

Aus dem Lehrstuhl  
für Anästhesiologie  
Prof. Dr. Bernhard M. Graf  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

Veränderung der Granulozytenfunktionalität in vitro  
in Anwesenheit von Escherichia coli und Cefuroxim

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Franz Reichel

2022



Aus dem Lehrstuhl  
für Anästhesiologie  
Prof. Dr. Bernhard M. Graf, M.Sc.  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

Veränderung der Granulozytenfunktionalität in vitro  
in Anwesenheit von Escherichia coli und Cefuroxim

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Franz Reichel

2022

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: PD Dr. Martin Kees

2. Berichterstatter: PD Dr. Franz Josef Putz

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2023

# Inhalt

<b>1. Einleitung</b> .....	4
1.1 Granulozyten .....	4
1.2 Escherichia coli.....	8
1.3 Cefuroxim .....	8
<b>2. Fragestellung</b> .....	10
<b>3. Projektplanung</b> .....	12
<b>4. Material und Methoden</b> .....	13
4.1 Bakterienkultur .....	13
4.2 Blutentnahme.....	14
4.3 Isolation der Granulozyten .....	14
4.4 Fluoreszenzfarbstoffe .....	15
4.5 E. coli-Konzentrationen.....	16
4.6 Hemmung des Bakterienwachstums durch Cefuroxim .....	16
4.7 Inkubation und Kammersystem.....	18
4.8 Alternative Befüllung des Kammersystems .....	20
4.9 Mikroskopie.....	21
<b>5. Auswertung</b> .....	23
<b>6. Ergebnisse</b> .....	28
6.1 Ergebnisse zu Fragestellung .....	28
6.2 Ergebnisse zur Methodenentwicklung.....	45
6.3 Interessante Beobachtungen .....	52
<b>7. Diskussion</b> .....	55
7.1 Diskussion der Ergebnisse zur Fragestellung.....	55
7.2 Diskussion der Ergebnisse der Methodik .....	60
<b>8. Zusammenfassung</b> .....	63
<b>9. Abbildungsverzeichnis</b> .....	64
<b>10. Tabellenverzeichnis</b> .....	65
<b>11. Literaturverzeichnis</b> .....	66

## 1. Einleitung

Schon seit Jahrzehnten wird in den Lehrbüchern der Immunologie des Menschen grundsätzlich zwischen dem angeborenen unspezifischen Immunsystem und dem erworbenen spezifischen Immunsystem differenziert. Beide Systeme stehen in enger Zusammenarbeit und werden weiterhin in ihre zellulären und humoralen Abwehrmechanismen unterteilt.

Zum zellulären Anteil des unspezifischen Immunsystems gehören die Granulozyten, die Monozyten, welche im Gewebe als Makrophagen Erreger phagozytieren, und die Natürlichen Killerzellen. Verantwortlich für die unspezifische humorale Abwehr sind die Faktoren des Komplementsystems sowie das Enzym Lysozym, Defensine und verschiedene Zytokine. Diese Faktoren bekämpfen Antigene direkt oder aktivieren und unterstützen Phagozyten bei der Beseitigung der Schädlinge.

Weniger unmittelbar arbeitet die spezifische Abwehr des Körpers, welche in der Lage ist, Erreger präzise zu erkennen und zu eliminieren. Die zelluläre Abwehr wird hierbei maßgeblich von den T-Lymphozyten getragen, während die B-Lymphozyten die spezifische humorale Abwehr mittels Produktion von Antikörpern bewerkstelligen. (1–3)

### 1.1 Granulozyten

Das primäre Interesse dieser Dissertation richtet sich auf die Granulozyten, welche den Großteil der Leukozyten im Blut ausmachen. Sie sind 9-16  $\mu\text{m}$  groß, reifen im Knochenmark heran und leben nur wenige Stunden bis Tage zirkulierend im Blut. (4, 5) Ihren Namen tragen die Granulozyten wegen der unter dem Lichtmikroskop sichtbaren Granula in ihrem Zellinneren, in denen unterschiedliche antimikrobielle Moleküle sowie Proteine für die Chemotaxis enthalten sind. (6) Das verschiedene Färbeverhalten dieser Granula ist das Unterscheidungskriterium dreier Subtypen: Neutrophile, Eosinophile und Basophile Granulozyten.

Anders als die eosinophilen und basophilen Granulozyten, die an der Abwehr von Parasiten sowie an allergischen Reaktionen beteiligt sind, sind die Neutrophilen dafür bekannt, bei bakteriellen Infektionen als erste Abwehr vor Ort zu sein. (2) Diese Neutrophilen sind die bedeutendsten Zellen des angeborenen Immunsystems und haben vier Hauptfunktionen der Erregerabwehr, die im Folgenden erklärt werden.

## a. Degranulation

Im Zytoplasma eines adulten Granulozyten finden sich in der Regel Granula, welche vier unterschiedlichen Typen zugehörig sind. (6) Die enthaltenen hochreaktiven Moleküle sind von großer Vielfalt und führen bei Exozytose zu einer Tötung der umliegenden Erreger. Myeloperoxidase (MPO), Defensine und Lysozym finden sich in den azurophilen, primären Granula, welche erst am Infektionsort ausgeschüttet werden. In den sekundären und tertiären Granula befinden sich die neutrophilenspezifischen Moleküle, welche es den Zellen ermöglichen, durch das extravasale Gewebe zum Ort der Inflammation zu migrieren. Dazu gehören u.a. Gelatinase, Kollagenase und Plasminogenaktivator. Zur vierten Kategorie gehören die sekretorischen Vesikel, welche Proteine enthalten, die für das Anheften und die Durchwanderung des Endothels unabdingbar sind. (6) Diese Abwehrfunktionen müssen allerdings gut reguliert werden, denn eine überschießende, unkontrollierte und systemische Degranulation, wie sie z.B. bei einer Sepsis auftritt, kann mehrere Organe bis zu ihrem Versagen schädigen. (6)

## b. Bildung von Reactive Oxygen Species (ROS)

Parallel zu der Phagozytose von Erregern produzieren neutrophile Granulozyten reaktive Sauerstoffmetabolite, welche die Membranen von Bakterien angreifen und diese so unschädlich machen. Initiiert wird die Produktion der ROS durch eine Kette von Reaktionen, welche durch unterschiedliche Faktoren am Infektionsort ausgelöst werden können, darunter Faktoren des Komplementsystems und N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), ein chemotaktisch wirksames, bakterielles Peptid. Diese Reaktionskette beginnt mit der NADPH-Oxidase, die in der Membran von Phagolysosomen sitzt und im Lumen Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) produziert, welche von der Superoxid-Dismutase in Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$  umgewandelt werden. Zu den reaktivsten Sauerstoffspezies wird allerdings die hypochlorige Säure (HOCl) gezählt, deren Synthese durch die oben genannte Myeloperoxidase katalysiert wird. (2) Die Bedeutung der ROS-Produktion für die Bekämpfung von Eindringlingen wird beispielsweise bei Patienten mit Chronischer Granulomatose (CGD) deutlich. Diese Menschen haben einen Gendefekt, der zu einer dysfunktionalen NADPH-Oxidase und somit zu einer verringerten Produktion von  $O_2^-$  führt. Die Patienten leiden an

rezidivierenden, oft lebensgefährlichen Infektionen. (7) Auf der anderen Seite birgt eine zu hohe ROS-Produktion und sein ungezieltes Schädigungspotential ebenso Gefahren. So wurde zum Beispiel festgestellt, dass eine hohe ROS-Produktion, auch als „respiratory burst“ bezeichnet, mit einem negativen Outcome bei schwerer Sepsis assoziiert ist. (8)

### c. Migration

Granulozyten befinden sich, anders als Makrophagen, nicht in gesundem Gewebe (2) und müssen sich im Falle einer Infektion erst zum Entzündungsherd bewegen, um dort ihre Aufgaben zu erfüllen. Dabei helfen ihnen zahlreiche Oberflächenmoleküle und Rezeptoren, die in der Zellmembran eingebaut sind. Zu diesen gehören zum Beispiel die Toll-like Rezeptoren, Rezeptoren für Immunglobuline, Komplementfragmente, Chemokine und der fMet-Leu-Phe-(fMLP)Rezeptor. Letzterer bindet an bakterielle Polypeptide und bringt die Zelle dazu, in Richtung der höchsten Konzentration des Liganden zu wandern. Dieser und viele weitere chemotaktische Mechanismen führen im Gefäßbett zu einer Adhäsion an das Endothel, der anschließenden Diapedese und schließlich zu einer gerichteten Migration zum Infektionsort. (2)

### d. Phagozytose

Dort angekommen kann die Zelle nun, über Aktivierung weiterer Rezeptoren, Bakterien in sich aufnehmen und töten, was Phagozytose genannt wird. Bei dieser Endozytose umschließt die Zelle den Erreger mit der Zellmembran, welche sich dann ins Zellinnere abschnürt und nun als Phagosom bezeichnet wird. Dieses verschmilzt mit einem Lysosom bakterizider Moleküle. In diesem Phagolysosom spielt sich nun auch die oben beschriebene Vernichtung des Erregers via ROS-Produktion ab. Neutrophile Granulozyten sind in der Lage, bis zu 20 einzelne Bakterien zu phagozytieren. Allerdings führt dies nicht zwangsläufig zu deren Vernichtung, denn es gibt Bakterien, die Strategien entwickelt haben, die Phagozytose zu überleben. (2, 3) So zum Beispiel *Staphylococcus aureus*, welcher durch Enzyme wie die Katalase der intrazellulären Vernichtung entgeht. Katalase baut  $H_2O_2$  in Sauerstoff und Wasser um,  $H_2O_2$  steht somit nicht mehr zur Produktion von HOCl durch MPO zur Verfügung. (9) Trotzdem ist eine funktionierende Phagozytose für die Gesundheit des Menschen

grundlegend. Dies wird beispielsweise beim Chediak-Higashi-Syndrom deutlich, bei welchem durch einen Gendefekt der Transport von Lysosomen und Granula beeinträchtigt ist. Die Patienten leiden an schweren rezidivierenden Infektionen. (2, 10)

#### e. NETose

Zusätzlich zu den bereits bekannten Abwehrfunktionen der Granulozyten wurde im Jahre 2004 die sogenannte NETose entdeckt. (11) Angelehnt an die Wörter Nekrose und Apoptose, ist mit diesem Wort eine Art des programmierten Zelluntergangs beschrieben, der in sich noch eine letzte Bekämpfung des Krankheitserregers darstellt: Die Bildung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs).

Diese extrazellulären Fallen bestehen aus einer netzartigen Struktur von zelleigener DNA des Neutrophilen, Histonen und einigen defensiven Proteinen und Enzymen, die auch in den oben beschriebenen Granula enthalten sind. (12) Auslöser der NETose können u. a. Bakterien, (11) Pilze, (13) Autoantikörper (14) und Signalmoleküle des Erregers und des Wirts sein. (15) Über eine Reihe von molekularen Mechanismen, zu denen auch die NADPH-Oxidase-abhängige ROS-Bildung gehört, kommt es schließlich über einen Anstieg des intrazellulären Calciums zu einer Dekondensation des Chromatins, woraufhin sich der Zellkern auflöst und die Zellmembran unter Freiwerden der NETs rupturiert. (16) Neben dieser suizidalen NETose wurde auch eine vitale Form beschrieben, bei der die Zellmembran intakt bleiben und die Zelle trotz des Verlustes ihrer DNA weiterhin zur Phagozytose fähig sein soll. (17) Die NETs sind durch ihre Faserstruktur und Ladung sowohl in der Lage Bakterien einzufangen, um sie direkt durch die anwesenden, antimikrobiellen Enzyme der Granula zu töten, als auch für Phagozytose durch Fresszellen bereit zu halten. Allerdings gibt es Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, die mit Hilfe von DNasen die NETs abbauen können und so ihrer Vernichtung entgehen. Seit ihrer Entdeckung sind die NETs Gegenstand intensiver Forschung, um herauszufinden, welche Rolle sie in der Pathogenese unterschiedlichster Krankheiten spielen könnten. Dabei fand man vor allem eine Beteiligung bei thrombotischen und autoimmunen Erkrankungen. (18–23) Zwar schützen die NETs das umliegende Gewebe durch eine feste Bindung ihrer toxischen Moleküle, dennoch spielt dabei stets der zeitnahe enzymatische Abbau der

NETs eine maßgebliche Rolle, denn sonst können diese zu Klotbildung und Entzündungen des Gewebes führen. (24)

Auch mit der Funktion der Phagozytose setzt sich diese Arbeit auseinander. Es wurde für die Untersuchungen das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) als zu phagozytierenden Erreger ausgesucht, der nun knapp vorgestellt wird.

## 1.2 *Escherichia coli*

Schon im 19. Jahrhundert wurde das erste Darmbakterium von Theodor Escherich entdeckt und später nach ihm benannt. *E. coli* ist ein gramnegatives, bewegliches Stäbchenbakterium, welches zur gesunden Darmflora jedes gesunden Menschen gehört. (25) Allerdings gibt es auch einige pathogene Subtypen, die intestinale oder extraintestinale Infektionen hervorrufen können. Diese Varianten des *E. coli* bilden Toxine, welche zum Zelltod der umliegenden Zellen führen können. Darmpathogene Stämme sind beispielsweise der enterotoxische und der enterohämorrhagische *E. coli*, kurz ETEC und EHEC. Diese Erregertypen führen zu wässrigen bzw. blutig-schleimigen Durchfällen. (26) Über die Harnwege kann es auch zu einer Urosepsis durch *E. coli* kommen, was dieses Bakterium zu einem häufigen Sepsiserreger macht. (25) Nach den Leitlinien der European Association of Urology sollte eine Urosepsis durch *E. coli* initial mit einem Cephalosporin, Carbapenem oder Piperacillin/Tazobactam behandelt werden. (27)

## 1.3 Cefuroxim

Cefuroxim ist ein Cephalosporin der 2. Generation und wird bei Infektionen mit gramnegativen Bakterien wie *E. coli* angewendet. (28) Die antibakterielle Wirksamkeit beruht wie auch bei anderen Beta-Lactam-Antibiotika auf einer Hemmung der Zellwandsynthese. Die Zellwand muss in ihrem Aufbau aus Glykanen durch Oligopeptide verbunden werden, was durch die Syntheseleistung sogenannter Transpeptidasen erfolgt. Diese Transpeptidasen und manche weitere der Enzyme, die in den Aufbau der Zellwand involviert sind und an welche Penicillin (und andere Beta-Lactam-Antibiotika) bindet, werden Penicillin-binding Proteins genannt (PBPs). (29) In *E. coli* wurden von Spratt et al. 6 PBPs gefunden. (30) Der in Cephalosporinen enthaltene Beta-Lactam-Ring hemmt diese Enzyme irreversibel. Einige Erreger besitzen wiederum Enzyme zur Spaltung dieses Rings und sind somit gegen manche

Beta-Lactam-Antibiotika resistent. Cephalosporine sind bekannt für ihre Stabilität gegenüber manchen solcher Enzyme (31) So wird im GERMAP-Bericht von 2015 eine Sensibilität von 81,7 % der E. coli-Stämme gegenüber Cefuroxim dokumentiert. (32) Die minimale Hemmkonzentration (MHK) von Cefuroxim liegt für E. coli bei ca. 4 µg/mL. (33) Interessanterweise wurde beobachtet, dass bei Exposition gegenüber hohen Cefuroxim-Konzentrationen die Zellgröße der E. coli zunimmt. Vermutet wird, dass dies durch osmotische Flüssigkeitszunahme durch die defekte Zellwand zustande kommt. (34)

## 2. Fragestellung

Die Zusammenhänge und Abhängigkeiten zwischen den oben beschriebenen Funktionen der neutrophilen Granulozyten sind in den letzten Jahren von steigendem Interesse in der Grundlagenforschung gewesen. Man erhofft sich, durch ein besseres Verständnis der Abläufe, Ansatzpunkte für Neuerungen in der Diagnostik und Therapie von Granulozyten-assoziierten Erkrankungen zu finden. (35) Da vor allem die NETs mit pathologischen Vorgängen in Verbindung gebracht werden, wie beispielsweise bei thrombotischen und autoimmunen Gefäßerkrankungen, (36) wurde untersucht, welche Umstände die Zelle dazu veranlassen – oder welche sie eher hemmen – in die NETose zu gehen. Dabei postulieren manche Forscher, dass die Phagozytose mit der Bildung der NETs in einem reziproken Verhältnis steht. Neutrophile, die phagozytiert hätten, seien nicht mehr in der Lage in die NETose zu gehen, und umgekehrt gingen Granulozyten vermehrt in die NETose, wenn diese nicht in der Lage seien den Erreger – zum Beispiel wegen seiner Größe – zu phagozytieren. (37, 38) Dies wird durch Resultate unterstützt die anzeigen, dass die Anwesenheit von MPO (39) und Neutrophilen Elastase (NE) (38) im Zytosol eine notwendige Voraussetzung für die Dekondensation des Chromatins und somit der Bildung von NETs ist. Denn diese Enzyme würden bei der Phagozytose im Phagolysosom vereinnahmt und stünden dann nicht mehr im Zytosol und somit am Zellkern zur Verfügung. (38) Manfredi et al. haben vor diesem Hintergrund mehrere Versuche entwickelt. Zum Beispiel ließen sie, in einem ersten Schritt, die Granulozyten verschiedene non-vitale Zellen oder Partikel phagozytieren, um in einem zweiten Schritt eben diese Granulozyten zu stimulieren und die Bildung von NETs mittels Konfokalmikroskopie zu quantifizieren. (40) Sie kamen zu der Erkenntnis, dass ein Neutrophiler eine unwiderrufliche Entscheidung trifft, entweder zu phagozytieren oder NETs zu bilden. Die Entscheidung sei abhängig von vielen Gegebenheiten, die es zu erforschen gilt. (37)

Im Rahmen meiner Doktorarbeit soll überprüft werden, ob diese Aussage über die Granulozytenaktivität auch bei einer Konfrontation mit einem vitalen Bakterium Gültigkeit behält.

Andere Arbeiten nähren Zweifel daran, dass die Handlungsoptionen des Granulozyten wirklich dichotom sind, sondern vielmehr ein konsekutiver Vorgang von Phagozytose zu NETose besteht. Diese Vermutung wird von einer Arbeit unterstützt, die zeigt, dass Pneumokokken-induzierte Autophagozytose, die mit der Phagozytose verwandt ist, die NETose fördert. (41) Des Weiteren konnten Pelletier et al. mittels einer intelligenten

Methodik und Durchflusszytometrie zeigen, dass Neutrophile, die E. coli ummantelte Latex-Partikel phagozytiert hatten, anschließend in die NETose gegangen waren. Diesem Zellvorgang haben sie den Namen „phagoNETosis“ gegeben. (42)

Die Widersprüchlichkeiten der Publikationen von Branzk et al. (38) und Pelletier et al. (42) spiegeln den Bedarf an weiteren aufklärenden Arbeiten im Bereich der Granulozytenfunktionalität bei Kontakt mit Bakterien wider.

Aus diesem Grund hat sich dieses Projekt zur Aufgabe gemacht, mit der im Labor der Klinik für Anästhesiologie der Universität Regensburg etablierten Methodik sowohl Erkenntnisse zu den funktionellen und zeitlichen Abläufen der Granulozyten in Konfrontation mit E. coli zu gewinnen als auch die bestehenden Methoden für die Quantifizierung von Phagozytose weiterzuentwickeln.

### 3. Projektplanung

Geplant wird, Granulozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen von E. coli in Kontakt zu bringen und die Zellaktivitäten der Migration, der Phagozytose, der ROS-Produktion und der NETose in zeitlicher Abhängigkeit zu quantifizieren. Die durch Fluoreszenzmikroskopie und Computersoftware erfassten Werte (Parameter der Migration, Zeitpunkte der maximalen ROS-Produktion, Erreichen des halbmaximalen Effekts der NETotischen DNA-Freisetzung) sollen in Relation zu den Bakterienkonzentrationen gestellt werden, um so eine Aussage über den Effekt der Anwesenheit von E. coli auf die Granulozytenfunktionalität treffen zu können. Dazu soll zunächst eine Bakterienkultur hergestellt werden, sowie deren Vitalität über einen Beobachtungszeitraum von ca. 8 Stunden sichergestellt werden. Dann sollen verschiedene methodische Alternativen im Versuchsaufbau getestet werden, um ein Modell zu entwickeln, was sich möglichst nah an den Bedingungen in vivo befindet. Und schließlich soll auf die erarbeitete Methodik das System unterschiedlicher E. coli-Konzentrationen angewendet werden. Eine Übersicht des Schemas findet sich in Abbildung 1.

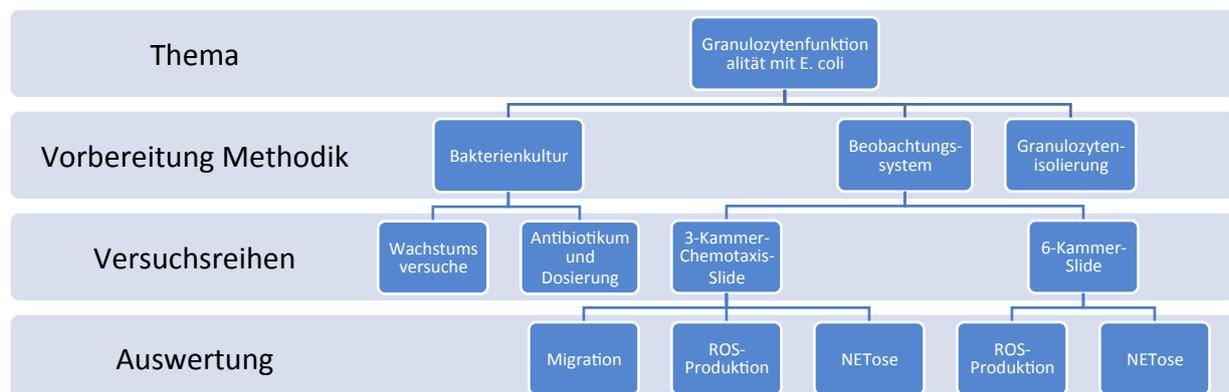


Abbildung 1: Aufbau der Projektumsetzung

## 4. Material und Methoden

Im Folgenden wird der grundlegende Versuchsaufbau mit den angewandten Methoden und genutzten Materialien erläutert.

### 4.1 Bakterienkultur

Um unter dem Fluoreszenzmikroskop die Bakterien sichtbar zu machen, haben wir einen genveränderten *E. coli*-Stamm (ATCC 25922GFP, Manassas, USA) ausgewählt, der ein Plasmid besitzt, welches für das grün fluoreszierende Protein (GFP) codiert. Dies ermöglicht, das Bakterienwachstum sowie die Extinktion des GFP-Signals bei Phagozytose zu quantifizieren.

Vor Beginn der Kultivierung der *E. coli* GFP wurde zunächst das vom Hersteller empfohlene Nährmedium hergestellt. Dazu wurden 490 mL deionisiertes Wasser in eine 500 mL Glasflasche gegeben, mit 15 g Tryptic Soy Broth (Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) versetzt und dann bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums auf höchstens 50 °C wurden 19 mL entnommen und abschließend 1 mL einer 2 mg/mL Ampicillin-Lösung zugefügt. Das Antibiotikum dient zur Selektion der *E. coli* GFP, da diese gegen Ampicillin resistent sind. Das fertige Medium wurde bei 4 °C für bis zu 10 Tage gelagert und verwendet, bis es erneut hergestellt werden musste. Für die Kultur wurden 100 µL der Bakteriensuspension mit 5 mL des Mediums in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gegeben und mit Alufolie umwickelt, um das GFP der *E. coli* vor Lichtexposition zu schützen. Gemeinsam mit einem Zentrifugenröhrchen, in welches als Kontrolle etwas Medium ohne *E. coli* gefüllt wurde, wurde die Bakteriensuspension für ca. 16 Stunden im Inkubator (Lab-Therm LT-W, Adolf Kühner AG, Basel, Schweiz) bei 37 °C und 125 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Durch visuelle Prüfung wurde das Wachstum von kontaminierenden Erregern ausgeschlossen. Das für den anstehenden Versuch nicht verwendete Volumen an Bakterien-Suspension wurde für einen kurzen Zeitraum von ein bis zwei Wochen bei -20 °C und für längere Zeiträume mit 40 % Glycerol 1:1 verdünnt und bei -80 °C eingefroren.

