

Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie

der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Untersuchungen zur Bedeutung von *Neutrophil derived extracellular traps* (NETs) für die bakterielle Dissemination und Leukozytenmigration bei der polymikrobiellen Sepsis in der Maus

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Almuth Maria Anni Hoffmann

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Korreferent: Prof. Dr. med. Kindgen-Milles

Für meine Eltern,
die immer an mich geglaubt haben.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Meng et al.: Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Critical Care* 2012 16:R137.

Zusammenfassung

Zur Abwehr von Bakterien sind Neutrophile Granulozyten in der Lage *neutrophil derived extracellular traps* (NETs) zu bilden. Durch an die NETs angeheftete Histone und andere antimikrobielle Enzyme können Mikroorganismen abgetötet werden. Gleichzeitig ist eine Schädigung des umliegenden Gewebes möglich. Inwiefern NETs eine Rolle im Rahmen einer Sepsis *in vivo* spielen ist bisher nicht bekannt. Die Möglichkeit, NETs durch rekombinante humane Desoxyribonuklease (rhDNase) zu zerstören, ermöglicht es, die Rolle von NETs bei Sepsis *in vivo* genauer zu untersuchen. Die Basis dieser Arbeit bildet ein murines Modell, bei dem durch zökale Ligation und Punktion (*cecal ligation and puncture*, CLP) eine Sepsis induziert wurde. Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgten intermittierend intraperitoneale Injektionen von rhDNase. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der DNase Gabe auf 1. die Leukodiapedese neutrophiler Granulozyten in die Sepsis-assoziierten Organe Leber und Lunge anhand von histologischer Färbung und Auszählung und 2. die bakterielle Dissemination in die Peritonealhöhle, Blut, Lunge und Leber durch die Bestimmung von *colony forming units* (CFU) zu untersuchen.

Die Zahl von CFU in der Lunge und in der Peritonealhöhle war bei Mäusen mit DNase Gabe bereits 6 Stunden nach CLP signifikant erhöht. Die Anzahl von CFU in Mäusen ohne rhDNase-Behandlung stieg hingegen später, dafür aber 24 Stunden nach Sepsisinduktion signifikant stärker an. Während 6 Stunden nach CLP die Anzahl an neutrophilen Granulozyten in Lunge und Leber von Mäusen mit und ohne rhDNase-Gabe auf gleichem Niveau lagen, konnte nach 24 Stunden eine signifikant erhöhte Anzahl bei Mäusen mit rhDNase-Behandlung festgestellt werden. Die Depletion von NETs führte zusammenfassend zu einer gesteigerten bakteriellen Dissemination und zu einer vermehrten Rekrutierung von Neutrophilen in Sepsis-assoziierte Organe.

Anhand der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Bildung von NETs vor allem während der frühen Abwehrphase einer schweren Sepsis von Bedeutung ist. Insgesamt scheinen die vorteilhaften Effekte der NETs gegenüber den potentiell gewebeschädigenden Auswirkungen für das umliegende Gewebe zu überwiegen.

Abkürzungsverzeichnis

ACCP/SCCM	<i>American College of Chest Physicians und die Society of Critical Care Medicine</i>
ALT	Alanin-Amino-Transferase
ARDS	Akutes respiratorisches Distress-Syndrom
cf-DNA	<i>cell-free-deoxyribonucleic acid</i>
CGE	Chronische granulomatöse Erkrankungen
CLP	<i>cecal ligation and puncture</i>
CLR	<i>C-type lectin receptor</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
ds-DNA	Doppelstrang- <i>deoxyribonucleic acid</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1ra	Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LE	Lupus erythematodes
LPS	Lipopolysaccharide
Mrd.	Milliarde
NETs	<i>neutrophil derived extracellular traps</i>
NLR	<i>nucleotide-binding oligomerization domain receptor</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PRR	<i>pattern-recognition receptor</i>
rhDNase	rekombinante humane Desoxyribonuklease
RLR	<i>retinoic acid inducible gene receptors</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrom</i>
SPF	<i>specific pathogen free</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TLR	<i>toll-like-Rezeptor</i>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Bedeutung der Sepsis	1
1.2 Inflammation bei Sepsis	2
1.3 Antimikrobielle Bedeutung neutrophiler Granulozyten	3
1.4 Antimikrobielle Bedeutung von NETs	5
1.5 Bedeutung der NETs im Rahmen einer Infektion	6
1.6 Bedeutung der NETs bei nicht infektiösen Erkrankungen	8
1.7 Desoxyribonuklease und ihre therapeutische Bedeutung	9
1.8 Zielsetzung der Arbeit	10
2. Material und Methoden	12
2.1. Material	12
2.1.1 Geräte	12
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	12
2.1.3 Chemikalien	12
2.2 Tiermodell	13
2.2.1 Versuchstiere	13
2.2.2 Versuchsaufbau	13
2.2.3 Zökalpolligatur und Punktion	14
2.2.4 Intraperitoneale Injektion von rhDNase	14
2.3 Methoden	15
2.3.1 Bestimmung der <i>colony forming units</i> (CFU)	15
2.3.2 Histologische Untersuchung von Leber und Lunge	16
2.4 Statistische Analysen	18
3. Ergebnisse	19
3.1 Ergebnisse des Gesamtprojekts	19
3.1.1 Gesteigerte Freisetzung von NETs und erhöhte DNase- Konzentrationen nach CLP	19
3.1.2 Degradation von NETs <i>in vivo</i> durch die Applikation von rhDNase	20
3.1.3 Einfluss der DNase-Applikation auf das Überleben nach CLP	21
3.1.4 Gesteigerte inflammatorische Antwort durch die Depletion von NETs	22
3.2 Eigene Ergebnisse	24
3.2.1 Gesteigerte bakterielle Dissemination durch die Depletion von NETs	24

3.2.2 Verstärkte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in von Sepsis betroffene Organe durch die Depletion von NETs	27
4. Diskussion	29
4.1 Überblick	29
4.2 Bedeutung von NETs bei Sepsis	29
4.3 Bedeutung von DNase bei Sepsis	33
4.4 Inflammation	35
4.5 Rekrutierung neutrophiler Granulozyten	36
4.6 Bakterielle Dissemination	39
4.7 Ausblick	41
5. Schlussfolgerung	42
6. Literatur	43

1. Einleitung

1.1 Bedeutung der Sepsis

Die Sepsis stellt bis heute eine der größten Herausforderungen der Medizin dar. Sie ist die zweithäufigste Todesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen und insgesamt die zehnthäufigste Todesursache in den westlichen Nationen (1,2). In den entwickelten Ländern wird die Inzidenz der Sepsis auf etwa 2,5 pro 1.000 geschätzt und zeigt über die letzten 20 Jahre einen jährlichen Anstieg um 8,7% (3). Die Mortalität der Sepsis bei hospitalisierten Patienten ist hoch. Sie liegt hier bei 20%, bei schwerer Sepsis steigt sie sogar auf 40-50% (2). Dabei spielen vor allem die Zahl, sowie das Ausmaß der Organschädigungen eine Rolle als prädikativer Faktor für die Sterblichkeit (4). Am häufigsten geht eine Sepsis von Infektionen des oberen Respirationstraktes, besonders von Pneumonien, aus (4). Diese sind gleichzeitig mit der höchsten Mortalität assoziiert (4). Bei den Patienten, die eine Sepsis überleben, ist neben einer erhöhten Langzeit-Mortalität auch die Inzidenz von chronisch gesundheitlichen Beeinträchtigungen, wie zum Beispiel von dauerhaften kognitiven und funktionalen Dysfunktionen, erhöht (5). Neben dieser klinischen Problematik entsteht außerdem eine beträchtliche ökonomische Belastung durch die Sepsis und ihre Therapie (6). In den USA betragen die jährlichen Kosten die durch Sepsis entstehen schätzungsweise 6,7 Mrd. US-Dollar, in Deutschland zwischen 3,6 und 7,8 Mrd. Euro (2,6). Neben den direkten Kosten durch die Behandlung entstehen im Verlauf noch zusätzliche indirekte Kosten für die Gesellschaft, zum Beispiel durch krankheitsbedingten Arbeitsausfall, Frühberentung und Versterben (6). Somit ist eine effektive und effiziente Behandlung der Sepsis nicht nur aus klinischer, sondern auch aus gesundheitsökonomischer Sicht dringlich.

Eine wesentliche Rolle für das Outcome der Patienten spielt die Art des Keimes, welcher eine Infektion verursacht (4). Eine Metaanalyse von 510 Studien konnte zeigen, dass Infektionen mit gramnegativen Keimen mit einer höheren Mortalität assoziiert sind, als eine Bakteriämie mit Grampositiven (7). Oft sind diese Infektionen polymikrobiell und durch Keime der intestinalen Flora

verursacht (8-11). Gerade bei Trauma- und abdominal-chirurgischen Patienten sind Peritonitis, das *systemic inflammatory response syndrom* (SIRS), Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock häufige Komplikationen (8, 12, 13). Zwar können die genannten Krankheitsbilder zeitweise fließend ineinander übergehen, jedoch stellen sie jeweils eigene Krankheitsentitäten dar. Ein SIRS liegt vor, wenn zwei oder mehr folgender Kriterien erfüllt sind: Körpertemperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$; Herzfrequenz $>90/\text{min}$; Atemfrequenz $>20/\text{min}$ oder $\text{PaCO}_2 <32 \text{ mmHg}$; Leukozytenzahl $>12.000/\mu\text{l}$ oder $<4.000/\mu\text{l}$ oder $>10\%$ unreife Granulozyten im Differentialblutbild (2). In der lange gebräuchlichen Definition des *American College of Chest Physicians* und die *Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM) von 1992 wird eine Sepsis als ein SIRS definiert, welches aus einer bakteriellen, viralen, fungalen oder parasitären Infektion heraus resultiert (14). In den neuen Leitlinien des ACCP/SCCM für die Behandlung der Sepsis von 2012 ist diese klassische Definition weiterentwickelt und für den klinischen Alltag praktikabler worden. Eine Sepsis wird hier lediglich definiert als das Vorliegen einer Infektion bei gleichzeitigen systemischen Manifestationen einer systemischen Infektion (15). Eine Sepsis mit Schädigung eines der Organsysteme Lunge, Leber, Niere, Herz-Kreislauf, Gerinnung oder zentrales Nervensystem wird als schwere Sepsis definiert (14). Im weiteren Verlauf kann ein septischer Schock und letztendlich ein Multiorganversagen folgen.

1.2 Inflammation bei Sepsis

Bisher wurden bereits enorm hohe Ressourcen aufgewendet um den Pathomechanismus der Sepsis zu verstehen und mögliche Therapieansätze zu entwickeln oder zu überprüfen (1, 16). Nach heutigem Wissensstand spielen bei der Immunantwort des Wirts auf pathogene Keime sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Komponenten eine Rolle (17). Das native Immunsystem ist in der Lage Pathogene über *pattern-recognition receptors* (PRRs), darunter *toll-like- Rezeptoren* (TLRs), *retinoic acid inducible gene receptors* (RLRs), *nucleotide-binding oligomerization domain receptors* (NLRs) und *C-type lectin receptors* (CLR)s, zu erkennen (18).

Daraufhin werden über intrazelluläre Signalkaskaden zahlreiche proinflammatorische Enzyme vermehrt exprimiert und freigesetzt (18). Hierzu zählen unter anderem der Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Leukozyten aktivierende Chemokine, Adhäsionsmoleküle, reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxide (16). Bis vor kurzem wurde angenommen, dass vor allem ein Überschießen dieser Immunreaktion verantwortlich für die schweren Verläufe einer Sepsis ist (17). Mittlerweile wird eine heftige native Immunreaktion als zweiseitiges Schwert eingeschätzt. Zum einen schützt sie den Wirt vor der Invasion von Pathogenen (17). Auf der anderen Seite kann sie, wenn sie unkontrolliert abläuft, zur Entwicklung einer systemischen Infektion, einer intravaskulären Koagulation, Gewebeschäden und Zelltod als Folge einer unverhältnismäßig starken Reaktion beitragen (17). Allerdings hat die einfache Inhibition der proinflammatorischen Zytokine keinen positiven Einfluss auf die Klinik bei Patienten mit schwerer Sepsis (17). Überlappend zu der proinflammatorischen Phase erfolgt die Expression und Freisetzung von antiinflammatorischen Mediatoren, darunter Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist (IL-1ra), Prostaglandine, lösliche Rezeptoren und antiinflammatorisch immunmodulierende Hormone (16). Dabei ist es bisher unklar, ob die Immunsuppression eine kompensatorische Phase im Anschluss an die Inflammation darstellt, oder als eine primäre Reaktion zu werten ist (17, 19-21).

1.3 Antimikrobielle Bedeutung neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind für die Abwehr von extrazellulären Mikroorganismen von essentieller Bedeutung. Sie gehören zum unspezifischen Immunsystem und spielen eine Schlüsselrolle zu Beginn einer Abwehr von grampositiven und gramnegativen Bakterien, sowie von Pilzen (13, 22-24). Kommt es zu einer Invasion von Mikroorganismen, werden neutrophile Granulozyten durch Chemotaxis aus dem peripheren Blut an den Ort einer Infektion oder eines Zellschadens rekrutiert (25). Mikrobielle Bestandteile und lokal freigesetzte inflammatorische Mediatoren führen zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und am

kapillären Endothel (25). Auf Neutrophilen bewirkt die Expression von L-Selektin eine Abbremsung der Granulozyten im Blutstrom und ein Entlangrollen an der Kapillarwand (25). Dies ermöglicht ihnen die Adhäsion an das Endothel über die Interaktion von beta-2 Integrinen auf ihrer Zelloberfläche und dem interzellulären Adhäsionsmolekül-1 auf dem Endothel (25). Daraufhin können die Neutrophilen das Endothel durch Ausschüttung von Enzymen wie Elastinase und Gelatinase durchqueren und in das Gewebe migrieren (25). Diese direkte Migration oder Chemotaxis wird durch die Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts der Neutrophilen, welche so Pseudopodien in Richtung des inflammatorischen Stimulus ausbilden, ermöglicht (26). Durch verschiedene Mechanismen können neutrophile Granulozyten am Ort einer Infektion Pathogene abtöten.

Bereits vor über 100 Jahren wurde von Elie Metchnikoff der Mechanismus der Phagozytose entdeckt (27). Neutrophile Granulozyten können sowohl Oberflächenmoleküle von Mikroorganismen, als auch Fc-Teile von opsonisierten Antigenen über verschiedene Rezeptoren, wie zum Beispiel *toll-like*-Rezeptoren und Fc-Rezeptoren, erkennen, binden und über eine Einstülpung ihrer Membran in intrazelluläre Kompartimente einschließen (28-32). Dadurch entsteht ein Phagozytom, welches anschließend mit intrazellulären Granula zu einem Phagolysosom fusioniert (28). In diesem erfolgt die Abtötung der Bakterien durch oxidative und nicht-oxidative Mechanismen (28, 33, 34).

Neben der Phagozytose sind neutrophile Granulozyten in der Lage intrazelluläre Granula zu exozytieren (34). So gelangen eine Reihe proteolytischer Enzyme, wie zum Beispiel die Granulozyten-Elastase und Myeloperoxidase (MPO), sowie reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) in den Extrazellulärraum (34). Dies führt neben der Abtötung von Bakterien auch zu einer Schädigung oder sogar Zerstörung der in der Umgebung von Neutrophilen liegenden Parenchymzellen (35, 36).

Vor einigen Jahren wurde neben der Phagozytose und der Exozytose ein weiterer, bis dahin unbekannter, antimikrobieller Mechanismus entdeckt (37). Angeregt durch verschiedene Moleküle, wie Interleukin-8 (IL-8), Phorbol-

Myristat-Acetat (PMA), Thrombozyten, Lipopolysaccharide (LPS) oder Pathogene wie Bakterien und Pilze, werfen Neutrophile ihre DNA in den Extrazellulärraum aus (38). Dieser Mechanismus wird Netose genannt (37). Die Netose unterscheidet sich in ihrem Ablauf von der Apoptose und der Nekrose (37). Die DNA formatiert sich extrazellulär zu Netzen, durch welche Bakterien immobilisiert und abgetötet werden können (37, 39-49). Diese Konglomerate werden *neutrophil derived extracellular traps* (NETs) genannt (37, 39-49).

