



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

Das Repertoire der Behandlungsmöglichkeiten ist erschöpft – spätestens wenn kein Antibiotikum mehr anschlägt, weil die Keime resistent geworden sind. Für den Betroffenen entsteht eine lebensbedrohliche Situation. Denn während Sporen und Hyphen von Schimmelpilzen (*Aspergillus* spp.) bei gesunden Menschen innerhalb weniger Minuten beseitigt werden, können sie sich im Körper des an chronischer Granulomatose leidenden Patienten (engl.: *chronic granulomatous disease, CGD*) weit-

von Pilzinfektionen spielen, war jedoch lange unklar – bis zwei Forscher vom Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie einem bis dahin unbekanntem Abwehrmechanismus unseres Immunsystems auf die Spur kamen. Dabei hatten sie zunächst geglaubt, dass es sich bei ihrer Beobachtung um einen Artefakt handle.

Die beiden Wissenschaftler saßen in einem Labor des Instituts auf dem Gelände der berühmten Charité in Berlin, der einstigen

Ins Netz gegangen – unbekannte Waffe unseres Immunsystems entdeckt

gehend ungehindert ausbreiten: die eingeatmeten Sporen keimen in der Lunge aus und durchwachsen das Gewebe. Durch Pilzinfektionen verursachte Lungenentzündungen sind so die häufigste Todesursache bei CGD-Patienten.

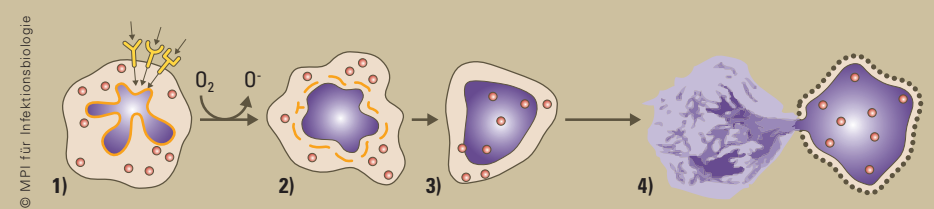
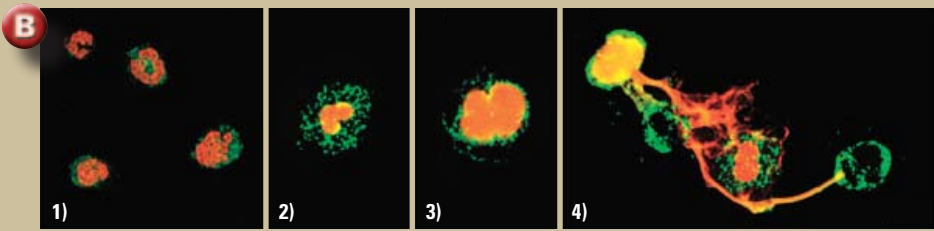
RADIKAL NÜTZLICH?

Chronische Granulomatose ist eine sehr seltene Erbkrankheit, bei der die Funktion einer bestimmten Form weißer Blutkörperchen, der neutrophilen Granulozyten, gestört ist. 75 Prozent aller CGD-Fälle beruhen auf der Mutation eines Gens auf dem X-Chromosom, das für eine ganz bestimmte Untereinheit des Enzyms NADPH-Oxidase kodiert, – und in diesem Fall nur Jungen betrifft, weil es sich um einen X-chromosomal rezessiven Erbgang handelt. Die NADPH-Oxidase wandelt normale Sauerstoffmoleküle um in aggressive Sauerstoffradikale, Superoxid und Wasserstoffperoxid. Welche Rolle diese Radikale bei der Bekämpfung

