017): Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 induces NET formation and suppresses the inflammatory response in a mouse septic model. *Mol Med Rep* 16, 5618–5626
- Höxtermann S, Nüchel C, Altmeyer P (1998): Fumaric acid esters suppress peripheral CD4- and CD8-positive lymphocytes in psoriasis. *Dermatology* 196, 223–230
- Hu SCS, Yu HS, Yen FL, Lin CL, Chen GS, Lan CCE (2016): Neutrophil extracellular trap formation is increased in psoriasis and induces human β -defensin-2 production in epidermal keratinocytes. *Sci Rep* 6, 31119
- Kavanaugh A, van der Heijde D, McInnes IB, Mease P, Krueger GG, Gladman DD, Gómez-Reino J, Papp K, Baratelle A, Xu W et al. (2012): Golimumab in psoriatic arthritis: one-year clinical efficacy, radiographic, and safety results from a phase III, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 64, 2504–2517
- Kawai T, Akira S (2006): TLR signaling. *Cell Death Differ* 13, 816–825
- Keijsers RRM, Joosten I, van Erp PEJ, Koenen HJPM, van de Kerkhof PCM (2014a): Cellular sources of IL-17 in psoriasis: a paradigm shift? *Exp Dermatol* 23, 799–803
- Keijsers RRM, Hendriks AGM, van Erp PEJ, van Cranenbroek B, van de Kerkhof PCM, Koenen HJPM, Joosten I (2014b): In vivo induction of cutaneous inflammation results in the accumulation of extracellular trap-forming neutrophils expressing ROR γ t and IL-17. *J Invest Dermatol* 134, 1276–1284
- Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne HJ, Brinkmann V, Jenne DE (2009): Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 15, 623–625
- Kim GK, Del Rosso JQ (2010): Drug-provoked psoriasis: is it drug induced or drug aggravated? *J Clin Aesthet Dermatol* 3, 32–38
- Knight JS, Luo W, O'Dell AA, Yalavarthi S, Zhao W, Subramanian V, Guo C, Grenn RC, Thompson PR, Eitzman DT, Kaplan MJ (2014): Peptidylarginine deiminase inhibition reduces vascular damage and modulates innate immune responses in murine models of atherosclerosis. *Circ Res* 114, 947–956

- Kolios AGA, Cozzio A (2016): Psoriasis – effiziente Diagnose und Therapie. *Praxis* 105, 953–959
- Koziel J, Bryzek D, Sroka A, Maresz K, Glowczyk I, Bielecka E, Kantyka T, Pyrc K, Svoboda P, Pohl J, Potempa J (2014): Citrullination alters immunomodulatory function of LL-37 essential for prevention of endotoxin-induced sepsis. *J Immunol.* 192, 5363–5372
- Kusunoki Y, Nakazawa D, Shida H, Hattanda F, Miyoshi A, Masuda S, Nishio S, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A (2016): Peptidylarginine deiminase inhibitor suppresses neutrophil extracellular trap formation and MPO-ANCA production. *Front Immunol* 7, 227
- Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, Cao W, Wang YH, Su B, Nestle FO et al. (2007): Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449, 564–569
- Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, Meller S, Chamilos G, Sebastiani R, Ricciari V et al. (2011): Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 3, 73ra19
- Lande R, Botti E, Jandus C, Dojcinovic D, Fanelli G, Conrad C, Chamilos G, Feldmeyer L, Marinari B, Chon S et al. (2014): The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nat Commun* 5, 5621
- Leonardi CL, Powers JL, Matheson RT, Goffe BS, Zitnik R, Wang A, Gottlieb AB, Etanercept Psoriasis Study Group (2003): Etanercept as monotherapy in patients with psoriasis. *N Engl J Med* 349, 2014–2022
- Lewis HD, Liddle J, Coote JE, Atkinson SJ, Barker MD, Bax BD, Bicker KL, Bingham RP, Campbell M, Chen YH et al. (2015): Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat Chem Biol* 11, 189–191
- Li JLY, Goh CC, Keeble JL, Qin JS, Roediger B, Jain R, Wang Y, Chew WK, Weninger W, Ng LG (2012): Intravital multiphoton imaging of immune responses in the mouse ear skin. *Nat Protoc* 7, 221–234
- Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y (2010): PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* 207, 1853–1862
- Lim KH, Staudt LM (2013): Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a011247
- Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, Villanueva EC, Shah P, Kaplan MJ, Bruce AT (2011): Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol* 187, 490–500
- Lønnberg AS, Skov L, Skytthe A, Kyvik KO, Pedersen OB, Thomsen SF (2013): Heritability of psoriasis in a large twin sample. *Br J Dermatol* 169, 412–416
- Macanovic M, Sinicropi D, Shak S, Baughman S, Thiru S, Lachmann PJ (1996): The treatment of systemic lupus erythematosus (SLE) in NZB/W F1 hybrid mice; studies with recombinant murine DNase and with dexamethasone. *Clin Exp Immunol* 106, 243–252
- Martinod K, Witsch T, Erpenbeck L, Savchenko A, Hayashi H, Cherpokova D, Gallant M, Mauler M, Cifuni SM, Wagner DD (2017): Peptidylarginine deiminase 4 promotes age-related organ fibrosis. *J Exp Med* 214, 439–458

- McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J, Heesemann J, Ebel F (2010): NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect* 12, 928–936
- Méchin MC, Sebbag M, Arnaud J, Nachat R, Foulquier C, Adoue V, Coudane F, Duplan H, Schmitt AM, Chavanas S et al. (2007): Update on peptidylarginine deiminases and deimination in skin physiology and severe human diseases. *Int J Cosmet Sci* 29, 147–168
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. (1997): A human homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397
- 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
- Morshed M, Hlushchuk R, Simon D, Walls AF, Obata-Ninomiya K, Karasuyama H, Djonov V, Eggel A, Kaufmann T, Simon HU, Yousefi S (2014): NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils. *J Immunol* 192, 5314–5323
- Müller S, Behnen M, Bieber K, Möller S, Hellberg L, Witte M, Hänsel M, Zillikens D, Solbach W, Laskay T, Ludwig RJ (2016): Dimethylfumarate impairs neutrophil functions. *J Invest Dermatol* 136, 117–126
- Nast A, Amelunxen L, Augustin M, Boehncke WH, Dressler C, Gaskins M, Härle P, Hoffstadt B, Klaus J, Koza J et al. (2017): S3-Leitlinie zur Therapie der Psoriasis vulgaris Update 2017. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/013-0011_S3_Therapie_Psoriasis-vulgaris_2017-12.pdf; aufgerufen am 18.07.2019
- Neeli I, Khan SN, Radic M (2008): Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol* 180, 1895–1902
- Nestle FO, Kaplan DH, Barker J (2009): Psoriasis. *N Engl J Med* 361, 496–509
- 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
- Neumann A, Völlger L, Berends ETM, Molhoek EM, Stapels DAC, Midon M, Friães A, Pingoud A, Rooijackers SHM, Gallo RL et al. (2014a): Novel role of the antimicrobial peptide LL-37 in the protection of neutrophil extracellular traps against degradation by bacterial nucleases. *J Innate Immun* 6, 860–868
- Neumann A, Berends ETM, Nerlich A, Molhoek EM, Gallo RL, Meerloo T, Nizet V, Naim HY, von Köckritz-Blickwede M (2014b): The antimicrobial peptide LL-37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps. *Biochem J* 464, 3–11
- O’Neill LAJ, Bowie AG (2007): The family of five: TIR-domain-containing adaptors in toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7, 353–364
- 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
- Papp K, Thaçi D, Reich K, Riedl E, Langley RG, Krueger JG, Gottlieb AB, Nakagawa H, Bowman EP, Mehta A et al. (2015): Tildrakizumab (MK-3222), an anti-interleukin-23p19 monoclonal antibody, improves psoriasis in a phase IIb randomized placebo-controlled trial. *Br J Dermatol* 173, 930–939

