

Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. L. Conradi

Untersuchungen zur Rolle von Peptidylarginin- Deiminase 4 für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in murinen neutrophilen Granulozyten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der ärztlichen Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Ronahi Lala
aus Minden

promoviert am 17.September 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Professorin Dr. rer. nat. A.-N. Paunel-Görgülü
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. O. Utermöhlen

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Für die Auswahl und Auswertung des Materials sowie die Erstellung des Manuskripts erhielt ich Unterstützung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Adnana Paunel-Görgülü. Weitere Personen waren nicht an der Erstellung dieser Dissertationsschrift beteiligt.

Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit dargestellten Experimente wurden von mir persönlich gemäß den Anweisungen von Frau Prof. Dr. rer. nat. Adnana Paunel-Görgülü durchgeführt. Zur Gewinnung der Knochenmarkszellen führten die medizinisch-technischen Assistentinnen, Frau Natalia Mierau und Frau Sabine Schmitt, die Genickdislokation an den Versuchstieren durch und unterstützten bei der Isolation der PMN-Zellen aus dem Knochenmark sowie bei der Anfertigung der Immunfluoreszenzfärbung Präparate.

Sowohl die operativen Eingriffe zur Induktion des Myokardinfarkts als auch die Entnahme der Herzgewebeprobe wurden vollständig von Frau Michelle Holthaus, einem Mitglied der Arbeitsgruppe, durchgeführt. Ich selbst habe diese operativen Eingriffe nicht vorgenommen, sondern mich auf die anschließende Analyse der Proben konzentriert.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 25.05.2025

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. ZUSAMMENFASSUNG	9
2. EINLEITUNG	11
2.1. Der akute Myokardinfarkt	11
2.2. PMN in der postischämischen Entzündungsreaktion	11
2.2.1. Bildung von ROS durch PMN	12
2.2.2. Freisetzung von NETs und cell-free DNA durch PMN	14
2.3. Die Aktivität des Enzyms PAD4	15
2.4. Zielsetzung	16
2.5. Hypothesen	17
3. MATERIAL UND METHODEN	18
3.1. Material	18
3.1.1. Chemikalien	18
3.1.2. Puffer und Lösungen	18
3.1.3. Antikörper und Konjugate	20
3.1.4. Kits	20
3.1.5. Zellkulturmedien und Zusätze	20
3.1.6. Fluoreszenzfarbstoffe und Detektionsreagenzien	21
3.1.7. Geräte und Zubehör	21
3.1.8. Laborutensilien	21
3.1.9. Software	22
3.2. Methoden	22
3.2.1. Mäuse	22
3.2.2. PMN-Isolation aus dem Knochenmark	22
3.2.3. Zellzahlbestimmung	23
3.2.4. Quantifizierung der ROS in isolierten PMN mittels DHR123	23
3.2.5. Quantifizierung mitochondrialer ROS mittels MitoSOX	24
3.2.6. Quantifizierung der Lipidperoxidation mittels TBARS (TCA Method) Assay im infarzierten murinen Myokardgewebe	25
3.2.7. Quantifizierung der NETs aus PMN mittels PicoGreen	26

3.2.8.	Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung	26
3.2.9.	Proteinanalyse mittels Gelelektrophorese	27
3.2.10.	Western-Blot-Stripping	28
3.2.11.	Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion von NETs	29
3.2.12.	Statistische Datenauswertung	29
4.	ERGEBNISSE	30
4.1.	Die Quantifizierung intrazellulärer ROS	30
4.1.1.	Bildung von ROS durch PMN nach Stimulation mit PMA und Ionomycin	30
4.1.2.	Erfassung der mitochondrialen ROS in Gegenwart von MitoSOX™	32
4.2.	Die Lipidperoxidation im infarzierten murinen Myokardgewebe	35
4.3.	Abhängigkeit der NETs-Bildung von PAD4 und ROS in Ionomycin-stimulierten PMN	36
5.	DISKUSSION	38
5.1.	Bewertung der Hypothesen	42
5.2.	Fazit	44
6.	LITERATURVERZEICHNIS	45
7.	ANHANG	49
7.1.	Abbildungsverzeichnis	49
7.2.	Tabellenverzeichnis	49

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic Acid (auch: Bicinchoninsäure)
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Grad Celsius
C5a	Komplementfaktor 5 aktiviert
CCL2	C–C Motif Chemokine Ligand 2
cfDNA	Cell-free DNA (auch: zirkulierende freie DNA)
citH3	Citrullinated Histone H3 (auch: citrulliniertes Histon H3)
CK-MB	Creatine Kinase Muscle-Brain Type
DAMP	Danger/Damage-Associated Molecular Patterns
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DHR123	Dihydrorhodamine 123
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (sie auch: PBS)
DPI	Diphenyleneiodonium Chloride
dsDNA	doppelsträngige DNA
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinases
etc.	Et cetera
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	fetales Kälberserum
FCS	Fetal Calf Serum
FMN	Flavinmononukleotid
gp91 ^{phox}	Glykoprotein 91phox
h	Stunde(n)
H	Histon
H2A	Histon 2A
H3	Histon 3
H4	Histon 4
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HL-60	Human promyelocytic leukemia cell line 60
HMGB-1	High-Mobility Group Protein B1

HRP	Horseradish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-18	Interleukin-18
IL-6	Interleukin-6
Iono	Ionomycin
KGDHC	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex
KHK	koronare Herzkrankheit
KO	Knockout (hier auch: PAD4 ^{-/-})
LAD	Left Anterior Descending Artery (auch: RIVA)
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MDA	Malondialdehyd
MEK	auch: MAPK/ERK-Kinase
min	Minute(n)
MPO	Myeloperoxidase
mPTP	mitochondrialer Permeabilitätsübergangsporen
NADH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
NOX2	NADPH-Oxidase 2
NSTEMI	Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction (auch: nicht typische bzw. fehlende STEMI)
p22 ^{phox}	Protein 22 ^{phox}
p40 ^{phox}	Protein 40 ^{phox}
p47 ^{phox}	Protein 47 ^{phox}
p67 ^{phox}	Protein 67 ^{phox}
PAD	Peptidylarginine Deiminase
PAD4	Peptidylarginine Deiminase 4
PAD4 ^{-/-}	PAD4-Knockout (auch: PAD4-geninaktiviert)
PE-A	Phycoerythrin-Area
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PDC	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
PFA	Perfluoralkoxylalkan

PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PRRs	Pattern Recognition Receptors
RAC	Ras-Related C3-Botulinum-Toxin-Substrate
Raf	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RET	reverser Elektronentransfer
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten (auch: Relative Fluorescence Units)
RIPA	Radio Immunoprecipitation Assay
RIVA	Ramus Interventricularis Anterior (siehe auch: LAD)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species (auch: reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
S.	Seite
Sec	Sekunden
SEM	Standard Error of the Mean (auch: Standardfehler des Mittelwerts)
STEMI	ST-Segment Elevation Myocardial Infarction (auch: Myokardinfarkt mit ST-Streckenhebung)
TBA	Thiobarbituric Acid
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TBS	Tris-Buffered Saline
TBS-T	Tris-Buffered Saline with Tween 20
TCA	Trichloroacetic Acid
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamine
U937	Human Macrophage Cell Line 937
WT	Wildtyp
V	Volt
Z. B.	Zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

1. Zusammenfassung

Der akute Myokardinfarkt zählt zu den schwerwiegendsten medizinischen Notfällen und ist weltweit eine der häufigsten Todesursachen. Während eines solchen Infarktes führt die Minderversorgung des Myokardgewebes mit Sauerstoff zu einem irreversiblen Zelluntergang und der Freisetzung von sogenannten Danger/Damage-Associated Molecular Patterns (DAMP). Diese Moleküle aktivieren entzündliche Signalwege, die insbesondere die Rekrutierung von Leukozyten fördern. In diesem Kontext spielen polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) eine zentrale Rolle. PMN wirken dem pathologischen Geschehen entgegen, indem sie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produzieren, Granulaproteine freisetzen und Neutrophil Extracellular Traps (NETs) bilden. Die Freisetzung von NETs wird durch das kalziumabhängige Enzym Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) initiiert, das die Deiminierung von Histonen katalysiert.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von PAD4 auf die ROS-Produktion in PMN von Wildtyp- (WT) und PAD4-Knockout-Mäusen (PAD4^{-/-}) untersucht. Die ROS-Bildung wurde durch die Stimulation mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und dem Kalzium-Ionophor Ionomycin angeregt. Während PMA die ROS-Produktion über die Aktivierung der NADPH (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat)-Oxidase 2 (NOX2) durch Proteinkinase C (PKC) erhöht, bewirkt Ionomycin eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels, wodurch die ROS-Bildung insgesamt gesteigert und PAD4 aktiviert wird. Die Ergebnisse zeigen, dass PAD4 weder die zelluläre noch die mitochondriale ROS-Produktion in PMN beeinflusst. Sowohl PMA als auch Ionomycin induzierten eine relevante ROS-Bildung in PMN, unabhängig von den Genotypen. Die Hemmung der NOX2 durch den unspezifischen Hemmer von Flavoproteinen Diphenyliodoniumchlorid (DPI) reduzierte die PMA-induzierte ROS-Produktion signifikant, jedoch nicht vollständig, was auf Mitochondrien als alternative ROS-Quelle zurückschießen lässt.

Des Weiteren wurde die Rolle von ROS bei der PAD4-abhängigen Bildung von NETs ebenfalls untersucht. In WT-PMN führte die Stimulation mit Ionomycin zu einer signifikanten Zunahme der NETs-Bildung, bestätigt durch den Nachweis von citrulliniertem Histon H3 (CitH3) als Indikator der Chromatindekondensation. Die Hemmung von PAD4 durch den panPAD-Inhibitor CI-Amidin sowie die Hemmung der NOX2 durch DPI führten in WT-PMN zur deutlichen Reduktion der NETs-Bildung. Diese Ergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle von PAD4 und der NOX2 in der Regulation der NETose, wobei PAD4-defiziente PMN erwartungsgemäß keine Histoncitrullinierung bzw. NETs-Bildung vorwiesen.

Die Lipidperoxidation dient als wichtiger Indikator zur Bewertung des oxidativen Stresses im Myokardgewebe. Die Induktion eines Myokardinfarktes in WT- und PAD4^{-/-}-Mäusen durch die

permanente Ligatur eines Koronargefäßes führte zu einem signifikanten Anstieg der Lipidperoxidation im Myokardparenchym der WT-Mäuse, das den erhöhten oxidativen Stress im Gewebe zeigt. Obwohl in in vitro Untersuchungen kein Zusammenhang zwischen PAD4 und der ROS-Produktion festgestellt wurde, wiesen PAD4^{-/-}-Mäuse eine signifikant geringere Lipidperoxidation auf. Diese Diskrepanz könnte durch eine verringerte Infarktgröße und den damit verbundenen geringeren oxidativen Stress in PAD4-defizienten Mäusen erklärt werden, ebenso wie durch die Beteiligung weiterer ROS-Quellen, insbesondere von Makrophagen, an der Inflamationsreaktion.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Enzym PAD4 eine Schlüsselrolle in der kalziumabhängigen NET-Bildung spielt, jedoch keinen Einfluss auf die Bildung von ROS in PMN ausübt. Die reduzierten MDA-Konzentrationen im infarzierten Herzen von PAD4^{-/-}-Mäusen sind demnach nicht auf eine eingeschränkte ROS-Produktion in PMN zurückzuführen.

