UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie

Prof. Dr. med. Konrad Reinshagen

THERAPEUTIC TARGETING OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS IMPROVES PRIMARY AND SECONDARY INTENTION WOUND HEALING IN MICE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Annika Heuer aus Dormagen

Hamburg 2021

| Angenommen von der |
|---|
| Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.05.2021 |

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

| Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: | Prof. Dr. Wilhelm Wößmann |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: | Prof. Dr. Michael Boettcher |
| Mündliche Disputation vom: | 08.12.2021 |

"The immune system is more concerned with damage than foreignness, And is called in action by alarm signals from injured tissues, Rather than by the recognition of nonself." Matzinger 1994¹

INHALTSVERZEICHNIS:

| 1. ABKÜ | RZUNGSVERZEICHNIS | 5 |
|------------|--|----|
| 2. PUBL | IKATION | 6 |
| 3. DARS | TELLUNG DER PUBLIKATION | 17 |
| 3.1 Einlei | tung | 17 |
| 3.2 Mate | rial und Methoden | 19 |
| 3.2.1 | Studiendesign | 19 |
| 3.2.2 | Tierversuche | 19 |
| 3.2.3 | Präparatgewinnung und Aufarbeitung | 20 |
| 3.2.4 | Praparatanalyse | 20 |
| 3.2.5 | | 22 |
| 3.3 Ergeb | nisse | 23 |
| 3.3.1 | Modell 1 – Laparotomie Modell (Primäre Wundheilung) | 23 |
| 3.3.2 | Modell 2 – Thermische Verletzung (Sekundäre Wundheilung) | 24 |
| 3.4 Disku | ssion | 25 |
| 3.5 Ausb | ick | 27 |
| 3.6 Zusar | nmenfassung | 28 |
| 3.6.1 | Englisch | 28 |
| 3.6.2 | Deutsch | 29 |
| 3.7 LITE | RATURVERZEICHNIS | 30 |
| 3.8. ABE | BILDUNGSVERZEICHNIS | 36 |
| 3.8.1. | Abbildung 1 | 36 |
| 3.8.2. | Abbildung 2 | 37 |
| 3.8.3. | Abbildung 3 | 38 |
| 3.8.4. | Abbildung 4 | 39 |
| 4. ERKL | ÄRUNG DES EIGENANTEILS AN DER PUBLIKATION | 40 |
| 5. DANK | SAGUNG | 41 |
| 6. LEBEI | NSLAUF | 43 |
| 7. EIDES | STATTLICHE VERSICHERUNG | 44 |

1. Abkürzungsverzeichnis

| ARDS | Acute Respiratory Distress Syndrome Deutsch: Akutes Atemnotsyndrom |
|--------|--|
| cfDNA | C <i>ell-free</i> DNA Deutsch: zellfreie DNA |
| DAMPs | <i>Damage-associated molecular patterns</i> Deutsch: Schaden-assoziierte molekulare Muster |
| DAPI | 4',6-diamidiono-2-phenylindole |
| H&E | Hämatoxylin und Eosin |
| H3cit | <i>Citrullinated histone H3</i> Deutsch: Zitrulliniertes Histon H3 |
| КО | Knock out |
| Ly6G | Lymphozyten-Antigen 6 Komplex Lokus G6D |
| MPO | Myeloperoxidase |
| NE | Neutrophile Elastase |
| NETs | <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> Deutsch: Neutrophile Extrazelluläre Fallen |
| NETose | Programmierter Zelltod mit dem Ziel der NET Formation |
| NG | Neutrophile Granulozyten |
| PAD4 | Peptidylarginin-Deiminase 4 |
| PAMPs | Pathogen-associated molecular patterns Deutsch: Pathogen-assoziierte molekulare Muster |
| PBS | Phospathgepufferte Salzlösung (Pufferlösung) |
| SMA | <i>Alpha smooth muscle actin</i> Deutsch: Typ Alpha Aktin des glatten Muskels |
| TRALI | <i>Transfusion-related acute lung injury</i> Deutsch: Transfusionsbedingte akute Lungenschädigung |

2. Publikation



ORIGINAL RESEARCH published: 25 February 2021 doi: 10.3389/fimmu.2021.614347



Therapeutic Targeting of Neutrophil Extracellular Traps Improves Primary and Secondary Intention Wound Healing in Mice

Annika Heuer^{1†}, Carolin Stiel^{1†}, Julia Elrod¹, Ingo Königs¹, Deirdre Vincent¹, Patrick Schlegel², Magdalena Trochimiuk¹, Birgit Appl¹, Konrad Reinshagen¹, Laia Pagerols Raluy^{1†} and Michael Boettcher^{1*†}

Research Institute, Sydney University, Westmead, NSW, Australia

OPEN ACCESS

Edited by:

Amiram Ariel, University of Haifa, Israel

Reviewed by: Milladur Rahman, Lund University, Sweden Markus H. Hoffmann, University of Erlangen Nuremberg, Germany

*Correspondence: Michael Boettcher

m.boettcher@uke.de

[†]These authors have contributed equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to Inflammation, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: 05 October 2020 Accepted: 21 January 2021 Published: 25 February 2021

Citation:

Heuer A, Stiel C, Elrod J, Königs I, Vincent D, Schlegel P, Trochimiuk M, Appl B, Reinshagen K, Raluy LP and Boettcher M (2021) Therapoutic Targeting of Neutrophil Extracellular Traps Improves Primary and Secondary Intention Wound Healing in Mice. Front. Immunol. 12:614347. doi: 10.3389/limmu.2021.614347. **Background:** Neutrophils are the first responders in wound healing after injury that mediate pro- and anti-inflammatory activities i.a. through the formation of extracellular traps (NETs). However, excessive NETs presence in wound tissue can cause local hyperinflammation and -coagulation resulting in delayed wound healing. To improve wound healing, we aimed to examine the role of NETs and DNase1 on primary and secondary wound healing.

¹ Department of Pediatric Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ² Children's Medical

Methods: The study included 93 C57BL/6 mice, with 3 different genotypes: wildtype, Pad4-, and DNase1-Knockout (KO). Pad4-KO mice show limited NETs formation, while DNase1-KO mice cannot disintegrate them. All 3 genotypes were included in (1) a laparotomy group and (2) a thermal injury group. Animals in both groups either received DNase1 or a vehicle i.p. post wound induction and wound assessment and euthanasia were conducted. Laparotomy and burn scars were assessed using the stony brook scar evaluation scale and modified Yeong scale respectively. Tissue was analyzed histologically using H&E staining. Ly6g, Collagen I and III, SMA, and Fibrinogen were visualized and neutrophils activation (NE, MPO) and NETs (H3cit) formation assessed.

Results: All animals survived with no complications. DNase1 treatment led to a significantly improved scar appearance in both groups, which was also seen in Pad4-KO mice. In the laparotomy group DNase1 improved collagen deposition and fibrin concentration was significantly reduced by DNase1 treatment. Markers of neutrophil activation were significantly reduced in the treatment and Pad4-KO group. In the thermal injury group wound closure time was significantly reduced after DNase1 treatment and in the Pad4-KO group. Even though inflammation remained high in the thermal injury model over time, neutrophil activation and NETs formation were significantly reduced by DNase1 treatment compared to controls.

1

February 2021 | Volume 12 | Article 614347

Discussion: Primary and secondary intention wound healing is improved by targeting NETs through DNase1 treatment or genetic KO, as assessed by wound closure time and scar appearances. Additionally, wound stability was not affected by DNASE treatment. The results suggest that overall wound healing is accelerated and DNase1 appears to be a promising option to reduce scar formation; which should be evaluated in humans.

Keywords: scars, burns, wound healing, neutrophil extracellular traps, DNases

BACKGROUND

After an injury our innate immune system reacts within hours and days through an array of mechanisms which can exhibit both pro- and anti-inflammatory activities (1). A delicate equilibrium is formed that, once interrupted, can tilt from protecting the host to mediating hyperinflammation, further injury, and increasing mortality (1). Neutrophils are the most abundant cell type in the circulatory system, are regarded as the first line of defense in the innate immune system, and constitute the main leukocytes involved in the early phase of wound healing (2, 3). The short half-life of neutrophils in circulation, which is approximately 4 h, is balanced by their continuous and tightly controlled release from the bone marrow. However, recent studies have shown that neutrophils may differentiate into distinct subsets defined by specific phenotypes and functional profiles (4). As such, neutrophiles can reverse transmigration and reenter the circulatory system after shifting their phenotype towards a proinflammatory state with a longer life span of about 5.4 days, leading to severe systemic inflammation (5).

In response to infection and injury, neutrophils form extracellular traps (NETs), consisting of a tight network of nuclear material, lined with cytotoxic proteins such as myeloperoxidase (MPO) and neutrophil elastase (NE) (6, 7). NET formation is part of an evolutionarily conserved innate immune response that is directed at capturing and killing microbial pathogens either through (1) a programmed cell death pathway or (2) through discharging parts or their whole nucleus in a non-lytic matter (6-9). In spite of their antimicrobial properties, the excessive presence of NETs can be detrimental to the host in some cases, and hence NETs have been aptly acknowledged as "double-edged swords of innate immunity" involved in both stimulating and resolving inflammation (10, 11). NETs formation is not only induced by pathogens, it is also stimulated through endogenous danger signals and can further modulate the immune response though priming other cells to induce sterile inflammation. NETs may also stimulate platelet adhesion, resulting in activation of the coagulation cascade causing deleterious effects (6, 12-15). In fact, it has been shown that disturbed interactions, excessive release of NETs into the circulation, and an overexpression of cytokines contribute significantly to the pathology of several inflammatory conditions, such as autoimmune diseases, sepsis, ischemia reperfusion injury, thrombosis, endothelial damage, and hyperinflammation (16-19).

Different factors can interfere with the wound healing process, leading to an impairment of the physiological wound healing; resulting in (1) delayed acute wounds, (2) chronic wounds, or (3) excessive scar formation, causing a tremendous psychosocial burden to afflicted patients (20–22). Additionally, it has been reported that nonhealing wounds result in enormous health care expenses with costs being estimated at more than \$3 billion per year in the US (22). Although inflammation is indispensable for wound healing, it is closely associated with scar formation (21, 23, 24). In this context pathologic scars are assumed to be the result of hyper- or chronic inflammation of the reticular dermis (23).

Inflammation appears to be of particular importance in the context of thermal injuries. In burns, early debridement is essential in order to limit the inflammatory cascade, cease the hypermetabolic state, and limit secondary damage, since the removed eschar constitutes an inflammatory matrix and moreover presents an ideal breeding ground for pathogens (25-27). Furthermore, early re-epithelialization is one of the most important positive prognostic markers for an optimal outcome after thermal injury. A significant proportion of the tissue loss can be caused by secondary expansion of necrosis into the surrounding initially vital neighboring dermis, leading to an increased burn depth and area (28). Neutrophils infiltrate the wound after burn trauma and mediate microvascular damage in the zone of stasis through the formation of NETs (29). Hence, this process might be the result of neutrophils triggering local inflammatory responses and NET induced hypercoagulation at the burn wound site.

Activated neutrophils and elevated NET levels can be found in the adjacent tissue up to 60 days after the initial thermal injury in pigs and human, where the activated neutrophils produce large quantities of proteases and matrix metalloproteinases (30, 31). This results in prolonged inflammation, increased tissue damage, and delayed wound healing, which in turn promotes formation of hypertrophic scars (19, 32). Consequentially, neutrophils and induction of NET formation should be tightly regulated during the inflammatory phase of both primary and secondary intention wound healing to prevent excessive tissue loss, which can spread out far beyond the initially affected area. Recently, DNases have been reported to counteract local hypercoagulability and clotting-induced hypoxia, by dissolution of NETs formation, resulting in significantly enhances tissue perfusion and accelerated wound healing (7, 13, 14, 33). In the absence of DNASES, intravascular NETs form aggregates (NET clots) that can occlude blood vessels and cause ischemic end organ failure damage during inflammatory responses (33, 34). Thus, as clotting and inflammation processes are essential for wound healing, the aim of this study is to examine the role of NETs and DNase1 on primary and secondary wound healing.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

The study was approved by the Hamburg State Administration for animal research (73/15, 63/16). A total of 93 six- to eightweek-old mice (C57BL/6) were utilized for the two experimental models. Mice with a Pad4- or DNase1-Knockout with the same genetic background (C57BL/6) were used to examine the role of NETs and DNase1 in the process of wound healing. The DNase1-KO mice were generated as described earlier (33, 35). The WT mice and the Pad4-KO mice were obtained from Jackson Laboratory. PAD4 is a histone-modifying enzyme that is essential for NETs formation and its inhibition has been shown to limit NETs formation (36). For comparison, DNase1-Knockout mice were also employed. As DNase1 is known to disintegrate NETs (7), DNase1-Knockout mice are incapable of NET-resolution. All environmental parameters within the animal facility complied with the German guide for the care and use of laboratory animals (Tierschutzgesetz).

