

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. Rainer Haas

Gestörte Bildung von *Neutrophil Extracellular Traps (NETs)*

- eine Komponente der Infektanfälligkeit bei Patienten

mit Myelodysplastischem Syndrom (MDS) -

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der medizinischen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von Carolin Brings

2021

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

Dekan: Prof. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Norbert Gattermann

Zweitgutachterin: Prof. Margitta Elvers

Zusammenfassung

Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) weisen unter anderem eine erhöhte Infektanfälligkeit auf. Dies beruht in erster Linie auf einer Verminderung der neutrophilen Granulozyten, aber auch auf Funktionsstörungen dieser Zellen. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde der Vermutung nachgegangen, dass ein funktioneller Defekt der neutrophilen Granulozyten zu einer verminderten Ausbildung von *neutrophil extracellular traps* (NETs) führt. Hierbei handelt es sich um Netzwerke extrazellulärer Fasern, die hauptsächlich aus *DNA* von Neutrophilen bestehen und Krankheitserreger binden. Diese Komponente der unspezifischen Immunabwehr wurde 2004 erstmalig beschrieben. Auf molekularer Ebene wird die Bildung von NETs durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) initiiert, die in den neutrophilen Granulozyten hauptsächlich durch die Enzyme NADPH-Oxidase und Myeloperoxidase (MPO) produziert werden.

Das Thema der Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte. Zunächst erfolgten fluoreszenzmikroskopische Analysen zum Nachweis von NETs bei Patienten mit MDS im Vergleich zu einer altersadjustierten Kontrollgruppe. Zweitens wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt, um die Bildung von NETs weiter zu charakterisieren und die Produktion von ROS durch die Enzyme NADPH-Oxidase und MPO nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass die neutrophilen Granulozyten von Patienten mit MDS nach Stimulation mit PMA signifikant weniger NETs ausbilden als die neutrophilen Granulozyten in einer altersadjustierten Kontrollgruppe. Zunächst schien dies nicht an einer verminderten Produktion von ROS zu liegen. Signifikante Unterschiede bei der Produktion von ROS durch die MPO konnten allerdings nach partieller Inhibition dieses Enzyms gezeigt werden. Dies deutet auf eine verminderte Aktivität der MPO hin und steht daher im Einklang mit dem bei einigen MDS-Patienten auch zytochemisch auffälligen Befund eines partiellen MPO-Defekts. Dieser dürfte jedoch nicht der alleinige Grund für eine beeinträchtigte Funktion der neutrophilen Granulozyten sein. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen zeigten deutliche morphologische Unterschiede bei der Ausbildung von NETs. Bei Patienten mit MDS kam es in Granulozyten nach Stimulation mit PMA zu einer schwächeren Dekondensierung des Chromatins als in der altersadjustierten Kontrollgruppe. Weiterhin unterschieden sich die beiden Patientengruppen bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung hinsichtlich der Freisetzung der neutrophilen Elastase aus den zytoplasmatischen Granula der neutrophilen Granulozyten. Diese Ergebnisse verbessern das pathophysiologische Verständnis der Granulozyten-Funktionsstörung und der Infektneigung bei Patienten mit MDS.

Summary

Patients with myelodysplastic syndrome (MDS) show an increased susceptibility to infections, partly due to decreased numbers of neutrophil granulocytes in the peripheral blood but also due to functional impairment of these cells. In this doctoral thesis, the hypothesis was tested that neutrophil dysfunction leads to reduced neutrophil extracellular traps (NETs). These are networks of extracellular fibers, primarily composed of DNA from neutrophils, which bind pathogens. This component of the immune system's first line of defense was first described in 2004. On a molecular level, the formation of NETs is triggered by reactive oxygen species (ROS), which in neutrophils are mainly produced by the enzymes NADPH-oxidase and myeloperoxidase (MPO).

The doctoral thesis is divided into two parts. First, fluorescence microscopy was carried out to show NET formation in patients with MDS in comparison to an age-adjusted control group. Second, flow cytometry was used to further characterize NET formation and demonstrate the production of ROS by NADPH-oxidase and MPO.

Upon stimulation with PMA, neutrophils of patients with MDS generated significantly fewer NETs than neutrophils from an age-adjusted control group. Initially, this did not seem to be attributable to diminished ROS production. However, significant differences regarding the generation of ROS by MPO were shown after partial inhibition of the enzyme. This finding suggests decreased activity of MPO, in accordance with the partial MPO defect that is detectable on cytochemistry in a proportion of MDS patients. This feature would not appear to be the only cause of neutrophil dysfunction in MDS. On fluorescence microscopy, marked morphological abnormalities were observed with regard to NET formation. Upon stimulation with PMA, neutrophils from patients with MDS showed decreased chromatin decondensation compared with neutrophils from age-adjusted controls. Furthermore, both groups differed regarding the release of neutrophil elastase from the cytoplasmic granula of neutrophils. These findings contribute to a better understanding of the pathophysiology of neutrophil dysfunction and susceptibility to infections in patients with MDS.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AAA	abdominelles Aortenaneurysma
ABAH	4-aminobenzoic hydrazid
AML	akute myeloische Leukämie
AP	Dimethylaminoantipyrin
APC	Allophycocyanin
APF	3`-(p-aminophenyl) fluorescein
<i>ASXL1</i>	<i>additional sex combs-like 1</i>
BD	Becton Dickinson GmbH
C5a	Komplementkomponente 5a
CD	<i>cluster of differentiation</i>
<i>CGD</i>	<i>chronic granulomatous disease</i>
Cl ⁻	Chlorid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
del(x)	Deletion (Chromosom x)
DHR	Dihydrorhodamin
<i>DNA</i>	<i>desoxyribonucleic acid - Desoxyribonukleinsäure</i>
DPI	Diphenyliodoniumchlorid
<i>E-Selectin</i>	<i>endothelial selectin</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
<i>EZH2</i>	<i>enhancer of zeste homolog 2</i>
<i>FAB</i>	<i>French American British</i>
<i>FACS</i>	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanat
<i>FSC</i>	<i>forward scatter</i>
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating Factor</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hydroethidin
HOCl	Hypochlorid
HPF	3`-(hydroxyphenyl) fluorescein
HSA	humanes Serum Albumin
<i>HSC</i>	<i>hematopoietic stem cell – hämatopoetische Stammzelle</i>
<i>ICAM</i>	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IL	Interleukin
<i>IPSS</i>	<i>international prognostic scoring system</i>
KM	Knochenmark

LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MDS	myelodysplastische Syndrome
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
mm	Millimeter
MMP9	Matrix-Metalloprotease 9
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	nicotinamid adenin dinucleotid phosphat
NE	neutrophilen Elastase
<i>NETs</i>	<i>neutrophil extracellular traps</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
<i>NRAS</i>	<i>neuroblastoma ras viral oncogene homolog</i>
O ₂ ^{•-}	Superoxid-Anion
OH [•]	Hydroxyl-Radikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
pAVK	periphere arterielle Verschlusserkrankung
<i>PBMC</i>	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
<i>PBS</i>	<i>phosphate buffered saline</i>
PAD4	Peptidylarginin-Deiminase 4
<i>PAMP</i>	<i>pathogene associated molecular pattern</i>
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
P-Selectin	<i>platelet selectin</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>
RAEB	<i>refractory anemia with excess of blast</i> - refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss
RARS	<i>refractory anemia with ringsideroblasts</i> - refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RCMD	<i>refractory cytopenia with multilineage dysplasia</i> -refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien
<i>RNA</i>	<i>ribonucleic acid</i> - Ribonukleinsäure
<i>ROI</i>	<i>region of interest</i>
<i>ROS</i>	<i>reactive oxygen species</i>
<i>RPMI</i>	Zellkulturmedium entwickelt am <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RS	Ringsideroblasten
RUNX1	<i>runt-related transcription factor 1</i>
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SSC	<i>sideward scatter</i>

TAAA	thorakoabdominelles Aortenaneurysma
TET2	Tet methylcytosin dioxygenase 2
<i>TLR</i>	<i>toll like receptor</i>
<i>TNF</i>	<i>tumor necrosis factor</i>
TP53	Tumorsuppressor-Gen 53
TPO-RA	Thrombopoetin-Rezeptoragonist
UV	ultraviolett
<i>WHO</i>	<i>World Health Organization</i>
<i>WPSS</i>	<i>WHO-adapted prognostic scoring system</i>
x g	Zentrifugationsgeschwindigkeit in g

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Myelodysplastische Syndrome	1
1.2 Neutrophile Granulozyten	6
1.3 <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>	10
1.4 Reaktive Sauerstoffspezies	14
1.5 Ziel der Arbeit	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Verwendete Materialien	17
2.1.1 Chemikalien, Kits und Substanzen	17
2.1.2 Antikörper	18
2.1.3 Geräte	18
2.1.4 Verbrauchsmaterial	19
2.2 Patientencharakteristika	19
2.3 Fluoreszenzmikroskopische Analysen	21
2.3.1 Extraktion von neutrophilen Granulozyten	21
2.3.2 Zellkultur und Stimulation	22
2.3.3 Fluoreszenzfärbung der <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>	23
2.3.4 Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Befunde	24
2.4 Durchflusszytometrische Analysen	25
2.4.1 Extraktion von Leukozyten mittels Lyse	25
2.4.2 Durchflusszytometrie	26
2.4.3 Antikörpermarkierung zur Zählung von <i>CD66+</i> Zellen	27
2.4.4 Intrazelluläre Antikörpermarkierung der Myeloperoxidase	27
2.4.5 Fluoreszenzfärbung von reaktiven Sauerstoffspezies (<i>ROS</i>)	28
2.4.6 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten	30
2.4.7 Messung von <i>ROS</i>	30
2.4.8 Charakterisierung der <i>NETs</i>	31

3. Ergebnisse	33
3.1 Fluoreszenzmikroskopische Analysen	33
3.1.1 Fluoreszenzintensität	33
3.1.2 Quantifizierung der <i>NETs</i>	36
3.1.3 Auswertung der Zellzahl	37
3.1.4 Zellmorphologie	38
3.1.5 Bildmorphologische, semiquantitative Auswertung	40
3.1.5.1 Altersadjustierte Kontrollgruppe	41
3.1.5.2 MDS-Gruppe	43
3.2 Durchflusszytometrische Analysen	46
3.2.1 Anteil an <i>CD66+</i> Zellen nach Aufreinigung	46
3.2.2 Anteil an <i>MPO+</i> Zellen	46
3.2.3 Nachweis der Bildung von <i>HOCl</i> mit Hilfe von <i>APF</i> und <i>HPF</i> nach Stimulation mit <i>H₂O₂</i>	47
3.2.4 Nachweis von <i>H₂O₂</i> mittels <i>DHR</i> nach Stimulation mit <i>PMA</i>	53
3.2.5 Nachweis von <i>O²⁻</i> mittels <i>HE</i> nach Stimulation mit <i>PMA</i>	54
3.2.6 Veränderung des Zelldurchmessers im <i>Forward Scatter</i> nach Stimulation mit <i>PMA</i>	55
3.2.7 Veränderung der Granularität im <i>Sideward Scatter</i> nach Stimulation mit <i>H₂O₂</i>	57
4. Diskussion	59
4.1 Fluoreszenzmikroskopische Analysen	59
4.1.1 Erhöhte mittlere Fluoreszenzintensität von <i>DAPI</i> und <i>FITC</i> nach Stimulation mit <i>PMA</i> bei Patienten mit <i>MDS</i>	60
4.1.2 Geringere Ausprägung von <i>NETs</i> nach Stimulation mit <i>PMA</i> bei Patienten mit <i>MDS</i> im Vergleich zur altersadjustierten Kontrollgruppe	61
4.1.3 Einfluss der Stimulation mit <i>PMA</i> auf die Zellgröße	62
4.2 Durchflusszytometrische Analysen	63
4.2.1 Verminderte Präsenz von <i>CD66+</i> Zellen bei <i>MDS</i>	64
4.2.2 Vergleichbare Nachweisbarkeit der Myeloperoxidase (> 95%) in Granulozyten von <i>MDS</i> -Patienten und altersadjustierten Kontrollen	64

4.2.3	Signifikanter Unterschied beim Nachweis von HOCl nach Zugabe von Inhibitoren der Myeloperoxidase -----	65
4.2.4	Kein signifikanter Unterschied beim Nachweis von Sauerstoffradikalen mittels DHR -----	67
4.2.5	Kein signifikanter Unterschied beim Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies mittels Hydroethidium -----	67
4.2.6	Signifikanter Unterschied bei der durchflusszytometrischen Analyse von Zellgröße und Granularität der Zellen vor und nach Stimulation-----	68
5.	Schlussfolgerung-----	70
6.	Literaturverzeichnis-----	72
7.	Abbildungsverzeichnis-----	79
8.	Tabellenverzeichnis-----	81

1. Einleitung

1.1 Myelodysplastische Syndrome

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind eine heterogene Gruppe von im höheren Lebensalter erworbenen klonalen Knochenmarkerkrankungen, die vor allem durch eine ineffektive Hämatopoese gekennzeichnet sind. Die Störung der Hämatopoese kann als Reifungsstörung der blutbildenden Zellen bezeichnet werden, bei der es trotz eines Wachstumsvorteils der abnormen Zellen auf Stammzebene zu vorzeitigem Absterben der reifen Vorläuferzellen und so zu peripheren Zytopenien mit Anämie, Leukozytopenie und Thrombozytopenie kommt. Hierbei zeigen die ausreifenden Zellen Dysplasiezeichen, eine Einschränkung ihrer Funktion und eine verkürzte Überlebensdauer. Patienten mit MDS sind nicht nur durch die ineffektive Hämatopoese betroffen, sondern ebenso durch das erhöhte Risiko des Übergangs der Erkrankung in eine akute myeloische Leukämie (AML).

Myelodysplastische Syndrome gehören zu den häufigsten malignen hämatologischen Neoplasien. Die Inzidenz der Erkrankung beträgt insgesamt ca. 4-5/100.000/Jahr, steigt jedoch bei über 70-jährigen auf >30/100.000/Jahr an. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 71 Jahren (Neukirchen et al., 2011). Die Symptome, die am häufigsten zur Diagnose eines MDS führen, sind Anämie (73%), Müdigkeit (38%), reduzierter Allgemeinzustand (36%) und seltener Infektionen, Fieber oder Blutungen (Gattermann et al., 2013).

Als Risikofaktoren sind vorangegangene Chemo- oder Strahlentherapien bekannt, die zum auftreten sogenannter therapieassoziierter oder sekundärer MDS führen, aber mit ca. 10% nur einen kleineren Teil der Erkrankungen erklären (Pedersen-Bjergaard et al., 1993). Als weiterer Risikofaktor ist eine langjährige berufliche Exposition gegenüber Lösungsmitteln oder benzolhaltigen Stoffen beschrieben. Für den größten Teil der Erkrankungen, die primären MDS, bleibt die Ätiologie ungeklärt; man geht von einer multifaktoriellen Genese aus (Bowen, 2013), an der wahrscheinlich auch vererbte Prädispositionen beteiligt sind.

Bei der Pathogenese der Erkrankung, d.h. bei der klonalen Expansion der Stammzellen, der ineffektiven Hämatopoese, sowie beim Übergang in eine AML und dem Gesamtüberleben (Bejar et al., 2012) spielen Mutationen und chromosomale Translokationen (Pedersen-Bjergaard et al., 2002) eine wichtige Rolle, da sie zu Veränderungen von Genen führen, die vor allem das *Splicing* der RNA, den Zellzyklus und die Apoptose regulieren (Papaemmanuil et al., 2013). Außerdem sind Veränderung des Mikromilieus im Kno-

chenmark, insbesondere der hämatopoetischen Stammzellnische, zu finden (Schroeder et al., 2016).

Um das heterogene Krankheitsbild besser zu verstehen und die Bedeutung verschiedener zytomorphologischer, zytogenetischer und molekulargenetischer Befunde im Hinblick auf Prognoseeinschätzung und Therapieentscheidung zu erfassen, lohnt sich ein kurzer Überblick über die Entwicklung verschiedener Klassifikations- und Prognosesysteme.

Die 1982 eingeführte *FAB*-Klassifikation (Bennett et al., 1982) unterschied erstmals fünf MDS-Typen nach morphologischen Kriterien. Die Einteilung bezieht sich auf den Blastenanteil im Blut und Knochenmark, eine Vermehrung von Monozyten, den Nachweis von Ringsideroblasten, sowie das Vorhandensein von Auerstäbchen in myeloischen Blasten. Die 2001 publizierte *WHO*-Klassifikation (Vardiman et al., 2002) übernahm einen Großteil der Kriterien der *FAB*-Klassifikation und orientiert sich auch heute noch, nach Revisionen 2008 und 2016, vor allem an der Zytomorphologie und dem Ausmaß der Panzytopenien. Berücksichtigt werden hierbei die Anzahl der Zellreihen mit Zytopenien und Dysplasiezeichen, sowie der prozentuale Anteil an Blasten. Ab einem Blastenanteil von >20% spricht man vom Übergang in eine AML. Hinzugekommen ist in der Klassifikation ein klinisch relevanter Subtyp, der zytogenetisch durch Deletionen im langen Arm von Chromosoms 5 charakterisiert ist (del5q). Tabellarisch aufgeführt ist nachfolgend die *WHO*-Klassifikation von 2008, nach der die MDS-Patienten in dieser Arbeit klassifiziert wurden.

WHO Klassifikation (2008) myelodysplastischer Syndrome		
Klassifikation	Knochenmarkbefunde	Blutbefunde
Refraktäre Anämie mit unilineären Dysplasien (RCUD)	< 5% Blasten unilineär < 15 % Ringsideroblasten	< 1% Blasten
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)	< 5% Blasten ≥ 15 % Ringsideroblasten Dyserythropoese	< 1% Blasten
Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien (RCMD)	< 5% Blasten (ohne Auerstäbchen) ± 15 % Ringsideroblasten Dysplasien in >10% der Zellen	< 1% Blasten (ohne Auerstäbchen) Monozyten <1000/μl Zytopenie
MDS mit del(5q-)	< 5% Blasten (ohne Auerstäbchen) normale oder vermehrte Megakaryozyten del(5q-)zytogenetisch nachweisbar	< 1% Blasten Anämie ggf. Thrombozytopenie
Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss I/II (RAEBI/II)	< 10%/20% Blasten uni- oder multilineäre Dysplasien	< 5%/20% Blasten Monozyten <1000/μl Zytopenien
Unklassifizierte MDS (MDS-U)	< 5% Blasten eindeutige Dysplasien in <10% der Zellen mit zytogenetisch typischem MDS-Befund	< 1% Blasten Zytopenien

Tabelle 1.1 WHO-Klassifikation myelodysplastischer Syndrome: adaptiert nach (Vardiman et al., 2009)

Die wichtigsten Prognosefaktoren, die sich auf die mediane Überlebenszeit und das Risiko des Übergangs in eine AML beziehen, sind der Anteil der Blasten im Knochenmark und der Karyotyp. Neben der *FAB*- und *WHO*-Klassifikation gibt es eine Reihe von Prognose-Scores, die weitere Parameter mit einbeziehen. Das 1997 eingeführte *International Prognostic Scoring System (IPSS)* (Greenberg et al., 1997) mit zunächst drei Parametern (KM-Blasten, zytogenetische Risikogruppe, Anzahl der Zytopenien), das im Verlauf erweitert wurde (s. Tabelle), kann als Goldstandard in der klinischen Praxis angesehen werden. Ebenso das *WHO adapted Prognostic Scoring System (WPSS)* (Malcovati et al., 2007), das neben dem Karyotyp die *WHO*-Klassifikation und die Transfusionsabhängigkeit berücksichtigt. Weitere Parameter wie Alter, Geschlecht, LDH-Aktivität oder Komorbiditäten können die Prognose und individuelle Therapieentscheidung beeinflussen (Germing et al., 2005), (Gattermann et al., 2013).

Die mediane Überlebenszeit für Patienten mit einem sehr niedrigen Risikoprofil beträgt mehr als acht Jahre, für Patienten mit einem hohen Risikoprofil dagegen nur weniger als ein Jahr (Greenberg et al., 2012). Zu den häufigsten Todesursachen gehören der Übergang in eine akute Leukämie (46%), Infektionen (27%), Blutungen (10%) und Herzinsuffizienz (8%). Hierbei korreliert das Risiko für den Übergang in eine akute Leukämie mit der Höhe des Prognosescores, während schwere Infektionen oder Blutungen eher mit Niedrig-Risiko MDS assoziiert sind (Nachtkamp et al., 2016).

IPSS-R Score							
Chromosomale Veränderungen							
sehr gut gut intermediär schlecht sehr schlecht	del(11q), -Y normal, del(5q), del(12p), del(20q) del(7q), +8, i17q, +19 Inv(3)/t(3q)/del(3q), -7/-7q, komplexe Karyotypen mit 3 Veränderungen komplexe Karyotypen mit mehr als 3 Veränderungen						
Prpgnostische Variablen	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Zytogenetik Blastenanteil (KM) Hämoglobin Thrombozyten	sehr gut <2% >10g/dl >100		gut >2%-<5% 8-<10g/dl <50		intermediär 5%-10%	schlecht >10%	sehr schlecht
Risikokategorien				Risikoscore			
sehr niedrig niedrig Intermediär hoch sehr hoch				<1,5 >1,5-3 >3-4,5 >4,5-6 >6			

Tabelle 1.2 IPSS-R Score: adaptiert nach (Greenberg et al., 2012), KM – Knochenmark

Bei der zytologischen Untersuchung werden neben dem Blastenanteil morphologische Anomalien im Knochenmark und peripheren Blut erfasst. Dabei müssen mindestens 10% der Zellen einer hämatopoetischen Zellreihe Dysplasien aufzeigen, um die Kriterien zu erfüllen. Zu den häufigsten Dysplasiezeichen gehören hypo- oder degranulierte Granulozyten, Pseudo-Pelger-Zellen, Mikromegakaryozyten, mononukleäre Megakaryozyten oder Kernanomalien in myelomonozytären Vorläuferzellen. Auch das Fehlen chemischer Reaktionen, wie der Myeloperoxidase-Reaktion, oder eine vermehrte Eisenakkumulation, dargestellt in der Berliner-Blau Färbung, sind MDS-typische Veränderungen (Germing et al., 2012).

Die Chromosomenanalyse ist neben der Zytologie eine der wichtigsten Untersuchungen, die zur Klassifikation und Prognosebestimmung genutzt wird und damit auch therapeutische Relevanz hat. Dies spiegelt sich in der Berücksichtigung sowohl in der *WHO*-Klassifikation als auch im *IPSS-R-Score* wider (s.o.). 30% der Patienten zeigen einen abnormen, weitere 15% einen komplex veränderten Karyotyp. Zu den häufigsten Veränderungen gehören del(5q-), +8, -Y, del(20q), -7. Während ein normaler Karyotyp, eine del(5q-), del(11q), oder -Y mit einer eher guten Prognose einhergehen, sind komplexere Karyotypveränderungen mit einer schlechten Prognose verbunden.

Punktmutationen der *DNA* zählen noch nicht zu den routinemäßig bestimmten Parametern, sind jedoch für das Verständnis der Pathogenese der Erkrankung bzw. ihre Evolution in eine akute Leukämie sowie die Entwicklung von zielgerichteten Therapien, die in Zukunft zu einer Verbesserung der Prognose führen könnten, von großer Bedeutung.

Zu den wichtigsten beschriebenen Mutationen gehören Mutationen des *RNA-Splicing* Apparates, der *DNA*-methylierenden Enzyme, der Chromatinmodifikatoren, der Signaltransduktionsmoleküle, des *RAS*-Signalweges, sowie Komponenten des Cohesin-Komplexes und der *DNA*-Reparatur (Ganguly and Kadam, 2016). Bei bis zu 50% der Patienten mit MDS können eine oder mehrere dieser Mutationen nachgewiesen werden und für Therapieentscheidungen oder Krankheitsverlauf bedeutsam sein (Bejar et al., 2011). Die häufigsten Mutationen sind *TET2* (20%), *ASXL1* (14%), *RUNX1* (8,7%), *TP53* (7,5%), *EZH2* (6,4%) und *NRAS* (3,6%). Es hat sich gezeigt, dass die meisten dieser Mutationen mit einer schlechten Prognose einhergehen.

Die Therapiestrategie bei MDS basiert auf der Unterteilung in Niedrigrisiko- und Hochrisiko-MDS. Bei Patienten mit niedrigem Risiko und fortgeschrittenem Alter besteht die The-

rapie aus symptom-basierten, supportiven Maßnahmen. Hier ist vor allem die Durchführung von Transfusionen, Gabe von Wachstumsfaktoren (EPO, *G-CSF*, TPO-RA) und die Verhinderung von Infektionen durch Antibiotika und Impfungen wichtig. Patienten, die dauerhaft Erythrozytenkonzentrate benötigen, sind häufig von einer Eisenüberladung betroffen, die zu einer sekundären Hämochromatose mit Kardiomyopathie und Hepatopathie führen kann. Diese Patienten sollen mit Eisenchelatoren therapiert werden (Gattermann et al., 2010). Eine weitere Möglichkeit ist die Behandlung mit Valproinsäure (Kuendgen und Gattermann, 2007) oder für Patienten mit isoliertem 5q-Syndrom eine Therapie mit Lenalidomid, mit der häufig für längere Zeit eine Transfusionsfreiheit erreicht werden kann (List et al., 2006).

Die allogene Stammzelltransplantation stellt bislang die einzige kurative Maßnahme für Patienten mit MDS dar und sollte bei allen Patienten mit Hochrisiko-MDS in Erwägung gezogen werden. Weiterhin steht für Patienten mit Hochrisiko-MDS eine epigenetisch wirksame Therapie mit dem niedrigdosierten Pyrimidin-Analogon 5-Azacitidin zur Verfügung (Fenaux et al., 2009).

1.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten werden im Knochenmark gebildet und stammen von einer hämatopoetischen Stammzelle (HSC) ab. Ausgehend von solch einer pluripotenten Stammzelle entwickeln sich weitere Vorläuferzellen, die sich, beeinflusst durch lokale und humorale Faktoren, in unterschiedliche Zelllinien differenzieren. Grundsätzlich unterscheidet man Zellen der Myelopoese und der Lymphopoese. Zu den Zellen der Myelopoese zählt man Granulozyten und Makrophagen, die ihre Aufgabe in der unspezifischen Immunabwehr haben sowie Erythrozyten und Thrombozyten, die dem Transport von Sauerstoff bzw. der Blutgerinnung dienen. Zellen der Lymphopoese hingegen sind der erworbenen Immunabwehr zuzuordnen und durch eine wesentlich längere Lebensdauer und eine Reifung auch ausserhalb des Knochenmarkes in Lymphknoten oder Thymus gekennzeichnet.

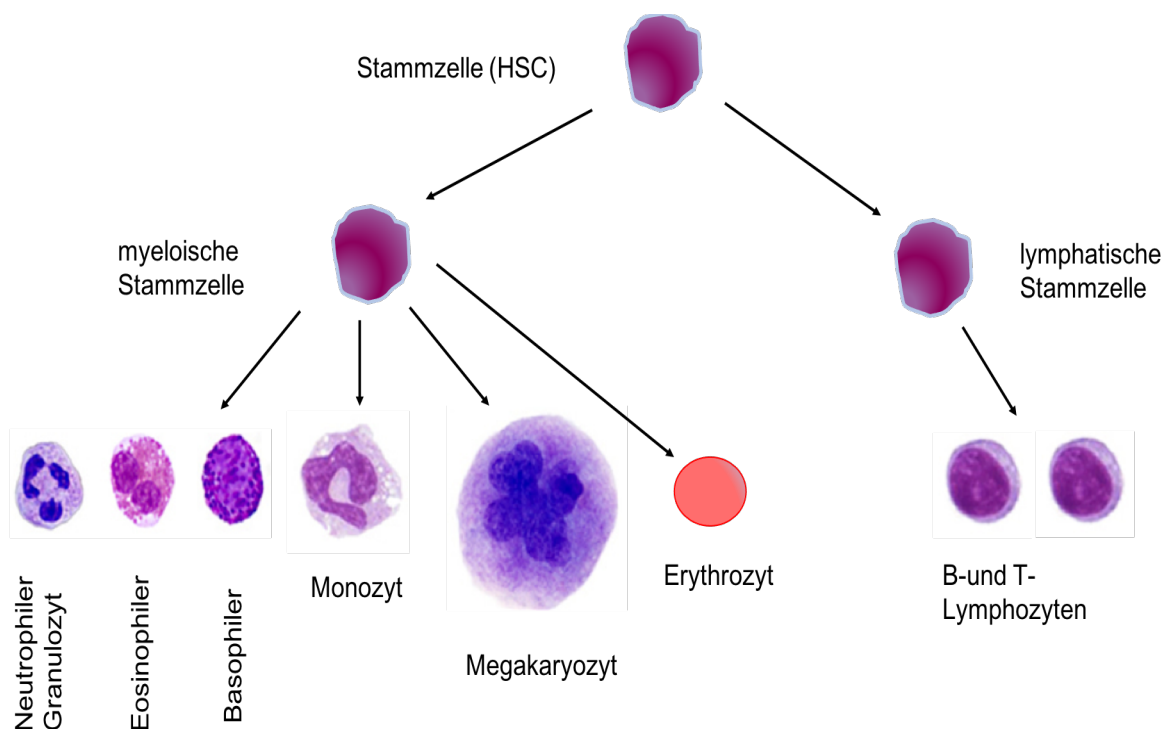


Abb. 1.1 Hämatopoese

vereinfachte Darstellung der Hämatopoese ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle (HSC), die sich in eine myeloische und eine lymphatische Stammzellreihe aufteilt. Aus der myeloischen Stammzelle bilden sich über mehrere Reifungsschritte unter anderem neutrophile Granulozyten. Angelehnt an (Sarvothaman et al., 2015)

Im blutbildenden Knochenmark werden täglich $1-2 \times 10^{11}$ Granulozyten gebildet, um den hohen Zellumsatz aufrechtzuerhalten. Während Erythrozyten bis zu 120 Tage und Thrombozyten bis zu einer Woche lang leben, beträgt die Lebensdauer von Granulozyten nur wenige Stunden (Wessels et al., 2010).

Reife neutrophile Granulozyten, die im Blutausstrich in der Färbung nach Pappenheim gut beurteilt werden können, weisen einen segmentierten Zellkern auf. Je nach Alter der Zelle sind bis zu fünf Segmente zu beobachten. Die Kernsegmente sind durch Kernbrücken verbunden. In geringerem Maße lassen sich im Blut auch etwas unreifere Formen mit stabförmigem Kern identifizieren. Normalerweise setzen sich die kernhaltigen Zellen im Blut folgendermaßen zusammen: neutrophile Granulozyten (40-80%), Lymphozyten (20-50%), Monozyten (2-6%), eosinophile Granulozyten (0-4%), basophile Granulozyten (0-1%).

Die Chromatinstruktur der Granulozyten kann in der Färbung als derbstreifig-fleckig und das Zytoplasma als zartrosa bis violett beschrieben werden. Im Zytoplasma befinden sich reichlich azurophile Granula (Theml et al., 2002). Bei Patienten mit MDS weisen diese Zellen im peripheren Blut häufig Dysplasiezeichen im Sinne von Anomalien der Kernsegmentierung (Pseudo-Pelger Zellen), Vergrößerung der Chromatinstruktur, Degranulierung oder einer Verschiebung hin zu unreiferen Zellformen auf (Germing et al., 2012).