1.4 Antimikrobielle Bedeutung von NETs

NETs sind extrazelluläre Strukturen mit einem Grundgerüst aus zellfreien Chromatinsträngen (*cell-free-DNA*, cf-DNA) (37). Diesen sind unter anderem die Histone H1, H2A, H2B, H3, H4, sowie wichtige bakterizide Proteine und Enzyme der Granula neutrophiler Granulozyten, wie zum Beispiel Elastase, Myeloperoxidase und Cathepsin G, angeheftet (37, 39, 40, 50). Bakterien und andere Pathogene können abgefangen, gebunden und durch die antimikrobiell wirkenden Histone sowie die antimikrobiellen Proteine eliminiert werden (44, 45, 51). NETs interagieren sowohl mit grampositiven und gramnegativen Bakterien, als auch mit Pilzen (37, 40, 44). Nach Einschluss der Mikroorganismen kommt es durch die den NETs angehefteten Histone zur Abtötung und Spaltung virulenter Faktoren, wie zum Beispiel Toxin alpha, welches vom grampositiven *Staphylococcus aureus* gebildet wird, oder IpaB, welches die grampositive *Shigella flexneri* produziert (37, 40). Bisher ist allerdings nicht bekannt, wie NETs auf molekularer Ebene Bakterien binden. Brinkmann und Mitarbeiter vermuten, dass elektrostatische Interaktionen zwischen kationischen Anteilen der NETs und anionischen Anteilen der Bakterienoberfläche eine Rolle spielen könnten (39). In aktuellen Studien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass NETs neben ihrer strukturellen antimikrobiellen Wirkung in der Lage sind, die Produktion von antibakteriellen Zytokinen, wie zum Beispiel Interferon- α (IFN- α), zu steigern (53-54). IFN- α ist beteiligt bei der Abwehr und Kontrolle von Infektionen durch Bakterien, Viren und Protozoen (55). Trotzdem sind einige Bakterienstämme resistent gegenüber den NETs (44, 56-59). Diese Stämme haben Mechanismen

entwickelt, sich der Abtötung durch NETs zu entziehen. Sie exprimieren beispielsweise Desoxyribonukleasen (DNasen), welche das Chromatingerüst der NETs spalten können. So bilden zum Beispiel nahezu alle Streptokokkenstämme der Gruppe A mindestens eine extrazelluläre DNase (59). Buchanan und Mitarbeiter wiesen darüber hinaus nach, dass Stämme von *Streptococcus pneumoniae* sich durch DNase-Expression der durch Neutrophile vermittelten Tötung teilweise entziehen können und dadurch eine höhere Pathogenität aufweisen, als Stämme, die keine DNase bilden (57).

Neben der Abtötung und Verhinderung der systemischen Streuung von Mikroorganismen führt die NETs-Bildung auch zu einer erhöhten extrazellulären Konzentration antimikrobieller Proteine am Ort einer Infektion (40). Durch die dem Chromatin angehefteten Proteasen und Enzyme der Granula von neutrophilen Granulozyten kann es zu einer Schädigung von umliegenden Parenchymzellen kommen (40). So entstehen durch die Bildung von NETs auch potentiell negative Konsequenzen für den Wirt (43). Dies scheint vor allem in Organen mit einem großen kapillären Endstromgebiet eine Rolle zu spielen. *In vitro* konnte eine NETs-assoziierte Schädigung von Endothelzellen gezeigt werden (40, 54, 60). Darüber hinaus wiesen Clark und Mitarbeiter in einem murinen Modell, mit einer durch Lipopolysaccharide (LPS) induzierten Endotoxämie, das Vorhandensein von NETs in Lebersinusoiden *in vivo* nach (40). Mit der Anwesenheit von NETs war eine verminderte Perfusion, sowie eine Schädigung von Lebergewebe, die durch die Bestimmung der Alanin-Aminotransferase (ALT) im Blut gemessen wurde, assoziiert (40). Die Leber ist neben der Lunge ein typischer Manifestationsort eines Sepsis-assoziierten Organversagens (61).

1.5 Bedeutung der NETs im Rahmen einer Infektion

Bei einer systemischen Infektion werden neutrophile Granulozyten vor allem in die Endstromgebiete von Lunge und Leber als typische Manifestationsorte rekrutiert (62). Bei Patienten mit einem akuten respiratorischen Distress-Syndrom (ARDS), welches eine Folge von einer Sepsis sein kann, finden sich massive Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten in der Lunge, wobei

die Zahl der Neutrophilen mit der Mortalität korreliert (63, 64). Gleichzeitig ist bei einer Sepsis eine Thrombozytopenie in Lunge und Leber nachweisbar (40, 65, 66). Clark und Mitarbeiter konnten zeigen, dass es über die Interaktion von Thrombozyten und Neutrophilen zu einer verstärkten NETs-vermittelten Bakterienabwehr kommt (40). Über eine gesteigerte Expression des *toll-like*-Rezeptors 4 (TLR4) auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten binden diese über den TLR4-Liganden an neutrophile Granulozyten und führen zur Formation von NETs (40, 65-67). Diese Zellinteraktion mit einer daraus resultierender Bildung von NETs konnte im Blut von Patienten mit Sepsis nachgewiesen werden (65). Thrombozyten gelten daher als hochpotente Induktoren der NETs-Formation. Da *in vitro* die durch Bakterien oder andere Induktoren vermittelte NETs-Bildung einige Stunden erfordert, wäre es im Kontext der Sepsis denkbar, dass aktivierte Thrombozyten bei neutrophilen Granulozyten eine schnellere NETs-Formation induzieren, noch bevor eine Phagozytose der Mikroorganismen erfolgt (42, 45). NETs könnten somit möglicherweise schneller und gleichzeitig mehr Bakterien abfangen, als dies einzelne Neutrophile durch Phagozytose und Exozytose erreichen würden (42). Da septische Krankheitsbilder zum einen mit einer starken Aktivierung der Immunantwort und exzessiver Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Mediatoren, und zum anderen mit einer sekundären Dysregulation des Immunsystems verbunden sind, ist es denkbar, dass NETs auch eine immunmodulatorische Rolle innehaben (42). Die Dysregulation des Immunsystems kann sowohl das unspezifische Immunsystem, mit gestörter Freisetzung von Zytokinen, als auch das spezifische Immunsystem durch Alteration der Antigenpräsentation und einer daraus resultierenden oder zusätzlich entstandenen Dysregulation der T-Zellantwort betreffen (17). Die Bedeutung einer Fehlregulation von NETs bei der Entstehung einer Sepsis ist bisher nicht bekannt.

Neben der Bildung von NETs durch Bakterien oder Thrombozyten, konnten *in vitro* Modelle mit humanen neutrophilen Granulozyten und dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) zeigen, dass Neutrophile auch durch HIV zur Bildung von NETs stimuliert werden (68). Gleichzeitig generiert das Virus die Bildung von Interleukin-10 (IL-10) in dendritischen Zellen, um der Netosis entgegenzuwirken (68).

1.6 Bedeutung der NETs bei nicht infektiösen Erkrankungen

Auch bei unterschiedlichen nicht infektiösen Erkrankungen konnte eine Beteiligung von NETs an deren Pathogenese aufgezeigt werden (69-75).

Dies betrifft unter anderem Autoimmunerkrankungen wie den systemischen Lupus erythematoses (SLE). Es wird angenommen, dass die extrazelluläre Exposition von Chromatin und endogenen Adjuvantien in Kombination mit einer gestörten Beseitigung dieser, oder aber einer abnormalen Reaktion auf diese Moleküle, die Bildung von Autoantikörpern bewirkt (76-79). SLE ist eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung, bei der die Patienten Antikörper gegen Chromatin entwickeln. Dies führt zur Ablagerung von Immunkomplexen und Inflammation in Organen wie Niere, Haut und Gelenken (73, 80). Obwohl es wahrscheinlich scheint, dass NETs in der Pathogenese eine bedeutende Rolle spielen, reicht die alleinige Applikation von *in vitro* generierten NETs allerdings nicht zur Induktion einer Autoimmunreaktion aus (81). Eventuell spielen mikrobielle Bestandteile im Sinne von TLR Liganden eine Rolle als Adjuvantien bei der Entstehung von Autoreaktivität gegen Chromatin bei SLE (81).

Die autosomal-rezessiv vererbte zystische Fibrose ist eine Erkrankung, welche aufgrund eines gestörten transmembranösen Ionentransports mit einer erhöhten Mukusviskosität einhergeht (82, 83). Im Sputum von Patienten mit zystischer Fibrose finden sich stark erhöhte Level freier DNA, welche unter anderem zu dieser gesteigerten Viskosität beitragen (83-85). Ursprünglich wurde das Vorliegen freien Chromatins im Sputum als Zeichen einer vermehrten Nekrose von neutrophilen Granulozyten gesehen (86). Seit der Entdeckung von NETs werten einige Autoren die erhöhten DNA-Spiegel im Sputum als Ausdruck einer exzessiven NETs-Produktion (87, 88). Derzeit wird diskutiert, ob die Inflammation, die mit zystischer Fibrose einhergeht, primär durch die Ausschüttung von NETs und proinflammatorischen Zytokinen verursacht ist, oder sekundär durch die chronische Besiedlung des Mukus mit Pathogenen (89-91).

Auch bei der Präeklampsie, die weltweit ein häufiger Grund für maternale und fetale Mortalität ist, sind NETs involviert (70). Die Präeklampsie tritt in der späten Phase einer Schwangerschaft auf und ist assoziiert mit einer vermehrten Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und erhöhten Spiegeln von cf-DNA im maternalen Serum (92, 93). *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass von der Plazenta herrührende Faktoren, wie IL-8 und plazentäre Mikropartikel, neutrophile Granulozyten zur massiven Bildung von NETs aktivieren können (69). Dies könnte die erhöhten maternalen cf-DNA-Spiegel erklären und eine Rolle in der plazentären Minderperfusion, welche mit der Präeklampsie assoziiert ist, spielen (69).

1.7 Desoxyribonuklease und ihre therapeutische Bedeutung

Desoxyribonuklease (DNase) ist eine Endonuklease, die physiologisch in Pankreas und exokrinen Drüsen des Körpers produziert wird und die Hydrolyse von Desoxyribonukleinsäure (DNA) katalysiert (94). Eine ihrer Hauptfunktionen ist die Zersetzung von mit der Nahrung aufgenommener DNA im Verdauungstrakt (95). Darüber hinaus scheint DNase wichtig für die Hydrolyse extrazellulärer DNA im Rahmen einer Nekrose zu sein (95). Dies wird als Schutz gegen die Bildung von Autoantikörpern gegen DNA gewertet (95). Im Serum liegt die Konzentration von DNase durchschnittlich bei 3ng/ml (96).

Bei Krankheiten, die durch übermäßige Ablagerung chromatinhaltiger Strukturen verursacht werden, wie zum Beispiel bei der zystischen Fibrose oder dem systemischen Lupus erythematoses (SLE), kann die Eigenschaft von DNase, extrazelluläre DNA spalten zu können, therapeutisch genutzt werden (94, 97-102). Durch *in vitro* Studien konnte nachgewiesen werden, dass NETs durch Desoxyribonuklease gespalten werden, wohingegen ihr Chromatingerüst durch Streptokinase nicht zerstört wird (37, 39). Bei der Behandlung des SLE wurde die therapeutische Wirksamkeit von DNasen in einem murinen Modell auch *in vivo* bestätigt (97). Im Vergleich zur immunsuppressiven Standardtherapie mit Steroiden war die intermittierende DNase-Behandlung mit einem positiven Einfluss auf die Lebensdauer, einer reduzierten Anzahl von Immunkomplexablagerungen und einer verbesserten Organfunktion assoziiert

(97). In einer darauf aufbauenden Studie mit humanen Patienten, die an einem SLE erkrankt waren, wurde die intravenöse Gabe von rekombinanter humaner DNase (rhDNase) gut vertragen und führte nicht, wie befürchtet, zu einer Bildung neutralisierender Antikörper gegen rhDNase (94).

Bei Patienten mit zystischer Fibrose wurden darüber hinaus bereits in mehreren Studien positive Behandlungseffekte durch rhDNase nachgewiesen (100-102). Im Sputum dieser Patienten ist vermehrt freie DNA nachweisbar, welche unter anderem zu einer erhöhten Viskosität des Mukus führt (84, 85). Seit 1992 wird rhDNase bei der Therapie der zystischen Fibrose angewandt. Diese Therapie ist assoziiert mit einer Größenabnahme der freien DNA im Sputum und geht evidenzbasiert mit einer verbesserten Lungenfunktion einher (83, 103).

DNasen können sowohl intraperitoneal (i.p.) als auch intravenös (i.v.) appliziert werden und zeigen bei beiden Applikationsformen nach pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Untersuchungen eine gute Enzymaktivität (94, 97). Die Halbwertszeit für rhDNase im Serum liegt nach i.v. Injektion bei circa 105 Minuten und nach i.p. Injektion bei 5 Stunden (97). Für eine nachweisbare Nukleaseaktivität im Serum ist eine Serumkonzentration von 50 bis 100 ng/ml rhDNase notwendig (96).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die pharmakodynamischen und –kinetischen Eigenschaften sowie die Fähigkeit von Desoxyribonukleasen, das Chromatingerüst der NETs zu spalten, eröffnet die Möglichkeit, die pathophysiologische Bedeutung von NETs bei der Sepsis weiterführend *in vivo* zu untersuchen. Im Rahmen eines Projekts sollten in einem murinen Sepsismodell die lokalen und systemischen pathophysiologischen Einflüsse von NETs und die therapeutische Rolle von DNase bei der polymikrobiellen Sepsis evaluiert werden.

Innerhalb des Gesamtprojekts wurden für diese Arbeit folgende Zielsetzungen definiert:

1. Untersuchung der bakteriellen Dissemination durch Bestimmung der *colony forming units* (CFU) in Lunge, Leber, Blut und Peritonealhöhle als besonders von der Sepsis betroffene Organe
2. Untersuchung der Migration neutrophiler Granulozyten durch histologische Auszählung in den Endstromgebieten Lunge und Leber.

Die Basis der Arbeit bildet ein Mausmodell mit C57Bl/6-Mäusen, bei dem durch Zökumligation und -punktion (*cecal ligation and puncture*, CLP) eine polymikrobielle Sepsis induziert wurde. Dieses Verfahren gilt als etabliert für die Induktion einer polymikrobiellen Sepsis mit Keimen der intestinalen Flora (104). Nach CLP entwickeln die Tiere eine Bakteriämie, Hypothermie, Hypotension und darüber hinaus Schäden an multiplen Organsystemen (105-107). Die Neutralisation von NETs erfolgte durch intermittierende intraperitoneale Injektion rekombinanter humaner Desoxyribonuklease (rhDNase) zu definierten Zeitpunkten nach CLP (1 Stunde, 4 Stunden, 7 Stunden, 10 Stunden, 24 Stunden und 27 Stunden nach CLP). Anhand dieses Protokolls sollte überprüft werden, welche Bedeutung NETs für die bakterielle Infiltration von Organen, Blut und Peritoneallavage, sowie auf die Leukodiapedese von neutrophilen Granulozyten besitzen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Im Folgenden werden die bei dieser Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien aufgelistet.