Animal Procedures

The mice were randomly divided into various groups. For better standardization all interventions were performed by the same operator. Anesthesia was induced with 5% isoflurane gas (Baxter, Unterschleißheim, Germany) and maintained with 2.5% isoflurane gas delivered through a facemask. Preoperative antisepsis was performed with Octenisept.

Model 1: Laparotomy

Primary intention wound healing was induced *via* median laparotomy using scissors (2.5 cm length) followed by a singlelayer continuous suture (Prolene 5-0; Ethicon, Norderstedt, Germany) in all animals. No suture removal was performed. Mice in the treatment group received DNase1 (Pulmozyme, Roche, Mannheim, Germany) with a dosage of 10 mg/kg body weight *via* i.p. route for 72 h every 12 h as shown **Figure 1B**. Control animals received a vehicle with the same treatment intervals as the case group. Euthanasia was performed after 72 h or 21 days *via* decapitation under general anesthetic with



Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

February 2021 | Volume 12 | Article 614347

Isoflurane. Experimental design and treatment strategy are summarized in **Supplement 1**.

Model 2: Thermal Injury

Thermal injuries, serving as a model for secondary intention wound healing, were induced as described previously (37, 38). In short, a 1.5 cm x 1.5 cm large burn injury was induced. After discontinuation of anesthesia, all animals were housed in the animal facility. Again, animals in the treatment group received DNase1 (Pulmozyme, Roche, Mannheim, Germany) with a dosage of 10 mg/kg body weight *via* i.p. route for 7 days every 12 h. Control animals received a vehicle with treatment intervals. Animals were euthanatized after 72 h, 7 days, 14 days, or 28 days as described above. Experimental design and treatment strategy are summarized in **Supplement 1**.

Scar Assessment

Scar assessment of model 1 (laparotomy wounds) were evaluated by two surgeons, blinded for the treatment group, before euthanasia using the Stony Brook Scar Evaluation Scale (39). This five-item ordinal wound evaluation scale incorporates assessments of five distinct attributes (width, height, color, suture marks, and overall appearance) with a binary response (1 or 0), resulting in a total score ranging from 0 (*worst*) to 5 (*best*).

Burn scars (model 2) were evaluated before euthanasia using the modified Yeong scale (40), by two surgeons, blinded for the treatment groups. This three-item wound evaluation scale was specifically developed for thermal injuries assessing the scar surface appearance, height and color mismatch from 1 (best) to 4 (worst) for each item.

Tissue Sampling

After blood collection, morphologic analysis was performed and captured using a 4K/12-megapixel camera. Next, the scar was dissected and evenly distributed into test tubes containing Bouin solution.

Microscopic Grading

All specimen were evaluated histologically. In our burn model the scars were marked with blue dye for better microscopic evaluation and standardization. All specimen were then washed in phosphate buffered saline (PBS) and fixed in 10% buffered formalin before being embedded in paraffin and cut into 3 μ m thick sections, slides were then stained using hematoxylin and eosin (H&E) and examined by two researchers who were blinded to the groups in light microscopy, using a magnification of ×4 and x10. Assessment of wound healing (epithelialization) was carried out in a standardized manner and expressed as a percentage of the whole wounded area. This was performed at a magnification of x10. The unhealed wound was measured as the distance between both edges of the reeptongue and the total wound diameter as the distance between the wound edges.

Immunohistochemistry (H&E, Ly6g, Collagen I/III, SMA, and Fibrin)

Hematoxylin and Eosin (H&E) and Lymphocyte Antigen 6 Complex Locus G6D (1A8-Ly6G) staining was performed with a standardized staining procedure. Collagen fibers were stained using Pico Sirius red (ab150681, Abcam, Cambridge, UK), using polarized light microscopy was used to differentiate collagen I from III. An antibody for smooth muscle actin (SMA, ab5694, Abcam, Cambridge, UK) was applied to the samples, serving as a marker for myofibroblast, which induce wound contraction. Fibrin deposition was determined using a fibrinogen antibody (ab58207, Abcam, Cambridge, UK). Subsequently, the stained samples were incubated according to manufacturer's instructions. In accordance with each antibody examined, an appropriate isotype control antibody was used as a negative control.

All samples were scored semi-quantitatively using following score:

- None (0) no signs of tissue staining
- Isolated (1) barely any staining of the tissue
- Little (2) small amount of tissue staining
- Medium (3) medium amount of tissue staining
- Strong (4) strong amount of tissue staining

The assessment of collagen alignment was scored based on the orientation of the bundles (0=diffuse with bundles in 90° angle to 4=parallel).

Immunofluorescence Staining (MPO, NE, and H3cit)

Three micrometer paraffin tissue sections underwent a deparaffinization and rehydration process followed by immunofluorescence staining for myeloperoxidase (MPO), neutrophil elastase (NE) and citrullinated histone 3 (H3cit). Antigen retrieval was assessed by incubating the sample slides with Target Retrieval Solution pH6 (Dako, Santa Clara, USA) and microwave for 1 min at 360W. following a cooling step of 30 min. After rinsing the sections twice for three min with a solution of tri-buffered saline and polysorbate 20 (Tween 20) (TBST), blocking of the probes was performed with a Donkey Block (BioGenex, Fremont, USA) for 30 min at room temperature (RT). Tissue specimens were further incubated with either isotype- or antigen-specific-antibodies at 4°C (Abcam, UK). Mouse anti-mouse MPO- (AB90810, Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-mouse NE- (AB68672, Abcam, Cambridge, UK), and rabbit anti-mouse H3cit- antibodies (AB5103, Abcam, Cambridge, UK) were diluted 1:50. Twelve hours later, sections were rinsed 3 x 5 min with TBST and subsequently incubated 1:200 with AF647- or Cy3 at RT for 30 min (Abcam, Cambridge, UK). After a 3 x 5 min rinsing-step with TBST, nuclei were counterstained by incubating probes with DAPI for 5 min at RT. Finally, slides were rinsed 5 min with PBS followed by 5 min rinsing with H_2O , and mounted with Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, USA). Isotype control antibodies were used as a negative control (MPO = X0931, Aglient, Santa Clara, USA; NE = AB37415, H3cit = AB37415, Abcam, Cambridge, UK).

Statistics

All data were analyzed using SPSS Statistics 26 (IBM, NY, USA) and GraphPad Prism 9 (GraphPad, CA, USA). A pre-power study calculation was performed using G*Power 3.0. The power

was deducted from previous trials regarding inflammation and NET formation (13, 41). Differences between groups were calculated using mixed-effect model with Geisser-Greenhouse correction as well as Dunnett's multiple comparison test. Data is presented as mean \pm standard deviation (SD). The level of significance was set at 0.05.

RESULTS

All animals survived and no complications, such as wound infection, sepsis or incisional hernia occurred.

Model 1—Laparotomy Model (Primary Intention Wound Healing)

Effects of Anti-NETs Treatment on Wound Healing Treatment with DNase1 led to a significantly improved Stony Brook Scar Evaluation Scale at 21 days post wound induction compared to controls that received a vehicle. A similar effect occurred in the Pad4-KO mice, which scored significantly better in the scar scale in comparison to wild type mice treated with the vehicle (shown in Figures 1A, B). With regards to immunohistochemistry, NETs seem to affect collagen distribution: There were no significant differences between groups regarding the collagen 1 to collagen 3 ratio, however, the alignment of collagen was significantly enhanced after 21 days post wound induction in mice treated with DNase1, compared to the control cohort (as shown in Figures 1C-E). Conversely, the collagen I to III ratio (p=0.012) and collagen alignment (p=0.03) of Pad4-KO were significantly increased in comparison to mice without endogenic DNase1 (DNase1-KO). Moreover, staining of fibrin was significantly reduced by DNase1 treatment (Figure 1F). SMA however, was not affected by treatment with DNASES or Pad-KO in this model (Figure 1G).

Effects of Anti-NETs Treatment of Neutrophils

Immunofluorescence staining showed that DNasel treatment significantly reduced markers of neutrophil activation, in particular NE, and NETs formation (H3cit) compared to controls (**Figures 2B–E**). The effects were even more pronounced when comparing animals with limited NETs formation (Pad4-KO) to mice with a genetic knockout of DNasel (MPO p=0.023, NE p=0.029, H3cit P=0.02, **Figures 2B–E**). In contrast, the effect of treatment with DNasel or genetic alteration of NETs formation on neutrophils (Ly6G staining) was not significant (**Figure 2A**).

Model 2: Thermal Injury (Secondary Intention Wound Healing)

Effects of Anti-NETs Treatment on Wound Healing

Wound healing was very consistent in all animals but affected knockout mice differently: Treatment with DNase1 significantly improved scar appearance compared to controls as measured by the modified Yeong scar scale (Figures 3A–C). Additionally, mice with reduced NET concentration, either resulting from DNase1 treatment or due to the Pad4-KO, showed a significantly faster wound closure time compared to (untreated) controls or DNase1-KO as shown in Figures 3D, E. The acceleration of wound maturation in mice that received DNase1 for one week is reflected by a significantly improved collagen I to III ratio (**Figures 3F, G**) and collagen alignment (**Figures 3F, H**). Collagen birefringence pattern was assessed. Parallel collagen fiber formation was observed predominantly during early stages and persisted significantly in control and DNase1-KO scars until day 28; whereas basket wave-like texture reminiscent of normal skin was more evident in animals with DNase treatment or with limited NETs formation (Pad4-KO). A statistically significant increased proportion of immature fibers (Collagen III; green) and decreased of mature fibers (Collagen I, red) were revealed in controls and DNase-KO animals. As in primary intention wound healing, SMA was mostly not affected by genetic alteration of NETs formation (Pad4-KO) or treatment with DNase1 (**Figure 3I**).

Effects of Anti-NETs Treatment of Neutrophils

Compared to primary intention wound healing, inflammation remained high in the thermal injury model over time, as measured through neutrophil activation and NETs formation: DNase1 treatment did not significantly affect the number of neutrophils, however PAD4-mice showed a reduction of neutrophils after 4 weeks (**Figure 4A**). However, neutrophil activation (as measured by the MPO score and NE) and most importantly, NETs formation (as measured by H3cit) were significantly lower in animals that were treated with DNase1 compared controls (**Figures 4B–E**).

DISCUSSION

Wound healing is a complex biological process, and therapeutic enhancement has proven difficult. To date, various concepts to improve wound healing and to limit hypertrophic scaring exist, but these measures are complicated, time consuming, and relatively ineffective (42). Particularly after thermal injuries, 70% of all patients still suffer from hypertrophic scaring, despite continuous advances in the surgical management of burn injuries. Subsequently, quality of life is greatly decreased due to the massive functional, aesthetic, and psychosocial sequelae (43). In the current study, primary and especially secondary intention wound healing was improved significantly by targeting NETs either by DNase1 treatment or genetic knockout (Pad4-KO mice). Supporting these findings is the observation that the genetic knockout of DNase1 lead to a diminished wound healing. Thus, DNase1 treatment improved wound closure time and scar appearances, which were reflected by an improved collagen I to III ratio and collagen alignment. Fortunately, SMA, a marker of wound stability, was not affected by anti-NETs treatment.