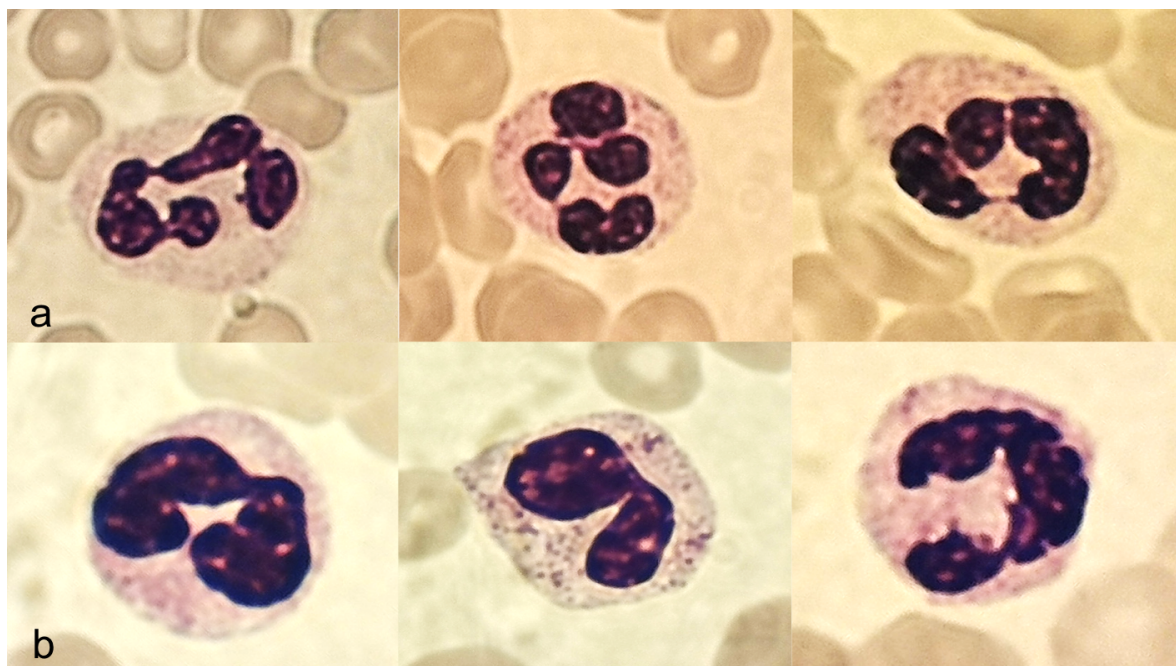


Abb. 1.2 neutrophile Granulozyten

Lichtmikroskopische Aufnahmen, peripherer Blutausstrich, May-Grünwald-Färbung, Vergrößerung 1000-fach
a) normale segmentkernige neutrophile Granulozyten, b) Segmentanomalien bei MDS

Während der Entwicklung von der Vorläuferzelle zum neutrophilen Granulozyten werden die synthetisierten Proteine in unterschiedliche Granula verpackt. Jedes Reifungsstadium hat eine bestimmte Proteinausstattung. Es werden drei unterschiedliche Granulatypen unterschieden (Borregaard, 2010). Primäre bzw. azurophile Granula haben den größten Durchmesser und enthalten vor allem antimikrobielle Enzyme wie Myeloperoxidase (MPO), neutrophile Elastase (NE), Serinproteasen und Cathepsin G. Auch die sekundären oder spezifischen Granula enthalten antimikrobielle Glycoproteine wie Lactoferrin und Lysozyme. Die tertiären oder MPO-negativen Granula speichern überwiegend Metalloproteasen wie Gelatinase und Leukolysin, die den Durchtritt durch Gewebe und Basalmembranen ermöglichen (Borregaard and Cowland, 1997).

Die Produktion der Granulozyten im Knochenmark wird durch den Wachstumsfaktor *G-CSF* angeregt. Dessen Sekretion wiederum wird durch Apoptose von neutrophilen Granulozyten im Gewebe reguliert. Kommt es zu einer verstärkten Phagozytose von apoptotischen neutrophilen Granulozyten im Gewebe, dann reduzieren die phagozyzierenden Makrophagen ihre Freisetzung von IL-23, welches ansonsten spezifische T-Zellen, sogenannte Neutrophilen-regulierende T-Zellen, zur Bildung von IL-17a anregt. Dies ist wiederum ein starker Stimulus für die *G-CSF*-Produktion. So führt eine hohe Zahl von apoptotischen Neutrophilen im Gewebe zu einer verminderten Synthese von *G-CSF* in Stromazellen (Borregaard, 2010). Neutrophile Granulozyten sind unspezifisch an der Abwehr aller körperfremden Mikroorganismen beteiligt. Hierzu zirkulieren die Zellen im Blut und können mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen (*E*-, *P*-*Selectin*, *ICAMs*), die von Endothelzellen exprimiert werden, an der Gefäßwand anhaften und anschließend durch Diapedese in das Gewebe übertreten (Amulic et al., 2012). Im Gewebe wandern die Granulozyten entlang chemotaktischer Gradienten zum Ort der Inflammation. Der Kontakt zu körpereigenen Interleukinen (IL-8), Komplementfaktoren (C5a) und erregervermittelten *PAMPs* (*pathogen associated molecular patterns*) wie LPS, (Lipopolysaccharide), Flagellin und anderen, setzt über *Toll-like* Rezeptoren (*TLRs*) eine Aktivierungskaskade im neutrophilen Granulozyten in Gang (Mantovani et al., 2011).

Durch die Aktivierung der Zellen kommt es zur Freisetzung der Inhaltsstoffe der primären und sekundären Granula und somit zum Austreten antimikrobieller Enzyme und der Bildung von *ROS*. So können phagozytierte Mikroorganismen abgetötet werden, ohne dass der toxische Inhalt der Granula in das Gewebe übertritt (Brinkmann and Zychlinsky,

2007). Auch weitere immunologische Prozesse wie die Rekrutierung anderer Immunzellen (Makrophagen, B-Zellen) werden durch die Freisetzung von Interleukinen (TNF) durch neutrophile Granulozyten gesteuert (Nathan, 2006).

Die Bedeutung neutrophiler Granulozyten für die Immunabwehr zeigt sich in Form schwerer, lebensbedrohlicher Infektionen, wenn es zu einer Verminderung der Zellzahl kommt, vor allem bei gestörter Produktion im Knochenmark durch Zytostatika, andere Medikamente, Bestrahlung oder Leukämien (Estcourt et al., 2016). Auch angeborene Störungen der Granulopoese, die sowohl die Zellzahl als auch die Funktion der Zellen betreffen können, wie z.B. die chronische Granulomatose, führen zu bakteriellen Infektionen, die nur schwer zu beherrschen sind (Lanini et al., 2017).

1.3 Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Die Bildung von *neutrophil extracellular traps* wurde 2004 erstmalig beschrieben (Brinkmann et al., 2004) und stellt einen bis dahin noch unbekannten Prozess dar, der neutrophile Granulozyten dabei unterstützt, Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten einzufangen und zu neutralisieren. Bereits bekannt war, dass neutrophile Granulozyten die Möglichkeit zur Phagozytose mit dem Verdau von Mikroorganismen innerhalb der Zelle oder der Abgabe antimikrobieller Substanzen in das Gewebe besitzen. Bei der Bildung von *NETs* kommt es nach Aktivierung der Zellen zur Fusion von Granula mit dem Phagosom, der Auflösung der Zellmembran und der Abgabe von Proteinen in den Extrazellularraum. Dort bilden sich netzartige Strukturen, hauptsächlich aus Chromatin bestehend, das mit Histonen und Plasmaproteinen, sowie Inhaltsstoffen der neutrophilen Granula bestückt ist.

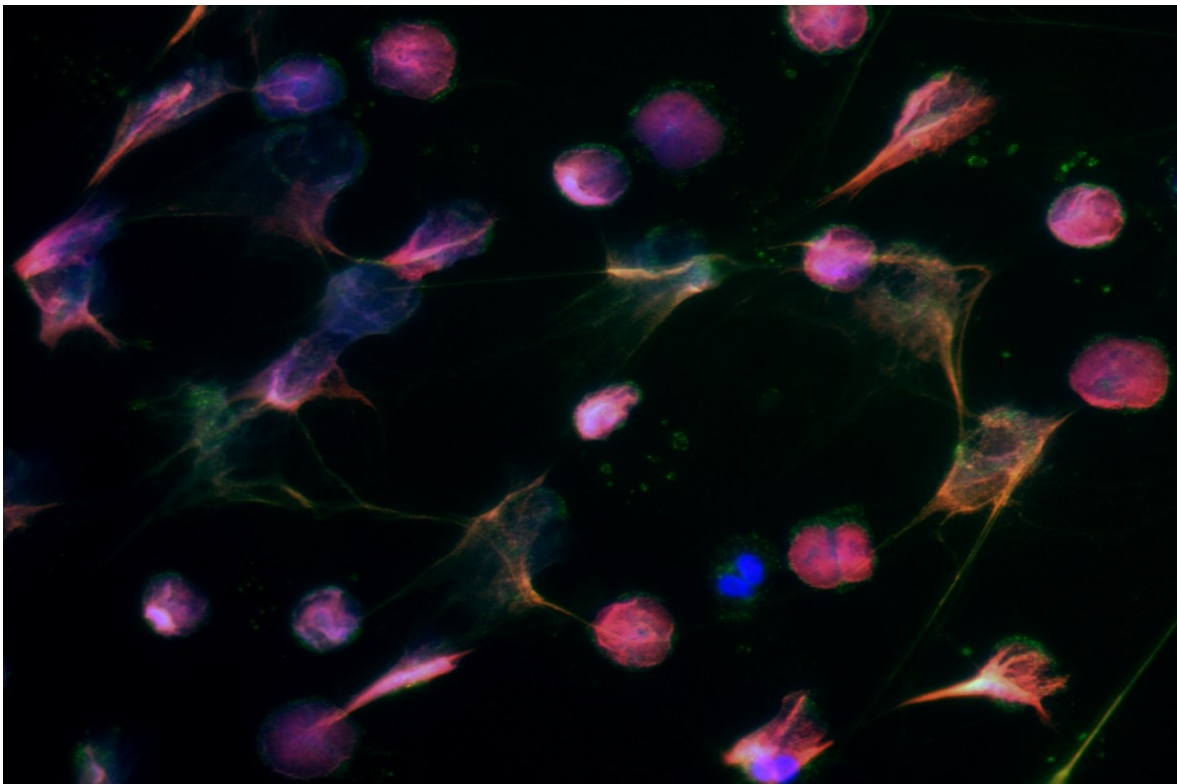


Abb. 1.3 Neutrophil extracellular traps die Abbildung zeigt neutrophile Granulozyten nach 180-minütiger Stimulation mittels PMA und Markierung der DNA, der Histone und der neutrophilen Elastase mittels Immunfluoreszenzfarbstoffen in einer 400-fachen Vergrößerung.

Färbt man neutrophile Granulozyten, die mit PMA (Phorbol-Myristat-Acetat) stimuliert wurden, mit Fluoreszenzfarbstoffen gegen DNA, Histone oder neutrophile Elastase an, so kann man unter dem Mikroskop beobachten, dass die Zellen Ausläufer bilden und eine

Art faserige Matrix entsteht, die auch eine physikalische Barriere für Mikroorganismen darstellen kann. Die Bildung von *NETs* wird als *NETosis* bezeichnet, da die Zellen eine Form des Zelltods aufweisen, der morphologisch von der Apoptose oder Nekrose unterschieden werden kann. (Fuchs et al., 2007). Kennzeichen der Apoptose sind die Kondensation und Fragmentation des Zellkerns (Pyknose und Karyorrhexis) mit Auflösung der Kernmembran und Bildung von Vakuolen im Zytoplasma. Hierdurch soll ein Austritt von Zellinhalt in den Extrazellularraum vermieden werden, weshalb diese Form des Zelluntergangs im allgemeinen auch als nicht-immunogener oder gerichteter Zelltod beschrieben wird (Galluzzi et al., 2007).

Im Gegensatz zur Apoptose ist die Zellnekrose durch ein onkotisches Anschwellen der Zellorganellen gekennzeichnet, das letztendlich zur Ruptur der Plasmamembran mit unkontrolliertem Austritt von Zellinhalt und der möglichen Folge einer Entzündungsreaktion führt (Benarafa and Simon, 2017).

Bei der *NETosis* zeigt sich ebenfalls eine Auflösung der Struktur des Zellkerns durch Anschwellen seines Inhaltes mit Vergrößerung des Zelldurchmessers. Es kommt zu einer Fragmentierung der Kernmembran und Auflösung der Granula, sowie zur Vermischung des Chromatins mit den Granula-Inhaltsstoffen. Die Zellmembran bleibt hierbei solange intakt, bis alle Komponenten vermischt sind, um dann die *NETs* zu entlassen (Brinkmann and Zychlinsky, 2007). Diese Form des Zelltodes führt im Gegensatz zur Apoptose und Nekrose zu der Freisetzung von intaktem Chromatin in den Extrazellularraum. Bei der Bindung von Mikroorganismen werden letztere einer hohen lokalen Konzentration antimikrobieller Substanzen ausgesetzt. (Fuchs et al., 2007)

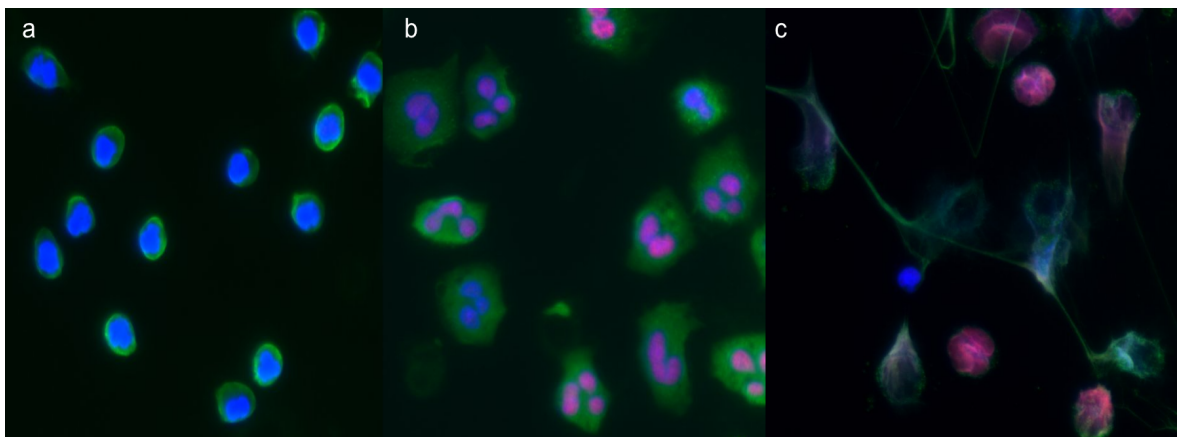


Abb. 1.4 morphologische Veränderung von neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit PMA

Die Abbildung zeigt fluoreszenzmikroskopische Ausschnitte in einer 400-fachen Vergrößerung von neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit PMA. a) unstimuliert, b) nach 30-minütiger Stimulation, c) nach

180-minütiger Stimulation. In Blau erfolgte die Markierung der *DNA*, in Grün die Markierung der neutrophilen Elastase und in Rot die Anfärbung der Histone. Zu erkennen ist eine Größenzunahme des Zellkerns und des Zellvolumens insgesamt, bis zur Ausbildung netzartiger Strukturen in c.

Auf molekularer Ebene wird dieser Prozess durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*ROS*) initiiert, die durch das Enzym NADPH-Oxidase generiert werden. Im weiteren Verlauf bewirkt das Enzym Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) durch Veränderung der Histonstruktur eine Dekondensierung des Chromatins im Zellkern. Unterstützt durch die Enzyme Myeloperoxidase (MPO) und neutrophilen Elastase (NE) (Metzler et al., 2014), die nun aus den azurophilen Granula im Zytoplasma ebenfalls in den Zellkern gelangen (Papayannopoulos et al., 2010), kann das Chromatin weiter dekondensieren, so dass es im Verlauf zur Ruptur der Kernmembran kommt.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten nicht nur durch *NETosis*, sondern auch durch einen vom Zelltod unabhängigen Prozess *NETs* entlassen können (Yipp and Kubes, 2013). Diese sogenannte vitale oder schnelle *NETosis* führt ebenfalls zu einer Aktivierung von PAD4 und zu einer Freisetzung von Granulozyten-Elastase; dies allerdings in einem Prozess, der unabhängig von *ROS* abläuft. Die Freisetzung des Chromatins erfolgt dann über Vesikel, so dass es nicht zu einer Ruptur der Plasmamembran kommt und die Zelle am Leben bleibt (Pilszczek et al., 2010).

Welche Bedeutung *NETs* in der Abwehr von Mikroorganismen haben, wurde erstmals bei der Analyse von Patienten mit chronischer Granulomatose (*CGD*) gezeigt. Diesen Patienten fehlt von Geburt an das Enzym NADPH-Oxidase. Hierdurch können die Granulozyten keine *ROS* produzieren und keine *NETs* bilden. Es kommt immer wieder zu lebensbedrohlichen Infektionen, bei denen vor allem generalisierte Pilzinfektionen die häufigste Todesursache darstellen (Bianchi et al., 2009).

Gegenstand der Forschung ist auch eine Beteiligung von *NETs* bei vielen weiteren Krankheitsbildern. Bei autoimmunologischen Erkrankungen, wie Psoriasis, systemischem Lupus erythematoses (SLE), rheumatoider Arthritis oder chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen, begünstigt die Bildung von *NETs* durch die Stimulation der Produktion von Interleukinen und Entzündungsmediatoren eine Persistenz des entzündlichen Milieus (Delgado-Rizo et al., 2017) und damit eine Chronifizierung des Krankheitsprozesses. Es konnte auch gezeigt werden, dass *NETs* bei der Entstehung von Atherosklerose und der daraus resultierenden Bildung arterieller Thromben beteiligt sind. Die Behandlung von Mäusen mit DNase, einem Enzym, das *DNA* spaltet und zum Schutz vor *NETs* auch von

einigen Bakterien gebildet wird, bewirkte nach koronaren Ischämien eine verminderte Schädigung des Myokards durch den Ischämie-Reperfusions-Effekt (Döring et al., 2017). Hier wird die Schädigung des körpereigenen Gewebes durch eine übermäßige Freisetzung von *ROS* und Enzymen hervorgerufen. Weiterhin wurde beschrieben, dass *NETs* eine wichtige Rolle sowohl bei der Entwicklung maligner Erkrankungen als auch bei Tumor-assoziierten Thrombosen spielen (Erpenbeck and Schön, 2016).

Neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen gehören zu den Immunzellen, die am häufigsten in soliden Tumoren zu finden sind. Man geht davon aus, dass das Mikromilieu des Tumors die Aktivierung der Granulozyten beeinflusst und durch die Bildung von *NETs* einen Einfluss auf das Tumorwachstum nimmt. Einerseits kann hierdurch ein Effekt entstehen, der gegen die Tumorzellen gerichtet ist, andererseits können Proteine wie die neutrophile Elastase (Houghton et al., 2010) oder das in den tertiären Granula vorkommende MMP9 (Matrix-Metalloprotease 9) die Proliferation und Tumorzellmigration fördern. Zytokine wie IL-8, IL-12 und TNF-alpha bewirken die Aktivierung von Wachstumsfaktoren und die Ausbildung neuer Gefäße. Tumorassoziierte Thrombosen, eine häufige Todesursache bei Krebspatienten, können durch Interaktion von Tumormikropartikeln und neutrophilen Granulozyten ausgelöst werden, die somit durch intravaskuläre *NET*-Bildung an der Entstehung von Thrombosen beteiligt sind (Fuchs et al., 2012).

1.4 Reaktive Sauerstoff Spezies

Reaktive Sauerstoffspezies (*ROS*) sind hochreaktive Moleküle, die meist durch Reduktion von molekularem Sauerstoff oder durch Autoxidation von Zwischenprodukten des Stoffwechsels innerhalb der Zelle entstehen. Zusätzlich haben auch exogene physikalische Faktoren wie UV-Licht, Röntgen- oder Gammastrahlung Einfluss auf die Bildung von *ROS* (Löffler, 2007). In der folgenden Abbildung sind die *ROS* aufgeführt, die an der Bildung von *NETs* beteiligt sind.

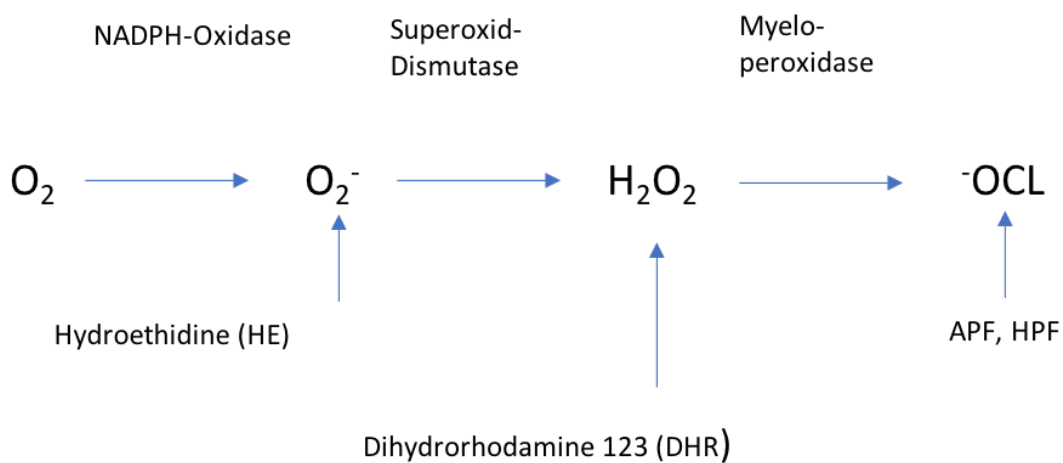


Abb. 1.5 Bildung von Hypochlorid aus O_2

Durch Elektronentransfer bildet die NADPH-Oxidase das Superoxid-Anion ($\text{O}_2^{\cdot -}$), das mit Hilfe der Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) katalysiert wird. Dieser dient wiederum der Myeloperoxidase als Substrat zur Bildung von Hypochlorid. Hydroethidine, Dihydrorhodamine und APF bzw. HPF sind die in dieser Arbeit verwendeten fluoreszierenden Farbstoffe, die zum Nachweis der einzelnen *ROS* verwendet wurden.

Durch eine Überproduktion von *ROS* kann es zu oxidativem Stress kommen, der zelluläre Strukturen wie DNA, Proteine, Lipide oder Kohlenhydrate schädigt und somit verantwortlich sein kann für die Entstehung von Erkrankungen wie Krebs, Atherosklerose, Diabetes mellitus oder neurodegenerative Erkrankungen, aber auch bei der Zellalterung eine Rolle spielt (Dröge, 2002). Andererseits sind *ROS* wichtige Signalmoleküle und *second messenger* (Angelova and Abramov, 2016), die Prozesse wie Zellproliferation und Migration steuern können. Dies verdeutlicht, wie wichtig es ist, dass diese hochreaktiven Moleküle durch ein System aus Radikalfängern (Antioxidantien) wie Glutathion und Vitamin C sowie enzymatischen Entgiftungsreaktionen, die den hochreaktiven molekularen Sauerstoff sofort umwandeln, reguliert werden (Dröge, 2002). *ROS* entstehen vor allem an der mito-

chondrialen Atmungskette, wo es durch stufenweise Reduktion von Sauerstoff zur Energiegewinnung kommt. Weiterhin werden im endoplasmatischen Retikulum mit Hilfe von Oxidationsprozessen Moleküle gefaltet und prozessiert (Dickinson and Chang, 2011).

Auch während der Phagozytose können durch NADPH-Oxidasen, die in der Zellmembran lokalisiert sind, große Mengen an *ROS* zur Elimination von Mikroorganismen gebildet werden („*oxidative burst*“). Zunächst kommt es durch Elektronentransfer des NADPH-Oxidase-Komplexes zur Bildung von Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$), die durch die Superoxid-Dismutase zu H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) umgewandelt werden. Die Myeloperoxidase (MPO) katalysiert dann die Bildung von Hypochlorid (HOCl) aus H_2O_2 und Chlorid (Cl^-). Hierdurch entsteht hypochlorige Säure (HOCl), die eine der wirkungsvollsten antimikrobiellen Substanzen darstellt (Winterbourn and Kettle, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass *ROS* nicht nur bei der Phagozytose, sondern auch bei der Bildung von *NETs* ganz wesentlich beteiligt sind. Bei fehlender NADPH-Oxidase (Fuchs et al., 2007) oder MPO (Metzler et al., 2011), können keine *NETs* mehr gebildet werden. Wenn Hypochlorid als Endprodukt des oxidativen Burst substituiert wird, ist die Bildung von *NETs* in vitro wieder möglich (Akong-Moore et al., 2012).

1.5 Ziel der Arbeit

Eine erhöhte Infektanfälligkeit bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen beruht in erster Linie auf einer Verminderung der neutrophilen Granulozyten, aber auch auf Funktionsstörungen dieser Zellen. Hierzu passt auch ein partieller Myeloperoxidase-Defekt, der im Knochenmark einiger MDS-Patienten zytochemisch nachweisbar ist, dessen Genese jedoch noch nicht geklärt ist.

In dieser Arbeit wird der Vermutung nachgegangen, dass neutrophile Granulozyten bei Patienten mit MDS eine verminderte Fähigkeit aufweisen, *neutrophil extracellular traps* zu bilden. Zudem wird untersucht, ob solch ein Defekt darauf beruhen könnte, dass die Enzyme NADPH-Oxidase und/oder Myeloperoxidase nicht in ausreichendem Maß reaktive Sauerstoffspezies (*ROS*) generieren, deren Produktion nach bisherigen Erkenntnissen für die Ausbildung von *NETs* unerlässlich ist.

Bei der Bildung von *NETs* durchläuft der neutrophile Granulozyt wesentliche morphologische Veränderungen, bis hin zum Auflösen der Zellmembran und dem geordneten Freisetzen seiner Inhaltstoffe. Ein weiterer Gegenstand der Untersuchung in dieser Doktorarbeit sind die morphologischen Auffälligkeiten der neutrophilen Granulozyten von MDS-Patienten während der NETose.

Das Thema der Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte. Zunächst erfolgten fluoreszenzmikroskopische Analysen zum Nachweis von *NETs* bei Patienten mit MDS im Vergleich zu einer altersadjustierten Kontrollgruppe. Zweitens wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt, um die Bildung von *NETs*, sowie die morphologischen Veränderungen während der NETose weiter zu charakterisieren und die Produktion von *ROS* durch die Enzyme NADPH-Oxidase und MPO nachzuweisen.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

Im folgenden Kapitel werden alle verwendeten Substanzen, Verbrauchsmaterialien und Gerätschaften aufgelistet.

2.1.1 Chemikalien, Kits und Substanzen

Name	Hersteller
4-aminobenzoic hydrazid (ABAH)	Sigma Aldrich
3`-(p-aminophenyl) fluorescein (APF)	Molecular Probes
4-Dimethylamino-antipyrine (AP)	Sigma Aldrich
3`-(hydroxyphenyl) fluorescein (HPF)	Molecular Probes
A. dest (destilliertes Wasser)	Fresenius Kabi AG
BD <i>Intrasure Kit</i>	BD Bioscience
DAPI <i>Fluormount G, Mounting medium</i>	Thermo Fisher Scientific
Dihydroethidium (hydroethidine; HE)	Molecular Probes
Dihydrorhodamine 123 (DHR)	Molecular Probes
Diphenyleneiodonium chlorid (DPI)	BD Bioscience
Ethylendiamidtetraacetat (EDTA)	Sigma Aldrich
Formaldehyd (<i>Methanol Free, 10 % UltraPure</i>)	Polysciences Inc.
<i>Goat serum</i> (10%)	Thermo Fisher Scientific
Histopaque 1119	Sigma Aldrich
Humanes Serum-Albumin (HSA)	CSL Behring GmbH
Lysepuffer (0,83% Ammoniumchloridlösung)	Zentralapotheke Uniklinik Düsseldorf
RPMI 1640 (<i>modified, without L-Glu, Phenol-red</i>)	Sigma Aldrich
<i>Paraformaldehyde Solution</i> (4%)	USB Corporation
<i>PBS</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)	Sigma Aldrich
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Applichem
Triton X100	Sigma Aldrich

Tabelle 2.1 Verwendete Chemikalien, Kits und Substanzen

2.1.2 Antikörper

Name	Hersteller
Anti-NE (elastase antibody)	Abcam
Anti-Histone	Milipore
Anti-pan Histone (clone HII-4)	Abcam
Anti-CD45 APC	BD Bioscience
Anti-CD66b FITC	Beckmann Coulter
Anti-Myeloperoxidase	BD Bioscience
<i>goat anti-rabbit Alexa 488</i>	Molecular Probes/Invitrogen
<i>goat anti-mouse Alexa 568</i>	Molecular Probes/Invitrogen

Tabelle 2.2 Verwendete Antikörper

2.1.3 Geräte

Name	Hersteller
<u>Durchflusszytometer:</u> FACS Calibur	BD Bioscience
<u>Inkubator:</u> Heraeus HERA cell	Thermo Fisher Scientific
<u>Pipettierhilfen:</u> Eppendorf Research (0,1 – 2,5 µl) Eppendorf Research (0,5 – 10 µl) Eppendorf Research (2 – 20 µl) Eppendorf Research (10 – 100 µl) Eppendorf Research (100 - 1000 µl)	Eppendorf
<u>Mikroskope:</u> Zeiss Axiovert 25 Zeiss Axioplan 2 imaging	Zeiss
<u>Sterilwerkbänke :</u> Schulz Z100	Schulz Lufttechnik GmbH
<u>Zentrifugen:</u> Megafuge 1.0R Biofuge stratos , Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 2.3 Verwendete Geräte

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
24-well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One
<i>Casy Cups</i>	Innovatis
<i>Cover Slips</i> (rund, 13 mm)	VRR
Objektträger	Engelbrecht
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Biozym
Reaktionsgefäße: Eppendorf <i>Tubes</i> (1,5 ml) <i>Falcon Tubes</i> (15ml, 50ml) <i>BD Tubes</i>	Eppendorf Greiner Bio-One BD Bioscience
<i>Vacutainer</i> System	BD Bioscience
<i>Vacutainer</i> EDTA-Röhrchen	BD Bioscience

Tabelle 2.4 Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.2. Patientencharakteristika

Für die experimentellen Untersuchungen wurden Blutproben von MDS-Patienten und einer altersadjustierten Vergleichsgruppe gewonnen. Die Abnahme der Vollblutproben in EDTA-Röhrchen erfolgte im Rahmen einer normalen Routineuntersuchung. Die Patienten wurden zuvor über die Studie aufgeklärt und erklärten sich mit der Teilnahme einverstanden. Eine schriftliche Einverständniserklärung der Probanden, sowie ein Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit der Studiennummer 4638 liegen vor.

Zusätzlich zu den hier aufgeführten Proben erfolgte eine interne Standardkontrolle mit einer von einem gesunden Spender gewonnenen Blutprobe.