Wirkungsstätte von Robert Koch, dem Entdecker des Tuberkulose-Bakteriums, und Paul Ehrlich. Paul Ehrlich war der erste, der 1880 den für die Immunologie so bedeutsamen Mechanismus der **Phagocytose** beschrieb. Auch neutrophile Granulozyten nehmen bakterielle Krankheitserreger via Phagocytose auf. Dabei umfließt die „Fresszelle“ den Erreger und schließt ihn in einer Blase, dem Phagosom, ein. Das Phagosom verschmilzt mit den Granula, membranumhüllten Bläschen, die gefüllt sind mit antimikrobiellen Substanzen. Sie schützen ihre Fracht in den so entstandenen Hohlraum aus. Gleichzeitig werden →



▲ NETs im Rasterelektronenmikroskop: Stimulierter neutrophiler Granulozyt mit Netzen und darin gefangenen Shigellen (orange), den Erregern der Bakterien-Ruhr. Sie werden durch die antibakterielle Wirkung des Chromatins abgetötet.



Damit durch Signalstoffe aktivierte neutrophile Granulozyten NETs bilden können, muss das Enzym NADPH-Oxidase zunächst Sauerstoff in Superoxid umwandeln (1). Die Membran des Zellkerns und der Granula zerfallen daraufhin (2) und ihre Inhalte mischen sich mit der Zellflüssigkeit (3). Nach zwei Stunden reißt die Zellmembran auf und die Bestandteile der NETs werden herausgeschleudert. Die obere Bildreihe zeigt die über selektiv bindende Antikörper mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markierten Bestandteile der NETs während der Netose.

→ an der Membran des Phagosoms Superoxid und Wasserstoffperoxid produziert. Für den eingeschlossenen Erreger entsteht so ein äußerst unwirtliches Milieu, in dem er schließlich umkommt.

Neutrophile sind, ebenso wie die andere Sorte „Fresszellen“, die Makrophagen, Teil der angeborenen Immunabwehr. Sie differenzieren sich täglich zu Millionen aus Stammzellen des Knochenmarks und machen weit über die Hälfte der weißen Blutkörperchen aus. Sie zirkulieren im Blut, verlassen die Blutgefäße aber, sobald sie über das Eindringen von Bakterien in den Körper alarmiert sind. Einem chemischen Lockstoff-Gradienten folgend, suchen sie innerhalb von Stunden den Infektionsherd auf. Zusammen mit den Makrophagen sind sie „Ersthelfer“ vor Ort. In der direkten Umgebung des Infektionsherds entlassen die Neutrophile dann in einem zweiten Schritt membranumhüllte und mit antimikrobiellen Substanzen gefüllte Bläschen, die Granula – gleichsam kleine chemische Bomben. Dieser Vorgang wird als **Degranulation** bezeichnet.

Die **angeborene Immunabwehr** gilt als eine Art Vorhut, ein erster Schutzwall und im Vergleich zum adaptiven Immunsystem zumindest vordergründig als ein wenig fili-graner Haudrauf, der eingedrungene Erreger binnen Minuten attackiert und so ihre Ausbreitung im Organismus verhindert. Die **adaptive Immunabwehr** wiederum basiert darauf, jeden Keim mit maßgeschneiderten Waffen zu vernichten. Und hernach die molekulare Visitenkarte des jeweiligen Erregers

ein Leben lang im Gedächtnis zu behalten, um bei einer erneuten Infektion schneller und effektiver zur Tat zu schreiten. Sie besteht aus Myriaden spezialisierter Zellen mit verschiedenen Unterklassen und noch mehr Botenstoffen und Signalmolekülen sowie passgenauen Antikörpern.

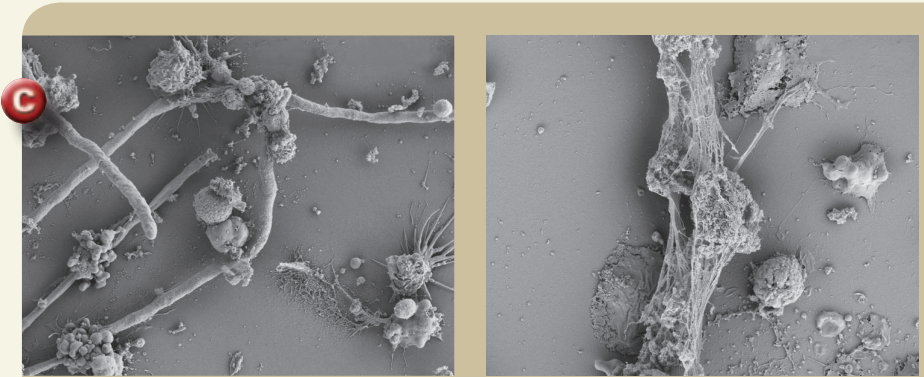
EINE NEUE MASCHKE?