## 4.2 Blutentnahme

Pro Versuch wurde ein Volumen von 3 bis 9 mL Vollblut benötigt, welches gesunden Probanden nach Aufklärung über Datenschutz und Gesundheitsrisiken und der Unterzeichnung einer Einverständniserklärung aus einer peripheren Vene des Armes entnommen wurde (Ethikvotum: 18-1210-101). Die Haut über der Vene wurde desinfiziert, die Vene proximal davon gestaut und mit einer Safety-Multifly-Kanüle (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) punktiert. Das benötigte Blutvolumen wurde in eine Lithium-Heparin Monovette (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) gezogen.

## 4.3 Isolation der Granulozyten

Die Granulozyten wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem unverdünnten Vollblut entnommen. Dazu wurden in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen 3 mL Lymphozyten-Separationsmedium (PBMC Spin Medium, pluriSelect Life Science Worldwide, Leipzig, Deutschland) auf 3 mL Leukozyten-Separationsmedium (Leuko Spin Medium, pluriSpin, pluriSelect Life Science Worldwide, Leipzig, Deutschland) geschichtet, welche sich beide bei Raumtemperatur befanden und vorsichtig unter Schräglage pipettiert wurden, um eine Durchmischung der Schichten zu vermeiden. Auf diese zwei Schichten wurden auf gleiche Art und Weise 3 mL des frisch entnommenen Vollblutes pipettiert. Das Zentrifugenröhrchen wurde für 20 Minuten mit 2000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dadurch teilten sich die Bestandteile des Blutes auf und fanden sich in verschiedenen Schichten des Röhrchens wieder. Nun konnten aus der Granulozyten-Schicht 400  $\mu$ L Zellsuspension entnommen werden und in einem weiteren Röhrchen mit 1000  $\mu$ L PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (D8537-500M), SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland) verdünnt werden. Von dieser Verdünnung wurden 10  $\mu$ L entnommen und zur Bestimmung der Zellkonzentration verwendet. Das Zentrifugenröhrchen mit der Zellsuspension wurde für 5 Minuten mit 1200 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Währenddessen konnten die Zellen der entnommenen 10  $\mu$ L Zellsuspension mit Hilfe einer Neubauerkammer (Neubauer improved Kammertiefe 0,1 mm, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland), einem Lichtmikroskop (Leica Leitz DM IRB) sowie einem planem, 20 x 26 mm Deckglas (Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland) ausgezählt werden. Hieraus wurde das benötigte Volumen

berechnet, mit dem man das durch die zweite Zentrifugation entstandene Zellpellet verdünnen musste, um auf eine Zielkonzentration von 18 Millionen Zellen pro mL zu gelangen. Zu dieser Verdünnung wurde RPMI 1640 (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) verwendet. Die fertige Granulozytensuspension in gewünschter Konzentration konnte schließlich für die unterschiedlichen Ansätze des jeweiligen Versuchsaufbaus genutzt werden.

#### 4.4 Fluoreszenzfarbstoffe

Die Reagenzien für die Markierung der Granulozytenfunktionen wurden so ausgewählt, dass sie Fluoreszenz hervorrufen, wenn eine Zelle ROS produziert oder wenn sie NETose betreibt. Zur Darstellung des Eintritts des „respiratory bursts“ wurde Dihydrorhodamin 123 (DHR, life technologies, Eugene, Oregon, USA) zu den Zellen gegeben, welches durch eine Oxidationsreaktion mit Wasserstoffperoxid zu Rhodamin 123 reagiert, welches wiederum nach Anregung Licht einer Wellenlänge von 534 nm emittiert. Bei der Bildung der ROS ist die Zellmembran noch intakt. Das frei permeable DHR kann allerdings durch diese hindurch diffundieren. (43, 44) In unserem Versuchsaufbau wurden 3  $\mu$ L DHR mit einer Konzentration von 1  $\mu$ M zu einer Zellsuspension von 300  $\mu$ L zugefügt, woraus eine DHR-Endkonzentration von 10 nM resultierte.

Die Bildung der NETs wurde mittels 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) detektiert. DAPI lagert sich hauptsächlich in die kleine Furche der Desoxyribonukleinsäure (DNA) in Regionen mit vielen AT-Basenpaarungen ein und emittiert maximal mit 461 nm bei einer Anregung mit ultraviolettem Licht. DAPI ist nicht in der Lage, durch die Zellmembran zu diffundieren und kann bei der Mikroskopie von lebenden Zellen nur extrazelluläre DNA anfärben. (45) Daher eignet es sich für die Detektion der NETose, bei der der Granulozyt seine DNA in den extrazellulären Raum freigibt. Deshalb wurden 5  $\mu$ L einer 5  $\mu$ g/mL konzentrierten DAPI-Lösung zugegeben. Bei einem Endvolumen im Versuchsröhrchen von 300  $\mu$ L ergab sich eine Endkonzentration von 0,083  $\mu$ g/mL DAPI.

Weiterhin soll auch die Freigabe von MPO in den Extrazellulärraum als Indikator für die NETose genutzt werden, da MPO eine wichtige Komponente der Netze ist. (46) Hierfür verwendeten wir einen MPO-Antikörper, der an Allophycocyanin (APC) gekoppelt ist und bei Bindung an das Enzym (lokale Erhöhung der Farbstoffkonzentration) zu einer messbaren Licht-Emission führt. Das Absorptionsmaximum liegt bei 650 nm und das

Emissionsmaximum bei 660 nm. 10 µL einer fertigen Anti-MPO-APC-Lösung (anti-MPO-APC, human, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) werden hierfür dem Versuchsansatz hinzugefügt.

#### 4.5 E. coli-Konzentrationen

Je nach Versuchsreihe wurden E. coli in unterschiedlichen Konzentrationen zur Zellsuspension hinzugefügt. Zur Bestimmung der vorliegenden Konzentration der Bakterienkultur wurde, wie schon für die Granulozyten-Zählung beschrieben, die Neubauerkammer zu Hilfe genommen. Die Bakterien wurden dann so verdünnt und 10 µL davon zum Ansatz hinzugefügt, dass ihre Konzentration in einem bestimmten Verhältnis zur Granulozyten-Konzentration stand. Es wurden Verhältnisse der Granulozyten zu den E. coli von 1:4, 1:1, 2:1, 10:1, 20:1 und 100:1 angesetzt. Die niedrigste Bakterienkonzentration (100:1) wurde deshalb eingesetzt, weil sie einer Kontamination durch andere Bakterien ähnlich käme. Dadurch kann später ausgeschlossen werden, dass ein gemessener Effekt auf einer Kontamination beruht.

#### 4.6 Hemmung des Bakterienwachstums durch Cefuroxim

Um für eine längere Beobachtungszeit der Granulozyten die E. coli-Konzentration konstant zu halten, wurde Cefuroxim in gelöster Form in den Versuchsansatz eingefügt.

Die geeignete Konzentration des Antibiotikums wurde ermittelt, indem E. coli in 1:1-Konzentration mit verschiedenen Konzentrationen des Cefuroxims in einen Ibidi µ-Slide VI 0.1 (Abb. 2) gefüllt wurden. Als Medium wurde das gleiche Medium verwendet, wie es auch für die Versuche mit Granulozyten genutzt wird. (siehe 4.7) Es wurden die Konzentrationen 20, 2, 0.2, 0.02, 0.002, 0.0002 µg/mL untersucht. Das Wachstum bzw. dessen Hemmung konnte über das GFP-Signal mit dem Fluoreszenzmikroskop gemessen werden. (siehe 4.9. und 5.)

Nach weiteren Vorversuchen wurde Cefuroxim (Hikma Farmaceutica, Portugal) schließlich so hinzugefügt, dass sich im Beobachtungs-Slide eine Endkonzentration von 8 µg/mL ergab. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Wachstum sicher gehemmt wird, weshalb die MHK von 4 µg/mL deutlich überschritten wurde. Andererseits sollte vermieden werden, dass sich die Morphologie der E. coli stark verändert und es durch zu hohe Cefuroxim-Konzentrationen zu einem massiven Anschwellen der Zelle kommt.



#### 4.7 Inkubation und Kammersystem

Neben den Farbstoffen wurde der Zellsuspension von 50  $\mu\text{L}$  pro Ansatz 100  $\mu\text{L}$  eines am Vortag zubereiteten und bei 37 °C inkubierten Mediums, bestehend aus 20  $\mu\text{L}$  destilliertem Wasser, 20  $\mu\text{L}$  MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 10  $\mu\text{L}$  Natriumbikarbonatlösung (Sodium bicarbonate solution, 7,5 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 50  $\mu\text{L}$  RPMI 1640 (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) hinzugefügt. Die Vereinigung der Reagenzien wurde mit der Zugabe von 150  $\mu\text{L}$  Kollagen (PureCol Bovine Collagen Solution Type 1, 3 mg/mL, Advanced BioMatix, Carlsbad, Kalifornien, USA) vollendet. Das Kollagen diente dazu, ähnliche Bedingungen zu schaffen wie bei einer Granulozyten-Migration in menschlichem extravasalem Gewebe. Zu diesem Zweck wurden je 6  $\mu\text{L}$  der nun gallertigen, mit Farbstoffen versehenen Zellsuspension in die Kanäle einer  $\mu$ -Slide Chemotaxis-Kammer (Ibidi GmbH, Martinried, Deutschland) pipettiert. Diese Kammer besteht aus drei Kanälen, die mit je zwei seitlichen Schlitzöffnungen zu einem trapezförmigen Reservoir versehen sind, siehe Abbildung 2. (47) Sie wurde direkt nach Befüllung der Kanäle für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, bis sich das Gel verfestigt hat. Anschließend wurde jeweils das linke Reservoir der drei Kammern mit 65  $\mu\text{L}$  des Lockstoffs 10 nM fMLP in RPMI + 10 % FKS und das rechte Reservoir mit je 65  $\mu\text{L}$  reinem RPMI + 10 % FKS, aufgefüllt. Die Befüllung der Kammern ist in Abbildung 3 veranschaulicht. Der direkte Vergleich sowohl der gerichteten Granulozyten-Migration als auch der NETs- und ROS-Detektion in drei verschiedenen, synchronisierten Versuchsansätzen wurde durch diesen Aufbau ermöglicht.

Für die Versuchsreihen, in denen mit einigen verschiedenen *E. coli*-Konzentrationen gearbeitet wurde, wurde ein anderes Kammersystem verwendet. Dieser Slide ( $\mu$ -Slide VI 0.1, Ibidi GmbH, Martinried, Deutschland) hat sechs Kanäle und keine Reservoirs, wie in Abbildung 4 (48) zu sehen ist. Somit konnte in dieser Versuchsreihe keine Chemotaxis gemessen werden, jedoch der Effekt sechs unterschiedlicher Bakterienkonzentrationen parallel.

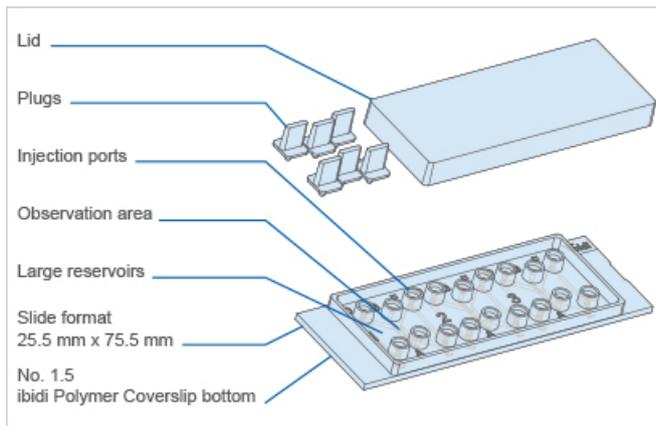


Abbildung 2: Ibidi  $\mu$ -Slide Chemotaxis

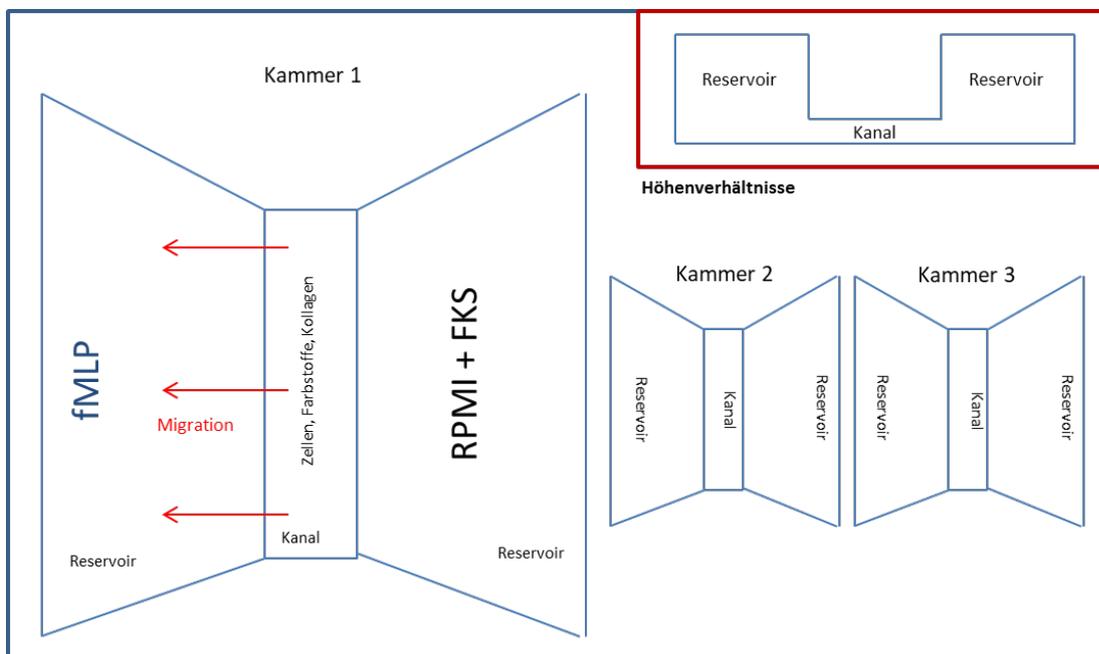


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Kammerbefüllung und Aufbau

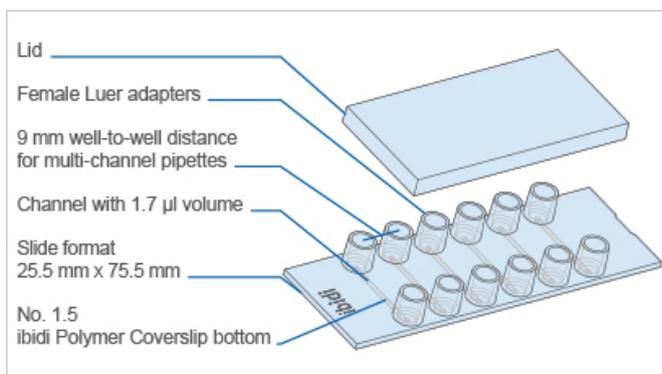


Abbildung 4: Ibidi  $\mu$ -Slide VI 0.1

## 4.8 Alternative Befüllung des Kammersystems

Wird die bisher beschriebene Art und Weise der Nutzung des Kammersystems durchgeführt, bedeutet dies, dass die Granulozyten aus dem Gel in die flüssige Phase des Reservoirs auswandern. Da in vivo die Verhältnisse genau umgekehrt sind, wurden zwei alternative Befüllungen der  $\mu$ -Slide Chemotaxis-Kammer getestet, die näher an die Bedingungen im Körper reichen sollten, sowie eine dritte Alternative, die ihren Fokus auf die Lockwirkung der *E. coli* setzen sollte.

### 1. Reservoirfüllung mit Vollblut

Die grundsätzliche Zusammensetzung des Gels blieb wie beschrieben, allerdings wurden keine isolierten Granulozyten in das Gel gegeben, sondern diese wurden im Vollblut in die Reservoirs gefüllt und sollten dann in das Gel im Kanal wandern.

Es wurden drei verschiedene Gele hergestellt, die dann jeweils in einen Kanal der Chemotaxis-Kammer pipettiert wurden. Im ersten Gel waren neben den normalen Komponenten nur die drei Farbstoffe. Im zweiten Gel wurde 10 nM fMLP eingesetzt und im Dritten *E. coli* im bekannten 1:1-Verhältnis. Anschließend wurde die Kammer für 30 Minuten inkubiert. Währenddessen erfolgten die Blutabnahme und die 10-fache Verdünnung des entnommenen Blutes. Dazu wurden 100  $\mu$ L Blut mit 900  $\mu$ L PBS vereint. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die sechs Reservoirs vorsichtig mit dem verdünnten Vollblut befüllt und umgehend mikroskopiert.

### 2. Reservoirfüllung mit isolierten Granulozyten

Diese Versuchsdurchführung verlief genau wie die Reservoirfüllung mit Vollblut, nur dass während der halbstündigen Inkubation neben der Blutabnahme auch noch die Isolation der Granulozyten vorgenommen werden musste. Das Isolat wurde genau wie unter 4.3. beschrieben hergestellt, verdünnt und in die sechs Reservoirs gefüllt.

### 3. Reservoirfüllung mit *E. coli*

Zur Überprüfung der Lockfunktion der Granulozyten wurde ein weiterer Versuchsaufbau entwickelt, bei dem wieder isolierte Granulozyten in Gel und Kanal

waren, allerdings keine E. coli. Diese wurden im 1:1-Konzentrationsverhältnis in RPMI + FKS in das linke Reservoir des dritten Kanals gefüllt. In das zweite linke Reservoir wurde fMLP zugegeben und im ersten linken Reservoir nur RPMI + FKS. Für das Verständnis dieses Aufbaus lohnt sich ein erneuter Blick in Abbildung 3. In einem Versuch wurden die E. coli zusätzlich mit Cefuroxim (8 µg/mL) versetzt, in einem anderen nicht.

#### 4.9 Mikroskopie

In der gesamten Versuchsdurchführung wurde darauf geachtet, mögliche Aktivierung der Granulozyten durch mechanische Belastung, Temperaturschwankungen oder Lagerung zu vermeiden. So wurde die fertig befüllte Kammer umgehend zum Mikroskop gebracht und die Beobachtung wurde ohne Verzögerung direkt gestartet. Verwendet wurde ein Inversionsmikroskop Leica DMI8 (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland) in Kombination mit einer Fluoreszenzkamera Leica DFC9000 GT (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH), dem Objektiv HC, PL FL L10x/0,40 CORR PH1 (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH) und der Lichtquelle CoolLED pE-4000 (CoolLED Ltd, Andover, Großbritannien). Außerdem wurden für die Auswahl der Wellenlängen der Anregung und der Emission der Farbstoffe verschiedene Filterwürfel gebraucht, nämlich der Filterwürfel DAPI/FI (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH) und der LED QUAD Filterwürfel (Chroma Technology Corp., Vermont, USA). Die folgende Tabelle 1 zeigt die Filtereigenschaften der beiden Würfel.

Filtereigenschaft	Extinktion [nm]	Dichroic beam splitter [nm]	Emission [nm]
DUAL-Filter	380-410; 472-498	418; 502	424-460; 505-545
QUAD-Filter	350-380; 460-480; 522-548; 615-635	405; 485; 555; 645	410-450; 492-518; 560-590; LP 650

**Tabelle 1: Eigenschaften der Filterwürfel**

Nach den Fluoreszenzwerten der verwendeten Farbstoffe wurden entsprechend die Filterwürfel ausgewählt, wie in Tabelle 2 zu sehen ist.

Fluoreszenzfarbstoff	DAPI	Rhodamin 123	MPO-APC	GFP
Extinktionsmaximum [nm]	359	507	650	490
Emissionsmaximum [nm]	461	529	660	510
LED Belichtung [nm]	385	490	635	490
Filterwürfel	DUAL	DUAL	QUAD	DUAL

**Tabelle 2: Fluoreszenzwerte der Farbstoffe**

Die Kammer wurde in einer Klimakammer (ibidi Heating System, Universal Fit, for 1 Chamber, Ibidi, Martinsried, Deutschland), ausgestattet mit einem Thermometer (Ibidi Temperature Controller, Ibidi, Martinsried, Deutschland) und einer Heizung (Ibidi Heating System, Ibidi, Martinsried, Deutschland) auf den Mikroskoptisch gestellt, was für konstante Gaszusammensetzung, Luftfeuchtigkeit und Temperatur von 37 °C sorgte. Es wurden die Positionen der drei Kanäle eingestellt und im Phasenkontrastbild, also ohne Filterwürfel, die Schärfe reguliert. Unter Nutzung der Filterwürfel wurde für jede Fluoreszenzfarbe die Belichtungszeit und Intensität eingestellt, sodass das Bild weder über- noch unterbelichtet war. Dann wurde ein automatischer Mikroskopie-Zyklus von ca. 30 Sekunden mit der Mikroskop-Software Leica Application Suite X 3.4.2.18368 (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) gestartet und das Mikroskop fuhr abwechselnd den linken, mittleren und rechten Kanal an und machte je nach Einstellung ein Bild mit den Filtereinstellungen für DAPI, MPO-APC, Rhodamin 123, Phasenkontrast und ggf. GFP. Das Mikroskop lief in der Regel für etwa 8 Stunden, da in dieser Zeit Zellaktivitäten zu erwarten waren.

## 5. Auswertung

Die aufgenommenen Bilder wurden von der Mikroskop-Software abgespeichert, die Daten wurden konvertiert und dann in das Computerprogramm Imaris 9.0.2. (Bitplane AG, Zürich, Schweiz) importiert. Mit Imaris kann man sowohl die Auswertung der Fluoreszenzsignale als auch der Migration der Granulozyten vornehmen. Die erhobenen Daten wurden schließlich statistisch ausgewertet.

### 1. Fluoreszenzauswertung

Die Bearbeitung mit Imaris erfolgte für alle Farbreaktionen nach dem gleichen Schema. Zunächst wurde der auszuwertende Bereich des Bildes festgelegt, was bedeutete, dass die Ränder und Enden des Kanales weggeschnitten wurden, um Artefakte zu vermeiden. Anschließend wurde festgelegt, welche Intensität das Leuchten einer Fläche bzw. Zelle mindestens aufweisen muss um nicht als falsches Signal ausgeschlossen zu werden. Im nächsten Schritt wurde die Größe der „Area“, also der fluoreszierenden Fläche eingestellt. Flächen, die deutlich kleiner oder größer waren als ein Granulozyt, wurden nicht angenommen. Auf diese Weise konnten Lymphozyten, die einen kleineren Durchmesser von 6-8  $\mu\text{m}$  haben (49) und fälschlicher Weise im Isolat waren, ausgeschlossen werden. Nach Abschluss dieser Bearbeitung werden von Imaris die einzelnen Flächen berechnet und ihrer Bildnummer („Frame“) zugeordnet. Die Werte können in einer Datei von Microsoft Excel 2010 abgespeichert werden. In Excel wurden die Daten so umgerechnet, dass jedem „Frame“ die Summe der Flächen zugeordnet war.

Für DHR konnte in Excel der Kurvenverlauf der Werte dargestellt werden und aus dieser Kurve eine polynomische Funktion gewonnen werden (Abbildung 5), deren X-Wert des Maximums mit Hilfe der Nullstelle der 1. Ableitung berechnet wurde. Der erhaltene Wert entspricht dem Frame der maximalen ROS-Produktion, und zu seiner Berechnung wurde ein Ableitungsrechner im Internet (<https://www.ableitungsrechner.net>) genutzt. Der „Frame“ konnte später über die „Framezeit“ in Minuten seit Versuchsbeginn umgerechnet werden.