2. Einleitung

2.1. Der akute Myokardinfarkt

Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen in Deutschland zu den häufigsten Todesursachen, wobei der akute Myokardinfarkt etwa 10 % der Fälle ausmacht.¹ Er resultiert bei über 80% der betroffenen Patienten aus einer myokardialen Nekrose infolge eines akuten Sauerstoffmangels, meist im Rahmen einer koronaren Herzkrankheit (KHK).² In Deutschland beträgt die Lebenszeitprävalenz der KHK bei Menschen im Alter von 40 bis 79 Jahren 9,3 %, womit sie zu den bedeutendsten Volkskrankheiten zählt.³ (3: S. 237) Hauptursache ist meistens eine akute Gefäßokklusion durch rupturierte oder erodierte atherosklerotische Plaques mit nachfolgender Thrombusbildung.⁴ Die Diagnosestellung basiert auf einer integrativen Beurteilung von klinischer Symptomatik, apparativer Diagnostik und laborchemischen Parametern.⁵ Das klinische Spektrum reicht von Angina pectoris und Dyspnoe bis hin zum plötzlichen Herztod.³ (3: S. 250-251) Eine Erhöhung kardialer laborchemischer Marker wie des hochsensitiven kardialen Troponins und CK-MB (Creatine Kinase Muscle-Brain Type) können auf eine myokardiale Schädigung hinweisen. Im Elektrokardiogramm (EKG) können sich dabei unterschiedliche Infarktformen zeigen, etwa ein STEMI (ST-Segment Elevation Myocardial Infarction, auch: ST-Streckenhebungsinfarkt) mit typischer ST-Streckenhebung oder ein NSTEMI (Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction), der häufig nur unspezifische EKG-Veränderungen aufweist.³ (3: S. 251-253) Die Therapie erfolgt leitlinienkonform unter Einsatz einer raschen Reperfusionstherapie, Thrombozytenaggregationshemmung, Antikoagulation sowie – je nach Indikation – perkutaner Koronarintervention oder aortokoronarer Bypass-Operation.⁵

2.2. PMN in der postischämischen Entzündungsreaktion

Die postischämische Entzündungsreaktion nach einem akuten Myokardinfarkt ist ein hochkomplexer Prozess, der durch simultan ablaufende und eng vernetzte immunologische Signalwege reguliert wird. Eine zentrale Rolle des vorliegenden Prozesses spielen die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN), die als eine der ersten zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems in das betroffene Gewebe einwandern.^{6, 7} Die initiale Immunantwort nach einem Myokardinfarkt wird durch die Aktivierung der Komplementkaskade, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Freisetzung Danger/Damage-associated molecular patterns (DAMP), darunter Adenosintriphosphat (ATP), mitochondriale Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA) und High-Mobility Group Box 1 (HMGB-1), vermittelt.⁸⁻¹¹ Diese DAMPs interagieren mit Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs), insbesondere mit den Toll-like Receptoren (TLRs) und dem NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) -Inflammasom. Dies führt zur verstärkten Sekretion proinflammatorischer Zytokine (z. B. IL-1 β , IL-18, IL-6 etc.) und Chemokine (z. B.

MCP-1, CCL2 etc.), welche die gezielte Rekrutierung von Immunzellen, insbesondere der PMN, in das infarzierte Myokard fördern.^{8, 9} PMN infiltrieren das geschädigte Myokardparenchym bereits wenige Stunden nach dem Infarkt, erreichen ihr Maximum zwischen dem ersten und dritten Tag und nehmen ab dem fünften Tag progressiv ab.^{2, 9} Sie zirkulieren im Blut und sind in zwei funktionelle Reservepools unterteilt: einen marginalen Pool, in dem sie transient an Endothelzellen großer Venen adhären, und einen Knochenmarkspool, in dem sie aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen und bei Bedarf freigesetzt werden.¹² Nach Migration in das betroffene Interstitium übernehmen sie weitere zentrale Funktionen neben der Freisetzung der ROS, darunter die Phagozytose von Zelltrümmern, die Bildung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) sowie die Sekretion von Granulaproteinen, die sowohl proinflammatorische als auch gewebe modulierende Effekte entfalten.^{9, 13, 14}

2.2.1. Bildung von ROS durch PMN

ROS sind hochreaktive Moleküle, die im Rahmen zellulärer Stressreaktionen gebildet werden und eine zentrale Rolle in Entzündungsprozessen einnehmen; sie entstehen dabei vornehmlich durch die Aktivität verschiedener Immunzellen, insbesondere PMN und Makrophagen.^{15, 16} PMN setzen ROS gezielt frei, sowohl beispielsweise zur Abwehr pathogener Erreger als auch zur Entfernung zellulärer Trümmer im Verlauf entzündlicher Reaktionen.^{17, 18, 19} (19: S.101-103) Die Produktion von ROS durch PMN erfolgt primär über den NADPH (Nikotinamidadeninukleotidphosphat)-Oxidase-Komplex, dessen Aktivierung eine wichtige Rolle bei der zellulären Effektorfunktion im Rahmen der angeborenen Immunantwort spielt. Der NADPH-Oxidase-Komplex gehört zur Familie der NADPH-Oxidasen, die mehrere homologe Enzymkomplexe (NOX1–5, DUOX1/2) umfasst. Diese Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Expressionsmuster in verschiedenen Zelltypen und übernehmen zellspezifische Funktionen im oxidativen Stressgeschehen.^{20, 21} In PMN ist insbesondere die Isoform NOX2 von funktioneller Relevanz, da sie für die rasche und lokal begrenzte Produktion der ROS verantwortlich ist.^{21, 22} Eine detaillierte Darstellung der übrigen NOX-Isoformen würde den Rahmen dieser Arbeit überschreiten, da im vorliegenden Kontext ausschließlich NOX2 von zentraler Bedeutung ist. NOX2 ist sowohl in der Plasmamembran als auch in Membranen endosomaler Vesikel der PMN lokalisiert.^{20, 23} (23: S. 739-740) In ruhenden, nicht-stimulierten PMN liegt der Enzymkomplex jedoch in einer inaktiven, nicht assemblierten Form vor.²⁰ Die membranständige Komponente der NOX2 besteht aus dem Cytochrom-b₅₅₈-Komplex, der sich aus der bislang einzig bekannten katalytisch aktiven Untereinheit gp91^{phox} (Glykoprotein 91phox, auch NOX2 genannt) sowie der strukturell stabilisierenden Untereinheit p22^{phox} (Protein 22^{phox}) zusammensetzt. Die zytosolischen Untereinheiten – p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} sowie die kleine GTPase ‚Rac (Ras-Related C3-Botulinum-Toxin-Substrate)‘ – liegen im inaktiven Zustand unassoziiert im Zytoplasma vor.^{20, 21} Erst nach zellulärer Aktivierung werden

diese zytosolischen Faktoren an die Membran rekrutiert, wo sie zur Assemblierung des funktionellen Enzymkomplexes beitragen.²⁰ Die Aktivierung erfolgt unter anderem durch Phosphorylierung von p47^{phox} durch die Proteinkinase C sowie durch die Aktivierung der kleinen GTPase Rac, das die Translokation und Interaktion der Untereinheiten mit dem membranständigen Cytochrom-b₅₅₈-Komplex ermöglicht. Dieser Komplex wird daraufhin an der Plasmamembran und an neugebildeten phagosomalen Kompartimenten aktiv.^{20, 21}

Eine weitere wesentliche Quelle von ROS ist die mitochondriale ROS-Generierung.^{24, 25, 26}

Dabei sind insbesondere Komplex I und III der mitochondrialen Atmungskette von Bedeutung, da sie unter bestimmten Bedingungen maßgeblich zur Bildung der mitochondrialen ROS beitragen. Weitere Komponenten der Atmungskette werden im Rahmen dieser Arbeit nicht im Detail behandelt, vielmehr erfolgt im Folgenden eine selektive Darstellung der für die mitochondriale ROS-Bildung relevanten Strukturen. Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NADH):Ubichinon-Oxidoreduktase) erzeugt mitochondriale ROS vor allem durch die partielle Reduktion von molekularem Sauerstoff am Flavinmononukleotid (FMN), ein Prozess, der insbesondere bei einem hohen NADH/NAD⁺-Verhältnis begünstigt wird. Zusätzlich kann im Rahmen des reversen Elektronentransfers (RET) eine verstärkte ROS-Produktion erfolgen.^{23 (23: 203-213), 26, 27} Komplex II der mitochondrialen Atmungskette (Succinat-Dehydrogenase) trägt in geringerem Umfang zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei, insbesondere durch Elektronenleckage bei erhöhter Succinatkonzentration. Komplex III (Ubichinol:Cytochrom-c-Oxidoreduktase) generiert Superoxid vornehmlich auf der Intermembranseite, wobei die Redoxzyklen des Ubisemichinons als zentrale Quelle der ROS-Produktion gelten.^{23 (23: 203-213), 26, 28} Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette (Cytochrom-c-Oxidase) trägt unter physiologischen Bedingungen nur in sehr geringem Maße zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei, da der molekulare Sauerstoff dort nahezu vollständig zu Wasser reduziert wird.^{23 (23: 203-213), 26, 28}

Darüber hinaus tragen auch in der Matrix lokalisierte Enzyme wie der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (KGDHC) und der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC) zur mitochondrialen ROS-Entstehung bei.^{29, 30} Die mitochondriale ROS-Bildung umfasst demnach verschiedene Mechanismen, darunter die Aktivität der Komplexe I bis III der mitochondrialen Atmungskette sowie flavinabhängiger Enzyme wie dem KGDHC und dem PDC. Darüber hinaus stellt der Kalzium-induzierte Öffnungsmechanismus der mPTP eine weitere Quelle mitochondrialer ROS dar. Diese Öffnung wird durch erhöhte zytosolische Kalziumkonzentrationen ausgelöst, etwa infolge der Stimulation mit Kalzium-Ionophoren, und führt zur verstärkten Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus den Mitochondrien.^{29 -32}

Die vermehrte Bildung von ROS trägt wesentlich zur oxidativen Schädigung zellulärer Strukturen bei. Die Peroxidation membranassoziierter Lipide führt zur Bildung instabiler Lipidperoxide, welche die Membranintegrität beeinträchtigen und als sekundäre

Radikalquellen zelluläre Schäden verstärken. Ein dabei entstehendes Abbauprodukt, Malondialdehyd (MDA), dient als etablierter Marker zur Quantifizierung der Lipidperoxidation.^{33, 34}