2.1.1 Geräte

- HE-Färbeapparat: Tissue-Tek (Xpress® x, Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande)
- Auflichtmikroskop: Axiovert (Zeiss, Jena, Deutschland)
- Mikrotom: HM400, (Microm, Walldorf, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

- Mikrotiterplatten: Polystyrol-Platten, 96 Vertiefungen, U-Form, oberflächenunbehandelt, steril (BRAND GmbH+Co KG, Wertheim, Deutschland)
- Objektträger: Glasobjektträger, 76 x 26mm, mit Mattrand, geschnitten und gereinigt (Engelbrecht, Edermünde, Deutschland)
- Pipetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Plattenmedien: Columbia CNA Agar mit 5% Schaafsblut
- Schraubenverschlussröhrchen (Falcon BD, Heidelberg, Deutschland)

2.1.3 Chemikalien

- ASDCL-Lösung: bei insgesamt 24ml bestehend aus 0,5ml Fast-Red-Violet LB-Lösung, 0,5ml Natriumnitritlösung, 20ml Aqua dest, 2,5ml Trizmal 6,3 und 0,5ml Naphtol AS-D Chloracetat-Lösung (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)

- Dulbecco's phosphate buffered saline: Phosphatgepufferte Salzlösung (Gibco/Invitrogen, , Karlsruhe, Deutschland)
- Eosin-G-Lösung (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)
- Hämalaun-Lösung (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)

2.2 Tiermodell

Die Tierversuche wurden von einem anderen Mitglied der Arbeitsgruppe durchgeführt (Abschnitt 2.2.1 bis 2.2.4). Die Darstellung des Tiermodells wird lediglich zur Anschaulichkeit des Projekts aufgeführt.

2.2.1 Versuchstiere

Die Experimente wurden mit weiblichen Wildtyp C57bl/6 Mäusen (TVA, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt. Sie waren zum Zeitpunkt der Versuche 7-11 Wochen alt und 18-22 g schwer. Alle Mäuse wurden unter *specific pathogen free* (SPF) Bedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu Nagetierfutter und zu Wasser ad libitum. Die Tierversuche erfolgten nach behördlicher Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Umweltschutz NRW (Aktenzeichen: 87-51.04.2010.A112).

2.2.2 Versuchsaufbau

Zu Beginn erfolgte eine Einteilung der Mäuse in 4 Gruppen:

1) Sham; 2) Sham + rhDNase; 3) CLP; 4) CLP + rhDNase. Bei Mäusen der Sham-Gruppe wurde lediglich eine mediane Laparotomie mit Eröffnung von Faszia und Peritoneum durchgeführt. Mäuse der Sham + rhDNase-Gruppe erhielten zusätzlich zu der Eröffnung des Abdomens intraperitoneale (i.p.) Injektionen von rekombinanter humaner DNase (rhDNase) zu definierten Zeitpunkten. Bei den Mäusen der CLP-Gruppe wurde das Abdomen median

laparotomiert und anschließend eine Ligation und Punktion des Zökums durchgeführt. Den Tieren, die der CLP + rhDNase-Gruppe angehörten, wurde nach Laparotomie mit zökaler Ligation und zökaler Punktion intraperitoneal (i.p.) rhDNase zu definierten Zeitpunkten appliziert. Naive Mäuse ohne jegliche Behandlung dienten als Kontrollgruppe (n = 35). Um die Lebensdauer der Mäuse nach CLP zu beurteilen wurde die Mortalität alle 12 Stunden bis zum 7. Tag beobachtet.

2.2.3 Zökalligation und Punktion

Das CLP Modell ist ein bereits etabliertes Verfahren zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis (104). Eine Mischung aus 10 mg/kg Xylazin und 100 mg/kg Ketaminhydrochlorid wurde zunächst zur Betäubung i.p. injiziert. Nach Rasur und Desinfektion des Abdomens erfolgte eine mediane Laparotomie von 1 cm Länge, bei der sowohl Faszie als auch Peritoneum eröffnet wurden. Dann wurde das Zökum mit einem Faden der Stärke 4-0 proximal zu ca. 50% ligiert, wobei das intestinale Lumen durchgängig blieb. Mit einer 21-Gauge-Kanüle wurde das Zökum zweimal punktiert, sowie etwas Darminhalt ausgepresst. Im Anschluss erfolgte die Reposition des Darmes und der Bauchdeckenverschluss mittels zweifacher Naht. Unter diesen Bedingungen zeigten alle Mäuse, bei denen eine CLP durchgeführt wurde, schwere Krankheitszeichen innerhalb der ersten 24 Stunden. In der Sham-Gruppe erfolgte eine Laparotomie und Mobilisation des Darms ohne jedoch, dass eine Ligation und Punktion des Zökums durchgeführt wurde.

2.2.4 Intraperitoneale Injektion von rhDNase

Mäuse, welche eine Behandlung mit rhDNase bekamen, wurde gemäß Arbeitsprotokoll zu definierten Zeitpunkten bestimmte Konzentrationen von rhDNase intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die i.p. Applikation von rhDNase bei Mäusen wurde zuerst von Macanovic und Mitarbeitern beschrieben. Diese zeigten, dass Serumkonzentrationen von rhDNase zwischen 0,1 und 1 µg/ml

notwendig sind, um eine nachweisbare Endonukleaseaktivität im Serum zu erreichen (97). Die Halbwertszeit von rhDNase im Serum liegt nach i.p. Injektion bei 5 Stunden. In dieser Arbeit wurde den Tieren rhDNase in einer Dosis von 5 mg/kg oder statt rhDNase 100 µl PBS mit 2 mM Calcium injiziert. Die Gabe erfolgte 1 Stunde, 4 Stunden, 7 Stunden, 10 Stunden, 21 Stunden, 24 Stunden und 27 Stunden nach CLP. In den Sham-Gruppen wurde das Zökum nicht perforiert und die Mäuse erhielten lediglich Injektionen mit rhDNase oder der Kontrolllösung zu den korrelierenden Zeitpunkten. Die Mäuse wurden zu definierten Zeitpunkten durch Kohlenstoffmonoxid-Intoxikation getötet. Unmittelbar nach der Tötung wurde durch kardiale Punktion Blut gewonnen. Zudem erfolgte durch Spülung der Peritonealhöhle mit 4 ml eiskaltem PBS die Gewinnung von Peritoneallavage-Flüssigkeit. Aus den Suspensionen wurde die Anzahl der *colony forming units* (CFU) bestimmt. Zudem wurden die Organe Lunge und Leber steril präpariert.

2.3 Methoden

Die Bestimmung der Konzentrationen von cf-DNA/NETs, DNase und IL-6 wurden von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Die histologische Untersuchung im Hinblick auf die Leukodiapedese neutrophiler Granulozyten, sowie die Bestimmung von *colony forming units* (CFU) in Leber, Lunge, Blut und Peritoneallavage, wurden von mir durchgeführt.

2.3.1 Bestimmung der *colony forming units* (CFU)

Die quantitative Analyse vermehrungsfähiger Bakterien im Blut, in der Peritonealhöhle, sowie in Lunge und Leber der Mäuse erfolgte durch Bestimmung der *colony forming units* (CFU). Für die Analyse standen je 30 µl zu definierten Zeitpunkten unter sterilen Bedingungen gewonnene

Zellsuspensionen aus der Peritonealspülung und intrakardial gewonnen Blutes zur Verfügung.

Von jeder Probe wurden drei 1:10 Verdünnungsreihen hergestellt, wobei die erste Verdünnung 10 µl Peritoneallavage oder Blut auf 90 µl PBS beinhaltete. Jede Verdünnungsreihe bestand aus fünf 1:10 Verdünnungen, sodass in der letzten Verdünnung eine Konzentration von 1:100 000 vorlag. Außerdem wurde je Verdünnungsreihe eine Negativkontrolle mit PBS angefertigt. 10 µl aller Verdünnungen, inklusive den Negativkontrollen, wurden auf Columbia Agar Platten mit 5% Schaafsblut aufgetragen. Diese wurden anschließend unter aeroben Bedingungen bei 37 °C vibrationsarm inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Auszählung der Bakterienkolonien. Dabei wurde der Mittelwert aller drei Verdünnungsreihen pro Probe ermittelt, wobei immer mit der Verdünnungsstufe gerechnet wurde, in der alle drei Verdünnungsreihen zählbare Bakterienkolonien aufwiesen. Die Ergebnisse wurden spezifiziert als CFU pro 1 ml Peritoneallavage oder Blut.

Zusätzlich wurden ein Lungenflügel und die Hälfte der Leber zu den definierten Zeitpunkten unter sterilen Bedingungen mit einem Metallmörser unter Zugabe von 1 ml PBS homogenisiert. Von je 10 µl des Überstandes vom Homogenisat wurden mit 90 µl PBS drei 1:10 Verdünnungsreihen je Probe hergestellt. Jede Verdünnungsreihe beinhaltete fünf Verdünnungen und eine Negativkontrolle. Das weitere Vorgehen entsprach dem von Peritoneallavage und Blut. Die Ergebnisse wurden spezifiziert als CFU pro 1 ml Homogenisat.

2.3.2 Histologische Untersuchung von Leber und Lunge

Als quantitatives Maß der Leukodiapedese bei der polymikrobiellen Sepsis wurde die Anzahl neutrophiler Granulozyten in Leber und Lunge bestimmt. Für die Analysen standen die zu den definierten Zeitpunkten nach CLP steril entnommenen Organe Lunge und Leber zur Verfügung. Je ein Lungenflügel und die Hälfte der Leber wurden sofort nach Entnahme bei Raumtemperatur in 4% Formaldehyd fixiert. Danach wurden sie dehydriert, paraffiniert und in Paraffin eingebettet. Dann wurden von jeder Probe zwei 3 µm dicke Schnitte

mit einer Stahlklinge, die in einem Schlittenmikrotom befestigt war, angefertigt. Die Schnitte wurden auf einen Glasobjektträger aufgetragen, in Küvetten sortiert und für 20 Minuten bei 60 °C in einem Brutschrank getrocknet.

Ein Schnitt jeder Probe wurde mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Dies erfolgte mit Hilfe des Färbeapparates des Institutes für Pathologie der Uniklinik Düsseldorf. In diesem wurden zunächst die Kerne mit Hämalaun-Lösung 3 Minuten gefärbt und die Präparate anschließend mit 0,1% HCl-Lösung 2 Sekunden lang gespült. Danach erfolgte eine Differenzierung mit Leitungswasser. Die Gegenfärbung erfolgte mit 0,5% Eosin-G-Lösung für 3 Minuten gefolgt von 30 Sekunden Spülen mit Leitungswasser. Dann durchliefen die Präparate eine ansteigende Ethanolreihe und wurden anschließend eingedeckelt. Zellkerne wurden so dunkelblau angefärbt, Zytoplasma rot und Kollagen, Elastin und Erythrozyten orange-rot.

Der zweite Schnitt jeder Probe wurde mit Chloracetatesterase gefärbt, um neutrophile Granulozyten nachweisen und quantifizieren zu können. Hierzu wurden die Präparate zunächst mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) gespült. Danach wurden sie mit Chloracetatesterase-Färbelösung (ASDCL-Färbung) bei 37 °C gefärbt. Nach 30 Minuten Färben wurde mit Aqua dest. gespült und eine Gegenfärbung mit Hämalaun-Lösung durchgeführt. Anschließend wurden die Präparate 3 Minuten in Leitungswasser getaucht, nochmals mit Aqua dest. gespült und schließlich eingedeckelt. Zellen der Granulopoese wurden so rot-violett angefärbt, wohingegen Lympho- und Monozyten nur eine schwache oder keine Reaktion zeigten. Zellkerne anderer Gewebe waren dunkelblau sichtbar.

Mit einem Mikroskop und computergestützter Bildverarbeitung wurde eine semiquantitative Analyse der positiv angefärbten Zellen pro Gesichtsfeld durchgeführt. Dafür wurden 20 Gesichtsfelder mit einem 100x Objektiv meanderförmig betrachtet und die neutrophilen Granulozyten ausgezählt. Danach wurde der arithmetische Mittelwert aller positiven Zellen pro Gesichtsfeld gebildet. Die Ergebnisse wurden spezifiziert als neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld.

2.4 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als arithmetisches Mittel (mean) \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels (*Standard error of the mean*, SEM). Daten, die aus verschiedenen Gruppen stammen, wurden mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (One-way ANOVA) und anschließend Newman-Keuls-Post-Test getestet. Die Daten zum Überleben der Mäuse sind in einer Kaplan-Meyer-Überlebenskurve dargestellt. Die Überlebenszeiten wurden verglichen durch den Gehan-Wilcoxon-Test; die Prävalenzen der Mortalität wurden verglichen durch den exakten Test nach Fisher. Als signifikant wurde ein p-Wert von <0.05 angenommen.

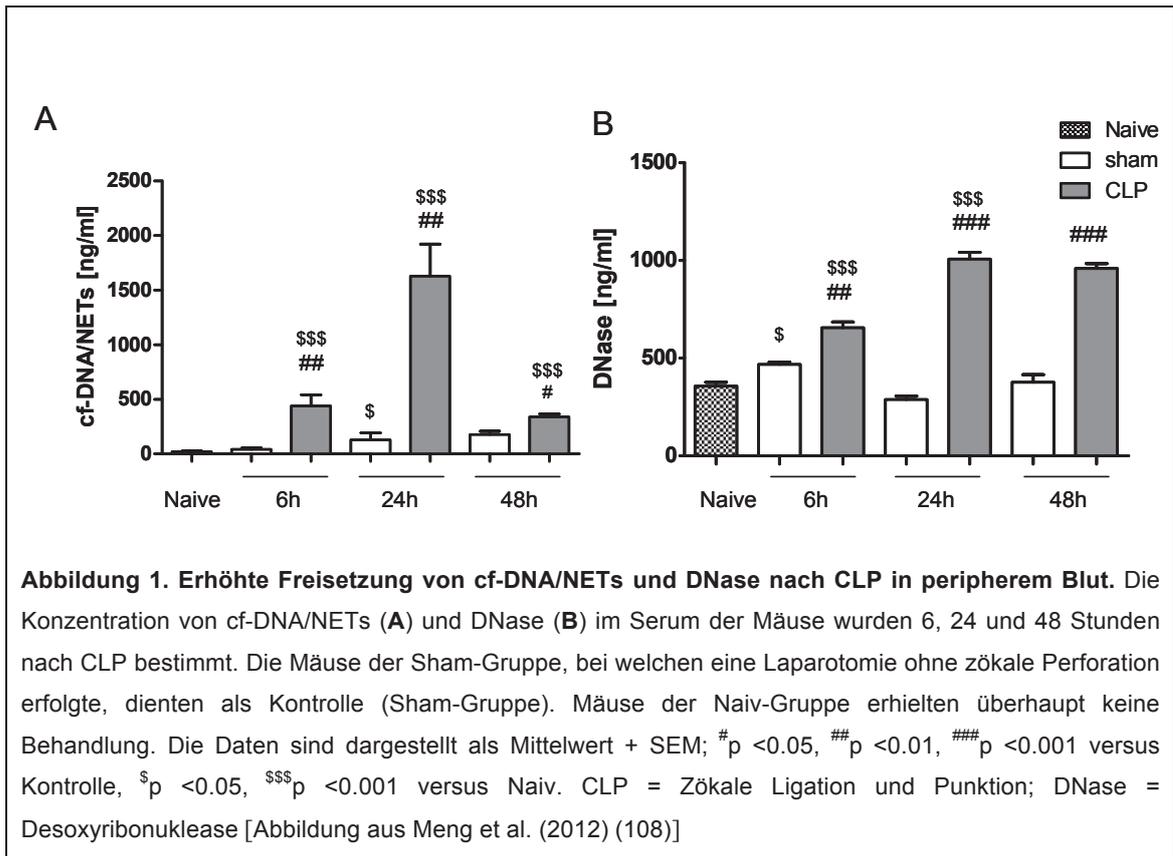
3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse des Gesamtprojekts

Die unter 3.1 dargestellten Ergebnisse sind Bestandteil des Gesamtprojekts der Arbeitsgruppe. Sie stellen die Grundlage der selbst durchgeführten Analysen dar und sind zum besseren Verständnis dargestellt.