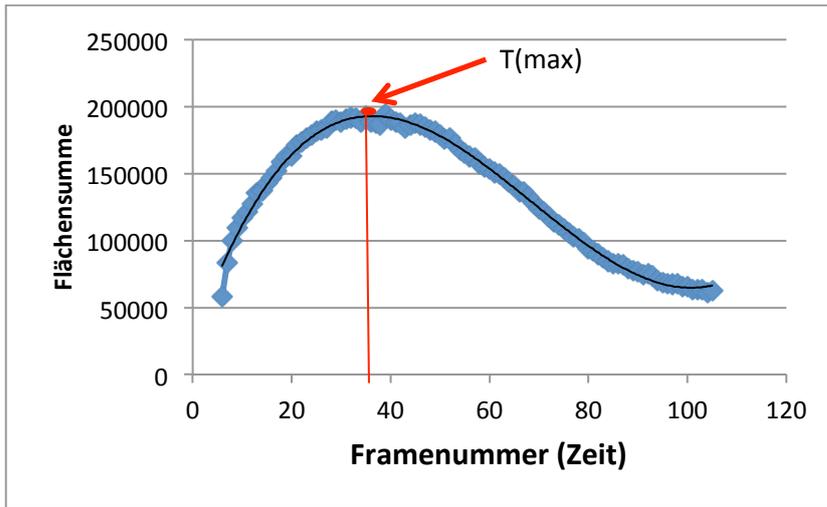


Abbildung 5: Beispielhafter Kurvenverlauf von Rhodamin 123

Die Kurven der Flächensummen pro Zeitpunkt ergaben bei MPO und DAPI einen sigmoidalen Verlauf, wie in Abbildung 6 zu sehen ist.

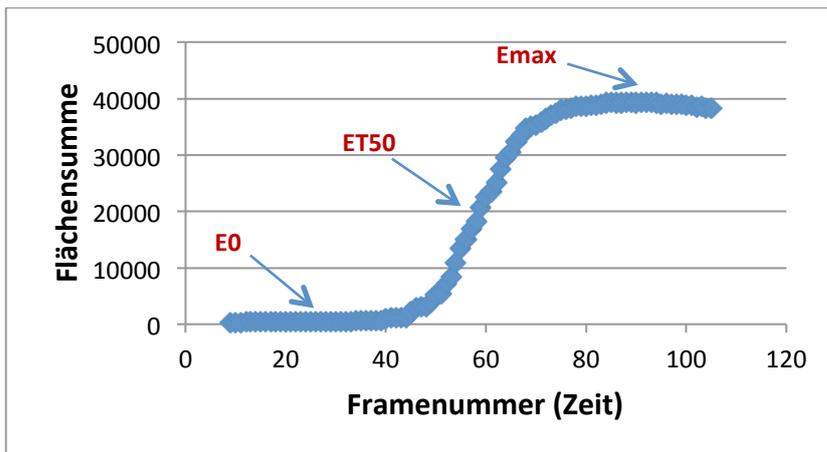


Abbildung 6: Beispielhafter Kurvenverlauf von DAPI & MPO-APC

Zur Auswertung dieser Kurvenverläufe wurde die Software Phoenix 64 Version 8.0.0 (Certara, New York, USA) verwendet. Zur mathematischen Erfassung des Kurvenverlaufes passt das Programm mittels Populationsanalyse die Parameter folgender Gleichung (Formel 1) an die Wertepaare aus Zeit (T) und Summe der Flächen (= Effekt; E) an. Dabei nutzt Phoenix den Naive-pooled-Algorithmus mit tausend Iterationsschritten.

$$E = E_0 + \frac{E_{max} * T^\gamma}{(ET_{50}^\gamma + T^\gamma)}$$

**Formel 1: An Michaelis-Menten angelehnte Funktion zur Beschreibung des sigmoidalen Kurvenverlaufes des MPO bzw. DNA Freisetzung.**

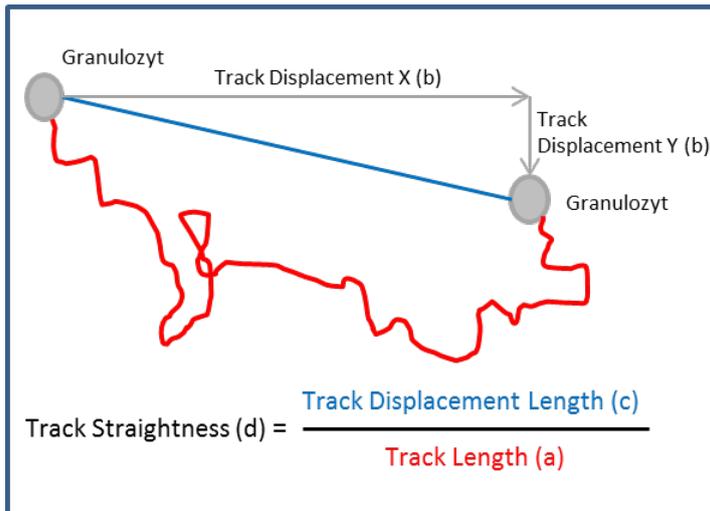
Phoenix berechnete den  $E_0$ - (initiale Effekthöhe),  $ET_{50}$ - (halbmaximales Wachstum),  $E_{max}$ - (maximale Effekthöhe, siehe Abbildung 6), und  $\gamma$ -Wert. Letzterer zeigt an, wie steil die sigmoidale Kurve verläuft, wodurch sich eine Aussage über die Synchronität der NETs-Bildung treffen lässt.

## 2. Migrationsauswertung

Für die Auswertung der Zellwanderung wurden die Phasenkontrastaufnahmen verwendet. Mit der Funktion „Spots“ in Imaris wurde abermals die einzuschließende Größe und die Intensität der „Spots“ festgelegt, um diese als Granulozyten zu identifizieren. Dann wurde die Funktion „Tracking“ eingestellt, die die Wanderwege eines jeden Granulozyten von Bild zu Bild verfolgt. Dabei ist das Programm in der Lage die zurückgelegte Strecke einer Zelle auch dann zu berechnen, wenn sie in manchen Bildern aus der Schärfenebene verschwunden ist.

Die Verfolgung der Zellen wurde hierbei nach je 60 „Frames“ unterbrochen. Bei 2 Bildern pro Minute ergab sich daraus, dass die Veränderung der Zellwanderung in halbstündigen Zeitrahmen verglichen werden konnte. Folgende Parameter wurden für die Migrationsmessung eingesetzt:

- a) „Track Length“ entsprechend der Gesamtlänge des verfolgten Weges in  $\mu\text{m}$
- b) „Track Displacement“ entsprechend der Entfernung des Anfangs- und Endpunktes in  $\mu\text{m}$  für X- und Y- Richtung
- c) „Track Displacement Length“ entsprechend der Entfernung des Anfangs- und Endpunktes in  $\mu\text{m}$  Luftlinie
- d) „Track Straightness“ entsprechend der Ratio aus „Track Displacement Length“ und „Track Length“; (Abbildung 7) je höher der Wert, desto direkter wandert die Zelle



**Abbildung 7: Grafische Darstellung der Migrationsparameter**

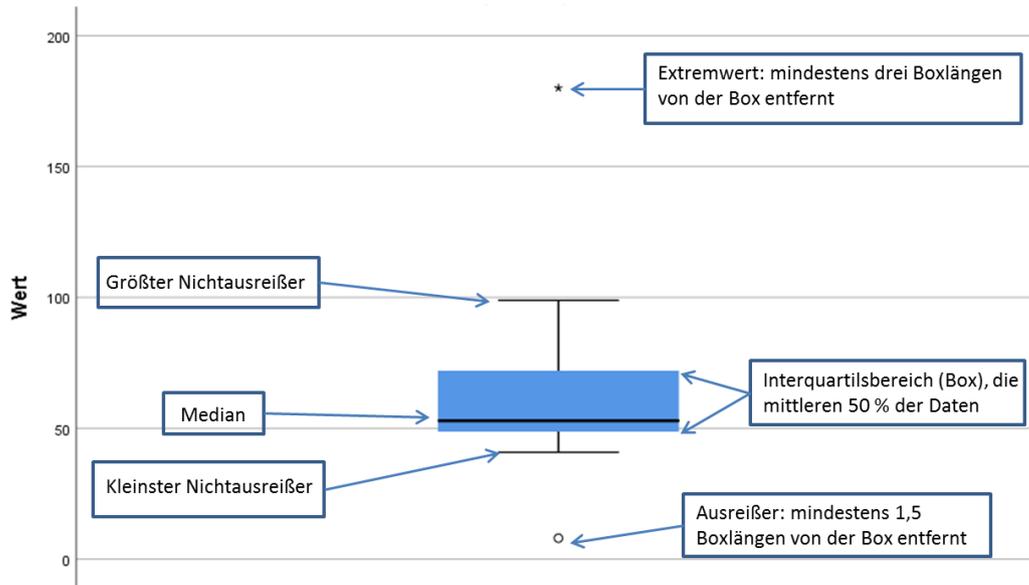
Aus der Auswertung ausgeschlossen wurden alle Spots, die eine Track-Dauer kürzer als 1000 Sekunden hatten, um kurz sichtbare Zellen oder randständige Zellen von der Auswertung auszuschließen. Zusätzlich wurde eine minimale Tracklänge von 25 µm angesetzt, um die Lymphozyten, welche sich im Isolat befanden, und welche nicht migrieren, auszuschließen.

Die erhaltenen Werte wurden über „Collections“ in Imaris gesammelt und als Excel-Datei exportiert.

### 3. Statistische Auswertung

Sowohl die Daten der Farbauswertung als auch der Migration wurden nach ihrer Zusammenstellung mit IBM SPSS Statistics 22 graphisch dargestellt und statistisch analysiert. Es wurden zur Veranschaulichung der Daten Boxplots verwendet, da diese einen umfassenden Eindruck über die Verteilung der Daten vermitteln. In Abbildung 8 ist der Aufbau eines Boxplots erklärt. (50) Auch bei normal verteilten Datensätzen kamen Boxplots zum Einsatz, auf eine Normalverteilung wird stets gesondert hingewiesen.

Für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurde bei Erfüllung der Voraussetzung für ein parametrisches Verfahren der t-Test verwendet. Wurden die Voraussetzungen nicht erfüllt, kam der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz. Sollten in diesem Fall allerdings mehrere unabhängige Stichproben verglichen werden, nutzten wir den Kruskal-Wallis-Test. Das Signifikanzniveau wurde bei 0,05 festgelegt.



**Abbildung 8: Erklärung eines Boxplots**

## 6. Ergebnisse

Zunächst erfolgt unter 6.1 die Präsentation der Ergebnisse, die zur Beantwortung der Fragestellung dienen sollen. Im Anschluss daran werden unter 6.2 die Ergebnisse der Tests zur Erweiterung der Methoden ausgewertet.

### 6.1 Ergebnisse zu Fragestellung

#### 6.1.1 NETose in Anwesenheit von E. coli

In der Chemotaxis-Kammer wurden 7 auswertbare Versuche mit einem Granulozyten-E. coli-Verhältnis von 1:1 durchgeführt. Die Anzahl der Versuche ohne E. coli konnte durch Zusammenlegung von verschiedenen Versuchsreihen, in denen diese „Kontrolle“ immer den gleichen Bedingungen entsprach, auf 15 auszuwertende Versuche erhöht werden. Abbildung 9 zeigt die Gegenüberstellung der ET50-Werte von DAPI aus den Gruppen mit und ohne E. coli.

Durch DAPI wird extrazelluläre DNA – also NETs – detektiert.

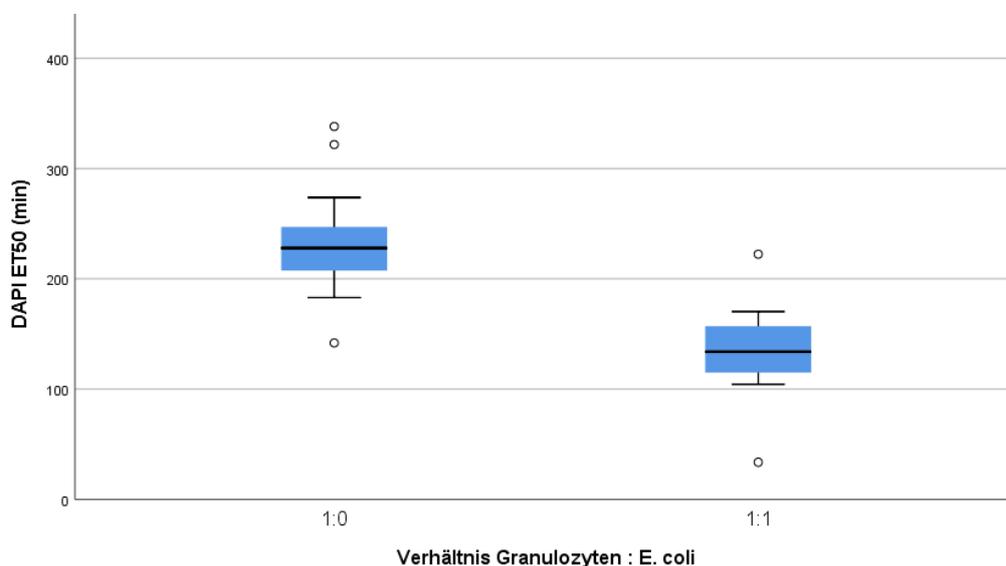


Abbildung 9: ET50-Werte (min) von DAPI ohne E. coli und mit E. coli (1:1)

Die ET50-Werte in der Gruppe mit E. coli (1:1) sind kleiner. Die Werte sind normalverteilt mit Mittelwerten 133,5 bei E. coli und 233,3 Minuten ohne E. coli. Die Differenz der Mittelwerte beider Gruppen beträgt somit 100 Minuten und ist mit  $p = 0,001$  im t-Test bei

Annahme gleicher Varianzen signifikant. Die Fallzahlen liegen mit E. coli bei 7 und ohne E. coli bei 15.

In den gleichen Gruppen wurden auch die ET50-Werte von MPO-APC ausgewertet (Abbildung 10), wobei hier zwei Versuche aus der Wertung genommen wurden, weil sie Werte weit außerhalb des Beobachtungszeitraums anzeigten, die auftreten, wenn Phoenix die Kurve nicht richtig anpassen kann. Dies geschieht, wenn kein sigmoidaler Kurvenverlauf erkennbar ist und deshalb der T(max)-Wert im Unendlichen angenommen wird, woraus extrem hohe ET50-Werte resultieren.

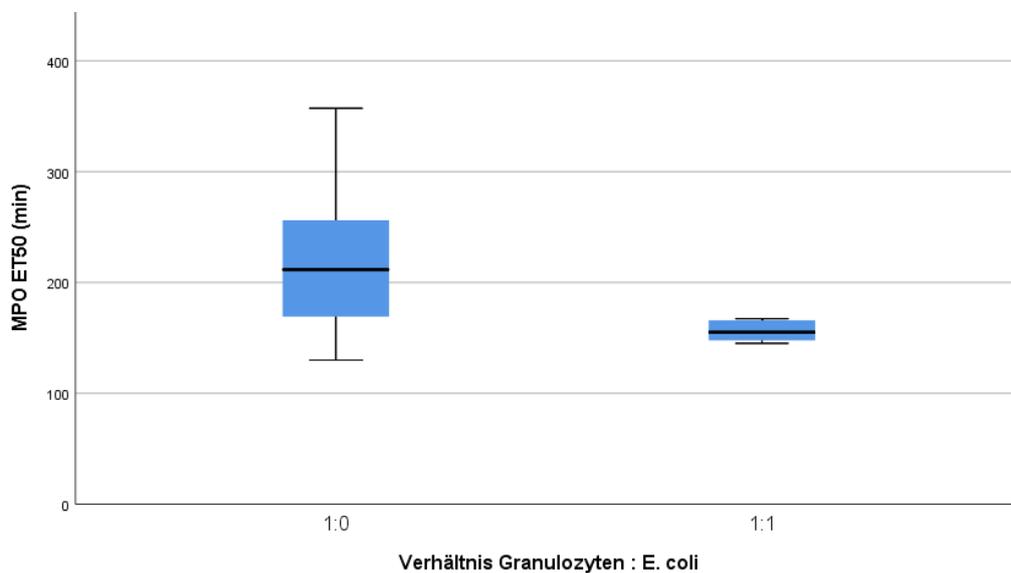


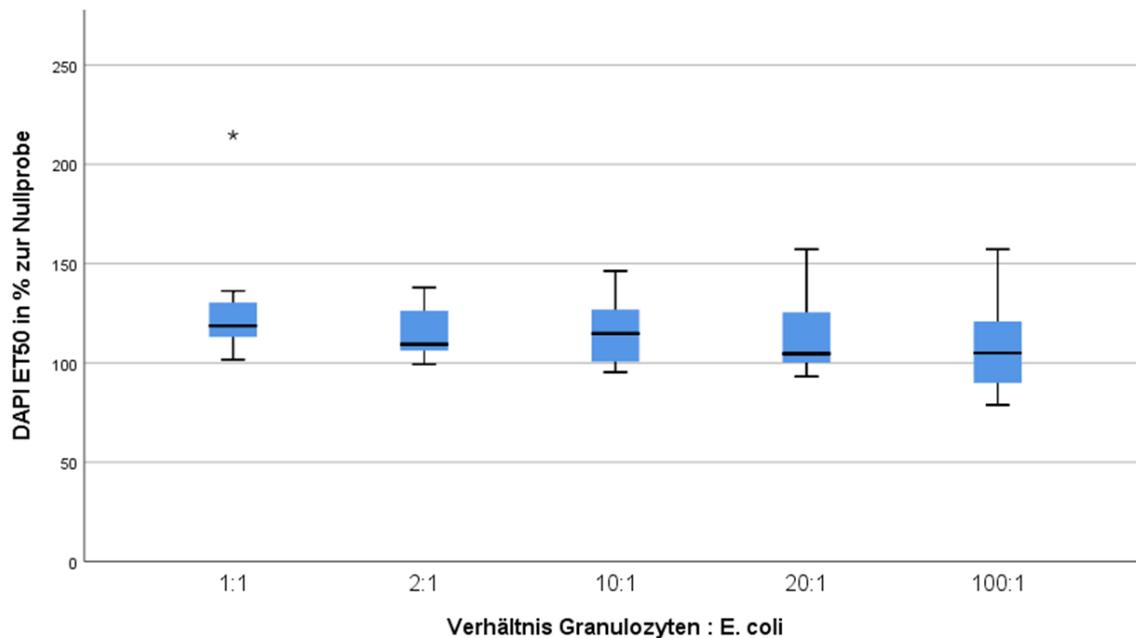
Abbildung 10: ET50-Werte (min) von MPO-APC ohne E. coli und mit E. coli (1:1)

Es liegen signifikant kleinere ET50-Werte in der Gruppe mit E. coli (1:1) vor. Hier weichen die Mittelwerte der normalverteilten Einzelergebnisse um 67 Minuten voneinander ab. Bei einer Versuchsanzahl von  $N = 6$  mit E. coli und  $N = 13$  ohne E. coli liegt die Signifikanz im t-Test bei ungleichen Varianzen bei  $p = 0,003$ .

#### 6.1.2 NETose in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen von E. coli

Es wurden 11 Versuche mit verschiedenen E. coli-Konzentrationen und DAPI im  $\mu$ -Slide VI 0.1 ausgewertet. Um den interindividuellen Fehler der Versuche auszugleichen, wurden hier nicht die ET50-Absolutwerte direkt verglichen, sondern pro Versuch die ET50-Werte relativ

zum ET50-Wert der Kontrolle (Kanal ohne E. coli) gesetzt. Der Kontrolle jedes Versuchs wird der Wert 100 % zugeordnet, sie ist deshalb in Abbildung 11 nicht dargestellt.

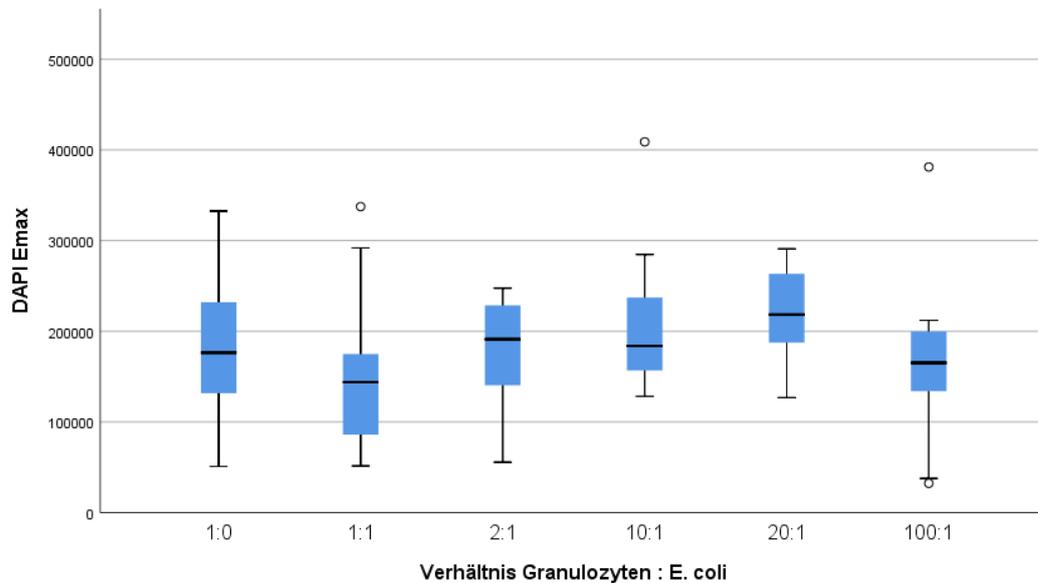


**Abbildung 11: DAPI ET50-Werte in % zur Kontrolle nach fünf E. coli-Konzentrationen**

Man sieht, dass die mittleren DAPI ET50 Werte bei allen E. coli-Konzentrationen über 100 % liegen, ohne sich signifikant voneinander zu unterscheiden. Dies bedeutet, dass die ET50-Werte von DAPI mit E. coli höher liegen als ohne E. coli, unabhängig von den vorliegenden Konzentrationsverhältnissen von 1:1 bis 100:1.

Die relativen MPO-ET50-Änderungen zum ET50-Wert der Kontrolle von MPO-APC waren ebenso gering wie von DAPI und ebenfalls statistisch nicht signifikant.

Um unter den Ansätzen vergleichen zu können, wie viel NETose insgesamt betrieben wird, unabhängig von der Zeit, wurden auch die E(max)-Werte von DAPI ausgewertet und sind in folgender Abbildung 12 dargestellt.

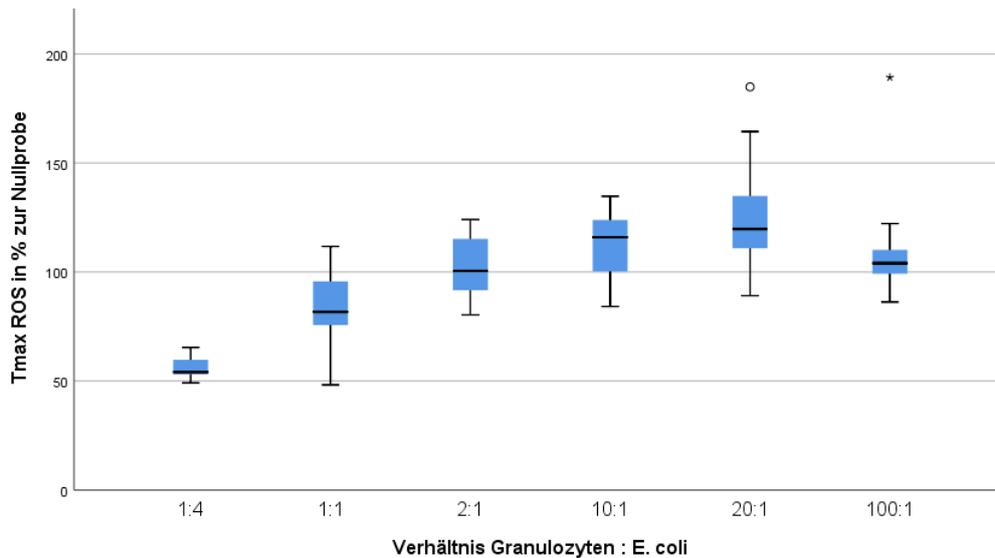


**Abbildung 12: E(max) von DAPI nach E. coli-Konzentration**

Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied im paarweisen Vergleich dieser Gruppen.

### 6.1.3 ROS-Produktion in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen von E. coli

Zur Auswertung des Signals von Rhodamin 123 in Abhängigkeit der E. coli- Konzentration konnten 13 Versuche eingeschlossen werden. Auch hier wurden nicht direkt die T(max)-Werte verwendet, sondern die Werte relativ zum T(max)-Wert der Kontrolle eines jeden Versuchs gesetzt. Somit bekommt die Kontrolle immer den Wert 100 % und ist nicht im Boxplot (Abbildung 13) aufgeführt. Für diese Versuchsreihe wurden weitere Versuche angefertigt mit einem Verhältnis der Granulozyten zu E. coli von 1:4, um den Effekt von sehr hohen Bakterienkonzentrationen zu messen. Aus dieser Gruppe gingen keine Daten von DAPI und MPO-APC hervor, weil die Kurvenverläufe durch Phoenix nicht angepasst werden konnten.