The appearance of scar tissue is dependent on the diameter, density, and orientation of the collagen fibers within the wound (44). While collagen fibers in normal skin tissue show a basketwave orientation, the fibers in scar tissue are densely packed and orientated in a parallel fashion (44, 45). Furthermore, the collagen fibrils appear to be thinner in contrast to normal tissue, which



Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

6



FIGURE 3 | Therapeutic targeting of NETs improves secondary intention wound healing. In all animals a 1.5 cm² thermal injury was induced. For the wildtype mice four timepoints (72 h, 7, 14, and 28 days) were performed and two (7, 28 days) for the knockouts. Controls n=5-6, DNase1 n=6, DNase1-KO n=5-6, Pad4-KO n=5-6. (**A**-**C**) Animals that received DNase1 or with limited NETs formation (Pad4-KO) had significantly superior scar scores than controls. (**D**-**H**) Animals with DNase1 treatment or without NETs showed a significantly faster wound closure and switch from collagen 30 to 1. Additionally, an improved collagen alignment after DNase1 treatment or without NETs showed a significantly faster wound closure and switch from collagen 30 to 1. Additionally, an improved collagen alignment after DNase1 treatment was found, indicating a faster maturation of the scar. (**E**) H&E staining of the thermal injury on day 7 showing the left wound border. Arrows indicate the reepithelization tongue progressing significantly faster in animals with DNase treatment. S indicates scab which is made up of necrotic tissue and found is less-optimal wounds. M indicates muscle layer and F adipose tissue. In control mice the subcutaneous fat and muscle layer was lost. However, in mice that were treated with DNase1 both layers were not affected possibly suggesting a secondary injury induced by extracellular traps. (**F**) Parallel collagen fiber formation was observed predominantly during early stages and persisted significantly in control and DNase1-KO scars until day 28; whereas basket wave-like texture reminiscent of normal skin was more evident in animals with DNase treatment or with limited NETs formation (Pad4-KO). Moreover, in controls and DNase-KO mice immature fibers (Collagen III; green vs. Collagen I, red) remained dominant. (**I)** SMA was only affected partially by DNase1. Data shown as Mean ± SD. Comparison was performed always in comparison with controls. Statistics: mixed-effect model with Geisser-Greenhouse correction as well

results in an altered ratio of collagen I to III (44). Therefore, it is believed, that the mechanical stability, the tensile strength, and the wound quality of both normal and scar tissue are determined by the ratio of collagen I to III and orientation (46, 47). In previous studies a low collagen I to III ratio has been associated with anastomotic leakage after large bowel surgery and with a higher incidence of incisional hernias and recurrent incisional hernias (46–48). In the current study, however, inhibition of NETs formation (by Pad4-KO or alternatively DNase1 treatment) lead to an improved collagen I to III ratio in the scars. Treating wounds with DNase1, one might fear an impairment of wound stability; especially in the context of thermal injuries in which neutrophils are known to persist for weeks (31). In contrast to this assumption,

this study demonstrated that overall wound healing was not impaired, but rather accelerated, as shown by the improved switch from collagen III to I, the collagen alignment, and most obviously by the accelerated wound closure. Correspondingly, SMA concentrations did not differ between animals with increased or decreased NETs formation, which is expressed by the activated myofibroblast in the course of wound healing. Thus, the results may suggest that NETs do not promote the phenotype switch of fibroblast to myofibroblast (49).

In previous studies it has been established that neutrophils play an essential role in wound healing. Skin injury triggers neutrophil infiltration and NETs formation through unknown mechanisms (50). The increase in NET deposition in skin



Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

8

wounds of diabetic mice reduces healing rates and normal healing rates can be restored by PAD4 deficiency (3). The process might involve tissue damage or the modulation of inflammation and the downregulation of tissue repair mechanisms (51). In the current study, targeting of NETs by DNase1 or by the genetic knockout did not influence the number of neutrophils, but it did lead to a significant reduction of neutrophil activation and, most importantly, NETs deposition in the skin. The self-amplifying loop between activated neutrophils and NETs has been described in previous studies (52-57). As total number of neutrophils were not affected by DNase1 treatment, it appears that NETs affect neutrophil activation; for instance via an activation loop by oxidative stress or IL-1b/IL-18 (54, 56). Taking the results form Wong et al. under consideration, it is very likely that deposition of NETs in primary and secondary intention wound healing hinders wound healing and that this process may be improved using anti-NETs therapy like DNASES (3).

Limitations of the current study include (1) the limited number of timepoints of the knockout mice in the burn model and (2) the histological analyses are rather observational than providing mechanistic insights which should be addressed in future studies.

In conclusion, the inhibition of NETs formation either by treatment with DNase1 or Pad4-KO appears to be a promising option to reduce scar formation. Indeed, recombinant human DNase1 is cost effective and, to date, no adverse effects are known (58-61). In fact, NETs are shown to have procoagulant and prothrombotic effects, but as of yet no evidence for an elevated bleeding diathesis after NETs dissolution are known. In a previous study, systemic DNase1 treatment did not interfere with coagulation; more specifically, it did not affect bleeding time (41). Additionally, health care professionals might fear an elevated susceptibility to infections in those treated with DNase1, due to their role in the innate immune system. However, although NETs were first postulated to limit infection, a lack of NETs did not worsen bacteremia in PAD4deficient mice which were subjected to polymicrobial sepsis, indicating that NET inhibition will not likely render the host vulnerable to bacterial infections (62). However, further research is necessary to validate our findings in humans and to test tolerances of the DNases in a clinical setting.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

REFERENCES

- Huber-Lang M, Lambris JD, Ward PA. Innate immune responses to trauma. Nat Immunol (2018) 19:327–41. doi: 10.1038/s41590-018-0064-8
- Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? Front Physiol (2018) 9:113. doi: 10.3389/fphys.2018.00113

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Hamburg State Administration for animal research (73/15, 63/16).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AH: acquisition, analyzed data, and interpretation of the data, drafted the manuscript, and approved the final revision. CS: acquisition, analyzed and interpreted the data, drafted the manuscript, and approved the final revision. JE: acquisition, analyzed and interpreted the data, and approved the final revision. IK: acquisition, analyzed data, and approved the final revision. DV: acquisition, analyzed data, and approved the final revision. PS: acquisition, analyzed data, and approved the final revision. MT: acquisition, analyzed data, and approved the final revision. BA: acquisition, analyzed data, and approved the final revision. KR: acquisition, analyzed data, and approved the final revision. LP: acquisition, analyzed and interpreted the data, and approved the final revision. MB: designed study, acquisition, analyzed and interpreted the data, drafted the manuscript, and approved the final revision. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was supported by the German Research Society (BO5534).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Kristin Hartmann (Mouse pathology, core facility, UKE Medical School) for assistance with histological processing.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021. 614347/full#supplementary-material

Supplementary Figure 1 | Experimental design and treatment strategy. 1A: In mice either a laparotomy or thermal injury was induced. Treatment was started directly after induction. Subjects were treated according to their assigned group with DNase1 i.p. injections for three days (model one 1B) or one week (model two 1C). In order to control for secondary effects of the injection, controls received a vehicle.

- Wong SL, Demers M, Martinod K, Gallant M, Wang Y, Goldfine AB, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. Nat Med (2015) 21:815–9. doi: 10.1038/nm.3887
- Silvestre-Roig C, Fridlender ZG, Glogauer M, Scapini P. Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends Immunol* (2019) 40:565–83. doi: 10.1016/ j.it.2019.04.012

9

- Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2012) 32:1777–83. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.242859
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* (2004) 303:1532–5. doi: 10.1126/science.1092385
- Fuchs TA, Hakim A, Urban CF. Inflammation. Vol. Chapter 6. World Scientific (2018).
- 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) 176:231–41. doi: 10.1083/jcb.200606027
- Toussaint M, Jackson DJ, Swieboda D, Guedan A, Tsourouktsoglou TD, Ching YM, et al. Host DNA released by NETosis promotes rhinovirusinduced type-2 allergic asthma exacerbation. *Nat Med* (2017) 23:681–91. doi: 10.1038/nm.4332
- 11. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med* (2017) 23:279–87. doi: 10.1038/nm.4294
- Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr., et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107:15880–5. doi: 10.1073/pnas.1005743107
- Boettcher M, Meier D, Jimenez-Alcazar M, Eschenburg G, Mietzsch S, Vincent D, et al. Degradation of Extracellular DNA by DNasel Significantly Reduces Testicular Damage After Testicular Torsion in Rats. Urology (2017) 109:223 e1–7. doi: 10.1016/j.urology.2017.07.031
- Boettcher M, Fuchs TA, Schafer H, Appl B, Trochimiuk M, Jimenez-Alcazar M, et al. Modulation of Thrombosis Significantly Reduces Testicular Damage after Testicular Torsion in Rats: Anti-Thrombotic Treatment and Testicular Torsion. Urology (2016) 88:227 e1–7. doi: 10.1016/j.urology.2015.11.004
- Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood* (2013) 122:2784–94. doi: 10.1182/blood-2013-04-457671
- Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* (2009) 15:1318–21. doi: 10.1038/nm.2053
- Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNApeptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* (2011) 3:73ra19. doi: 10.1126/scitranslmed.3001180
- Ray K. Autoimmunity: disordered NETs implicated in pathogenesis of MPO-ANCA-associated vasculitis. *Nat Rev Rheumatol* (2012) 8:501. doi: 10.1038/ nrrheum.2012.123
- Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. Adv Wound Care (New Rochelle) (2013) 2:379–88. doi: 10.1089/wound.2012.0383
- Brown BC, McKenna SP, Siddhi K, McGrouther DA, Bayat A. The hidden cost of skin scars: quality of life after skin scarring. J Plast Reconstr Aesthet Surg (2008) 61:1049–58. doi: 10.1016/j.bjps.2008.03.020
- 21. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. J Dent Res (2010) 89:219-29. doi: 10.1177/0022034509359125
- Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. *Clin Dermatol* (2007) 25:19-25. doi: 10.1016/ j.clindermatol.2006.12.005
- Ogawa R. Keloid and Hypertrophic Scars Are the Result of Chronic Inflammation in the Reticular Dermis. Int J Mol Sci (2017) 18(3):606. doi: 10.3390/ijms18030606
- Jeong W, Yang CE, Roh TS, Kim JH, Lee JH, Lee WJ. Scar Prevention and Enhanced Wound Healing Induced by Polydeoxyribonucleotide in a Rat Incisional Wound-Healing Model. Int J Mol Sci (2017) 18(8):1698. doi: 10.3390/ijms18081698
- Orgill DP. Excision and skin grafting of thermal burns. N Engl J Med (2009) 360:893-901. doi: 10.1056/NEJMct0804451
 Barret IP, Herndon DN. Effects of burn wound excision on bacterial
- Darret JP, Herndon DN. Elects of burn wound excision on bacterial colonization and invasion. *Plast Recornst Surg* (2003) 111:744–50; discussion 751-2. doi: 10.1097/01.PRS.0000041445.76730.23
- Engrav LH, Heimbach DM, Reus JL, Harnar TJ, Marvin JA. Early excision and grafting vs. nonoperative treatment of burns of indeterminant depth: a randomized prospective study. *J Trauma* (1983) 23:1001–4. doi: 10.1097/ 00005373-198311000-00007

NETs and Wound Healing

- Singer AJ, McClain SA, Taira BR, Guerriero JL, Zong W. Apoptosis and necrosis in the ischemic zone adjacent to third degree burns. *Acad Emerg Med* (2008) 15:549–54. doi: 10.1111/j.1553-2712.2008.00115.x
- Schwacha MG, Thobe BM, Daniel T, Hubbard WJ. Impact of thermal injury on wound infiltration and the dermal inflammatory response. J Surg Res (2010) 158:112–20. doi: 10.1016/j.jss.2008.07.034
- Singh V, Devgan L, Bhat S, Milner SM. The pathogenesis of burn wound conversion. Ann Plast Surg (2007) 59:109–15. doi: 10.1097/01.sap. 0000252065.90759.e6
- Korkmaz HI, Ulrich MMW, Vogels S, de Wit T, van Zuijlen PPM, Krijnen PAJ, et al. Neutrophil extracellular traps coincide with a pro-coagulant status of microcirculatory endothelium in burn wounds. *Wound Repair Regener* (2017) 25(4):609–17. doi: 10.1111/wrr.12560
- Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nat Rev Immunol (2006) 6:173–82. doi: 10.1038/nri1785
- Jimenez-Alcazar M, Rangaswamy C, Panda R, Bitterling J, Simsek YJ, Long AT, et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science* (2017) 358:1202–6. doi: 10.1126/science.aam8897
- Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, Lindemann A, Singh J, Herrmann I, et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine* (2020) 58:102925. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102925
- Bradley A, Anastassiadis K, Ayadi A, Battey JF, Bell C, Birling MC, et al. The mammalian gene function resource: the International Knockout Mouse Consortium. *Mamm Genome* (2012) 23:580–6. doi: 10.1007/s00335-012-9422-2
- Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* (2010) 207:1853–62. doi: 10.1084/jem.20100239
- Atalay S, Coruh A, Deniz K. Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing. *Burns* (2014) 40:1375–83. doi: 10.1016/ j.burns.2014.01.023
- Cardoso AL, Bachion MM, Morais JM, Fantinati MS, Almeida VL, Lino RSJ. Adipose tissue stromal vascular fraction in the treatment of full thickness burns in rats. Acta Cir Bras (2016) 31:578–85. doi: 10.1590/S0102-865020160090000002
- Singer AJ, Arora B, Dagum A, Valentine S, Hollander JE. Development and validation of a novel scar evaluation scale. *Plast Reconstr Surg* (2007) 120:1892–7. doi: 10.1097/01.prs.0000287275.15511.10
- Mecott GA, Finnerty CC, Herndon DN, Al-Mousawi AM, Branski LK, Hegde S, et al. Reliable scar scoring system to assess photographs of burn patients. J Surg Res (2015) 199:688–97. doi: 10.1016/j.jss.2014.10.055
- Boettcher M, Eschenburg G, Mietzsch S, Jimenez-Alcazar M, Klinke M, Vincent D, et al. Therapeutic targeting of extracellular DNA improves the outcome of intestinal ischemic reperfusion injury in neonatal rats. *Sci Rep* (2017) 7:15377. doi: 10.1038/s41598-017-15807-6
- Singer AJ, Dagum AB. Current management of acute cutaneous wounds. N Engl J Med (2008) 359:1037–46. doi: 10.1056/NEJMra0707253
- Finnerty CC, Jeschke MG, Branski LK, Barret JP, Dziewulski P, Herndon DN. Hypertrophic scarring: the greatest unmet challenge after burn injury. *Lancet* (2016) 388:1427–36. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31406-4
- Dale PD, Sherratt JA, Maini PK. A mathematical model for collagen fibre formation during foetal and adult dermal wound healing. *Proc Biol Sci* (1996) 263:653–60. doi: 10.1098/rspb.1996.0098
- 45. van Zuijlen PP, Ruurda JJ, van Veen HA, van Marle J, van Trier AJ, Groenevelt F, et al. Collagen morphology in human skin and scar tissue: no adaptations in response to mechanical loading at joints. *Burns* (2003) 29:423– 31. doi: 10.1016/S0305-4179(03)00052-4
- Stumpf M, Klinge U, Wilms A, Zabrocki R, Rosch R, Junge K, et al. Changes of the extracellular matrix as a risk factor for anastomotic leakage after large bowel surgery. *Surgery* (2005) 137:229–34. doi: 10.1016/j.surg. 2004.07.011
- Klinge U, Si ZY, Zheng H, Schumpelick V, Bhardwaj RS, Klosterhalfen B. Abnormal collagen I to III distribution in the skin of patients with incisional hernia. *Eur Surg Res* (2000) 32:43–8. doi: 10.1159/000008740
- 48. Klinge U, Zheng H, Si Z, Schumpelick V, Bhardwaj RS, Muys L, et al. Expression of the extracellular matrix proteins collagen I, collagen III and fibronectin and matrix metalloproteinase-1 and -13 in the skin of patients with inguinal hernia. *Eur Surg Res* (1999) 31:480–90. doi: 10.1159/ 000008728

- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* (2012) 180:1340–55. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.02.004
- Lammermann T, Afonso PV, Angermann BR, Wang JM, Kastenmuller W, Parent CA, et al. Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature* (2013) 498:371–5. doi: 10.1038/nature12175
- El Kebir D, Filep JG. Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through beta2 Integrins. *Front Immunol* (2013) 4:60. doi: 10.3389/fimmu.2013.00060
- Kahlenberg JM, Carmona-Rivera C, Smith CK, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages. J Immunol (2013) 190:1217–26. doi: 10.4049/jimmunol.1202388
- Weber C, Jenke A, Chobanova V, Yazdanyar M, Chekhoeva A, Eghbalzadeh K, et al. Targeting of cell-free DNA by DNase I diminishes endothelial dysfunction and inflammation in a rat model of cardiopulmonary bypass. *Sci Rep* (2019) 9:19249. doi: 10.1038/s41598-019-55863-8
- Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. Science (2015) 349:316–20. doi: 10.1126/science.aaa8064
- Munafo DB, Johnson JL, Brzezinska AA, Ellis BA, Wood MR, Catz SD. DNase I inhibits a late phase of reactive oxygen species production in neutrophils. *J Innate Immun* (2009) 1:527–42. doi: 10.1159/000235860
- 56. Josefs T, Barrett TJ, Brown EJ, Quezada A, Wu X, Voisin M, et al. Neutrophil extracellular traps promote macrophage inflammation and impair atherosclerosis resolution in diabetic mice. JCI Insight (2020) 5(7):e134796. doi: 10.1172/jci.insight.134796
- Shao S, Fang H, Dang E, Xue K, Zhang J, Li B, et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote Inflammatory Responses in Psoriasis via Activating Epidermal TLR4/IL-36R Crosstalk. Front Immunol (2019) 10:746. doi: 10.3389/ fimmu.2019.00746

- Pressler T. Review of recombinant human deoxyribonuclease (rhDNase) in the management of patients with cystic fibrosis. *Biologics* (2008) 2:611–7. doi: 10.2147/BTT.S3052
- Davis JC Jr., Manzi S, Yarboro C, Rairie J, McInnes I, Averthelyi D, et al. (rhDNase) in patients with lupus nephritis. *Lupus* (1999) 8:68–76. doi: 10.1191/096120399678847380
- Martinez Valle F, Balada E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarres M. DNase 1 and systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* (2008) 7:359–63. doi: 10.1016/ j.autrev.2008.02.002
- Keyel PA. Dnases in health and disease. Dev Biol (2017) 429:1–11. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.06.028
- Martinod K, Fuchs TA, Zitomersky NL, Wong SL, Demers M, Gallant M, et al. PAD4-deficiency does not affect bacteremia in polymicrobial sepsis and ameliorates endotoxemic shock. *Blood* (2015) 125:1948–56. doi: 10.1182/ blood-2014-07-587709

Conflict of Interest: MB serves as a medical advisor of Neutrolis, Cambridge, MA, USA that focuses on developing therapies against NETs. MB is a stakeholder of Neutrolis. No compounds from Neutrolis were used in this study.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Heuer, Stiel, Elrod, Königs, Vincent, Schlegel, Trochimiuk, Appl, Reinshagen, Raluy and Boettcher. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3. Darstellung der Publikation

3.1 Einleitung

Das angeborene Immunsystem reagiert innerhalb von Stunden über komplexe pro- und antiinflammatorische Prozesse auf Verletzungen^{2,3}. Hierbei ist die Schlüsselrolle der Neutrophilen Granulozyten (NG) im Rahmen der lokalen Pathogenabwehr allgemein anerkannt^{2,4-6}. NG unterliegen in der Zirkulation mit ca. 4 Stunden einer raschen Zellelimination welcher eine streng regulierte kontinuierliche Freisetzung aus dem Knochenmark entgegensteht^{7,8}. Im Rahmen eins Traumas kommt es u.a. zur Differenzierung der NG in proinflammatorische Subtypen mit spezifischen Phänotypen und funktionellem Profil. Dieser Phänotypenswitch führt nicht nur zu einer Verlängerung der Lebensdauer mit bis zu 5,4 Tagen, sondern ermöglicht auch die Rückkehr der NG in das Gefäßsystem (reverse Transmigration), welche mit einer hohen systemischen proinflammatorischen Triggerwirkung einhergeht^{7,9,10}. NGs formen als sogenannte Effektorfunktion Neutrophil Extracellular Traps (NETs), welche nach der NG Aktivierung v.a. über die Dekondensation von nukleärem Chromatin entstehen. Dieses netzartige DNA-Gerüst wird überzogen von proteolytischen Enzymen, u.a. Neutrophile Elastase (NE) und Myeloperoxidase (MPO)^{5,11-13}. Die Freisetzung von NETs in den Extrazellularraum läuft entweder (1) über programmierten Zelltod (NETose) oder (2) durch nicht-lytische Freisetzung von zytoplasmatischer- und mitochondrialer DNA ab^{5,11,14}. Insbesondere während der NETose zeigt sich die Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) essentiell für die Citrullinierung nukleärer Histone (H3cit) während der Dekondensation chromosomaler DNA^{13,15,16}. Neuere Arbeiten konnten jedoch auch eine uncitrullinierte, PAD4-unabhängige NET-Formation nachweisen¹⁷. Die NET-Formation wird nicht nur durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs), sondern ebenso durch endogene danger oder damage (Gefahrensignal) assoziierte molekulare Muster (DAMPs) ausgelöst und kann aus diesem Grund ebenso die Entstehung autoimmuner Inflammation verursachen^{1,10,13}. Vor allem von steriler und der prothrombotische Stimulus der NETs fungiert als Link zwischen Inflammation und schwerwiegenden lokalen, aber auch systemischen Schäden bis hin zum septischem Multiorganversagen oder Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)^{18,19}. Im Wundmodell führen lokal erhöhte Konzentrationen von NETs durch die proteolytischen Enzyme zu einem endo- und epithelialen Schaden. Durch die hierdurch resultierende Schädigung von Granulationsgewebe kommt es zu einer verzögerten Reepithelialisierung und Entstehung von chronischen Wunden ^{4,20,21}. Dem initialen, durch direkten mechanischen Schaden bedingten Untergang von dermalem Gewebe kann eine nekrotische Ausweitung in ursprünglich vitales angrenzendes Gewebe der sogenannten Stasezone folgen^{20,22}. Dieser sekundäre Zelluntergang ist vor allem durch eine NET-vermittelte Mikrothrombenbildung mit

bedingt^{4,23,24}. Perfusions-Disäquilibrium nachfolgendem Insbesondere thermische Verletzungen führen im Gesundheitswesen durch lange Hospitalisierung, aufwändige Rehabilitation und komplexes Wundmanagement zu einer hohen ökonomischen Belastung²⁵. Trotz komplexer Behandlungsalgorithmen und stetigem medizinischem Fortschritt führen bis zu 70 % aller thermischen Verletzungen zu einer hypertrophen Narbenbildung^{26,27}. Insbesondere die Lebensqualität der hiervon betroffenen Patienten bleibt nachhaltig eingeschränkt, da sich ästhetische, funktionelle und hohe psychische Beeinträchtigungen ergeben^{28,29}. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass ein gutes klinisches Langzeit-Outcome maßgeblich von einer schnellen Reepithelialisierung der Wunde (Wundverschluss) abhängig ist^{30,31}. Bei zeitgerechter Wundheilung infiltrieren NG die Wunde innerhalb von 24 Stunden und persistieren für ca. eine Woche nach der initialen Verletzung. Bei thermischen Verletzungen ist die Inflammationsreaktion besonders ausgeprägt, sodass NG und NETs regelhaft über Wochen in der Läsion nachgewiesen werden können^{4,32}. Die hoch komplexen Abläufe der Wundheilung setzen sich noch Monate bis Jahre in Form von Narbenumbau fort^{27,33,34}.

Die Aktivierung der NG und NET-Formation muss folglich streng reguliert sein um einen komplikationslosen Ablauf der Inflammationsphase in primärer als auch sekundärer Wundheilung zu gewährleisten und eine progrediente Schädigung von Gewebe zu verhindern. DNasen stellen die größte Gruppe extrazellulärer Endonukleasen in unseren Körperflüssigkeiten dar und zersetzen effektiv Chromatin und DNA³⁵. Durch die Degradation der NETs können DNasen somit einer lokalen und systemischen überschießenden NET-getriggerter Inflammation und Hyperkoagulation entgegenwirken^{24,36}.

Da sowohl die Inflammationsreaktion als auch eine kompetente Gerinnung essentielle Aspekte der Wundheilung darstellen, ist das Ziel dieser Studie die Rolle der NETs und DNase1 auf die primäre und sekundäre Wundheilung zu untersuchen.

Hypothese

Durch eine therapeutische DNase1 vermittelte sowie genetische PAD4-KO induzierte Hemmung der NG-Effektorfunktion, den NETs, lässt sich ein vorteilhafter Effekt auf die primäre und sekundäre Wundheilung in einem murinen Modell erzielen.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Studiendesign

Das Tierversuchsvorhaben (73/15, 63/16,109/17) wurde von der Hamburger Behörde für Tierversuche nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes bewilligt. Insgesamt wurden 93, 6-8 Wochen alte C57BL/6 Versuchsmäuse in einen zweiarmigen experimentellen Versuch eingeschlossen. Mäuse mit genetischem PAD4- oder DNase1-*Knock-out* (KO) desselben genetischen Hintergrundes (C57BL/6) wurden eingesetzt, um die Rolle von NETs und DNase1 differenzierter zu untersuchen. Die Zucht der DNase1-KO Mäuse erfolgte nach vorbeschriebener Art und Weise^{24,37}. Wildtyp und PAD4-KO Mäuse wurden von *Jackson Laboratory* erworben. Die Tierhaltung erfolge in durch das deutsche Tierschutzgesetz für Versorgung und Verwendung von Labortieren vorgeschriebenem Rahmen.

3.2.2 Tierversuche

Die Versuchstiere wurden nach dem Zufallsprinzip in die verschiedenen Gruppen aufgeteilt. Zur Qualitätssicherung wurden die Traumata bei allen Mäusen durch den gleichen Operateur erzeugt. Die Anästhesieeinleitung erfolgte durch 5 % Isofluran-Gas (Baxter, Unterschleißheim, DEU) und wurde mittels 2 %-iger Isofluranapplikation über die Gesichtsmaske aufrechterhalten. Interventionen erfolgten in aseptischen Bedingungen³⁸.

3.2.2.1 Modell 1: Laparotomie

Eine mediale Laparotomie über 2,5 cm Länge wurde mittels mikrochirurgischer Schere induziert und durch eine kontinuierliche Hautnaht mittels Prolene 5-0 (Ethicon, Norderstedt, DEU) verschlossen. Es erfolgte kein Fadenzug. Mäuse der Behandlungsgruppe erhielten DNase1 (Pulmozyme, Roche, Mannheim, DEU) in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht *via* i.p. Applikation alle 12 h während der ersten 72 h. Kontrolltiere erhielten eine *Vehicle*-Applikation im selben Behandlungsintervall. Euthanasie erfolgte an den Zeitpunkten 72 h und 21 Tagen mittels zervikaler Dislokation in Isofluran induzierter Vollnarkose.