Altersadjustierte Kontrollgruppe

Nummer	Alter	Geschlecht	Grunderkrankung	Leukozyten (x1000/ μ l)
1	72	M	pAVK	9,3
2	78	W	pAVK, TAAA	10,4
3	64	M	pAVK, AAA	11,7
4	77	W	pAVK IV	10,8
5	66	M	terminale Niereninsuffizienz	9,4
6	85	W	pAVK IV	6,9
7	66	W	pAVK IV	8,7
8	64	M	pAVK IV	4,9
9	63	W	pAVK IIb	8,6
10	78	M	pAVK IV	9,3
11	74	M	Carotisstenose	6,7
12	67	M	pAVK	13,9
13	84	W	pAVK IV	5,2
14	81	M	generalisierte Aneurysmose	8,7
15	76	W	pAVK IIb	6,5
Mittelwert	73	m/w (8/7)		8,7
Median	74			

Tabelle 2.5 Patientencharakteristika in der altersadjustierten Kontrollgruppe

m – männlich, w – weiblich, pAVK – periphere arterielle Verschlusskrankheit, TAAA – thorakoabdominelles Aortenaneurysma, AAA – abdominelles Aortenaneurysma

MDS-Gruppe

Nummer	Alter	Geschlecht	MDS	Leukozyten (x1000/ μ l)
16	79	M	del 5q-	9,9
17	77	W	RCMD	1,3
18	72	W	RAEB I	4,3
19	69	M	RCMD RS	5,2
20	79	M	RCMD	3,3
21	71	W	RARS	5,2
22	74	M	RCMD	6,2
23	71	W	RAEB II	n.a.
24	79	M	RAEB I	3,4
25	75	M	RCMD	13,7
26	76	M	RAEB II	2,3
27	73	W	RCMD	2,3
Mittelwert	75	m/w (7/5)		5,2
Median	74,5			

Tabelle 2.6 Patientencharakteristika in der MDS-Gruppe

m – männlich, w – weiblich, n.a. – nicht auswertbar, del (5q) – Deletion 5(q-), RCMD – Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien, RCMD-RS - Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien und Ringsideroblasten, RAEB (I/II) - refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss (I/II)

2.3 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

2.3.1 Extraktion von neutrophilen Granulozyten

Die Extraktion von neutrophilen Granulozyten wurde aus Vollblut durchgeführt, welches durch eine Blutabnahme mittels *Vacutainer Systems* (BD Biosciences) gewonnen und durch die Zugabe von EDTA antikoaguliert wurde. Um einer Aktivierung oder Apoptose der Granulozyten im Vorfeld entgegenzuwirken, erfolgte eine Verarbeitung der Proben innerhalb von vier Stunden. Die Proben wurden möglichst schonend behandelt, um eine mechanische Aktivierung der Zellen durch Scherkräfte zu vermeiden. Bei einem Normwert von ca. $1,5 - 7,7 \times 10^3$ Granulozyten/ μl setzten wir 6-10 ml EDTA Vollblut pro Extraktion ein. Die Separation der Granulozyten erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation. Im ersten Schritt wurden pro Ansatz 3–5 ml Vollblut vorsichtig in einem 15 ml *Falcon Tube* auf 5 ml einer Histopaque-1119-Lösung pipettiert. Aufgrund der besonderen Dichteigenschaften dieser Lösung wurde durch die nachfolgende Zentrifugation bei 800 g für 20 Minuten eine Separation der verschiedenen Zellarten innerhalb des Mediums erreicht.

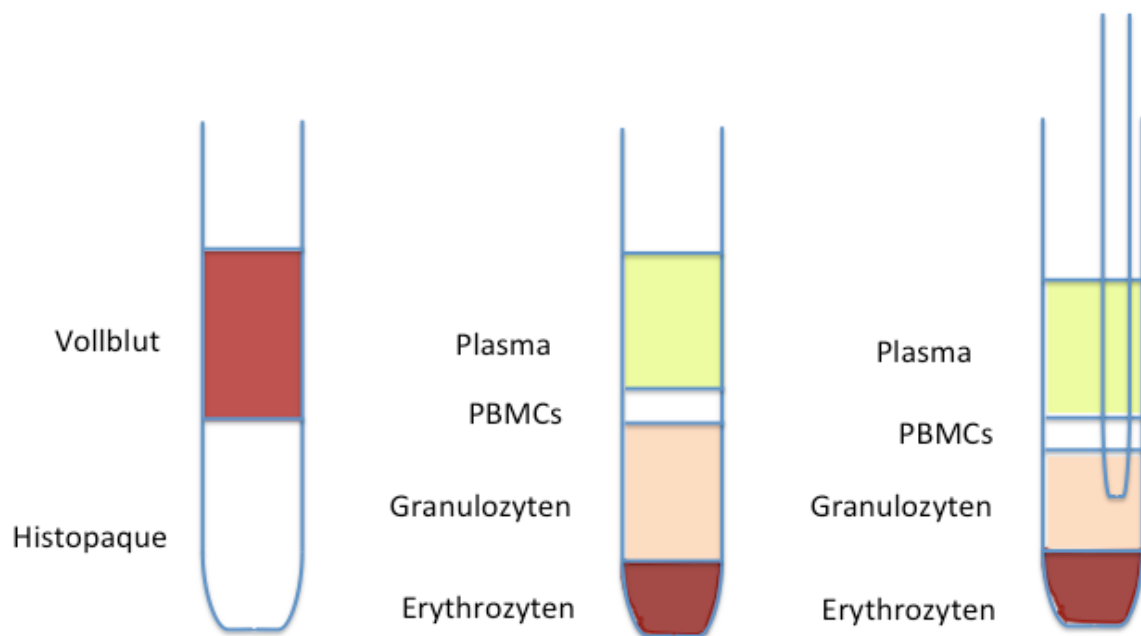


Abb. 2.1 Dichtegradientenzentrifugation

Die Grafik links zeigt zwei Phasen, die bei der Aufschichtung des Vollblutes auf das Trennmedium entstehen. Nach der Zentrifugation erfolgt, wie in der zweiten Grafik zu sehen, eine Aufteilung der einzelnen Blutbestandteile aufgrund unterschiedlicher Dichte in vier Fraktionen. Die Grafik auf der rechten Seite zeigt die Entnahme der gewünschten Zellschicht zur weiteren Bearbeitung.

Mit Hilfe einer Pipette wurde der Bereich der Suspension entnommen, in dem sich die Granulozyten befinden. Die Zellsuspension wurde in *PBS*-Lösung aufgenommen, gewaschen und bei 450 g für 8 Minuten zentrifugiert. Da sich weiterhin ein größerer Anteil an Erythrozyten in der Suspension befand, erfolgte eine Resuspension des Zellpellets in 5 ml kalter 0,83%-iger Ammoniumchloridlösung. Nach einer Inkubationszeit von 7 Minuten bei Raumtemperatur wurde das *Falcon Tube* mit *PBS*-Lösung aufgefüllt und bei 450 g für 8 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in 10 ml *PBS*-Lösung aufgenommen und 10 µl zur Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des *Casy Tone* Zellzählgerätes entnommen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 450 g für 8 Minuten erfolgte die Resuspension des Pellet abhängig von der extrahierten Zellzahl in einer definierten Menge (100 µl = 1×10^6 Zellen) *RPMI* + 1% HSA Zellkulturmedium zur weiteren Verarbeitung der extrahierten Granulozyten. Zusätzlich wurde nach der Zellextraktion noch eine Reinheitskontrolle der isolierten Granulozyten mittels Immunfluoreszenzfärbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung durchgeführt. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen aus der Suspension entnommen.

2.3.2. Zellkultur und Stimulation

Die extrahierten Granulozyten wurden auf Zellkulturplatten und *Cover Slips* zur späteren Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop vorbereitet und über verschiedene Zeiträume inkubiert und stimuliert. Das grundlegende Prinzip zur Darstellung von *neutrophil extracellular traps*, das durch die Berliner Arbeitsgruppe um Zychlinski und Brinkmann (Brinkmann et al., 2010) etabliert wurde, passten wir an unsere Fragestellungen an.

Zunächst erfolgte die Vorbereitung der *24-well*-Zellkulturplatte durch Einlegen der 13 mm *Cover Slips*, die im weiteren als Träger für die Zellen dienten und zur endgültigen Darstellung auf Objektträger übertragen werden konnten. Pro Ansatz wurden nun 2×10^5 Zellen in 500 µl *RPMI* + 1% HSA aufgenommen und jeder Ansatz in jeweils eine Vertiefung der Zellkulturplatte pipettiert. Danach wurde die Platte zunächst für 30 Minuten bei 37°C im Inkubator gehalten, um eine Sedimentation der Zellen abzuwarten. Es wurde jeweils ein doppelter Ansatz durchgeführt. Zur Stimulation der Zellen erfolgte bei allen Ansätzen die Zugabe von 1,62 nM PMA in 500 µl *RPMI* und 1% HSA. Wenn keine Stimulation erfolgen sollte, wurden lediglich 500 µl *RPMI* und 1% HSA ohne PMA hinzugefügt.

Probe: MDS/altersadjustierte Kontrollgruppe	Probe: Kontrollgruppe
unstimuliert	unstimuliert
PMA 30 Minuten	PMA 30 Minuten
PMA 180 Minuten	PMA 180 Minuten

Tabelle 2.7 Versuchsansatz der fluoreszenzmikroskopischen Analysen

Es erfolgte jeweils ein doppelter Probenansatz der altersadjustierten Kontrollgruppe bzw. MDS-Gruppe und einer internen Standardkontrolle ohne Stimulation, sowie Ansätze für eine 30- und eine 180- minütige Stimulation mit PMA.

Zur Beendigung der Stimulation nach 30 Minuten und nach 180 Minuten erfolgte die Zugabe von 500 µl Paraformaldehyd (4%). Zu den unstimulierten Ansätzen wurde ebenfalls nach 180 Minuten 500 µl Paraformaldehyd pipettiert und die Proben hierdurch gleichzeitig fixiert. Die Proben konnten nun bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

2.3.3 Fluoreszenzfärbung zur Darstellung der *Neutrophil Extracellular Traps*

Bei der Fluoreszenz-Immunzytologie erfolgte die Markierung bestimmter zellulärer Strukturen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und daran gekoppelten Fluorochromen. Eine gute Darstellung von *NETs* wird erreicht, indem Elastase, Histone und *DNA* markiert werden. Die Färbung von Elastase und Histonen erfolgte mittels Primärantikörpern, die spezifisch gegen diese Strukturen gerichtet sind. Bei unseren Versuchen wurden Antikörper verwendet, die von Kaninchen oder Mäusen gebildet wurden. Nach dem Einsatz des Primärantikörpers wurden fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper hinzugegeben, die gegen den jeweiligen Primärantikörper aus der Maus oder dem Kaninchen gerichtet waren. Die Färbung erfolgte in Suspension. Die *Cover Slips* wurden zunächst dreimal sehr vorsichtig für 5 Minuten mit *PBS* gewaschen. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembran durch 0,5% Triton X-100 für eine Minute sowie eine erneute dreimalige Wäsche für jeweils 5 Minuten mit *PBS*. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit den Primärantikörpern (Anti-Elastase, Anti-Histon) inkubiert und dann erneut dreimal für 5 Minuten mit *PBS* gewaschen. Es erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 10% *Goat Serum* für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Hiernach wurden die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (*goat anti-rabbit Alexa 488*, *goat anti-mouse Alexa 568*) aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die *Cover Slips* wurden danach mit einem speziellen Eindeckmedium, welches DAPI, einen fluores-

zierenden, interkalierenden *DNA*-Farbstoff, enthält, zur weiteren mikroskopischen Auswertung auf einen Objektträger gebracht.

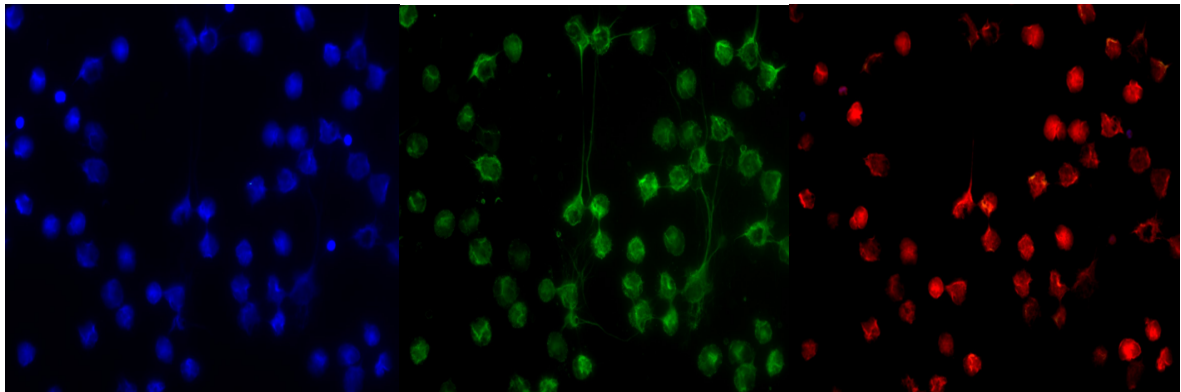


Abb. 2.2 Darstellung der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe

Die Abbildung zeigt stimulierte neutrophile Granulozyten (PMA, 180 Minuten). In den drei Abbildungen ist der gleiche Bildausschnitt mit unterschiedlich angefärbten Strukturen zu erkennen. blau = *DNA*, grün = neutrophile Elastase, rot = Histone (Vergrößerung 100-fach)

2.3.4 Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Befunde

Die Auswertung der gefärbten *Cover Slips* erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Quantifizierung der Anzahl der Granulozyten, die *NETs* gebildet haben, orientierte sich an dem von Brinkmann und Zychlinsky beschriebenen Protokoll (Brinkmann et al., 2010). Zunächst wurden auf jedem *Cover Slip* zufällig fünf nicht überlappende Bereiche ausgewählt und über das 10-fach Objektiv mit der Kamera Bilder aufgenommen und gespeichert. Für jeden Fluoreszenzfarbstoff wurde im Filter der geeignete Fluoreszenzkanal ausgewählt.

Dargestellte Struktur	Fluorochrom	Filter (Farbe)
<i>DNA</i>	DAPI	455 nm (blau)
neutrophile Elastase	FITC	488 nm (grün)
Chromatin, Histone	PE	568 nm (rot)

Tabelle 2.8 Zuordnung der Fluoreszenzfilter und -farbstoffe

Die Dauer der Belichtung wurde nach vorheriger Testung über die gesamte Aufnahme-
serie konstant gehalten. Die so erstellten Bilddateien wurden zur weiteren Auswertung in
das Programm *Image J/Fiji Software* (<https://imagej.nih.gov/ij/>) geladen. Nach Vorein-
stellung des Auswertungsverfahrens gemäß dem Protokoll von Brinkmann und Zychlinski

wurden die im Bildausschnitt befindlichen Zellen vom Programm automatisch erfasst. Die Auswertung erfolgte getrennt in allen drei Fluoreszenzkanälen für die unstimulierten, die 30 Minuten stimulierten und die 180 Minuten mit PMA stimulierten Zellen. Die Anzahl der *NETs* konnte folgendermaßen bestimmt werden:

$$\text{Anzahl der } NETs (\%) = 100 \times \frac{\text{Anzahl der gemessenen Objekte in der Histon-Färbung}}{\text{Anzahl der gemessenen Objekte in der DNA-Färbung}}$$

Zur Qualitätskontrolle wurde die Anzahl der Granulozyten an der Gesamtzellzahl, der auf den *Cover Slips* aufgetragenen Zellen in ähnlicher Weise bestimmt:

$$\text{Anzahl der Granulozyten (\%)} = 100 \times \frac{\text{Anzahl der gemessenen Objekte in der Elastase-Färbung}}{\text{Anzahl der gemessenen Objekte in der DNA-Färbung}}$$

Zusätzlich wurde die Fluoreszenzintensität in den einzelnen Fluoreszenzkanälen über den *ROI-Manager* erfasst. Zur Auswertung wurden die erhobenen Daten in Excel kopiert und weiter analysiert.

2.4 Durchflusszytometrische Analysen

2.4.1 Extraktion von Leukozyten mittels Lyse

Die Extraktion von Leukozyten zur durchflusszytometrischen Analyse wurde ebenfalls aus EDTA-Blut durchgeführt. Wie oben beschrieben, konnte dies durch eine Blutabnahme mittels *Vacutainer Systems (BD Biosciences)* gewonnen werden. Ca. 12 ml EDTA-Blut wurden in einem 50 ml *falcon tube* mit ca. 38 ml kalter 0,83%-Ammoniumchloridlösung vermischt und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde das *falcon tube* bei 450 g für 8 Minuten zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet erneut in 10 ml kalter 0,83%-Ammoniumchloridlösung resuspendiert und für 10 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach Zentrifugation bei 450 g für 8 Minuten wurde das Zellpellet zweimal in *PBS*-Lösung resuspendiert und zentrifugiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte wie oben beschrieben mittels *Casy Tone* Zellzählgerät.

2.4.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein physikalisches Messverfahren, das durch Lasertechnik die Analyse von einzelnen Zellen hinsichtlich verschiedener Zelleigenschaften erlaubt und eine hohe Anzahl von Zellen in einer Probe innerhalb kürzester Zeit untersuchen kann. Die Eigenschaften der Zellen können graphisch in einem Diagramm, dem so genannten *Dot Plot*, in einer wolkenähnlichen Anordnung gegeneinander aufgetragen und ausgewertet werden. Jede Zelle verursacht bei der Durchkreuzung eines Lichtstrahls am Anfang des Durchflusszytometers ein Streulicht (*light scatter*), das über spezielle Spiegel detektiert werden kann. Die gewonnenen Informationen können spezifisch für eine Zellpopulation sein. Durch den *Forward Scatter* (FSC) lässt sich das Volumen bzw. die Größe einer Zelle bestimmen. Der *Sideward Scatter* (SSC) detektiert das Seitwärtsstreulicht, das Informationen über die Granularität der Zelle vermittelt.

Zusätzlich können die Zellen im Vorfeld mit Fluorochrom-markierten Antikörpern, die sich gegen spezifische Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Strukturen richten, markiert werden. Der Laserstrahl im Gerät regt den Fluoreszenzfarbstoff an, der daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, das mit Hilfe von Filtern und einem Photomultiplier detektiert wird. Das Lichtsignal wird entsprechend seiner Stärke graphisch in einem *Dot Plot* repräsentiert.

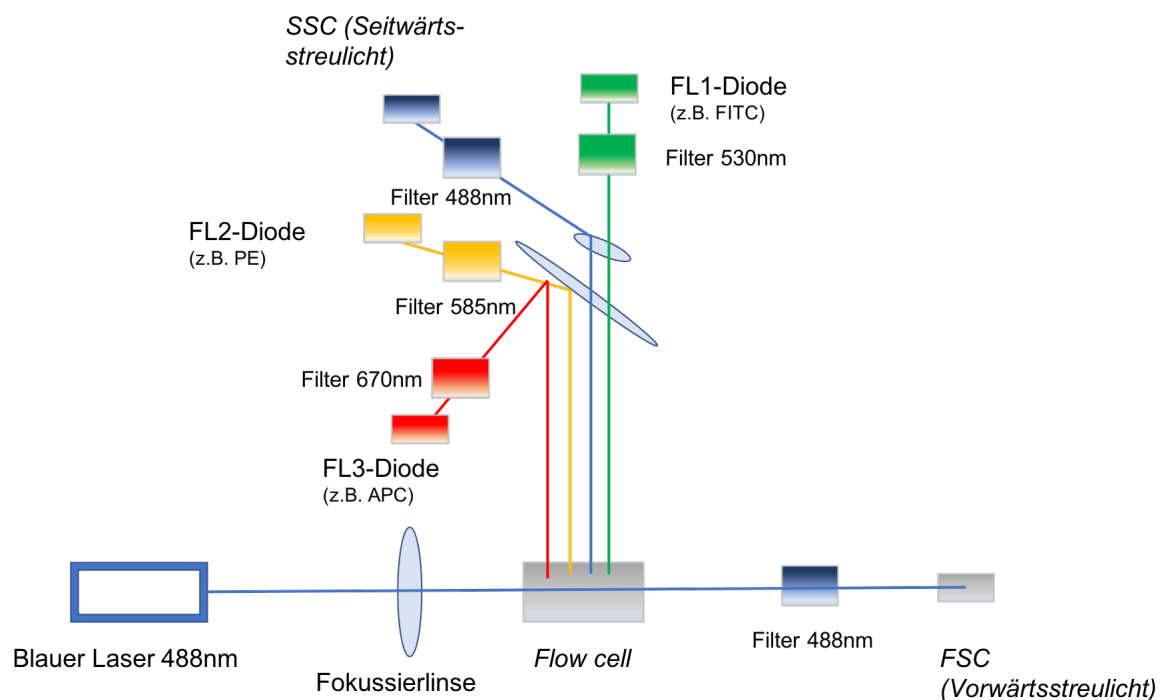


Abb. 2.3 Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

Im Bereich der *Flow cell* erfolgt die Probenaufnahme mittels hydrodynamischer Fokussierung, d.h. Aufreihung der Zellen hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom. Danach kommt es zum Durchtritt durch eine Lichtquelle und die Anregung der Zellen durch einen Laser in einem bestimmten Frequenzbereich. Das hierbei ausgesendete Licht wird durch verschiedene Spiegel umgelenkt und durch Filter und Prismen in die unterschiedlichen Wellenlängen aufgeteilt. Das Signal einer bestimmten Wellenlänge kann dann an der entsprechenden Diode aufgenommen und gemessen werden

2.4.3 Antikörpermarkierung zur Bestimmung der Anzahl an CD66+ Zellen

Die Antikörperfärbung dient der Reinheitskontrolle neutrophiler Granulozyten nach deren Anreicherung durch die oben beschriebene Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurden 1×10^6 der gewonnenen Zellen der Suspension entnommen und mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern, Anti-CD66b (FITC) und Anti-CD45 (APC), für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1 ml *PBS*-Lösung hinzugegeben und die Proben für 8 Minuten bei 450 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 0,1% Formaldehydlösung aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.4.4 Intrazelluläre Antikörpermarkierung der Myeloperoxidase

Myeloperoxidase kann durch intrazelluläre Markierung mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper und anschließende durchflusszytometrischer Auswertung nachgewiesen werden.

Hierzu wurden 1×10^6 der isolierten Granulozyten entnommen und zunächst eine extrazelluläre Färbung mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper Anti-CD45 (APC) für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der Inkubation wurde 1 ml *PBS*-Lösung hinzugegeben und die Proben 8 Minuten lang bei 450 g zentrifugiert. Die weitere Präparation zur intrazellulären Färbung erfolgte mit Hilfe des *BD Intrasure Kits* durch Zugabe von 100 µl Reagenz A (Fixationslösung) und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Zugabe von 1 ml *PBS*-Lösung erfolgte die Zentrifugation und dann die Dekantierung des Überstands. Das Pellet wurde in 50 µl Reagenz B (Detergenz) resuspendiert und anschließend der Anti-Myeloperoxidase Antikörper zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut gewaschen, zentrifugiert, in 0,1% Formaldehydlösung aufgenommen und bis zur Messung im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.4.5 Fluoreszenzfärbung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle erfolgte deren Markierung durch verschiedene Fluorochrome. Die Zellen wurden in Suspension gefärbt. Durch zügige Verarbeitung der Proben und Vermeidung einer Lichtexposition sollte dabei die Autoxidation der Farbstoffe vermieden werden.

Der Nachweis von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) kann durch Dihydrorhodamin 123 (DHR) erfolgen, das nach Oxidation durch H_2O_2 zu Rhodamin 123, ein Fluoreszenzsignal im Bereich von 529 nm emittiert. Das Superoxid-Anion (O_2^-) kann durch Hydroethidin (HE) nachgewiesen werden. Durch die Oxidation entsteht das rot fluoreszierende Ethidium (605 nm), das mit der DNA interkaliert. Die Farbstoffe können frei die Zellmembran durchdringen und verbleiben nach der Oxidation intrazellulär (Walrand et al., 2003).

3'-(p-aminophenyl) fluorescein (APF) und 3'-(hydroxyphenyl) fluorescein (HPF) können in Kombination miteinander den Nachweis von Hypochlorid (OCl^-) erbringen (515 nm). Fluoreszenzfarbstoffe können zusätzlich durch Nebenprodukte, die bei der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies anfallen, oxidiert werden. Durch Subtraktion der Fluoreszenzsignale von APF und HPF sollen solche Nebenreaktionen rechnerisch eliminiert werden, so dass ein spezifischer Nachweis von OCl^- ermöglicht wird (Setsukinai et al., 2003).

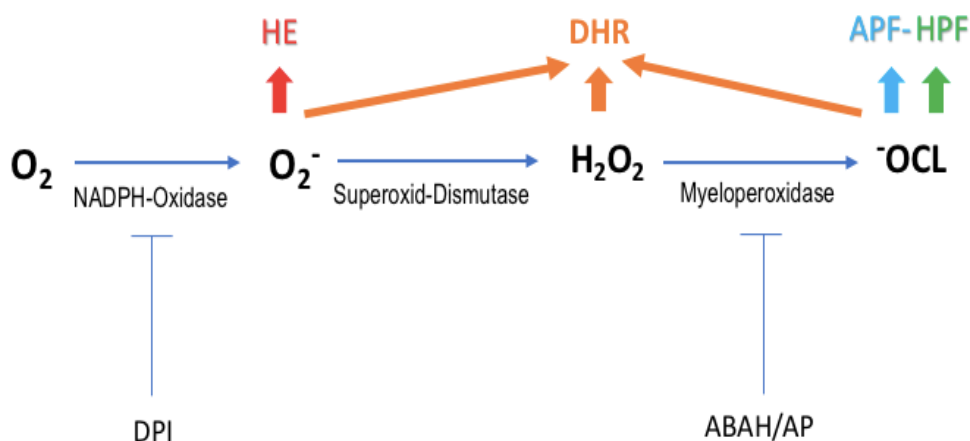


Abb. 2.4 Schematische Darstellung der ROS-Produktion

Die Enzyminhibitoren DPI und ABAH/AP hemmen die Enzyme NADPH-Oxidase bzw. Myeloperoxidase. Mit den verwendeten Fluorochromen (HE, DHR, und APF/HPF) kann der Nachweis bestimmter ROS erfolgen.

Der Nachweis der reaktiven Sauerstoffspezies erfolgte für jeden Indikator-Farbstoff in einem gesonderten Ansatz. Hierzu wurde jeweils eine Messung für eine unstimulierte Probe, eine stimulierte Probe und eine stimulierte Probe nach Zugabe von Inhibitoren durchgeführt. Für alle Ansätze wurden Granulozyten aus derselben Zellisolierung verwendet. Zunächst wurden für jeden Ansatz 1×10^6 Zellen in 100 μl PBS in ein *FACS-Tube* überführt. Danach wurden die jeweiligen Inhibitoren hinzugegeben. Durch die Zugabe von 4-aminobenzotriazolhydrat (ABAH) soll es zu einer Inhibition der Myeloperoxidase kommen (Kettle et al., 1995). Auch 4-Dimethylamino-antipyrin (AP) soll entweder durch eine direkte Enzyminhibition oder das Abfangen der entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies einen Einfluss auf den *oxidative burst* ausüben (Costa et al., 2006). Diphenyliodoniumchlorid (DPI) ist ein Inhibitor der NADPH-Oxidase und des Komplex I der mitochondrialen Elektronentransportkette und hierdurch für die Hemmung der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich (Kirchner et al., 2012). Zunächst wurden jeweils 200 μM der Inhibitoren ABAH und AP sowie 20 μM DPI zu den entsprechenden Ansätzen gegeben und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Hiernach erfolgte die Zugabe von jeweils 5 μM APF und HPF, sowie 11 μM DHR und 25 μM HE zu den entsprechenden Ansätzen. Die Proben wurden 30 Minuten im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation entweder mit H_2O_2 zur Beurteilung der Myeloperoxidaseaktivität oder mit PMA. PMA wurde als unspezifischer Stimulator der Bildung von NETs mit begleitender Produktion reaktiver Sauerstoffspezies bereits bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von NETs eingesetzt. Nach Stimulation im Dunkeln bei 37°C für 10 Minuten erfolgte die Zugabe von 1 ml PBS-Lösung und die Zentrifugation für 8 Minuten bei 450 g. Das Pellet wurde anschließend in 300 μl PBS resuspendiert. Möglichst unmittelbar danach wurden die Zellen am Durchflusszytometer gemessen.

Ansatz	Fluorochrom	+Stimulanz	+Inhibitor	
1	Autofluoreszenz			
2-4	APF unstimuliert	APF +H ₂ O ₂	APF+H ₂ O ₂ +ABAH/AP	
5-7	HPF unstimuliert	HPF+H ₂ O ₂	HPF+H ₂ O ₂ +ABAH/AP	
8-10	DHR unstimuliert	DHR+H ₂ O ₂	DHR+H ₂ O ₂ +ABAH/AP	
11-13		DHR+PMA	DHR+PMA+ABAH/AP	DHR+PMA+DPI
14-16	HE unstimuliert	HE+PMA	HE+PMA+DPI	

Tabelle 2.9 Versuchsansätze zur durchflusszytometrischen Analyse

Insgesamt erfolgten 16 Probenansätze nur mit einem Fluorochrom, dem Fluorochrom und dem entsprechenden Stimulanz, sowie mit dem entsprechenden Fluorochrom und Stimulanz und Zugabe der Inhibitoren

2.4.6 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Die Auswertung der durchflusszytometrisch erhobenen Daten erfolgte zunächst mit der *CellQuest Software* (Becton Dickinson) am Durchflusszytometer. Durch *Gating* innerhalb der einzelnen *dot plots* wurden Zellpopulationen ausgewählt und weiter analysiert. Dabei wurden neue Punktwolken erstellt. Die so gewonnen Rohdaten wurden mit dem Programm *FCS Express Reader* (De Novo Software) zusätzlich ausgewertet und zur statistischen Analyse in Excel (Microsoft) übertragen.

2.4.7 Messung der ROS

Zur Messung der reaktiven Sauerstoffspezies vor und nach Stimulation wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der jeweiligen Probe ausgewertet. Es erfolgte zunächst eine Darstellung der Zellen mit den Achsenaufragungen *Forward Scatter* gegen *Sideward Scatter*. Hierdurch erhält man eine orientierende Aufteilung in die einzelnen Subpopulationen: Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Durch *Gating* der Zellen, d. h. Restriktion des Untersuchungsfensters auf die Granulozyten, konnte eine gezielte Auswertung der Fluoreszenzintensität der Gesamtpopulation der Granulozyten erfolgen.

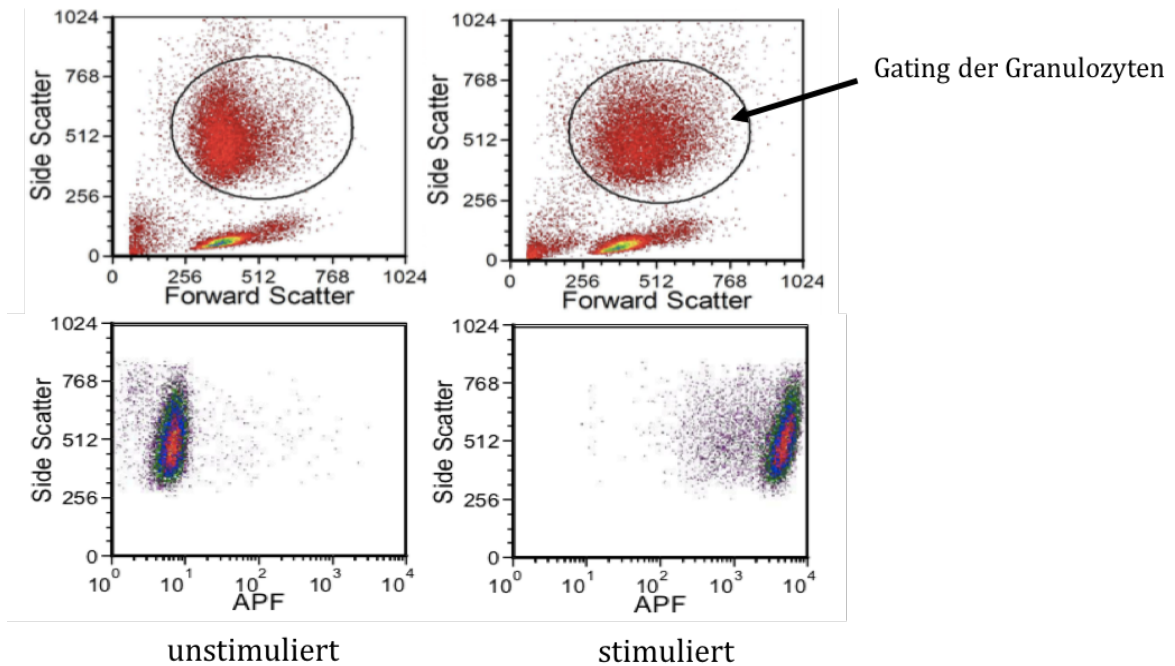


Abb. 2.5 Gating der Granulozytenpopulation

In den oberen beiden Grafiken ist die Betrachtung einer Probe auf der Basis von *FSC* und *SSC* zu sehen. Man erkennt die Separation der Zellpopulationen gemäß Größe und Granularität. Granulozyten sind mittelgroße Zellen mit einer hohen Granularität; sie generieren viel Seitwärtsstreulicht und mäßig viel Vorwärtsstreulicht. Durch das Setzen eines *Gates* auf diesen Bereich werden in den unteren beiden Grafiken ausschließlich die Zellen dargestellt, die durch das *Gate* ausgewählt wurden. So kann man in den unteren beiden Grafiken die Fluoreszenzintensität für einen bestimmten Farbstoff (hier APF) in dieser Zellpopulation betrachten.