**Abbildung 13: T(max) von ROS in % zur Kontrolle nach 6 verschiedenen E. coli-Konzentrationen**

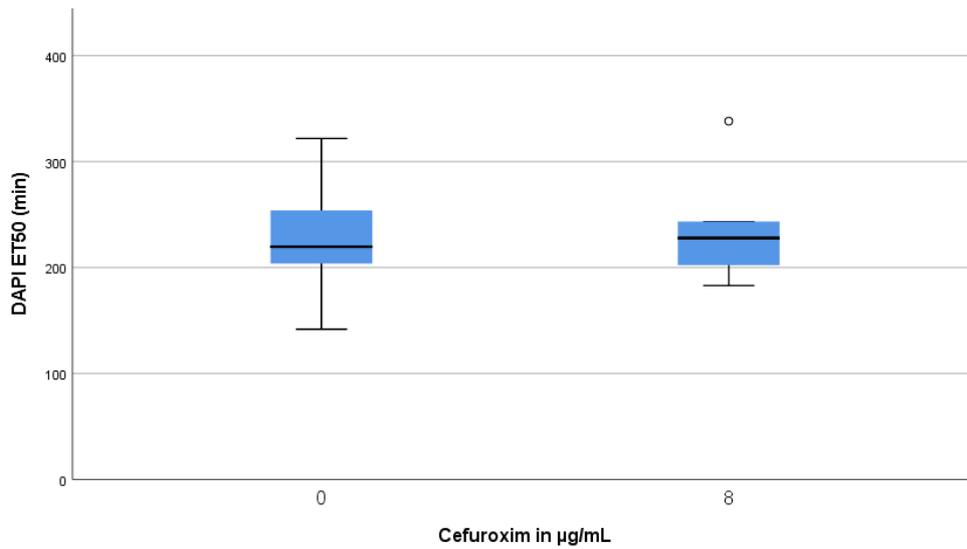
Es ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Kruskal-Wallis-Test und nach Bonferroni-Korrektur zwischen manchen Gruppen. (siehe Tabelle 3) Bei einem 1:4-Verhältnis verringert sich der T(max)-Wert um fast 50 %.

Stichprobe 1 – Stichprobe 2	Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur
1:4 – 2:1	p = 0,008
1:4 – 10:1	p < 0,001
1:4 – 20:1	p < 0,001
1:4 – 100:1	p = 0,001
1:1 – 20:1	p = 0,006

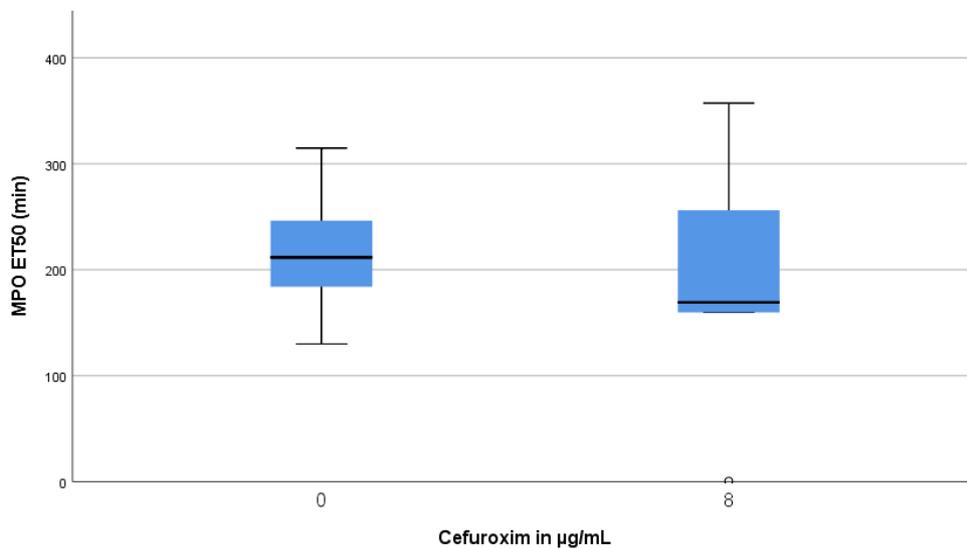
**Tabelle 3: p-Werte der Stichprobenvergleiche von T(max) ROS in %**

#### 6.1.4 NETose Beeinflussung durch Cefuroxim

Um auszuschließen, dass der in den obigen Diagrammen dargestellte Effekt nicht von den E. coli, sondern vom Cefuroxim stammt, wurde in 10 Versuchen ein Kanal nur mit Cefuroxim, jedoch ohne E. coli ausgestattet. Der Effekt des Cefuroxims auf die ET50-Werte von DAPI und MPO-APC wird in Abbildung 14 und Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 14: Die ET50-Werte von DAPI in Abhängigkeit von Cefuroxim (8µg/mL)**

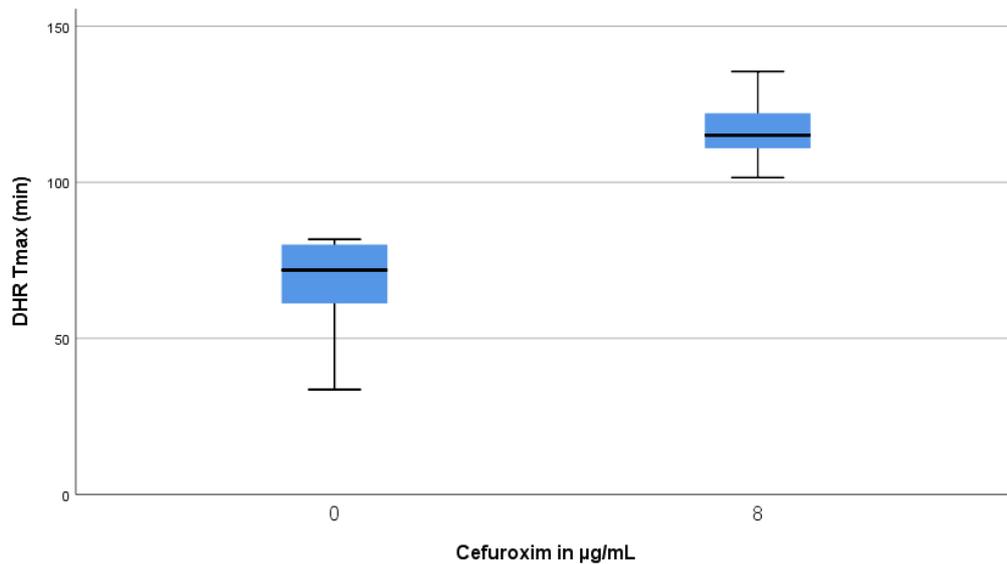


**Abbildung 15: Die ET50-Werte von MPO-APC in Abhängigkeit von Cefuroxim (8µg/mL)**

Sowohl für DAPI als auch für MPO-APC ergibt sich im Mann-Whitney-U-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit und ohne Cefuroxim.

### 6.1.5 ROS-Produktion Beeinflussung durch Cefuroxim

Ebenso wurden die T(max)-Werte von Rhodamin 123 in Abhängigkeit von Cefuroxim ausgewertet (Abbildung 16).



**Abbildung 16: T(max) der ROS-Produktion in Minuten abhängig von Cefuroxim**

Es zeigt sich, dass bei Anwesenheit von 8 µg/mL Cefuroxim die T(max)-Werte höher sind. Die Werte sind normalverteilt. Bei einer Anzahl von 5 Versuchen pro Gruppe ergab sich ein Mittelwert von T(max) ohne Cefuroxim von 65,7 und mit Cefuroxim von 117,0 Minuten. Die mittlere Verzögerung des T(max) von ROS durch Cefuroxim von 51,3 Minuten ist im t-Test bei gleichen Varianzen mit  $p = 0,001$  signifikant.

### 6.1.6 Migration Beeinflussung durch Cefuroxim

Im Folgenden werden die Migrationsparameter Track Length, Track Straightness und Track Displacement in Abhängigkeit von Cefuroxim dargestellt.

Die Track Lengths der ersten beiden halben Stunden nach Mikroskopstart sind in Abbildung 17 zu sehen, die dazugehörigen statistischen Daten in Tabelle 4.

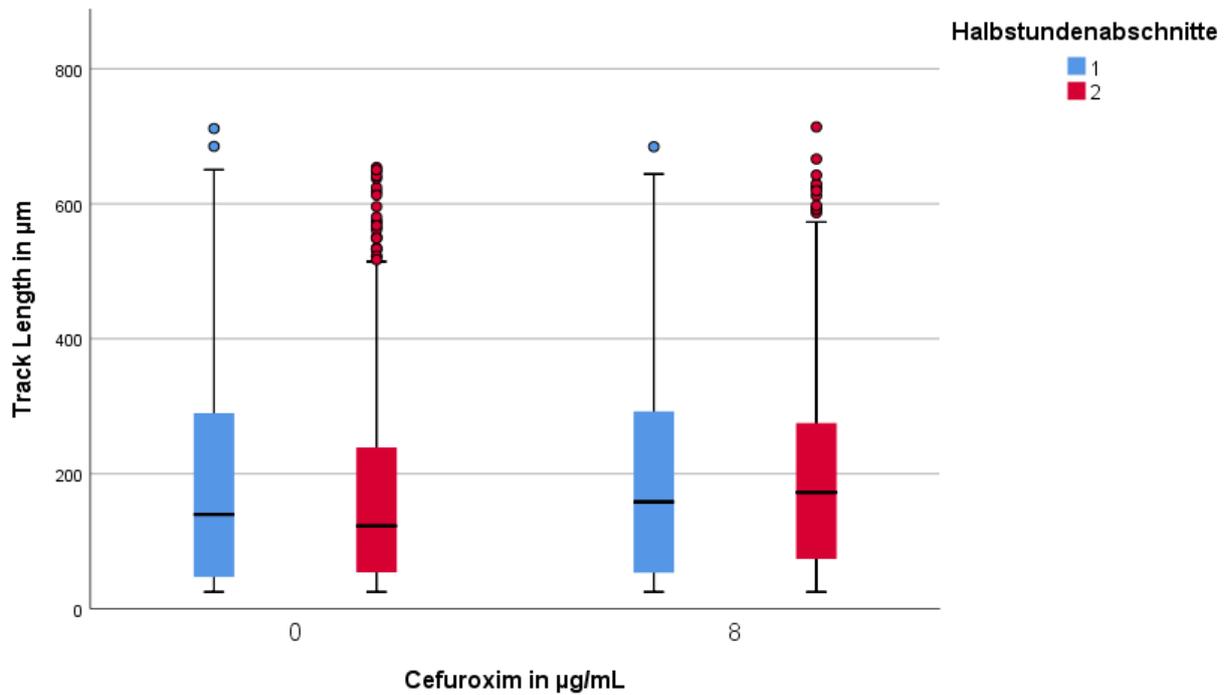


Abbildung 17: Track Length in Abhängigkeit von Cefuroxim, nach 1. und 2. Halbstunde

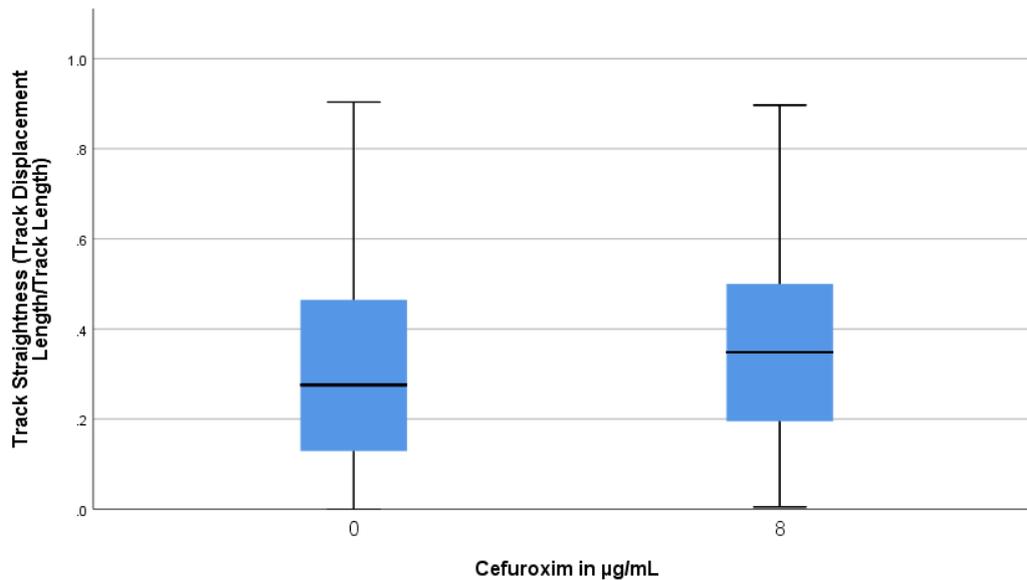
Halbstunden-Abschnitt	Cefuroxim [µg/mL]	Anzahl der Tracks	Mittelwert [µm]	Mann-Whitney- U
1	0	2283	183,1	p = 0,014
1	8	1914	192,2	
2	0	1769	161,9	p < 0,001
2	8	1662	189,3	

Tabelle 4: Statistik der Track Length nach Cefuroxim

Mehr noch als die erste halbe Stunde des Beobachtungszeitraums zeigt die zweite halbe Stunde einen Anstieg der Track Length durch Cefuroxim (8 µg/mL) um 16,9 %. Dieser Unterschied ist mit  $p < 0,001$  hochsignifikant.

In der dritten halben Stunde sind die Unterschiede nicht mehr signifikant und nur eine leichte Tendenz zu erkennen.

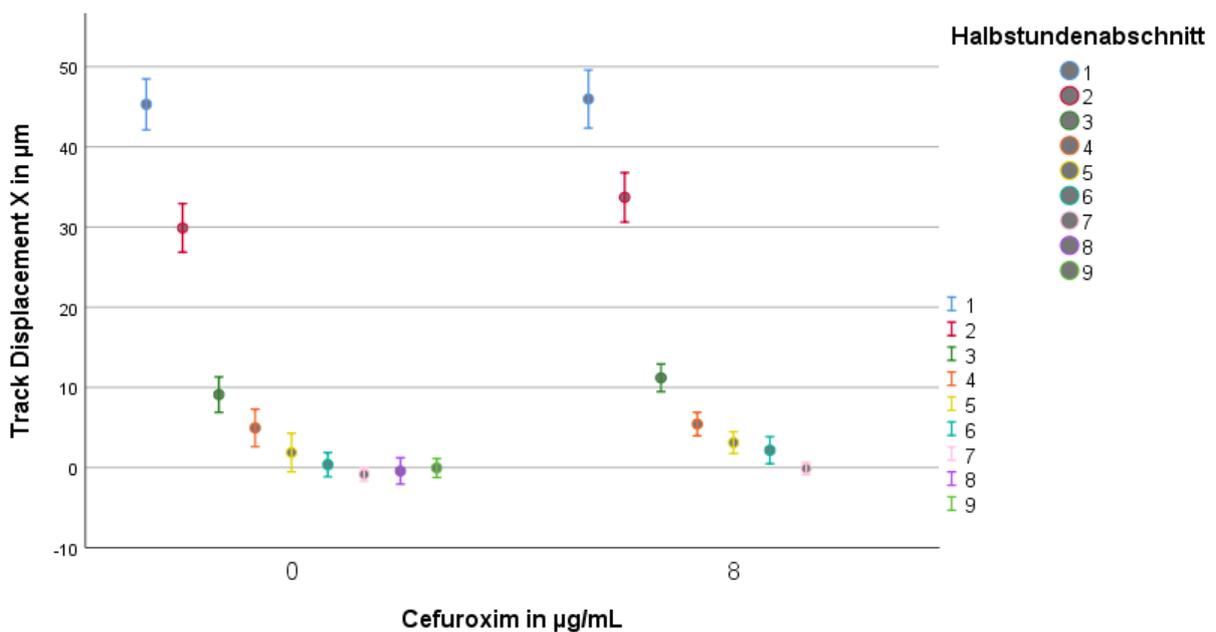
Für die Track Straightness wurden die Messungen der ersten halben Stunde im Boxplot dargestellt (Abbildung 18).



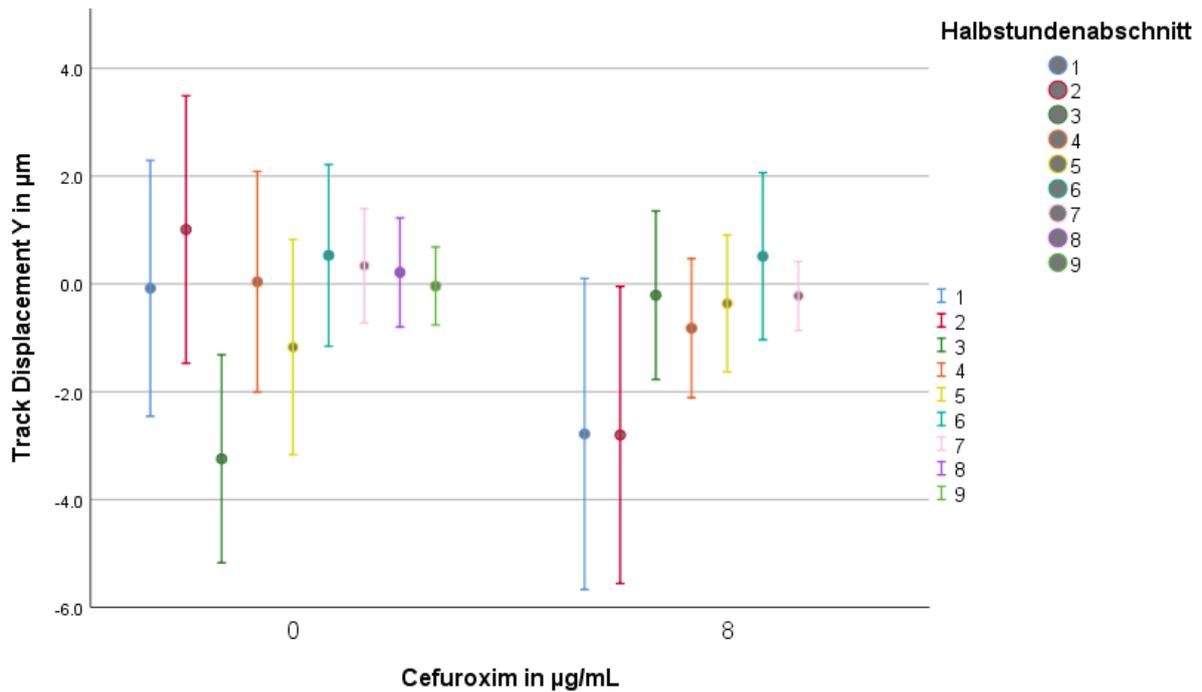
**Abbildung 18: Track Straightness der 1. halben Stunde, nach Cefuroxim-Konzentration**

In der abgebildeten ersten halben Stunde der Migration findet sich ein signifikanter Unterschied der Straightness. Der Mittelwert der Gruppe mit Cefuroxim ist mit 0,36 um 0,05 höher als ohne Cefuroxim. In der weiteren Beobachtungszeit findet sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Track Straightness mehr.

Zur Überprüfung der Methodik an sich sowie zum Vergleich der Migration mit und ohne Cefuroxim wurde das Track Displacement in X- (Abbildung 19) und in Y-Richtung (Abbildung 20) ausgewertet.



**Abbildung 19: Track Displacement in X-Richtung nach Cefuroxim-Konzentration und Zeit**



**Abbildung 20: Track Displacement in Y-Richtung nach Cefuroxim-Konzentration und Zeit**

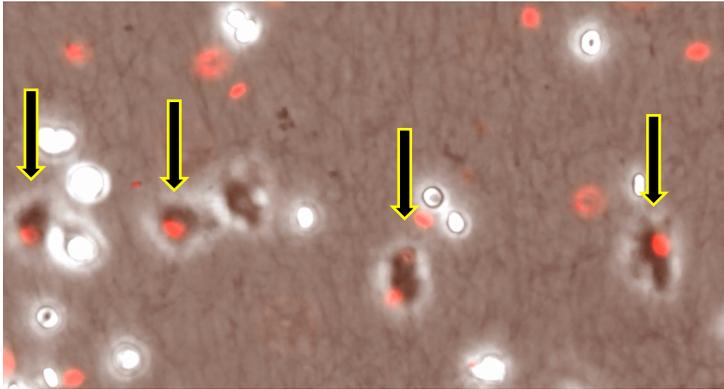
Abbildung 19 zeigt, dass sich die Spots (Granulozyten) in den ersten zwei halben Stunden deutlich in X-Richtung zum Lockstoff bewegen, dies wird mit fortschreitender Zeit immer weniger. Dies gilt für die Gruppen mit und ohne Cefuroxim gleichermaßen, allerdings zeigt sich die Tendenz, dass ein hohes Displacement mit Cefuroxim etwas länger anhält.

In Abbildung 20 wiederum sieht man, dass die Migration in Y-Richtung, vertikal zum chemotaktischen Gradienten, in einer viel kleineren Größenordnung stattfindet. Auch hier wird das Track Displacement mit fortschreitender Zeit immer kleiner und geht gegen Null. Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne Cefuroxim sind hier nicht zu erkennen.

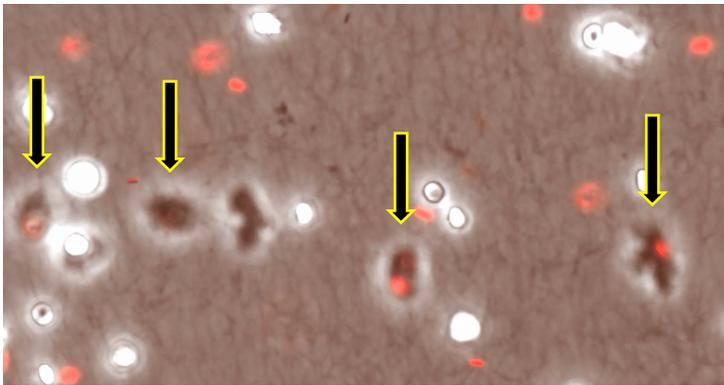
### 6.1.7 Phagozytose

Die Quantifizierung der Phagozytose von *E. coli* durch Granulozyten gestaltete sich schwierig, dennoch konnten einige Beobachtungen der Phagozytose gemacht werden.

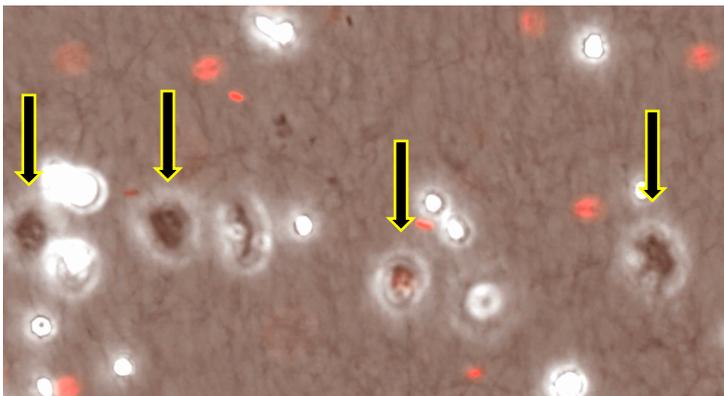
In Abbildung 21 sind in grau (Phasenkontrast) mehrere Granulozyten zu sehen, die rot leuchtende (GFP-Signal) Stäbchenbakterien in ihrem Zellinneren tragen. Das Leuchten dieser *E. coli* erlischt innerhalb von etwa 30 Minuten (Abbildung 22, Abbildung 23). Im Gegenzug produzieren nicht phagozytierte *E. coli* weiterhin GFP. Anschließend runden sich die Zellen ab (Abbildung 24), und gehen etwa 30 min später in die NETose, wie am blauen DAPI-Signal erkennbar ist (Abbildung 25).