2.2.2. Freisetzung von NETs und cell-free DNA durch PMN

NETs sind große, netzartige, extrazelluläre Strukturen, die hauptsächlich aus chromosomaler DNA sowie zytosolischen, granulären und mitochondrialen Proteinen bestehen und von aktivierten PMN freigesetzt werden. Die als NETs bezeichneten Strukturen wurden erstmals 2004 von Brinkmann et al. funktionell beschrieben, nachdem bereits 1996 Takei et al. ähnliche morphologische Veränderungen bei Neutrophilen beobachtet hatten.³⁵⁻³⁹ Im Laufe der Zeit wurde gezeigt, dass NETs im Rahmen eines regulierten Zelltodmechanismus – der NETose – freigesetzt werden, um pathogene Mikroorganismen abzufangen und die Entzündungsreaktion zu verstärken. Dabei wird hauptsächlich chromosomale DNA der PMN freigesetzt, die sich von zirkulierender cell-free DNA (cfDNA) unterscheidet. cfDNA, die aus apoptotischen oder nekrotischen Zellen stammt, zirkuliert frei im Blut und kann als Marker für Gewebeschädigungen oder systemische Entzündungen dienen. Die PMN unterliegen nach der NETs-Freisetzung nicht zwangsläufig dem Zelltod.^{36, 40-43} Die Bestandteile der NETs-Strukturen werden durch die Citrullinierung einiger Histone (H) (H2A, H3, H4) freigesetzt. Die Umwandlung des Arginins in Citrullin wird auch als Citrullinierung oder Deiminierung bezeichnet. Diese werden mittels posttranslationaler Modifizierung der in den Nuclei befindlichen Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) reguliert. Durch die Umwandlung von Arginin zu Citrullin kommt es zur Dekondensierung der Chromatinstruktur und schließlich zur Freisetzung der NETs.^{36, 41,44-46} Die Induktion der NETs-Bildung erfolgt in vitro typischerweise durch Stimulation mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), einem Aktivator der Proteinkinase C (PKC), oder mittels Ionomycin, einem Kalzium-Ionophor. Hierbei werden drei wesentliche Signalkaskaden beschrieben.⁴⁵⁻⁴⁶ Der durch PMA aktivierte PKC–Raf (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)–MEK (MAPK/ERK-Kinase, auch: Mitogen-Activated Protein Kinase/ Extracellular signal-Regulated Kinase)–ERK-Signalweg führt zur Aktivierung der NOX2 und in der Folge zur gesteigerten Bildung der ROS. Dies begünstigt die Freisetzung von neutrophiler Elastase (NE) und Myeloperoxidase (MPO), welche in den Zellkern translozieren und dort die Chromatindekondensation initiieren, die in einer nukleären NETs-Freisetzung resultiert.⁴⁶⁻⁴⁹ Eine zweite Signalkaskade basiert auf der Erhöhung intrazellulärer Kalziumkonzentrationen, z. B. durch Kalzium-Ionophor wie Ionomycin. Dies führt zur Aktivierung der PAD4, welche durch Citrullinierung der Histone die elektrostatischen Bindungen zwischen Histonen und DNA schwächt, was die Chromatindekondensation und NETs-Freisetzung einleitet.^{44, 45, 49} Die dritte Signalkaskade beschreibt die Bildung mitochondrialer NETs, wobei entweder die durch den Komplementfaktor 5 aktiviert (C5a) induzierte mitochondriale ROS-Produktion oder die

Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR4) durch LPS als auslösende Stimuli fungieren.^{44, 45}
50

2.3. Die Aktivität des Enzyms PAD4

Innerhalb der fünf bekannten Isoformen der Peptidylarginin-Deiminase (PAD1–PAD4, PAD6), von denen PAD1 bis PAD4 eine kalziumabhängige enzymatische Aktivität aufweisen, während PAD6 als enzymatisch inaktiv gilt, kommt PAD4 im Rahmen dieser Arbeit eine besondere Bedeutung zu. Die gelegentlich in älterer Literatur verwendete Bezeichnung PAD5 beruht auf einer fehlerhaften Annotation und bezieht sich tatsächlich auf PAD4 und ist synonym zu setzen.⁵¹⁻⁵⁴ Das PAD4-Enzym wird vor allem in Zellen myeloischer Herkunft exprimiert, darunter eosinophile und neutrophile Granulozyten, Monozyten sowie entsprechende Zelllinien wie HL-60 (Human promyelocytic leukemia cell line 60) und U937 (Human Macrophage Cell Line 937).⁵⁴⁻⁵⁶ Eine pathologische Überexpression wurde in verschiedenen Tumorzelllinien, unter anderem aus Lungen-, Ovarial- und kolorektalen Karzinomen, beschrieben.^{52, 56} PAD4 katalysiert die calciumabhängige Umwandlung von Argininresten in Proteinen zu Citrullin (Citrullinierung), wodurch insbesondere Histone modifiziert, die Chromatinstruktur aufgelockert und damit Prozesse wie die Bildung NETs ermöglicht werden.^{39, 40, 44, 45} Sie besteht aus zwei immunglobulin-ähnlichen Subdomänen am N-Terminus, die über eine flexible Verbindungssequenz mit einer katalytisch aktiven Domäne am C-Terminus verbunden sind (**Abbildung 1 A, B**).^{55, 56-58} Die katalytische Domäne setzt sich aus fünf charakteristischen $\beta\alpha\beta$ -Motiven zusammen, die eine pseudo-fünffach symmetrische α/β -Propellerstruktur ausbilden. Diese Struktur umschließt eine zentrale Spaltregion, die als regulatorisches Zentrum fungiert. Dort befinden sich funktionelle Kalzium-Bindungsstellen sowie die Substratbindetasche, welche gemeinsam die enzymatische Aktivität steuern. Insgesamt sind fünf Kalzium-Bindungsstellen für die vollständige Aktivierung von PAD4 erforderlich – drei davon in den N-terminalen Subdomänen und zwei innerhalb der katalytischen Domäne.^{53, 55-58} PAD4 ist sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert, zeigt jedoch in neutrophilen Granulozyten insbesondere nach Kalzium-vermittelter Aktivierung eine überwiegende nukleäre Verteilung. Der Grund dafür ist, dass PAD4 ein nukleäres Lokalisierungssignal (NLS) besitzt, das es gezielt in den Zellkern transportieren lässt. Im Zellkern erfüllt PAD4 dann spezifische Funktionen, etwa die Citullinierung von Histonen, was bei der Bildung von NETs eine zentrale Rolle spielt.⁵⁵⁻⁵⁹

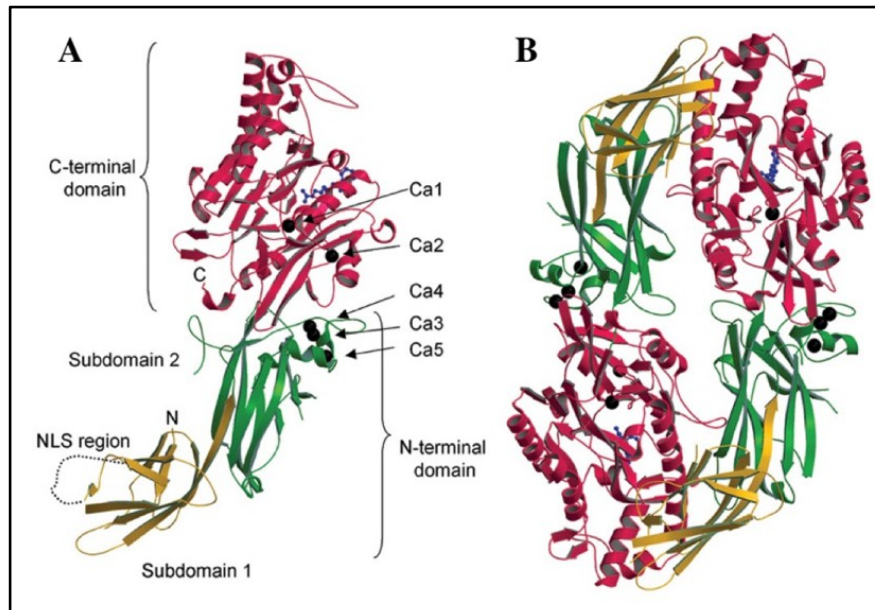


Abbildung 1: Struktur des PAD4-Enzyms. Gezeigt ist die monomere Form mit fünf Ca^{2+} -Ionen (Ca 1-5) (schwarz), den Unterdomänen 1 (gelb) und 2 (grün), dem synthetischen Substratanalogon Benzoyl-L-Argininamid (blau) sowie dem C-terminalen Ende (rot). Die nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS) ist gestrichelt dargestellt. **(A)** Monomere Substratkomplex. **(B)** Dimerische Form mit 180°-Rotation um eine zentrale kristallographische Symmetrieachse (nach Arita et al., Nat Struct Mol Biol, 2004).⁵⁵

2.4. Zielsetzung

Die Immunantwort spielt eine zentrale Rolle im Verlauf des akuten Myokardinfarktes und beeinflusst sowohl das Ausmaß des Gewebeschadens als auch die Regeneration des betroffenen Infarktareals. Die PMN stellen hierbei den Großteil der infiltrierenden Immunzellen in der frühen Phase des Myokardinfarktes dar und tragen durch ihre proinflammatorischen Eigenschaften – insbesondere die Produktion der ROS, die Freisetzung von NETs sowie die Sekretion von Zytokinen – maßgeblich zum kardialen Gewebsumbau bei. Das PAD4-Enzym spielt eine entscheidende Rolle bei der Freisetzung der NETs, indem es die Deiminierung von Histonen fördert, was zur Chromatin-Dekondensation und letztlich zur Bildung der NETs führt.^{36, 39, 40, 44, 45} Für die vorliegende Dissertation sind folgende Fragestellungen von besonderer Relevanz:

1. Inwiefern moduliert PAD4 die ROS-Produktion in PMN?
2. Ist die in vitro induzierte PAD4-abhängige Bildung von NETs abhängig von der ROS-Produktion?
3. Inwiefern beeinflusst PAD4 die Lipidperoxidation im infarzierten Myokardgewebe?

Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen wurden PMN aus dem Knochenmark von Wildtyp (WT) und PAD4-defizienten Mäusen ($\text{PAD4}^{-/-}$) isoliert und in vitro mit Ionomycin und PMA stimuliert. Zur Analyse des oxidativen Stresses in vivo wurden infarzierte Myokardgewebe von

WT- und PAD4^{-/-}-Mäusen nach permanenter Ligatur des Ramus interventricularis anterior (RIVA; engl.: left anterior descending artery, LAD) untersucht.

2.5. Hypothesen

Auf Grundlage des aktuellen Forschungsstandes sowie der in dieser Arbeit formulierten Zielsetzungen ergeben sich folgende überprüfbare Hypothesen:

- 1. PAD4 beeinflusst die ROS-Produktion in PMN.**
- 2. Die PAD4-abhängige Bildung von NETs ist unter anderem mit von der intrazellulären ROS-Produktion abhängig.**
- 3. PAD4^{-/-}-Mäuse weisen eine geringere Lipidperoxidation im infarzierten Myokardgewebe vor.**

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich®
Bromphenolblau Natriumsalze	Carl Roth GmbH, A512.1
Bovine Serum Albumin (BSA) (Albumin Fraktion V)	Carl Roth GmbH, 8076.4
Cl-Amidin (hydrochloride)	Cayman Chemical Company, 10599
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent Technologies, 95051
Dako-Eindeckmedium mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI): - Arbeitskonzentration: 1 µg/ml Stock-Lösung: 2000 µg/ml 1:2000 mit PBS Inkubation: 10 min, RT	Sigma-Aldrich®
Dihydrorhodamine123 (DHR123)	PromoKine
Diphenyleneiodonium (chloride) (DPI)	Cayman Chemical Company, 81050
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH
Ethanol	Carl Roth GmbH, T171.4
FCS (Fetal Calf Serum)/FBS (fetales Kälberserum) Premium (Low Endotoxin)	PAN™ BIOTECH
Glycerol	Carl Roth GmbH, 3783.1
Glycin	Carl Roth GmbH
Ionomycin	Cayman Chemical Company
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, 4227.3
Methanol	Carl Roth GmbH 4627.5
Milchpulver	Carl Roth GmbH T145.2
MitoSOX	Invitrogen™
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Natriumdeoxycholat	Carl Roth GmbH 3484
Nonidet™ P40 Substitute (NP 40)	Sigma-Aldrich®, 74385
Penicillin G/ Streptomycin	Sigma-Aldrich®, P4333
Percoll, Easycoll	Fa. Biochrom, L6145
PMA	Sigma-Aldrich®, P1585
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich®, P6407
Ponceau S	Carl Roth GmbH, 5938.2
Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1)	Carl Roth GmbH, 3029.2
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamine)	Carl Roth GmbH, 2367.3
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH, 76-03-9
TRIS PUFFERAN® (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH, AE15.1
Tris-Base	Calbiochem®, 643810
Tris-Hydrochlorid	Calbiochem®, 643817
Triton X-100	Sigma-Aldrich®, 9036-19-5
Trypan 3 Stain	Gibco™ 15250061
Tween® 20	Sigma-Aldrich®, P9416

3.1.2. Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Puffer und Lösungen.