Die Waffen der angeborenen Immunabwehr schienen also bekannt – dachte man zumindest bis 2003. Aber das, was Arturo Zychlinsky und Volker Brinkmann jetzt zum ersten Mal unter dem Lichtmikroskop sahen, war etwas anderes: Die Neutrophilen hatten sich ganz offenbar in den Selbstmord gestürzt. Die Zellen waren aufgeplatzt, und zwar einschließlich der Membran des Zellkerns. Dabei war die DNA dekondensiert und hatte – wie bei einem aufgelösten Knäuel Wolle – Fäden aus Chromatin über die Mi-

kroben ausgeworfen, die nun wie Fische im Netz zappelten (**Abb. A**). „**Neutrophil extracellular traps**“ oder kurz NETs nannten die beiden Max-Planck-Forscher ihre Entdeckung. In den folgenden Jahren machten sie sich daran, das Geheimnis der NETs zu entschlüsseln, Schritt für Schritt mit ausgeklügelten Methoden.

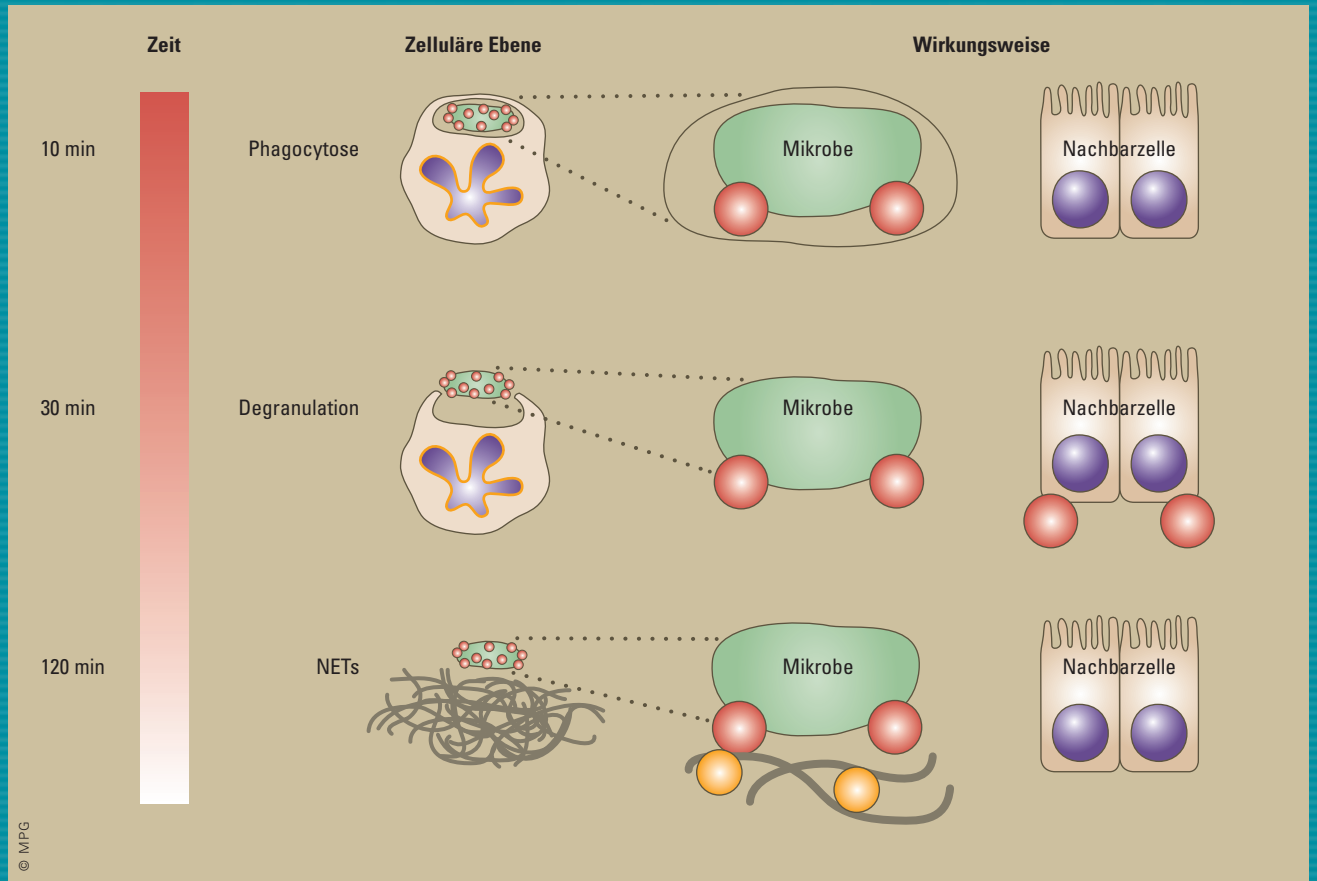
Das Experimentieren mit Neutrophilen ist wegen ihrer kurzen Lebensdauer von nicht mehr als sechs Stunden schwierig. Viele konventionelle molekularbiologische Methoden greifen nicht. Hinzu kommt, dass NETs sehr fragile Strukturen sind. „Wir nutzen die Technik der Immunfluoreszenz, um die NETs sichtbar zu machen. Die Probe wird dabei mit Antikörpern versetzt, die mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt sind und selektiv an Bestandteile der NETs binden“, erklärt Volker Brinkmann. Diese Technik ist sogar an lebenden Zellen durchführbar, der Prozess der NETs-Bildung kann so im Detail verfolgt werden (**Abb. B**).