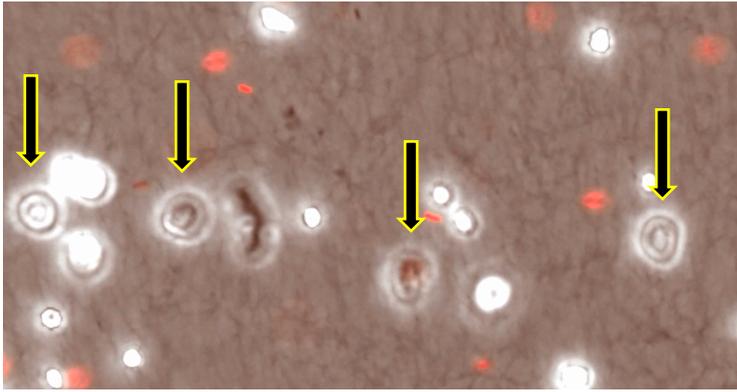
**Abbildung 21: Fluoreszierende E. coli in Granulozyten,  
T 00:04:11**



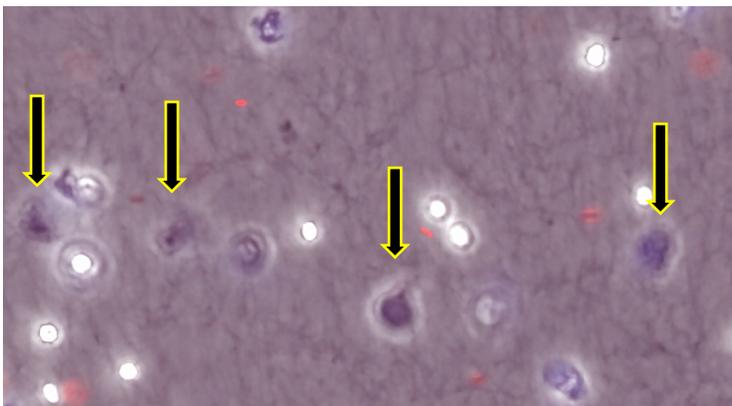
**Abbildung 22: Sukzessives Erlöschen des GFP-Signals,  
T 00:19:42**



**Abbildung 23: Phagozytierte E. coli produzieren  
kein GFP mehr, T 01:08:28**



**Abbildung 24: Abrunden der Phagozyten, T 01:17:11**



**Abbildung 25: Anfärbung durch DAPI Freigabe von DNA, NETose, T 01:48:00**

Eine weitere Videoaufnahme zeigte die Internalisierung eines Bakteriums durch einen Granulozyten und ist untenstehend anhand von 7 Standbildern dargestellt. Über Abbildung 26, Abbildung 27 und Abbildung 28 lässt sich die Phagozytose eines fluoreszierenden *E. coli* durch einen mit dem linken Pfeil markierten Granulozyten erkennen. Das Erlöschen des GFP-Signals bleibt zunächst aus und die beiden mit Pfeil markierten Zellen mit internalisiertem *E. coli* bewegen sich für ca. 1,5 Stunden heftig (Abbildung 29). 15 min später runden sich die Zellen ab (Abbildung 30), und rupturieren 30 min danach (Abbildung 31). Es dauert noch weitere 2 h bis das GFP-Signal der *E. coli* verblasst (Abbildung 32).

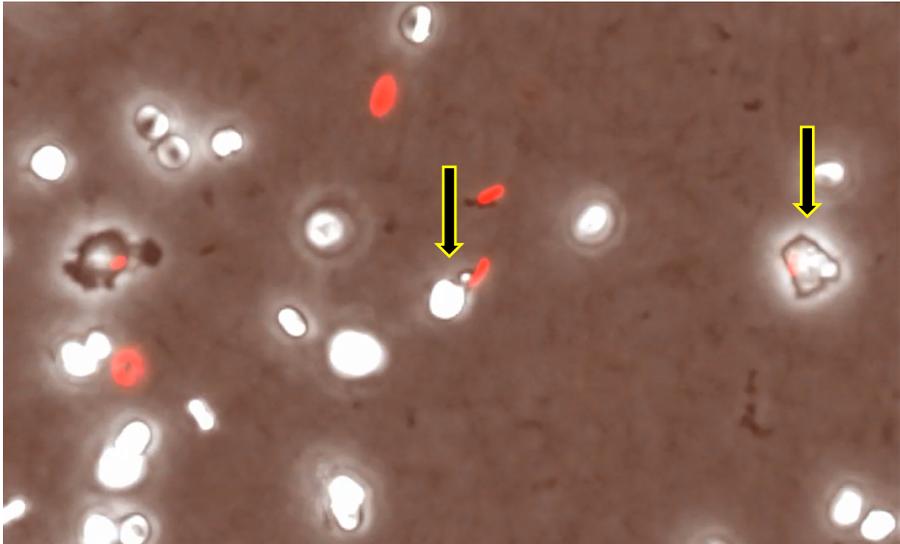


Abbildung 26: Granulozyten treten in Kontakt mit E. coli, T 00:01:52

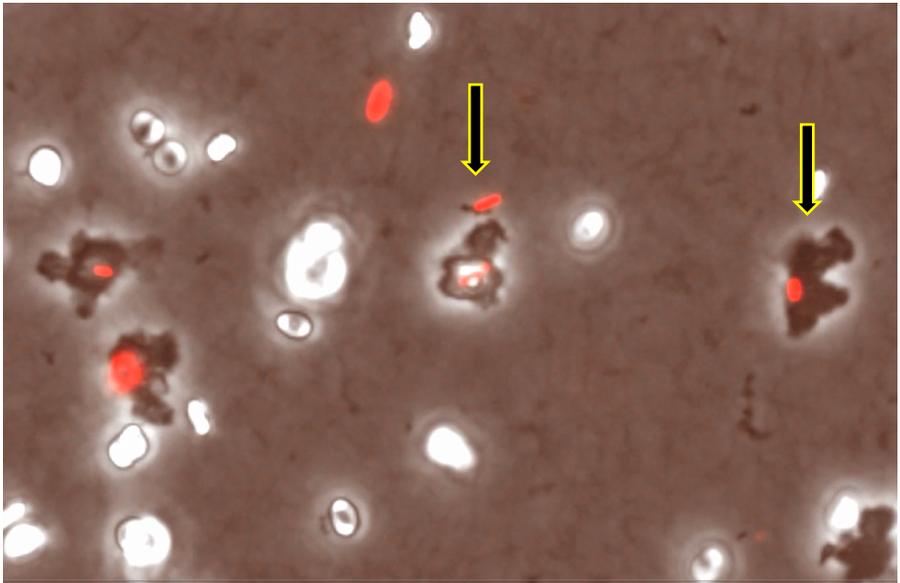
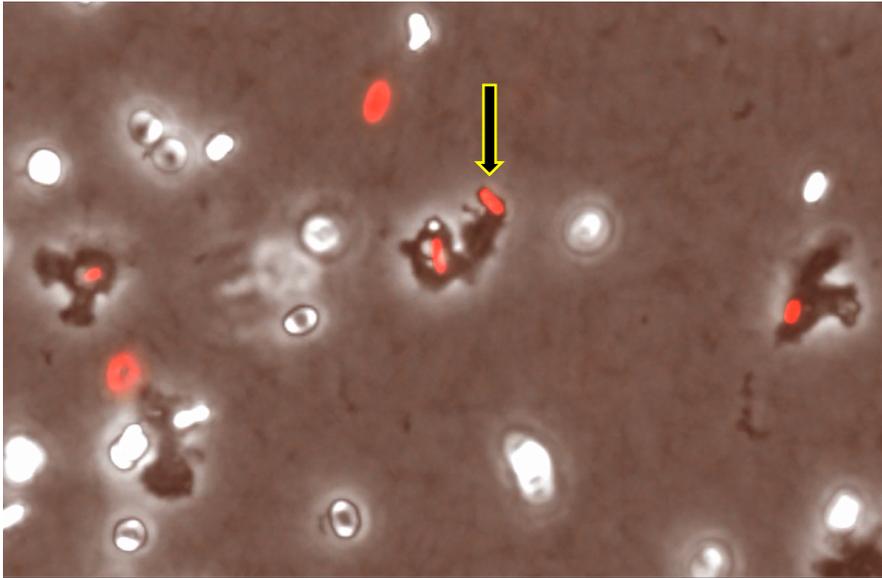
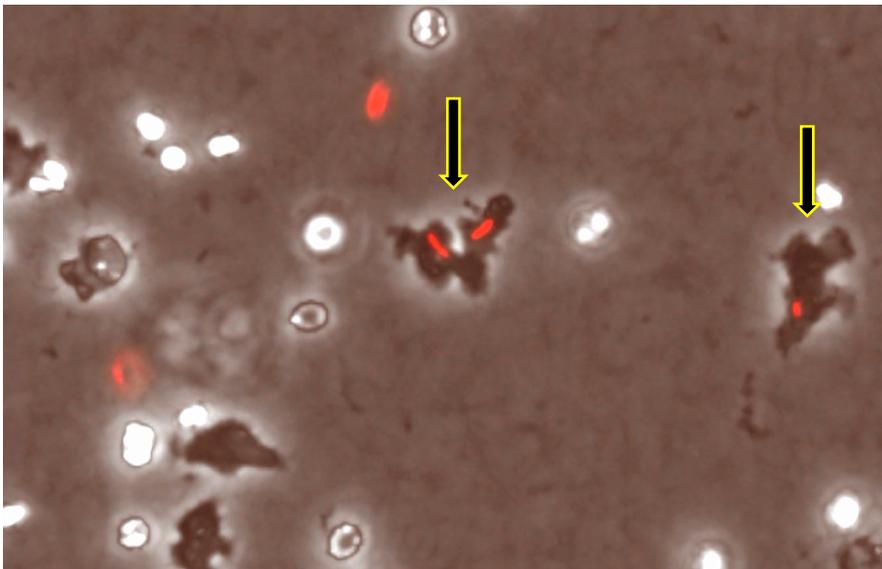


Abbildung 27: E. coli werden internalisiert, T 00:05:59



**Abbildung 28: E. coli von Granulozytenmembran (dunkle Umrandung) umschlossen, T 00:10:28**



**Abbildung 29: Fortlaufende Bewegung der Zellen bis T 1:45:07**

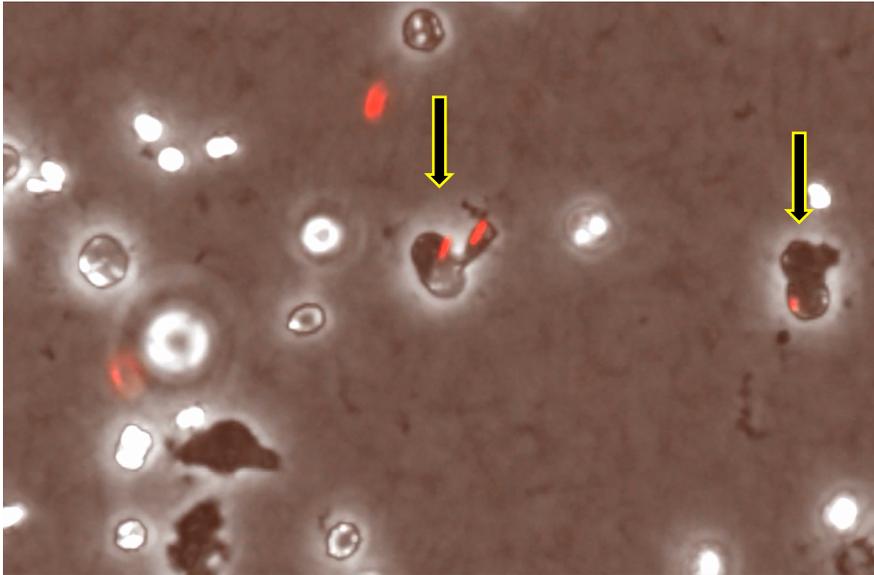


Abbildung 30: Abrundung der Granulozyten, T 2:04:58

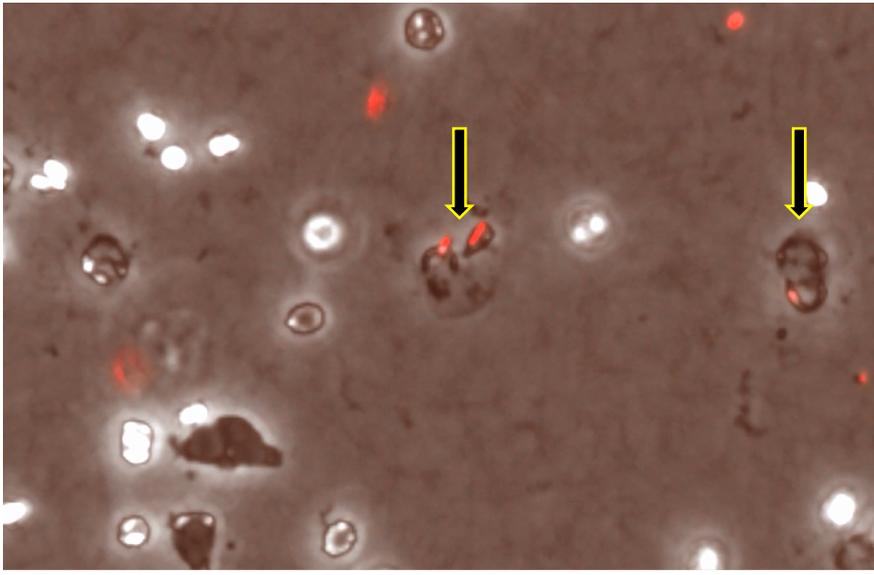
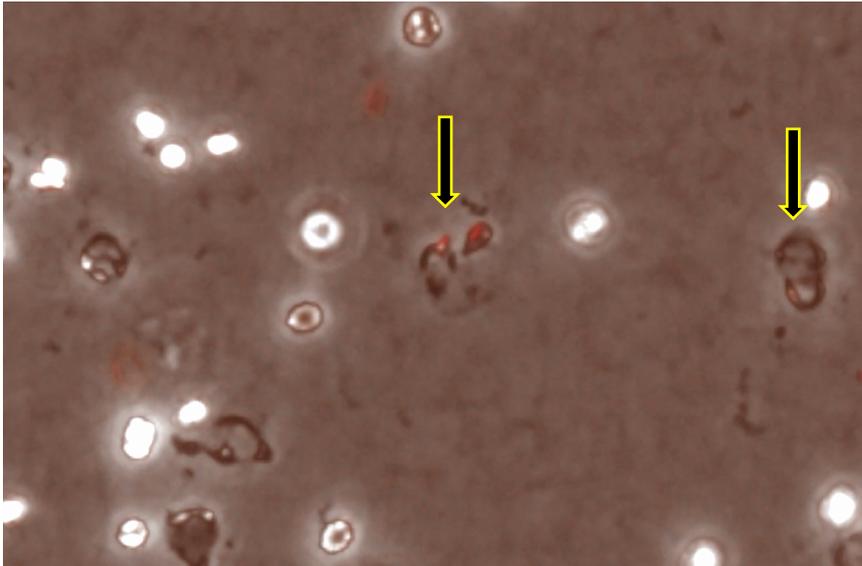


Abbildung 31: Ruptur der Zellmembran, NETose, T 2:35:39,

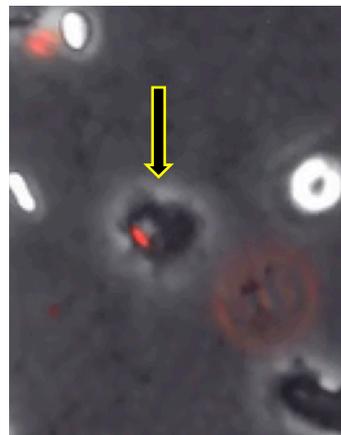


**Abbildung 32: Das GFP Signal ist verblasst, T 4:28:39**

In den nächsten Aufnahmen (Abbildung 33 bis Abbildung 37) sieht man ein jeweils mit Pfeil markiertes leuchtendes *E. coli*-Bakterium innerhalb eines Granulozyten, dann das Verblaszen und Erlöschen des GFP-Signals und folgend ein Abrunden der Zelle mit anschließender Ruptur der Zellmembran und dem Freiwerden von DNA. Die extrazelluläre DNA ist durch DAPI in blau sichtbar. Dieser Vorgang konnte regelmäßig beobachtet werden.



**Abbildung 33: *E. coli* in Granulozyt, T 00:03:14**



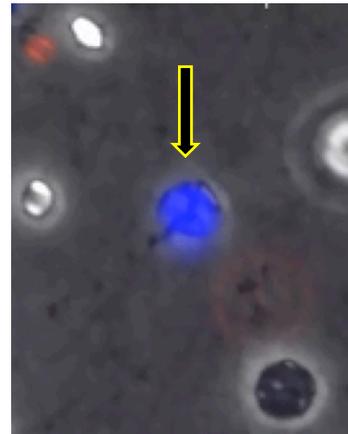
**Abbildung 34: Verblaszen des GFP-Signals, T 00:22:44**



**Abbildung 35: GFP-Signal ausgelöscht, T 00:33:24**

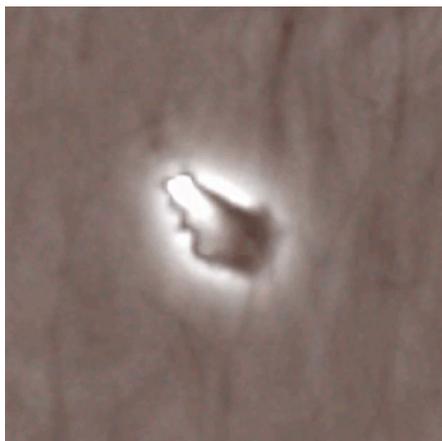


**Abbildung 36: Abrunden der Zelle, T 01:40:14**

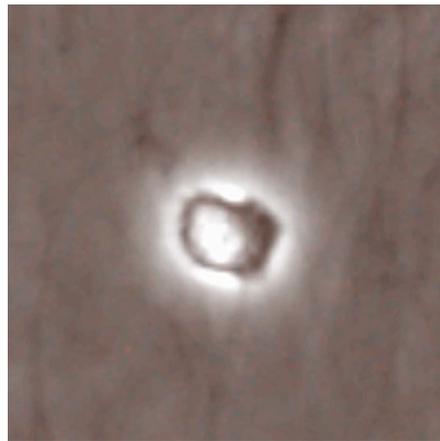


**Abbildung 37: Anfärbung extrazellulärer DNA durch DAPI, T 02:00:39**

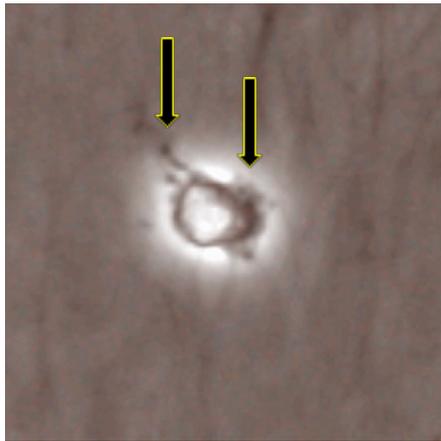
Außerdem konnte beobachtet werden, wie ein Granulozyt kurz vor seiner NETose bereits internalisierte Stäbchenbakterien wieder freigibt (Abbildung 38 bis Abbildung 42). Bei dieser schlagartigen Freigabe von 8-10 Bakterien rupturiert die Zellmembran nicht. Dies tut sie erst 15 Minuten später unter Abgabe von DNA in den Extrazellulärraum, wie durch das DAPI-Signal in Abbildung 42 angezeigt wird. Die frei gewordenen E. coli geben kein GFP-Signal ab, bewegen sich aber aktiv.



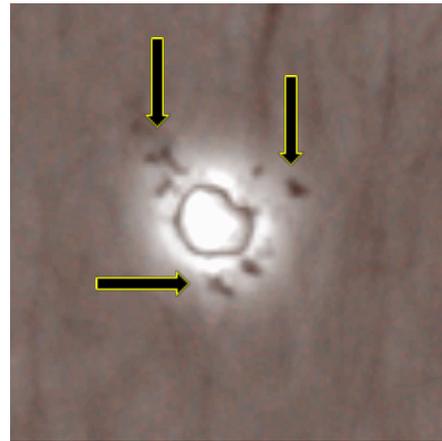
**Abbildung 38: Phagozytierender Granulozyt, T 00:50:47**



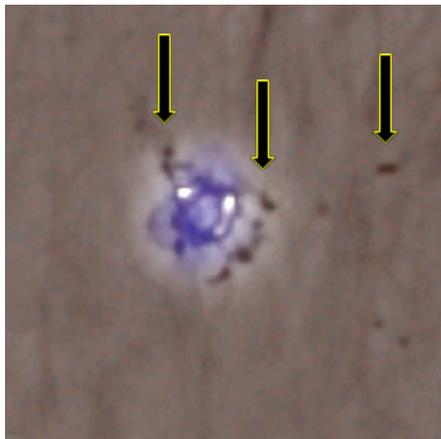
**Abbildung 39: Abrundung der Zelle, T 01:43:47**



**Abbildung 40: E. coli werden plötzlich frei. T 01:57:16**



**Abbildung 41: Eigenbewegliche E. coli schwärmen aus. T 01:58:40**



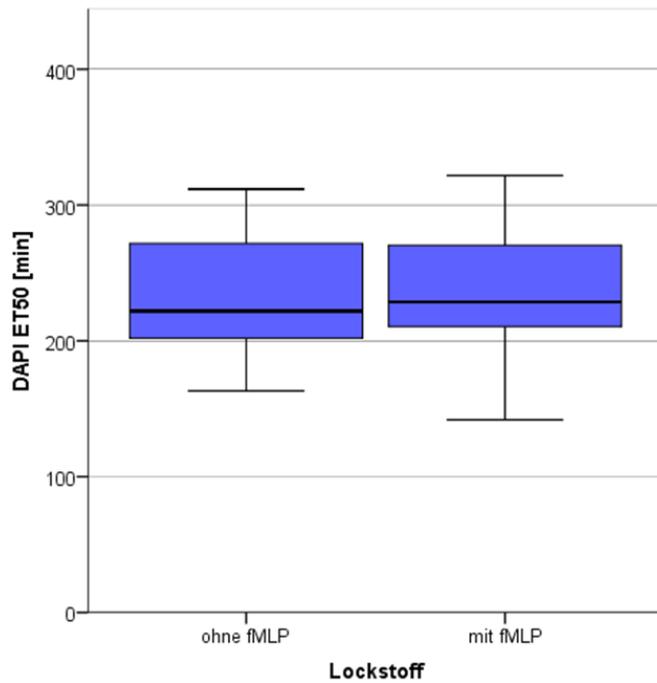
**Abbildung 42: NETose (blau), T 02:13:00**

## 6.2 Ergebnisse zur Methodenentwicklung

### 6.2.1 Der Effekt von fMLP auf die NETose

Bei Nutzung der Chemotaxiskammer kamen die Granulozyten stets mit einem Lockstoff, nämlich fMLP in Kontakt. Um auszuschließen, dass mögliche Veränderungen durch die E. coli nicht in Wirklichkeit durch das fMLP ausgelöst wurden, haben wir Versuche angefertigt, bei denen Granulozyten nur fMLP oder nur Medium ausgesetzt waren.

Das Ergebnis in Bezug auf die Bildung der NETs ist in Abbildung 43 dargestellt.