3.1.1 Gesteigerte Freisetzung von NETs und erhöhte DNase-Konzentrationen nach CLP

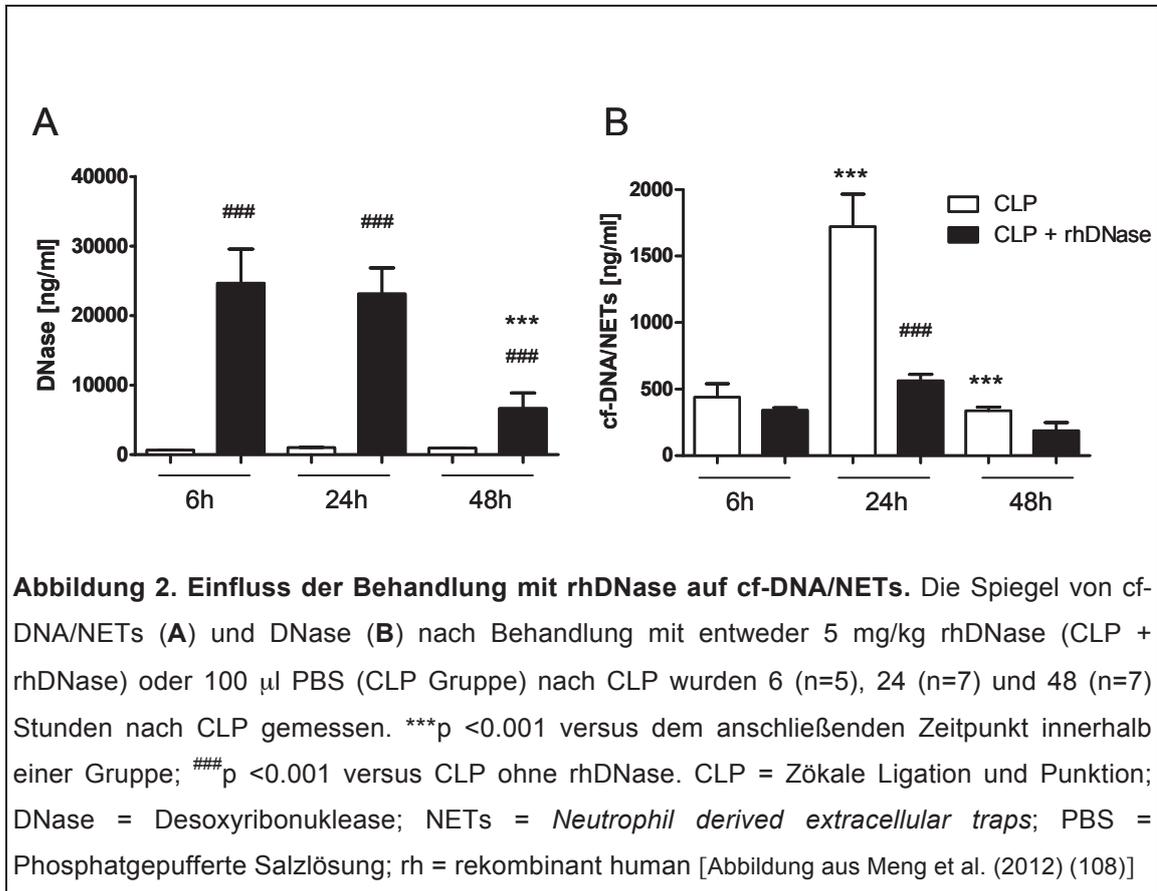
In einem ersten Schritt zur Untersuchung der pathophysiologischen Bedeutung von NETs bei der Entstehung und dem Verlauf einer Sepsis wurden die Spiegel von cf-DNA/NETs und DNase im Serum der Mäuse 6, 24 und 48 Stunden nach CLP oder Sham-Operation bestimmt (Abbildung 1A, B). In der CLP-Gruppe waren zu allen Zeitpunkten erhöhte Konzentrationen von cf-DNA/NETs verglichen mit der Sham-Gruppe und der Naiv-Gruppe messbar (Abbildung 1A). Das Maximum wurde 24 Stunden nach CLP erreicht (108). Bereits bei naiven Mäusen war DNase im Serum nachweisbar. Nach Induktion der Sepsis stieg die DNase-Konzentration kontinuierlich an. Zu allen 3 Zeitpunkten war die DNase-Konzentrationen gegenüber der Sham-Gruppe und den naiven Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 1B) (108). Im Gegensatz zu den Spiegeln von cf-DNA/NETs fielen die DNase-Spiegel auch 48 Stunden nach Induktion der Sepsis nicht ab (108).



3.1.2 Degradation von NETs *in vivo* durch die Applikation von rhDNase

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass NETs durch rhDNase in ihrer Struktur zerstört werden können (108). In einem weiteren Schritt sollte nun geprüft werden, ob eine Behandlung mit rhDNase auch *in vivo* zu einer Reduktion von cf-DNA/NETs führt (108). Hierzu wurde die Konzentration von cf-DNA/NETs und DNase im Serum von Mäusen 6, 24 und 48 Stunden nach CLP mit und ohne DNase-Behandlung bestimmt (Abbildung 2). Die intermittierende intraperitoneale Gabe von rhDNase führte zu einer erhöhten Konzentration von DNase im Serum (Abbildung 2A) (108). Überraschenderweise war die Serumkonzentration zum Zeitpunkt 48 Stunden nach CLP, das heißt 24 Stunden nach der letzten rhDNase-Gabe, immer noch deutlich erhöht (108). 6 Stunden nach CLP lagen die cf-DNA/NETs-Konzentrationen in beiden Mausgruppen auf gleichem Niveau (108). Die höchsten cf-DNA/NETs-Konzentrationen wurden 24 Stunden nach CLP nachgewiesen (Abbildung 2B) (108). In den Mäusen, die mit rhDNase behandelt wurden, waren die cf-

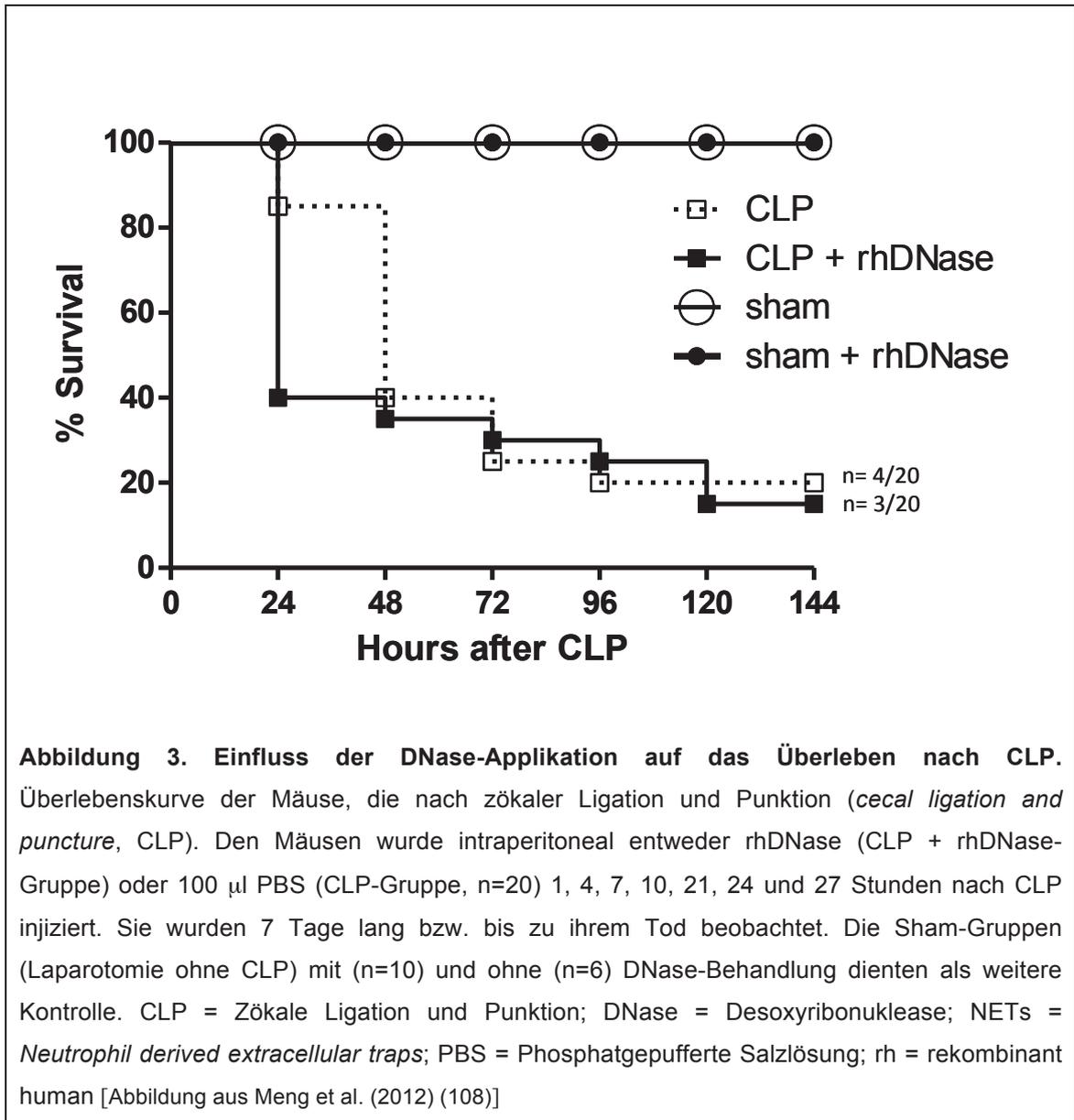
DNA/NETs Konzentrationen signifikant reduziert (108). Dies zeigte, dass eine Degradation von cf-DNA/NETs durch rhDNase *in vivo* möglich ist (108).



3.1.3 Einfluss der DNase-Applikation auf das Überleben nach CLP

Um die Relevanz der Formation von NETs für die Abwehr des Wirts bei der polymikrobiellen Sepsis zu eruieren, wurde zunächst der Einfluss einer Behandlung mit rhDNase auf das Überleben der Mäuse nach CLP oder Sham-Operation analysiert. Das mediane Überleben nach CLP war bei den Tieren, die i.p. Injektionen mit rhDNase bekamen, mit 24 Stunden kürzer als das der Mäuse, denen PBS injiziert wurde. Deren medianes Überleben lag bei 48 Stunden. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen im Gesamtüberleben der Mäuse. Interessanterweise war die

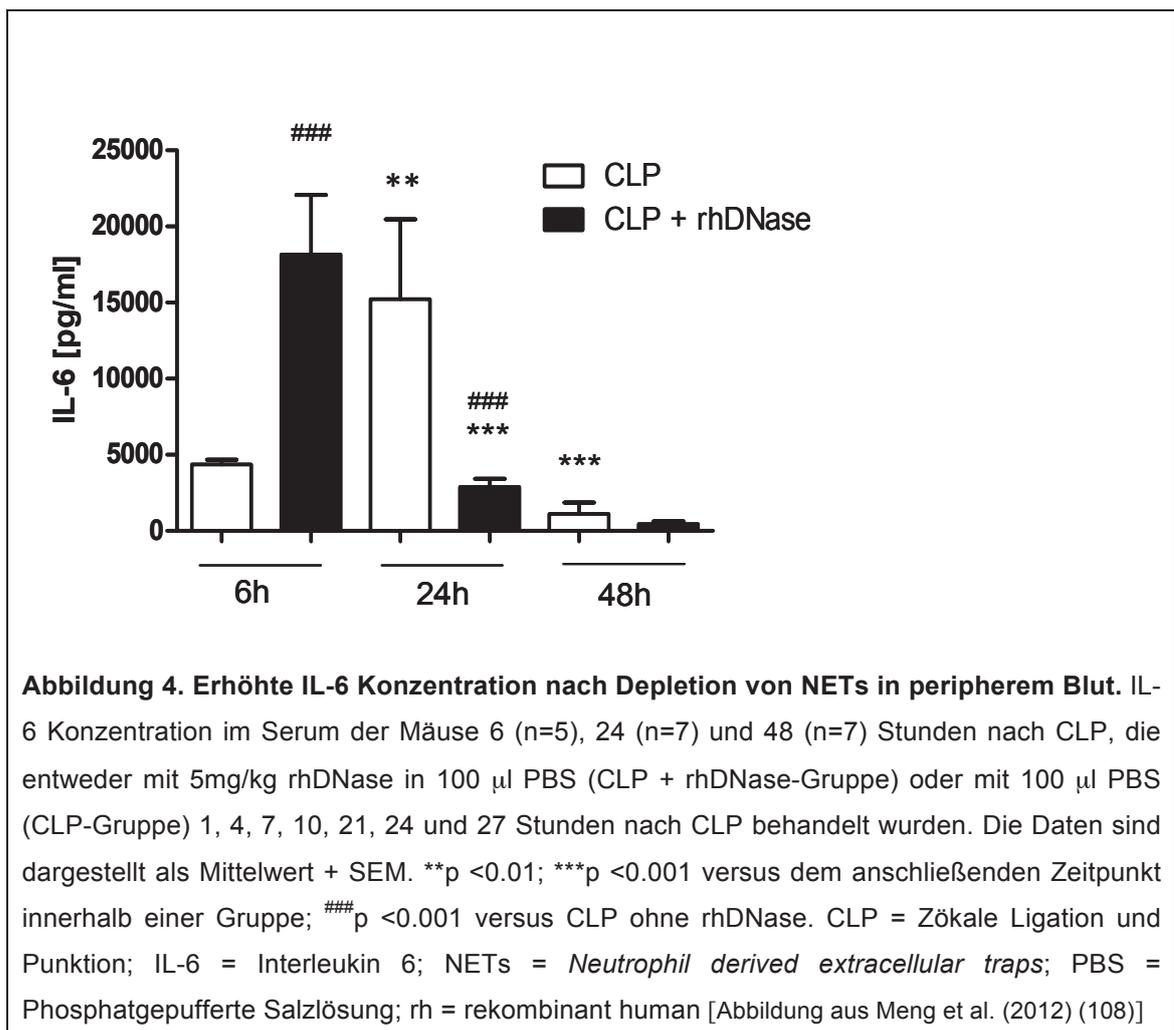
Prävalenz der Mortalität 24 Stunden nach Sepsisinduktion höher bei den Mäusen, die mit rhDNase behandelt wurden, als bei Injektion von PBS ($p = 0.008$; exakter Test nach Fisher; Abbildung 3) (108).



3.1.4 Gesteigerte inflammatorische Antwort durch die Depletion von NETs

Um den Einfluss einer Depletion von NETs auf die inflammatorische Antwort bei einer Infektion zu untersuchen, wurde die Konzentration von Interleukin 6 (IL-6) im Serum 6, 24 und 48 Stunden nach CLP gemessen (Abbildung 4). In

Mäusen, die mit rhDNase behandelt wurden, war die höchste Konzentration von IL-6 bereits 6 Stunden nach Sepsisinduktion nachweisbar. Im Gegensatz dazu stieg die Konzentration von IL-6 im Serum der Mäuse ohne rhDNase-Behandlung, erst später, mit einem Maximum 24 Stunden nach CLP (108). Zu diesem Zeitpunkt war die Konzentration von IL-6 bei den Mäusen, welche mit rhDNase behandelt wurden, bereits wieder gefallen (108).



3.2 Eigene Ergebnisse

Die unter 3.2 dargestellten Ergebnisse sind die innerhalb dieser Arbeit erzielten Resultate.