- Papp KA, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Krueger JG, Kricorian G, Aras G, Li J, Russell CB, Thompson EH, Baumgartner S (2012): Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med* 366, 1181–1189
- Parisi R, Symmons DPM, Griffiths CEM, Ashcroft DM (2013): Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol* 133, 377–385
- Raaby L, Ahlehoff O, de Thurah A (2017): Psoriasis and cardiovascular events: updating the evidence. *Arch Dermatol Res* 309, 225–228
- Reich K (2009): Approach to managing patients with nail psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23, 15–21
- Reich K, Gooderham M, Thaçi D, Crowley JJ, Ryan C, Krueger JG, Tsai TF, Flack M, Gu Y, Williams DA et al. (2019): Risankizumab compared with adalimumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis (IMMvent): a randomised, double-blind, active-comparator-controlled phase 3 trial. *Lancet* 394, 576–586
- Reinholz M, Ruzicka T, Schaubert J (2012): Cathelicidin LL-37: an antimicrobial peptide with a role in inflammatory skin disease. *Ann Dermatol* 24, 126–135
- Rich P, Bourcier M, Sofen H, Fakharzadeh S, Wasfi Y, Wang Y, Kerkmann U, Ghislain PD, Poulin Y, PHOENIX 1 investigators (2014): Ustekinumab improves nail disease in patients with moderate-to-severe psoriasis: results from PHOENIX 1. *Br J Dermatol* 170, 398–407
- Rochael NC, Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, DeSouza-Vieira TS, Oliveira MP, Garcia e Souza LF, Oliveira MF, Saraiva EM (2015): Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of neutrophil extracellular traps triggered by *Leishmania* parasites. *Sci Rep* 5, 18302
- Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Uehata T, Iwasaki H, Omori H, Yamaoka S et al. (2012): Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* 12, 109–116
- Sandor F, Buc M (2005): Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands. *Folia Biol (Praha)* 51, 148–157
- Schafer PH, Parton A, Gandhi AK, Capone L, Adams M, Wu L, Bartlett JB, Loveland MA, Gilhar A, Cheung YF et al. (2010): Apremilast, a cAMP phosphodiesterase-4 inhibitor, demonstrates anti-inflammatory activity in vitro and in a model of psoriasis. *Br J Pharmacol* 159, 842–855
- Schön MP, Boehncke WH (2005): Psoriasis. *N Engl J Med* 352, 1899–1912
- Schön MP, Erpenbeck L (2018): The Interleukin-23/Interleukin-17 axis links adaptive and innate immunity in psoriasis. *Front Immunol* 9, 1323
- Schönrich G, Raftery MJ (2016): Neutrophil extracellular traps go viral. *Front Immunol* 7, 366
- Smith CK, Vivekanandan-Giri A, Tang C, Knight JS, Mathew A, Padilla RL, Gillespie BW, Carmona-Rivera C, Liu X, Subramanian V et al. (2014): Neutrophil extracellular trap-derived enzymes oxidize high-density lipoprotein: an additional proatherogenic mechanism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 66, 2532–2544
- Sondermann W, Rompoti N, Leister L, Huptas L, Klode J, Dissemond J, Körber A (2017): Lymphopenia and CD4+/CD8+ cell reduction under fumaric acid esters. *Dermatology* 233, 295–302