Puffer/ Lösung	Anteil/ Faktoren	Bestandteile/ Lösungen	Hersteller
Ampuwa®		H ₂ O	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
CaCl ₂ -Lösung	[2mM]	221,96 mg CaCl ₂ + 1L Aqua dest.	
CellWash		NaCl, Kaliumchlorid (KCl), Disodiumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄), Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄), Natriumazid (NaN ₃)	Fa. BD
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	NaCl, KCl, Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄), NaH ₂ PO ₄ , Kalziumchlorid (CaCl ₂), Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich®
HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)		CaCl ₂ , MgCl ₂	Gibco™

HBSS Prep		HBSS, 3 % fetales Kälberserum (FBS) 1,5 ml FBS ad 50 ml HBSS	
Laemmli-Puffer		4x Tris-Glycin-SDS (Sodium dodecyl sulfate) Sample Buffer 2,5 ml Tris-HCL (pH = 6,8) 4 ml Glycerol 0,8 g SDS 1 µg Bromphenolblau ad 10 ml H ₂ O vor Gebrauch 20 % 2-Mercaptoethanol zugeben	
NaCl		0,2 % (0,1 g NaCl in 50 ml Aqua dest.) + 1,2 % (0,6 g NaCl in 50 ml Aqua dest.) + 150 mM (8,7 g/L Aqua dest.)	
RIPA (Radio Immunoprecipitation Assay)-Puffer		50 mM Tris HCl (pH = 8,0) 150 mM NaCl 1 % NP-40 0,5 % Natriumdesoxycholat 0,1 % SDS vor Gebrauch Phosphataseinhibitor und Proteininhibitor (1:100) zugeben, anschließend Lagerung bei -20 °C	Abcam
SIP	Stock-isotonisches Percoll	9 ml Percoll + 1 ml NaCl (1,5 M)	
Western Blot	Laufpuffer (für 10x)	30,3 g Tris (pH 8,3–8,8; 25 mM]) 144,2 g Glycin ([192 mM]) 10 g SDS ([0,1 %]) ad 1000 ml H ₂ O	Thermo Fisher Scientific
	Tris-Glycin Transferpuffer (für 25x)	18,2 g Tris-Base ([12 mM]) 90 g Glycin ([96 mM]) ad 500 ml H ₂ O	
	Blotting-Puffer (2x Tris-Glycin Transferpuffer)	60 ml 25x Transferpuffer 75 ml Methanol ad 750 ml H ₂ O	
	4xTrenngel-puffer	91 g Tris (pH 8,8; c [1,5 M]) 2 g SDS (c [0,4 %]) ad 500 ml H ₂ O	
	4x Sammelgel-puffer:	6,05 g Tris (pH 6,8; c [0,5 M]) 0,4 g SDS (c [0,4 %]) ad 100 ml H ₂ O	
	TBS (Tris-buffered saline) (für 10x)	12,1 g Tris (pH 7,5; [7,7 mM]) 87,7 g NaCl ([150 mM]) ad 1000 ml H ₂ O	
	TBS-T (TBS with Tween 20)	100 ml 10x TBS 1 ml Tween 20 ([0,1 %]) ad 1000 ml H ₂ O	
	Ponceau S	0,1 % Ponceau 3 % Essigsäure	
	Blocking Puffer	5 % Milchpulver in 1x TBS-T 3 % Milchpulver in 1x TBS-T 5 % BSA in 1x TBS-T 3 % BSA in 1x TBS-T	
	Trenngel 10 % (1 Gel)	3,125 ml H ₂ O 2,5 ml 30 % Acrylamid 1,875 ml 4x Trenngelpuffer 10 µl TEMED 25 µl 10 % APS	
	Sammelgel 4 % (1 Gel)	3 ml H ₂ O 650 µl 30 % Acrylamid 1,25 ml 4x Sammelgelpuffer 10 µl TEMED 25 µl 10 % APS	
	Stripping-Puffer	3,75 g Tris (pH 6,8, c [62,5 mM]) 10 g SDS ([2 %]) vor Gebrauch 100 mM 2-Mercaptoethanol zugeben	

FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)-Puffer	ca. 10 ml	10 ml Phosphate-Buffered Saline (PBS) 0,2 ml FCS (Fetal Calf Serum) 1 mM EDTA (pH 8.0) steril filtrieren (0,2 µm) und bei 4 °C lagern	
Permeabilisierung s-puffer	ca. 10 ml	10 ml PBS 10 µl Triton X-100 (0,1 %)	
Blockpuffer	ca. 10 ml	0,5 ml Normal Ziegen Serum 0,5 ml 20x PBS 9 ml Aquadest 30 µl Triton X-100	

3.1.3. Antikörper und Konjugate

Tabelle 3: Antikörper.

Antikörper	Hersteller
<u>Primärantikörper:</u>	
Anti-Histone H3 (citulline R2 + R8 + R17) antibody	Abcam ab 5103
Rabbit anti-Histone H3 (D1H2) XP® mAb	Cell Signaling Technology®, #4499
Anti-Roti®-Mark Western-Marker	Carl Roth GmbH
<u>Sekundärantikörper:</u>	
Ziege anti-Kaninchen IgG Antikörper (Immunglobulin G) AF488	Cell Signaling Technology®, #4412S

Tabelle 4: Proteinanalytik-Reagenzien und Marker.

Proteinanalytik-Reagenzien und Marker	Hersteller
Precision Plus Protein Unstained Protein Standard	BioRad, 1610363
Precision Protein StrepTactin- Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate	BioRad, 1610380

3.1.4. Kits

Tabelle 5: Kits.

Kit	Hersteller
Enhanced Chemiluminescence (ECL) Western Blotting Substrate	Pierce™ ThermoFischer scientific, 32209
Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA (doppelsträngige DNA) Assay-Kits und dsDNA-Reagenzien	ThermoFischer scientific, P7581
Pierce™ Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit	ThermoFischer scientific, 23227
TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) Assay Kit	Cayman Chemical Company, 700870
UptiLight HRP Blot Chemiluminescent Enhanced Chemiluminescence (ECL) Substrate	INTERCHIM, UP99619A

3.1.5. Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 6: Zellkulturmedien.

Medium	Zusätze und Hersteller
RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Medium	ThermoFischer scientific
Zellkulturmedium	40 ml RPMI + 1 % Penicillin/Streptomycin 2 mM Ca ₂ Cl 1 % FBS

Tabelle 7: Stimulatoren und Inhibitoren.

Stimulatoren und Inhibitoren:	Arbeitslösungen:
<u>Stimulatoren:</u>	
50 nM PMA (Proteinkinase-C-Stimulator)	1mM PMA-Stammlösung gelöst in DMSO: - 1 µM Arbeitslösung von 1 ml (1:1000): 1 µl PMA der Stammlösung + 999 µl Zellkulturmedium
4 µM Ionomycin (Kalzium-Ionophor)	1,33 mM Ionomycin-Stammlösung gelöst in DMSO: - 133 µM Arbeitslösung von 90 µl (1:10): 9 µl Ionomycin der Stammlösung + 81 µl Zellkulturmedium
<u>Inhibitoren:</u>	
200 µM Cl-Amidin (pan-PAD-Inhibitor)	28,8 mM Cl-Amidin-Stammlösung gelöst in DMSO: - 14 400 µM Arbeitslösung von 25 µl (1:2): 12,5 µl Cl-Amidin der Stammlösung + 12,5 µl Zellkultur-medium
10 µM DPI (unspezifischer Hemmer der Flavoproteine)	3178 µM DPI-Stammlösung gelöst in DMSO: - 635,6 µM Arbeitslösung von 25 µl (1:5): 5 µl DPI der Stammlösung + 20 µl Zellkulturmedium

3.1.6. Fluoreszenzfarbstoffe und Detektionsreagenzien

Tabelle 8: Fluoreszenzbasierte Nachweisreagenzien.

Indikatoren	Arbeitslösungen:
4 µM MitoSOX™ Red	5 mM MitoSOX-Stammlösung gelöst in DMSO: - 100 µM Arbeitslösung von 60 µl (1:50): 1,2 µl MitoSOX der Stammlösung + 58,8 µl Zellkulturmedium
20 µM DHR123	10 mM DHR123-Stammlösung gelöst in DMSO: - 500µM Arbeitslösung von 280 µl (1:20): 14 µl DHR123 der Stammlösung + 266 µl PBS

3.1.7. Geräte und Zubehör

Tabelle 9: Geräte und Zubehör.

Gerät und Zubehör	Hersteller
10 µl Eppendorf Research® Pipette	Eppendorf SE
20 µl Eppendorf Research® Pipette	Eppendorf SE
100 µl Eppendorf Research® Plus Pipette	Eppendorf SE
200 µl Eppendorf Research® Pipette	Eppendorf SE
1000 µl Eppendorf Research® Pipette	Eppendorf SE
Abzug	Clean Air Biohazard
Accu-jet® pro	BRAND GmbH & Co KG
Analysenwaage	KERN® ABJ
Baki Shaker	Innova 42
Blotter	BioRad Trans-Blot® Turbo, Transfer System
Brutschrank 37 °C	Panasonic MCO-170AICUV-PE CO2 Incubator
Eclipse Ti Series Inverted Microscope Systems	Nikon Europe B. V.
Elektrophorese-Anlage	BioRad Mini Protean® Tetra System
FACSCanto™ II	Beckmann Coulter
Heizblock	VWR Digital Headblock
Magnetrührer und Heizplatte	Fisherbrand®
Microfuge 16	Beckmann Coulter
Mikroskop	Olympus CKX31
Mini-Vac Power	Axonlab®
Multi-Achs-Rotations-Mischer	CAT RM 5
Multikanalpipette	BRAND® Transferpette® S -8
Multi-mode Microplate Reader	FLUOstar Omega®, BMG Labtech
Multimodus-Mikrotiterplatten-Lesegerät	Victor®, Perkin Elmer
pH-Meter	METTLER TOLEDO
Pipette Controller Manual	Accu-jet® pro, BRAND
Rollenmischer	Phoenix Instrument, Garbsen
Schüttler	GFL 3006
Shaking-bath 12 L	VWR®
Sterilbank	KOJAIR® Biowizard
Ultraschallprozessor	Hielscher UP50H
Vortex	VWR Analog Vortex Mixer
Waage	KERN® PCB
Wasserbad	Memmert WNB
Western-Blot-Geldokumentationsanlage	BioRad ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software
Zählkammer Neubauer	LO – Laboroptik ltd
Zentrifuge – Microfuge® 16	Beckmann Coulter
Zentrifuge – Fresco 17	ThermoFischer scientific
Zentrifuge – Microfuge® 22R	Beckmann Coulter
Zentrifuge – Allegra® X-15R	Beckmann Coulter
Zentrifuge Perfect Spin 24R, Mikrozentrifuge	PeqLab

3.1.8. Laborutensilien

Tabelle 10: Laborutensilien.

Produkt	Hersteller
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG
70 µm Filter	Fa. BD
0,45 mm x 12 mm Kanülen	Fa. Terumo

7 ml Pasteurpipetten	VWR 7 ml 612-1681
Pipette tip (10 µl, 200 µl, 1000µl)	SARSTEDT AG & Co. KG
Reaktionsgefäß (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Carl Roth GmbH
5 ml Rundbodenröhrchen (FACS)	FALCON®
1 ml Spritzen	Fa. BD
Stabpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG
6er-Well-Platten	FALCON®
12er-Well-Platten	FALCON®
24er-Well-Platten	FALCON®
96er-Well-Platten (transparent und nicht-transparent)	FALCON®
Casting Stands	BioRad
Casting Frames	BioRad
Einmal-Skalpelle, Nr. 22	Fa. Feather
FACS-Röhrchen	Fa. BD
Glasplatten (0,75 mm)	BioRad
Operationsbesteck	Carl Roth GmbH
Petrischalen, beliebig	FALCON®
Kanülen	B. Braun SE
Neubauer-Zählkammer	LO- Laboroptik Ltd.
Nitrocellulose-Membran (0,2 µm)	VWR (peqlab)
Western-Blotting-Filterpapier (2,5 mm, 7,5 cm x 8,4 cm)	Invitrogen™ Blotting Filter Paper LC2010

3.1.9. Software

Tabelle 11: Software.