3.2.1 Gesteigerte bakterielle Dissemination durch die Depletion von NETs

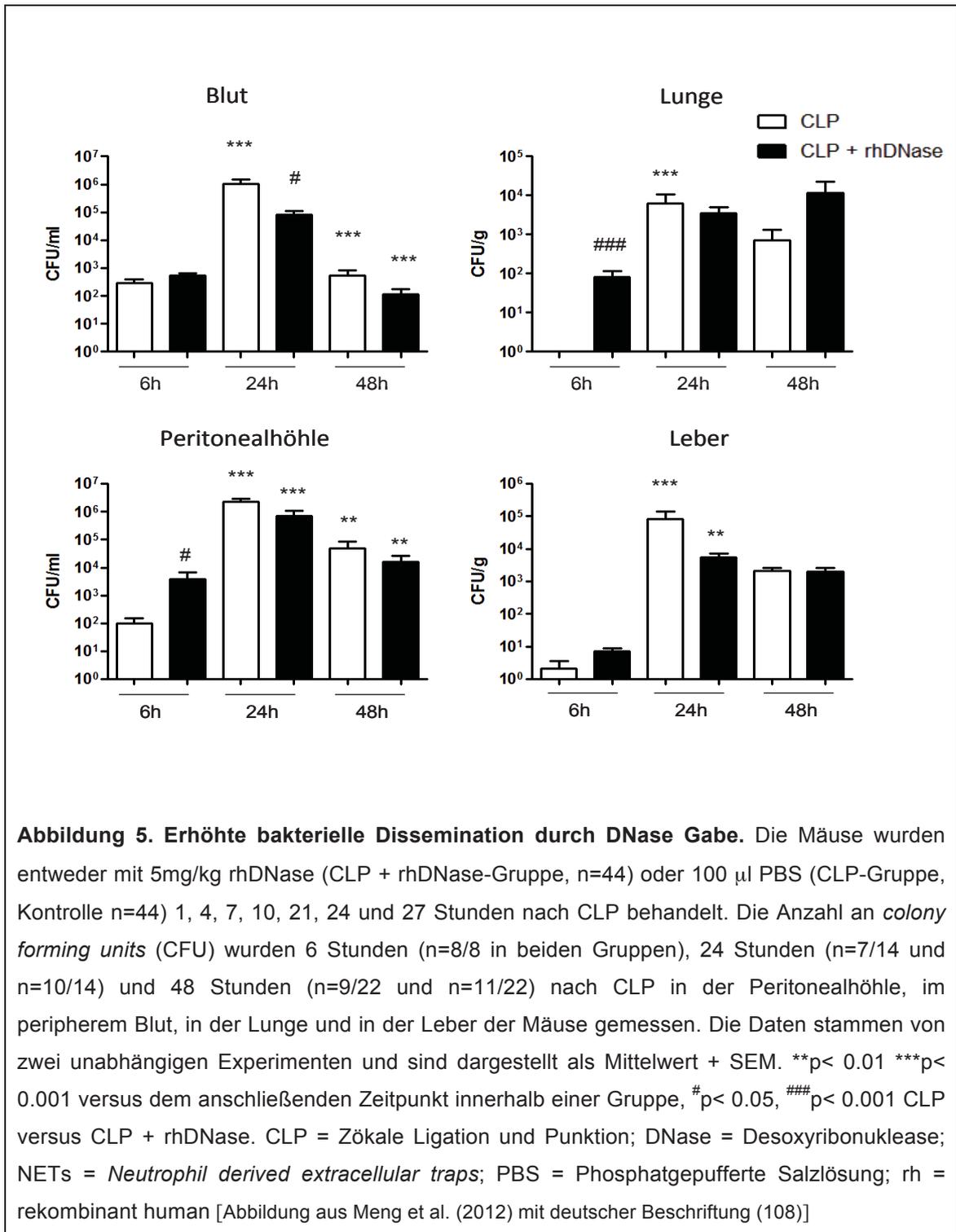
Zur Untersuchung, welchen Einfluss die rhDNase-Behandlung auf die bakterielle Streuung während einer Sepsis haben, wurde die Anzahl von *colony forming units* (CFU) im peripheren Blut, in der Peritonealhöhle, sowie in Leber und Lunge bestimmt (Abbildung 5). Bei den naiven Mäusen und den Mäusen der Sham-Gruppe wurde davon ausgegangen, dass keine CFU in den oben genannten Organen messbar sind. Sie wurden deshalb wie Kontrollen ohne CFU behandelt (nicht aufgeführt in den Diagrammen).

Die Anzahl von CFU in der Peritonealhöhle kann in diesem Modell als Maß für das lokale Fortschreiten am primären Manifestationsort der Infektion gewertet werden. Nicht überraschend waren 6 Stunden nach CLP Bakterien in der Peritonealhöhle der Mäuse nachweisbar, deren Anzahl innerhalb der kommenden 18 Stunden signifikant anstieg ($p < 0.001$). Bis zum Zeitpunkt 48 Stunden nach CLP sank die Anzahl an CFU erneut ($p < 0.01$), blieb jedoch insgesamt noch vergleichsweise hoch. In den Mäusen, die mit rhDNase behandelt wurden, waren 6 Stunden nach Sepsisinduktion signifikant mehr Bakterien nachweisbar als in den Mäusen, die PBS erhielten ($p < 0.05$). Zu den anderen Zeitpunkten lagen keine Gruppenunterschiede vor.

Der Nachweis von Bakterien im Blut bei bekanntem Fokus wird als ein sicheres Zeichen der systemischen Ausbreitung einer Infektion gewertet (14). Bereits nach 6 Stunden waren in beiden Gruppen CFU im Blut nachweisbar, ohne, dass ein Unterschied zwischen den Gruppen vorlag. Wie in der Peritonealhöhle kam es in beiden Gruppen zu einem Anstieg zum Zeitpunkt 24 Stunden, wobei die Anzahl an CFU in der CLP Gruppe höher lag als in der CLP + rhDNase-Gruppe ($p < 0.05$). In den darauffolgenden 24 Stunden fielen die Werte in beiden Gruppen wieder deutlich ab.

Lunge und Leber sind typische von Sepsis betroffene Organe (61, 109). Ein Nachweis von Bakterien in diesen Organen kann in diesem Modell als Maß für die systemische Ausbreitung einer bakteriellen Infektion genommen werden. In der Lunge von Mäusen der CLP + rhDNase-Gruppe waren nach 6 Stunden signifikant mehr CFU nachweisbar als in denen der CLP-Gruppe ($p < 0.001$). Die Zahl von CFU stieg zu den folgenden Zeitpunkten kontinuierlich an, mit einem Maximum 48 Stunden nach CLP.

Als Zeichen eines systemischen Infektionsgeschehens mit Manifestation in der Leber waren 6 Stunden nach CLP sowohl in der CLP + rhDNase-Gruppe als auch in der CLP-Gruppe CFU nachweisbar. Nach 24 Stunden stieg die Anzahl an CFU in beiden Gruppen signifikant an, wobei sogar tendenziell, aber ohne Signifikanz, mehr CFU in der CLP Gruppe als in der CLP + rhDNase-Gruppe nachweisbar waren ($p > 0.05$). Danach fiel die Anzahl von CFU zum Zeitpunkt 48 Stunden in beiden Gruppen wieder ab, blieb jedoch insgesamt hoch. Während des gesamten Beobachtungszeitraums waren allerdings keine Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar.



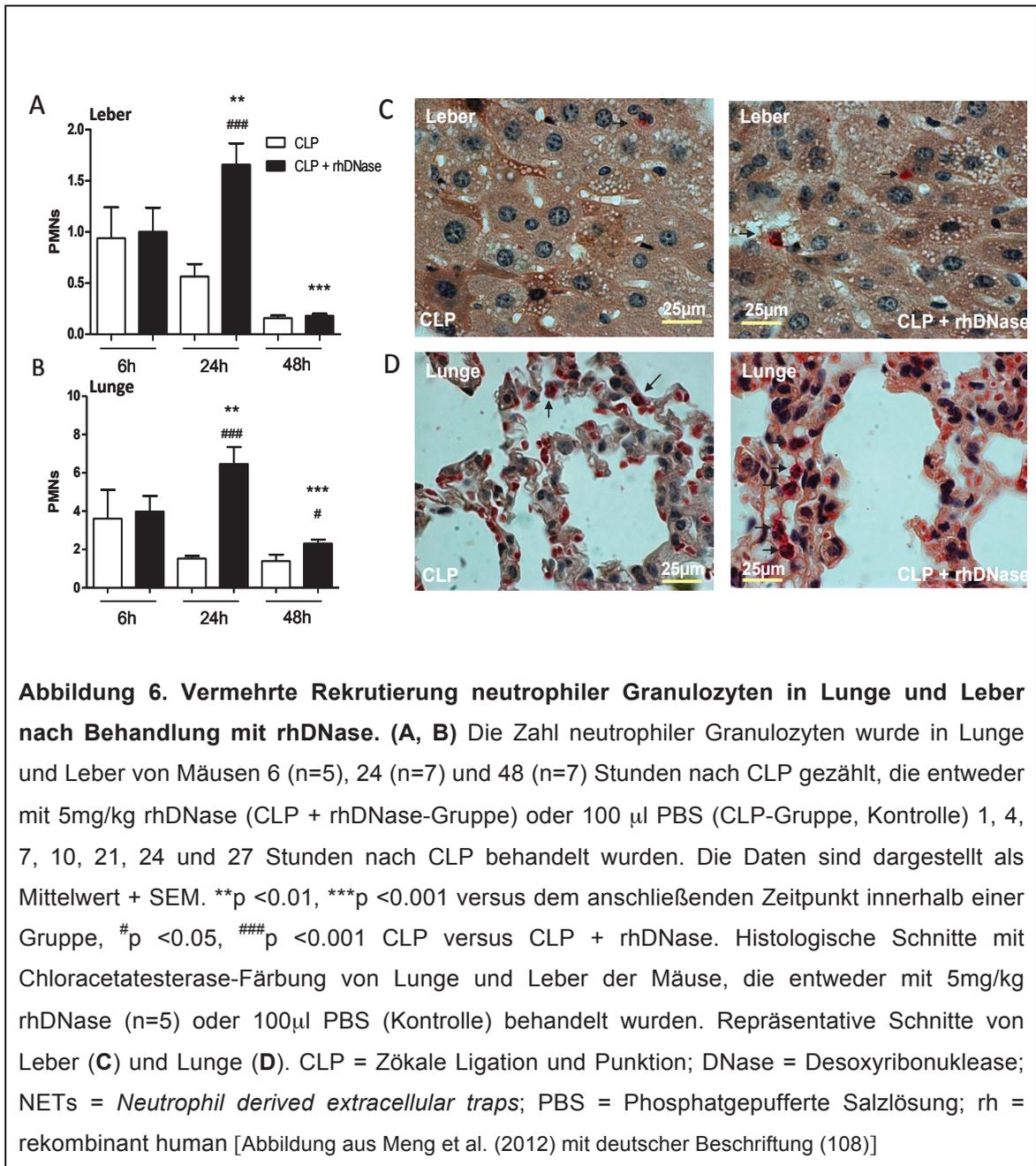
3.2.2 Verstärkte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in von Sepsis betroffene Organe durch die Depletion von NETs

Neutrophile Granulozyten spielen eine wesentliche Rolle im Rahmen der Frühphase der Sepsis und Bildung von NETs (22-24). Daher wurde untersucht, welchen Einfluss die Depletion von NETs auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Organe hat, die besonders von einer Sepsis betroffen sind (Abbildung 6). Es erfolgte eine quantitative Bestimmung der Neutrophilen in Leber und Lunge durch histologische Färbung.

In der Lunge waren 6 Stunden nach CLP keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an neutrophilen Granulozyten zwischen der CLP-Gruppe und der CLP + rhDNase-Gruppe vorhanden (Abbildung 6B). 24 Stunden nach CLP war die Behandlung mit rhDNase verglichen mit der CLP Gruppe mit einer signifikant verstärkten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge ($p < 0.001$) assoziiert. Die Anzahl an neutrophilen Granulozyten lag zu diesem Zeitpunkt in dieser Gruppe um ein vielfaches höher. In der CLP Gruppe hingegen nahm die Zahl neutrophiler Granulozyten nach 24 Stunden verglichen mit dem Zeitpunkt 6 Stunden sogar ab. Nach 48 Stunden schließlich sank die Zahl neutrophiler Granulozyten in der Lunge in beiden Gruppen deutlich, wobei sich interessanterweise die Werte in der CLP + rhDNase-Gruppe trotz vorhergehendem Anstieg nun wieder denen der CLP Gruppe annäherten.

In der Leber zeigte sich ein ähnlicher Verlauf. Zum Zeitpunkt 6 Stunden lag die Anzahl an neutrophilen Granulozyten zunächst in der CLP + rhDNase-Gruppe und in der CLP Gruppe auf gleichem Niveau (Abbildung 6A). 24 Stunden nach CLP zeigte sich in der CLP + rhDNase-Gruppe ein signifikanter Anstieg der neutrophilen Granulozyten. Nach 48 Stunden fiel die Zahl der neutrophilen Granulozyten wiederum stark ab. In der CLP-Gruppe hingegen kam es 48 Stunden nach Sepsisinduktion nicht zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten, sondern die Anzahl nahm sogar ab.

Repräsentative histologische Gewebeschnitte, die eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten als Folge einer Depletion von NETs 24 Stunden nach CLP in Leber und der Lunge darstellen, sind in Abbildung 6C und 6D gezeigt.



4. Diskussion

4.1 Überblick

In den aktuellen Studien der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass *neutrophil derived extracellular traps* (NETs) bei einer Vielzahl von Erkrankungen gebildet werden (65, 69-75, 89). Es wurde nachgewiesen, dass NETs in der Lage sind sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterien zu binden und abzutöten (37, 40, 44). Den NETs wird daher eine relevante Bedeutung in der unspezifischen Immunabwehr zugeschrieben. Die lokale NETs vermittelte Konzentration antibakterieller Enzyme kann jedoch gleichzeitig Schäden an Endothel, Gewebe und Organen des Wirts verursachen (40, 43, 60). Ziel des Gesamtprojekts war es, die lokalen und systemischen pathophysiologischen Einflüsse von NETs bei der polymikrobiellen Sepsis in der Maus zu untersuchen. In dem angewandten Modell war die Formation von NETs in der frühen Phase einer Sepsis signifikant erhöht (108). Die Konzentration von NETs konnte *in vivo* effektiv und dauerhaft durch intermittierende DNase-Injektionen nach CLP gesenkt werden (108). Darüber hinaus führte die Depletion von NETs zu einem schnelleren Verlauf einer Sepsis mit einer temporär erhöhten Prävalenz der Sterblichkeit und einer gesteigerten Inflammation (108). Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnte gezeigt werden, dass die NETs Depletion mit einer gesteigerten frühen bakteriellen Dissemination und einer gesteigerten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Sepsis-assoziierten Organe Lunge und Leber assoziiert waren. Diese Ergebnisse zeigen die wichtige Rolle von NETs als antibakteriellen Mechanismus in der frühen Phase einer Infektion bei einer polymikrobiellen Sepsis *in vivo* auf.

4.2 Bedeutung von NETs bei Sepsis

Neutrophile Granulozyten sind bei einer Infektion die erste Instanz der unspezifischen Immunabwehr des Körpers (13, 22-24). Neutrophile können Bakterien unterschiedlich abwehren, z.B. durch Phagozytose, Exozytose oder

durch die Bildung von NETs. Die netzartige Struktur der NETs mit vielen Verzweigungen ermöglicht die hohe lokale Konzentration antimikrobieller Proteine mit einer hohen antibakteriellen Aktivität (39). Die Stimulation von neutrophilen Granulozyten zur Bildung von NETs ist *in vitro* bereits etabliert (110). Ebenfalls ist die Darstellung des Vorgangs der Netose und die Darstellung dieser extrazellulären Strukturen *in vitro* möglich (97). Die direkte quantitative Messung von NETs *in vivo* ist bis heute nicht möglich. Jedoch gilt die Messung von cf-DNA/NETs als ein Surrogatparameter für die Bildung von NETs (111). Die Bildung von cf-DNA/NETs konnte in *ex vivo* Beobachtungsstudien bereits aufgezeigt werden (37). Auch im hier angewandten CLP Mausmodell konnte gezeigt werden, dass bei einer polymikrobiellen Sepsis vermehrt cf-DNA/NETs gebildet werden (108). Da das Grundgerüst von NETs aus Chromatin besteht, können sie durch DNase zerstört werden. Dies machen sich zum Beispiel einige Bakterienstämme zu Nutze, um einer Abtötung durch NETs zu entgehen (56-59). Brinkmann und Mitarbeiter konnten *in vitro* zeigen, dass bereits eine kurze Behandlung von aktivierten neutrophilen Granulozyten mit DNase zu einer Aufhebung der durch NETs vermittelten Tötung von Bakterien führt (39). Weiterhin zeigten Meng und Mitarbeiter im Rahmen dieser Arbeit die Auflösung der murinen NETs durch DNase mittels qualitativer Fluoreszenzmikroskopie *in vitro* (108). Hieraus ergab sich die Möglichkeit, die pathophysiologische Relevanz von NETs und die Auswirkungen einer Depletion von NETs *in vivo* durch systemische Applikation von DNase weiterführend zu untersuchen.