**Abbildung 43: ET50-Werte von DAPI nach Lockstoff**

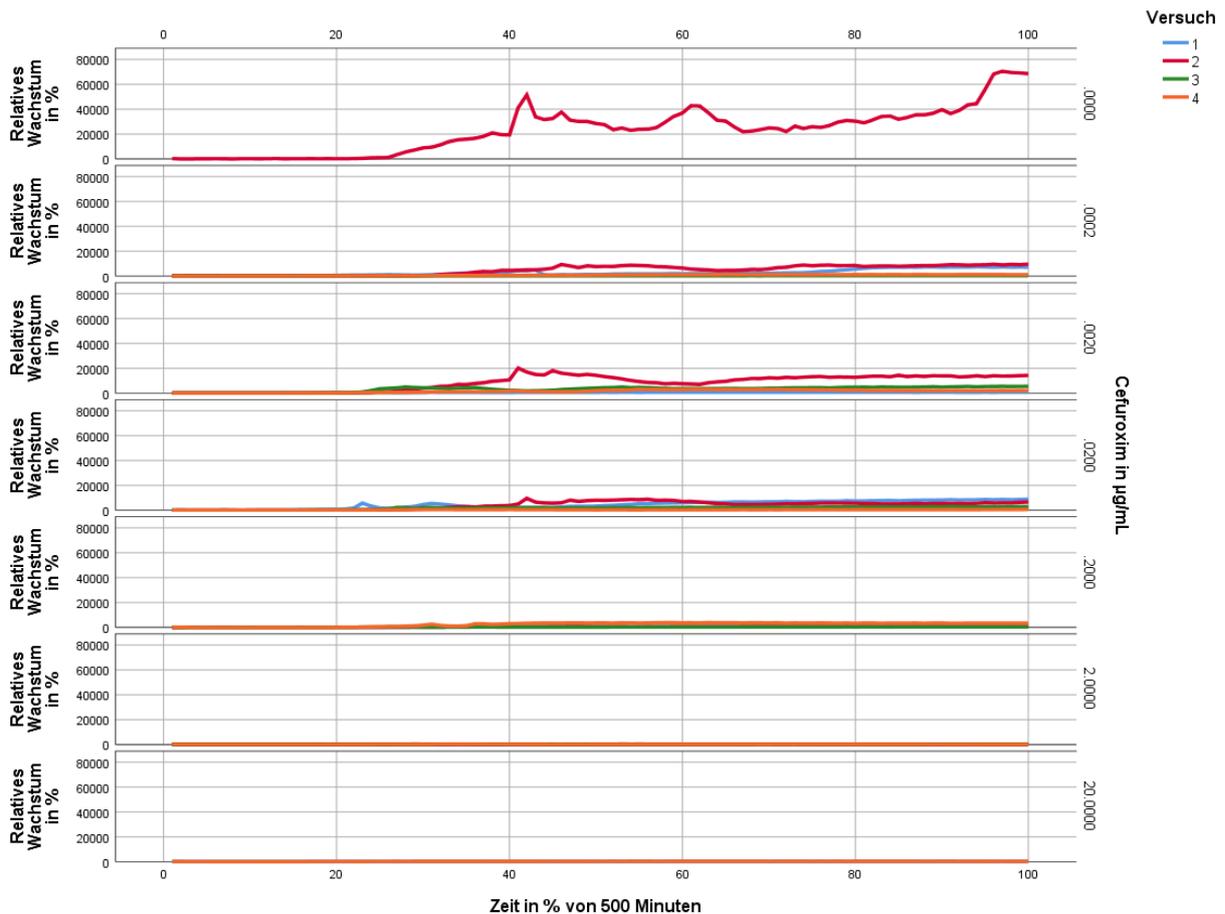
Ohne Lockstoff ergab sich aus 8 Messungen ein Mittelwert des ET50 von DAPI von 233,3 Minuten und mit Lockstoff aus 12 Messungen ein Mittelwert von 231,3 Minuten.

Zwischen den Gruppen besteht kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p = 0,93$  im t-Test) bei gleichen Varianzen und Normalverteilung.

Ebenso besteht bei der Betrachtung des Zeitpunkts der maximalen ROS-Produktion kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

### 6.2.2 Die Bestimmung der Cefuroxim-Konzentration

Es wurden vier Versuche nach der unter 4.6. beschriebenen Methodik zur Bestimmung einer geeigneten Cefuroxim-Konzentration durchgeführt. Die Wachstumskurven sind in Abbildung 44 dargestellt und zeigen nicht das absolute, sondern das relative Wachstum der Bakterienkonzentration über eine Zeit von 500 Minuten an.

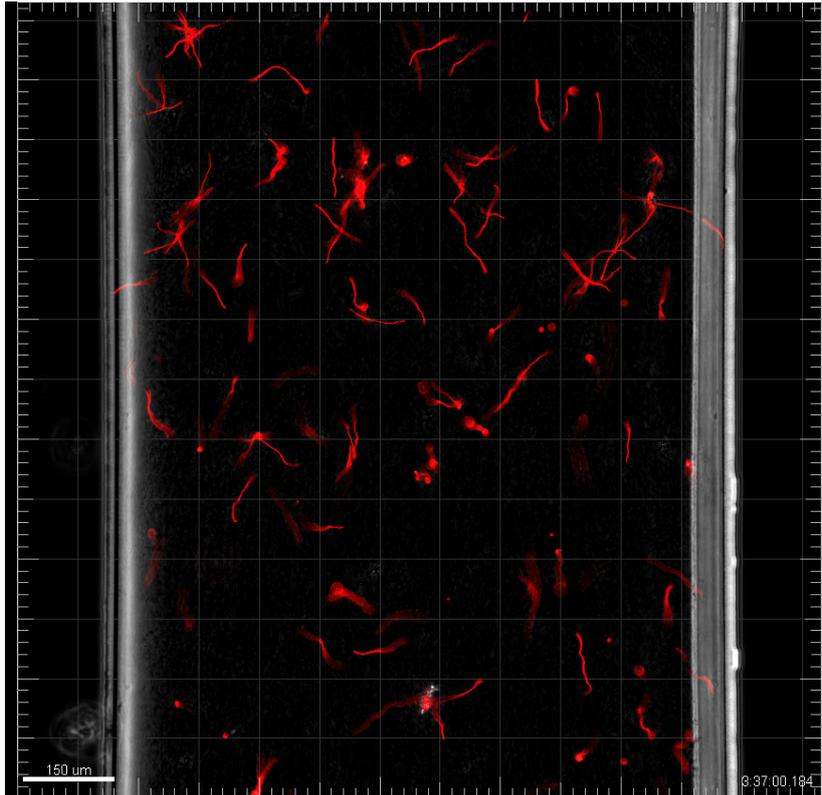


**Abbildung 44: Wachstumskurven von E. coli unter Cefuroxim-Konzentrationen**

Aus dem Diagramm lässt sich erkennen, dass eine Wachstumshemmung bei den Konzentrationen von 2 µg/mL und 20 µg/mL eintritt. Bei niedrigeren Konzentrationen liegt das relative Wachstum nach 500 Minuten bei etwa 10 Verdopplungen.

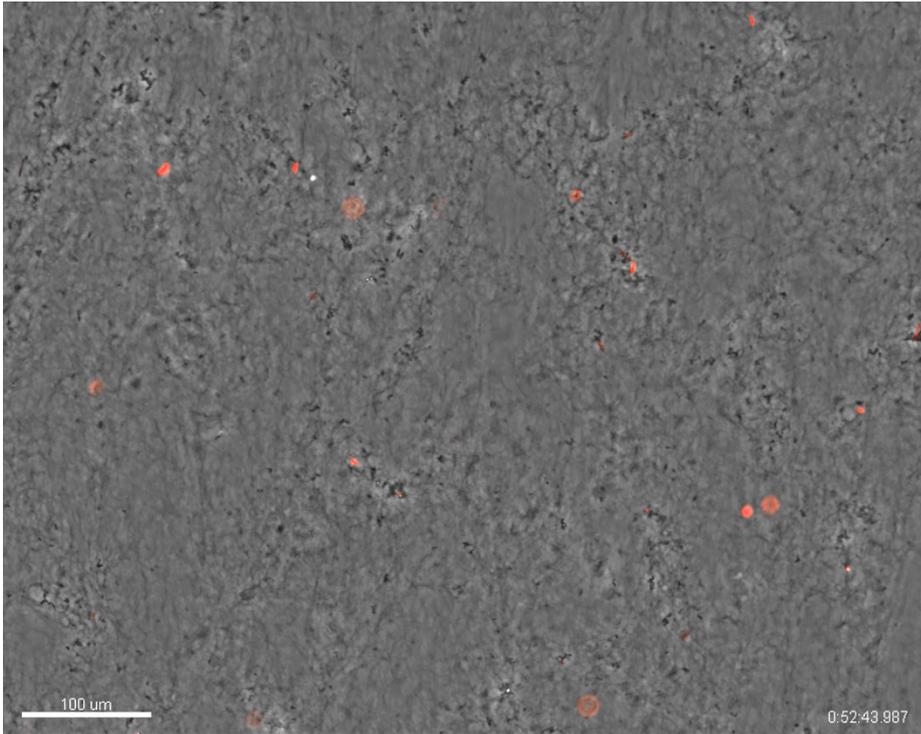
Trotz der Wachstumshemmung mit Cefuroxim waren Schwankungen in der Größe der E. coli Population innerhalb eines Zeitraums von etwa 8 Stunden zu sehen. Des Weiteren exprimierte ein relevanter Anteil der E. coli kein GFP. Diese E. coli hatten das GFP-Plasmid verloren und waren somit nicht mehr fluoreszenzaktiv, aber im Phasenkontrast als bewegliche Stäbchen erkennbar.

Auffällig war, dass bei den zwei höchsten Konzentrationen die E. coli sich zwar nicht stark vermehrten, aber ihre Zellgröße enorm zunahm. Die Länge des Stäbchenbakteriums liegt normalerweise bei etwa 7 µm, diese nahm allerdings auf bis zu 150 µm zu (Abbildung 45).

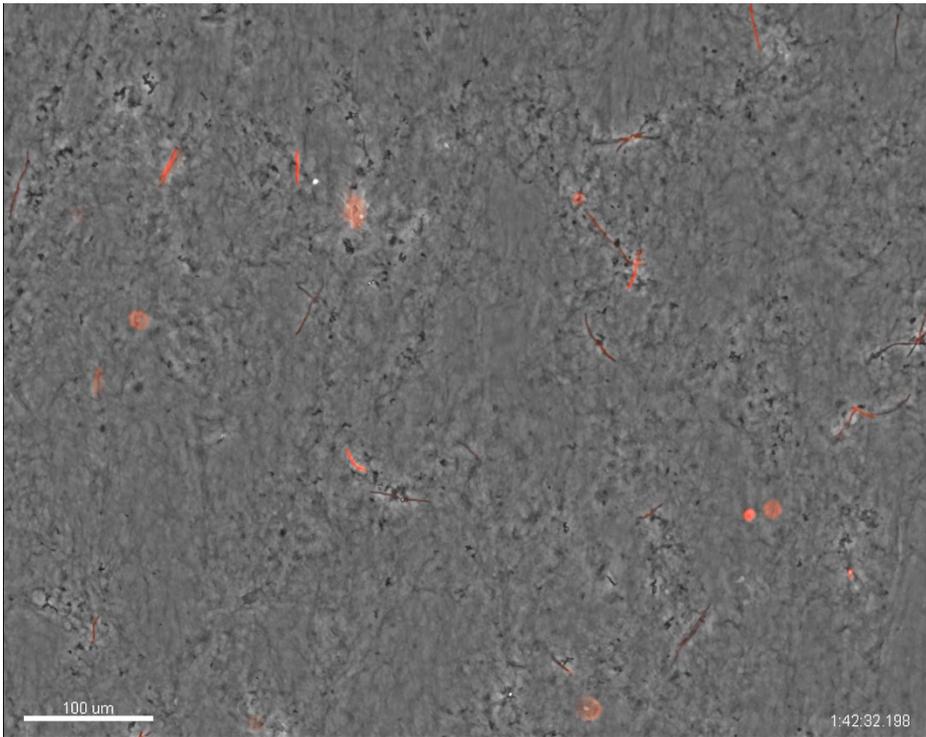


**Abbildung 45: Schwellung der *E. coli* unter hohen Cefuroxim-Konzentrationen**

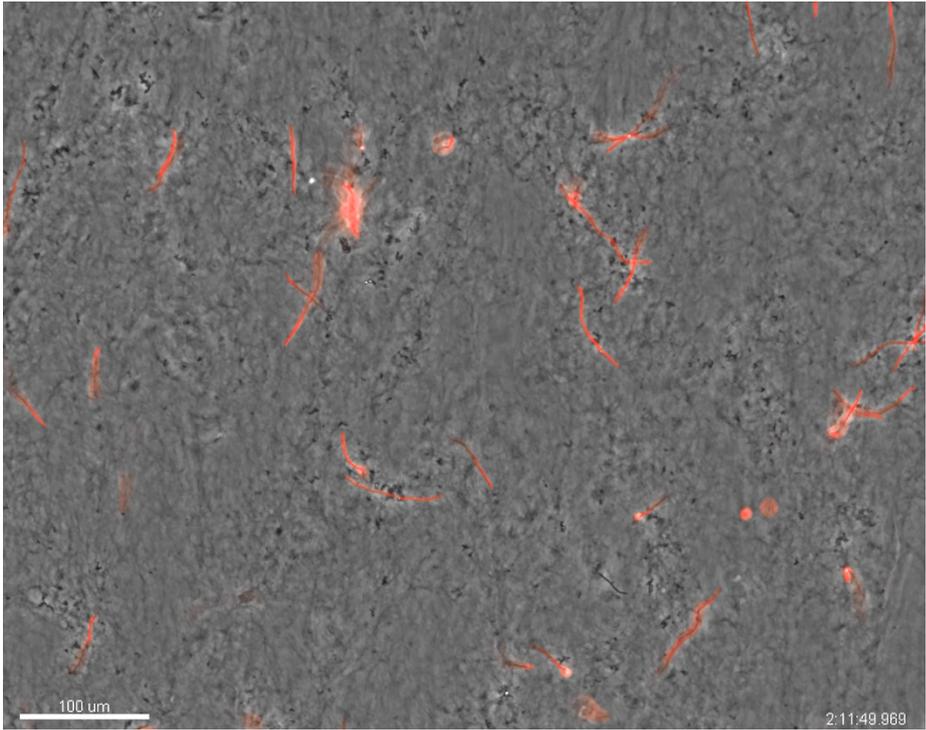
In Abbildung 45 ist ein Bild des Fluoreszenzmikroskops nach 3 h 37 min zu sehen. Das Phasenkontrast-Bild wurde mit dem GFP-Bild übereinandergelegt. Der Phasenkontrast zeigt hier lediglich die Ränder des Kanals, die rot leuchtenden Streifen sind die GFP produzierenden *E. coli*. Das Wachstum wurde auch in einem Zeitraffer-Video veranschaulicht, welches hier als Bilderreihe (Abbildung 46 bis Abbildung 49) dargestellt ist, ebenfalls Phasenkontrast und GFP zeigt und eine Zeit von rund 4 h zusammenfasst.



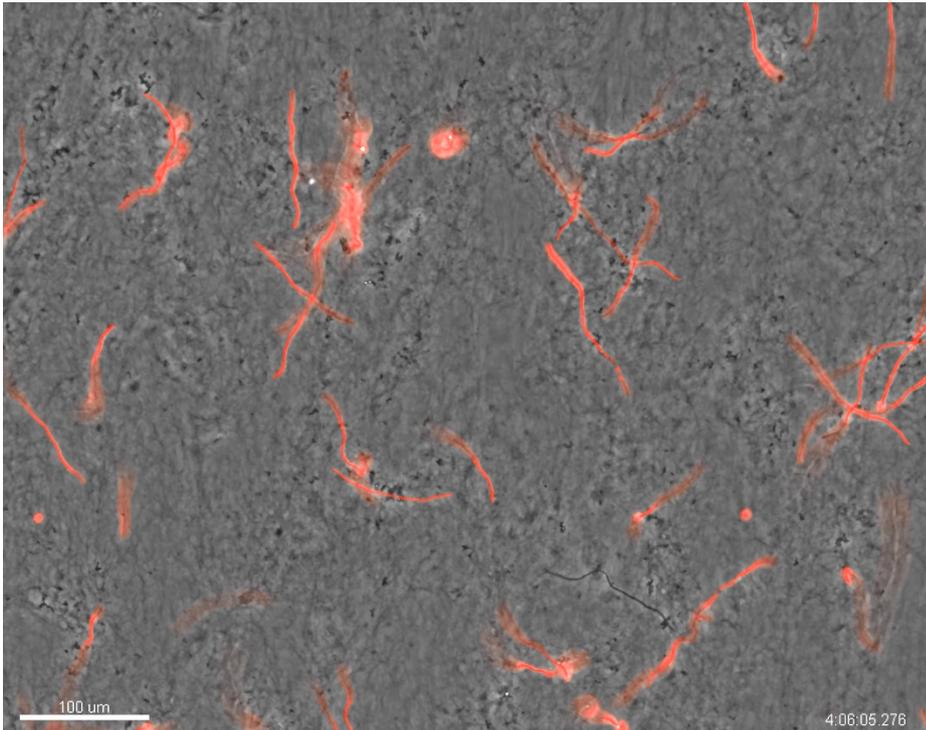
**Abbildung 46: Leuchtende E. coli, T 00:52:43**



**Abbildung 47: Beginn der Schwellung, T 01:42:32**



**Abbildung 48: Starke Schwellung, T 01:11:49**



**Abbildung 49: Extreme Schwellung, T 04:06:05**

### 6.2.3 Alternative Befüllung des Kammersystems

Zur Testung alternativer Versuchsaufbauten mit der Ibidi Chemotaxis-Kammer liegen keine statistischen Daten oder quantifizierbare Ergebnisse vor. Allerdings wurden Beobachtungen gemacht, welche hier vorgestellt werden.

#### a. Reservoirfüllung mit Vollblut

Es konnte weder im Ansatz mit *E. coli*, noch mit fMLP, noch in der Kontrolle ohne Lockstoff eine Einwanderung von Granulozyten oder anderen zellulären Bestandteilen des Blutes aus dem Reservoir in den Kanal beobachtet werden. Vereinzelt wurden Zellen bei Befüllen der Reservoirs in den Kanal gedrückt, allerdings sind diese im Kanal nicht weiter migriert oder haben Zellaktivitäten beobachten lassen. Am Rand des Kanals sind über einen Verlauf von mehreren Stunden erst einige Zellen von DHR, dann MPO-APC und DAPI angefärbt worden. Im Kanal mit den *E. coli* waren vitale, sich vermehrende Bakterien zu beobachten. Ob diese in die Reservoirs einwuchsen, war nicht erkennbar. Abgesehen von den Bewegungen der Bakterien waren über 8 Stunden keine Bewegungen zu sehen und das Bild änderte sich nicht.

#### b. Reservoirfüllung mit isolierten Granulozyten

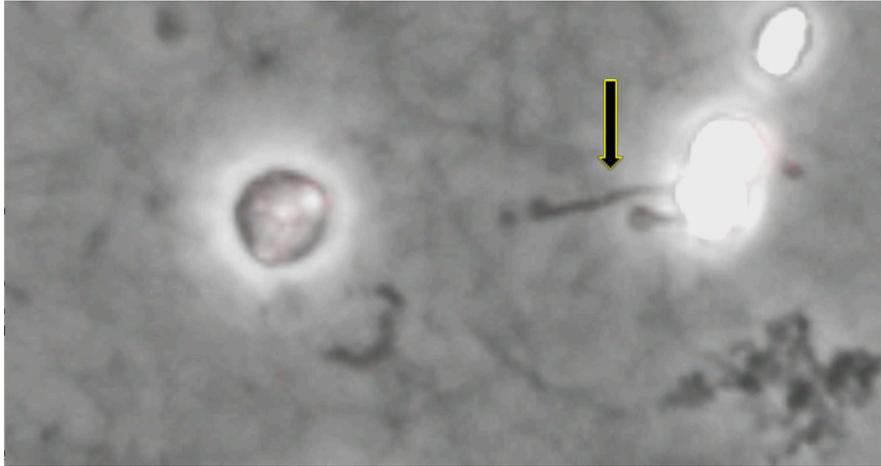
Auch bei der Reservoirfüllung mit isolierten Granulozyten konnte keine deutliche Migration in den Kanal beobachtet werden. Im ersten Versuch mit fMLP oder *E. coli* im Kanal war hier zu sehen, dass die Zellen in den ersten 15 Minuten nach Mikroskopstart in Richtung des Kanals wanderten und dort kumulierten. Keine Zelle wanderte in den Kanal. Die am Übergang von Reservoir zu Kanal gestauten Zellen gingen schon nach etwa 30 Minuten in NETose. Im Kanal ohne fMLP oder *E. coli* wurden beim Befüllen einige Granulozyten in den Kanal gedrückt. Allerdings sieht man, dass innerhalb der ersten 30 Minuten einige Zellen in den Kanal migrierten. Im zweiten Versuch wurden die gleichen Beobachtungen gemacht, mit dem Unterschied, dass im Kanal mit fMLP ein Einwandern weniger Zellen zu beobachten war. Allerdings wurden auch hier beim Befüllen des Reservoirs Granulozyten in den Kanal gedrückt.

### c. Reservoirfüllung mit E. coli

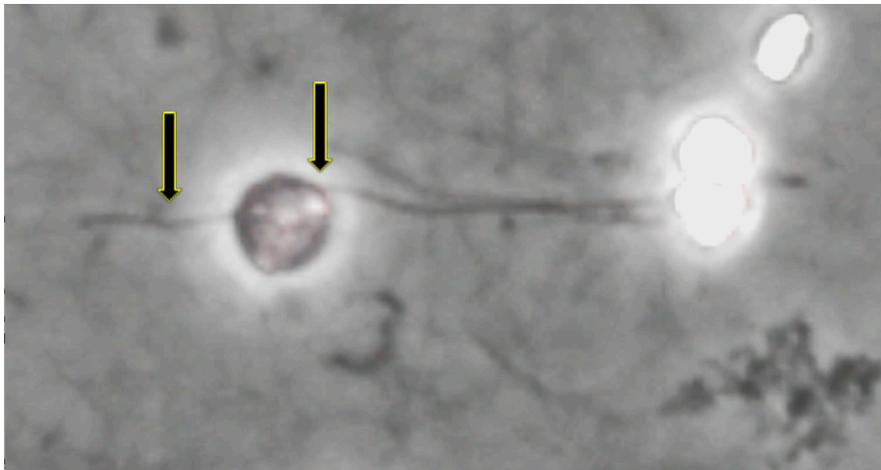
Während im zweiten Kanal mit einseitiger Füllung des zugehörigen Reservoirs mit fMLP eine deutliche Migration der Granulozyten in Richtung des fMLP zu beobachten war, konnte im dritten Kanal keine gerichtete Migration der Granulozyten in Richtung des mit E. coli gefüllten Reservoirs festgestellt werden. Allerdings war eine erhöhte ungerichtete Bewegung der Granulozyten zu sehen. Es sind E. coli aus dem Reservoir in den Kanal eingewachsen, und sie vermehrten sich im Kanal. Im zweiten Test dieses Aufbaus, bei dem die E. coli-Suspension für das Reservoir mit Cefuroxim versetzt wurde, war dieses Einwachsen der E. coli zwar deutlich reduziert, jedoch wanderten auch hier keine Granulozyten in das Reservoir der E. coli aus. In der Kontrolle (kein fMLP, keine E. coli) war keine gerichtete oder vermehrte Migration zu sehen.

### 6.3 Interessante Beobachtungen

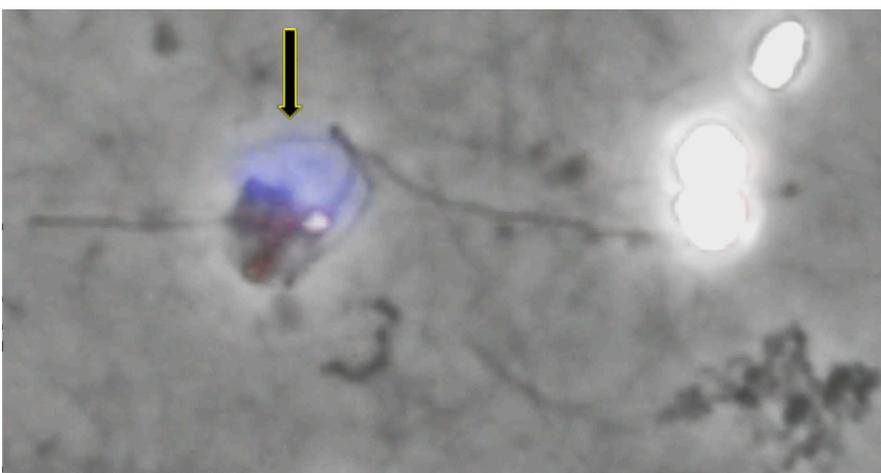
Immer wieder wurde eine Art Fadenbildung der Zellen im Phasenkontrastbild unter allen angewandten Bedingungen gesehen. Plötzlich gingen von einer Zelle lange, dünne Ausstülpungen aus, die sich umgehend wieder zurückbildeten. Der Vorgang dauerte ungefähr 10 Minuten und die Ausstülpungen wurden bis zu 70 µm lang, das sind 500-600 % der eigenen Zelllänge. Dabei handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen Granulozyten, obwohl nicht auszuschließen ist, dass es sich um einen Lymphozyten handelt. Ein solcher Vorgang wurde per Video festgehalten und ist hier in einer Bilderreihe (Abbildung 50 bis Abbildung 53) dargestellt. Es ist aufgefallen, dass auch eine benachbarte Zelle von den Ausstülpungen berührt wird und dann in die NETose geht, wie am blauen DAPI-Signal zu erkennen ist. Es sieht so aus, als gingen auch von ihr dünne Zellausstülpungen aus.