3.2.2.2 Modell 2: Thermale Verletzung

1,5 cm² messende thermale Verletzungen, repräsentativ für die sekundäre Wundheilung, wurden wie zuvor beschrieben mittels Wasser befüllten PVP Flasche (95 °C für 9 Sekunden) dorsal auf Höhe der Schulterblätter induziert^{39,40}. Mäuse der Behandlungsgruppe erhielten DNase1 (Pulmozyme, Roche, Mannheim, DEU) in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht *via* i.p. Applikation alle 12 h während der ersten 7 Tage. Kontrolltiere erhielten eine *Vehicle*-Applikation im selben Behandlungsintervall. Euthanasie erfolgte an zwei oder mehr

Zeitpunkten (72 h, 7, 14 und 28 Tagen) mittels zervikaler Dislokation in Isofluran induzierter Vollnarkose.

3.2.2.3 Knock-out-Modell

Die Knockout-Mäuse erhalten nach der Induktion der Verletzung keine weitere Behandlung. Die Protein-Arginin-Deiminase 4 (PAD4) ist ein Histon-modifizierendes Enzym, dessen Funktionsverlust im KO-Modell die NET-Formation einschränkt⁴¹. Durch einen Defekt der endogenen DNase1 ist der Abbau von zellfreier DNA (cfDNA) inklusive der NETs in DNase1-KO Tieren gestört, sodass es zu einer Akkumulation kommt^{24,37}.

3.2.3 Präparatgewinnung und Aufarbeitung

Post mortem erfolgte die Fotodokumentation der Verletzung sowie die großzügige Resektion der Verletzung im Gesunden. Zur genaueren mikroskopischen Identifikation erfolgte die exakte Markierung der Verbrühung/Narbe mittels Tissue Marking Dye (CDI's® TMD Blue, Cancer Diagnostics, Inc., Durham, USA) bevor die Präparate mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gespült und bis zur Weiterverarbeitung für 48 – 96 h in gepufferter 10 %-iger Formalinlösung aufbewahrt wurden.

3.2.4 Präparatanalyse

Die histologischen Präparate wurden makroskopisch ausgewertet (Narbenscore, siehe 4.2.4.1) und anschließend der histologischen Färbung zugeführt. Nach der Paraffinbettung wurden Schnitte mit einer Dicke von 3 µm angefertigt. Alle Färbeverfahren erfolgten standardisiert und maschinell nach Angaben des Herstellers. Alle Proben wurden durch zwei unabhängige Wissenschaftlerinnen semi-quantitativ am Lichtmikroskop beurteilt.

3.2.4.1 Makroskopisches Scoring

Im Modell 1 (Laparotomie Wunde) erfolgte die Evaluation verblindet durch zwei Wissenschaftlerinnen anhand der *Stony Brook Scar Evaluation* Skala⁴². Mittels binärer Kategorisierung (1 oder 0) erfolgte die Beurteilung in 5 Kategorien: Breite, Dicke, Farbunterschied, Naht-Narben und Gesamteindruck.

Im Modell 2 (Thermische Wunde) wurde verblindet durch zwei Wissenschaftlerinnen anhand der modifizierten Yeong Skala evaluiert⁴³. In drei Kategorien erfolgte, die Beurteilung der Oberfläche, der Dicke sowie der Farbunterschiede (1 - bestes Ergebnis bis 4 - schlechtestes Ergebnis).

3.2.4.2 Histologische Analyse

Die Präparate wurden mittels Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt und lichtmikroskopisch unter 4-, 10- und 20-facher Vergrößerungen analysiert. Die Reepithelialisierung der Wunde wurde definiert als der Abstand zwischen den zwei Reepithelialisierungszungen minus der gesamten Wunddistanz.

3.2.4.3 Immunhistologische Analyse

Kollagenfasern wurden mittels Pico Sirius red (ab150681, Abcam, Cambridge, UK) angefärbt und unter polarisierendem Licht bei 10- und 20-facher Vergrößerungen evaluiert. Anteilig wurden Kollagen III und I semiquantitativ bestimmt sowie die Faserdichte und Ausrichtung zueinander evaluiert. Ein Antikörper für glatte Muskulatur (SMA, ab5694, Abcam, Cambridge, UK) wurde als Marker für Myofibroblasten, welche über Wundkontraktion zum Wundverschluss beitragen, verwendet. Die Lymphozyten-Antigen 6 Komplex Lokus G6D (1A8-Ly6G) Färbung erfolgte standardisiert und bindet primär NG. Fibrinablagerungen wurden mittels Fibrinogen-Antikörper (ab58207, Abcam, Cambridge, UK) dargestellt. Auf jedem Objektträger befand sich neben der Probe eine mit entsprechendem isotypen Kontrollantikörper inkubierte Negativkontrolle (Isokontrolle) zum standardisierten Abgleich. Das Scoring erfolgte semiquantitativ anhand einer Skala von 0 (kein Anhalt für Färbung) bis 4 (gut sichtbares Muster mit ausgeprägter Anhäufung). Die Bewertung des Kollagen *Alignment* erfolgte anhand der Ausrichtung der Kollagenbündel zueinander (0 = diffus mit bis zu 90 ° zwischen den Bündeln bis 4 = Parallelität).

3.2.4.3 Immunfluoreszenzfärbung

3 µm-Paraffinschnitte durchliefen eine Deparaffinierung und Rehydratation bevor sie zur Darstellung der Myeloperoxidase (MPO), der Neutrophilen Elastase (NE) und des citrullinierten Histon 3 (H3cit) immunfluoreszenzgefärbt wurden. Vorbereitend erfolgte die Inkubation mittels *Target Retrieval Solution pH6* (Dako, Santa Clara, USA) und ein Anwärmen in der Mikrowelle bei 360 W für 1 Minute mit 30-minütiger Abkühlungsphase. Anschließend folgte das zweifache Abspülen für 3 Minuten mit TBS-T-Pufferlösung und Polysorbate 20 (Tween 20). Die Proben wurden zur Reduzierung des Hintergrundrauschens für 30 Minuten bei Raumtemperatur mittels *Donkey Block* (BioGenex, Fremont, USA) behandelt. Jeweils zwei der vier Schnitte wurden entweder mit Isotypen- oder Antigenspezifischem-Antikörper bei 4 °C (Abcam, UK) behandelt. *Mouse anti-mouse* anti-MPO (AB90810, Abcam, Cambridge, UK), *rabbit anti-mouse* anti-NE (AB68672, Abcam, Cambridge, UK) und *rabbit anti-mouse* anti-H3cit (AB5103, Abcam, Cambridge, UK) wurden 1:50 gelöst. Zwölf Stunden später erfolgte ein erneuter Spülschritt mit TBST. Nukleoli wurden

durch die 5-minütige Inkubation mit DAPI bei Raumtemperatur gegengefärbt. Abschließend erfolgte erneut ein Spülschritt mit PBS gefolgt von H₂O für jeweils 5 Minuten und Fixieren mittels Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, USA). Die der Negativkontrolle dienenden Isotypen Antikörper entsprechen: MPO = X0931, Aglient, Santa Clara, USA; NE = AB37415; H3cit = AB37415, Abcam, Cambridge, UK. Die Inkubation erfolgte 1:200 mit AF647- oder Cy3 (Abcam, Cambridge, UK).

3.2.5 Statistik

Alle Daten werden mit SPSS Statistics 26 (IBM, NY, USA) und GraphPad Prism 9 (GraphPad, CA, USA) analysiert. Eine Power-Analyse wurde mittels G*Power 3.0 durchgeführt. Die Effektstärke wurde aus vorangehenden Studien mit Fokus auf Inflammation und NET-Formation abgeleitet^{44,45}. Es wurde ein Mixed Modell mit Geisser-Greenhouse Korrektur sowie ANOVA mit Dunnett's Korrektur verwendet. Unsere Daten werden als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit p≤0,05 erreicht.

3.3 Ergebnisse

Es überlebten alle Versuchstiere ohne Komplikationen wie Wundheilungsstörungen, Sepsis oder Narbenhernien.

3.3.1 Modell 1 – Laparotomie Modell (Primäre Wundheilung)

3.3.1.1 Effekte der Anti-NET-Therapie auf die Wundheilung

Anhand der Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung konnten durch die DNase1 Therapie signifikant reduzierte Marker der Neutrophilenaktivität, speziell NE und NET-Formation (H3cit), verglichen mit der Kontrollgruppe gezeigt werden (Abbildung 2A-E; MPO 21 Tage: Kontrolle vs. DNase1 p<0,032, Kontrolle vs. PAD4-KO p=0,032; H3cit 72h: Kontrolle vs. DNase1 p<0,005, Kontrolle vs. PAD4-KO p<0,01; H3cit 21 Tage: PAD4-KO vs. DNase1 p<0,018). Der Effekt war sogar verstärkt, wenn Tiere mit limitierter NET-Formation (PAD4-KO) mit Tieren der DNase1-KO Gruppe verglichen wurden (MPO p=0.023, NE p=0.029, H3cit p=0.02, Abbildung 2B-F). DNase1 Therapie oder PAD4-KO beeinflussten hingegen die NG Anzahl (Ly6G Färbung) nicht signifikant (Abbildung 2A).

3.3.1.2 Effekte der Anti-NET-Therapie auf die Neutrophilen Granulozyten

Die Therapie mit DNase1 führte zu signifikant höheren Werten auf der *Stony Brook Scar Evaluation* Skala 21 Tage nach Wundinduktion im Vergleich mit Tieren, die eine *Vehicle*-Injektion erhielten. Ein ähnlicher Effekt stellte sich in der PAD4-KO Gruppe ein, deren Wert auf der Scar Skala signifikant höher als der von mit *Vehicle* behandelten Wildtyp-Mäusen war (Abbildung 1A, B). Im Hinblick auf die Immunhistochemie beeinflussten NETs die Kollagenverteilung: Zwar zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Kollagen I/III-Quotienten, jedoch zeigte sich das *Alignment* als Marker der Reifung nach 21 Tagen signifikant reduziert in Tieren, die eine DNase1 Therapie erhielten, verglichen mit der Kontrollgruppe (dargestellt in Abbildung 1C-E). In PAD4-KO Tieren zeigte sich der Kollagen I/III-Quotient (p=0.012) und das Kollagen *Alignment* (p=0.03) gleichermaßen signifikant verbessert verglichen mit Tieren ohne endogener DNase1 Aktivität (DNase1-KO). Darüber hinaus bildete sich durch die DNase1-Behandlung weniger Fibrin (Abbildung 1F). SMA wurde in unserem Modell weder durch DNase noch PAD4-KO signifikant beeinflusst (Abbildung 1G).

3.3.2 Modell 2 – Thermische Verletzung (Sekundäre Wundheilung)

3.3.2.1 Effekte der Anti-NET-Therapie auf die Wundheilung

Eine Therapie mittels DNase1 verbesserte die makroskopischen Eigenschaften (Yeong-Skala) verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant (Abbildung 3A-C; 28 Tage: Kontrolle vs. DNase1 p=0.002; Kontrolle vs. PAD4-KO p=0.017). Bei reduzierter NETs-Anzahl in PAD4-KO Mäusen oder durch Therapie mittels DNase1 zeigte sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe auch der Wundverschluss signifikant beschleunigt (Abbildung 3D, E; 7 Tage: Kontrolle vs. DNase1 p=0.001; Kontrolle vs. PAD4-KO p=0.028). Die beschleunigte Wundreifung in Mäusen, welche DNase1 erhielten, spiegelte sich sowohl in dem signifikant erhöhtem Kollagen I/III-Quotienten (Abbildung 3F, G; 72 Stunden: Kontrolle vs. DNase1 p=0.019; 14 Tage: Kontrolle vs. DNase1 p=0.008), als auch signifikant reduziertem Kollagen Alignement wider (Abbildung 3F, H; 28 Tage: Kontrolle vs. DNase1 p=0.05). Parallele Kollagenfaseranordnung wurde primär während frühen Phasen der Heilung beobachtet und zeigte sich persistent bis Tag 28 in Narben der Kontrolltiergruppe und DNase1-KO-Tieren. Korbflechtartige Anordnung der Fasern, physiologisch in gesunder Haut, zeigte sich signifikant vermehrt in Tieren mit DNase1-Therapie sowie Tieren des PAD4-KO (Abbildung 3 H; 28 Tage: Kontrolle vs. DNase1 p=0.05). Ein signifikant erhöhter Anteil an unreifen Fasern (Kollagen III, grün) und Reduktion der reifen Fasern (Kollagen I, rot) wurde in Kontroll- und DNase-KO-Mäusen beobachtet. SMA zeigte sich wie bei der primären Wundheilung größtenteils unbeeinflusst (Abbildung 3).