Zur Rolle des antibakteriellen Mechanismus von NETs liegen für verschiedene Infektionserkrankungen, auch der Sepsis, bereits einige Erkenntnisse vor (40, 112-114). Nach einer Infektion wehren neutrophile Granulozyten Bakterien zunächst durch Phagozytose und erst später durch die Formation von NETs ab (39). In einem vorangegangenen Sepsismodell wurden *in vivo* mehr Bakterien gebunden in NETs gefunden, als von Neutrophilen oder Makrophagen phagozytiert wurden (40). Die Autoren schlossen daraus, dass NETs besonders unter Strömungsbedingungen effektiver sind als die Phagozytose (40). Die Erkenntnisse zu der durch NETs vermittelten Zerstörung von Bakterien basieren mehrheitlich auf *in vitro* Untersuchungen. In dieser *in vivo* Studie

zeigte sich, dass die Freisetzung von cf-DNA/NETs schon früh nach der Induktion einer Sepsis erfolgt (108). So war die höchste Freisetzung von cf-DNA/NETs in den ersten 24 Stunden nach CLP messbar (108). Nach 48 Stunden fiel die cf-DNA/NETs Konzentration wieder ab (108). Am primären Manifestationsort der Sepsis, der nach CLP die Bauchhöhle ist, waren die Konzentrationen von NETs sogar über den gesamten Beobachtungszeitraum erhöht (108). Dies unterstreicht die wichtige Rolle, die NETs als Teil des unspezifischen Immunsystems in der Frühphase der Abwehr einer Sepsis einnehmen (108). *Ex vivo* konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten, welche aus dem Knochenmark von Mäusen gewonnen wurden, zur Bildung von NETs über die gesamte Dauer der Untersuchung vorhanden bleibt (108). Ein Abfall der Bildungsfähigkeit von NETs im Verlauf der Sepsis war nicht vorhanden (108). Weiterhin zeigten Meng und Mitarbeiter, dass 24 Stunden nach CLP, wo die höchsten Spiegel von cf-DNA/NETs *in vivo* gemessen wurden, auch gleichzeitig Konzentrationsspitzen *in vitro* bei der Freisetzung von NETs aus stimulierten Neutrophilen zu sehen waren (108).

Die erhaltene Bildungsfähigkeit von NETs über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg weist darauf hin, dass während des Fortschreitens einer Sepsis möglicherweise andere Regulationsmechanismen die Produktion von NETs beeinflussen. Grundsätzlich wäre es daher denkbar, durch selektive Stimulation von neutrophilen Granulozyten zur Bildung von NETs in der akuten Phase einer Sepsis die Abwehr von Bakterien zu fördern und das Fortschreiten der Sepsis zu reduzieren (108). Die Bildungsfähigkeit von NETs wurde von Meng und Mitarbeitern an stimulierten Neutrophilen aus dem Knochenmark geprüft. Sie könnten sich somit möglicherweise in ihrer Funktionalität von denen im peripheren Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten unterscheiden (108). Interessant wäre es daher für zukünftige Fragestellungen, ob auch aus dem peripheren Blut gewonnene neutrophile Granulozyten die gleiche Bildungskapazität während des Fortschreitens einer Sepsis aufweisen.

Es ist aktuell nicht bekannt, welche Faktoren bei neutrophilen Granulozyten den Wechsel von der Phagozytose zur Bildung von NETs während einer Sepsis

koordinieren. Diskutiert werden verschiedene Faktoren, die die Netose induzieren können. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) Neutrophile zur Formation von NETs anregen können (115). Es wird angenommen, dass dies eine Rolle in der Pathogenese von chronischen granulomatösen Erkrankungen (CGE), welche mehrere Defekte der NADPH-Oxidase aufweisen und dadurch keine ROS bilden können, spielt (115). In diesem Zusammenhang ist auch der Raf-MEK-ERK-Pathway bei der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten zur Bildung von NETs beteiligt (116). Dieser Signalweg führt unter anderem zu einer vermehrten Aktivierung der NADPH-Oxidase, welche wiederum über die Bildung von ROS zu einer Freisetzung von NETs führt (116). Darüberhinaus werden aktivierte Thrombozyten mit der NETs vermittelten Bakterienabwehr in Verbindung gebracht (40). Thrombozyten, deren primäre Funktion die Hämostase ist, sind bei der Pathophysiologie einer Sepsis von großer Bedeutung. Zum einen können sie sowohl proinflammatorische, als auch antiinflammatorische Faktoren und Mikropartikel ausschütten und so die Inflammation beeinflussen (117-119). Zusätzlich sind aktivierte Thrombozyten in der Lage bioaktive Mediatoren, wie zum Beispiel das prothrombotische Thromboxan A₂, zu produzieren (120). Bei einer Infektion oder einem Endothelschaden können sie Leukozyten unter anderem über Chemokine rekrutieren (119, 121, 122). Bei einer Sepsis werden darüberhinaus neben Neutrophilen auch aktivierte Thrombozyten in die Endstromgebiete der Sepsis-assoziierten Organe wie Leber und Lunge rekrutiert, was unter anderem mit der bei einer Sepsis entstehenden Thrombozytopenie in Verbindung gebracht wird (40, 65, 66). Das Ausmaß einer solchen Thrombozytopenie korreliert dabei mit der Schwere einer Sepsis und deren Mortalität (123). In einem Sepsismodell *in vivo* wurde gezeigt, dass aktivierte Thrombozyten neutrophile Granulozyten auch zur Freisetzung von NETs stimulieren können (40). Diese Stimulation fand hauptsächlich in den Lebersinusoiden und den Kapillaren der Lunge statt, was die Autoren auf den hier sehr geringen Gefäßdurchmesser zurückführten (40). Die Thrombozyten werden von Lipopolysacchariden durch den *toll-like*-Rezeptor (TLR)-4 aktiviert und binden dann an die Oberfläche von neutrophilen Granulozyten (40). Hierdurch werden NETs produziert, welche auch unter Strömungsbedingungen in der Lage sind Bakterien abzufangen (40). Da es

aber lediglich bei schwereren, systemischen Infektionen zu einer Aktivierung von Thrombozyten kommt, ließen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass gerade in diesen Situationen neutrophile Granulozyten zur Bildung von NETs angeregt werden (40). Dies steht im Einklang mit den in unserem Projekt gewonnenen Ergebnissen. Auch wir konnten eine inverse Korrelation zwischen der Konzentration von NETs und der Konzentration von Thrombozyten 24 Stunden nach CLP feststellen (108). Es zeigte sich, dass bei Mäusen, die mit rhDNase behandelt wurden, ein starker Abfall von cf-DNA/NETs einem deutlich Anstieg der Thrombozytenzahl gegenüberstand (108). Es wäre daher möglich, dass die verminderte Freisetzung von NETs zu einer kompensatorisch verstärkten Mobilisation von Thrombozyten aus dem Knochenmark führt (108). Auf der anderen Seite wäre es denkbar, dass die Bindung von Thrombozyten an die NETs Strukturen in den Endstromgebieten zur Thrombozytopenie im peripheren Blut beitragen.

4.3 Bedeutung von DNase bei Sepsis

Die intermittierende Gabe von rhDNase führte zu einer signifikanten Senkung der cf-DNA/NETs Konzentration im Serum (108). Als Folge dieser Behandlung mit rhDNase waren die Prävalenz der Mortalität 24 Stunden nach CLP und das mediane Überleben dieser Mäuse reduziert (108). Trotzdem wurde das Gesamtüberleben durch eine Behandlung mit rhDNase bis zu 72 Stunden nach CLP nicht beeinflusst (108). Dies unterstreicht, dass die NETs insbesondere in der frühen Phase einer Infektion eine bedeutende antibakterielle Funktion inne haben. In späteren Phasen stehen Mechanismen des spezifischen Immunsystems im Vordergrund (124). Gleichzeitig könnte die gezielte Stimulation von neutrophilen Granulozyten zur Formation von NETs möglicherweise zur Fortführung der durch NETs vermittelten Effekte über einen längeren Zeitraum führen. Zu bedenken ist dabei jedoch die gleichzeitige Erhöhung der potentiell gewebeschädigenden Proteine in den Organen über die frühe Phase der Sepsis hinaus. In Anbetracht der noch unzureichenden Erkenntnisse über die genauen Signalwege ist die isolierte NETs Stimulation noch nicht möglich.

Der mangelnde Effekt von rhDNase auf das Gesamtüberleben im angewandten CLP Modell lässt sich auch durch das hier verwendete Studienprotokoll erklären. Aktuelle Studien konnten zeigen, dass bei einer lokalisierten oder weniger schweren Bakteriämie neutrophile Granulozyten nicht zur Formation von NETs aktiviert werden (40). Im vorliegenden CLP Modell wurde eine vergleichsweise schwere Bakterienlast durch CLP induziert und eine Überlebensrate von 20% nach 6 Tagen beobachtet (108). In weiterführenden Studien könnte es interessant sein, ob die Effekte der NETs in Bezug auf die Überlebensrate gegebenenfalls bei einer zwar weiterhin systemisch relevanten, jedoch geringeren bakteriellen Last nachweisbar werden. Zudem wäre es interessant, ob bei einer geringen Bakterienlast mit hoher Überlebensrate, im Sinne einer „milden“ Sepsis, überhaupt NETs ausgeschüttet werden. In dem angewandten Modell wurde den Mäusen rhDNase in den ersten 48 Stunden appliziert (108). Bei einer Halbwertszeit der rhDNase von 5 Stunden bei intraperitonealer Injektion war die Wirkung zeitlich begrenzt. Die Formation von NETs durch eine Behandlung mit rhDNase war dementsprechend nur in den ersten 48 Stunden nach CLP verringert (108). Möglich wäre ein Einfluss von DNase auf den Verlauf einer Sepsis bei einer Anwendung über einen längeren Zeitraum. Da allerdings die Formation von NETs vornehmlich innerhalb der ersten 24 Stunden nach CLP stattfand (108) sind Effekte über einen längeren Zeitraum unwahrscheinlich.

Im Rahmen dieses Projekts konnte zusätzlich gezeigt werden, dass bei einer Sepsis DNase in erhöhten Konzentrationen im Blut vorhanden ist (108). So lagen die Konzentrationen von DNase im Serum bei Sepsis über dem Normwert von durchschnittlich 3 ng/ml. DNase wird zum einen endogen vom Pankreas und von exokrinen Drüsen produziert und ausgeschüttet (94). Buchanan und Mitarbeiter zeigten aber auch, dass viele Bakterienstämme DNase exprimieren um sich der NETs vermittelten Tötung zu entziehen (57). Es wäre folglich möglich, dass die erhöhten DNase-Konzentrationen in der CLP Gruppe auf eine DNase-Sekretion von Bakterien zurückzuführen sind und sich so die erhöhten Werte im Serum erklären lassen. Insgesamt lagen die DNase-Konzentrationen in dieser Gruppe aber wie erwartet um ein vielfaches unterhalb denen der CLP + DNase-Gruppe (108). Die Daten weisen darauf hin, dass die

Konzentrationen von DNase im normalen Progress einer Sepsis keinen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung der NETs und damit auf den weiteren Verlauf einer Sepsis haben. Das angewandte CLP Modell führt zu einer polymikrobiellen Sepsis. Auf der Basis der Erkenntnisse von Buchanan könnte die Depletion der NETs zu einer Selektierung von gegen NETs resistente Bakterienstämme führen und damit einen Einfluss auf den Sepsisprogress haben. Es wäre daher für zukünftige Untersuchungen interessant, die Effekte der Applikation von DNase bei einer Sepsis durch einen einzelnen Keim darzustellen. Zudem wären Einflüsse der Applikation von DNase nicht nur auf neutrophile Granulozyten, sondern auch auf andere immunokompetente Zellen oder nicht DNase-produzierende Bakterienstämme denkbar. Dies könnte ebenfalls eine Rolle innerhalb des Fortschreitens der Sepsis spielen.

In anderen murinen Modellen zu anderen Krankheitsentitäten war die Applikation von DNase nicht mit relevanten Nebenwirkungen assoziiert und auch bei der bereits etablierten Behandlung des systemischen Lupus erythematodes und der zystischen Fibrose sind keine relevanten Nebenwirkungen bekannt (94, 100-103). Auch in der vorliegenden Studie konnten keine gravierenden Nebenwirkungen festgestellt werden. Die Gabe von DNase bei Tieren ohne Sepsis hatte keinen Einfluss auf das Überleben (108). Zu Auswirkungen von DNase auf Organebene kann keine Aussage gemacht werden. In zukünftigen Analysen wären hierzu zusätzlich histologische Untersuchungen hilfreich.

4.4 Inflammation

Offensichtlich sind NETs vor allem in der frühen Phase einer Infektion von bedeutender Rolle. Im Rahmen des Gesamtprojekts wurde gezeigt, dass die cf-DNA/NETs Freisetzung signifikant 6 Stunden und 24 Stunden nach CLP erhöht war (108). Zudem war das mittlere Überleben der Mäuse, in denen die NETs durch DNase zerstört wurden, gegenüber dem Überleben der Tiere mit normaler NETs Formation verringert (108). In der Frühphase einer Sepsis kommt es neben der Aktivierung immunokompetenter Zellen zu einer starken

inflammatorischen Reaktion. Es werden zum einen proinflammatorische Mediatoren wie Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) freigesetzt (16, 18). Überlappend dazu kommt es auch zu einer Freisetzung von antiinflammatorischen Mediatoren wie Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist (IL-1ra), Prostaglandinen, löslichen Rezeptoren und antiinflammatorisch immunmodulierenden Hormone (16). Das Zytokin IL-6 ist ein wichtiger proinflammatorischer Parameter in der Frühphase einer Sepsis (125). Die Plasmaspiegel von IL-6, als proinflammatorischem Mediator, korrelierten mit der Mortalität bei Sepsis (125, 126). Ebong und Mitarbeiter konnten in einem CLP Modell zeigen, dass Tiere mit den höchsten IL-6-Plasmaspiegeln die höchste Mortalität hatten (127, 128). Im Rahmen des hier angewandten Modells zeigte die Messung von IL-6, dass eine Depletion der NETs einen früheren Anstieg von IL-6 im Serum verglichen mit der Kontrollgruppe zur Folge hatte (108). Für die deutlich erhöhten IL-6 Werte bei Fehlen von NETs Strukturen gibt es zwei Erklärungsansätze. Zum einen wäre es daher denkbar, dass die verstärkte inflammatorische Reaktion einen Kompensationsmechanismus der fehlenden NETs Bildung darstellt. Daraus könnte der Rückschluss gezogen werden, dass IL-6 ein potentieller Stimulator von NETs ist. In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse, welche anderen Zytokine mit der Formation von NETs in Zusammenhang stehen. Auf der anderen Seite könnte die verstärkte Ausschüttung von IL-6 eine Reaktion auf die verstärkte bakterielle Dissemination darstellen. Die bakterielle Dissemination in der Bauchhöhle bei Depletion der NETs war früher ausgeprägt. Dies wiederum lässt den Rückschluss zu, dass NETs die Dissemination einer Sepsis zwar nicht verhindern, aber dennoch verzögern können.

4.5 Rekrutierung neutrophiler Granulozyten

Während der frühen Phase einer Sepsis werden neutrophile Granulozyten aktiviert und migrieren vor allem in die Kapillaren der Sepsis-assoziierte Organe (109). Hierzu gehören in erster Linie Lunge und Leber, die im Rahmen einer Sepsis als erste Organe von der systemischen Infektion betroffen sind (109).