2.4.8 Charakterisierung von *NETs*

Neutrophil extracellular traps sollten im Rahmen der durchflusszytometrischen Analysen hinsichtlich ihrer morphologischen Parameter charakterisiert werden. Hierzu wurde nach Stimulation der Zellen deren Größenzunahme durch Dekondensation des Chromatins anhand der Veränderung des Vorwärtsstreulichtes (*FSC*) detektiert, sowie eine mögliche Degranulierung der Zellen anhand einer Veränderung des Seitwärtsstreulichtes (*SSC*) dargestellt.

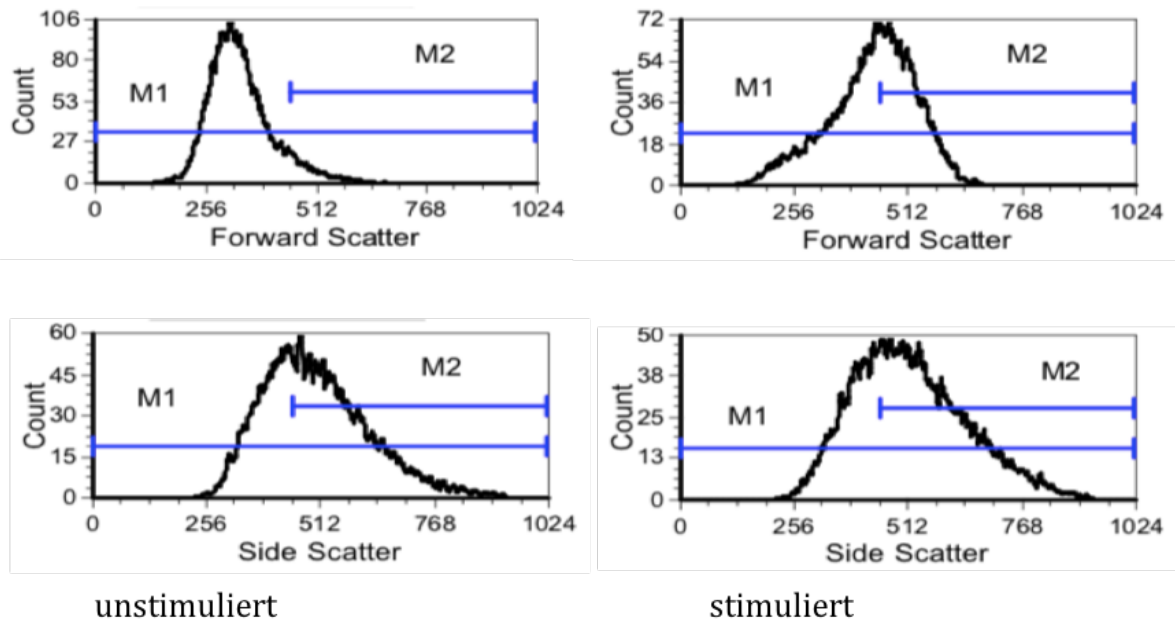


Abb. 2.6 Durchflusszytometrische Charakterisierung von NETs

Die beiden oberen Diagramme zeigen, die Zellzahl, sowie das ausgestrahlte Vorwärtstreulicht an. Nach Stimulation der Zellen kommt es zu einer Größenzunahme und hiermit zur Emission von mehr Vorwärtstreulicht. Dementsprechend ist eine Verschiebung der Kurve nach rechts zu sehen. In den unteren Diagrammen ist die Zellzahl gegen den *sideward scatter* aufgetragen. Hier wird die Granularität der Zellen vor und nach Stimulation dargestellt. Die Marker (M1, M2) markieren Messbereiche, aus denen Informationen bezüglich Zellzahl und Veränderung der Kurven nach Stimulation abgeleitet werden.

3. Ergebnisse

3.1 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

3.1.1 Fluoreszenzintensität

Zunächst wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) pro Probe aus fünf Aufnahmen eines *Cover Slips* unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Aus den fünf Resultaten wurde der Mittelwert gebildet. Außerdem wurde die Veränderung der Fluoreszenzintensität nach Stimulation (für 180 Minuten) in der altersadjustierten Kontrollgruppe (n=14) und in der MDS-Gruppe (n=9) betrachtet.

Bei der Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität für DAPI ergab sich in der altersadjustierten Kontrollgruppe ein Mittelwert von 12821 ± 1009 vor Stimulation und 8134 ± 2121 nach 180 Minuten Stimulation. Der Rückgang der mittleren Fluoreszenzintensität war hoch signifikant ($p=6 \cdot 10^{-8}$). Der Mittelwert der Fluoreszenzintensität für FITC lag in der altersadjustierten Kontrollgruppe vor Stimulation bei 4804 ± 1365 und nach 180 Minuten Stimulation bei 2992 ± 671 . Auch hier zeigte sich ein signifikanter Rückgang der Fluoreszenzintensität ($p=0,0001$). Die mittlere Fluoreszenzintensität von PE betrug in der altersadjustierten Kontrollgruppe vor Stimulation 4024 ± 2727 und nach 180 Minuten Stimulation 6398 ± 1105 . Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg der MFI ($p=0,0056$).

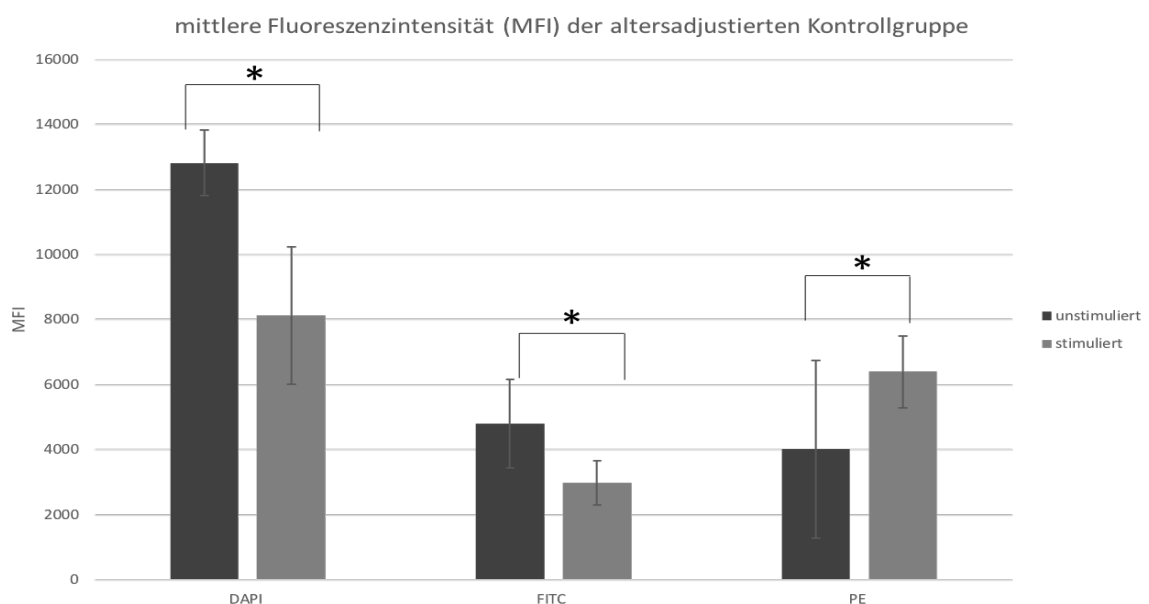


Abb. 3.1 mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der altersadjustierten Kontrollgruppe

Die drei Balkendiagramme zeigen die Veränderung der mittleren Fluoreszenzintensität für die einzelnen Fluorochrome (DAPI, FITC, PE) vor und nach Stimulation mit PMA für 180 Minuten. Die Fluorochrome DAPI und FITC zeigen nach Stimulation eine signifikante Abnahme der MFI, während die MFI für PE signifikant zunimmt. Das Sternchen (*) gibt einen signifikanten Unterschied auf dem Signifikanzniveau $p < 0,02$ an.

In der MDS-Gruppe ergab sich für DAPI eine signifikante Abnahme der MFI von 13566 ± 530 vor Stimulation auf 10099 ± 1530 nach 180 Minuten Stimulation ($p=0,00001$). Für FITC zeigte sich ein Rückgang von 5484 ± 1299 auf 5032 ± 1142 (nicht signifikant; $p=0,44$). Die MFI von PE ließ nach 180 Minuten Stimulation einen signifikanten Anstieg von 2033 ± 1128 auf 5765 ± 1486 erkennen ($p=0,00002$).

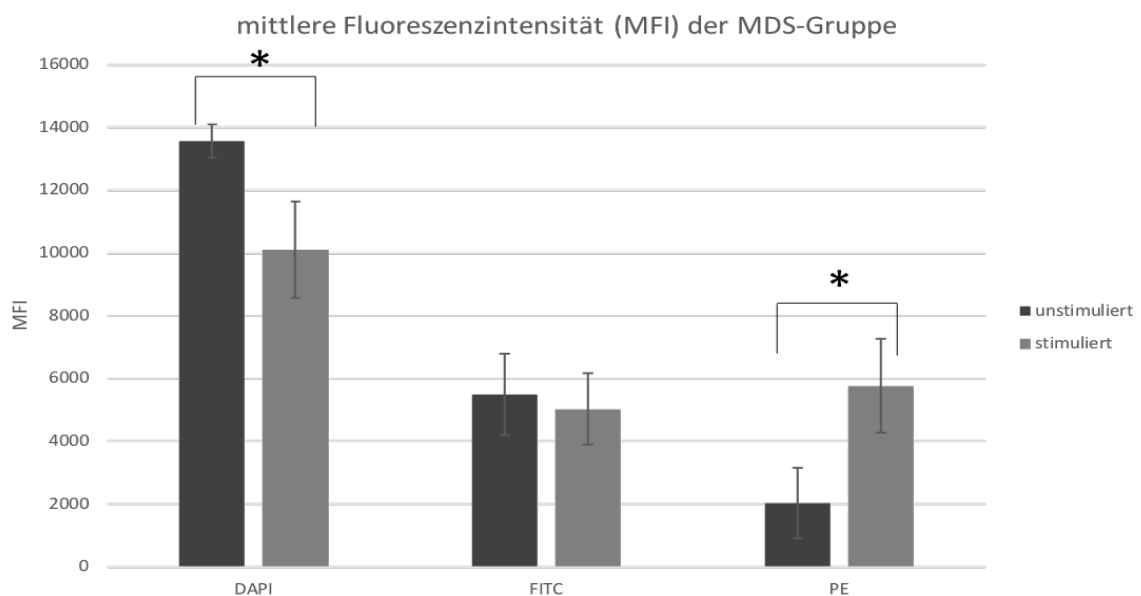


Abb. 3.2 mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der MDS-Gruppe

Die drei Balkendiagramme zeigen die Veränderung der mittleren Fluoreszenzintensität für die einzelnen Fluorochrome (DAPI, FITC, PE) vor und nach Stimulation mit PMA für 180 Minuten. DAPI zeigt eine signifikante Abnahme der MFI, während die MFI für PE signifikant zunimmt. Für das Fluorochrom FITC konnte keine signifikante Abnahme der MFI beobachtet werden. Das Sternchen (*) gibt einen signifikanten Unterschied auf dem Signifikanzniveau $p < 0,02$ an.

Die MFI von DAPI zeigte bei MDS im Vergleich zur altersadjustierten Kontrollgruppe zunächst eine nicht signifikante Erhöhung ($p=0,06$). Nach 180 Minuten Stimulation mit PMA war die MFI von DAPI in der MDS-Gruppe dann signifikant höher ($p=0,03$). Für FITC ergab sich bei den unstimulierten Proben kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,21$). Nach Stimulation lag die MFI bei den MDS-Patienten signifikant höher als bei den Kontrollen ($p=0,00002$). Für PE konnte in der MDS-Gruppe vor Stimulation eine niedrigere MFI beobachtet werden ($p=0,05$); nach Stimulation zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,25$).

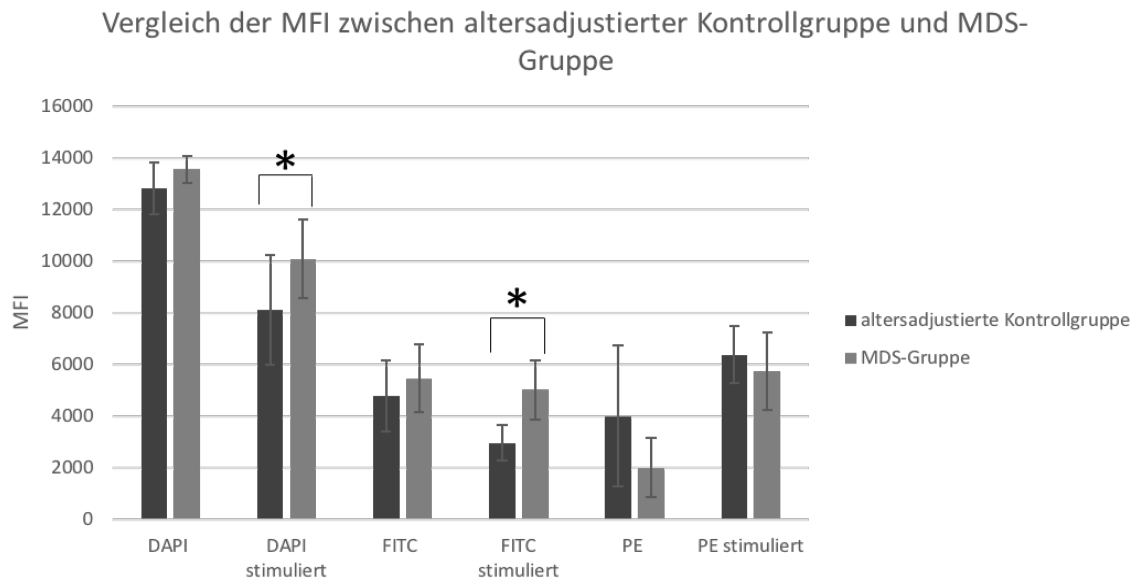


Abb. 3.3 Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten zwischen der altersadjustierten Kontrollgruppe und der MDS-Gruppe:

Die Balkendiagramme zeigen die Veränderung der mittleren Fluoreszenzintensität für die einzelnen Fluorochrome (DAPI, FITC, PE) vor und nach Stimulation mit PMA für 180 Minuten, im direkten Vergleich der altersadjustierten Kontrollgruppe und der MDS-Gruppe miteinander. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der MFI für DAPI nach Stimulation. Die MFI der altersadjustierten Kontrollgruppe ist signifikant niedriger als in der MDS-Gruppe. Ebenso zeigt sich eine signifikant niedrigere MFI für FITC nach Stimulation in der altersadjustierten Kontrollgruppe im Vergleich zur MDS-Gruppe. Das Sternchen (*) zeigt einen signifikanten Unterschied auf dem Signifikanzniveau $p < 0,05$ an.

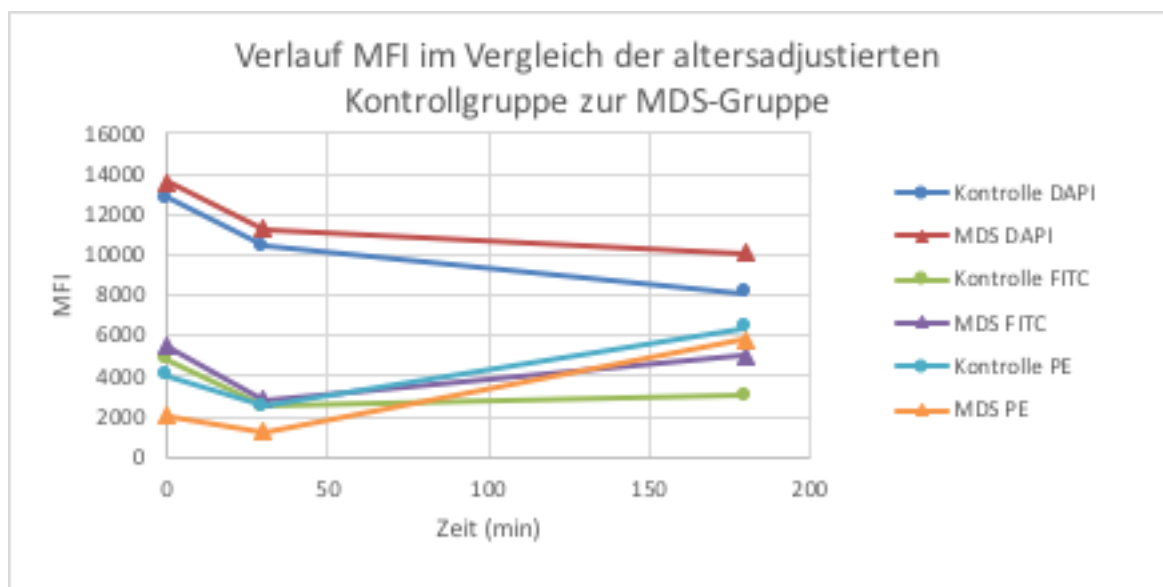


Abb. 3.4 Verlauf der MFI im Vergleich der altersadjustierten Kontrollgruppe zur MDS-Gruppe

Dargestellt ist hier der Verlauf der mittleren Fluoreszenzintensität der einzelnen Fluorochrome für die altersadjustierte Kontrollgruppe und die MDS-Gruppe während der 180-minütigen Stimulation mit PMA.

3.1.2 Quantifizierung der *NETs*

Für die Bestimmung des Anteils an *NETs* vor und nach Aktivierung mit PMA wurden pro Probe jeweils fünf zufällig ausgewählte, repräsentative Bildausschnitte ausgewertet. Die Gesamtzellzahl wurde durch Zählung aller DAPI-positiven Zellen ermittelt. Der Anteil an neutrophilen Granulozyten wurde anhand der Anzahl der FITC-positiven Zellen bestimmt. Schließlich ließ sich der Anteil der *NETs* mit Hilfe der PE-positiven Zellen berechnen.

Für die altersadjustierte Kontrollgruppe (n=11) ergab sich ein Mittelwert von 17% *NETs* in den unstimulierten Proben und 85% *NETs* nach 180-minütiger Stimulation mit PMA. In der MDS-Gruppe (n=7) lag der Mittelwert bei 17% *NETs* in den unstimulierten Proben und 67% *NETs* nach 180-minütiger Stimulation mit PMA. Der Anstieg nach PMA-Stimulation war in der MDS-Gruppe signifikant geringer als in der altersadjustierten Kontrollgruppe (p=0,02).

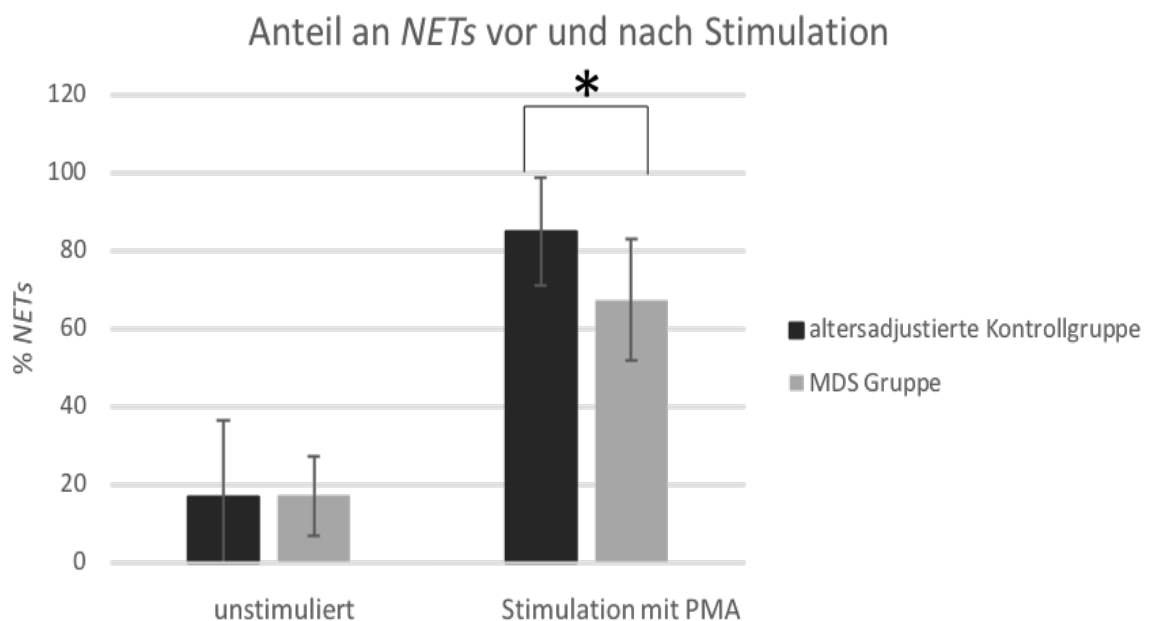


Abb. 3.5 Anteil an *NETs* vor und nach Stimulation

Die beiden Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil an Zellen die *neutrophil extracellular traps* bilden vor und nach 180-minütiger Stimulation mit PMA. Nach Stimulation haben in der altersadjustierten Kontrollgruppe signifikant mehr Zellen *NETs* gebildet, als in der MDS-Gruppe. Das Sternchen (*) gibt einen signifikanten Unterschied auf dem Signifikanzniveau $p = 0,02$ an.

3.1.3 Auswertung der Zellzahl

Bei Auswertung der Gesamtzellzahl in der DAPI Fluoreszenzfärbung waren in der altersadjustierten Kontrollgruppe vor Stimulation im Mittelwert 695 ± 304 Zellen pro Bildausschnitt zu finden. Bei der Stimulation mit PMA wurden nach 30 Minuten 752 ± 292 und nach 180 Minuten 740 ± 182 Zellen gezählt. In der MDS-Gruppe fanden sich vor Stimulation 413 ± 111 , nach 30 Minuten PMA 432 ± 117 Zellen und nach 180 Minuten PMA 420 ± 116 Zellen.

Insgesamt zeigten sich somit signifikante Unterschiede zwischen der altersadjustierten Kontrollgruppe und der MDS-Gruppe, sowohl vor ($p=0,03$) als auch nach 30-minütiger ($p=0,02$) und 180-minütiger ($p=0,02$) Stimulation mit PMA. In der MDS-Gruppe waren signifikant weniger auswertbare Zellen vorhanden. Über die Zeit zeigte sich weder in der Kontrollgruppe noch in der MDS-Gruppe eine relevante Veränderung der Zellzahl.

In den zu jedem Experiment mitgeführten Standardkontrollen waren im Mittel vor Stimulation 515 ± 236 Zellen, nach 30 Minuten Stimulation 689 ± 302 Zellen, und nach 180 Minuten Stimulation 661 ± 184 Zellen nachweisbar. Im Vergleich zur altersadjustierten Kontrollgruppe zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied ($p=0,08$; $p=0,60$; $p=0,27$). Im Vergleich zur MDS-Gruppe lag die Zellzahl in der Standardkontrolle jedoch nach 30 Minuten PMA ($p=0,04$) und nach 180 Minuten PMA ($p=0,004$) signifikant höher.

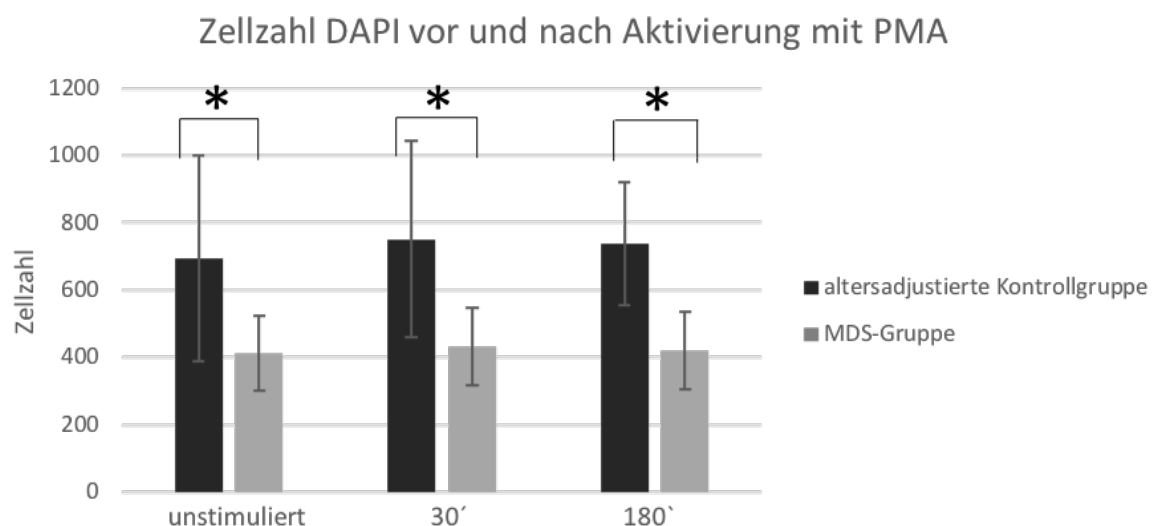


Abb. 3.6 Auswertung der Gesamtzellzahl in der DAPI Fluoreszenzfärbung vor und nach Stimulation

Die drei Balkendiagramme zeigen die durchschnittlich ausgewertete Zellzahl pro Bildausschnitt im Vergleich der altersadjustierten Kontrollgruppe zur MDS Gruppe vor, während und nach Stimulation mit PMA. In der altersadjustierten Kontrollgruppe sind sowohl vor, als auch nach 30- und 180 minütiger Stimulation mit PMA signifikant mehr Zellen auf dem Objektträger nachweisbar, als in der MDS-Gruppe. Das Sternchen(*) gibt einen signifikanten Unterschied auf dem Signifikanzniveau $p < 0,05$ an.

3.1.4 Zellmorphologie

Die Veränderung des Zellkern- bzw. Zelldurchmessers vor und nach Stimulation mit PMA wurde mit Hilfe der bereits genannten Fluorochrome und der hiermit markierten Strukturen an 11 Proben in der altersadjustierten Kontrollgruppe und 7 Proben in der MDS-Gruppe gemessen.

In der Kontrollgruppe ergab sich bei Verwendung von DAPI nach 30-minütiger Stimulation eine signifikante Zunahme des Zellkern-Durchmessers von 7,5 µm auf 9,9 µm ($p=4,4 \cdot 10^{-9}$) und nach 180-minütiger Stimulation eine Zunahme auf 14,4 µm ($p=1,9 \cdot 10^{-5}$). In der MDS-Gruppe war die Zunahme von 8,5 µm auf 9,9 µm nach 30-minütiger Stimulation geringer, aber ebenfalls signifikant ($p=0,01$). Eine weitere Zunahme auf 10,6 µm zeigte sich nach 180-minütiger Stimulation ($p=0,008$). Vergleicht man die beiden Gruppen miteinander, so zeigte sich in der MDS-Gruppe ein signifikant größerer Durchmesser der Zellkerne vor Stimulation ($p=0,05$). Nach 180-minütiger Stimulation war der Durchmesser allerdings in der Kontrollgruppe signifikant größer ($p=0,04$). Insgesamt war in der MDS-Gruppe eine geringere Zunahme des Zellkern-Durchmessers nach Stimulation mit PMA zu beobachten.

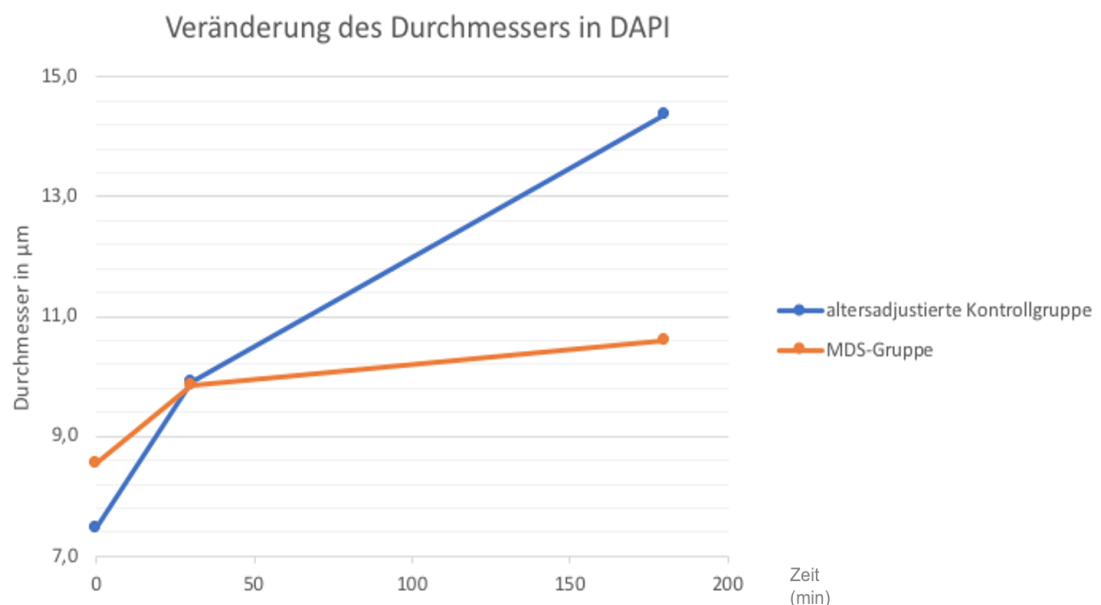


Abb. 3.7 Veränderung des Zellkerndurchmessers in der Fluoreszenzfärbung DAPI nach Stimulation mit PMA

Die Grafik zeigt die Veränderung des Zellkerndurchmessers im Vergleich der altersadjustierten Kontrollgruppe zur MDS-Gruppe während der 180-minütigen Stimulation mit PMA. In der MDS-Gruppe zeigt sich ein signifikant größerer Durchmesser vor ($p=0,05$) und nach ($p=0,04$) 180-minütiger Stimulation.

In der FITC-Färbung betrug der durchschnittliche Zelldurchmesser in der altersadjustierten Kontrollgruppe 10,3 μm . Nach 30-minütiger Stimulation zeigte sich eine starke Zunahme auf 24,6 μm ($p=2,4 \cdot 10^{-10}$). Nach 180-minütiger Stimulation konnte ein Rückgang auf 11,2 μm gemessen werden. In der MDS-Gruppe zeigte sich ebenfalls zuerst eine signifikante Zunahme des Durchmessers von 10 μm auf 18 μm ($p=1,1 \cdot 10^{-6}$) und dann nach 180-minütiger PMA-Stimulation eine Abnahme auf 9,6 μm . Im Vergleich zwischen altersadjustierter Kontrollgruppe und MDS-Gruppe findet sich vor Stimulation kein signifikanter Unterschied ($p=0,46$). Nach 30-minütiger Stimulation ergibt sich jedoch durch eine geringere Zunahme des Zelldurchmessers in der MDS-Gruppe ein signifikanter Unterschied ($p=0,001$). Nach 180-minütiger Stimulation zeigen beide Gruppen eine Abnahme des Durchmessers, der sich dann aber gerade nicht mehr signifikant voneinander unterscheidet ($p=0,06$).