NETs bestehen aus feinen Filamenten mit einem Durchmesser von etwa 17 Nanometer, womit sie etwa 200-mal dünner sind als ein menschliches Haar. Es sind Stapel aus Nukleosomen, einem Komplex aus DNA und Histonen, die quasi das Rückgrat der Filamente bilden. Dieses ist wie mit Perlen über und über mit Enzymen aus den Granula bedeckt. „Aufgrund dieser Morphologie lassen sich NETs in der hochauflösenden Elektronenmikroskopie gut von anderen filamentösen Strukturen unterscheiden“, sagt Brinkmann. Sind die NETs erst einmal ausgeworfen, breiten sie sich über einen 10- bis 15-fach größeren Raum aus als das ursprüngliche Zellvolumen. Die Mikroben werden dabei durch Unterschiede in der elektrischen Ladung auf der Oberfläche in den NETs fest



Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von mit *Aspergillus nidulans* infizierten Neutrophilen. Die Neutrophilen stammen vom selben Patienten vor (links) und nach (rechts) der Gentherapie. Vor der Behandlung sind die Neutrophile nicht fähig, NETs zu bilden. Nach der funktionalen Wiederherstellung der NADPH-Oxidase gelingt ihnen dieses wieder.

© Matteo Bianchi, Umeå University, 2011



Neutrophile setzen drei verschiedene Strategien ein, um Mikroben zu bekämpfen. Dazu gehören die Phagozytose, die Degranulation sowie die Bildung von NETs. Alle drei laufen auf unterschiedlichen Zeitskalen ab und haben ganz verschiedene Auswirkungen auf die Nachbarzellen. So reduziert die Aufnahme der Mikroben (grün) in das Phagosom Schäden der Nachbarzellen, während im Zuge der Degranulation Verdauungsenzyme (rot) frei gesetzt werden, die weiträumig auch Nachbarzellen schädigen. Die Einbindung dieser Enzyme, einschließlich der Histone (gelb), in die NETs begrenzt ihre Ausbreitung und damit auch die Gefahr für die Nachbarzellen.