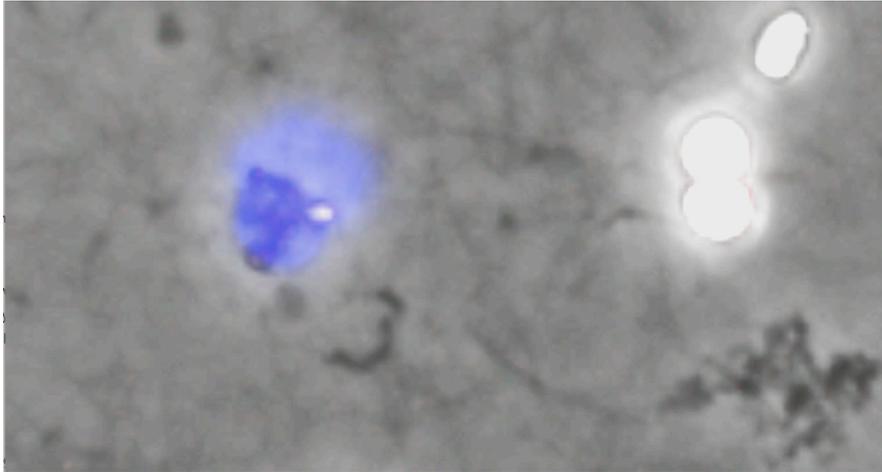
**Abbildung 50: Beginn der "Fadenbildung", T 01:28:26**



**Abbildung 51: Benachbarte Zelle wird erreicht und bildet Faden, T 01:30:52**



**Abbildung 52: Benachbarte Zelle geht in NETose (blau), T 01:31:59**



**Abbildung 53: Fäden vollständig zurückgebildet, T 01:38:52**

Es wurde eine gewisse Synchronität dieser Zellaktion unter den umliegenden Zellen beobachtet. Wir haben ein Video von einem größeren Ausschnitt des gleichen Kanals aufgenommen, in welchem zu sehen ist, wie drei weitere Zellen nahezu zeitgleich die Fadenbildung betreiben. Die Fäden aller Zellen zeigen in die gleiche Richtung, tendenziell weg vom fMLP, jedoch nicht um exakt 180 Grad. Diese Zellaktion wurde unter Bedingungen mit und ohne Cefuroxim beobachtet.

Die beschriebenen Zellvorgänge sind auf unbewegten Bildern nicht erkennbar, weshalb sie hier nicht dargestellt werden können.

## 7. Diskussion

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Fragestellung nach den Zusammenhängen von Phagozytose und NETose. Es sollte überprüft werden, ob diese beiden Funktionen sich gegenseitig ausschließen, weil der Granulozyt sich festlege, entweder zu phagozytieren oder NETose zu betreiben. Ein weiteres Ziel war es, Erfahrungen in der Methodik bei der Arbeit mit Bakterien und Granulozyten zu sammeln und neue Abläufe zu entwickeln. In diese beiden Aspekte wird die folgende Diskussion gegliedert.

### 7.1 Diskussion der Ergebnisse zur Fragestellung

Im gewählten Versuchsaufbau stellten sich die Abwehrmechanismen der Phagozytose und der NETose nicht als unvereinbar dar. Es wurde mehrfach eine erfolgreiche Phagozytose, also ein intrazelluläres Vernichten des Erregers, und eine darauf folgende NETose derselben Zelle (wie in Abbildung 33 bis Abbildung 37) gesehen. Auch in Abbildung 38 bis Abbildung 42 ist zu sehen, dass ein Granulozyt sich offensichtlich schon auf die Abwehrfunktion der Phagozytose festgelegt hat, die Bakterien dann wieder freigibt und danach noch NETose betreibt. Dies widerspricht der Beobachtung von Manfredi et al., (37) dass die Entscheidung „irreversibel“ sei. Durch die heftigen Bewegungen und die flexiblen Ausstülpungen der Zellmembran, die bei allen Granulozyten in Kanälen mit *E. coli* beobachtet wurden, schließen wir darauf, dass diese Zellen phagozytieren. Es gingen in diesen Kanälen nach einer gewissen Zeit gleich viele Granulozyten in die NETose, wie in den Kanälen ohne *E. coli*. Dies ist an den gleich hohen E(max)-Werten von DAPI mit und ohne *E. coli* zu erkennen (siehe Abbildung 12). Dies spricht für einen konsekutiven Ablauf von Phagozytose zu NETose. Denn wenn phagozytierende Granulozyten keine NETose mehr betreiben könnten, wären in den mit Bakterien befüllten Kanälen kleinere E(max)-Wert von DAPI zu erwarten.

Auffällig sind die nicht zueinander passenden Ergebnisse der ET50-Werte von DAPI im Vergleich der Versuche im Chemotaxis-Slide zu denen im  $\mu$ -Slide VI 0.1 (6er-Slide). Im Chemotaxis-Slide trat der Zeitpunkt, an dem die meisten Zellen in die NETose gehen, signifikant früher ein, wenn *E. coli* im Verhältnis 1:1 eingesetzt worden waren. Demgegenüber verspätete sich dieser Zeitpunkt, wenn *E. coli* im Verhältnis Granulozyten zu *E. coli* von 1:1 bis 100:1 im 6er-Slide eingesetzt worden waren. Mit den Werten von MPO verhält es sich im Vergleich dieser beiden Versuchsreihen genauso. Dies gibt eine zusätzliche Sicherheit, dass die Messungen und Berechnungen dieser Werte korrekt sind. Es gibt zwei

Möglichkeiten, dieses Ergebnis zu erklären, denn die Bedingungen in den beiden Versuchsreihen waren durchaus nicht gleich.

1. In der Versuchsreihe mit dem Chemotaxis-Slide wurde bei der Kontrolle fMLP in eines der Reservoirs gefüllt. Dies wurde nicht gemacht, wenn E. coli im Kanal waren. Das bedeutet, dass es durchaus möglich ist, dass die vergleichsweise kleineren ET50-Werte von DAPI und MPO des Kanals mit E. coli (1:1) gegenüber der Kontrolle nicht auf einem Effekt durch E. coli, sondern durch fMLP in der Kontrolle beruht. fMLP hätte in diesem Szenario also die Eigenschaft, die NETose zu verzögern. Wie Abbildung 43 zu entnehmen ist, konnte dieser Effekt von fMLP allerdings ausgeschlossen werden.
2. Denkbar ist auch, dass sich die unterschiedlichen Aufbauten der Kammersysteme auf die Funktionalität der Zellen oder der E. coli auswirken. Es könnte zum Beispiel sein, dass die E. coli im 6er-Slide besser in die „Füllreservoirs“, die sich an die Enden des Kanals anschließen, fliehen können und so im Kanal eine viel niedrigere Bakterienkonzentration resultiert als angenommen.

Interessant ist nun zu sehen, ob und wenn ja, wie sich die ROS-Produktion der Granulozyten bei Kontakt mit E. coli verändert. Aus Abbildung 13 lässt sich entnehmen, dass die Zellen früher beginnen ROS zu produzieren, wenn sie mit hohen Bakterienkonzentrationen konfrontiert werden. Im Gegenzug scheinen niedrige Konzentrationen den respiratory burst tendenziell hinauszuzögern. Das Ergebnis der früheren ROS-Produktion bei hohen Bakterienkonzentrationen unterstützt dabei das oben diskutierte Resultat aus der NETose-Analyse im Chemotaxis-Slide, die auch auf ein schnelleres Durchlaufen der Abwehrfunktionen hinweist. Gemäß Fuchs et al. (51) wird die NETose immer durch eine vorrangige ROS-Produktion eingeleitet. Da sowohl die ROS-Produktion als auch die NETose bei niedrigen Bakterienkonzentrationen verspätet auftrat, lässt sich spekulieren, ob eine bestimmte Schwellenkonzentration zu einem Strategiewechsel von Phagozytose zu NETose führt. Die Bildung der NETs könnte unter bestimmten Bedingungen eventuell mehr Erreger unschädlich machen als die Phagozytose. Wahrscheinlicher erscheint allerdings, dass bei hohen Konzentrationen die Phagozytose-Kapazität eines Granulozyten schneller erschöpft ist und er deswegen früher NETose betreibt. Die Idee, dass ein Granulozyt in die NETose geht, weil er für die aufwändige Phagozytose keine Energie mehr hat, wurde bereits von anderen Forschern aufgeworfen. (37)

Im Allgemeinen darf gesagt werden, dass die Untersuchung des Zusammenhangs von Phagozytose mit unseren Methoden handfeste Beobachtungen hervorbringen konnte, obwohl sich die Messung der Phagozytose schwierig gestaltete. Die Nutzung von GFP-exprimierenden *E. coli* hat sich als praktisch und erkenntnisreich erwiesen, jedoch konnte ihre Internalisierung leider nicht quantifiziert werden. Probleme stellten vor allem die Wachstumsschwankungen und das Verlieren des GFP-Plasmids eines unbekanntem Prozentanteils der *E. coli* dar. Die ursprüngliche Idee, die Phagozytose anhand der Anzahl der leuchtenden *E. coli* im Kanal zu quantifizieren konnte deshalb nicht verwirklicht werden. Ein weiterer kritischer Aspekt war, dass die Bakterien, wenn sie in sehr hoher Konzentration eingesetzt wurden, die NETs degradierten. Dies führte dazu, dass das DAPI-Signal kurz nach der NETose wieder verschwand und somit die Auftragung der Flächensummen pro Zeit keine sigmoidale Kurve ergab. Folglich konnte kein Zeitpunkt der maximalen NETose ermittelt werden.

Natürlich könnte die Arbeit mit lebenden Bakterien in der Untersuchung der Phagozytose zu realitätsgetreueren Ergebnissen führen (52), als ein Phagozytose Assay mit Partikeln, die mit bakteriellen Oberflächenproteinen bestückt sind, wie sie in der Arbeit von Pelletier et al. (42) verwendet wurden. Es stellt sich deshalb die Frage, wie man mit den in diesem Projekt genutzten Instrumenten die Phagozytose lebender Bakterien quantifizieren kann. Eine künftige Möglichkeit stellt die Nutzung von pHrodo markierten Bakterien dar. pHrodo ist ein pH sensitives Reagenz, welches bei neutralen pH-Werten eine minimale Fluoreszenz besitzt und bei niedrigeren pH-Werten stark fluoresziert. (53) Wird ein Bakterium phagozytiert, wird es im Phagosom einem sauren Milieu (pH ca. 4,5) ausgesetzt. (54) Ist dieses Bakterium mit pHrodo markiert, wird eine Fluoreszenz messbar, die für die Quantifizierung der Phagozytose genutzt werden kann. (55, 53, 56) pHrodo markierte *E. coli* sind im Handel erhältlich und ihre Verwendung könnte in Kombination mit der etablierten Methodik im Labor der Klinik für Anästhesiologie der Universität Regensburg zur Erarbeitung weiterer Erkenntnisse dienlich sein. Mit dieser Methode würde, anders als bei der Nutzung der *E. coli* GFP, die Quantifizierung nicht abhängig sein von der Zählbarkeit der überlebenden Bakterienpopulation, sondern die Phagozytose würde direkt gemessen werden. Dies bedeutet, dass das Wachstum der Bakterien kein Problem mehr darstellen würde und auf ein Antibiotikum verzichtet werden könnte. Die Zugabe eines Antibiotikums könnte schließlich unerwünschte Auswirkungen auf die Granulozytenfunktionalität haben. Um von möglichen Veränderungen der Granulozytenfunktionalität in unseren Versuchen sicher auf die Wirkung

von *E. coli* ableiten zu können, haben wir eine Versuchsreihe durchgeführt, die zeigen sollte, ob Cefuroxim einen Effekt auf die Granulozyten hat.

Und ein Effekt des Cefuroxims konnte durchaus gezeigt werden. Insbesondere auf die Produktion der Sauerstoffspezies wirkt sich das Cephalosporin aus und führt zu einer deutlichen Verzögerung um etwa 50 Minuten (siehe Abbildung 16). Interessant ist, dass sich diese Verzögerung nicht auf den Zeitpunkt auswirkt, an dem die meisten Zellen NETs bilden. Wie bereits erwähnt ist der funktionelle und molekulare Zusammenhang der ROS-Produktion und NETose schon offengelegt worden. (51) Dieses Ergebnis deutet allerdings darauf hin, dass aus der molekularen Verknüpfung kein direkter zeitlicher Zusammenhang entsteht. Man könnte annehmen, dass die Verzögerung der ROS-Produktion nicht auf einem unmittelbaren Effekt des Cefuroxims auf die Granulozyten beruht, sondern auf der Eliminierung bakterieller Verunreinigungen: Die Bakterien würden durch das Cefuroxim getötet und könnten – anders als im Kanal ohne Antibiotikum – die Zellen nicht mehr aktivieren. Dem ist entgegenzuhalten, dass in der Versuchsreihe unterschiedlicher *E. coli*-Konzentrationen keine signifikante Verzögerung der ROS-Produktion aufgetreten ist. Es wurden *E. coli* im 1:100 Verhältnis zu den Granulozyten eingesetzt, was einer Verunreinigung nahekommen mag, und gerade bei dieser Bakterienkonzentration wurde keine Abweichung des T(max) von ROS im Vergleich zur Kontrolle festgestellt.

Neben den Fluoreszenzfarbstoffen konnte in dieser Versuchsreihe auch die Migration der Granulozyten ausgewertet werden. Die Untersuchung der Migration mit den Ibidi Chemotaxis-Kammern funktioniert gut, und durch das Tracking vieler Spots lassen sich schon durch wenige Versuche kleine Veränderungen erkennen. Die in Abbildung 19 dargestellte Grafik zeigt, dass fMLP als potenter Lockstoff fungiert. Cefuroxim verbesserte die Migration der Granulozyten, sie wanderten weiter und sogar direkter in Richtung des Lockstoffes.

Es ist bekannt, dass Antibiotika nicht nur antimikrobielle Eigenschaften haben, sondern sich auch auf die Zellen unseres Immunsystems auswirken können. (57) Für Neutrophile Granulozyten wurden die Effekte etlicher Antibiotika auf Phagozytose (58), ROS-Produktion (59, 60), NETose (61) und Chemotaxis (58) untersucht. Die Effekte einiger Antibiotika sind in Tabelle 5 veranschaulicht. Die Pfeile zeigen entsprechend ihrer Ausrichtung steigernde, hemmende oder indifferente Auswirkung des jeweiligen Antibiotikums an.

Antibiotikum	Literatur	Migration	ROS	NETose
Tetrazykline	(62, 63)	↓	↓	
Chloramphenicol	(62, 63)	↓	→	
Cephalosporine	(62, 62)	→		
Minocycline	(63)		↓	
Erythromycin	(63, 62)	→	↓	
Penicilline	(63, 62)	→	→	
Streptomycin	(63)		→	
Cefotaxim (Cephalosporin)	(61)			→

**Tabelle 5: Effekte von Antibiotika auf Granulozyten**

Berichte von einer Verbesserung der Chemotaxis, wie in dieser Arbeit mit Cefuroxim, wurden auch nach ausführlicher Literaturrecherche nicht gefunden.

Die Publikationen zu diesem Thema stammen hauptsächlich aus den 70er und 80er Jahren, einzig zum Effekt von Antibiotika auf die NETose wurden neuere Publikationen gefunden. Maßgeblich daran beteiligt ist eine Forschungsgruppe der medizinischen Universität Warschau, welche herausfand, dass die Auswirkungen sehr unterschiedlich sein können. Es wurden sowohl NETose fördernde als auch hemmende Antibiotika entdeckt. (61, 64) Bei dem Cephalosporin Cefotaxim wurde keine Beeinflussung der NETs-Bildung festgestellt (siehe Tabelle 5). Somit bestätigen unsere Ergebnisse mit Cefuroxim diese Reihe. Die Erforschung NETose-beeinflussender Antibiotika könnte für die Behandlung von Patienten von Bedeutung sein, die unter NETs-assoziierten Erkrankungen leiden. Möglicherweise ist es therapeutisch sinnvoll, einem Patienten mit Lupus Erythematodes ein Antibiotikum zu verschreiben, welches einen hemmenden Effekt auf die NETose ausübt. Ähnliches gilt auch für septische Patienten, deren Organe unter der hohen Produktion reaktiver Sauerstoffspezies Schaden nehmen. (65) Sepsis ist eine der Haupttodesursachen auf Intensivstationen und die Erforschung weiterer Therapiemöglichkeiten ist daher von enormer Wichtigkeit. (66) Es wurden bisher diverse Antioxidantien als Zusatz für die Sepsis-Therapie untersucht und die Ergebnisse stützen die Annahme, dass ROS eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Sepsis spielen. (67) Es könnte interessant sein, ob unterschiedliche Antibiotika bei gleicher antibakterieller Wirksamkeit, aber unterschiedlicher Beeinflussung der ROS-Produktion ein unterschiedliches Outcome in Sepsis hervorrufen und Auswirkungen auf die Dysfunktion der

Organe haben. Zur Prophylaxe von akuten Exacerbationen von COPD kommen Makrolid-Antibiotika zum Einsatz (68), da sie einen direkten positiven Effekt auf Epithelzellen haben. (69) Da Antibiotika also nicht nur auf Bakterien wirken, sondern man sich deren Effekte auf menschliche Zellen zu Nutze machen kann, ist die weitere Erforschung von Granulozytenfunktionalität unter antibiotischem Einfluss sicher sinnvoll.

## 7.2 Diskussion der Ergebnisse der Methodik

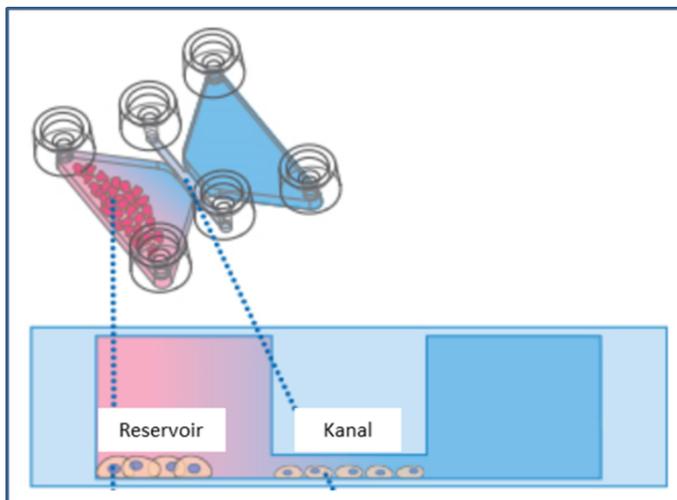
Vor der Diskussion der Tests zu den methodischen Alternativen wird im Folgenden noch knapp die diffizile Festlegung der antibiotischen Hemmkonzentration für *E. coli* erörtert. Obwohl in den Versuchen zur Findung der geeigneten Konzentration bei 2 µg/mL kein Wachstum auftrat (siehe Abbildung 44), galt dies nicht mehr, wenn diese Konzentration bei zusätzlicher Anwesenheit von Granulozyten zum Einsatz kam. Ebenso wurde bei den Testversuchen mit 2 µg/mL die Schwellung der *E. coli* beobachtet, welche nicht mehr auftrat, wenn Granulozyten anwesend waren. Es führte dazu, dass die Cefuroxim-Konzentration auf 8 µg/mL hochgesetzt wurde. Der Grund für den oben beschriebenen Effekt ist uns nicht bekannt.

Mit dem Test zur Weiterentwicklung der Methodik konnte kein Durchbruch erzielt werden, jedoch wurden pro Ansatz auch nur zwei Versuche durchgeführt. Es gibt mehrere Möglichkeiten, wieso die Migration der Granulozyten in den Kanal weder aus dem Isolat noch aus Vollblut stattfand.

- a. Möglicherweise schaffen es die Zellen nicht, aus der flüssigen Phase in die feste Phase überzutreten. Dies kann an einer zu hohen Festigkeit des Gels liegen oder daran, dass es an einer Art Initiation fehlt. In vivo gehen die Zellen nicht direkt von der flüssigen in die feste Phase über, sondern haften erst an das Endothel an und durchwandern dieses anschließend. (70) Dieser Prozess, der Diapedese genannt wird, benötigt möglicherweise ein Priming der Granulozyten, das in vitro nicht gegeben ist.
- b. Es entsteht kein Konzentrationsgefälle von fMLP. Die Granulozyten wandern nur dann in eine Richtung, wenn sie einem Konzentrationsgefälle des Lockstoffs folgen können. (71) Dieses entsteht, wenn sich das fMLP initial in der flüssigen Phase befindet und dann langsam in das Gel eindiffundieren kann. Dreht man die Verhältnisse um, dann könnte es sein, dass das fMLP, welches aus dem Gel im Kanal nur langsam in das Reservoir diffundiert, innerhalb des Kanals keinen Konzentrationsgradienten aufweist. Somit läge die maximale fMLP-Konzentration

schon am Rand des Kanals vor und die Zellen blieben dort stehen, so wie es beobachtet wurde.

- c. Eine dritte Option ist, dass es am Aufbau der Kammer liegt. Wandern die Zellen aus dem Kanal aus, dann migrieren sie in einen Bereich, in dem sie mehr Platz haben. Andersherum müssen sich die Granulozyten erst abflachen, um in den Kanal zu gelangen. Die Verhältnisse der Lumina von Kanal und Reservoir sind in Abbildung 54 veranschaulicht. Ob das Einzwängen der Zellen in den flachen Kanal die Ursache für die fehlende Migration ist, ließe sich überprüfen, indem das Kollagen-Gel mit Granulozyten in die Reservoirs gefüllt wird und fMLP + RPMI + FKS in den Kanal. Somit würden die Granulozyten wieder von der festen in die flüssige Phase wandern und eine Beeinträchtigung durch den Kammer-Aufbau wäre ausgeschlossen.



**Abbildung 54: Höhenverhältnis Kanal-Reservoir (72)**

In den Versuchen, in denen *E. coli* als „Lockstoff“ in eines der Reservoirs gefüllt wurde, trat möglicherweise deshalb keine gerichtete Migration in Richtung der Bakterien auf, weil diese beim Befüllen der Reservoirs leicht in den Kanal eingedrückt wurden. Dies führte dazu, dass die Granulozyten im Kanal zu Genüge mit Phagozytose beschäftigt waren und nicht mehr zu einer Migration in das Reservoir kamen.

Abschließend werden noch kurz die merkwürdigen Beobachtungen der langen Zellausstülpungen der Zellen erklärt. Hierbei handelt es sich um Ausstülpungen des Zytoskeletts und der Zellmembran, die in der Literatur unter den Bezeichnungen Cytoneme, Filopodia oder Protrusionen bekannt sind. (73, 74) Diese Cytoneme haben als Hauptaufgabe die interzelluläre Kommunikation über Liganden und Rezeptoren, (75) und beteiligen sich an

der Fortbewegung der Zelle. (74) Die Charakteristiken der beobachteten Zelle deuten darauf hin, dass es sich um einen Granulozyten handelt, allerdings können Lymphozyten im Isolat nicht ausgeschlossen werden. Bei beiden Zelltypen ist bekannt, dass sie in der Lage sind Cytoneme auszubilden. (73, 76) In Neutrophilen kommt den Cytonemen auch eine Aufgabe in der Phagozytose zu, sie sind in der Lage Erreger zu binden. (76) Es wurde nicht nur gezeigt, dass Cytoneme auf diese Weise weiter entfernte Erreger fangen können, sondern auch dass sie so eine teleskopartige Exocytose durchführen können um bakterizide Moleküle direkt beim gebundenen Erreger, aber nicht in eigener Nähe freizusetzen. (77) Des Weiteren wurde herausgefunden, dass Neutrophilen-Cytoneme an Blutplättchen binden, welches eine Rolle bei Entzündungen und Thrombusbildung spielen soll. (78) Im beobachteten Fall scheint es also wahrscheinlich, dass Neutrophile diese Protrusionen ausgebildet haben, um miteinander zu kommunizieren, oder um zu versuchen ein Bakterium einzufangen. Die Richtungsgleichheit der Protrusionen ist vermutlich auf leichte Strömungen im Kanal zurückzuführen. Wegen des äußerst geringen Durchmessers der Cytoneme werden sie in der Mikroskopie selten gesehen und waren bis vor kurzem im Labor der Klinik für Anästhesiologie am Klinikum Regensburg nicht bekannt. Sie sind ein Beispiel für die faszinierend vielfältigen Funktionen und Eigenarten der Granulozyten.