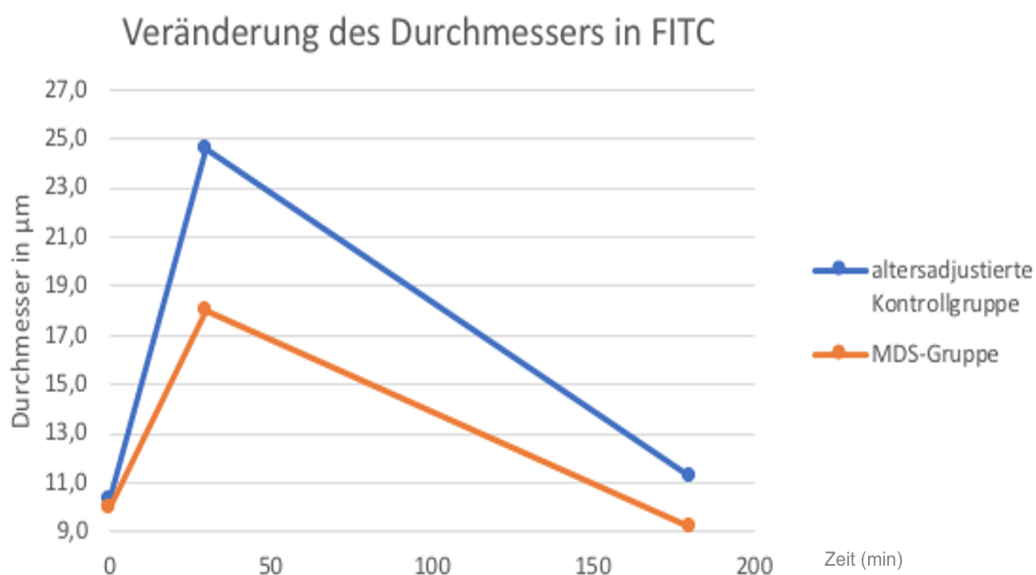


Abb. 3.8 Veränderung des Zelldurchmessers in der FITC-Fluoreszenzfärbung nach Stimulation mit PMA:

Die Grafik zeigt die Veränderung des Zelldurchmessers im Vergleich der altersadjustierten Kontrollgruppe zur MDS-Gruppe während der 180-minütigen Stimulation mit PMA. Nach 30-minütiger Stimulation mit PMA zeigt sich in der altersadjustierten Kontrollgruppe ein signifikant größerer Durchmesser ($p=0,001$), als in der MDS-Gruppe.

In der PE-Färbung zeigte sich für die altersadjustierte Kontrollgruppe ein Zelldurchmesser von 8 μm vor Stimulation, sowie eine leichte Zunahme auf 8,5 μm nach 30 Minuten und eine signifikante Zunahme auf 11,4 μm ($p=0,0009$) nach 180 Minuten Stimulation mit PMA. In der MDS-Gruppe lag der durchschnittliche Zelldurchmesser vor Stimulation bei

10,6 μm . Nach 30 Minuten zeigte sich eine Abnahme auf 8,2 μm und nach 180 Minuten eine geringfügige Zunahme auf 8,6 μm (die Abnahme im Vergleich zum Ausgangswert war nicht signifikant; $p=0,18$). Im Vergleich mit der altersadjustierten Kontrollgruppe zeigte sich in der MDS-Gruppe zunächst ein tendenziell größerer Durchmesser ($p=0,11$). Nach 180-minütiger Stimulation war er in der MDS-Gruppe jedoch signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe ($p=0,05$).

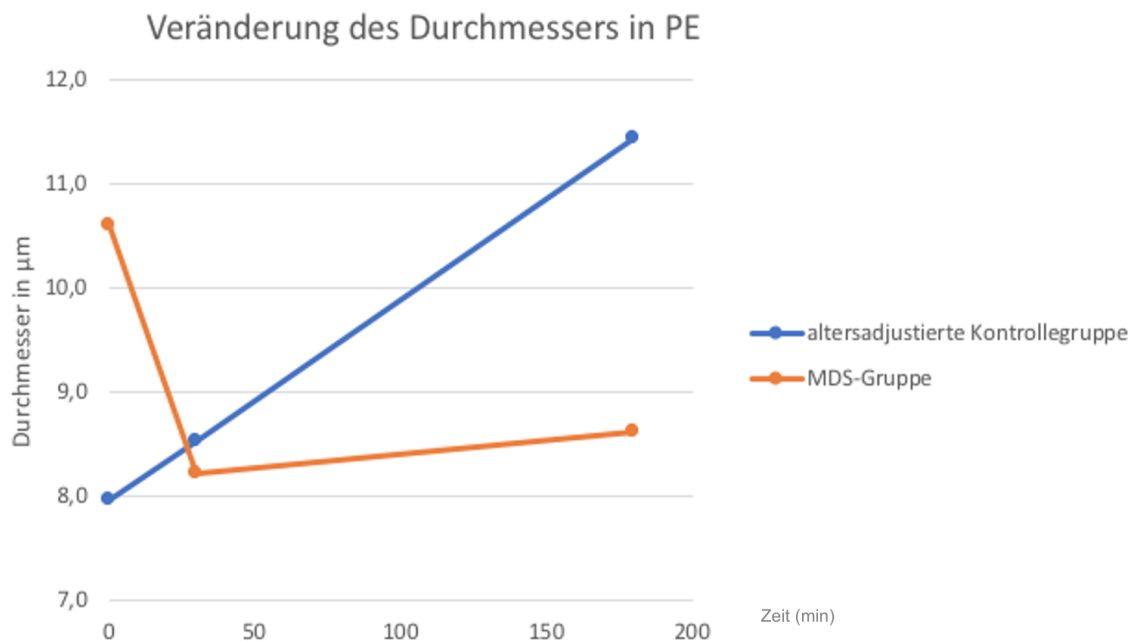


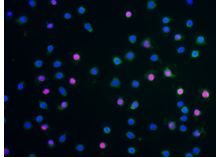
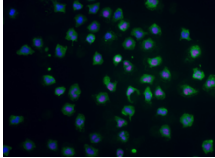
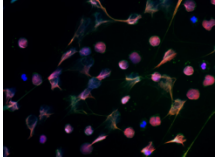
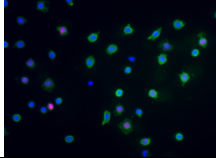
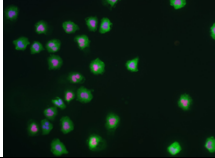
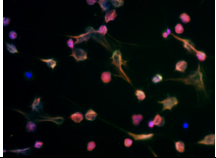
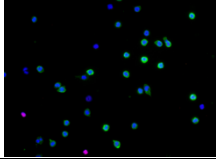
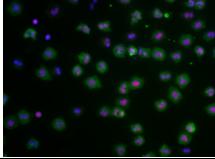
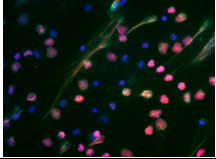
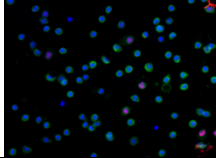
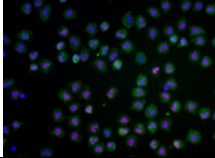
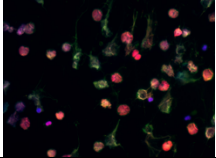
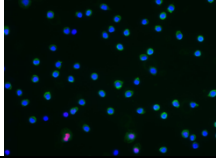
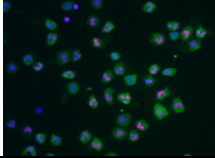
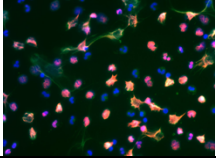
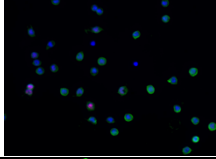
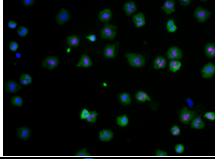
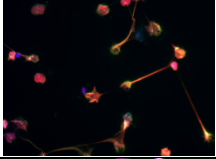
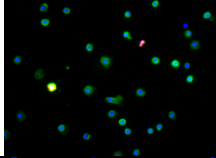
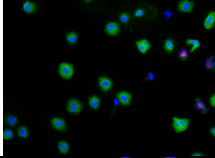
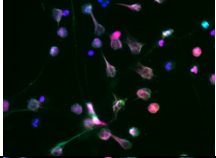
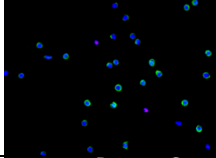
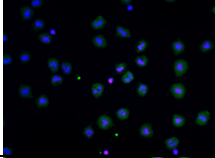
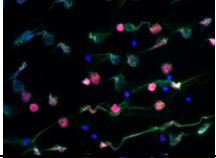
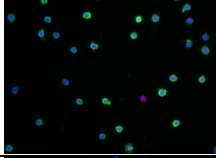
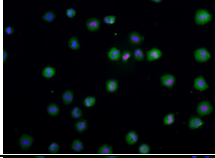
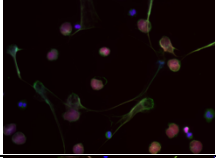
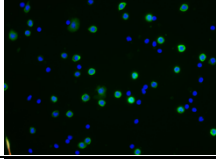
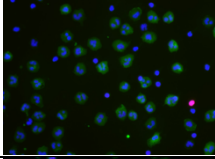
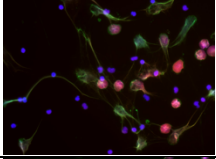
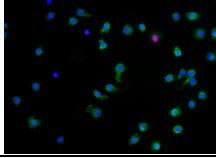
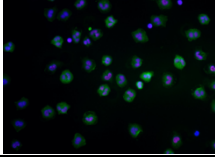
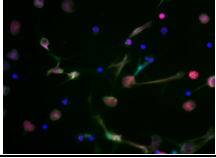
Abb. 3.9 Veränderung des Zelldurchmessers in der PE-Fluoreszenzfärbung nach Stimulation mit PMA

Die Grafik zeigt die Veränderung des Zellkerndurchmessers im Vergleich der altersadjustierten Kontrollgruppe zur MDS-Gruppe während der 180-minütigen Stimulation mit PMA. Nach Stimulation ist der Durchmesser in der altersadjustierten Kontrollgruppe signifikant größer als in der MDS-Gruppe ($p=0,05$). Die Größenunterschiede vor Stimulation unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

3.1.5 Bildmorphologische, semiquantitative Auswertung

Für die bildmorphologische Auswertung der *NETs* wurden mithilfe des Programms *Image J/Fiji* die mit unterschiedlichen Fluoreszenzen erzeugten Bilder elektronisch übereinandergelegt und jeweils ein repräsentativer Bildausschnitt ausgewählt. Bewertet wurde vor allem die Kernstruktur. Ausschlaggebend für die Bildung von *NETs* ist zunächst die Abnahme des Kern-Plasma-Größenverhältnisses und anschließend die Dekondensation des Chromatins mit Auflösung der Kernstruktur und schließlich die Abgabe des Chromatins und der neutrophilen Elastase in den extrazellulären Raum. Bewertet wurde die Bildung von *NETs* nach 180-minütiger Stimulation mittels PMA. Zu jedem Experiment wurde eine interne Standardkontrolle mitgeführt. Insgesamt konnten in der altersadjustierten Kontrollgruppe und in der MDS-Gruppe jeweils 9 Experimente ausgewertet werden.

3.1.5.1 Altersadjustierte Kontrollgruppe

Name	unstimuliert	30min PMA	180min PMA	NETs
#07				+++
Kontrolle				+++
#08				++
Kontrolle				+++
#09				++
Kontrolle				+++
#10				+++
Kontrolle				+++
#11				+++-++++
Kontrolle				++
#12				++

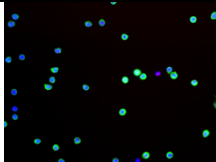
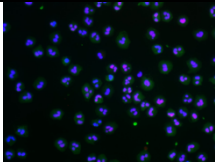
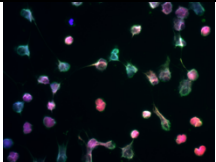
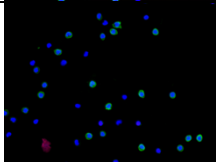
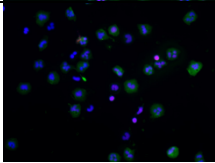
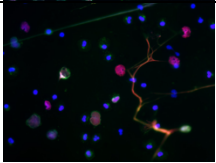
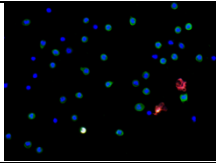
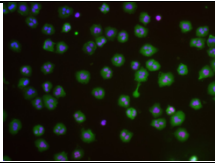
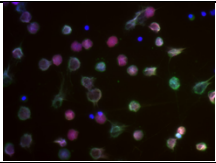
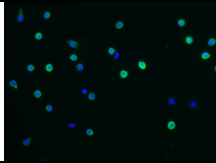
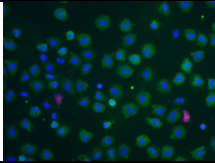
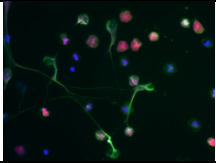
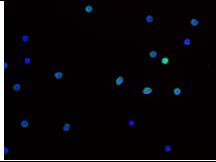
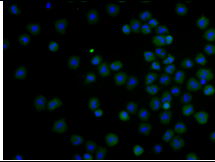
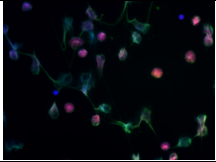
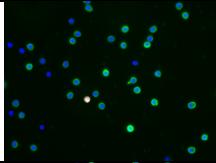
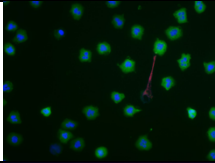
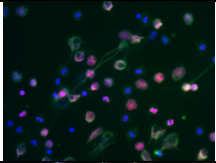
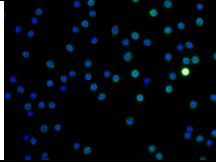
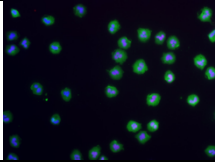
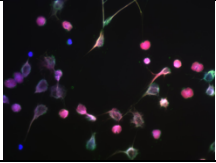
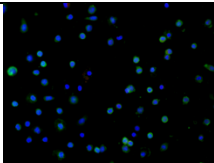
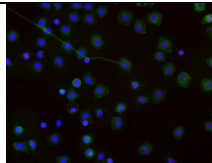
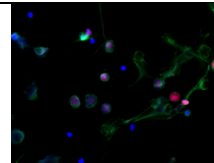
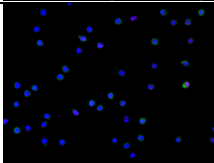
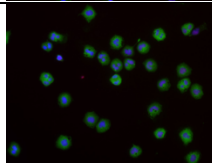
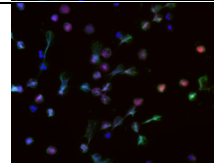
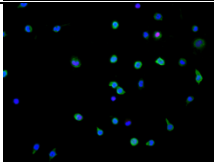
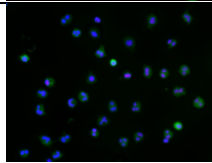
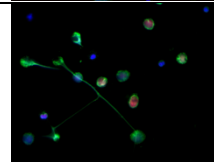
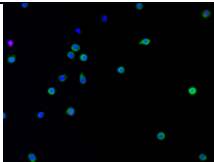
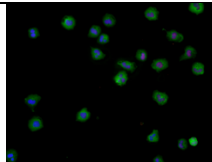
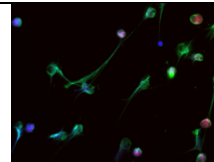
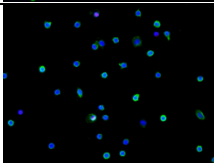
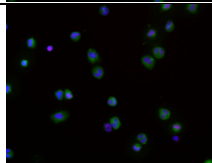
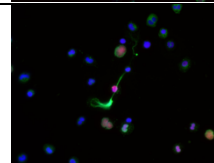
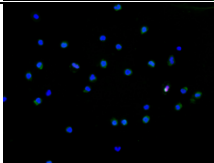
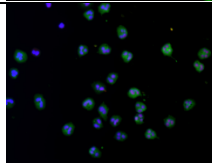
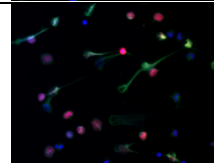
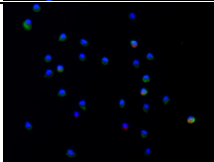
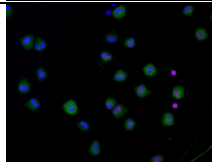
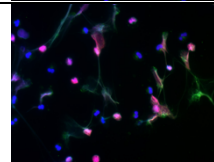
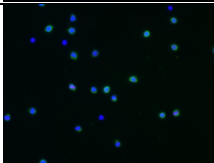
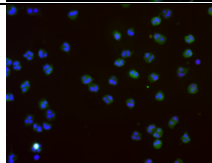
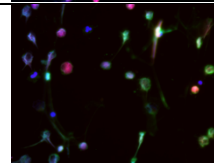
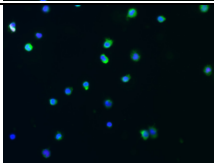
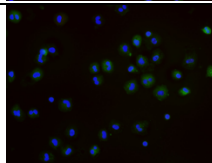
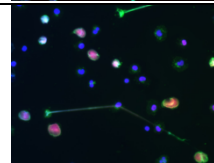
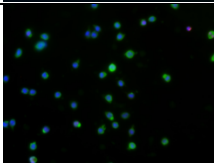
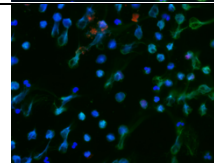
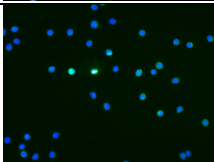
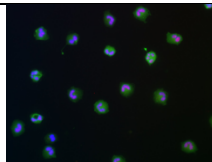
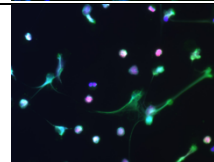
Kontrolle				+++
#13				+
Kontrolle				+++
#14				++
Kontrolle				+++
#15				++
Kontrolle				+++

Tabelle 3.1 Bildmorphologische, semiquantitative Auswertung der Bildung von *NETs* in der altersadjustierten Kontrollgruppe

Die Tabelle zeigt jeweils einen repräsentativen Ausschnitt der Fluoreszenzfärbung, nachdem die Aufnahmen in den einzelnen Fluoreszenzkanälen (DAPI, FITC und PE) übereinandergelegt wurden. Die Proben der altersadjustierten Kontrollgruppe sind mit einer Nummer versehen, während die Proben mit der Bezeichnung „Kontrolle“ als interner Standard dienen und vom selben Probanden simultan mit der Probe aus der altersadjustierten Kontrollgruppe aufgearbeitet wurden.

Die Anzahl der gebildeten *NETs* wurde jeweils mit der Vergabe von +- und - Zeichen bewertet: +++ > 80% der Kerne dekondensiert, +++-++ unter 80% aber deutlich über 50% der Kerne kondensiert, ++ ca. 50% der Kerne kondensiert, + deutlich unter 50% der Kerne kondensiert, - keine *NET*-Bildung, n.a. nicht auswertbar

3.1.5.2 MDS-Gruppe

Probe	unstimuliert	30' PMA	180' PMA	NETs
#16				++
Kontrolle				+++
#17				++
Kontrolle				+++
#18				+
Kontrolle				+++-+++
#19				++
Kontrolle				+++
#20				+
Kontrolle		n.a.		+++
#21				+++

Kontrolle				+++
#22				+
Kontrolle				+++
#24				-
Kontrolle				+++
#25				+
Kontrolle				+++

Tabelle 3.2 Bildmorphologische, semiquantitative Auswertung der Bildung von *NETs* in der MDS-Gruppe

Die Tabelle zeigt hier ebenfalls jeweils einen repräsentativen Ausschnitt der Fluoreszenzfärbung, nachdem die Aufnahmen in den einzelnen Fluoreszenzkanälen (DAPI, FITC und PE) übereinandergelegt wurden. Die Proben der MDS-Gruppe sind mit einer Nummer versehen, während die Proben mit der Bezeichnung „Kontrolle“ als interner Standard dienen und vom selben Probanden simultan mit der Probe aus der MDS-Gruppe aufgearbeitet wurden.

Die Anzahl der gebildeten *NETs* wurde jeweils mit der Vergabe von +- und - -Zeichen bewertet:+++ - > 80% der Kerne dekondensiert, +++-++ unter 80%, aber deutlich über 50% der Kerne kondensiert, ++ ca. 50% der Kerne kondensiert, + deutlich unter 50% der Kerne kondensiert, - keine *NET*-Bildung, n.a. nicht auswertbar

Die Auswertung ergab, dass die Bildung von *NETs* in der internen Standardkontrolle durchschnittlich mit 2,92 bewertet wurde. Die altersadjustierte Kontrollgruppe erreichte einen Wert von durchschnittlich 2,20 und die MDS-Gruppe einen Wert von 1,4. Somit zeigte sich in der bildmorphologischen Auswertung ebenfalls eine geringere Bildung von *NETs* in der MDS-Gruppe im Vergleich zur altersadjustierten Kontrollgruppe.

NETs	Interne Kontrollen	Altersadjustierte Kontrollgruppe	MDS-Gruppe
+++ (3 Punkte)	16	2	1
+++ - ++ (2,5 Punkte)	1	1	0
++ (2 Punkte)	1	5	3
+		1	4
-			1
Σ	52,5 Punkte (Ø 2,92)	19,5 Punkte (Ø 2,20)	13 Punkte (Ø 1,4)

Tabelle 3.3 Verteilung und durchschnittliche Bewertung der NET-Bildung

Die Tabelle zeigt die für die Auswertung der NET-Bildung vergebenen Punkte. Die vergebenen + - und - - Zeichen wurden in eine Punkteskala umgerechnet. In der untersten Zeile können die jeweilige Gesamtpunktzahl und das durchschnittlich erreichte Ergebnis abgelesen werden. Insgesamt zeigte sich durchschnittlich eine geringere Bildung von NETs in der MDS-Gruppe, als in der altersadjustierten Kontrollgruppe.

3.2 Durchflusszytometrische Analysen

3.2.1 Anteil an CD66+ Zellen nach Aufreinigung

Nachdem aus dem peripheren Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation die Granulozytenfraktion gewonnen wurde, betrug hierin der Anteil CD66b-positiver Zellen 88,5% in der altersadjustierten Kontrollgruppe und 68,1% in der MDS-Gruppe. Der Unterschied war statistisch signifikant ($p=0,01$). Zur Auswertung wurde zunächst die Autofluoreszenz der Probe bestimmt. Danach erfolgte die Positionierung der *Gates*.

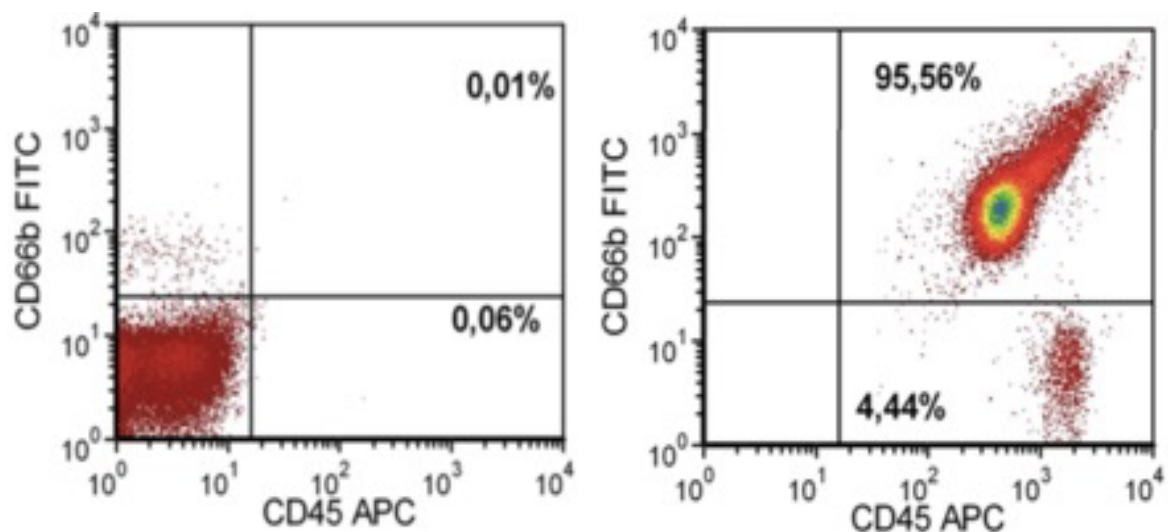


Abb. 3.10 Durchflusszytometrische Auswertung der Antikörperfärbung mit Anti-CD66b und Anti CD45

In der Grafik links ist die Autofluoreszenz der Zellen dargestellt. In der Grafik rechts befinden sich in dem Quadranten oben rechts die Zellen, die sowohl für die Färbung mit dem Antikörper anti-CD66b, als auch für die Färbung mit dem Antikörper anti-CD45 positiv sind. Dies macht hier insgesamt 95,56% der Zellen aus. Die Zellen im Quadranten unten rechts sind positiv für die Färbung mit anti CD45, aber exprimieren kein CD66b.

3.2.2 Anteil an MPO+ Zellen

Nach der Lyse wurden die Zellen zunächst anhand des *Sideward Scatter* und der CD45-Expression charakterisiert. Durch *Gating* der Granulozytenpopulation wurden die Zellen festgelegt, deren intrazelluläre Myeloperoxidase-Expression bestimmt werden sollte. Für den intrazellulären Nachweis der Myeloperoxidase ergab sich ein Mittelwert von 96,7% in der altersadjustierten Kontrollgruppe und 99,1% in der MDS-Gruppe.

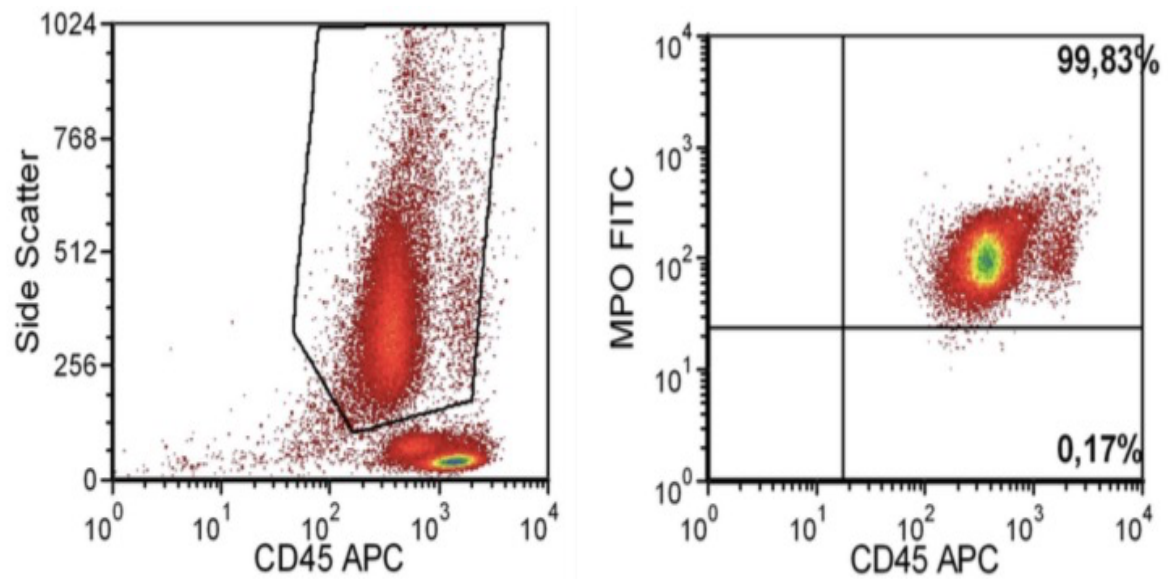


Abb. 3.11 Durchflusszytometrische Auswertung der Antikörperfärbung mit Anti-MPO und Anti-CD45

In der IGraphik links ist ein Gate auf die Granulozytenfraktion gelegt. Diese „eingegateten“ Zellen kommen in der Grafik rechts zur Darstellung. Hier ist Anti-MPO in der Fluoreszenz FITC auf der y-Achse aufgetragen. Alle Zellen im rechten oberen Quadranten konnten den Anti-MPO Antikörper binden.

3.2.3 Nachweis der Bildung von HOCl mit Hilfe von APF und HPF nach Stimulation mit H_2O_2

Durch Zugabe von H_2O_2 erhält die Myeloperoxidase ihr Substrat, dessen Umsetzung in HOCl die Bildung von NETs auslöst. Gemessen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der Farbstoffe APF und HPF, die indirekt auf die Menge des gebildeten Sauerstoffradikals schließen lässt. Um die Änderung des Signals (Δ APF und Δ HPF) zu bestimmen, wurde zunächst die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der unstimulierten Probe gemessen und später von der MFI nach Stimulation subtrahiert. Außerdem erfolgte die Auswertung der MFI nach Stimulation und zusätzlicher Gabe der Inhibitoren ABAH und AP.

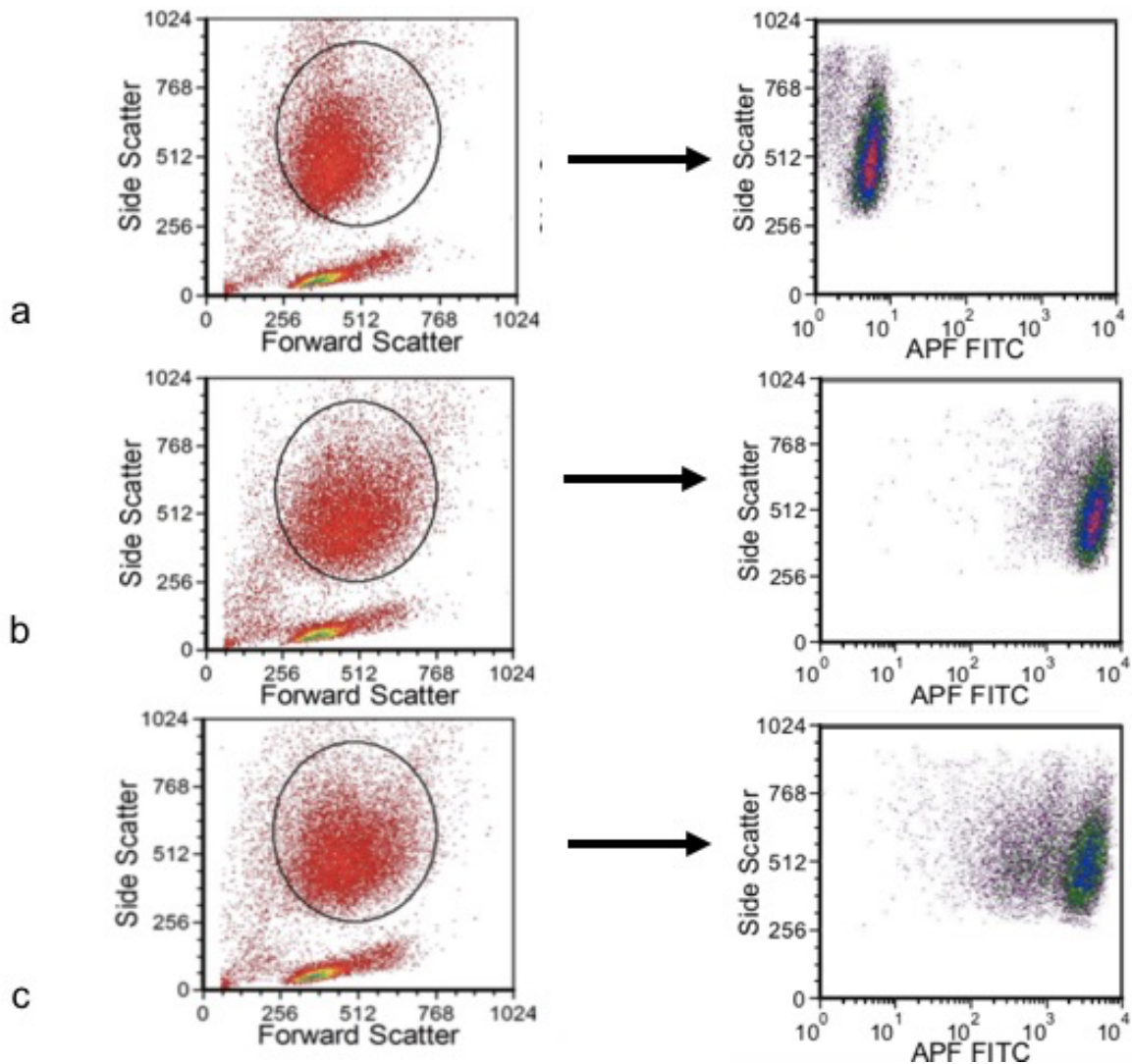


Abb 3.12 Durchflusszytometrische Auswertung der Bildung von HOCl mittels APF.