gehalten. Und obwohl in der letzten Phase der **Netose** – so haben die Forscher diesen Vorgang getauft – durch Auflösung der Membranen die zellulären Kompartimente arg durcheinander gemischt werden, sind weniger als 30 verschiedene Proteine in den NETs vertreten. Die meisten von ihnen stammen aus den mit antimikrobiellen Substanzen gefüllten Depots, den Granula, einige wenige vom Zellkern, während Bestandteile des Zellplasmas eher selten sind.

UNGESUND FÜR MIKROBEN

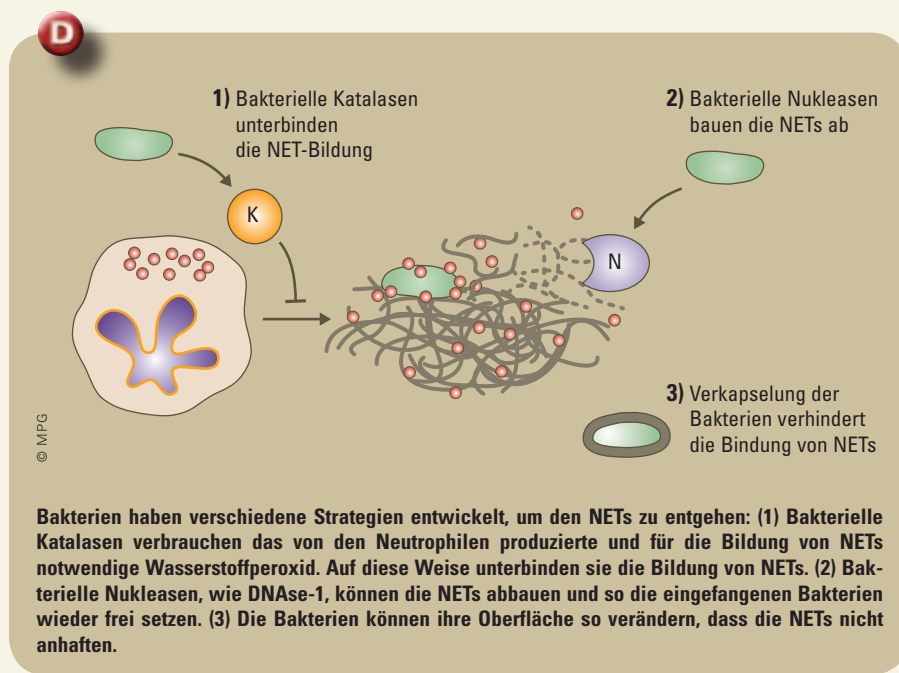
Die in der Falle zappelnden Bakterien werden durch die in den NETs enthaltenen Enzyme abgetötet. Oder gibt es da noch etwas? „Ja, die Histone aus dem Zellkern der Neutrophilen“, erklärt Arturo Zychlinsky, Direktor der Abteilung Zelluläre Mikrobiologie am Berliner Max-Planck-Institut. Sie sind eigentlich bekannt als maßgebliche

strukturelle Organisatoren der DNA. Der etwa zwei Meter lange Faden Erbsubstanz wird nämlich – wie Nähgarn um eine Garnrolle – um diese Proteine herum gewickelt, damit er überhaupt in den Zellkern passt. Da sich über die **Histone** der Verpackungsgrad der DNA verändern und damit das Ablesen der Gene regulieren lässt, haben sie eine wichtige Funktion in der Epigenetik – bestimmte Umwelteinflüsse können so auf die Erbinformation rückgekoppelt werden (**siehe auch BIOMAX 23**). „Aber Histone sind auch höchst potente Antibiotika und können Bakterien bereits in nanomolaren Konzentrationen vernichten“, betont Zychlinsky. Damit sind sie weitaus effektiver als die meisten antimikrobiellen Wirkstoffe.