3.3.2.2 Effekte der Anti-NET-Therapie auf die Neutrophilen Granulozyten

Verglichen mit der primären Wundheilung zeigte sich die Inflammationsreaktion im Modell der thermischen Verletzung über die Zeit, gemessen an der NG-Aktivierung und NET-Formation, ausgeprägt hoch: Zwar wurde die Anzahl von NG (Ly6G) im Gewebe von DNase1-behandelten und PAD4-KO-Tieren wenig beeinflusst, doch konnte in PAD4-KO-Mäusen nach vier Wochen eine signifikante Reduktion der NG-Anzahl im Narbengewebe festgestellt werden (Abbildung 4A; 28 Tage: Kontrolle vs. PAD4-KO p=0,022). Die Aktivität der NG, gemessen an der Verteilung von MPO und NE sowie insbesondere der NET-Formation (H3cit), konnte durch eine Therapie mittels DNase1 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert werden (Abbildung 4B-E; 14 Tage: MPO Kontrolle vs. DNase1 p<0,001; H3cit Kontrolle vs. PAD4-KO p=0,044).

3.4 Diskussion

In dem vorgestellten tierexperimentellen Modell der primären und insbesondere sekundären Wundheilung konnte reproduzierbar eine *full-thickness* Wunde mit nachfolgend starkem NG-Influx sowie NETs-Produktion erzielt werden. Darüber hinaus konnte die Formation von NETs in allen Phasen der Wundheilung sowie Persistenz von *NETosis primed* NG bis in die Remodelingphase nachgewiesen werden.

Neben der erfolgreichen Etablierung des Maus-Modells in unserem Institut entsprachen unsere Ergebnisse der Hypothese, dass eine Reduktion von NETs mittels DNase1 oder genetisch in PAD4-KO Tieren zu einer signifikant verbesserten sekundären Wundheilung führt. Dies spiegelte sich insbesondere in der beschleunigten Reepithelialisierung sowie verbesserten makroskopischen Wund-/Narbenausprägung wider. Die Zeit bis zur vollständigen Reepithelialisierung wird in der Literatur als prognostisch wichtiger Prädiktor für das spätere Outcome beschrieben⁴⁶. Die pathogene Rolle der NETs während der Wundheilung wurde weiter durch die negativ beeinflusste Heilungstendenz in Tieren mit DNase1-KO unterstützt. Durch Fehlen der DNase1 kam es zu einer gestörten Abbaufähigkeit und somit Akkumulation von NETs in Wund- und Stasezone, was zu einem verstärkten sekundären Ausweiten der Nekrosezone und Beeinträchtigung der Heilungstendenz führte.

Die Infiltration der Wundregion durch Fibroblasten initiiert den der Inflammationsphase folgenden Schritt der Wundheilung: die Proliferationsphase⁴⁷. Lokale Fibroblasten produzieren bereits in den ersten drei Tagen nach Gewebeschädigung Kollagen, hauptsächlich parallele Fasern vom Typ III⁴⁸. In der Proliferationsphase wird jedoch die spätere Struktur und Qualität der entstehenden Narbe, welche maßgeblich sowohl vom Durchmesser, von der Orientierung als auch von der Dichte der entstehenden Kollagenfasern (insbesondere dem Wechsel zu Typ I) abhängig ist, definiert^{49,50}. Im letzten Schritt der Wundheilung, dem Remodeling, zeigt sich hauptsächlich die Produktion von stabilem korbflechtartig angeordnetem Typ I Kollagen. In normaler Haut zeigen Kollagenfasern diese gut vernetzte korbflechtartige Anordnung, wohingegen sich Kollagenfasern in Narbengewebe eher unreif, fein und parallel angeordnet darstellen^{27,50}. Eine reduzierte Narbenreifung spiegelt sich daher in reduziertem Kollagen I/III-Quotient wider⁵⁰. Kollagen Typ I erhöht die lokale Widerstandskraft und Stabilität und definiert somit die Qualität des Gewebes^{27,51}. Je nach Wundgröße kann die Remodelingphase Wochen bis Jahre andauern⁴⁹. In Studien konnte ein niedriger Kollagen I/III-Quotient mit erhöhtem Risiko von Anastomoseninsuffizienzen sowie Narbenhernien in Verbindung gebracht werden^{51,52}. In unseren Versuchen führte die Inhibition der NET-Formation (PAD4-KO oder DNase1Therapie) zu einem erhöhten Kollagen I/III-Quotienten der Narben. Wir konnten somit neben einer prognostisch guten Beschleunigung der Reepithelialisierung auch die qualitative Verbesserung durch eine DNase1-Therapie demonstrieren.

Zudem zeigen unsere Daten eine in den Gruppen stabile SMA Expression durch Myofibroblasten, welche zu Kontraktilität und Spannkraft von Gewebe und zügigem Wundschluss beitragen^{53,54}. In unserer Studie wirkte sich die NET-Formation nicht auf den Phänotypenswitch von Fibroblasten zu Myofibroblasten aus.

Auch in der Literatur wurde die pathogene Rolle der NG im Rahmen der Wundheilung bereits untersucht. So führte die Akkumulation von NETs in Hautwunden zu deutlich verlangsamter Heilung und chronischen Wunden in einem Modell diabetischer Mäuse. Diesem Effekt konnte durch einen PAD4-KO, welcher die NET-Formation hemmt, entgegengewirkt werden²¹. Der pathogene Effekt der NETs wird in dieser Studie direkt auf den lokalen Gewebeschaden und/oder der Modulation der Inflammationsreaktion mit Herunterregulation von Reparaturmechanismen zurückgeführt⁵⁵. Weitere Studien zeigten, dass die Infiltration von T-Zellen und NG in die Dermis nach DNAse1 Behandlung deutlich reduziert werden konnte^{56,57}. In unserer Studie führte ein Abbau der NETs durch DNase1, bzw. reduzierter Produktion in PAD4-KO-Tieren, zwar nicht zu einer Reduktion der Anzahl an NG im Gewebe, jedoch zu einem signifikanten Rückgang der Aktivierung der NG sowie der NET-Formation. Eine positive-Feedbackschleife zwischen NETs und der NG-Aktivierung wurde in Studien bereits beschrieben⁵⁵⁻⁶¹. Dies berücksichtigend, sehen wir die signifikante Reduktion der Aktivität der NG durch die DNase1 Therapie, trotz fehlendem bzw. insbesondere bei fehlendem Einfluss auf die NG-Anzahl, als Hinweis auf die Beeinflussung der NG durch die NETs. NETs an sich stellen bereits ein DAMP dar und verursachen darüber hinaus via proinflammatorischer Interleukine u.a. IL-1β/IL-18 sowie oxidativem Stress ein starkes NGaktivierendes Signal, welches zur Amplifikation der Inflammationsreaktion beiträgt⁵⁷⁻⁶¹.

Zusammen mit den Ergebnissen von Wong et al. zeigt sich, dass die Akkumulation von NETs die primäre und sekundäre Wundheilung negativ beeinflusst und diesem pathogenen Prozess durch eine anti-NET-Therapie via DNasen entgegengewirkt werden kann.

Limitationen der vorliegenden Studie beinhalten (1) eine geringere Anzahl von Analysezeitpunkten der Knock-out-Gruppen im Verbrennungsmodell sowie (2) eine durch histologische Analysen limitierte mechanistische Herangehensweise, welche in weiteren Studien vertieft werden sollte.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass die Inhibition der NET-Entstehung, sowohl durch eine Therapie mit DNase1, als auch mittels eines genetischen PAD4-KO, eine vielversprechende therapeutische Option zur Beschleunigung der Wundheilung und Reduktion von Narbenbildung in einem experimentellen Mausmodell ist. Weitere Studien sollten die Ergebnisse in humanisierten Modellen verifizieren, um einen möglichen *bench-to-bedside*-Transfer zu realisieren.

3.5 Ausblick

Aufgrund der essentiellen Rolle in der Pathogenabwehr wurde durch eine DNase1-Behandlung besonders eine Vulnerabilität für Infektionen angenommen. Obwohl NETs physiologischerweise Infektionen limitieren sollen, führt ein Defizit dieser Effektorzellen nicht zu einer erhöhten Bakteriämie in PAD4-KO-Mäusen, welche einer polymikrobiellen Umgebung ausgesetzt waren. In mehreren Studien konnte hingegen ein protektiver systemischer Effekt einer verminderten NET-Produktion im Rahmen der Sepsis nachgewiesen werden⁶²⁻⁶⁵. Es wird daher postuliert, dass eine NET-Inhibition nicht zu erhöhter Vulnerabilität im Rahmen bakterieller Infektionen führt^{66,67}. In diesem Sinne konnte eine therapeutische Anwendung von DNase1 einen signifikant beschleunigten Abbau von nekrotischem Material sowie Pus in Weichteilabszessen und Pleuraempyemen erzielen^{68,69}. Eine Großzahl von bakteriellen Biofilmen sind zur Aufrechterhaltung einer strukturellen Stabilität auf freie DNA angewiesen, so konnte in Versuchen eine Biofilmbildung mit und ohne medizinischer Implantate mittels DNase-Therapie signifikant reduziert oder verhindert werden⁷⁰⁻⁷⁵. Insbesondere wenn Patient:innen mit einliegenden Implantaten von sekundären Wundinfekten betroffen sind, welche einen Wechsel nötig machen oder dieser unmöglich ist, steht das behandelnde Team vor großen Herausforderungen. Beschichtete Implantate oder lokaler / systemischer DNase Einsatz könnte neue Therapieoptionen im Feld der septischen Chirurgie ermöglichen und somit zu signifikanten Fortschritten in der Patientenversorgung führen^{75,76}. Darüber hinaus scheint die DNase-Therapie zusammen mit klassischer antiinfektiver Therapie einen synergistischen Effekt auszubilden und könnte zukünftig einen wertvollen therapeutischen Nutzen erweisen^{68,70,75,76}.

Rekombinante humane DNase1 ist kosteneffizient und bis dato wurden in tierexperimentellen sowie humanen Versuchen keine nachteiligen Auswirkungen festgestellt^{35,77-80}. Aufgrund der prokoagulatorischen sowie prothrombotischen Eigenschaft wurde befürchtet, dass es zu einer erhöhten Blutungsneigung nach NETs-Reduktion kommen könnte. Systemische DNase1 Therapie zeigte in einer experimentellen Studie jedoch keine negative Beeinflussung der Blutungszeit⁴⁵. Eine weitere endogene DNase ist die DNase1I3^{24,35}. In unserer AG haben wir bereits nachweisen, dass die DNase1I3 bereits in geringer Dosierung die komplette NET-Struktur inklusive der Histone auflösen kann (unveröffentlichte Ergebnisse). Möglicherweise könnte die Verwendung dieser DNase die Wundheilung noch weiter verbessern bzw. durch Verkürzung der Inflammationsphase beschleunigen. In weiteren Versuchen planen wir daher diese DNase in unseren Modellen der primären und sekundären Wundheilung zu evaluieren. Um die Translation zum Menschen weiter zu optimieren, sollen hierbei auch humanisierte Mäuse verwendet, sowie eine lokale (transdermale) Applikation der DNasen getestet werden.

3.6 Zusammenfassung

3.6.1 Englisch

<u>Background</u>: Neutrophilic granulocytes (NG) infiltrate tissue after trauma and mediate proand anti-inflammatory activities mainly through the formation of neutrophilic extracellular traps (NETs). NETs promote microvascular damage in the zone of stasis leading to impaired healing. We hypothesized that targeting NETs via DNase1 application and peptidyl arginine deminase type IV (PAD4) knock-out, reduces inflammation, promotes reepithelization and reduces scarring in an experimental model of primary and secondary injury. <u>Methods</u>: A cutaneous full-thickness wound was induced via either (1) surgical incision or (2) thermal injury of 93 C57BL6/J mice with 3 different genotypes: wildtype, PAD4-, and DNase1-Knockout (KO). Wildtype animals either received DNase1 or a vehicle via i.p. route. Wound assessment and euthanasia were conducted. Endpoints were macroscopic appearance (scar scale), time until full re-epithelization (H&E staining), scar structure (collagen I/III ratio, fiber organization and density), wound contractility (SMA), as well as activation of NG (NE, MPO) and NETs release (H3cit). <u>Results</u>: DNase1 treatment or PAD4-KO led to a significant improvement of macroscopic scar appearance and faster wound closure, while wound stability and contractibility was not negatively affected.