Der linke Teil der Grafik zeigt die Charakterisierung der Zellen gemäß *Forward scatter* und *Sideward scatter* sowie das *Gating* der Granulozyten. Im rechten Teil der Grafik ist die APF-Expression der Granulozyten auf der x-Achse dargestellt. a) zeigt die unstimulierten Zellen, b) die Zellen nach Stimulation mit H₂O₂, und c) die Zellen nach Stimulation und zusätzlicher Gabe der Inhibitoren ABAH/AP. Man sieht eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität von APF nach Stimulation. Nach Zugabe der Inhibitoren nimmt diese wieder ab, ist aber immer noch deutlich höher als im unstimulierten Zustand.

In der altersadjustierten Kontrollgruppe wurden 13 Proben untersucht. Hierbei ergab sich ein Δ APF von 2932 ± 826 und ein Δ APF + Inhibitoren von 2057 ± 788 . Durch Zugabe der Inhibitoren fiel der Anstieg der MFI somit signifikant geringer aus ($p=0,003$). In der MDS-Gruppe wurden 12 Proben analysiert. Hier betrug Δ APF 2549 ± 1027 und Δ APF + Inhibitoren 1407 ± 615 . Somit fiel auch innerhalb der MDS-Gruppe der Anstieg der MFI durch Zugabe der Inhibitoren signifikant geringer aus ($p=0,002$). Beim Vergleich zwischen Kontrollgruppe und MDS-Gruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Änderung der MFI nach Stimulation mit H₂O₂ ($p=0,31$). Nach Zugabe der Inhibitoren zeigte sich allerdings eine signifikant geringere Änderung der MFI in der MDS-Gruppe ($p=0,02$).

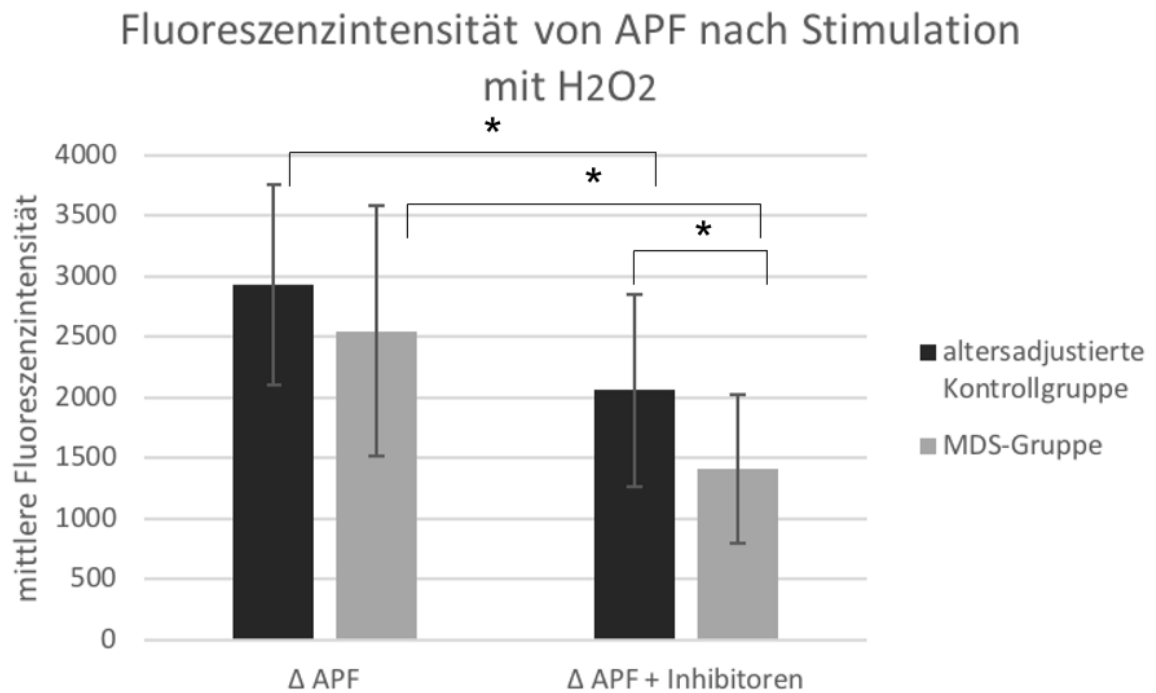


Abb. 3.13 Auswertung der Fluoreszenzintensität (ΔAPF) in der altersadjustierten Kontrollgruppe und der MDS-Gruppe nach Stimulation mit H₂O₂

Das ΔAPF bezeichnet die mittlere Fluoreszenzintensität von APF nach Stimulation mittels H₂O₂ und abzüglich der mittleren Fluoreszenzintensität vor Stimulation (Autofluoreszenz). Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der MFI, sowohl in der altersadjustierten Kontrollgruppe, als auch in der MDS-Gruppe nach Zugabe der Inhibitoren. Die MFI nach Zugabe der Inhibitoren unterscheidet sich ebenfalls zwischen der altersadjustierten Kontrollgruppe und der MDS-Gruppe signifikant. Das Sternchen (*) zeigt einen signifikanten Unterschied auf dem Signifikanzniveau $p < 0,05$ an.

Nach Stimulation mit H₂O₂ und Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes HPF ergab sich in der Kontrollgruppe nach Auswertung von 13 Proben ein ΔHPF von 959 ± 322 . Nach Zusatz von Inhibitoren betrug ΔHPF nur 151 ± 68 . Der Unterschied war hoch signifikant ($p = 4,4 \cdot 10^{-10}$). In der MDS-Gruppe wurde ein ΔHPF von 983 ± 376 gemessen. Mit Inhibition durch ABAH und AP ergab sich ein ΔHPF von 152 ± 99 . Auch hier war der Unterschied hoch signifikant ($p = 1,0 \cdot 10^{-7}$). Zwischen der Kontrollgruppe und der MDS-Gruppe war kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen ($p = 0,86$).

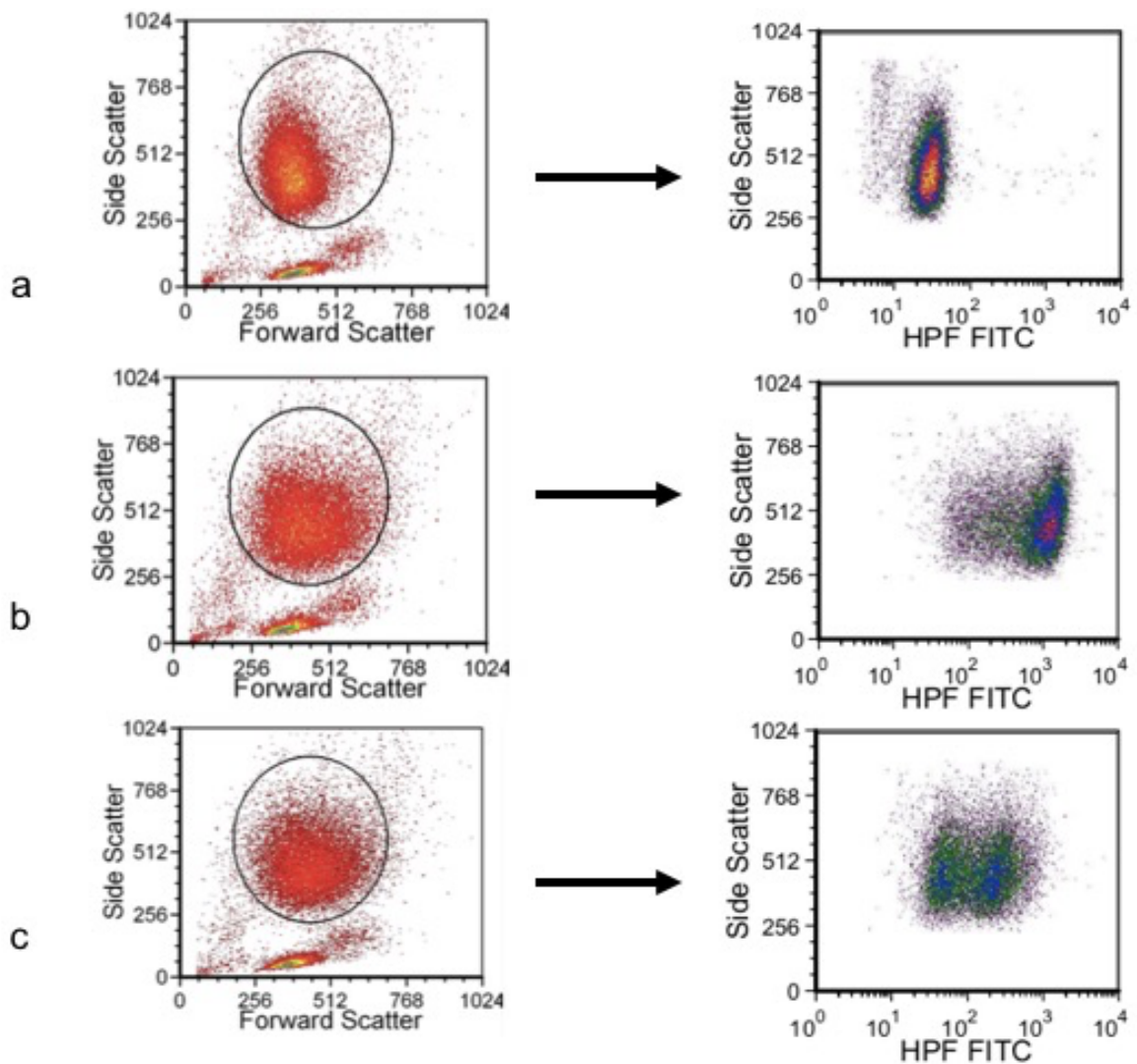


Abb. 3.14 Durchflusszytometrische Auswertung der Bildung von HOCl mittels HPF

Der linke Teil der Grafik zeigt die Charakterisierung der Zellen gemäß *Forward scatter* und *Sideward scatter* sowie das *Gating* der Granulozyten. Im rechten Teil der Grafik ist die HPF-Expression der Granulozyten auf der x-Achse dargestellt. a) zeigt die unstimulierten Zellen, b) die Zellen nach Stimulation mit H_2O_2 , und c) die Zellen nach Stimulation und zusätzlicher Gabe der Inhibitoren ABAH/AP. Man sieht eine Zunahme der Fluoreszenzintensität von HFP nach Stimulation. Nach Zugabe der Inhibitoren nimmt diese wieder ab, ist aber immer noch deutlich höher als im unstimulierten Zustand.

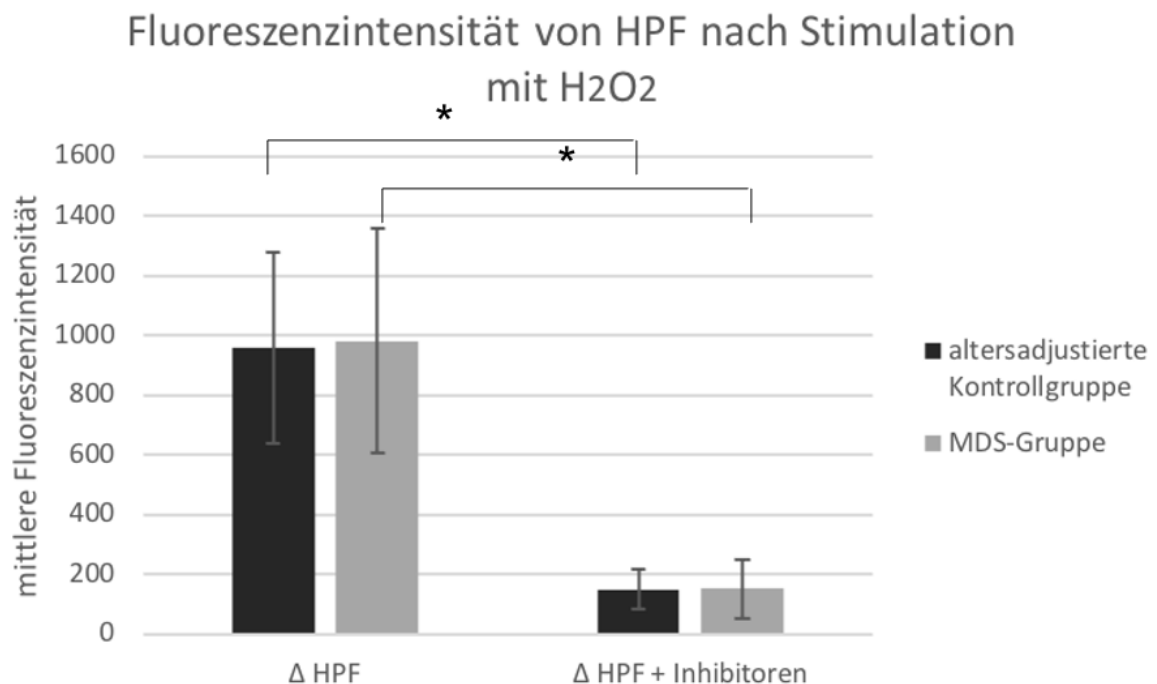


Abb. 3.15 Auswertung der Änderung der Fluoreszenzintensität (Δ HPF) in der altersadjustierten Kontrollgruppe und der MDS-Gruppe

Das Δ HPF bezeichnet die mittlere Fluoreszenzintensität von HPF nach Stimulation mittels H₂O₂ und abzüglich der mittleren Fluoreszenzintensität vor Stimulation (Autofluoreszenz). Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der MFI, sowohl in der altersadjustierten Kontrollgruppe, als auch in der MDS-Gruppe nach Zugabe der Inhibitoren. Die MFI nach Zugabe der Inhibitoren unterscheidet sich zwischen der altersadjustierten Kontrollgruppe und der MDS-Gruppe nicht. Das Sternchen (*) zeigt einen signifikanten Unterschied auf dem Signifikanzniveau $p < 0,02$ an

Durch die Differenz der beiden Messgrößen Δ APF und Δ HPF kann die Konzentration an gebildetem HOCl bestimmt werden. Für die altersadjustierte Kontrollgruppe ergab sich hierbei eine Differenz von 1969 ± 670 . Nach Zusatz von Inhibitoren betrug die Differenz 1918 ± 742 . In der MDS-Gruppe ergab die Subtraktion Δ APF– Δ HPF einen Wert von 1576 ± 864 . Nach Zugabe der Inhibitoren betrug die Differenz 1255 ± 551 . Somit zeigte sich weder innerhalb der altersadjustierten Kontrollgruppe ($p = 0,44$) noch innerhalb der MDS-Gruppe ($p = 0,20$) eine signifikante Änderung durch Stimulation mit H₂O₂. Auch der Vergleich der Gruppen untereinander erbrachte keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Reaktion auf die Stimulation mit H₂O₂ ($p = 0,20$). Die MDS-Gruppe reagierte jedoch signifikant stärker auf die Zugabe der Inhibitoren ($p = 0,01$).

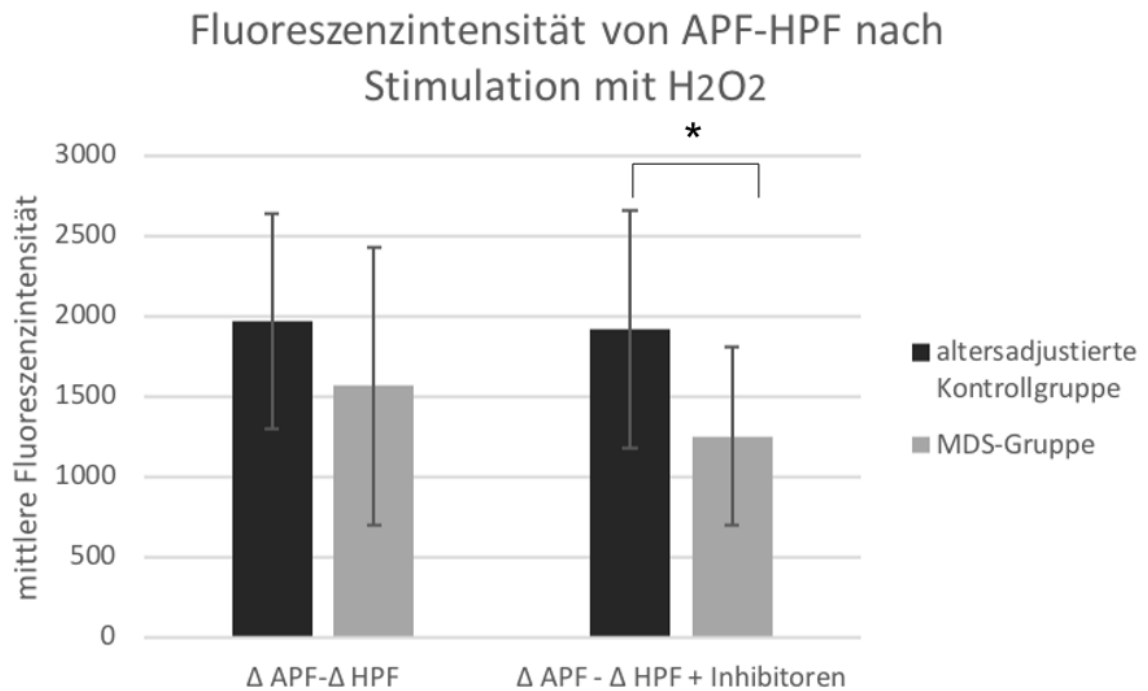


Abb. 3.16 Auswertung der HOCl-Bildung in der altersadjustierten Gruppe und der MDS-Gruppe nach Subtraktion von Δ APF und Δ HPF

Das Δ APF und Δ HPF bezeichnet die mittlere Fluoreszenzintensität von APF und HPF nach Stimulation mittels H₂O₂ und abzüglich der mittleren Fluoreszenzintensität vor Stimulation (Autofluoreszenz). Zur Ermittlung der mittleren Fluoreszenzintensität von Hypochlorid, als Produkt der Myeloperoxidase, werden diese beiden Werte voneinander abgezogen (Δ APF- Δ HPF). Es zeigt sich nach Zugabe der Inhibitoren ein signifikanter Unterschied der MFI zwischen der altersadjustierten Kontrollgruppe und der MDS-Gruppe. Das Sternchen (*) zeigt einen signifikanten Unterschied auf dem Signifikanzniveau $p < 0,02$ an.

3.2.4 Nachweis von H₂O₂ mittels DHR nach Stimulation mit PMA

Nach der Zugabe des Fluorochroms DHR, kann vor allem H₂O₂, aber auch eine Reihe anderer ROS als Nebenprodukte beim *oxidative burst*, eine Oxidation des Farbstoffes hervorrufen. Gemessen wurde in diesem Ansatz die MFI nach Aktivierung mit PMA und nach Zugabe der Inhibitoren ABAH/AP und DPI. In der altersadjustierten Kontrollgruppe ergab sich nach der Aktivierung mit PMA ein Δ DHR von 138 ± 41 . Δ DHR errechnet sich aus der Differenz zwischen Autofluoreszenz von DHR und der MFI nach Aktivierung mit PMA. Nach Zugabe der Inhibitoren ABAH/AP zeigte sich eine MFI von 71 ± 19 und nach Zugabe des Inhibitors DPI eine MFI von 13 ± 4 . Somit fand sich innerhalb der Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme der MFI, sowohl nach Zugabe der Inhibitoren ABAH/AP ($p=2,4 \cdot 10^{-6}$) als auch nach Zugabe des Inhibitors DPI ($p=1,3 \cdot 10^{-10}$). In der MDS-Gruppe betrug die MFI nach Stimulation mit PMA 116 ± 63 . Nach Zugabe der Inhibitoren ABAH/AP betrug die MFI 65 ± 18 und nach Zugabe des Inhibitors DPI 14 ± 6 . So zeigte sich innerhalb der MDS-Gruppe ebenfalls eine signifikante Abnahme der MFI nach Zugabe der Inhibitoren ABAH/AP ($p=0,01$) und DPI ($p=1,3 \cdot 10^{-5}$). Beim Vergleich der Kontrollgruppe mit der MDS-Gruppe war kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Ergebnisse nach Stimulation mit PMA ($p=0,29$) bzw. Zugabe der Inhibitoren ABAH/AP ($p=0,85$) und DPI ($p=0,55$) zu verzeichnen.

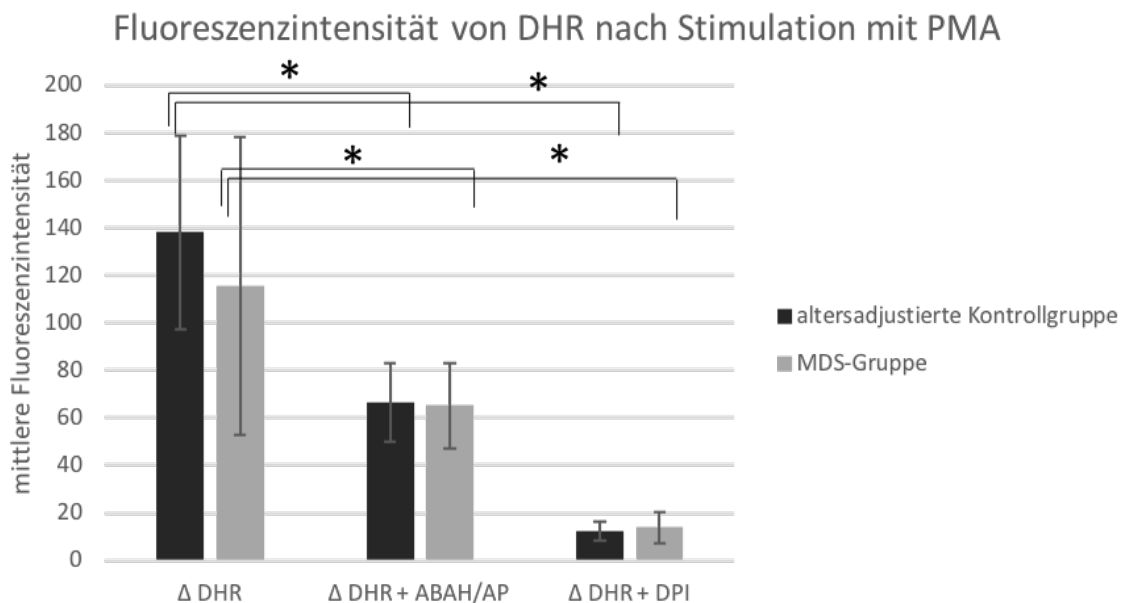


Abb. 3.17 mittlere Fluoreszenzintensität von DHR nach Stimulation mit PMA und Zugabe der Inhibitoren ABAH/AP bzw. DPI

Das Δ DHR bezeichnet die mittlere Fluoreszenzintensität von DHR nach Stimulation mittels PMA und abzüglich der mittleren Fluoreszenzintensität vor Stimulation (Autofluoreszenz). Es zeigt sich, sowohl in der al-

tersadjustierten Kontrollgruppe, als auch in der MDS-Gruppe eine signifikante Abnahme der MFI nach Zugabe der Inhibitoren ABAH/AP und des Inhibitors DPI. Signifikante Unterschiede in der MFI zwischen der altersadjustierten Kontrollgruppe und der MDS-Gruppe bestehen nicht. Das Sternchen (*) zeigt einen signifikanten Unterschied auf dem Signifikanzniveau $p < 0,02$ an

3.2.5 Nachweis von O^{2-} mittels HE nach Stimulation mit PMA

Für den Nachweis von O^{2-} wurde die MFI von HE nach Stimulation mit PMA und nach Zugabe des Inhibitors DPI gemessen. Für die Kontrollgruppe ergab sich hierbei nach Stimulation mit PMA und nach Abzug der Autofluoreszenz eine MFI von 95 ± 30 . Bei Zugabe des Inhibitors zeigte sich eine signifikant geringere MFI von 15 ± 6 ($p = 2,9 \cdot 10^{-11}$).

In der MDS-Gruppe fand sich nach Stimulation mit PMA eine MFI von 124 ± 44 . Bei Zugabe des Inhibitors zeigte sich ebenfalls eine signifikante geringere MFI von 21 ± 12 ($p = 1,2 \cdot 10^{-8}$). Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander, was die Ergebnisse nach Stimulation mit PMA ($p = 0,23$) oder Zugabe des Inhibitors ($p = 0,11$) betrifft.

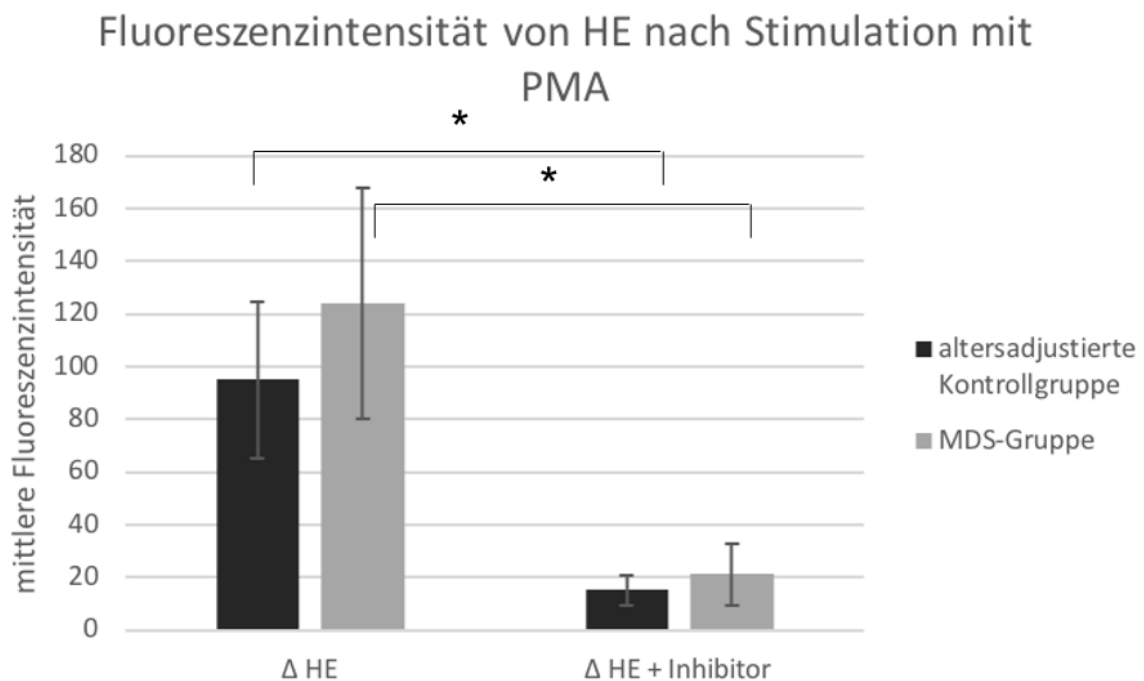


Abb. 3.18 Fluoreszenzintensität von HE nach Stimulation mit PMA

Das Δ HE bezeichnet die mittlere Fluoreszenzintensität von HE nach Stimulation mittels PMA und abzüglich der mittleren Fluoreszenzintensität vor Stimulation (Autofluoreszenz). Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der MFI vor und nach Zugabe des Inhibitors DPI in der altersadjustierten Kontrollgruppe und der MDS-Gruppe. Signifikante Unterschiede zwischen der altersadjustierten Kontrollgruppe und der MDS-Gruppe bestehen nicht. Das Sternchen (*) zeigt einen signifikanten Unterschied auf dem Signifikanzniveau $p < 0,02$ an.

3.2.6 Veränderung des Zelldurchmessers im *Forward Scatter* nach Stimulation mit PMA

Um die Veränderung des Zelldurchmessers, die sich nach Stimulation mit PMA bereits bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung gezeigt hat, auch durchflußzytometrisch zu erfassen, erfolgte eine Auswertung der Zellen im *Forward Scatter* vor und nach der Stimulation mit PMA und in Abhängigkeit von der Zugabe eines Inhibitors. Vor der Auswertung wurde ein *Cut off* - Wert festgelegt und nachfolgend der prozentuale Anteil an Zellen unterhalb und oberhalb dieses Wertes bestimmt.

In der Kontrollgruppe lagen vor Stimulation durchschnittlich $11\% \pm 5\%$ der Zellen oberhalb des *Cut off*. Nach Stimulation ergab sich ein Δ PMA von $47\% \pm 17,3\%$ als Differenz zwischen dem Ausgangswert und dem Wert nach Stimulation. Der Anstieg war statistisch hoch signifikant ($p=9,9 \cdot 10^{-9}$). Nach Zugabe der Inhibitoren ABAH/AP lagen $45\% \pm 14\%$ der Zellen oberhalb des *Cut off*; dies war keine statistisch signifikante Änderung ($p=0,34$). Nach Zugabe des Inhibitors DPI waren es $35\% \pm 12$ der Zellen; dies ist eine signifikante Verminderung ($p=0,02$).

In der MDS-Gruppe lagen vor Stimulation durchschnittlich $28\% \pm 16\%$ der Zellen oberhalb des *Cut off*. Nach Stimulation ergab sich ein Δ PMA von $27\% \pm 12\%$. Der Anstieg war statistisch nicht signifikant ($p=0,28$). Nach Inhibition mit ABAH/AP wurde ein Wert von $29\% \pm 13\%$ und nach Inhibition mit DPI ein Wert von $27\% \pm 8\%$ bestimmt. Die Verwendung der Inhibitoren wirkte sich nicht signifikant ($p=0,32$ ABAH/AP; $p=0,48$ DPI) auf die Veränderung der Zellgröße aus.

In der altersadjustierten Kontrollgruppe war der Anteil der Zellen, die ohne Stimulation oberhalb des *Cut off* lagen, signifikant kleiner als in der MDS-Gruppe ($p=0,0006$). Im Gegensatz dazu war nach Stimulation mit PMA die Anzahl der Zellen oberhalb des *Cut off* in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der MDS-Gruppe ($p=0,003$). Auch nach Inhibition mit ABAH/AP war der Anteil in der Kontrollgruppe noch signifikant höher ($p=0,02$), während sich nach Inhibition mit DPI kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen fand ($p=0,16$).