Auch in dieser Arbeit konnten neutrophile Granulozyten nach CLP in Lunge und Leber nachgewiesen werden. Gleichzeitig waren im Blut bei einer Sepsis signifikant weniger neutrophile Granulozyten nach CLP nachweisbar (108). Daher lässt sich vermuten, dass eine starke Rekrutierung von Neutrophilen aus dem Blut erfolgt. Die Depletion von NETs hatte einen signifikanten Anstieg der Anzahl neutrophiler Granulozyten in Lunge und Leber 24 Stunden nach CLP zur Folge. Dies weist daraufhin, dass bei Sepsis versucht wird eine verminderte Zahl an NETs durch eine erhöhte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten auszugleichen. Die vermehrte Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten kann im Zusammenhang mit der verstärkten bakteriellen Dissemination als Kompensationsmechanismus einer unzureichenden bakteriellen Abwehr gesehen werden. Histologische Analysen wiesen in dem Modell zudem aus, dass eine Depletion von NETs mit relevanten Sepsis-assoziierten Organschäden von Leber und Lunge assoziiert ist (108). In der Leber war bei Fehlen von NETs Strukturen eine vermehrte Steatose und Ballonierung der Parenchymzellen nachweisbar (108). In der Lunge ging die Depletion von NETs mit einem verstärkten interstitiellen Ödem einher (108). Dies unterstreicht die signifikante Relevanz von NETs für die Ausprägung einer Sepsis. Mit dem Verlust der antibakteriellen Aktivität von NETs im Blut können Bakterien schneller Organe überschwemmen und so die Progression der Sepsis verstärken.

Neutrophile Granulozyten besitzen eine Lebensdauer von 12-14 Stunden im peripheren Blut (23). Werden sie nicht durch proinflammatorische Faktoren stimuliert, wandern sie in Organe des retikuloendothelialen Systems, wie zum Beispiel in die Leber, wo sie die Apoptose durchlaufen (23, 129). Bei der Sepsis ist die Apoptose von neutrophilen Granulozyten reduziert und die Lebensdauer verlängert (13). Die erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten in den Organen Lunge und Leber in der vorliegenden Arbeit könnte daher gleichzeitig durch die verlängerte Lebensdauer in Kombination mit der gleichzeitig fehlenden Formation von NETs Strukturen erklärbar sein. In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse, ob eine Stimulation von neutrophilen Granulozyten zur Bildung von NETs gleichzeitig mit einer Reduktion der Anzahl

an neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut oder den Endstromgebieten der Organe einhergeht.

Es fiel auf, dass nach 48 Stunden ein starker Abfall der Anzahl neutrophiler Granulozyten sowohl in der Lunge als auch in der Leber nachweisbar war. Der gleichzeitige Abfall in beiden Organen spricht gegen einen organspezifischen Trend, sondern für ein systemisches Phänomen. Eine Leukopenie kann im Rahmen einer Sepsis auftreten und ist Bestandteil der Definitionskriterien (14). Dies wird als Erschöpfung des Immunsystems bzw. Ausschöpfung des Reservoirs von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark gedeutet (130-132). Ein Effekt der DNase auf neutrophile Granulozyten zum Zeitpunkt 48 Stunden ist unwahrscheinlich, da die Halbwertszeit von rhDNase bei intraperitonealer Injektion 5 Stunden beträgt (97) und die letzte Applikation 27 Stunden nach CLP erfolgte (108).

Interessanterweise zeigten die Zeitkinetiken der Anzahl von neutrophilen Granulozyten in Lunge und Leber ein ähnliches Muster. Zwar sind beide Organe primäre Manifestationsorte einer systemischen Infektion, klinisch manifest ist jedoch häufig die Lunge früher als die Leber (133). Beim akuten respiratorischen Distress Syndrom (ARDS), welches Ausdruck einer schweren Lungenschädigung ist und oft im Rahmen einer Sepsis auftritt (134), ist der Grad der Infiltration von neutrophilen Granulozyten mit einer schlechteren Lungenfunktion und einer erhöhten Konzentration proteolytischer Enzyme in der Bronchiallavage assoziiert (135). Auf der anderen Seite konnte eine Studie in der Leber eine im Vergleich zur Lunge gesteigerte und frühere Expression von Zytokin und Chemokin mRNA feststellen (109). Mit niedrigen Werten der Zytokin und Chemokin mRNA war eine reduzierte Anzahl von neutrophilen Granulozyten in den Endstromgebieten assoziiert (109). Diese Beobachtung könnte erklären, warum in dieser Studie die Anzahl von neutrophilen Granulozyten in Leber und Lunge gleich war, obwohl anzunehmen gewesen wäre, dass sich in der Lunge eine gesteigerte Ansammlung im Vergleich zur Leber findet. Außerdem gibt es Studien, welche zeigten, dass die Dysfunktion der Leber bei Sepsis entgegen der traditionellen Ansicht ein zeitkinetisch frühes Ereignis sein kann (136, 137). Diese Annahme vorausgesetzt ließe sich

ebenfalls die ähnlich stark ausgeprägte und frühe Migration von neutrophilen Granulozyten in Lunge und Leber begründen.

Insgesamt konnte also gezeigt werden, dass die Depletion einen signifikanten Einfluss auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten hat. Im Einklang hierzu besaßen NETs eine signifikante Relevanz für die Inhibierung der bakteriellen Streuung, welche im Folgenden diskutiert werden soll.

4.6 Bakterielle Dissemination

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die rhDNase vermittelte Reduktion von NETs in der frühen Phase nach Induktion einer Sepsis zu einer gestörten Abwehr von Bakterien am Entstehungsort der Infektion führt. So zeigte sich, dass im Gegensatz zu der CLP-Gruppe 6 Stunden nach Sepsisinduktion in der CLP + rhDNase-Gruppe ein schneller und signifikanter Anstieg der Anzahl von CFU sowohl am Entstehungsort der Sepsis, als auch in der Lunge stattfand. Durch die gestörte NETs-Abwehr können Bakterien daher schneller in andere Organsysteme disseminieren.

Die Anzahl an CFU lag im peripheren Blut 6 Stunden nach CLP in beiden Gruppen auf gleichem Niveau. Zum Zeitpunkt 24 Stunden stieg sie in beiden Gruppen an, lag jedoch in der CLP-Gruppe höher als in der CLP + rhDNase-Gruppe. Dies ist insofern überraschend, als dass zu diesem Zeitpunkt die NETs Formation in diesem Modell stark ausgeprägt ist (108). Ein Erklärungsansatz wäre, dass die NETs Bildung ihre wesentlichen Effekte in den Endstromgebieten der Organe aufweist und weniger unter den hohen Flussströmen in den größeren Gefäßen (40).

Nach 48 Stunden fiel die Anzahl an CFU im Blut in beiden Gruppen wieder ab während in der Peritonealhöhle und den Sepsis-assoziierten Organen weiterhin eine erhöhte Anzahl nachweisbar war. Die erhöhte Keimzahl in der Peritonealhöhle lässt sich damit erklären, dass hier bei CLP der primäre Ort Entstehung einer Sepsis ist und auch 48 Stunden nach CLP noch eine Perforation des Darms besteht (104). Die weiterhin erhöhte Anzahl CFU in den Sepsis-assoziierten Organen kann als weiteres Fortschreiten der Infektion

gewertet werden. Dies ist vereinbar mit der nachgewiesenen Gewebeschädigung.

Im Vergleich zur Lunge war in der Leber 6 Stunden nach CLP eine geringe Anzahl an CFU in beiden Gruppen vorhanden. Dies steht im Einklang mit dem häufig früheren Organversagen der Lunge und erst später der Leber (133). In der Leber war die Anzahl an CFU in beiden Gruppen nach 24 Stunden deutlich erhöht, jedoch ohne Unterschiede zwischen den Gruppen. Die neutrophilen Granulozyten waren zu diesem Zeitpunkt in der Leber in der CLP + rhDNase-Gruppe signifikant erhöht. Dies unterstützt die Annahme, dass bei fehlenden NETs vermehrt neutrophile Granulozyten zur bakteriellen Abwehr in die Organe rekrutiert werden. Die im Vergleich zur CLP-Gruppe verstärkten histologischen Zeichen der Gewebeschädigung in der CLP + rhDNase-Gruppe zeigt den schnelleren Progress der Sepsis in dieser Gruppe auf (108).

RhDNase wird als Medikament im klinischen Alltag therapeutisch bei der Behandlung von chronischen Lungenerkrankungen, der zystischen Fibrose oder des systemischen Lupus erythematoses eingesetzt (103). Darüber hinaus können grampositive Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae* oder *Staphylococcus aureus* selbst DNasen produzieren. Hierdurch sind sie potentiell in der Lage der NETs vermittelten Tötung zu entgehen (57). In dieser Arbeit mit einem polymikrobiellen Sepsismodell wurden die Bakterien nicht weiterführend untersucht. Bei der makroskopischen Begutachtung der CFU-Platten wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Nichtsdestotrotz ist es denkbar, dass die Therapie mit rhDNase bei Sepsis *in vivo* zu einer Verschiebung der bakteriellen Kolonisation zu anderen Bakterienstämmen hin führt, die eine Resistenz gegen die Immunabwehr durch NETs besitzen. Dies könnte sowohl die Ergebnisse der bakteriellen Dissemination in Organe als auch den weiteren Progress der Sepsis beeinflussen (108). Dieser mögliche Ansatzpunkt sollte in weiterführenden Studien berücksichtigt und genauer untersucht werden. Denkbar wäre die Sepsisinduktion durch einen isolierten Keim. In der Literatur ist die intravenöse Injektion eines zuvor angezüchteten isolierten Keims beschrieben und bereits etabliert (138-142). Zu den verwendeten isolierten Pathogenen gehören die bei einer Sepsis häufig nachweisbaren Keime wie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und

Pseudomonas aeruginosa, deren Infusion zu einer systemischen Inflammation führt (139-141). Um die Resistenzbildung von Bakterien gegen NETs zu überprüfen wäre der Vergleich der bakteriellen Dissemination bei isolierter Sepsisinduktion durch diese unterschiedlichen Keime vorstellbar.

4.7 Ausblick

Die Depletion von NETs durch rhDNase-Behandlung bei der polymikrobiellen Sepsis in der Maus geht mit einer frühzeitigen und gesteigerten Dissemination von Bakterien und einer verstärkten Migration von neutrophilen Granulozyten in Lunge und Leber einher. Für zukünftige Untersuchungen wäre es von Interesse, ob eine gesteigerte Freisetzung von NETs mit gegenteiligen Effekten einhergeht. Hierzu wäre es notwendig, dass, nachdem Brinkmann und Mitarbeiter 2004 erstmalig neutrophile Granulozyten zur Formation von NETs *in vitro* stimulieren konnten, ein geeigneter Weg gefunden wird, neutrophile Granulozyten auch *in vivo* selektiv zur Formation von NETs zu stimulieren. Anschließend könnte überprüft werden, ob eine verstärkte NETs Produktion mit einer verbesserten Abwehr einer systemischen Infektion assoziiert ist. Dies könnte eine neue Therapieoption für die Behandlung der akuten Sepsis eröffnen. Vor allem zu Beginn einer Sepsis wären positive Effekte vorstellbar. Zu bedenken ist hierbei jedoch, dass die vermehrte Bildung von NETs in den Endstromgebieten von Organen auch eine potentielle Gefahr für die Funktion dieser und seinerseits einen inflammatorischen Reiz darstellen kann.

5. Schlussfolgerung

Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Depletion von NETs bei der polymikrobiellen Sepsis (CLP) in der Maus zu einer gesteigerten bakteriellen Dissemination und einer vermehrten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in Sepsis-assoziierte Organe führen. Die erzielten Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten des Gesamtprojekts, in welchem die NETs Depletion mit einer verminderten medianen Überlebenszeit und verstärkten inflammatorischen Antwort nach CLP assoziiert war.

Zusammenfassend stellt die Formation von NETs einen wichtigen antibakteriellen Mechanismus des angeborenen Immunsystems dar, welcher die systemische Streuung von Bakterien hemmt. Die Daten zeigen, dass die NETs Produktion vor allem in der Frühphase einer Sepsis für die Abwehr von Bedeutung ist. Die Formation von NETs in den Endstromgebieten von Organen führt zwar gleichzeitig zu einer Konzentration potentiell gewebschädigender Proteine, insgesamt überwiegen aber die vorteilhaften Effekte der Formation von NETs für die Infektionsabwehr gegenüber den für das umliegende Gewebe und die Organfunktion schädlichen Auswirkungen. Für die Zukunft stellt die selektive Stimulation von neutrophilen Granulozyten zur Produktion von NETs möglicherweise einen Ansatz zur Therapie der Sepsis dar.

6. Literatur

1. Wheeler, A. P. & Bernard, G. R. Treating Patients with Severe Sepsis. *New England Journal of Medicine* 340, 207–214 (1999).
2. Angus, D. C. M., MPH, FFCM *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine* 29, 1303–1310 (2001).
3. Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. & Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 348, 1546–1554 (2003).
4. Mayr, F. B., Yende, S. & Angus, D. C. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 5, 4–11 (2014).
5. Iwashyna, T. J., Ely, E. W., Smith, D. M. & Langa, K. M. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA* 304, 1787–1794 (2010).
6. Moerer, O. & Burchardi, H. [The cost of sepsis]. *Anaesthetist* 55 Suppl 1, 36–42 (2006).
7. Cohen, J., Cristofaro, P., Carlet, J. & Opal, S. New method of classifying infections in critically ill patients. *Crit. Care Med.* 32, 1510–1526 (2004).
8. Wittmann, D. H., Schein, M. & Condon, R. E. Management of secondary peritonitis. *Ann. Surg.* 224, 10–18 (1996).
9. Schein, M. Management of severe intra-abdominal infection. *Surg Annu* 24 Pt 1, 47–68 (1992).
10. Villa, P. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor and antibiotics in the prophylaxis of a murine model of polymicrobial peritonitis and sepsis. *J. Infect. Dis.* 178, 471–477 (1998).
11. Marshall, J. C. & Innes, M. Intensive care unit management of intra-abdominal infection. *Crit. Care Med.* 31, 2228–2237 (2003).

- 12.** Barie, P., Hydo, L. & Eachempati, S. Longitudinal outcomes of intra-abdominal infection complicated by critical illness. *Surgical Infections (Larchmt)* 5, 365–373 (2005).
- 13.** Paunel-Görgülü, A., Flohé, S., Scholz, M., Windolf, J. & Lögters, T. Increased serum soluble Fas after major trauma is associated with delayed neutrophil apoptosis and development of sepsis. *Crit Care* 15, R20 (2011).
- 14.** Bone, R. C. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101, 1644–1655 (1992).
- 15.** Dellinger, R. P. *et al.* Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit. Care Med.* 41, 580–637 (2013).
- 16.** Dellinger, R. P. From the bench to the bedside: The future of sepsis research. Executive summary of an American College of Chest Physicians, National Institute of Allergy and Infectious Disease, and National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop. *Chest* 111, 744–53 (1997).
- 17.** Van der Poll, T. & Opal, S. M. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 8, 32–43 (2008).
- 18.** Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820 (2010).
- 19.** Hotchkiss, R. S. & Karl, I. E. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *New England Journal of Medicine* 348, 138–150 (2003).
- 20.** Hotchkiss, R. S. & Nicholson, D. W. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 6, 813–822 (2006).
- 21.** Munford, R. S. & Pugin, J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163, 316–321 (2001).

- 22.** Marshall, J. C. Neutrophils in the pathogenesis of sepsis. *Crit. Care Med.* 33, S502–505 (2005).
- 23.** Brown, K. A. *et al.* Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 368, 157–169 (2006).
- 24.** Alves-Filho, J. C., de Freitas, A., Spiller, F., Souto, F. O. & Cunha, F. Q. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* 30, 3–9 (2008).
- 25.** Mizgerd, J. P. Molecular mechanisms of neutrophil recruitment elicited by bacteria in the lungs. *Semin. Immunol.* 14, 123–132 (2002).
- 26.** Van Haastert, P. J. M. & Devreotes, P. N. Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 626–634 (2004).
- 27.** Metschnikoff, E. Lecture on Phagocytosis and Immunity. *Br Med J* 1, 213–217 (1891).
- 28.** Borregaard, N. & Cowland, J. B. Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood* 89, 3503–3521 (1997).
- 29.** Hayashi, F., Means, T. K. & Luster, A. D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102, 2660–2669 (2003).
- 30.** Lee, W. L., Harrison, R. E. & Grinstein, S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* 5, 1299–1306 (2003).
- 31.** Stuart, L. M. & Ezekowitz, R. A. B. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* 22, 539–550 (2005).
- 32.** Niedergang, F. & Chavrier, P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 422–428 (2004).
- 33.** Hampton, M. B., Kettle, A. J. & Winterbourn, C. C. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood* 92, 3007–3017 (1998).
- 34.** Faurschou, M. & Borregaard, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 5, 1317–1327 (2003).