3.6.2 Deutsch

Hintergrund: Neutrophile Granulozyten (NG) besitzen pro- und antiinflammatorische Eigenschaften und können mittels ihrer Effektorfunktion, den Neutrophil Extracellular Traps (NETs), nach traumatischer Verletzung zu überschießender Entzündungsreaktion und Hyperkoagulation führen. Wir stellten die These auf, dass eine Reduktion von NETs über DNase1 Therapie und Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) Knock-out zu einer Reduktion der Inflammation und beschleunigter Reepithelialisierung mit reduzierter Narbenbildung in einem Mausmodell der primären und sekundären Verletzung führt. Methoden: Eine Wunde wurde mittels (1) chirurgischer Inzision oder (2) Verbrühung in 93 C57BL6/J Mäusen der Genotypen Wildtyp, PAD4- und DNase1-Knockout (KO) induziert. Mäuse vom Wildtyp erhielten entweder eine i.p. DNase1- oder Vehicle-Behandlung. Nach der Euthanasie erfolgte die Evaluation folgender Endpunkte: Makroskopisches Bild (Narbenskala), Reepithelialisierung (H&E Färbung), Narbenstruktur (Kollagen I/III-Ratio, Faserorientierung und -dichte), Wundkontraktilität (SMA) sowie NG-Aktivität (NE, MPO) und NET-Formation (H3cit). Ergebnisse: NET-Reduktion durch DNase1-Behandlung oder PAD4-KO führte sowohl zu einer signifikanten Verbesserung des makroskopischen Narbenbildes als auch zu beschleunigter Reepithelialisierung, während die Wundstabilität nicht negativ beeinflusst wurde.

3.7 Literaturverzeichnis

- 1. Matzinger P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annual Review of Immunology.* 1994;12(1):991-1045.
- 2. Huber-Lang M, Lambris JD, Ward PA. Innate immune responses to trauma. *Nat Immunol.* 2018;19(4):327-341.
- 3. McIlroy DJ, Jarnicki AG, Au GG, et al. Mitochondrial DNA neutrophil extracellular traps are formed after trauma and subsequent surgery. *J Crit Care.* 2014;29(6):1133.e1131-1135.
- 4. Korkmaz HI, Ulrich MMW, Vogels S, et al. Neutrophil extracellular traps coincide with a pro-coagulant status of microcirculatory endothelium in burn wounds. *Wound Repair Regen.* 2017;25(4):609-617.
- 5. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-1535.
- 6. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol.* 2018;9:113.
- 7. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, et al. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2010;116(4):625-627.
- 8. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:181-218.
- 9. Beyrau M, Bodkin JV, Nourshargh S. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol.* 2012;2(11):120134.
- 10. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(3):159-175.
- 11. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231-241.
- 12. Pruchniak MP, Kotuła I, Manda-Handzlik A. Neutrophil extracellular traps (Nets) impact upon autoimmune disorders. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40(2):217-224.
- 13. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(2):134-147.
- 14. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009;16(11):1438-1444.
- 15. Wang S, Wang Y. Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1829(10):1126-1135.

- 16. Martinod K, Demers M, Fuchs TA, et al. Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(21):8674-8679.
- 17. Holmes CL, Shim D, Kernien J, Johnson CJ, Nett JE, Shelef MA. Insight into Neutrophil Extracellular Traps through Systematic Evaluation of Citrullination and Peptidylarginine Deiminases. *Journal of Immunology Research*. 2019;2019:2160192.
- 18. Czaikoski PG, Mota JM, Nascimento DC, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148142.
- 19. Bosmann M, Ward PA. Protein-based therapies for acute lung injury: targeting neutrophil extracellular traps. *Expert Opin Ther Targets.* 2014;18(6):703-714.
- 20. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One.* 2012;7(2):e32366.
- 21. Wong SL, Demers M, Martinod K, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med.* 2015;21(7):815-819.
- 22. Schwacha MG, Thobe BM, Daniel T, Hubbard WJ. Impact of thermal injury on wound infiltration and the dermal inflammatory response. *J Surg Res.* 2010;158(1):112-120.
- 23. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(8):1777-1783.
- 24. Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science*. 2017;358(6367):1202-1206.
- 25. Sánchez JL, Perepérez SB, Bastida JL, Martínez MM. Cost-utility analysis applied to the treatment of burn patients in a specialized center. *Arch Surg.* 2007;142(1):50-57; discussion 57.
- 26. Deitch EA, Wheelahan TM, Rose MP, Clothier J, Cotter J. Hypertrophic burn scars: analysis of variables. *J Trauma*. 1983;23(10):895-898.
- 27. Finnerty CC, Jeschke MG, Branski LK, Barret JP, Dziewulski P, Herndon DN. Hypertrophic scarring: the greatest unmet challenge after burn injury. *Lancet.* 2016;388(10052):1427-1436.
- 28. Murphy KD, Thomas S, Mlcak RP, Chinkes DL, Klein GL, Herndon DN. Effects of long-term oxandrolone administration in severely burned children. *Surgery*. 2004;136(2):219-224.
- 29. Pavoni V, Gianesello L, Paparella L, Buoninsegni LT, Barboni E. Outcome predictors and quality of life of severe burn patients admitted to intensive care unit. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine.* 2010;18(1):24.

- 30. Xiao-Wu W, Herndon DN, Spies M, Sanford AP, Wolf SE. Effects of Delayed Wound Excision and Grafting in Severely Burned Children. *Archives of Surgery*. 2002;137(9):1049-1054.
- 31. Ong YS, Samuel M, Song C. Meta-analysis of early excision of burns. *Burns.* 2006;32(2):145-150.
- 32. Theilgaard-Mönch K, Knudsen S, Follin P, Borregaard N. The Transcriptional Activation Program of Human Neutrophils in Skin Lesions Supports Their Important Role in Wound Healing. *The Journal of Immunology.* 2004;172(12):7684.
- 33. Ogawa R. Keloid and Hypertrophic Scars Are the Result of Chronic Inflammation in the Reticular Dermis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(3):606.
- 34. Singer AJ, Boyce ST. Burn Wound Healing and Tissue Engineering. *J Burn Care Res.* 2017;38(3):e605-e613.
- 35. Lauková L, Konečná B, Janovičová Ľ, Vlková B, Celec P. Deoxyribonucleases and Their Applications in Biomedicine. *Biomolecules*. 2020;10(7):1036.
- 36. Barnes BJ, Adrover JM, Baxter-Stoltzfus A, et al. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 2020;217(6).
- 37. Bradley A, Anastassiadis K, Ayadi A, et al. The mammalian gene function resource: the International Knockout Mouse Consortium. *Mamm Genome.* 2012;23(9-10):580-586.
- 38. LASA 2017 Guiding Principles for Preparing for and Undertaking Aseptic Surgery. A report by the LASA Education, Training and Ethics section. (E Lilley and M. Berdoy eds.)
- 39. Atalay S, Coruh A, Deniz K. Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing. *Burns.* 2014;40(7):1375-1383.
- 40. Cardoso AL, Bachion MM, Morais JM, Fantinati MS, Almeida VL, Lino RSJ. Adipose tissue stromal vascular fraction in the treatment of full thickness burns in rats. *Acta Cir Bras.* 2016;31(9):578-585.
- 41. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 2010;207(9):1853-1862.
- 42. Singer AJ, Arora B, Dagum A, Valentine S, Hollander JE. Development and validation of a novel scar evaluation scale. *Plast Reconstr Surg.* 2007;120(7):1892-1897.
- 43. Brusselaers N, Pirayesh A, Hoeksema H, Verbelen J, Blot S, Monstrey S. Burn scar assessment: A systematic review of objective scar assessment tools. *Burns.* 2010;36(8):1157-1164.

- 44. Boettcher M, Meier D, Jiménez-Alcázar M, et al. Degradation of Extracellular DNA by DNase1 Significantly Reduces Testicular Damage After Testicular Torsion in Rats. *Urology.* 2017;109:223.e221-223.e227.
- 45. Boettcher M, Eschenburg G, Mietzsch S, et al. Therapeutic targeting of extracellular DNA improves the outcome of intestinal ischemic reperfusion injury in neonatal rats. *Scientific Reports*. 2017;7(1):15377.
- 46. Wallace HJ, Fear MW, Crowe MM, Martin LJ, Wood FM. Identification of factors predicting scar outcome after burn injury in children: a prospective case-control study. *Burns & Trauma.* 2017;5(1):19.
- 47. Amini-Nik S, Glancy D, Boimer C, Whetstone H, Keller C, Alman BA. Pax7 expressing cells contribute to dermal wound repair, regulating scar size through a β-catenin mediated process. *Stem Cells.* 2011;29(9):1371-1379.
- 48. Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg.* 1998;176(2A Suppl):26s-38s.
- 49. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007;25(1):9-18.
- 50. Dale PD, Sherratt JA, Maini PK. A mathematical model for collagen fibre formation during foetal and adult dermal wound healing. *Proc Biol Sci.* 1996;263(1370):653-660.
- 51. Stumpf M, Klinge U, Wilms A, et al. Changes of the extracellular matrix as a risk factor for anastomotic leakage after large bowel surgery. *Surgery*. 2005;137(2):229-234.
- 52. Klinge U, Si ZY, Zheng H, Schumpelick V, Bhardwaj RS, Klosterhalfen B. Abnormal collagen I to III distribution in the skin of patients with incisional hernia. *Eur Surg Res.* 2000;32(1):43-48.
- 53. Lateef Z, Stuart G, Jones N, Mercer A, Fleming S, Wise L. The Cutaneous Inflammatory Response to Thermal Burn Injury in a Murine Model. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3).
- 54. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* 2012;180(4):1340-1355.
- 55. El Kebir D, Filep JG. Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through β 2 Integrins. *Front Immunol.* 2013;4:60-60.
- 56. Josefs T, Barrett TJ, Brown EJ, et al. Neutrophil extracellular traps promote macrophage inflammation and impair atherosclerosis resolution in diabetic mice. *JCI Insight.* 2020;5(7).

- 57. Shao S, Fang H, Dang E, et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote Inflammatory Responses in Psoriasis via Activating Epidermal TLR4/IL-36R Crosstalk. *Front Immunol.* 2019;10:746.
- 58. Kahlenberg JM, Carmona-Rivera C, Smith CK, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages. *J Immunol.* 2013;190(3):1217-1226.
- 59. Weber C, Jenke A, Chobanova V, et al. Targeting of cell-free DNA by DNase I diminishes endothelial dysfunction and inflammation in a rat model of cardiopulmonary bypass. *Scientific Reports*. 2019;9(1):19249.
- 60. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science*. 2015;349(6245):316-320.
- 61. Munafo DB, Johnson JL, Brzezinska AA, Ellis BA, Wood MR, Catz SD. DNase I inhibits a late phase of reactive oxygen species production in neutrophils. *Journal of innate immunity*. 2009;1(6):527-542.
- 62. Gao X, Hao S, Yan H, Ding W, Li K, Li J. Neutrophil extracellular traps contribute to the intestine damage in endotoxemic rats. *Journal of Surgical Research*. 2015;195(1):211-218.
- 63. Mai SHC, Khan M, Dwivedi DJ, et al. Delayed but not Early Treatment with DNase Reduces Organ Damage and Improves Outcome in a Murine Model of Sepsis. *Shock.* 2015;44(2).
- 64. Meng W, Paunel-Görgülü A, Flohé S, et al. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Critical Care*. 2012;16(4):R137.
- 65. Lauková L, Konečná B, Bábíčková J, et al. Exogenous deoxyribonuclease has a protective effect in a mouse model of sepsis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;93:8-16.
- 66. Martinod K, Fuchs TA, Zitomersky NL, et al. PAD4-deficiency does not affect bacteremia in polymicrobial sepsis and ameliorates endotoxemic shock. *Blood.* 2015;125(12):1948-1956.
- 67. Hemmers S, Teijaro JR, Arandjelovic S, Mowen KA. PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. *PLoS One.* 2011;6(7):e22043.
- 68. Lauková L, Konečná B, Janovičová Ľ, Vlková B, Celec P. Deoxyribonucleases and Their Applications in Biomedicine. *Biomolecules*. 2020;10(7).
- 69. Bobek V, Majewski A, Kolostova K, et al. Intrapleural administration of DNase alone for pleural empyema. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(11):22011-22015.