Produkt	Anbieter
Excel®	Microsoft®
Prism 5	GraphPad®
PowerPoint®	Microsoft®
Word®	Microsoft®
NIS Elements BR 3.10 Software Packet	Nikon Instruments

3.2. Methoden

3.2.1. Mäuse

Für die Versuche wurden 8-13 Wochen alte PAD4^{-/-}- und WT-Mäuse (C57BL/6J) eingesetzt. Zur Untersuchung der Lipidperoxidation im Myokard wurden für jeden Genotypen (PAD4^{-/-} und WT) jeweils zwei Versuchsgruppen untersucht: eine LAD-Gruppe und eine Sham-Kontrollgruppe. In der LAD-Gruppe wurde ein akuter Myokardinfarkt durch permanente Ligatur des distalen RIVA induziert. In der Sham-Gruppe erfolgte lediglich eine Thorakotomie, ohne Ligatur des distalen RIVA, um den isolierten Einfluss der Thorakotomie zu untersuchen. Die Gewebeentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3 und 7 nach dem Eingriff. Die operativen Eingriffe zur Myokardinfarktinduktion sowie die Entnahme des Myokardparenchyms wurden vollständig von Frau Michelle Holthaus, einem Mitglied der Arbeitsgruppe, durchgeführt. Die anschließende Probenverarbeitung und Analysen erfolgten durch die Autorin dieser Arbeit.

3.2.2. PMN-Isolation aus dem Knochenmark

Nach der Tötung von WT- und PAD4^{-/-}-Mäusen durch Genick-Dislokation wurden die Femora, Tibiae und gegebenenfalls auch Humeri entnommen. Diese Knochen wurden mithilfe eines Skalpells vom umgebenden Bindegewebe (Sehnen, Muskeln und Bindegewebe) befreit. Zur Erzeugung steriler Bedingungen wurden die Röhrenknochen für 10 min in Petrischalen mit

70% Ethanol gelegt. Um das Knochenmark aus den Röhrenknochen zu extrahieren, wurden 10 ml Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) in eine Petrischale gegeben, die Gelenkköpfe eröffnet und das Knochenmark durch Ausspülen mit der Lösung entnommen. Anschließend wurde das Knochenmark gesammelt und die Zellsuspension durch einen 70-µm-Filter in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen filtriert. Nach Zentrifugation (5 min, 400 g, 15 °C) wurde der Überstand dekantiert. Zur Erythrozytenlyse wurde das Zellpellet in 6 ml 0,2% NaCl resuspendiert und 45 sec bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 14 ml 1,2% NaCl gestoppt. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 400 g, 15 °C) und Dekantieren des Überstandes wurden die Pellets in 5 ml HBSS resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden auf einen diskontinuierlichen Dichtegradienten gegeben, wobei zunächst 5 ml 62% Percoll in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen pipettiert und die Zellsuspension vorsichtig auf die Percoll-Lösung aufgeschichtet wurde. Es folgte eine Zentrifugation (30 min, 1000 g, 15 °C) und vorsichtiges Abpipettieren des Überstandes. Zum Waschen wurden 10 ml HBSS Prep hinzugefügt, gefolgt von einer erneuten Zentrifugation (5 min, 400 g, 15 °C) und Dekantieren des Überstandes. Schließlich wurde das Zellpellet vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette in 5 ml PBS resuspendiert, um die Zellzahl zu bestimmen (siehe 3.2.3).

3.2.3. Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Trypanblau-Vitalfärbung durchgeführt. Dafür erfolgte eine 1:4-Verdünnung der Zellprobe, indem 10 µl der Zellsuspension mit 30 µl Trypanblau-Lösung vermischt wurden. Aus dieser verdünnten Suspension wurden anschließend 10 µl in die Neubauer-Zählkammer eingebracht, wobei sich der Tropfen gleichmäßig zwischen Deckglas und Kammerboden verteilte. Unter mikroskopischer Betrachtung erschienen vitale Zellen farblos, während nicht-vitale Zellen aufgrund der Aufnahme des Farbstoffs eine blaue Färbung zeigten. Die Zellzählung erfolgte in den vier großen Eckquadraten des Gitternetzes. Jedes dieser Quadrate besitzt eine Fläche von 1 mm², wobei durch die standardisierte Kammertiefe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 mm³ (entsprechend 0,1 µl) definiert ist. Zur Berechnung der Zellkonzentration wurde der Mittelwert der vitalen Zellen in den vier großen Eckquadraten ($\bar{n}_{\text{vital}}$) bestimmt. Da die Probe zuvor im Verhältnis 1:4 verdünnt worden war, musste dieser Mittelwert mit dem Verdünnungsfaktor 4 multipliziert werden, um die tatsächliche Zellzahl in der Originalprobe zu erhalten. Anschließend wurde zur Hochrechnung auf einen Milliliter (1 ml = 10³ µl) die Zellzahl pro 0,1 µl zunächst mit 10 (für 1 µl) und dann nochmals mit 10³ (für 1 ml) multipliziert, was zusammen dem Faktor 10⁴ entspricht. Daraus ergab sich die Formel: Zellzahl/ml = $\bar{n}_{\text{vital}} \times 4 \times 10^4$

3.2.4. Quantifizierung der ROS in isolierten PMN mittels DHR123

Die WT- und PAD4^{-/-}-PMN wurden aus dem Knochenmark isoliert und im Zellkulturmedium (RPMI + 1% P/S + 1% FCS + 2 mM CaCl₂) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine

Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Es wurden jeweils 200 μ l der Zellsuspension in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert, entsprechend 3×10^5 Zellen pro Well.

Für jeden Genotyp (WT, PAD4^{-/-}) wurden die folgenden Versuchsansätze in die jeweiligen Wells eingebracht: unbehandelte Kontrolle, 50 nM PMA, 50 nM PMA + 200 μ M Cl-Amidin, 50 nM PMA + 10 μ M DPI, 4 μ M Ionomycin, 4 μ M Ionomycin + 200 μ M Cl-Amidin sowie 4 μ M Ionomycin + 10 μ M DPI.

Die Konzentration der eingesetzten Stimulatoren und Inhibitoren basierte auf publizierten, validierten Protokollen, welche deren Wirksamkeit im jeweiligen zellulären Kontext belegen. Für Cl-Amidin wurde die PAD4-hemmende Wirkung in vitro und in vivo charakterisiert.⁵⁹ DPI zeigt eine verlässliche Hemmung NADPH-Oxidase-vermittelter ROS-Produktion.⁶⁰ Die Fähigkeit von Ionomycin und PMA zur Induktion von NETose und damit verbundenen ROS-abhängigen Prozessen wurde ebenfalls bestätigt.^{61, 62} Zu Beginn der Inkubation wurden die Inhibitoren 200 μ M Cl-Amidin (Stammlösung: 28,8 mM in DMSO; pan-PAD-Inhibitor) bzw. 10 μ M DPI (Stammlösung: 3,178 mM in DMSO; unspezifischer Hemmer der Flavoproteine) zu den jeweiligen Ansätzen (3×10^5 Zellen in 200 μ l) gegeben. Die Vorinkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurden, mit Ausnahme der Kontrollgruppen (WT und PAD4^{-/-}), die Zellen entweder mit PMA (50 nM, 10 μ L einer 1 mM Stammlösung, Stimulator der Proteinkinase C) oder mit Ionomycin (4 μ M, 6,0 μ l einer 1,33 mM Stammlösung, Kalzium-Ionophor) stimuliert. Die Stimulation erfolgte über einen Zeitraum von 3 h bei 37 °C. Nach der Stimulation wurden 8 μ l Dihydrorhodamin 123 (DHR123; Endkonzentration: 20 μ M) in jedes Well gegeben. DHR123 ist ein fluorogener Farbstoff, der intrazellulär durch ROS zum fluoreszierenden Rhodamin123 oxidiert wird. Die Platten wurden anschließend für 15 min bei 37 °C und 110 rpm im Baki-Shaker inkubiert. Vor der Fluoreszenzmessung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (jeweils 5 min bei 4 °C und 1500 rpm). Die Detektion erfolgte mithilfe des Mikrotiterplatten-Lesegeräts VictorX3® (Perkin Elmer) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm.

3.2.5. Quantifizierung mitochondrialer ROS mittels MitoSOX

In diesem Ansatz betrug die Anzahl der PMN pro Genotyp (WT, PAD4^{-/-}) 4×10^6 Zellen/ml bzw. 8×10^5 Zellen/ 200 μ l pro Well. Die Versuchsgruppen entsprachen denen des vorherigen Experiments (siehe Abschnitt 3.2.4). Zu Beginn wurden die Zellen entweder mit 200 μ M Cl-Amidin (2,8 μ l einer 28,8 mM Stammlösung, pan-PAD-Inhibitor) oder mit 10 μ M DPI (3,2 μ l einer 3178 μ M Stammlösung, unspezifischer Hemmer der Flavoproteine) behandelt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit 50 nM PMA (10 μ l einer 1 mM Stammlösung, Stimulator der Proteinkinase C) oder 4 μ M Ionomycin (6,0 μ l einer 1,33 mM Stammlösung, Kalzium-Ionophor) über einen Zeitraum von 2,5 h bei 37 °C. Nach der Stimulation wurden 8 μ l MitoSOX (4 μ M)– in jedes Well zugegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 30 min bei 37 °C.

MitoSOX™ ist ein kationisches Ethidium-Derivat, das selektiv in Mitochondrien angereichert und dort durch Superoxid oxidiert wird, wobei ein fluoreszierender Ethidium-Kation-Komplex entsteht, der an mitochondriale DNA interkaliert.

Die Reaktion wurde durch kurzfristiges Kühlen auf Eis (2 min) gestoppt. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und durch Zugabe von 2–3 ml FACS-Puffer sowie Zentrifugation (400 g, 5min, 4 °C) gewaschen. Nach kurzem Vortexen wurde die intrazelluläre Fluoreszenz von oxidiertem MitoSOX™ Red mithilfe eines Durchflusszytometers (BD FACSCanto™ II) quantifiziert. Die Messung erfolgte im PE-A (Phycoerythrin-Area)-Kanal (Anregung: 488 nm, Emissionserfassung im Bereich um 575 nm). Das Emissionsmaximum von oxidiertem MitoSOX™ Red liegt bei ca. 580 nm und wurde durch den verwendeten Detektionsfilter zuverlässig erfasst. Nach kurzem Vortexen wurde die intrazelluläre MitoSOX™-Fluoreszenz mithilfe eines Durchflusszytometers (BD FACSCanto™ II) quantifiziert. Die Fluoreszenz des oxidierten MitoSOX™ wurde im PE-A (Phycoerythrin-Area)-Kanal (Anregung bei 488 nm, Emission bei 575 nm) detektiert. Der PE-A-Kanal wurde gewählt, da das Emissionsspektrum des oxidierten MitoSOX™ Red mit dem Erfassungsbereich dieses Kanals übereinstimmt.