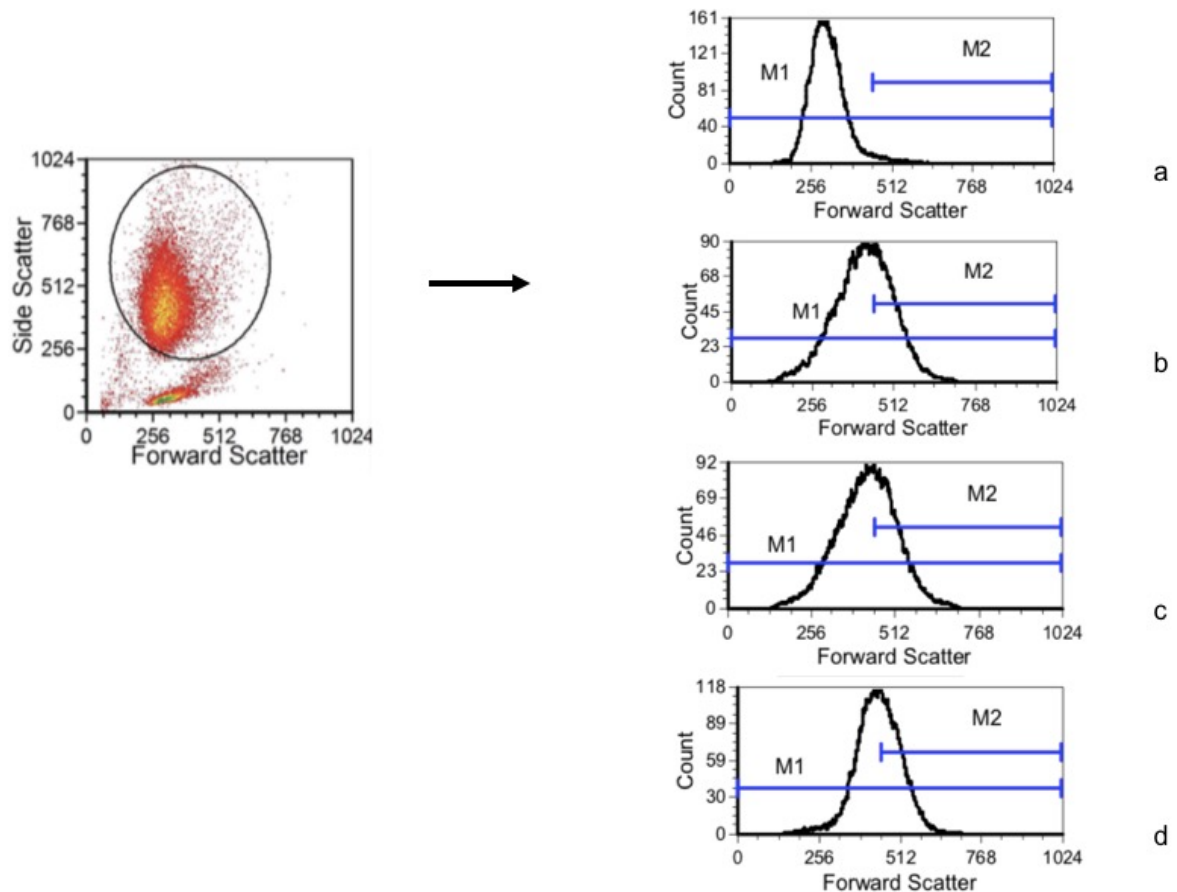


Abb. 3.19 Durchflusszytometrische Auswertung der Veränderung des Zelldurchmessers nach Stimulation mit PMA

In der Grafik auf der linken Seite ist ein *dot plot* Diagramm mit Auftragung des Seitwärtsstreulichtes (SSC) und des Vorwärtsstreulichtes (FSC) gezeigt. Anhand der Auftrennung der einzelnen Zellpopulationen nach ihrer Größe und Granularität kann die Granulozytenfraktion „gegatet“ werden. Die Diagramme auf der rechten Seite zeigen die Granulozytenfraktion a) vor Stimulation, b) nach Stimulation mit PMA, c) nach Stimulation mit PMA und Inhibition mittels ABAH/AP und d) nach Stimulation mit PMA und Inhibition mittels DPI. Der *Forward Scatter* bezeichnet hier die Zellgröße. Deren Veränderung vor und nach Stimulation/Inhibition wird über den Marker (M2) quantifiziert.

Betrachtet man im gleichen Versuchsansatz Zellen im *Forward Scatter*, die nicht mit PMA, sondern mit H_2O_2 stimuliert wurden, so konnte in keiner Gruppe vor und nach Stimulation oder Zugabe von Inhibitoren eine signifikante Veränderung des Zelldurchmessers nachgewiesen werden. In der altersadjustierten Kontrollgruppe betrug der Anteil der Zellen oberhalb des *Cut off* vor Stimulation $11\% \pm 6\%$, nach Stimulation mit H_2O_2 $9\% \pm 7\%$ und nach Zugabe von ABAH/AP $10\% \pm 6\%$. In der MDS-Gruppe betrug der Anteil $27\% \pm 1\%$ vor Stimulation, $10\% \pm 11\%$ nach Zugabe von H_2O_2 und $9\% \pm 6\%$ nach Zugabe der Inhibitoren.

3.2.7 Veränderung der Granularität im *Sideward Scatter* nach Stimulation mit H₂O₂

Zur Beurteilung der Veränderung der Granularität wurde wieder ein *Cut off*-Wert festgelegt und der Anteil an Zellen bestimmt, die diesen *Cut off* beim Experiment über- oder unterschritten. Analog zum vorher beschriebenen Versuch wird hier eine Veränderung betrachtet. Der *Cut off* wurde hoch angesetzt, da zunächst eine Abnahme der Granularität und damit eine Abnahme der Intensität der Seitwärtsstrahlung angenommen wurde.

In der Kontrollgruppe ergab sich für die unstimulierte Probe ein Mittelwert von 62%±12% der Zellen oberhalb der Markierung, d.h. im Bereich M2. Nach Stimulation mit H₂O₂ wurde ein Anteil von 29%±13% bestimmt. Die Differenz dieser beiden Werte ergibt ein Δ H₂O₂ von 32%±11% als Ausdruck der Anzahl an Zellen, deren Granularität abgenommen hat.. Nach Zugabe der Inhibitoren ABAH/AP sank der Anteil der Zellen, die eine morphologische Veränderung zeigten, auf Δ Inhibitor von 8%±6%. So zeigte sich zunächst nach Zugabe von H₂O₂ ein signifikanter Rückgang der Granularität unter den *Cut off*-Wert($p=9,4 \cdot 10^{-8}$).

Nach Zugabe des Inhibitors verschob sich die Kurve signifikant nach rechts ($p=1,8 \cdot 10^{-8}$).

In der MDS-Gruppe ergab sich für die unstimulierte Probe ein Anteil von 43%±20% der Zellen oberhalb der Markierung, also im Bereich M2. Nach Stimulation mit H₂O₂ sank der Anteil um 18%±8%. Somit ergab sich auch in der MDS-Gruppe zunächst ein signifikanter Rückgang der Zellen oberhalb des *Cut off* ($p=0,0003$). Nach Zugabe der Inhibitoren verminderte sich der Anteil der Zellen mit morphologischer Veränderung auf 9%±4%. Dies war statistisch signifikant ($p=0,0004$). Trotzdem zeigte sich der Unterschied in der MDS-Gruppe nicht so deutlich wie in der altersadjustierten Kontrollgruppe.

Insgesamt war nach Stimulation mit H₂O₂ die Abnahme des Seitwärtsstreulichtes als Zeichen der Abnahme der Granularität der Zellen in der MDS-Gruppe signifikant geringer als in der altersadjustierten Kontrollgruppe ($p=0,002$).

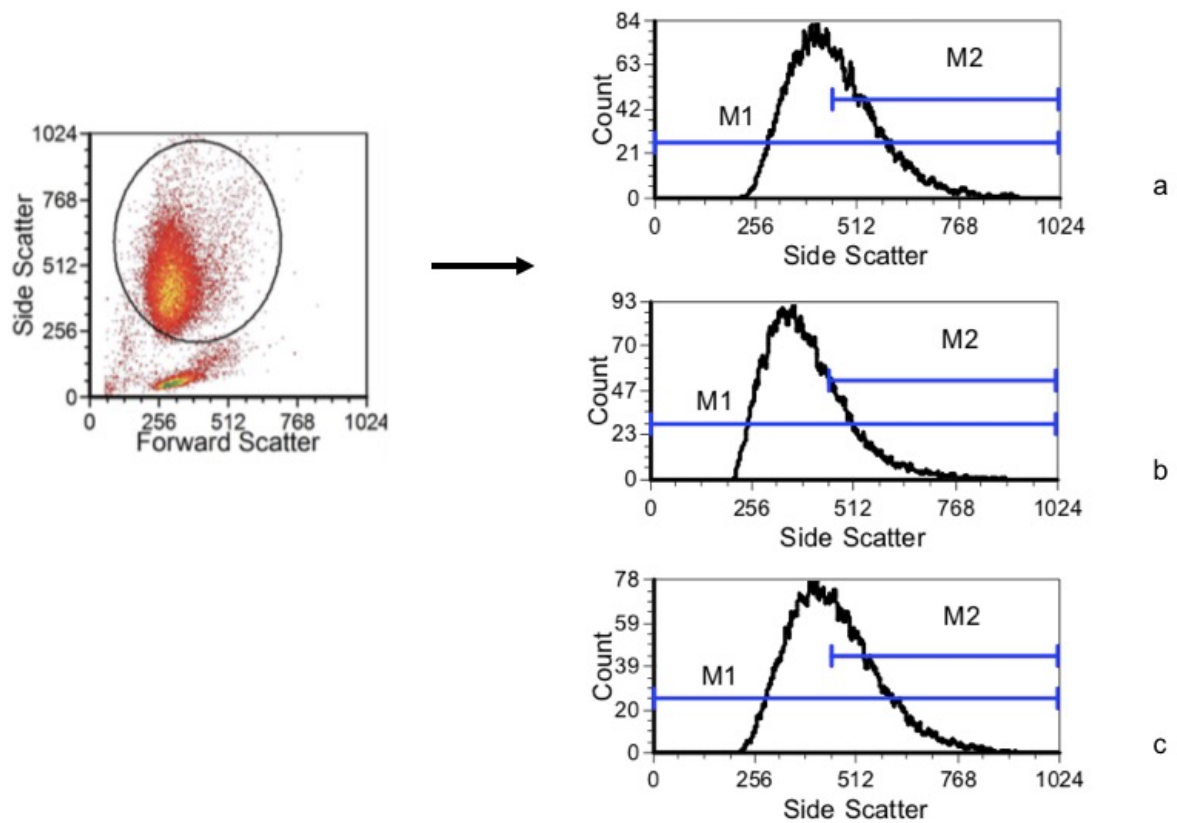


Abb. 3.20 Durchflusszytometrische Auswertung der Veränderung des Zelldurchmessers anhand des *Side Scatter* nach Stimulation mit H_2O_2

In der Grafik auf der linken Seite ist ein *dot plot* Diagramm mit Auftragung des Seitwärtsstreulichtes (SSC) und des Vorwärtsstreulichtes (FSC) gezeigt. Anhand der Auftrennung der einzelnen Zellpopulationen nach ihrer Größe und Granularität kann die Granulozytenfraktion „gegatet“ werden. Die Diagramme rechts zeigen die Granulozytenfraktion a) vor Stimulation, b) nach Stimulation mit H_2O_2 und c) nach Stimulation mit H_2O_2 und Inhibition mittels ABAH/AP. Der *Side Scatter* bezeichnet hier die Zellgranularität. Deren Veränderung vor und nach Stimulation/Inhibition wird über den Marker (M2) quantifiziert.

4. Diskussion

4.1. Fluoreszenzmikroskopische Analysen

2004 wurde die Bildung von *NETs* erstmalig von Brinkmann et al. beschrieben (Brinkmann et al., 2004). Es folgten weitere fluoreszenzmikroskopische Darstellungen und Auswertungen, die eine genauere Beschreibung des zeitlichen Ablaufs und der biochemischen Voraussetzungen ermöglichten. Im ersten Schritt der *NET*-Bildung erfolgt die Dekondensierung des Zellkerns, so dass sich das Kern-Plasma-Verhältnis zugunsten des Zellkerns verschiebt. Im weiteren zeitlichen Verlauf kommt es zur Auflösung der Zellmembran, so dass Chromatin und neutrophile Elastase in den Extrazellularraum entweichen. Färbt man den Zellkern und die neutrophile Elastase, so kann man im unstimulierten Zustand noch die Trennung zwischen dem Zellkern und der im Zytoplasma befindlichen neutrophilen Elastase erkennen. Nach Stimulation der *NET*-Bildung kommt es zu einer Größenzunahme des Zellkerns und der Zelle insgesamt, so dass fluoreszenzmikroskopisch die einzelnen Granula mit neutrophiler Elastase dargestellt werden können. Danach erfolgt die Auflösung der Kernmembran, so dass *DNA* und die neutrophile Elastase im Zytoplasma zunächst kolokalisiert sind und schließlich durch Auflösung der Zellmembran in den Extrazellularraum gelangen (Fuchs et al., 2007). Die Fragmentierung der Kernmembran und die Dekondensierung des Chromatins führen dazu, dass in der Folge Bindungsstellen für Anti-Histon-Antikörper freierwerden (Ermert et al., 2009). Die morphologischen Veränderungen, die mit messbaren Änderungen der Fluoreszenzintensität und der Beschaffenheit einzelner Zellkompartimente einhergehen, können zur strukturierten mikroskopischen Quantifizierung und Auswertung der Bildung von *NETs* herangezogen werden (Brinkmann et al., 2012).

In diesem ersten experimentellen Teil der Doktorarbeit wurden anhand solcher Merkmale mögliche Unterschiede in der Bildung von *NETs* zwischen Patienten mit MDS und einer altersadjustierten Kontrollgruppe untersucht. So erfolgte die Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität vor und nach Stimulation von neutrophilen Granulozyten, die Beschreibung der morphologischen Veränderung über die Zeit, die Auswertung der *NET*-Bildung mittels automatisierter mikroskopischer Datenauswertung, sowie eine zusätzliche visuelle Überprüfung anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.

4.1.1 Bei Patienten mit MDS findet sich eine erhöhte mittlere Fluoreszenzintensität von DAPI und FITC nach 180-minütiger Stimulation mit PMA

Im Rahmen der morphologischen Veränderungen während der *NET*-Bildung beschrieben Brinkmann et al. bereits eine Veränderung der Fluoreszenzintensität bei der Färbung von Chromatin und Histonen. In der Chromatinfärbung zeigte sich eine Abnahme der Fluoreszenzintensität, während es bei der Histonfärbung durch Dekondensierung des Chromatins und Freilegung der Histonbindungsstellen für den verwendeten Antikörper zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität kam (Brinkmann et al., 2012). In unseren Experimenten zeigte sich in beiden Gruppen ebenfalls eine Abnahme der Fluoreszenzintensität des mit DAPI angefärbten Chromatins. In der MDS-Gruppe war die Fluoreszenzintensität nach 180-minütiger Stimulation mit PMA im Vergleich zur altersadjustierten Kontrollgruppe allerdings noch signifikant höher. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Dekondensierung des Chromatins in der MDS-Gruppe schwächer ist und wahrscheinlich nicht vollständig durchgeführt werden kann. Bei der Anfärbung der Histon-Proteine konnte, wie durch Brinkmann et al. beschrieben, eine Zunahme der MFI über die Zeit beobachtet werden. In der MDS-Gruppe zeigte sich vor Stimulation eine signifikant niedrigere MFI. Nach 180-minütiger Stimulation unterschieden sich die beiden Gruppen nicht mehr signifikant voneinander. Die Unterschiede in der MFI vor Stimulation deuten auf eine stärkere Chromatinkondensierung von neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit MDS hin. Entsprechende dysplastische Veränderungen sind bei Patienten mit MDS beschrieben (Germing et al., 2012). Die fehlenden Unterschiede zwischen beiden Gruppen nach 180-minütiger Stimulation zeigen, dass die Dekondensierung des Chromatins in der MDS-Gruppe zwar schwächer ausfällt, aber zumindest eine ähnliche Bindung des Anti-Histon-Antikörpers ermöglicht.

Bei der Färbung der neutrophilen Elastase mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC zeigte sich in beiden Gruppen zunächst eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität nach 30 Minuten. Morphologisch kommt es in dieser Zeit zu einer Größenzunahme des Zellkerns, aber auch des gesamten Zellvolumens. Die Granula im Zytoplasma sind nun deutlicher zu erkennen. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität kann also durch eine stärkere räumliche Verteilung der neutrophilen Elastase erklärt werden und verläuft analog zur Abnahme der MFI bei der Chromatinfärbung, die durch Dekondensierung des Zellkerns und damit stärkere räumliche Trennung der einzelnen Bindungsstellen zu erklären ist. Nach 180-

minütiger Stimulation kommt es dann zu einem leichten, nicht signifikanten Wiederanstieg der MFI von FITC in der altersadjustierten Kontrollgruppe, so dass man hier insgesamt von einer signifikant verminderten MFI nach 180-minütiger Stimulation sprechen kann. In der MDS-Gruppe zeigt sich hingegen, dass nach dem initialen Abfall der MFI nach 30 Minuten eine wieder verstärkte MFI nach 180-minütiger Stimulation vorliegt. Auch hierdurch ergibt sich wieder ein Hinweis darauf, dass sich bestimmte dysplastische Veränderungen bei MDS, in diesem Fall die Granula betreffend, in einer eingeschränkten Freisetzung der neutrophilen Elastase bei der Bildung von *NETs* widerspiegeln.

4.1.2 Bei Patienten mit MDS kommt es zu einer geringeren Ausprägung von *NETs* nach 180-minütiger Stimulation mit PMA im Vergleich zur altersadjustierten Kontrollgruppe

Die Bildung von *NETs* wurde mithilfe zweier unterschiedlicher Verfahren beurteilt. Erstens wurde die von Brinkmann et al. beschriebene automatisierte mikroskopische Quantifizierung von *NETs* durchgeführt (Brinkmann et al., 2012). Hierbei wird durch eine Computersoftware in fünf repräsentativen Ausschnitten in der Chromatinfärbung und der Histonfärbung anhand der MFI die Anzahl an *NETs* ermittelt. Aufgrund der oben beschriebenen Dynamik während der *NET*-Bildung und der Zunahme der MFI bei der Chromatinfärbung erfolgte eine automatisierte Auswertung der Zellen vor und nach Stimulation. Wir konnten zeigen, dass nach 180-minütiger Stimulation mit PMA in der MDS-Gruppe signifikant weniger Zellen *NETs* bilden als in der altersadjustierten Kontrollgruppe.

Zweitens wurden *Overlays* der in den einzelnen Fluoreszenzkanälen aufgenommenen Bilder erstellt, die durch einen Untersucher hinsichtlich der Ausprägung der *NET*-Bildung in fünf Kategorien bewertet wurden. Zur Orientierung erfolgte der Vergleich mit einer internen Standardkontrolle. Als Standardkontrolle diente die Blutprobe einer gesunden Kontrollperson, die zeitgleich zur Patientenprobe entnommen wurde und parallel zu dieser alle Aufarbeitungs- und Färbeschritte durchlief. Auch bei dieser Auswertung konnten wir zeigen, dass die Ausprägung der *NET*-Bildung in der MDS-Gruppe deutlich geringer war als in der altersadjustierten Kontrollgruppe.

4.1.3 Bei MDS Patienten finden sich Unterschiede hinsichtlich der Zellgröße vor und nach Stimulation mit PMA im Vergleich zur altersadjustierten Kontrollgruppe

Bis hierhin konnten wir zeigen, dass in der MDS-Gruppe weniger Zellen *NETs* bilden als in der altersadjustierten Kontrollgruppe und dass Unterschiede in der Anfärbbarkeit verschiedener Zellstrukturen im zeitlichen Verlauf während der *NET*-Bildung bestehen. Um diese deutlicher zu charakterisieren, erfolgten weitere morphologische Auswertungen mit Hilfe der Computersoftware (ImageJ/Fiji), um sowohl den Durchmesser des Zellkerns, als auch den Durchmesser der gesamten Zelle zu erfassen.

Zunächst fiel auf, dass eine signifikant niedrigere Anzahl an Zellen in der MDS-Gruppe im Vergleich zur altersadjustierten Kontrollgruppe zur Verfügung stand. Vor der Stimulation wurde kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl festgestellt ($p=0,08$). Dies deutet darauf hin, dass der Unterschied nach der Stimulation nicht durch unzulängliche Präparation der Zellen, sondern durch erhöhte Vulnerabilität oder mangelhafte Adhäsionsmöglichkeit der MDS-Zellen auf dem Objektträger zu erklären ist.

Bei der Auswertung des Zellkerndurchmessers in der Chromatinfärbung konnte gezeigt werden, dass während des Experiments sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der MDS-Gruppe eine Zunahme des Durchmessers auftritt. Dies entspricht der Dekondensation des Zellkerns und damit dem erwarteten Ergebnis. Es fällt allerdings auf, dass sich der Durchmesser vor Stimulation in der MDS-Gruppe zunächst signifikant größer darstellt als in der altersadjustierten Kontrollgruppe; die Größenzunahme dann aber in der MDS-Gruppe geringer ausfällt, so dass nach 180-minütiger Stimulation der Durchmesser in der Kontrollgruppe signifikant größer ist. Auch in der Histonfärbung kann nach 180-minütiger Stimulation ein signifikant größerer Durchmesser in der Kontrollgruppe festgestellt werden. Dieser Befund unterstützt die Ergebnisse der Messung der mittleren Fluoreszenzintensität in 4.1.1 und gibt weitere Hinweise darauf, dass in der MDS-Gruppe bereits vor Stimulation Veränderungen im Zellkern bestehen und es nach der Stimulation zu einer geringeren Dekondensierung des Chromatins kommt.

Auch der geringere Zelldurchmesser nach Stimulation passt zu dem Befund einer insuffizienten *NET*-Bildung in der MDS-Gruppe, da sich bei MDS weniger *NET*-typische Strukturen ausbilden und das Chromatin nicht in den Extrazellarraum abgegeben wird. Betrachtet man den Zelldurchmesser in der Elastase-Färbung, so zeigt sich zunächst ein Anstieg des Zelldurchmessers nach 30 Minuten Stimulation mit PMA. Nach 180-minütiger

Stimulation kommt es dann zu einem Rückgang des Durchmessers auf nahezu den Ausgangswert. Nach 30-minütiger Stimulation fällt ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der MDS-Gruppe auf. Die Zunahme des Durchmessers ist in der MDS-Gruppe deutlich geringer. Ähnlich wie bei den Messungen der MFI für die neutrophile Elastase ergeben sich auch hier Hinweise auf eine Dysfunktion hinsichtlich der Organisation der Granula, was zu einer verminderten Ausbildung von *NETs* beitragen kann.

4.2 Durchflusszytometrische Analysen

Im zweiten Teil der Doktorarbeit geht es vor allem um die durchflusszytometrische Analyse von *NETs* und die damit verbundene Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Fuchs et al. beschrieben 2007, dass für die Ausbildung von *NETs* reaktive Sauerstoffspezies erforderlich sind. Zunächst stand die Aktivität des Enzyms NADPH-Oxidase im Fokus, da Granulozyten von Patienten mit *CGD* (*chronic granulomatous disease*), die einen Mangel oder sogar ein Fehlen der NADPH-Oxidase aufweisen, in vitro nicht in der Lage sind *NETs* auszubilden. Durch die Inhibition dieses Enzyms mit Hilfe von Diphenyleniodoniumchlorid (DPI) konnte die Bildung von *ROS* und damit auch von *NETs* unterdrückt werden (Fuchs et al., 2007). In weiteren Experimenten beschrieben Metzler et al. 2011, dass auch ein Fehlen der Myeloperoxidase die Ausbildung von *NETs* verhindert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung des Enzyms mittels ABAH bei gesunden Spendern die Bildung von *NETs* reduziert. Insgesamt konnte aber nur eine komplette Hemmung und nicht eine partielle Funktionseinschränkung die Ausbildung von *NETs* deutlich beeinflussen (Metzler et al., 2011). In diesem Teil der Doktorarbeit sollten *ROS* vor und nach Stimulation durchflusszytometrisch mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen quantifiziert werden. Dabei wurde das Superoxid-Anion als Produkt der NADPH-Oxidase, Hypochlorid als Produkt der Myeloperoxidase und Wasserstoffperoxid als Zwischenprodukt und Substrat der Myeloperoxidase betrachtet. Es kamen Hemmstoffe der NADPH-Oxidase und Myeloperoxidase zum Einsatz, um den Beitrag dieser Enzyme zur Produktion einzelner *ROS* zu erfassen. Verglichen wurde die Bildung von *ROS* in der MDS-Gruppe und der altersadjustierten Kontrollgruppe

4.2.1 In der MDS-Gruppe konnten weniger CD66+ Zellen aufgereinigt werden als in der altersadjustierten Kontrollgruppe

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden Granulozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Die Reinheit der Granulozytenfraktion wurde mit Hilfe von Anti-CD66b, einem hauptsächlich auf Granulozyten exprimiertem Antigen, kontrolliert. Hierbei ergab sich ein signifikant niedrigerer Granulozytenanteil in der MDS-Gruppe im Vergleich zur altersadjustierten Kontrollgruppe. Bereits in den Vorversuchen konnte durch Wiederholung der Prozedur eine Anhebung des Granulozytenanteils nur unter Inkaufnahme eines erheblichen Zellverlustes erreicht werden. Die schlechteren Ergebnisse bei der Aufreinigung der Blutproben der MDS-Gruppe sind wahrscheinlich auf eine höhere Fragilität und/oder ein verändertes Sedimentationsverhalten der zumeist dysplastischen Zellen im peripheren Blut zurückzuführen. Eine Ausweitung der Probenvorbereitung durch zusätzliche Zentrifugationsschritte hätte potentiell zu einer Verfälschung nachgeschalteter Experimente durch bevorzugte Anreicherung nicht-dysplastischer Zellen führen können. Erfreulicherweise stellte sich heraus, dass eine Intensivierung der Granulozytenanreicherung nicht erforderlich war. Durch das Anfärben der neutrophilen Elastase in den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen können neutrophile Granulozyten eindeutig von anderen Zellpopulationen unterschieden werden. Diese zusätzliche Kontrollmöglichkeit ergab, dass nach Aufbringen der Zellen auf die *Cover Slips*, sowie nach Färbung und mehrmaligem Waschen bei der mikroskopischen Betrachtung kein signifikanter Unterschied zwischen dem prozentualen Granulozytenanteil in der MDS-Gruppe und der Kontrollgruppe mehr bestand. Dies ist vermutlich auf die fehlende Adhäsionsfähigkeit anderer Zellpopulationen zurückzuführen.

4.2.2 Das Enzym Myeloperoxidase kann sowohl in der MDS-Gruppe als auch in der altersadjustierten Kontrollgruppe in über 95% der Granulozyten nachgewiesen werden

Mit der intrazellulären Antikörperfärbung gegen die Myeloperoxidase konnten wir zeigen, dass sowohl in der MDS-Gruppe als auch in der altersadjustierten Kontrollgruppe in mehr als 95% der neutrophilen Granulozyten das Enzym Myeloperoxidase nachweisbar ist. Damit ist aber noch nicht die Frage beantwortet, ob auch die Funktion des Enzyms erhalten ist.

4.2.3 Der Nachweis von HOCl zeigt nach Zugabe von Inhibitoren der Myeloperoxidase einen signifikanten Unterschied zwischen der MDS-Gruppe und der altersadjustierten Kontrollgruppe

Um Auskunft über die Funktion der Myeloperoxidase zu erhalten, wurde die Konzentration von Hypochlorid (HOCl) als Produkt der Enzymreaktion gemessen. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass HOCl essentiell für die Ausbildung von *NETs* ist. Durch die Substitution von HOCl nach Inhibition der Myeloperoxidase kann die *NET*-Bildung auch ohne die Aktivität des Enzyms erfolgen (Akong-Moore et al., 2012). Der Nachweis von HOCl erfolgte mittels zweier Fluoreszenzfarbstoffe, die in Kombination einen spezifischen Nachweis der HOCl-Konzentration erbringen. Beide Fluoreszenzfarbstoffe können durch das Hydroxylradikal ($\text{OH}^\cdot$) und Peroxynitrit (ONOO^-) oxidiert werden; dabei handelt es sich um Nebenprodukte, die beim *oxidative burst* durch unspezifische Reaktionen gebildet werden. Nur einer der Farbstoffe reagiert zusätzlich mit Hypochlorid. Durch Subtraktion der Ergebnisse erhält man die HOCl-Konzentration, ohne unspezifische Reaktionen berücksichtigen zu müssen (Setsukinai et al., 2003). Durch den Einsatz von Inhibitoren der Myeloperoxidase, wie 4-Aminobenzoic-hydrazid (ABAH) und 4-Dimethylamino-antipyrin (AP), sollte gezeigt werden, dass die Inhibition der Myeloperoxidase unsere Messergebnisse im Sinne einer Verminderung der HOCl-Produktion beeinflusst.

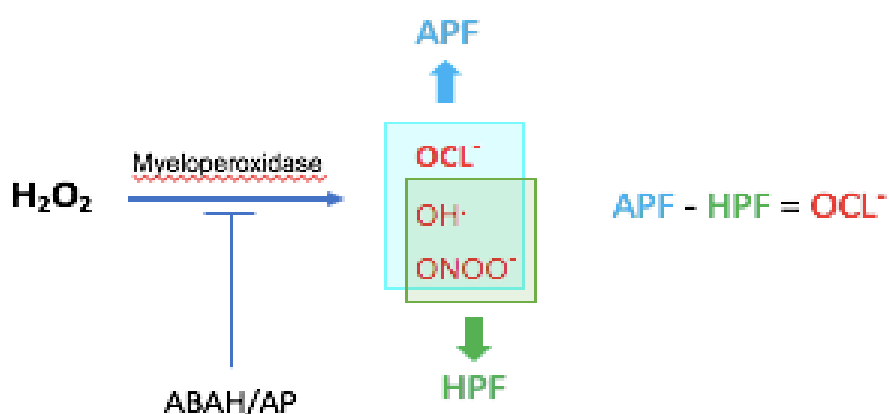


Abb. 4.1 Bestimmung der HOCl-Konzentration mittels APF und HPF

Die Myeloperoxidase produziert neben OCl^- weitere unspezifische Sauerstoffradikale als Nebenprodukte. Da der Fluoreszenzfarbstoff HPF kein OCl^- detektiert, kann die Hypochloridkonzentration rechnerisch durch die Subtraktion der beiden Fluoreszenzfarbstoffe voneinander bestimmt werden.

Mit unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass nach Aktivierung der Myeloperoxidase mittels H_2O_2 zunächst ein signifikanter Unterschied der MFI zwischen den beiden verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen APF und HPF besteht. So konnte für APF, der neben OH^- und ONOO^- auch HOCl detektiert, in der MDS-Gruppe und der altersadjustierten Kontrollgruppe eine signifikant höhere MFI nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass durch diese beiden Fluoreszenzfarbstoffe auch in unserem experimentellen Ansatz selektiv HOCl bestimmt werden kann. Nach Aktivierung durch H_2O_2 konnte für die einzelnen Farbstoffe und auch für die HOCl-Konzentration zunächst kein signifikanter Unterschied zwischen der MDS-Gruppe und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Nach Zugabe der Inhibitoren ABAH und AP zeigte sich jedoch eine signifikant geringere MFI für den Fluoreszenzfarbstoff APF in der MDS-Gruppe, wohingegen sich die MFI von HPF nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen unterschied. Auch die errechnete HOCl-Konzentration war in der MDS-Gruppe signifikant niedriger als in der altersadjustierten Kontrollgruppe. Dies zeigt zunächst, dass die Myeloperoxidase nicht vollständig, sondern nur partiell in ihrer Funktion inhibiert werden konnte. Der Befund, dass eine Inhibition der Myeloperoxidase die Konzentration von APF und nicht die von HPF in der MDS-Gruppe signifikant verändert, legt nahe, dass die Aktivität der Myeloperoxidase in der MDS-Gruppe stärker beeinflusst werden kann als in der altersadjustierten Kontrollgruppe. Dies deutet auf eine verminderte Enzymaktivität der Myeloperoxidase in der MDS-Gruppe hin. Um der Frage nachzugehen, warum erst durch partielle Inhibition des Enzyms diese Unterschiede zwischen der MDS-Gruppe und der altersadjustierten Kontrollgruppe messbar werden, muss die Arbeit von Metzler et al. 2011 herangezogen werden. In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass trotz einer partiellen Inhibition der Myeloperoxidase noch *NETs* ausgebildet werden und nur eine komplette MPO-Defizienz dazu führt, dass keine *NETs* mehr gebildet werden können (Metzler et al., 2011). Auch Parker et al. beschrieben, dass eine Restaktivität der Myeloperoxidase von 3% zur Ausbildung von *NETs* ausreichend ist (Parker and Winterbourn, 2012). Ab wann eine partielle Inhibition der Myeloperoxidase zu einer mit unserer Methode messbaren Verminderung der HOCl-Konzentration führt, konnte bislang noch nicht gezeigt werden. Unserer Meinung nach unterstützt dieses Ergebnis, auch im Hinblick auf die mikroskopisch nachgewiesene verminderte Ausbildung von *NETs* in der MDS-Gruppe, die Vermutung, dass eine verminderte Aktivität der Myeloperoxidase bei Patienten mit MDS einen wichtigen Faktor bei der

verminderten Bildung von *NETs* darstellt, aber nicht als alleinige Ursache angesehen werden kann.