- 35.** Donnelly, S. C. *et al.* Plasma elastase levels and the development of the adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151, 1428–1433 (1995).
- 36.** Bhatia, R., Dent, C., Topley, N. & Pallister, I. Neutrophil priming for elastase release in adult blunt trauma patients. *J Trauma* 60, 590–596 (2006).
- 37.** Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 303, 1532–1535 (2004).
- 38.** Guimarães-Costa, A. B., Nascimento, M. T. C., Wardini, A. B., Pinto-da-Silva, L. H. & Saraiva, E. M. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. *J Parasitol Res* 2012, (2012).
- 39.** Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Micro* 5, 577–582 (2007).
- 40.** Clark, S. R. *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 13, 463–469 (2007).
- 41.** Ermert, D. *et al.* Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J Innate Immun* 1, 181–193 (2009).
- 42.** Fuchs, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology* 176, 231–241 (2007).
- 43.** Medina, E. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. *J Innate Immun* 1, 176–180 (2009).
- 44.** Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology* 8, 668–676 (2006).
- 45.** Urban, C. & Zychlinsky, A. Netting bacteria in sepsis. *Nat Med* 13, 403–404 (2007).
- 46.** Saukkonen, K. *et al.* Cell-Free Plasma DNA as a Predictor of Outcome in Severe Sepsis and Septic Shock. *Clin Chem* 54, 1000–1007 (2008).

- 47.** Swarup, V. & Rajeswari, M. R. Circulating (cell-free) nucleic acids - A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Letters* 581, 795–799 (2007).
- 48.** Zeerleder, S. *et al.* Elevated nucleosome levels in systemic inflammation and sepsis. *Critical Care Medicine* 31, 1947–1951 (2003).
- 49.** Steinberg, B. E. & Grinstein, S. Unconventional Roles of the NADPH Oxidase: Signaling, Ion Homeostasis, and Cell Death. *Sci. STKE* 2007, pe11 (2007).
- 50.** Kawasaki, H. & Iwamuro, S. Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents. *Infect Disord Drug Targets* 8, 195–205 (2008).
- 51.** Hirsch, J. G. Bactericidal action of histone. *J. Exp. Med.* 108, 925–944 (1958).
- 52.** Garcia-Romo, G. S. *et al.* Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 3, 73ra20 (2011).
- 53.** Lande, R. *et al.* Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 3, 73ra19 (2011).
- 54.** Villanueva, E. *et al.* Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 187, 538–552 (2011).
- 55.** Bogdan, C., Mattner, J. & Schleicher, U. The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunol. Rev.* 202, 33–48 (2004).
- 56.** Beiter, K. *et al.* An Endonuclease Allows *Streptococcus pneumoniae* to Escape from Neutrophil Extracellular Traps. *Current Biology* 16, 401–407 (2006).
- 57.** Buchanan, J. T. *et al.* DNase Expression Allows the Pathogen Group A *Streptococcus* to Escape Killing in Neutrophil Extracellular Traps. *Current Biology* 16, 396–400 (2006).

- 58.** Urban, C. F., Lourido, S. & Zychlinsky, A. How do microbes evade neutrophil killing? *Cellular Microbiology* 8, 1687–1696 (2006).
- 59.** Wartha, F. *et al.* Capsule and d-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cellular Microbiology* 9, 1162–1171 (2007).
- 60.** Gupta, A. K. *et al.* Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.* 584, 3193–3197 (2010).
- 61.** Bone, R. C. Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions. *Ann. Intern. Med.* 114, 332–333 (1991).
- 62.** Welbourn, C. R. & Young, Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br J Surg* 79, 998–1003 (1992).
- 63.** Ware, L. B. & Matthay, M. A. The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 342, 1334–1349 (2000).
- 64.** Steinberg, K. P. *et al.* Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150, 113–122 (1994).
- 65.** Ma, A. C. & Kubes, P. Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 6, 415–420 (2008).
- 66.** Salomão, R. *et al.* TLR Signaling pathway in patients with sepsis. *Shock* 30, 73–77 (2008).
- 67.** Andonegui, G. *et al.* Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* 106, 2417–2423 (2005).
- 68.** Saitoh, T. *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* 12, 109–116 (2012).

- 69.** Gupta, A. K., Hasler, P., Holzgreve, W. & Hahn, S. Neutrophil NETs: a novel contributor to preeclampsia-associated placental hypoxia? *Semin Immunopathol* 29, 163–167 (2007).
- 70.** Redman, C. W. & Sargent, I. L. Latest Advances in Understanding Preeclampsia. *Science* 308, 1592–1594 (2005).
- 71.** Fairhurst, A. (true graphic)]Marie, Wandstrat, A. E. & Wakeland, E. K. in Volume 92, 1–69 (Academic Press, 2006).
- 72.** Galeazzi, M. *et al.* Dosage and characterization of circulating DNA: present usage and possible applications in systemic autoimmune disorders. *Autoimmunity Reviews* 2, 50–55 (2003).
- 73.** Lewis, E. J. & Schwartz, M. M. Pathology of lupus nephritis. *Lupus* 14, 31–38 (2005).
- 74.** Pathak, A. K., Bhutani, M., Kumar, S., Mohan, A. & Guleria, R. Circulating Cell-Free DNA in Plasma/Serum of Lung Cancer Patients as a Potential Screening and Prognostic Tool. *Clin Chem* 52, 1833–1842 (2006).
- 75.** Xue, X., Zhu, Y. M. & Woll, P. J. Circulating DNA and Lung Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1075, 154–164 (2006).
- 76.** Suber, T. L., Casciola-Rosen, L. & Rosen, A. Mechanisms of disease: autoantigens as clues to the pathogenesis of myositis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4, 201–209 (2008).
- 77.** Muñoz, L. E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A. A. & Herrmann, M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 6, 280–289 (2010).
- 78.** Mahoney, W. M., Jr, Fleming, J. N. & Schwartz, S. M. A unifying hypothesis for scleroderma: identifying a target cell for scleroderma. *Curr Rheumatol Rep* 13, 28–36 (2011).
- 79.** Wickman, G., Julian, L. & Olson, M. F. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death Differ.* 19, 735–742 (2012).

- 80.** Tsokos, G. C. Systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 365, 2110–2121 (2011).
- 81.** Liu, C. L. *et al.* Specific post-translational histone modifications of neutrophil extracellular traps as immunogens and potential targets of lupus autoantibodies. *Arthritis Res Ther* 14, R25 (2012).
- 82.** Matsui, H. *et al.* Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95, 1005–1015 (1998).
- 83.** Henke, M. O. & Ratjen, F. Mucolytics in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 8, 24–29 (2007).
- 84.** Shak, S., Capon, D. J., Hellmiss, R., Marsters, S. A. & Baker, C. L. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9188–9192 (1990).
- 85.** Aitken, M. L. *et al.* Recombinant human DNase inhalation in normal subjects and patients with cystic fibrosis. A phase 1 study. *JAMA* 267, 1947–1951 (1992).
- 86.** Lethem, M. I., James, S. L., Marriott, C. & Burke, J. F. The origin of DNA associated with mucus glycoproteins in cystic fibrosis sputum. *Eur. Respir. J.* 3, 19–23 (1990).
- 87.** Marcos, V. *et al.* CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat. Med.* 16, 1018–1023 (2010).
- 88.** Manzenreiter, R. *et al.* Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy. *J. Cyst. Fibros.* 11, 84–92 (2012).
- 89.** Cheng, O. Z. & Palaniyar, N. NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Front Immunol* 4, (2013).

- 90.** Becker, M. N. *et al.* Cytokine secretion by cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 645–653 (2004).
- 91.** Verhaeghe, C., Delbecq, K., de Leval, L., Oury, C. & Bours, V. Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus. *J. Cyst. Fibros.* 6, 304–308 (2007).
- 92.** Clark, P., Boswell, F. & Greer, I. A. The neutrophil and preeclampsia. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 16, 57–64 (1998).
- 93.** Zhong, X. Y. *et al.* Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 184, 414–419 (2001).
- 94.** Davis, J. C., Jr *et al.* Recombinant human Dnase I (rhDNase) in patients with lupus nephritis. *Lupus* 8, 68–76 (1999).
- 95.** Meng, W. *et al.* Deoxyribonuclease Is a Potential Counter Regulator of Aberrant Neutrophil Extracellular Traps Formation after Major Trauma. *Mediators Inflamm* 2012, (2012).
- 96.** Prince, W. S. *et al.* Pharmacodynamics of recombinant human DNase I in serum. *Clin. Exp. Immunol.* 113, 289–296 (1998).
- 97.** Macanovic, M. *et al.* 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 (1996).
- 98.** Napirei, M. *et al.* Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat Genet* 25, 177–181 (2000).
- 99.** Verthelyi, D., Dybdal, N., Elias, K. A. & Klinman, D. M. DNase treatment does not improve the survival of lupus prone (NZB x NZW)F1 mice. *Lupus* 7, 223–230 (1998).

- 100.** McPhail, G. L., Acton, J. D., Fenchel, M. C., Amin, R. S. & Seid, M. Improvements in Lung Function Outcomes in Children with Cystic Fibrosis are Associated with Better Nutrition, Fewer Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infections, and Dornase Alfa Use. *The Journal of Pediatrics* 153, 752–757 (2008).
- 101.** Wilson, C. J., Robbins, L. J., Murphy, J. M. & Chang, A. B. Is a longer time interval between recombinant human deoxyribonuclease (dornase alfa) and chest physiotherapy better?: A multi-center, randomized crossover trial. *Pediatric Pulmonology* 42, 1110–1116 (2007).
- 102.** Riethmueller, J. *et al.* DNA quantification and fragmentation in sputum after inhalation of recombinant human deoxyribonuclease. *Cell. Physiol. Biochem* 22, 347–352 (2008).
- 103.** Jones, A. P. & Wallis, C. Dornase alfa for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* CD001127 (2010). doi:10.1002/14651858.CD001127.pub2
- 104.** Dejager, L., Pinheiro, I., Dejonckheere, E. & Libert, C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends in Microbiology* 19, 198–208 (2011).
- 105.** Alexander, H. R. *et al.* Recombinant interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra): effective therapy against gram-negative sepsis in rats. *Surgery* 112, 188–193; discussion 193–194 (1992).
- 106.** Remick, D. *et al.* Blockade of tumor necrosis factor reduces lipopolysaccharide lethality, but not the lethality of cecal ligation and puncture. *Shock* 4, 89–95 (1995).
- 107.** Villa, P. *et al.* Effects of methyl palmitate on cytokine release, liver injury and survival in mice with sepsis. *Eur. Cytokine Netw.* 7, 765–769 (1996).
- 108.** Meng, W. *et al.* Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Crit Care* 16, R137 (2012).

- 109.** Salkowski, C. A., Detore, G., Franks, A., Falk, M. C. & Vogel, S. N. Pulmonary and Hepatic Gene Expression following Cecal Ligation and Puncture: Monophosphoryl Lipid A Prophylaxis Attenuates Sepsis-Induced Cytokine and Chemokine Expression and Neutrophil Infiltration. *Infect Immun* 66, 3569–3578 (1998).
- 110.** Brinkmann, V., Laube, B., Abu Abed, U., Goosmann, C. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J Vis Exp* (2010). doi:10.3791/1724
- 111.** Margraf, S. *et al.* Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock* 30, 352–358 (2008).
- 112.** Hakkim, A. *et al.* Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 9813–9818 (2010).
- 113.** Kessenbrock, K. *et al.* Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* 15, 623–625 (2009).
- 114.** Bianchi, M. *et al.* Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* 114, 2619–2622 (2009).
- 115.** Nishinaka, Y., Arai, T., Adachi, S., Takaori-Kondo, A. & Yamashita, K. Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413, 75–79 (2011).
- 116.** Hakkim, A. *et al.* Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* 7, 75–77 (2011).
- 117.** Coppinger, J. A. *et al.* Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 103, 2096–2104 (2004).
- 118.** Del Conde, I., Cruz, M. A., Zhang, H., López, J. A. & Afshar-Kharghan, V. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J. Exp. Med.* 201, 871–879 (2005).

- 119.** Smyth, S. S. *et al.* Platelet functions beyond hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7, 1759–1766 (2009).
- 120.** Weyrich, A. S., Schwertz, H., Kraiss, L. W. & Zimmerman, G. A. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J. Thromb. Haemost.* 7, 241–246 (2009).
- 121.** Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689 (2007).
- 122.** Wagner, D. D. & Frenette, P. S. The vessel wall and its interactions. *Blood* 111, 5271–5281 (2008).
- 123.** Mavrommatis, A. C. *et al.* Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit. Care Med.* 28, 451–457 (2000).
- 124.** Salomao, R. *et al.* Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. *Shock* 38, 227–242 (2012).
- 125.** Hack, C. E. *et al.* Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* 74, 1704–1710 (1989).
- 126.** Waage, A., Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P. & Espevik, T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J. Exp. Med.* 169, 333–338 (1989).
- 127.** Ebong, S. J. *et al.* Immunopathologic responses to non-lethal sepsis. *Shock* 12, 118–126 (1999).
- 128.** Ebong, S. *et al.* Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect. Immun.* 67, 6603–6610 (1999).
- 129.** Suratt, B. T. *et al.* Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281, L913–921 (2001).

- 130.** Cartwright, G. E., Athens, J. W. & Wintrobe, M. M. The kinetics of granulopoiesis in normal man. *Blood* 24, 780–803 (1964).
- 131.** Galbraith, P. R., Valberg, L. S. & Brown, M. Patterns of granulocyte kinetics in health, infection and in carcinoma. *Blood* 25, 683–692 (1965).
- 132.** Eriksson, E., Straube, R. C. & Robson, M. C. White blood cell consumption in the microcirculation after a major burn. *J Trauma* 19, 94–97 (1979).
- 133.** Moreno, R. *et al.* The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. Working Group on Sepsis related Problems of the ESICM. *Intensive Care Med* 25, 686–696 (1999).
- 134.** Adams, J. M. *et al.* Early trauma polymorphonuclear neutrophil responses to chemokines are associated with development of sepsis, pneumonia, and organ failure. *J Trauma* 51, 452–456; discussion 456–457 (2001).
- 135.** Windsor, A. C., Mullen, P. G., Fowler, A. A. & Sugerman, H. J. Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome. *Br J Surg* 80, 10–17 (1993).
- 136.** Kortgen, A. *et al.* Prospective assessment of hepatic function and mechanisms of dysfunction in the critically ill. *Shock* 32, 358–365 (2009).
- 137.** Recknagel, P. *et al.* Liver Dysfunction and Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalling in Early Sepsis: Experimental Studies in Rodent Models of Peritonitis. *PLoS Med* 9, e1001338 (2012).
- 138.** Rubins, J. B. & Pomeroy, C. Role of gamma interferon in the pathogenesis of bacteremic pneumococcal pneumonia. *Infect. Immun.* 65, 2975–2977 (1997).
- 139.** Sawa, T. *et al.* IL-10 improves lung injury and survival in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J. Immunol.* 159, 2858–2866 (1997).
- 140.** Kohler, J. *et al.* IFN-gamma involvement in the severity of gram-negative infections in mice. *J. Immunol.* 151, 916–921 (1993).

- 141.** Sasaki, S. *et al.* Interleukin-4 and Interleukin-10 Are Involved in Host Resistance to *Staphylococcus aureus* Infection through Regulation of Gamma Interferon. *Infect. Immun.* 68, 2424–2430 (2000).
- 142.** Silva, A. T. & Cohen, J. Role of interferon-gamma in experimental gram-negative sepsis. *J. Infect. Dis.* 166, 331–335 (1992).

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige, fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Almuth Maria Anni Hoffmann