- 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
- Steffen S, Abraham S, Herbig M, Schmidt F, Blau K, Meisterfeld S, Beissert S, Guck J, Günther C (2017): Toll-like receptor-mediated upregulation of CXCL16 in psoriasis orchestrates neutrophil activation. *J Invest Dermatol* 138, 344–354
- Sun J, Zhang Q, Schlick T (2005): Electrostatic mechanism of nucleosomal array folding revealed by computer simulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8180–8185
- Swindell WR, Michaels KA, Sutter AJ, Diaconu D, Fritz Y, Xing X, Sarkar MK, Liang Y, Tsoi A, Gudjonsson JE, Ward NL (2017): Imiquimod has strain-dependent effects in mice and does not uniquely model human psoriasis. *Genome Med* 9, 24
- Takahashi H, Iizuka H (2012): Psoriasis and metabolic syndrome. *J Dermatol* 39, 212–218
- Torii H, Terui T, Matsukawa M, Takesaki K, Ohtsuki M, Nakagawa H, The Japanese Dermatological Association (JDA) PMS committee (2016): Safety profiles and efficacy of infliximab therapy in Japanese patients with plaque psoriasis with or without psoriatic arthritis, pustular psoriasis or psoriatic erythroderma: Results from the prospective post-marketing surveillance. *J Dermatol* 43, 767–778
- Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A (2006): Neutrophil extracellular traps capture and kill candida albicans yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 8, 668–676
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H (2002): HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 277, 15107–15112
- Verthelyi D, Dybdal N, Elias KA, Klinman DM (1998): DNase treatment does not improve the survival of lupus prone (NZB6NZW)F1 mice. *Lupus* 7, 223–230
- 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
- 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
- Weiss G, Shemer A, Trau H (2002): The koebner phenomenon: review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 16, 241–248
- Wong A, Bryzek D, Dobosz E, Scavenius C, Svoboda P, Rapala-Kozik M, Lesner A, Frydrych I, Enghild J, Mydel P et al. (2018): A novel biological role for peptidyl-arginine deiminases: citrullination of cathelicidin LL-37 controls the immunostimulatory potential of cell-free DNA. *J Immunol* 200, 2327–2340
- Yang C, Chilvers M, Montgomery M, Nolan SJ (2016): Dornase alfa for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 4, CD001127
- Yasuda H, Leelahavanichkul A, Tsunoda S, Dear JW, Takahashi Y, Ito S, Hu X, Zhou H, Doi K, Childs R et al. (2008): Chloroquine and inhibition of toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 294, F1050–F1058
- Yipp BG, Kubes P (2013): NETosis: how vital is it? *Blood* 122, 2784–2794

Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, Schmid I, Straumann A, Reichenbach J, Gleich GJ, Simon HU (2008): Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* 14, 949–953

Zenaro E, Pietronigro E, Bianca VD, Piacentino G, Marongiu L, Budui S, Turano E, Rossi B, Angiari S, Dusi S et al. (2015): Neutrophils promote alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat Med* 21, 880–886

Zhou Y, Chen B, Mittereder N, Chaerkady R, Strain M, An LL, Rahman S, Ma W, Low CP, Chan D et al. (2017): Spontaneous secretion of the citrullination enzyme PAD2 and cell surface exposure of PAD4 by neutrophils. *Front Immunol* 8, 1200

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Dank entgegenbringen, die bei der Anfertigung der Arbeit mitgewirkt haben.

Herrn Professor Dr. med. Schön für die einmalige Möglichkeit der Durchführung einer solchen Arbeit innerhalb seiner Klinik. Stetiger intellektueller Input und Hilfe bei schwierigen Fragestellungen werden mir stets positiv im Gedächtnis bleiben.

Frau Dr. med. Luise Erpenbeck für die freundliche Aufnahme in ihre Forschungsgruppe und intensive Betreuung dieser Doktorarbeit. Insbesondere die persönliche Einführung habe ich als sehr angenehm empfunden.

Ich bedanke mich zusätzlich, dass mir die Gelegenheit einer Postervorstellung der Forschungsergebnisse sowie die Möglichkeit, einen Vortrag als Doktortand halten zu dürfen, gegeben wurde.

Außerdem danke ich Frau Ines Beulshausen für ihre Unterstützung bei der Durchführung verschiedener Experimente.