4.2.4 Der Nachweis von reaktiven Sauerstoffradikalen mittels DHR unterscheidet sich nicht signifikant zwischen der MDS-Gruppe und der altersadjustierten Kontrollgruppe

Um weitere reaktive Sauerstoffspezies zu betrachten, die eine wichtige Rolle beim *oxidative burst* spielen, erfolgte nach Stimulation mit PMA die Messung von *ROS* mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DHR. DHR kann in Anwesenheit einer Katalase unter anderem durch O^{2-} , H_2O_2 , $HOCl$ und $ONOO^-$ oxidiert werden. Daher wird dieser Fluoreszenzfarbstoff häufig als allgemeiner Nachweis für die Stärke des *oxidative burst* verwendet. In unserem experimentellen Ansatz konnte durch den Einsatz von DHR gezeigt werden, dass sich die Stärke des durch PMA ausgelösten *oxidative burst* nicht zwischen der MDS-Gruppe und der altersadjustierten Kontrollgruppe unterscheidet. Mit Inhibitoren der Myeloperoxidase und NADPH-Oxidase konnte eine signifikante Verminderung der *ROS*-Bildung in beiden Gruppen erreicht werden. Die Inhibition der NADPH-Oxidase mittels DPI führte sogar zu einer stärkeren Reduktion der MFI als die Inhibition der Myeloperoxidase. Wir konnten zeigen, dass sich die Bildung von *ROS* nach Aktivierung mit PMA nicht signifikant zwischen der MDS-Gruppe und der altersadjustierten Kontrollgruppe unterscheidet. PMA erwies sich somit als geeignetes Stimulanz für die Aktivierung des *oxidative burst* in beiden Gruppen. Dass die Bildung von *ROS* in beiden Gruppen über die NADPH-Oxidase und die Myeloperoxidase erfolgt, schließen wir aus der Verminderung der *ROS*-Bildung bei Inhibition dieser Enzyme. Dies ist ein wichtiger Befund, da sowohl die Möglichkeit der Bildung von *ROS* über alternative Reaktionswege als auch die Möglichkeit der Aktivierung der *NET*-Bildung durch andere Stimulanzien beschrieben wurde.

4.2.5 Der Nachweis von reaktiven Sauerstoffradikalen mittels Hydroethidium unterscheidet sich nicht signifikant zwischen der MDS-Gruppe und der altersadjustierten Kontrollgruppe

Dass die Produktion von Superoxidanion durch die NADPH-Oxidase wichtig für die Bildung von *NETs* ist, ergab sich in der Vergangenheit sowohl durch experimentelle Ansätze mit Inhibitoren als auch durch Beobachtungen bei Patienten mit Mutationen in diesem Enzym. Die NADPH-Oxidase ist ein Schlüsselfaktor für die Fähigkeit *NETs* bilden zu können. Um der Frage nachzugehen, ob bei Patienten mit MDS eine verminderte Aktivität der

NADPH- Oxidase vorliegt, die zu einer verminderten Bildung von Superoxidanion und damit zu einer sekundären Funktionsstörung der Myeloperoxidase durch mangelndes Substrat führt, wurde die Bildung von Superoxidanionen experimentell überprüft.

Wir konnten zeigen, dass die MFI von Hydroethidium sich nicht signifikant zwischen der MDS-Gruppe und der altersadjustierten Kontrollgruppe unterscheidet. Durch die Zugabe des Inhibitors DPI war es in beiden Gruppen möglich, eine signifikante Reduktion der MFI zu erzielen. Hierdurch konnten wir zeigen, dass die Bildung von Superoxidanionen auf die Aktivität der NADPH-Oxidase zurückzuführen ist und nicht durch alternative Mechanismen erzielt wurde. Da die Produktion von Superoxidanionen in beiden Gruppen gleich stark war, lässt sich ein Defekt der NADPH-Oxidase als Ursache für eine verminderte *NET*-Bildung in der MDS-Gruppe weitgehend ausschließen.

4.2.6 Durchflusszytometrisch zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen der MDS-Gruppe und der altersadjustierten Kontrollgruppe hinsichtlich Zellgröße und Granularität der Zellen vor und nach Stimulation

Die bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen beobachteten Unterschiede hinsichtlich der morphologischen Veränderungen nach Stimulation mit PMA sollten mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen bestätigt und weiter charakterisiert werden. Zunächst konnten wir zeigen, dass sich im *Forward Scatter* die Größe der Zellen bei MDS-Patienten signifikant von der Größe der Zellen in der altersadjustierten Kontrollgruppe unterschied. Dies bestätigten die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung, bei der sich ebenfalls der Zelldurchmesser in der Chromatinfärbung vor Stimulation in der MDS-Gruppe größer darstellte als in der altersadjustierten Kontrollgruppe. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten weiterhin, dass es nach Stimulation der Zellen mittels PMA zu einer Umkehr der Größenverhältnisse kam und die Zellen in der Kontrollgruppe eine signifikant stärkere Zunahme der Zellgröße aufwiesen. In beiden Gruppen führte die Inhibition der Myeloperoxidase nicht zu einer signifikanten Veränderung der Zellgröße nach Stimulation, was darauf schließen lässt, dass es trotz Hemmung der Myeloperoxidase nach Stimulation durch PMA, zu morphologischen Veränderungen der Zellen kommen kann. In den PMA-stimulierten Zellen bewirkte die Inhibition der NADPH-Oxidase mittels DPI interessanterweise in der altersadjustierten Kontrollgruppe eine signifikante Verminderung der Zellgrößenzunahme, was sich in der MDS-Gruppe nicht beobachten ließ.

Zusätzlich betrachteten wir im *Sideward Scatter* die Veränderung der Granularität nach Aktivierung der Myeloperoxidase durch Zugabe von H_2O_2 . Sowohl in der MDS-Gruppe als auch in der altersadjustierten Kontrollgruppe war nach Stimulation mit H_2O_2 eine signifikante Abnahme der Granularität zu erkennen. In der MDS-Gruppe fiel die Abnahme der Granularität im Vergleich zur altersadjustierten Kontrollgruppe allerdings signifikant geringer aus. Durch Inhibition der Myeloperoxidase konnte in beiden Gruppen eine weniger starke Degranulierung der Zellen beobachtet werden. Es lässt sich also sagen, dass es durch die Aktivierung der Myeloperoxidase zu einer Degranulierung der Zellen kommt. Dies unterstützt die vorherigen Beobachtungen, dass bei Patienten mit MDS eine gestörte oder eingeschränkte Freisetzung von Granula vorliegt.

5. Schlussfolgerungen

Infektionen stellen bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen eine der häufigsten Todesursachen dar. Hierfür sind vor allem eine insuffiziente Produktion reifer Granulozyten durch vorzeitige Apoptose auf Ebene der Vorläuferzellen, aber auch eine Funktionsstörung und verkürzte Lebensdauer der ausreifenden Zellen verantwortlich. Bereits in den 70er und 80er Jahren konnte gezeigt werden, dass sich die zytomorphologischen Veränderungen bei MDS auch in einem funktionellen Defekt der neutrophilen Granulozyten widerspiegeln (Lehrer et al., 1972). So wurde bereits früh eine Verminderung der Myeloperoxidaseaktivität beschrieben (Breton-Gorius et al., 1975). Eine verminderte Phagozytoseaktivität in Verbindung mit dem Myeloperoxidasedefekt ließen schon damals die Vermutung aufkommen, dass dies nur einige Aspekte einer komplexeren Funktionsstörung der neutrophilen Granulozyten sind (Martin et al., 1983).

Seit der erstmaligen Beschreibung von *neutrophil extracellular traps* durch Zychlinski et al. 2005 weiß man, dass neutrophile Granulozyten nicht nur die Fähigkeit zur Phagozytose eindringender Fremdorganismen besitzen, sondern auch durch Auflösung der Kern- und Zellmembran und Abgabe von Chromatin und antimikrobiellen Substanzen in den Extrazellularraum an der Immunabwehr teilnehmen. Interessanterweise hat das dazu geführt, dass neutrophile Granulozyten seitdem nicht nur als Teil der angeborenen Immunabwehr gesehen werden, sondern ihnen auch die Eigenschaft zugeschrieben wird, komplexere immunregulatorische Vorgänge zu steuern. Eine unkontrollierte Aktivierung von *NETs* ist, wie man heute weiß, bei einer Reihe von Erkrankungen wie Thrombosen, Multiorganversagen, rheumatischen Erkrankungen (z. B. systemischer Lupus erythematoses) oder malignen Erkrankungen ein wichtiger Pathogenitätsfaktor (Brinkmann, 2018).

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass Granulozyten von Patienten mit MDS nach Stimulation mit PMA signifikant weniger *NETs* bilden als Granulozyten einer altersadjustierten Kontrollgruppe. Hierbei zeigen sich allerdings relevante Unterschiede in der Produktion von *ROS* durch die MPO erst nach partieller Inhibition dieses Enzyms. Es kann also vermutet werden, dass eine geringere Aktivität des Enzyms MPO vorliegt, dies jedoch nicht der alleinige Grund für eine schlechtere Funktion der neutrophilen Granulozyten ist. Auffällig sind vor allem die morphologischen Unterschiede zwischen den Probandengruppen vor und während der Stimulation mit PMA. Bei Patienten mit MDS kam es zu einer schwächeren Dekondensierung des Chromatins nach Stimulati-

on mit PMA. Weiterhin erhielten wir bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung Hinweise darauf, dass sich die Freisetzung der neutrophilen Elastase aus den im Zytoplasma befindlichen Granula zwischen MDS-Patienten und Kontrollgruppe unterscheidet und damit eine weitere potentielle Erklärung für die gestörte *NET*-Bildung bei Patienten mit MDS bietet.

In früheren Arbeiten zur Physiologie der *NET*-Bildung konnte gezeigt werden, dass das Enzym Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4), das die Umwandlung der Aminosäure Arginin in die Aminosäure Citrullin katalysiert, eine wichtige Rolle bei der Chromatindekondensierung von neutrophilen Granulozyten und der Bildung von *NETs* spielt (Neeli et al., 2008). Durch die Citrullinierung der H3-Histone kommt es zu einer Auflockerung des Chromatins, was dazu beiträgt, die charakteristische Freisetzung des Chromatins bei der Bildung von *NETs* zu ermöglichen. Der Verlust von positiver Ladung bei der Citrullinierung verbessert zudem die Bindung des Chromatins an die Bakterienzellwand. Eine Inhibition von PAD4 führt zu verminderter Bildung von *NETs* (Wang et al., 2009). Unser Befund, dass es bei Patienten mit MDS nach Aktivierung mit PMA zu einer schwächeren Dekondensierung des Chromatins kommt, könnte in Zusammenhang mit einer verminderten Citrullinierung durch verminderte Aktivität des Enzyms PAD4 stehen.

Zusammenfassend unterstützen unsere Untersuchungen die Auffassung, dass die erhöhte Infektanfälligkeit bei Patienten mit MDS auch durch eine Funktionsstörung der neutrophilen Granulozyten bedingt ist. Unsere Beobachtungen stehen im Einklang mit beschriebenen Anomalien, sowohl in Bezug auf zytomorphologische Veränderungen als auch hinsichtlich veränderter Enzymaktivitäten und beeinträchtigter Bildung von *ROS*.

Die eingeschränkte MPO-Aktivität und eine verminderte Bildung von *ROS* dürften aber nur eine partielle Erklärung für die Störung der *NET*-Bildung sein. *NETosis* als eine spezielle Form des Zelltods ist ein hochkomplexer Vorgang. Wir haben in dieser Arbeit Hinweise dafür gewonnen, dass eine Chromatindekondensierungsstörung einen Aspekt der gestörten *NET*-Bildung bei Patienten mit MDS darstellt. Um dies genauer zu beleuchten, sind weitere Untersuchungen notwendig. Da die Bildung von *NETs* große pathophysiologische Relevanz bei verschiedenen infektiologischen, inflammatorischen und thrombotischen Erkrankungen hat, wird zu ihrer Erforschung und Quantifizierung inzwischen auch künstliche Intelligenz in Form des „*Machine Learning*“ eingesetzt (Elsherif et al., 2019), wodurch weiterführende Analysen unterstützen werden können.

6. Literaturverzeichnis

Akong-Moore, K., Chow, O.A., von Köckritz-Blickwede, M., Nizet, V., 2012. Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation. *PloS One* 7, e42984.

Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., Zychlinsky, A., 2012. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 459–489.

Angelova, P.R., Abramov, A.Y., 2016. Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology. *Free Radic. Biol. Med.* 100, 81–85.

Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Raza, A., Levine, R.L., Neuberg, D., Ebert, B.L., 2011. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med.* 364, 2496–2506.

Bejar, R., Stevenson, K.E., Caughey, B.A., Abdel-Wahab, O., Steensma, D.P., Galili, N., Raza, A., Kantarjian, H., Levine, R.L., Neuberg, D., Garcia-Manero, G., Ebert, B.L., 2012. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 3376–3382.

Benarafa, C., Simon, H.-U., 2017. Role of granule proteases in the life and death of neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482, 473–481. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.086>

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., Sultan, C., 1982. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 51, 189–199.

Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R.A., Zychlinsky, A., Reichenbach, J., 2009. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillo-sis. *Blood* 114, 2619–2622.

Borregaard, N., 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33, 657–670. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>

Borregaard, N., Cowland, J.B., 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89, 3503–3521.

Bowen, D.T., 2013. Occupational and environmental etiology of MDS. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 26, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2013.09.002>

Breton-Gorius, J., Houssay, D., Vilde, J.L., Dreyfus, B., 1975. Partial myeloperoxidase deficiency in a case of preleukaemia. II. Defects of degranulation and abnormal bactericidal activity of blood neutrophils. *Br. J. Haematol.* 30, 279–288.

Brinkmann, V., 2018. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. *J. Innate Immun.* 10, 414–421.

Brinkmann, V., Goosmann, C., Kühn, L.I., Zychlinsky, A., 2012. Automatic quantification of in vitro NET formation. *Front. Immunol.* 3, 413.

Brinkmann, V., Laube, B., Abu Abed, U., Goosmann, C., Zychlinsky, A., 2010. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J. Vis. Exp. JoVE.*

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A., 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535.

Brinkmann, V., Zychlinsky, A., 2007. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 577–582.

Costa, D., Marques, A.P., Reis, R.L., Lima, J.L.F.C., Fernandes, E., 2006. Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 632–640.

Delgado-Rizo, V., Martínez-Guzmán, M.A., Iñiguez-Gutierrez, L., García-Orozco, A., Alvarado-Navarro, A., Fafutis-Morris, M., 2017. Neutrophil Extracellular Traps and its Implications in Inflammation: An Overview. *Front. Immunol.* 8, 81.

Dickinson, B.C., Chang, C.J., 2011. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat. Chem. Biol.* 7, 504–511.

Döring, Y., Soehnlein, O., Weber, C., 2017. Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis. *Circ. Res.* 120, 736–743.

Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>

Elsherif, L., Sciaky, N., Metts, C.A., Modasshir, M., Rekleitis, I., Burris, C.A., Walker, J.A., Ramadan, N., Leisner, T.M., Holly, S.P., Cowles, M.W., Ataga, K.I., Cooper, J.N., Parise, L.V., 2019. Machine Learning to Quantitate Neutrophil NETosis. *Sci. Rep.* 9, 16891.

Ermert, D., Urban, C.F., Laube, B., Goosmann, C., Zychlinsky, A., Brinkmann, V., 2009. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J. Innate Immun.* 1, 181–193.

Erpenbeck, L., Schön, M.P., 2016. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene.*

Estcourt, L.J., Stanworth, S.J., Hopewell, S., Doree, C., Trivella, M., Massey, E., 2016. Granulocyte transfusions for treating infections in people with neutropenia or neutrophil dysfunction. *Cochrane Database Syst. Rev.* 4, CD005339.

Fenaux, P., Mufti, G.J., Hellstrom-Lindberg, E., Santini, V., Finelli, C., Giagounidis, A., Schoch, R., Gattermann, N., Sanz, G., List, A., Gore, S.D., Seymour, J.F., Bennett, J.M., Byrd, J., Backstrom, J., Zimmerman, L., McKenzie, D., Beach, C., Silverman, L.R., International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group, 2009. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 10, 223–232.

Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., Zychlinsky, A., 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176, 231–241.

Fuchs, T.A., Brill, A., Wagner, D.D., 2012. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1777–1783.

Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., Kroemer, G., 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 14, 1237–1243.

Ganguly, B.B., Kadam, N.N., 2016. Mutations of myelodysplastic syndromes (MDS): An update. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 769, 47–62.

Gattermann, N., Finelli, C., Porta, M.D., Fenaux, P., Ganser, A., Guerci-Bresler, A., Schmid, M., Taylor, K., Vassilieff, D., Habr, D., Domokos, G., Roubert, B., Rose, C., EPIC study investigators, 2010. Deferasirox in iron-overloaded patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndromes: Results from the large 1-year EPIC study. *Leuk. Res.* 34, 1143–1150.

Gattermann, N., Kündgen, A., Kellermann, L., Zeffel, M., Paessens, B., Germing, U., 2013. The impact of age on the diagnosis and therapy of myelodysplastic syndromes: results from a retrospective multicenter analysis in Germany. *Eur. J. Haematol.* 91, 473–482.

Germing, U., Hildebrandt, B., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Valent, P., Fonatsch, C., Lübbert, M., Haase, D., Steidl, C., Krieger, O., Stauder, R., Giagounidis, A. a. N., Strupp, C., Kündgen, A., Mueller, T., Haas, R., Gattermann, N., Aul, C., 2005. Refinement of the international prognostic scoring system (IPSS) by including LDH as an additional prognostic variable to improve risk assessment in patients with primary myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia* 19, 2223–2231.

Germing, U., Strupp, C., Giagounidis, A., Haas, R., Gattermann, N., Starke, C., Aul, C., 2012. Evaluation of dysplasia through detailed cytomorphology in 3156 patients from the Düsseldorf Registry on myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 36, 727–734.

Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M.M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D., Ohyashiki, K., Toyama, K., Aul, C., Mufti, G., Bennett, J., 1997. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89, 2079–2088.

Greenberg, P.L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J.M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., Kantarjian, H., Kuendgen, A., Levis, A., Malcovati, L., Cazzola, M., Cermak, J., Fonatsch, C., Le Beau, M.M., Slovak, M.L., Krieger, O., Luebbert, M., Maciejewski, J., Magalhaes, S.M.M., Miyazaki, Y., Pfeilstöcker, M., Sekeres, M., Sperr, W.R., Stauder, R., Tauro, S., Valent, P., Vallespi, T., van de Loosdrecht, A.A., Germing, U., Haase, D., 2012. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 120, 2454–2465.

Houghton, A.M., Rzymkiewicz, D.M., Ji, H., Gregory, A.D., Egea, E.E., Metz, H.E., Stolz, D.B., Land, S.R., Marconcini, L.A., Kliment, C.R., Jenkins, K.M., Beaulieu, K.A., Mouded, M., Frank, S.J., Wong, K.K., Shapiro, S.D., 2010. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat. Med.* 16, 219–223.

Kettle, A.J., Gedy, C.A., Hampton, M.B., Winterbourn, C.C., 1995. Inhibition of myeloperoxidase by benzoic acid hydrazides. *Biochem. J.* 308 (Pt 2), 559–563.

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

Kuendgen, A., Gattermann, N., 2007. Valproic acid for the treatment of myeloid malignancies. *Cancer* 110, 943–954.

Lanini, L.L.S., Prader, S., Siler, U., Reichenbach, J., 2017. Modern management of phagocyte defects. *Pediatr. Allergy Immunol.* 28, 124–134.

Lehrer, R.I., Goldberg, L.S., Apple, M.A., Rosenthal, N.P., 1972. Refractory megaloblastic anemia with myeloperoxidase-deficient neutrophils. *Ann. Intern. Med.* 76, 447–453.

List, A., Dewald, G., Bennett, J., Giagounidis, A., Raza, A., Feldman, E., Powell, B., Greenberg, P., Thomas, D., Stone, R., Reeder, C., Wride, K., Patin, J., Schmidt, M., Zeldis, J., Knight, R., Myelodysplastic Syndrome-003 Study Investigators, 2006. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N. Engl. J. Med.* 355, 1456–1465.

Löffler, G., Petrides, P.E., Heinrich, P.C. (Eds.), 2007. Biochemie und Pathobiochemie [+ online specials], 8., völlig neu bearb. Aufl. ed, Springer-Lehrbuch. Springer Medizin, Heidelberg.

Malcovati, L., Germing, U., Kuendgen, A., Della Porta, M.G., Pascutto, C., Invernizzi, R., Giagounidis, A., Hildebrandt, B., Bernasconi, P., Knipp, S., Strupp, C., Lazzarino, M., Aul, C., Cazzola, M., 2007. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 3503–3510.

Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S., 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 519–531.

Martin, S., Baldock, S.C., Ghoneim, A.T., Child, J.A., 1983. Defective neutrophil function and microbicidal mechanisms in the myelodysplastic disorders. *J. Clin. Pathol.* 36, 1120–1128. h

Metzler, K.D., Fuchs, T.A., Nauseef, W.M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., Wahn, V., Papayannopoulos, V., Zychlinsky, A., 2011. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 117, 953–959. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-290171>

Metzler, K.D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., Papayannopoulos, V., 2014. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep.* 8, 883–896.

Nachtkamp, K., Stark, R., Strupp, C., Kündgen, A., Giagounidis, A., Aul, C., Hildebrandt, B., Haas, R., Gattermann, N., Germing, U., 2016. Causes of death in 2877 patients with myelodysplastic syndromes. *Ann. Hematol.* 95, 937–944.

Nathan, C., 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 173–182.

Neeli, I., Khan, S.N., Radic, M., 2008. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 1895–1902.

Neukirchen, J., Schoonen, W.M., Strupp, C., Gattermann, N., Aul, C., Haas, R., Germing, U., 2011. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leuk. Res.* 35, 1591–1596.

Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Malcovati, L., Tauro, S., Gundem, G., Van Loo, P., Yoon, C.J., Ellis, P., Wedge, D.C., Pellagatti, A., Shlien, A., Groves, M.J., Forbes, S.A., Raine, K., Hinton, J., Mudie, L.J., McLaren, S., Hardy, C., Latimer, C., Della Porta, M.G., O'Meara, S., Ambaglio, I., Galli, A., Butler, A.P., Walldin, G., Teague, J.W., Quek, L., Sternberg, A., Gambacorti-Passerini, C., Cross, N.C.P., Green, A.R., Boulton, J., Vyas, P., Hellstrom-Lindberg, E., Bowen, D., Cazzola, M., Stratton, M.R., Campbell, P.J., Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium, 2013. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 122, 3616–3627; quiz 3699.

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

Parker, H., Winterbourn, C.C., 2012. Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.* 3, 424.

Pedersen-Bjergaard, J., Christiansen, D.H., Andersen, M.K., Skovby, F., 2002. Causality of myelodysplasia and acute myeloid leukemia and their genetic abnormalities. *Leukemia* 16, 2177–2184.

Pedersen-Bjergaard, J., Philip, P., Larsen, S.O., Andersson, M., Daugaard, G., Ersbøll, J., Hansen, S.W., Hou-Jensen, K., Nielsen, D., Sigsgaard, T.C., 1993. Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Cytogenetic characteristics of 115 consecutive cases and risk in seven cohorts of patients treated intensively for malignant diseases in the Copenhagen series. *Leukemia* 7, 1975–1986.

Pilsczek, F.H., Salina, D., Poon, K.K.H., Fahey, C., Yipp, B.G., Sibley, C.D., Robbins, S.M., Green, F.H.Y., Surette, M.G., Sugai, M., Bowden, M.G., Hussain, M., Zhang, K., Kubes, P., 2010. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 7413–7425.

Sarvothaman, S., Undi, R.B., Pasupuleti, S.R., Gutti, U., Gutti, R.K., 2015. Apoptosis: role in myeloid cell development. *Blood Res.* 50, 73–79.

Schroeder, T., Geyh, S., Germing, U., Haas, R., 2016. Mesenchymal stromal cells in myeloid malignancies. *Blood Res.* 51, 225–232.

Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H.J., Nagano, T., 2003. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J. Biol. Chem.* 278, 3170–3175.

Thiel, H., Diem, H., Haferlach, T., 2002. Taschenatlas der Hämatologie: morphologische und klinische Diagnostik für die Praxis, 5., vollst. überarb. Aufl. ed, Praxiswissen Hämatologie. Thieme, Stuttgart.

Vardiman, J.W., Harris, N.L., Brunning, R.D., 2002. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100, 2292–2302.

Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., Bloomfield, C.D., 2009. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937–951.

Walrand, S., Valeix, S., Rodriguez, C., Ligot, P., Chassagne, J., Vasson, M.-P., 2003. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 331, 103–110.

Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S.A., Allis, C.D., Coonrod, S.A., 2009. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* 184, 205–213.

Wessels, I., Jansen, J., Rink, L., Uciechowski, P., 2010. Immunosenescence of Polymorphonuclear Neutrophils. *Sci. World J.* 10, 145–160.

Winterbourn, C.C., Kettle, A.J., 2013. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 642–660.

Yipp, B.G., Kubes, P., 2013. NETosis: how vital is it? Blood 122, 2784–2794.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Hämatopoese	6
Abbildung 1.2	neutrophile Granulozyten	7
Abbildung 1.3	<i>Neutrophil extracellular traps</i>	10
Abbildung 1.4	morphologische Veränderung von neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit PMA	11
Abbildung 1.5	Bildung von Hypochlorid aus O ₂	14
Abbildung 2.1	Dichtegradientenzentrifugation	21
Abbildung 2.2	Darstellung der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe	24
Abbildung 2.3	Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers	26
Abbildung 2.4	Schematische Darstellung der ROS-Produktion	28
Abbildung 2.5	Gating der Granulozytenpopulation	31
Abbildung 2.6	Durchflusszytometrische Charakterisierung von NETs	32
Abbildung 3.1	Mittlere Fluoreszenzintensität der altersadjustierten Kontrollgruppe	33
Abbildung 3.2	Mittlere Fluoreszenzintensität der MDS-Gruppe	34
Abbildung 3.3	Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität zwischen der altersadjustierten Kontrollgruppe und der MDS-Gruppe	35
Abbildung 3.4	Verlauf der MFI im Vergleich der altersadjustierten Kontrollgruppe zur MDS-Gruppe	35
Abbildung 3.5	Anteil an NETs vor und nach Stimulation	36
Abbildung 3.6	Gesamtzellzahl in der DAPI Fluoreszenzfärbung vor und nach Stimulation	37
Abbildung 3.7	Veränderung des Zellkerndurchmessers in der Fluoreszenzfärbung DAPI nach Stimulation mit PMA	38
Abbildung 3.8	Veränderung des Zellkerndurchmessers in der Fluoreszenzfärbung FITC nach Stimulation mit PMA	39
Abbildung 3.9	Veränderung des Zellkerndurchmessers in der Fluoreszenzfärbung PE nach Stimulation mit PMA	40
Abbildung 3.10	Durchflusszytometrische Auswertung der Antikörperfärbung mit Anti-CD66b und Anti CD45	46
Abbildung 3.11	Durchflusszytometrische Auswertung der Antikörperfärbung mit Anti-MPO und Anti-CD45	47
Abbildung 3.12	Durchflusszytometrische Auswertung der Bildung von HOCl mittels APF	48
Abbildung 3.13	Auswertung der Fluoreszenzintensität (Δ APF) in der altersadjustierten Kontrollgruppe und der MDS-Gruppe nach Stimulation mit H ₂ O ₂	49

Abbildung 3.14 Durchflusszytometrische Auswertung der Bildung von HOCl mittels HPF 50	
Abbildung 3.15 Auswertung der Änderung der Fluoreszenzintensität (Δ HPF) in der altersadjustierten Kontrollgruppe und der MDS-Gruppe	51
Abbildung 3.16 Auswertung der HOCl-Bildung in der altersadjustierten Gruppe und der MDS-Gruppe nach Subtraktion der von Δ APF und Δ HPF	52
Abbildung 3.17 mittlere Fluoreszenzintensität von DHR nach Stimulation mit PMA und Zugabe der Inhibitoren ABAH/AP bzw DPI	53
Abbildung 3.18 Fluoreszenzintensität von HE nach Stimulation mit PMA	54
Abbildung 3.19 Durchflusszytometrische Auswertung der Veränderung des Zelldurchmessers nach Stimulation mit PMA	56
Abbildung 3.20 Durchflusszytometrische Auswertung der Veränderung des Zelldurchmessers anhand des <i>Side Scatter</i> nach Stimulation mit H ₂ O ₂	58
Abbildung 4.1 Bestimmung der HOCl-Konzentration mittels APF und HPF	65

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 <i>WHO</i> -Klassifikation myelodysplastischer Syndrome (Vardimann et al.)	2
Tabelle 1.2 <i>IPSS-R</i> , (Greenberg et al., 2012)	3
Tabelle 2.1 Verwendete Chemikalien, Kits und Substanzen	17
Tabelle 2.2 Verwendete Antikörper	18
Tabelle 2.3 Verwendete Geräte	18
Tabelle 2.4 Verwendete Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 2.5 Patientencharakteristika altersadjustierte Kontrollgruppe	20
Tabelle 2.6 Patientencharakteristika MDS-Gruppe	20
Tabelle 2.7 Versuchsansatz der fluoreszenzmikroskopischen Analysen	23
Tabelle 2.8 Zuordnung der Fluoreszenzfilter und -farbstoffe	24
Tabelle 2.9 Versuchsansätze zur durchflusszytometrischen Analyse	30
Tabelle 3.1 Bildmorphologische, semiquantitative Auswertung der Bildung von <i>NETs</i> in der altersadjustierten Kontrollgruppe	41
Tabelle 3.2 Bildmorphologische, semiquantitative Auswertung der Bildung von <i>NETs</i> in der MDS-Gruppe	43
Tabelle 3.3 Verteilung und durchschnittliche Bewertung der <i>NET</i> -Bildung	45

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr.med. Norbert Gattermann für die gemeinsame Entwicklung und Umsetzung dieser Arbeit. Zudem bedanke ich mich für die fortwährende Unterstützung, die Anregungen und stetige Weiterentwicklung, nicht nur bei der Umsetzung dieser Arbeit, sondern während meines gesamten Studiums.

Besonders bedanke ich mich auch bei Dr.rer.nat. Patrick Cadeddu und Dr.rer.nat. Julia Fröbel für die fachlich-technische Unterstützung bei den durchflusszytometrischen und immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen.

Weiterhin bedanke ich mich vor allem bei den Mitarbeitern des hämatologischen Forschungslabors (Dr.rer.nat. Stefanie Geyh und Anne Koch) und des Routinelabors (Irmgard Hamann, Sabrina Pechtel, Anke Böckmann und Brigitte Kalmutzke), sowie allen weiteren Mitarbeitern der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Ich bedanke mich für die fachliche Expertise, die Unterstützung bei der Probenakquise, die Anregungen, die große Hilfsbereitschaft und vor allem das angenehme und immer freundschaftliche Arbeitsklima!

Zudem bedanke ich mich bei Prof. Dr.med. Hubert Schelzig und der Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie für die Unterstützung bei der Probenakquise der altersadjustierten Kontrollgruppe.

Auch bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und Geduld.