## 8. Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten sind in der Lage, nach der Phagozytose von Bakterien noch NETs zu bilden. Dies konnte durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und den Einsatz von *E. coli* GFP eindeutig gezeigt werden. Soll die Phagozytose quantifiziert werden, um sie zur NETose in ein zahlenmäßiges Verhältnis setzen zu können, sind die angewandten Methoden jedoch noch zu erweitern. Wurden Granulozyten hohen Konzentrationen von *E. coli* ausgesetzt, trieben sie signifikant früher die Produktion von ROS an. In der gleichen Versuchsreihe konnte eine Verfrühung der NETose wiederum nicht gezeigt werden, während in einer anderen, vergleichbaren Versuchsreihe ein signifikant früheres Auftreten der NETs zu messen war. Der Grund für die Diskrepanz der Ergebnisse ist unklar. Werden die Granulozyten von Cefuroxim der Konzentration 8 µg/mL umgeben, wird die ROS-Produktion signifikant inhibiert. Auf die Bildung der NETs hat Cefuroxim unter unseren Laborbedingungen keinen Einfluss. Cefuroxim wirkt sich positiv auf die Migration der Granulozyten aus. Die Zellen wanderten sowohl signifikant weiter, als auch direkter in Richtung des Lockstoffes.

Es wurden methodische Varianten durchgeführt mit dem Ziel Granulozytenfunktionen im Vollblut, ohne Isolations-schritt quantifizieren zu können, um sich den Verhältnissen *in vivo* zu nähern. Positive Testergebnisse blieben zunächst aus, die Granulozyten wanderten weder aus Vollblut noch aus ihrem Isolat in ein mit Lockstoffversetztes Gel ein. Die Möglichkeiten sind jedoch noch lange nicht ausgeschöpft und weitere Experimente könnten lohnenswert sein.

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Projektumsetzung .....	12
Abbildung 2: Ibidi $\mu$ -Slide Chemotaxis.....	19
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Kammerbefüllung und Aufbau .....	19
Abbildung 4: Ibidi $\mu$ -Slide VI 0.1.....	19
Abbildung 5: Beispielhafter Kurvenverlauf von Rhodamin 123 .....	24
Abbildung 6: Beispielhafter Kurvenverlauf von DAPI & MPO-APC .....	24
Abbildung 7: Grafische Darstellung der Migrationsparameter .....	26
Abbildung 8: Erklärung eines Boxplots.....	27
Abbildung 9: ET50-Werte (min) von DAPI ohne E. coli und mit E. coli (1:1) .....	28
Abbildung 10: ET50-Werte (min) von MPO-APC ohne E. coli und mit E. coli (1:1).....	29
Abbildung 11: DAPI ET50-Werte in % zur Kontrolle nach fünf E. coli-Konzentrationen ....	30
Abbildung 12: E(max) von DAPI nach E. coli-Konzentration.....	31
Abbildung 13: T(max) von ROS in % zur Kontrolle nach 6 verschiedenen E. coli-Konzentrationen.....	32
Abbildung 14: Die ET50-Werte von DAPI in Abhängigkeit von Cefuroxim (8 $\mu$ g/mL) .....	33
Abbildung 15: Die ET50-Werte von MPO-APC in Abhängigkeit von Cefuroxim (8 $\mu$ g/mL) 33	
Abbildung 16: T(max) der ROS-Produktion in Minuten abhängig von Cefuroxim.....	34
Abbildung 17: Track Length in Abhängigkeit von Cefuroxim, nach 1. und 2. Halbstunde....	35
Abbildung 18: Track Straightness der 1. halben Stunde, nach Cefuroxim-Konzentration .....	36
Abbildung 19: Track Displacement in X-Richtung nach Cefuroxim-Konzentration und Zeit 36	
Abbildung 20: Track Displacement in Y-Richtung nach Cefuroxim-Konzentration und Zeit 37	
Abbildung 21: Fluoreszierende E. coli in Granulozyten, .....	38
Abbildung 22: Sukzessives Erlöschen des GFP-Signals, .....	38
Abbildung 23: Phagozytierte E. coli produzieren.....	38
Abbildung 24: Abrunden der Phagozyten, T 01:17:11 .....	39
Abbildung 25: Anfärbung durch DAPI Freigabe von DNA,.....	39
Abbildung 26: Granulozyten treten in Kontakt mit E. coli, T 00:01:52 .....	40
Abbildung 27: E. coli werden internalisiert, T 00:05:59 .....	40
Abbildung 28: E. coli von Granulozytenmembran (dunkle Umrandung) umschlossen, T 00:10:28 .....	41
Abbildung 29: Fortlaufende Bewegung der Zellen bis T 1:45:07 .....	41
Abbildung 30: Abrundung der Granulozyten, T 2:04:58.....	42

Abbildung 31: Ruptur der Zellmembran, NETose, T 2:35:39,.....	42
Abbildung 32: Das GFP Signal ist verblasst, T 4:28:39 .....	43
Abbildung 33: E. coli in Granulozyt, T 00:03:14 .....	43
Abbildung 34: Verblasen des GFP-Signals, T 00:22:44 .....	43
Abbildung 35: GFP-Signal ausgelöscht, T 00:33:24 .....	44
Abbildung 36: Abrunden der Zelle, T 01:40:14 .....	44
Abbildung 37: Anfärbung extrazellulärer DNA durch DAPI, T 02:00:39 .....	44
Abbildung 38: Phagozytierender Granulozyt, T 00:50:47.....	44
Abbildung 39: Abrundung der Zelle, T 01:43:47 .....	44
Abbildung 40: E. coli werden plötzlich frei, T 01:57:16.....	45
Abbildung 41: Eigenbewegliche E. coli schwärmen aus, T 01:58:40 .....	45
Abbildung 42: NETose (blau), T 02:13:00 .....	45
Abbildung 43: ET50-Werte von DAPI nach Lockstoff.....	46
Abbildung 44: Wachstumskurven von E. coli unter Cefuroxim-Konzentrationen.....	47
Abbildung 45: Schwellung der E. coli unter hohen Cefuroxim-Konzentrationen.....	48
Abbildung 46: Leuchtende E. coli, T 00:52:43.....	49
Abbildung 47: Beginn der Schwellung, T 01:42:32 .....	49
Abbildung 48: Starke Schwellung, T 01:11:49.....	50
Abbildung 49: Extreme Schwellung, T 04:06:05 .....	50
Abbildung 50: Beginn der "Fadenbildung", T 01:28:26.....	53
Abbildung 51: Benachbarte Zelle wird erreicht und bildet Faden, T 01:30:52 .....	53
Abbildung 52: Benachbarte Zelle geht in NETose (blau), T 01:31:59.....	53
Abbildung 53: Fäden vollständig zurückgebildet, T 01:38:52 .....	54
Abbildung 54: Höhenverhältnis Kanal-Reservoir (72).....	61

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften der Filterwürfel.....	21
Tabelle 2: Fluoreszenzwerte der Farbstoffe.....	22
Tabelle 3: p-Werte der Stichprobenvergleiche von T(max) ROS in % .....	32
Tabelle 4: Statistik der Track Length nach Cefuroxim.....	35
Tabelle 5: Effekte von Antibiotika auf Granulozyten.....	59

## 11. Literaturverzeichnis

1. Pape H-C, Klinke R, Brenner B, Silbernagl S, editors. Physiologie: Blut: Ein flüssiges Organsystem [Abwehrmechanismen des Körpers]. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2014. Seiten 278-289.
2. Murphy K, Weaver C, editors. Janeway Immunologie. 9. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. Seiten 96-100.
3. Holländer GA, Barthlott T, editors. Immunologie: Grundlagen für Klinik und Praxis. 1. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer; 2006. Seiten 13-37.
4. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992; 80(8):2012–20.
5. Huang J, Xiao Y, Xu A, Zhou Z. Neutrophils in type 1 diabetes. *J Diabetes Investig* 2016; 7(5):652–63.
6. Yin C, Heit B. Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules. *Cell Tissue Res* 2018; 371(3):455–71.
7. Arnold DE, Heimall JR. A Review of Chronic Granulomatous Disease. *Adv Ther* 2017; 34(12):2543–57.
8. Santos SS, Brunialti MKC, Rigato O, Machado FR, Silva E, Salomao R. Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. *Shock* 2012; 38(1):18–23.
9. Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered.
10. Kaplan J, Domenico I de, Ward DM. Chediak-Higashi syndrome. *Curr Opin Hematol* 2008; 15(1):22–9.
11. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303(5663):1532–5.
12. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 2009; 5(10):e1000639.

13. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 2006; 8(4):668–76.
14. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, Back W, Gross WL, Werb Z et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009; 15(6):623–5.
15. Yousefi S, Mihalache C, Kozłowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* 2009; 16(11):1438–44.
16. Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, Hess S, Prinz H, Zychlinsky A et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol* 2011; 7(2):75–7.
17. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood* 2013; 122(16):2784–94.
18. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 2015; 349(6245):316–20.
19. Leffler J, Gullstrand B, Jönsen A, Nilsson J-Å, Martin M, Blom AM et al. Degradation of neutrophil extracellular traps co-varies with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2013; 15(4):R84.
20. Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, Bitterling J, Simsek YJ, Long AT et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science* 2017; 358(6367):1202–6.
21. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 2013; 5(178):178ra40.
22. van Dam LS, Rabelink TJ, van Kooten C, Teng YKO. Clinical Implications of Excessive Neutrophil Extracellular Trap Formation in Renal Autoimmune Diseases. *Kidney Int Rep* 2019; 4(2):196–211.
23. Kimball AS, Obi AT, Diaz JA, Henke PK. The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis. *Front Immunol* 2016; 7:236.
24. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. *J Innate Immun* 2018; 10(5-6):414–21.

25. Hof H, Dörries R, Geginat G, editors. Medizinische Mikrobiologie: Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Immunologie, klinische Infektiologie, Hygiene ; + campus.thieme.de. 5., vollst. überarb. Aufl. s.l.: Georg Thieme Verlag KG; 2014. (Duale Reihe).
26. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26(4):822–80.
27. Bonkat G, Cai T, Veeratterapillay R, Bruyère F, Bartoletti R, Pilatz A et al. Management of Urosepsis in 2018. *Eur Urol Focus* 2019; 5(1):5–9.
28. Brogden RN, Heel RC, Speight TM, Avery GS. Cefuroxime: a review of its antibacterial activity, pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs* 1979; 17(4):233–66.
29. Triboulet S, Dubée V, Lecoq L, Bougault C, Mainardi J-L, Rice LB et al. Kinetic features of L,D-transpeptidase inactivation critical for  $\beta$ -lactam antibacterial activity. *PLoS ONE* 2013; 8(7):e67831.
30. SPRATT BG. Properties of the Penicillin-Binding Proteins of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* 1977; 72(2):341–52.
31. Bönisch H, Graefe K-H, Lutz W. Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie. 2., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2016. (Reihe, DUALE REIHE).
32. Gernap 2015: Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch; Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence; 2016.
33. Viberg A, Cars O, Karlsson MO, Jönsson S. Estimation of cefuroxime dosage using pharmacodynamic targets, MIC distributions, and minimization of a risk function. *J Clin Pharmacol* 2008; 48(11):1270–81.
34. Jepras RI, Paul FE, Pearson SC, Wilkinson MJ. Rapid assessment of antibiotic effects on *Escherichia coli* by bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol and flow cytometry. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(9):2001–5.
35. Barnado A, Crofford LJ, Oates JC. At the Bedside: Neutrophil extracellular traps (NETs) as targets for biomarkers and therapies in autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 2016; 99(2):265–78.

36. Ramirez GA, Maugeri N, Sabbadini MG, Rovere-Querini P, Manfredi AA. Intravascular immunity as a key to systemic vasculitis: a work in progress, gaining momentum. *Clin Exp Immunol* 2014; 175(2):150–66.
37. Manfredi AA, Ramirez GA, Rovere-Querini P, Maugeri N. The Neutrophil's Choice: Phagocytose vs Make Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol* 2018; 9:288.
38. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol* 2014; 15(11):1017–25.
39. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 2011; 117(3):953–9.
40. Manfredi AA, Covino C, Rovere-Querini P, Maugeri N. Instructive influences of phagocytic clearance of dying cells on neutrophil extracellular trap generation. *Clin Exp Immunol* 2015; 179(1):24–9.
41. Ullah I, Ritchie ND, Evans TJ. The interrelationship between phagocytosis, autophagy and formation of neutrophil extracellular traps following infection of human neutrophils by *Streptococcus pneumoniae*. *Innate Immun* 2017; 23(5):413–23.
42. Pelletier MGH, Szymczak K, Barbeau AM, Prata GN, O'Fallon KS, Gaines P. Characterization of neutrophils and macrophages from ex vivo-cultured murine bone marrow for morphologic maturation and functional responses by imaging flow cytometry. *Methods* 2017; 112:124–46.
43. Chen Y, Junger WG. Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods Mol Biol* 2012; 844:115–24.
44. Elbim C, Lizard G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry A* 2009; 75(6):475–81.
45. Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 1992; 31(12):3103–12.
46. Dąbrowska D, Jabłońska E, Garley M, Ratajczak-Wrona W, Iwaniuk A. New Aspects of the Biology of Neutrophil Extracellular Traps. *Scand J Immunol* 2016; 84(6):317–22.

47. ibidi. Technical features  $\mu$ -slide chemotaxis [cited 2019 Mar 29]. Available from: URL: [https://ibidi.com/img/cms/products/labware/channel\\_slides/S\\_8032X\\_Chemotaxis/S\\_8032X\\_Chemotaxis\\_KF.jpg](https://ibidi.com/img/cms/products/labware/channel_slides/S_8032X_Chemotaxis/S_8032X_Chemotaxis_KF.jpg).
48. ibidi. Technical features  $\mu$ -slide VI 0.1 [cited 2019 Mar 29]. Available from: URL: [https://ibidi.com/img/cms/products/labware/channel\\_slides/S\\_8066X\\_Slide\\_VI01/S\\_8066X\\_Slide\\_VI01\\_KF.jpg](https://ibidi.com/img/cms/products/labware/channel_slides/S_8066X_Slide_VI01/S_8066X_Slide_VI01_KF.jpg).
49. Junqueira LCU, Mayerhofer A, editors. *Histologie: Mit 500 Abbildungen in 618 Einzeldarstellungen und 17 Tabellen*. 6., neu übers., überarb. und aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer Medizin; 2005. (Springer-Lehrbuch).
50. Bühl A. *SPSS 23: Einführung in die moderne Datenanalyse*. 15., aktualisierte Auflage. Hallbergmoos: Pearson Deutschland GmbH; 2016. (Always learning). Available from: URL: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=5574970>.
51. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176(2):231–41.
52. DeChatelet LR, Mullikin D, Shirley PS, McCall CE. Phagocytosis of live versus heat-killed bacteria by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1974; 10(1):25–9.
53. Miksa M, Komura H, Wu R, Shah KG, Wang P. A novel method to determine the engulfment of apoptotic cells by macrophages using pHrodo succinimidyl ester. *J Immunol Methods* 2009; 342(1-2):71–7.
54. Flannagan RS, Jaumouillé V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* 2012; 7:61–98.
55. Lenzo JC, O'Brien-Simpson NM, Cecil J, Holden JA, Reynolds EC. Determination of Active Phagocytosis of Unopsonized *Porphyromonas gingivalis* by Macrophages and Neutrophils Using the pH-Sensitive Fluorescent Dye pHrodo. *Infect Immun* 2016; 84(6):1753–60.
56. Meena NP, Kimmel AR. Quantification of Live Bacterial Sensing for Chemotaxis and Phagocytosis and of Macropinocytosis. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; 8:62.
57. Hauser WE, Remington JS. Effect of antibiotics on the immune response. *The American Journal of Medicine* 1982; 72(5):711–6.

58. van Vlem B, Vanholder R, Paepe P de, Vogelaers D, Ringoir S. Immunomodulating effects of antibiotics: literature review. *Infection* 1996; 24(4):275–91.
59. Hoeben D, Dosogne H, Heyneman R, Burvenich C. Effect of antibiotics on the phagocytotic and respiratory burst activity of bovine granulocytes. *Eur J Pharmacol* 1997; 332(3):289–97.
60. Kalghatgi S, Spina CS, Costello JC, Liesa M, Morones-Ramirez JR, Slomovic S et al. Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Mammalian cells. *Sci Transl Med* 2013; 5(192):192ra85.
61. Manda-Handzlik A, Bystrzycka W, Sieczkowska S, Demkow U, Ciepiela O. Antibiotics Modulate the Ability of Neutrophils to Release Neutrophil Extracellular Traps. *Adv Exp Med Biol* 2017; 944:47–52.
62. Forsgren A, d. Schmeling, Banck G. Effect of antibiotics on chemotaxis of human polymorphonuclear leucocytes in vitro. *Infection* 1978; 6(S1):S102-S106.
63. Miyachi Y, Yoshioka A, Imamura S, Niwa Y. Effect of antibiotics on the generation of reactive oxygen species. *J Invest Dermatol* 1986; 86(4):449–53.
64. Bystrzycka W, Moskalik A, Sieczkowska S, Manda-Handzlik A, Demkow U, Ciepiela O. The effect of clindamycin and amoxicillin on neutrophil extracellular trap (NET) release. *Cent Eur J Immunol* 2016; 41(1):1–5.
65. Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *British Journal of Anaesthesia* 2003; 90(2):221–32.
66. Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H et al. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study\*. *Critical Care Medicine* 2006; 34(2):344–53.
67. Mantzaris K, Tsolaki V, Zakynthinos E. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017:5985209.
68. Cui Y, Luo L, Li C, Chen P, Chen Y. Long-term macrolide treatment for the prevention of acute exacerbations in COPD: a systematic review and meta-analysis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2018; 13:3813–29.
69. Araki N, Yanagihara K, Morinaga Y, Yamada K, Nakamura S, Yamada Y et al. Azithromycin inhibits nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced MUC5AC expression

and secretion via inhibition of activator protein-1 in human airway epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 2010; 644(1-3):209–14.

70. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* 2014; 41(5):694–707.

71. Schiffmann E, Corcoran BA, Wahl SM. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1975; 72(3):1059–62.

72. ibidi.  $\mu$ -slide chemotaxis: cell to cell chemotaxis [cited 2019 Apr 1]. Available from: URL: <https://ibidi.com/channel-slides/9--slide-chemotaxis-ibitreat.html>.

73. Sage PT, Varghese LM, Martinelli R, Sciuto TE, Kamei M, Dvorak AM et al. Antigen recognition is facilitated by invadosome-like protrusions formed by memory/effector T cells. *J Immunol* 2012; 188(8):3686–99.

74. Leithner A, Eichner A, Müller J, Reversat A, Brown M, Schwarz J et al. Diversified actin protrusions promote environmental exploration but are dispensable for locomotion of leukocytes. *Nat Cell Biol* 2016; 18(11):1253–9.

75. Buszczak M, Inaba M, Yamashita YM. Signaling by Cellular Protrusions: Keeping the Conversation Private. *Trends Cell Biol* 2016; 26(7):526–34.

76. Galkina SI, Molotkovsky JG, Ullrich V, Sud'ina GF. Scanning electron microscopy study of neutrophil membrane tubulovesicular extensions (cytonemes) and their role in anchoring, aggregation and phagocytosis. The effect of nitric oxide. *Exp Cell Res* 2005; 304(2):620–9.

77. Galkina SI, Romanova JM, Stadnichuk VI, Molotkovsky JG, Sud'ina GF, Klein T. Nitric oxide-induced membrane tubulovesicular extensions (cytonemes) of human neutrophils catch and hold *Salmonella enterica* serovar Typhimurium at a distance from the cell surface. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; 56(2):162–71.

78. Schmidtke DW, Diamond SL. Direct Observation of Membrane Tethers Formed during Neutrophil Attachment to Platelets or P-Selectin under Physiological Flow. *J Cell Biol* 2000; 149(3):719–30.

## **Danksagung**

Ein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater, PD Dr. Martin Kees, der mich mit seinen gewissenhaften Korrekturen, kritischen Nachfragen und Anregungen maßgeblich unterstützt hat.

Unermüdlich und mit viel Geduld wurde ich von Michael Gruber, der als Laborleiter diese Doktorarbeit initiiert hat, angeleitet. Mit seiner Offenheit für neue Ideen und seinem Vertrauen hat er in mir die Freude am Experimentieren geweckt. Vielen, vielen Dank.

Ein weiterer großer Dank geht an alle Mitarbeiter im Labor der Anästhesie, die mich immer wieder unterrichtet und unterstützt haben. Die gute Stimmung im Labor ist ein Erfolgsfaktor.

Ein herzliches Vergelt's Gott geht an die zahlreichen Blutspender, ohne die die Experimente nicht möglich gewesen wären.

Meinen Eltern danke ich für ihre finanzielle Unterstützung, ihre Inspiration zur Forschung und den starken Rückhalt, den sie mir geben.

Wärmster Dank gebührt meiner Ehefrau Marita, die immer für mich da war und mich in Krisen aufzufangen und motiviert hat.

# Curriculum Vitae

## ■ Persönliche Daten

Name: Franz Reichel  
Geburtsdaten: 25.11.1995 in London  
Geschlecht: Männlich  
Nationalität: Deutsch  
Konfession: Römisch Katholisch



## ■ Bildung

06/2015 Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife (Note 1,4)  
Heinrich-Suso-Gymnasium in Konstanz  
10/2015 Beginn Studium der Humanmedizin  
Universität Regensburg  
09/2017 Abschluss des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung (Note:  
sehr gut)  
04/2021 Abschluss des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung  
(Note: gut)  
05/2022 Abschluss des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung (Note:  
sehr gut)

## ■ Stipendien

seit 2018 Begabtenförderung der Hanns-Seidel-Stiftung  
10/2019 – 03/2020 Erasmus+ Förderung der Europäischen Union

## ■ Auslandserfahrungen

09/2011 – 07/2012 Highschool-Austauschprogramm, Ohio USA  
09/2019 – 03/2020 Auslandssemester in Frankreich  
Université Catholique de Lille  
12/2021 – 04/2022 Chirurgisches Tertial  
Red Cross Childrens Hospital in Kapstadt, Südafrika

## ■ Berufserfahrung

- Famulatur in der Anästhesiologie  
Klinikum Konstanz, Lehrkrankenhaus der Universität Freiburg
- Famulatur in der Allgemeinmedizin  
Hausarztpraxis Dr. Wehr in Konstanz
- Famulatur in der Gynäkologie  
Hospital St. Vincent in Lille, Frankreich
- Famulatur in der Urologie  
Hospital St. Philibert in Lille, Frankreich
- Laborarbeit und wissenschaftliches Arbeiten als Doktorand  
Labor der Anästhesiologie, Universitätsklinikum Regensburg
- 1. Terial Praktisches Jahr: Radiologie  
Klinikum Konstanz, Lehrkrankenhaus der Universität Freiburg
- 2. Terial Praktisches Jahr: Innere Medizin  
Ausbildungsstation A-STAR am Universitätsklinikum Regensburg  
Nephrologie am Universitätsklinikum Regensburg
- 3. Terial Praktisches Jahr: Chirurgie und Traumatologie  
Red Cross Childrens Hospital, Lehrkrankenhaus der Universität Kapstadt
- Assistenzarzt in Weiterbildung Neurologie am Krankenhaus der Barmherzigen Brüder in Regensburg ab Oktober 2022

## ■ Sprachen

- Französisch, DELF C1
- Englisch, sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift
- Spanisch, Grundkenntnisse
- Latein, Latinum

## ■ Gesellschaftliches Engagement

- |            |   |
|------------|---|
| seit 2004  | Ministrant in St. Gebhard Konstanz  |
| seit 2011  | Jugendleiter für das Sommerlager St. Gebhard  |
| 03-04/2020 | 2 Monate Freiwilligendienst in der Behinderteneinrichtung „L'Arche d'Écorchebeuf“ in Frankreich |