3.2.6. Quantifizierung der Lipidperoxidation mittels TBARS (TCA Method) Assay im infarzierten murinen Myokardgewebe

Malondialdehyd (MDA) ist ein reaktives Abbauprodukt der Lipidperoxidation, das insbesondere bei oxidativem Stress aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren entsteht.³⁴ Im TBARS-Assay reagiert MDA mit Thiobarbitursäure (TBA) unter Bildung eines rosafarbenen MDA-TBA-Komplexes, der photometrisch quantifiziert werden kann. Damit dient die Messung von MDA als indirekter Marker für das Ausmaß lipidperoxidativer Zellschädigung.³⁴ Für die Durchführung des TBARS-(Thiobarbituric Acid Reactive Substances)-Assays wurden 25 mg des murinen infarzierten Myokardparenchyms entnommen. Das Gewebe wurde in 80µl RIPA -Puffer resuspendiert, gründlich vortexiert und anschließend sonifiziert. Der Probenüberstand wurde nach Zentrifugation separiert und maximal bis zu drei Wochen bei -80°C gelagert. Der Assay zur Quantifizierung von MDA wurde gemäß der Kitanleitung durchgeführt. Die MDA-Standardlösung wurde auf eine Konzentration von 12,5 µM verdünnt und entsprechend dem in **Tabelle 12** beschriebenen Schema als Standardreihe in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt.

Tabelle 12: Standard-Konzentrationsreihe aus der Anwendungsanleitung des TBARS-(Trichloroacetic Acid (TCA) Method)-Assay-Kits (Cayman Chemical®).

Tube	MDA (µl)	Wasser (µl)	MDA-Konzentration (µM)
A	0	1000	0
B	5	995	0,0625
C	10	990	0,125
D	20	980	0,25
E	40	960	0,5
F	80	920	1
G	200	800	2,5
H	400	600	5

Danach wurden jeweils 100 µl der Probe und der Standards mit 100 µl 10 %iger Trichloressigsäure (TCA) gemischt. Anschließend wurden 800 µl Farbreagenz (Thiobarbitursäure-Lösung) hinzugefügt. Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen und für 1h bei 95 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden sie für 10 min auf Eis abgekühlt und bei 1600 g und 4 °C erneut abzentrifugiert. 200 µl Überstand der Reaktionsgefäße wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die photometrische Bestimmung des MDA-TBA-Komplexes erfolgte mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät FLUOstar Omega® bei einer Absorptionswellenlänge von 540 nm und einer Schüttelfrequenz von 500 rpm.

3.2.7. Quantifizierung der NETs aus PMN mittels PicoGreen

Die PAD4^{-/-} und WT-PMN wurden in Zellkulturmedium (RPMI + 1% P/S +1% FCS + 2 mM CaCl₂) auf 2x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Je 200 µl der Zellsuspension (4x 10⁵ Zellen) wurden in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Folgende Versuchsgruppen wurden pro Genotyp in die jeweiligen Wells angesetzt: unbehandelte Kontrolle, 4 µM Ionomycin, 4 µM Ionomycin + 200 µM Cl-Amidin sowie 4 µM Ionomycin + 10 µM DPI. Die Auswahl und Konzentration der eingesetzten Stimulatoren und Inhibitoren erfolgte auf Grundlage publizierter Protokolle mit belegter Effektivität in vergleichbaren zellulären Systemen.⁵⁹⁻⁶²

Die Zellen wurden in Anwesenheit der Inhibitoren Cl-Amidin (200 µM, 2,8 µl einer 28,8 mM Stammlösung, pan-PAD-Inhibitor) und DPI (10 µM, 3,2µl einer 3178 µM Stammlösung, unspezifischer Hemmer der Flavoproteine) für 20 min bei 37 °C vorinkubiert, gefolgt von einer 3-stündigen Stimulation mit Ionomycin (4µM, 6,0µl einer 1,33mM Stammlösung, Kalzium-Ionophor). Danach wurden 70 µl PicoGreen (1:1000 in PBS verdünnt) in jedes Well gegeben und die Platte für 3 min lichtgeschützt bei 37 °C inkubiert. Die Zellen in den Wells wurden durch Zentrifugation (5 min, 50 g, 15 °C) abzentrifugiert, und der Überstand wurde in eine lichtgeschützte, nicht-transparente 96-Well-Platte überführt. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte im Mikrotiterplatten-Lesegerät (Victor®, Perkin Elmer) bei einer Absorptionswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535nm.

3.2.8. Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung

Nach Isolation der PMN aus dem Knochenmark der WT- und PAD4^{-/-}-Mäuse (siehe 3.2.2) wurde die PMN im Medium (RPMI + 1% P/S +1% FCS + 2 mM CaCl₂) auf 2,5x 10⁶ Zellen/ml eingestellt und 1 ml in die Vertiefungen einer 24-Well-Platte pipettiert. Die Zellen wurden mit 4 µM Ionomycin (3,0 µl einer 1,33 mM Stammlösung; Kalzium-Ionophor) für 30 min und für 90 min stimuliert.

Nachfolgend wurden die Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, bei 700 rpm für 2 min abzentrifugiert und durch Zugabe von 30µL RIPA-Puffer und Sonikation lysiert. Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Protein-Assay-Kit von Pierce™® gemäß den Anweisungen des Benutzerhandbuchs. Eine

Verdünnungsreihe als Protein-Standard aus Bovine Serum Albumin (BSA) wurde nach dem Schema in **Tabelle 13** in entsprechende Reaktionsgefäße angesetzt.

Tabelle 13: Standard-Konzentrationsreihe aus BSA nach dem Protokoll des Pierce™ -BCA-Protein-Assay-Kits (ThermoFischer scientific®).

Probe	BSA-Standard (µl)	PBS (µl)	Konzentration (µg/µl)
A	300	0	2
B	375	125	1,5
C	325	325	1,0
D	125 von B	175	0,75
E	325 von C	325	0,5
F	325 von E	325	0,25
G	325 von F	325	0,125
H	100 von G	400	0,025
I	0	400	0 = BLANK

Zunächst wurden die Proben im Verhältnis 1:6 mit PBS verdünnt und jeweils 10 µl des Standards oder der Probe in eine 96-Well-Platte pipettiert. Nach der Zugabe von 200 µl der BCA-Arbeitslösung wurde die Platte mit einer Folie abgedeckt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde die Platte auf Raumtemperatur abgekühlt und in das Multimodus-Mikrotiterplatten-Lesegerät (Victor®, Perkin Elmer) überführt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die restlichen Proben wurden für weitere Versuche, wie beispielsweise zur Proteinanalyse (3.2.9.), verwendet.

3.2.9. Proteinanalyse mittels Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteinproben wurde eine SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) durchgeführt. Für Proteine im Bereich zwischen 40–120 kDa wurden 10 %ige Trenngelschichten verwendet, ergänzt durch ein 4 %iges Sammelgel zum Einbringen der Proben. Die Zusammensetzungen beider Gelphasen einschließlich der Polymerisationskomponenten sind in **Tabelle 14** dargestellt.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Gelphasen für SDS-Page.

Komponente	Trenngel (10%)	Sammelgel (4%)
Acrylamid/Bisacrylamid (30 % Lösung; Verhältnis 37,5:1)	7,5 ml	1,3 ml
Aqua dest.	3,75 ml	6,0 ml
Trenn-/ Sammelgelpuffer (4x)	3,75 ml	2,5 ml
APS	50 µl	25 µl
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamine)	20 µl	10 µl

Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel eingegossen und der Kamm zur Bildung der Geltaschen eingesetzt. Nach dem vorsichtigen Herausziehen des Kamms wurden die Geltaschen sorgfältig mit Pipetten gespült. Die Proben (30 µg) wurden im Verhältnis 4:1 mit 4 x Laemmli-Puffer versetzt mit 20% β-Mercaptoethanol versetzt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Anschließend wurden der Proteinmarker und die Proben in

die Taschen des Sammelgels pipettiert und die Elektrophorese mit 60 V gestartet. Sobald die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Der Gellauf wurde beendet, sobald die Farbstofffront den unteren Rand des Trenngeles erreicht hatte, um ein Herauslaufen der Proben zu verhindern. Im Anschluss wurden die Trenngele in Blotting-Puffer äquilibriert.

Western Blot Die Auftrennung der Proteine und der Nachweis von citrulliniertem Histon H3 (citH3) und Histon H3 in WT- und PAD4^{-/-}-PMN erfolgten mittels Western Blot. Die aufgetrennten Proteine wurden mithilfe eines Semidry-Blotting-Systems bei 25 V über 60 min auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Schichtung bestand aus Blotting-Papier, Nitrocellulose-Membran, Polyacrylamid-Gel und erneut Blotting-Papier, beginnend an der Anodenseite (positiv geladen) bis zur Kathodenseite (negativ geladen).

Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt, um die Effizienz der Proteinübertragung zu überprüfen, anschließend mit aqua dest und TBS-T (Tris-Buffered Saline mit 0,1 % Tween 20) gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für 5 min mit 5 % Milchpulver oder BSA in TBS-T auf einem Rollmischer. Anschließend wurde der Primärantikörper Kaninchen anti-Maus citrulliniertes Histon H3 (1:500) oder anti-Histone H3 (D1H2) XP® mAb (1:2000) in 3-5 % Milchpulver in TBS-T hinzu pipettiert und die Membran über Nacht bei 4 °C auf einem Rollmischer inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit 10 ml TBS-T für jeweils 5 min gewaschen. Für die Detektion wurden der Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen IgG Antikörper (Immunglobulin G) AF488 (1:1000 in TBS-T) sowie das Precision Protein StrepTactin-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate (1:1000 in TBS-T) lichtgeschützt für 1 h auf einem Rollmischer inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten in 10 ml TBS-T für jeweils 5 min wurde die Membran in PBS überführt. Die Detektion erfolgte mittels Geldokumentationssystem (BioRad® ChemiDoc™) unter Verwendung des ‚Enhanced Chemiluminescence (ECL) Western Blotting Substrate‘ gemäß Herstellerprotokoll.

3.2.10. Western-Blot-Stripping

Das Stripping-Verfahren ermöglichte die Entfernung von Primär- und Sekundärantikörpern von der Membran, wobei die relevanten Antigene erhalten blieben. Dadurch konnte die Membran erneut für die Detektion weiterer Proteine verwendet werden. Zur Durchführung wurde die Membran in 20 ml Stripping-Puffer mit 100 mM β-Mercaptoethanol für 20 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend gründlich im Rollmischer mit PBS gewaschen. Vor der erneuten Immundetektion wurden unspezifische Bindungsstellen auf der gewaschenen Membran durch Zugabe von Blocking-Puffer blockiert, um eine spezifische Bindung des Antikörpers zu gewährleisten.

3.2.11. Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion von NETs

Zur Darstellung freigesetzter NETs wurden PMN auf beschichtete Deckgläschen in 12-Well-Platten kultiviert. Vor dem Ansatz wurden die Deckgläschen mit 0,1 mg/ml Poly-D-Lysin-Lösung für 30 min Inkubation bei 37 °C beschichtet. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit PBS und eine Trocknung für 1 h unter sterilen Bedingungen. Die Platten wurden luftdicht verschlossen und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am Folgetag wurden WT- und PAD4^{-/-}-PMN (1,5x 10⁶ Zellen in 500 µl Medium) auf die beschichteten Deckgläser gegeben und mit 200 µM Cl-Amidin oder 10 µM DPI für 30min bei 37 °C vorinkubiert.

Darauf folgte eine Stimulation mit 4 µM Ionomycin für 3 h ebenfalls bei 37°C. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 40 min bei Raumtemperatur fixiert, anschließend dreimal mit PBS gewaschen und bis zur Färbung bei 4 °C gelagert. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen zunächst mit 0,1 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert und dann mit 200 µl Blockierungspuffer für 30 min inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper ‚Anti-Histone H3 (citrulline R2+R8+R17) Antikörper‘ (1:600) über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der Sekundärantikörper ‚α-rabbit IgG AF488‘ (1:1000) für 1,5 h bei Raumtemperatur aufgetragen. Nach weiteren dreimaligen Waschschrten wurde die Zellkernfärbung mit DAPI (1 µg/ml in PBS) für 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Abschließend erfolgten drei Waschschrte mit PBS sowie eine abschließende Spülung mit aqua dest. Die Deckgläschen wurden mit Dako-Eindeckmedium abgedeckt. Die Visualisierung der NETs erfolgte mithilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops (Eclipse Ti-U 100, Nikon®) und der Software NIS Elements BR 3.10 (Nikon Instruments®).