Darüber hinaus könnten die extrazellulären Netze aber auch eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Keimen spielen, die schlichtweg zu groß sind, um sie zu pha-

gocytieren, wie beispielsweise Pilzhyphen. Warum bleiben Neutrophile von CGD-Patienten bei einer Infektion mit *Aspergillus* wirkungslos, wo sie doch wie bei anderen Menschen an die Infektionsstellen wandern, Mikroorganismen verdauen und sogar Verdauungsenzyme und andere antimikrobielle Stoffe ausschütten können? Ganz offenbar ist der Mechanismus der Phagozytose hier wirkungslos. Können die Neutrophile von CGD-Patienten womöglich keine NETs bilden?

Wir erinnern uns: CGD-Patienten verfügen aufgrund einer Mutation nicht über die Enzymmechanismen, durch die Wasserstoffperoxid und Superoxid erzeugt werden. Spielen diese möglicherweise eine Rolle bei der Bildung von NETs? Was, wenn man im Zuge einer Gentherapie bei CGD-Patienten die Aktivität dieses Enzymkomplexes teilweise wiederherstellen →



Bakterien haben verschiedene Strategien entwickelt, um den NETs zu entgehen: (1) Bakterielle Katalasen verbrauchen das von den Neutrophilen produzierte und für die Bildung von NETs notwendige Wasserstoffperoxid. Auf diese Weise unterbinden sie die Bildung von NETs. (2) Bakterielle Nukleasen, wie DNase-1, können die NETs abbauen und so die eingefangenen Bakterien wieder frei setzen. (3) Die Bakterien können ihre Oberfläche so verändern, dass die NETs nicht anhaften.

→ könnte? Im Kinderkrankenhaus der Universität Zürich kämpfen die Ärzte 2008 um das Leben eines achtjährigen CGD-Patienten, der an einer schweren Infektion der Lunge mit *Aspergillus nidulans* leidet. Eine Gentherapie ist für den Jungen die letzte Hoffnung. Und tatsächlich: Nach der funktionalen Wiederherstellung der NADPH-Oxidase sind die Neutrophilen in der Lunge des kleinen Patienten in der Lage, NETs zu produzieren und so die Pilzinfektion innerhalb weniger Wochen wirksam zu bekämpfen (**Abb. C**). Damit steht auch fest, dass die Enzymprodukte Wasserstoffperoxid und Superoxid offenbar wesentlich an der Initiierung der Netose beteiligt sind.

Da der Prozess der Netose unumkehrbar ist – die Zelle begeht schließlich nichts anderes als Selbstmord –, ist die Frage interessant, wie Neutrophile entscheiden, welche ihrer drei Abwehrstrategien zum Einsatz kommen (**Kasten Seite 3**). In der Petrischale nehmen Neutrophile Mikroben innerhalb weniger Minuten mittels Phagozytose auf. Degranulation erfolgt erst nach zehn Minuten und dauert, je nachdem wie viele Granula vorhanden sind, bis zu 30 Minuten. Die Bildung von NETs hingegen ist ein langwieriger Prozess, der etwa zwei Stunden benötigt. Ein Neutrophil kann also alle drei Strategien einsetzen – vorausgesetzt sie erfolgen in der richtigen Reihenfolge. „Das schließt natürlich die Möglichkeit nicht aus, dass sich einzelne Neutrophile anders verhalten als der Rest der Zellpopulation“, sagt Zychlinsky und verweist auf zukünftige Forschungsarbeiten, die sich dieser Frage widmen.

NETs bekämpfen aber nicht nur Krankheiten, sie können auch Auslöser von Krankheiten sein, je nach Ort, Zeit und Dosis. Wie bei der **Mukoviszidose**, eine der häufigsten und schwersten Erbkrankheiten bei Europäern. Aufgrund eines Gendefekts kann der Organismus nach einer Entzündungsreaktion NETs nicht abbauen. Sie tragen so zur Entstehung des zähflüssigen Schleims bei, der die Lunge des Patienten zunehmend zerstört.