- 70. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science*. 2002;295(5559):1487-1487.
- 71. Izano EA, Shah SM, Kaplan JB. Intercellular adhesion and biocide resistance in nontypeable Haemophilus influenzae biofilms. *Microbial Pathogenesis*. 2009;46(4):207-213.
- 72. Seper A, Fengler VH, Roier S, et al. Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in Vibrio cholerae biofilm formation. *Mol Microbiol.* 2011;82(4):1015-1037.
- 73. Harmsen M, Lappann M, Knøchel S, Molin S. Role of Extracellular DNA during Biofilm Formation by Listeria monocytogenes. *Applied and Environmental Microbiology.* 2010;76(7):2271.
- 74. Hall-Stoodley L, Nistico L, Sambanthamoorthy K, et al. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in Streptococcus pneumoniae clinical isolates. *BMC Microbiology*. 2008;8(1):173.
- 75. Shao C, Zhang X, Ye J, et al. Surface functionalization of titanium substrates with Deoxyribonuclease I inhibit peri-implant bacterial infection. *Dent Mater J.* 2020.
- 76. Ye J, Shao C, Zhang X, et al. Effects of DNase I coating of titanium on bacteria adhesion and biofilm formation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;78:738-747.
- 77. Pressler T. Review of recombinant human deoxyribonuclease (rhDNase) in the management of patients with cystic fibrosis. *Biologics.* 2008;2(4):611-617.
- 78. Davis JC, Jr., Manzi S, Yarboro C, et al. Recombinant human Dnase I (rhDNase) in patients with lupus nephritis. *Lupus.* 1999;8(1):68-76.
- 79. Martínez Valle F, Balada E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarres M. DNase 1 and systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2008;7(5):359-363.
- 80. Keyel PA. Dnases in health and disease. *Dev Biol.* 2017;429(1):1-11.
- 81. Klinke M, Vincent D, Trochimiuk M, et al. Development of an improved murine model of necrotizing enterocolitis shows the importance of neutrophils in NEC pathogenesis. *Scientific Reports*. 2020;10(1):8049.

3.8. Abbildungsverzeichnis

3.8.1. Abbildung 1

Reduktion der NET Formation verbessert die primäre Wundheilung



Bei Tieren der Genotypen: Wildtyp n=12, DNase1-KO n=5 und PAD4-KO n=6 wurde eine Laparotomie über eine 2,5 cm messende Inzision durchgeführt. KO-Tiere erhielten keine weitere Intervention während je 6 Wiltyp Mäuse entweder *Vehicle* (Kontrolle) oder DNase1-Injektionen erhielten. Die Euthanasie erfolgte nach 72 Stunden oder 21 Tagen. **(A, B)** Die makroskopische Wundheilung, gemessen an höheren Werten auf der Stony Brook Scar Evaluation Skala, zeigte sich signifikant verbessert in Tieren die eine DNase1 Therapie erhielten. Der Effekt zeigte sich ähnlich in PAD4-KO Tieren. **(C-E)** Tiere der Therapie- oder PAD4-KO Gruppe zeigten einen signifikant früheren Switch von Kollagen 3 zu 1 und reduziertem Kollagen *Alignmen*t was für eine schnellere Narbenreifung spricht. **(F)** Fibrinlevel zeigten sich durch DNase1 Therapie reduziert. **(G)** SMA zeigte sich durch DNase1 oder PAD4-KO nicht beeinflusst. I Vergleiche erfolgten stets mit der Kontrollgruppe. ^{*}DNase1 vs. Kontrollgruppe und [#]PAD4-KO vs. Kontrollgruppe.

3.8.2. Abbildung 2

Targeting der NET Formation resultiert in reduzierter NG Aktivierung und NET Formation in einem Modell der primären Wundheilung.



(A) Ly6G als Marker der NG wurde nicht beeinflusst durch genetische Modifikation der NET Formation oder DNase1 Therapie. (B-D) NG Aktivierung und NET Formation wurden signifikant durch die DNase1 Therapie oder genetischen Knock-out gesenkt. (E) Repräsentative Immunofluoreszensbilder: DNase1 Therapie reduziert signifikant die NG Aktivierung (MPO) und NET Formation (H3cit). I Vergleiche erfolgten stets mit der Kontrollgruppe. ^{*}DNase1 vs. Kontrollgruppe und [#]PAD4-KO vs. Kontrollgruppe.



3.8.3. Abbildung 3



Reduktion der NET Formation verbessert die sekundäre Wundheilung

Eine 1,5 cm² messende thermale Wunde wurde induziert. Zur Evaluation dienten in Wildtyp Mäusen vier Zeitpunkte (72 h, 7, 14 und 28 Tage), in Knock-out Tieren zwei Zeitpunkte (7, 28 Tage). Kontrollgruppe n=5-6, DNase1 n=6, DNase1-KO n=5-6, PAD4-KO n=5-6. (A-C) Tiere der DNase1 Therapiegruppe oder mit PAD4-KO zeigten einen signifikant reduzierten Narbenscore. (D-H) Tiere der DNase1 Therapiegruppe oder mit PAD4-KO zeigten eine signifikant beschleunigte Reepithelialisierung, Switch von Kollagen 3 zu 1 sowie reduziertem Alignment. (E) H&E Färbung der thermalen Verletzung an Tag 7 zeigt den linken Wundrand. Der Pfeil markieren die Reepithelialisationszung welche sich durch DNase1 Therapie signifikant positiv beeinflusst zeigt. M: subkutane Muskelschicht und F: subkutane Fettgewebe. In Kontrolltieren kam es aufgrund von sekundärer nekrotischer Ausbreitung der Wundfläche zu Verlust von subkutanem Fettgewebe. In Mäusen der Therapiegruppe blieb die Muskelschicht erhalten was auf einen Zusammenhang der sekundären Ausbreitung und NET Formation spricht. (F) Parallele unreife Kollagen 1 Fasern wurden vor allem während der frühen Heilungsstadien beobachtet und persistieren signifikant in Kontroll- und DNase1-KO Tiere (Kollagen 3; grün vs. Kollagen 1; rot). (I) SMA wurde nur inkomplett durch DNase1 beeinflusst. I Vergleiche erfolgten stets mit der Kontrollgruppe. *DNase1 vs. Kontrollgruppe und [#]PAD4-KO vs. Kontrollgruppe.

3.8.4. Abbildung 4

Targeting der NET Formation resultiert in reduzierter NG Aktivierung und NET Formation in einem Modell der sekundären Wundheilung.



(A) Ly6G als Marker der NG wurde nicht beeinflusst durch genetische Modifikation der NET Formation oder DNase1 Therapie. Eine Ausnahme bildet die PAD4-KO Gruppe in der sich nach 28 Tagen eine signifikante Reduktion zeigte, was auf einen positiven Amplifikationseffekt durch die NETs hinweist. (B, C) Es zeigte sich insgesamt einen hohe NG Aktivierung bei jedoch signifikanter Reduktion durch Dase1 Applikation oder in PAD4-KO Tieren. (E) Repräsentative Immunofluoreszensbilder: in Verbrühungswunden zeigten sich aktivierte NG und NET Formation über 28 Tage persistierend. Die DNase1 Therapie wirkte diesem Effekt entgegen. I Vergleiche erfolgten stets mit der Kontrollgruppe. *DNase1 vs. Kontrollgruppe und *PAD4-KO vs. Kontrollgruppe.



4. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Die Arbeit wurde im Institut für Kinderchirurgie unter der Betreuung von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Michael Boettcher durchgeführt.

Die Konzeption der zweiarmigen Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Priv.-Doz. Dr. med. Michael Boettcher, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Laia Pagerols Raluy sowie Annika Heuer.

Die Etablierung des Modell 1 zur primären Wundheilung erfolgte im Rahmen der Studie von Klinke et al. (2017) durch Priv.-Doz. Dr. med. Michael Boettcher sowie Dr. med. Carolin Stiel mit Unterstützung durch das Team des kinderchirurgischen Labors⁸¹.

Die Etablierung des Modell 2 der thermischen Verletzung basierte auf vorangegangenen externen Studienmodellen ^{39,40} und wurde durch Priv.-Doz. Dr. med. Michael Boettcher gemeinsam mit Annika Heuer und Unterstützung durch das Team des kinderchirurgischen Labors erfolgreich am UKE implementiert.

Insbesondere wurden wir in der Tierbetreuung sowie Vorbereitung der Tierversuche und Euthanasie durch Magdalena Trochimiuk unterstützt. Die Probenentnahme, Vorbereitung und Markierung erfolgten im Modell 1 durch Dr. med. Carolin Stiel und im Modell 2 durch Annika Heuer, unterstützt durch Priv.-Doz. Dr. med. Michael Boettcher.

Die weitere Probenaufarbeitung sowie Färbungen erfolgten durch Birgit Appl. Bei einzelnen Spezialfärbungen wurden wir freundlicherweise durch Frau Kristin Hartmann aus der Mouse Pathology (Core facility, UKE Medical School) unterstützt.

Alle Proben wurden in gegenseitiger Kontrolle durch Dr. med. Carolin Stiel sowie Annika Heuer verblindet ausgewertet und von Annika Heuer für die statistische Analyse vorbereitet.

Die statistische Auswertung, das Verfassen sowie die Revisionen der Publikation erfolgte durch Annika Heuer in Unterstützung durch Priv.-Doz. Dr. med. Michael Boettcher.

5. Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. med. Konrad Reinshagen für das Bereitstellen der Mittel und Ermöglichen dieser spannenden Thematik.

Besonders hervorzuheben sind die Betreuung und Anleitung durch Univ.-Prof. Dr. med. Michael Boettcher, der mich nicht nur bei praktischen und organisatorischen Herausforderungen unterstützt, sondern als Mentor begleitet hat. *Danke, dass Du mich für die NETs begeistert hast und fortwährend bei Projekten unterstützend zur Seite stehst.*

Mein Dank gilt weiterhin Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Laia Pagerols Raluy für die Aufnahme in das kinderchirurgische Labor in dem ich in freundschaftlicher Atmosphäre arbeiten durfte. Danke auch für die wertvollen Stunden der Tierbetreuung und Probenverarbeitung, Magdalena Trochimiuk und Birgit Appl. In diesem Sinne danke ich auch Kristin Hartmann (Mauspathologie Facility, UKE) für die freundliche Unterstützung bei Färbungen.

Allen die mir Vorangegangen sind, unermüdlich Erklärungen erörtert und die ein oder andere Brücke gebaut haben, möchte ich in diesen Dank einschließen. Insbesondere bei Sarah-Jolan Bremer, Martin Butz, Marco Casentini und Sadaf Shahsavari bedanke ich mich für die gemeinsame Zeit durch das Studium, immer der richtigen Motivation und ehrlichem Feedback, *ohne euch wäre der Weg steiniger gewesen!* Den Frauen in der Chirurgie die mir fortwährend zeigen, dass eigentliche Stärke und Größe in Technik und Wissen zu finden ist, *danke für Eure Begeisterung*.

"You're led to believe that you can't also be smart.

But you can be fun and fit and social and be really smart. And the smarter you are, the more capable you'll be to handle whatever challenges come up in life." Danica McKellar

Dr. med. Katharina Besch und Melissa Kirsten, *meine surgery girls, danke für Eure Freundschaft, Smartness und Motivation als Rückenwind auf unserem gemeinsamen Weg.*

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir durch die ein oder andere Wand stets den Helm auf den Kopf und einen Hammer in die Hand gelegt hat.

Mama & Papa, danke, dass ihr mir mit Humor und Optimismus zur Seite standet und immer für mich gekämpft habt! Danke Opa & Oma Schmitz, dass ihr jeden Erfolg mit mir feiert und in jeder Lebenslage ein Glas Pfirsiche und Mosel Sekt bereitstellt. Danke an meine girl gang: Marieke, Lea-Carolina & Hannah Luise, dass ihr immer einen frechen Spruch parat habt. With love to Ben Bay, thanks for being ok with my craziness and cheering me to the top.

"The opposite of fear is a plan, and I have a plan. So no, I am not afraid." Courtney Milan

6. Lebenslauf

Annika Heuer

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie und Orthopädie

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) Martinistraße 45, 20251 Hamburg Telefon: 0152 22815056

Berufliche Ausbildung:

- Jan. 2020 Dato: Assistenzärztin in Weiterbildung, Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie und Orthopädie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
- Nov. 2019: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Hamburg; Note: sehr gut
- Okt. 2018: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Hamburg; Note: gut
- März 2016: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Hamburg; Note: gut
- Nov. 2013 Nov. 2019: Medizinstudium an der Universität Hamburg

Publikationen:

- Viezens, L., Dreimann, M., Eicker S.O., Heuer, A., Köpke, L.G., Mohme, M., Krätzig, T., Stangenberg, M. (2021) Posterior vertebral column resection as a safe procedure leading to solid bony fusion in metastatic epidural spinal cord compression. *Journal of Neurosurgery: Spine, Volume 34, Issue 3* Accepted. <u>IF 4.130</u>
- Heuer, A., Stiel, C., Elrod, J., Königs, I., Vincent, D., Schlegel, P., Trochimiuk, M., Appl, B., Reinshagen, K., Pagerols Raluy, L., Boettcher, M. (2021) Therapeutic Targeting of Neutrophil Extracellular Traps Improves Primary and Secondary Intention Wound Healing in Mice. Frontiers in Immunology https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.614347 IF 5.085

7. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: A. Heuer