3.2.12. Statistische Datenauswertung

Für die statistische Auswertung wurde neben der Microsoft-Plattform Excel® vorwiegend die Auswertungssoftware GraphPad Prism 5® verwendet. Die erhobenen Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts (Standard Error of the Mean, SEM) angegeben. Für normalverteilte Daten wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Newman-Keuls-Post-Hoc-Test durchgeführt. Zur Beurteilung, ob sich der Mittelwert einer Stichprobe signifikant von einem Referenzwert unterscheidet, wurde der Student's t-Test herangezogen. Ein p-Wert von < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Die Anzahl unabhängiger Versuchsdurchläufe („N“) variierte je nach Versuch und lag zwischen drei und zehn.

4. Ergebnisse

4.1. Die Quantifizierung intrazellulärer ROS

4.1.1. Bildung von ROS durch PMN nach Stimulation mit PMA und Ionomycin

ROS stellen zentrale Effektormoleküle der PMN im Rahmen der angeborenen Immunabwehr dar.^{15, 16} In der vorliegenden Versuchsreihe wurde untersucht, inwieweit das Enzym PAD4 die intrazelluläre ROS-Generierung nach Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege moduliert. Zur Stimulation der PMN kamen zwei etablierte Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zum Einsatz: PMA, ein direkter Aktivator der Proteinkinase C, welcher nachgeschaltet den NADPH-Oxidase-Komplex aktiviert, sowie Ionomycin, ein Kalzium-Ionophor, der durch Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration alternative, NADPH-Oxidase-unabhängige ROS-Quellen induziert. Zur gezielten Analyse des Beitrags PAD4- und NOX2-abhängiger Signalwege zur ROS-Produktion wurden zusätzlich DPI (unspezifischer Inhibitor von Flavoproteinen) für die Hemmung der NOX2 und Cl-Amidin als pan-PAD-Inhibitor eingesetzt. Zur Durchführung der Experimente wurden PMN aus WT- und PAD4^{-/-}-Mäusen mit 50 nM PMA oder 4 µM Ionomycin stimuliert und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Zwei Gruppen mit je 3x 10⁵ Zellen pro Well wurden zuvor für 30 min mit 200 µM Cl-Amidin oder 10 µM DPI vorbehandelt und anschließend stimuliert, um den Beitrag PAD4- und NOX2-abhängiger Signalwege zur ROS-Generierung gezielt zu untersuchen.

Die Stimulation mit PMA resultierte in beiden Genotypen in einer signifikanten Zunahme der intrazellulären ROS, wie anhand eines etwa verdoppelten Fluoreszenzsignals im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nachweisbar war (**Abbildung 2**). Die Vorbehandlung mit DPI zur Hemmung der NOX2 führte zu einer signifikanten wenngleich nicht vollständigen Reduktion des ROS-Signals. Dies bestätigt die zentrale Rolle der NOX2 bei der PMA-vermittelten ROS-Generierung, lässt jedoch auf zusätzliche ROS-Quellen schließen, etwa mitochondrialen Ursprungs. Hingegen zeigte die Hemmung der PAD-Enzyme durch Cl-Amidin keine signifikante Beeinflussung der ROS-Produktion – weder in WT noch im PAD4^{-/-}-PMN. Diese Befunde sprechen dafür, dass PAD4 unter den gewählten Bedingungen keine relevante Funktion bei der PMA-induzierten ROS-Produktion ausübt.

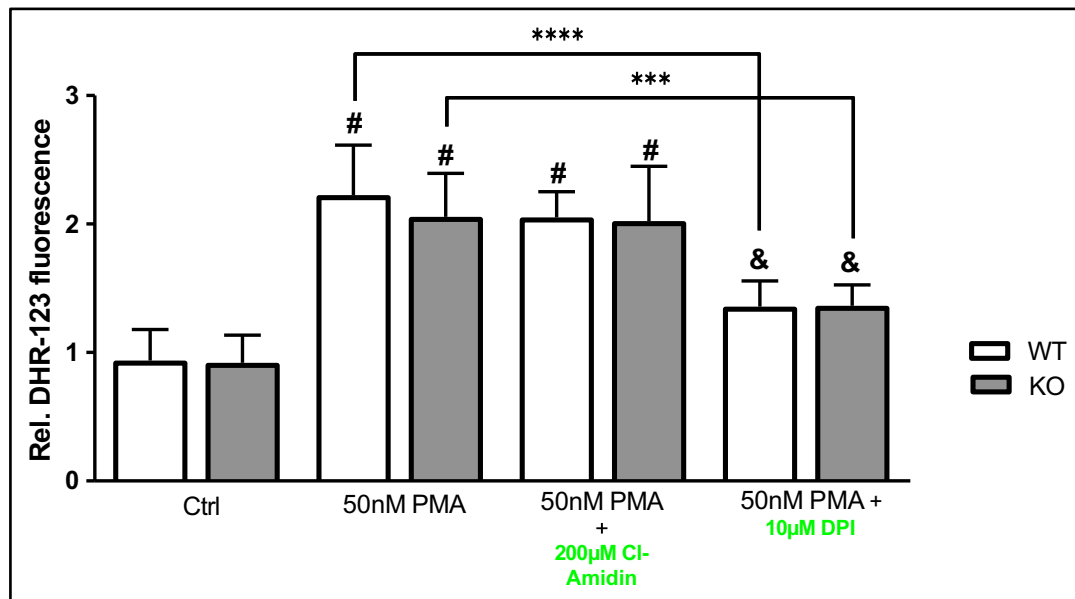


Abbildung 2: Bedeutung von PADs und NOX2 für die Bildung zellulärer ROS nach Stimulation mit PMA.

WT- und PAD4^{-/-} PMN (1,5x 10⁶ Zellen/ ml) wurden für 3h bei 37°C mit 50nM PMA stimuliert. In parallelen Ansätzen wurde im Vorfeld eine Vorinkubation mit dem pan-PAD-Inhibitor Cl-Amidin (200 µM) und dem unspezifischen Hemmer der Flavoproteine DPI (10 µM) für 30 min bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurde die ROS-Menge quantifiziert. Die unstimulierte Zellen (Ctrl) wurden hierbei als Kontrolle verwendet. Abschließend wurden die relativen Fluoreszenzeinheiten des oxidierten DHR123 zu Rhodamin123 ermittelt. N = 7. # p < 0,0001 und & p < 0,01 gegenüber der Kontrollgruppe (One-Way-ANOVA mit Newman-Keuls-post-hoc-Test). ****p < 0,0001, ***p < 0,001 (Student-Test).

Ionomycin, führte sowohl in PMN aus WT- als auch aus PAD4^{-/-}-Mäusen zur signifikanten Erhöhung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur jeweiligen unstimulierten Kontrolle (**Abbildung 3**). Die beobachtete Zunahme war in beiden Genotypen vergleichbar ausgeprägt. Eine Vorbehandlung mit DPI, hatte keinen messbaren Einfluss auf das durch Ionomycin induzierte ROS-Signal gezeigt. Auch die Hemmung der PAD-Enzyme durch Cl-Amidin führte in beiden Genotypen zu keiner signifikanten Veränderung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Ionomycin. Die Ergebnisse zeigen, dass die Ionomycin-vermittelte ROS-Generierung unter den gewählten Bedingungen unabhängig von NOX2 und PAD-Proteinen verläuft.

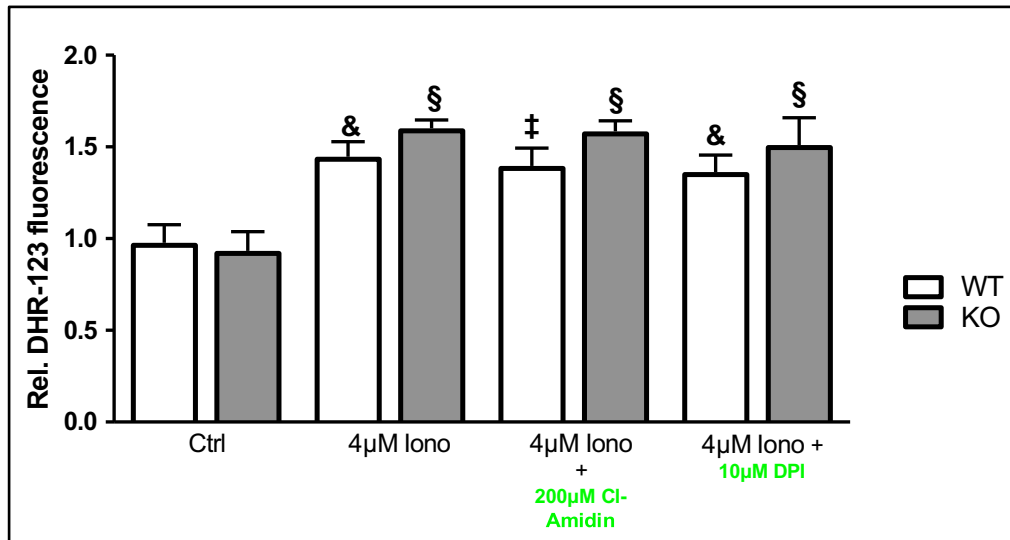


Abbildung 3: Bedeutung von PADs und NOX2 für die Bildung zellulärer ROS nach Stimulation mit Ionomycin.

WT- und PAD4^{-/-}-PMN ($1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden zunächst 3 h bei 37 °C mit 4 µM des Kalzium-Ionophor Ionomycin stimuliert. Zuvor fand eine 30-minütige Vorinkubation mit dem pan-PAD-Inhibitor Cl-Amidin (200 µM) oder dem unspezifischen Hemmer der Flavoproteine DPI (10 µM) bei 37 °C statt. Abschließend wurde die relative Fluoreszenzeinheiten des oxidierten DHR123 zu Rhodamin123 quantifiziert, wobei unbehandelte Zellen (Ctrl) als Kontrolle dienten. N = 5. § p < 0,001, & p < 0,01 und ‡ p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe (One-Way-ANOVA mit Newman-Keuls-post-hoc-Test).

4.1.2. Erfassung der mitochondrialen ROS in Gegenwart von MitoSOX™

Um den Beitrag mitochondrialer ROS zur Gesamt-ROS-Produktion sowie mögliche regulatorische Einflüsse von PAD4 oder NOX2 zu untersuchen, wurde die mitochondriale ROS-Entstehung mithilfe des mitochondrienspezifischen Farbstoffs MitoSOX™ analysiert. Die Fluoreszenzsignale wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS) erfasst und anhand der relative Fluoreszenzintensität ausgewertet. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden Dot-Plots verwendet, in denen die MitoSOX-Fluoreszenz auf der X-Achse und der Side Scatter Area (SSC-A) auf der Y-Achse abgebildet ist. Eine ungefärbte Kontrolle diente zur Festlegung des Schwellenwerts der PE-Fluoreszenz im Durchflusszytometer.

Die isolierten WT- und PAD4^{-/-}-PMN wurden für 30 min bei 37 °C mit 200 µM Cl-Amidin oder 10 µM DPI vorinkubiert. Zur Stimulation der ROS-Produktion erfolgte eine anschließende Inkubation für 2,5 h mit 50 nM PMA (**Abbildung 4 A, B**) oder 4 µM Ionomycin (**Abbildung 5 A, B**). Abschließend wurden 4 µM MitoSOX™ in die Wells gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Zugabe von PMA führte zu einem signifikanten Anstieg der MitoSOX-Fluoreszenz im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (p < 0,01) (**Abbildung 4 A**). Dies deutet auf eine durch die Aktivierung der Proteinkinase C vermittelte Steigerung der mitochondrialen ROS-Produktion hin. Weder die unspezifische Hemmung der Flavoproteine mittels DPI noch die Inhibition der PAD-Enzyme durch Cl-Amidin führte zu einer Reduktion des MitoSOX™-Signals in beiden Genotypen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die durch

PMA induzierte mitochondriale ROS-Produktion unabhängig von der Aktivität der NOX2 sowie des PAD4-Enzyms in PMN erfolgt.