ZU VIEL DES GUTEN

Im Fall der Autoimmunerkrankung **Lupus** wiederum bilden die Patienten drei Typen von Antikörpern: gegen die DNA, gegen Histone und gegen Proteine aus den Granula von Neutrophilen. Also interessanterweise genau gegen die Bestandteile der NETs. Die Krankheit schreitet in Schüben voran, die häufig von einer Infektion ausgelöst werden. Dabei scheint es sowohl zu einer gehäuften Bildung, als auch zu einem unzureichenden Abbau von NETs zu kommen. „Die rechtzeitige Entsorgung der NETs scheint essenziell zu sein, um die Bildung neuer Autoimmun-Antikörper zu verhindern“, erklärt der Max-Planck-Direktor. Normalerweise baut das im Blut zirkulierende Enzym DNase-1 die NETs ab; doch funktioniert das bei einem Teil der Lupus-Patienten nicht. Das führt zu einem Teufelskreis: NETs werden vermehrt gebildet, können nicht abgebaut werden, häufen sich daher an und können schließlich zu Nierenversagen führen. Die Produktion zu vieler NETs oder aber ihre Produktion zu einem falschen Zeitpunkt beziehungsweise am falschen Ort kann also schwerwiegende Folgen haben.

Trotzdem, NETs aus DNA und Histonen, die zur Immunabwehr ausgeworfen werden, sind – wie man inzwischen weiß – im Organismenreich weit verbreitet: Beim Menschen werden sie nicht nur von Neutrophilen produziert, sondern auch von Mastzellen, einer weiteren Art von Immunzellen. Analoge Strukturen wurden bei anderen Säugetieren, Vögeln und Fischen beschrieben. Auch Insekten machen NETs, wobei sie aber RNA statt DNA einsetzen, und selbst bei Pflanzen konnten NETs gefunden werden. Zychlinsky vermutet daher, dass sich der Komplex aus DNA und Proteinen, also das Chromatin, im Zuge der Evolution in zwei Richtungen entwickelt hat: zum einen, um große DNA-Stücke handhabbar zu machen, die genetische Information also zu organisieren, zum anderen, um die Erbsubstanz vor Fremdorganismen zu schützen. „Es ist vermutlich ein uraltes Instrument der Abwehr, das die Evolution bewahrt hat“, sagt der Mikrobiologe.

Nun besteht zwischen Wirt und Erreger immer ein kontinuierliches Wechselspiel. Im Laufe der Evolution haben beide jeweils neue Strategien entwickelt, den anderen für die eigenen Zwecke auszutricksen. Auf neue Abwehrstrategien des Wirts reagiert der Erreger irgendwann mit neuen Infektionsmechanismen – und umgekehrt. Auch bei den NETs ist die Evolution nicht zum Stillstand gekommen (**Abb. D**): So können einige Krankheitserreger ihre Oberflächenladung verändern oder sich in einer Kapsel verstecken, um nicht von NETs eingefangen zu werden. Verschiedene Bakterien sind sogar in der Lage, sich durch das Anbringen spezieller Enzyme an ihrer Oberfläche aus den NETs zu befreien. Den ersten Krankheitserregern gelingt es also bereits wieder, dem Immunsystem buchstäblich „durch die Maschen zu schlüpfen“.

Schlagnote: chronische Granulomatose, Phagozytose, neutrophile Granulozyten, Degranulation, angeborene/adaptive Immunabwehr, NETs, Netose, Histone, Mukoviszidose, Lupus

Internet-Tipp: www.mpg.de/608187/

WWW.MAXWISSEN.DE

– der Link zur Forschung für Schüler und Lehrer

Hier finden Sie Hintergrundinformationen und didaktisches Material zu den jeweils zweimal im Jahr erscheinenden Ausgaben von BIOMAX, GEOMAX und TECHMAX. Weitere Exemplare können Sie kostenlos bestellen unter: www.maxwissen.de/heftbestellung