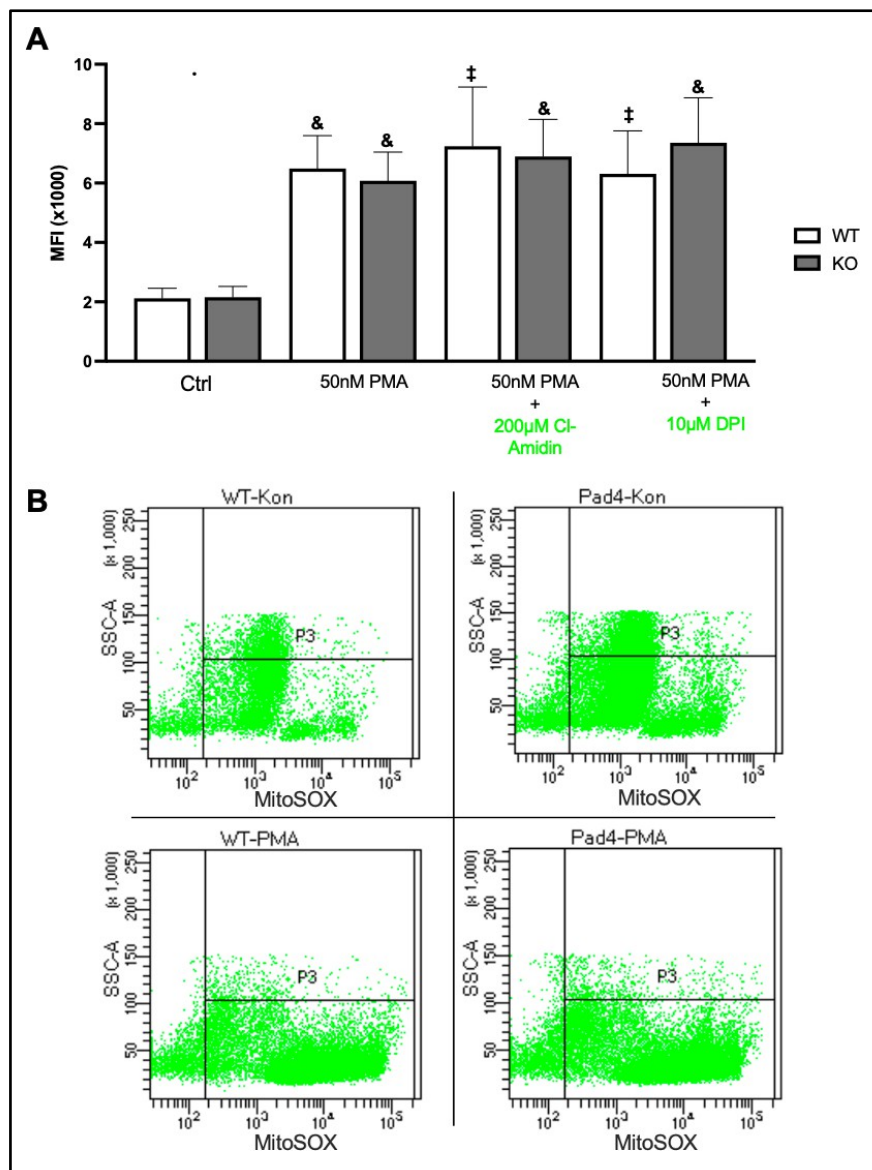


Abbildung 4: Erfassung mitochondrialer ROS nach Stimulation von PMN mit PMA.

A WT- und PAD4^{-/-}-PMN (4x 10⁶ Zellen/ml) wurden mit 50 nM PMA für 2,5 h bei 37°C stimuliert. Zuvor wurden einige Zellen entweder mit 200 µM Cl-Amidin (pan-PAD-Inhibitor) oder 10 µM DPI (unspezifischen Hemmer der Flavoproteine) für 30 min bei 37°C vorbehandelt. Die unbehandelten Zellen (Ctrl) dienten als Kontrolle. Dargestellt ist die Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) (x1000) von MitoSOX. N = 4-10. **B**) Repräsentative Dot-Plots der FACS-Analyse unbehandelter (Kon) sowie mit PMA stimulierter WT- und PAD4^{-/-}-PMN. & p < 0,01 und ‡ p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe (One-Way-ANOVA mit Newman-Keuls-post-hoc-Test).

Auch die Stimulation mit Ionomycin führte in WT- und PAD4^{-/-}-PMN zu einer signifikanten Zunahme der MitoSOX-Fluoreszenz, was eine erhöhte mitochondriale ROS-Produktion nach Aktivierung der Zellen durch Ionomycin anzeigt. Weiterhin zeigte sich nach Vorbehandlung mit Cl-Amidin oder DPI ebenfalls keine signifikante Veränderung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Ionomycin- stimulierten Zellen (**Abbildung 5 A, B**). Dies deutet darauf hin,

dass die durch Ionomycin induzierte mitochondriale ROS-Produktion ebenfalls unabhängig von der Aktivität von NOX2 und von PAD-Enzymen ist.

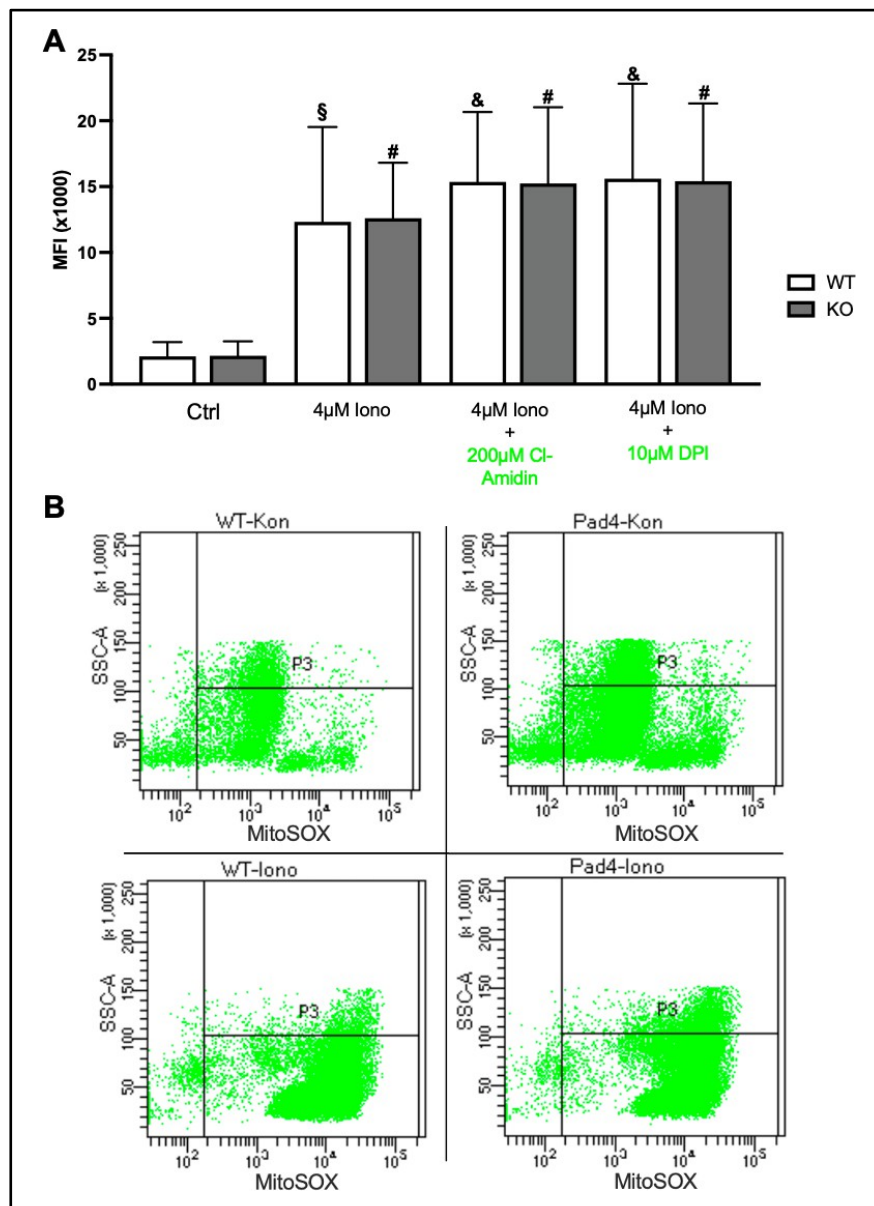


Abbildung 5: Erfassung mitochondrialer ROS nach Stimulation von PMN mit Ionomycin.

A) Zu Beginn wurden die WT- und PAD4^{-/-}-PMN (4x 10⁶ Zellen/ml) mit 4 µM Ionomycin für 2,5 h bei 37 °C stimuliert. Zuvor wurden einige Zellen entweder mit 200 µM Cl-Amidin (pan-PAD-Inhibitor) oder 10 µM DPI (unspezifischen Hemmer der Flavoproteine) für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Unbehandelte Zellen (Ctrl) dienten hierbei ebenfalls als Kontrolle. Die Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) (x1000) von MitoSOX wurde mittels FACS ermittelt. N = 4-10. **B)** Repräsentative Dot-Plots der FACS-Analyse unbehandelter (Kon) sowie mit Ionomycin stimulierter WT- und PAD4^{-/-}-PMN. # p < 0,0001, § p < 0,001 und & p < 0,01 gegenüber der Kontrollgruppe (One-Way-ANOVA mit Newman-Keuls-post-hoc-Test).

Die Dot-Plots in **Abbildung 4 B** (PMA-Stimulation) und **Abbildung 5 B** (Ionomycinstimulation) zeigen Unterschiede in der Verteilung und Dichte der Zellpopulationen im SSC-A/ MitoSOX - Diagramm. Diese Ergebnisse belegen, dass Art und Ausmaß der mitochondrialen ROS-Generierung sowie zelluläre Strukturveränderungen stimulusabhängig variieren. Während PMA über die Aktivierung von Proteinkinase-C primär zur moderaten mitochondrialen ROS-

Produktion beiträgt, induziert Ionomycin als Kalzium-Ionophor durch Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration eine ausgeprägte mitochondriale ROS-Generierung.

4.2. Die Lipidperoxidation im infarzierten murinen Myokardgewebe

Oxidativer Stress spielt eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts, insbesondere im Hinblick auf Zellschädigung, Entzündungsreaktionen und das strukturelle Remodeling des Herzgewebes. Die Akkumulation der ROS führt dabei unter anderem zur Lipidperoxidation.

Zur quantitativen Erfassung der Lipidperoxidation wurde die MDA-Konzentration im infarzierten Myokardgewebe von WT- und PAD4^{-/-}-Mäusen bestimmt. Ziel war es, mögliche genotypabhängige Unterschiede im oxidativen Stressverhalten zu detektieren, die Rückschlüsse auf die PAD4-Funktion im kardialen Gewebe erlauben.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der MDA-Messungen an den postoperativen Tagen 1, 3 und 7 dargestellt, um die Dynamik der Lipidperoxidation im zeitlichen Verlauf des Infarktgeschehens differenziert zu analysieren (**Abbildung 6**). Untersucht wurden hierzu Myokardgewebeproben von PAD4^{-/-}- und WT-Mäusen, die jeweils einer von zwei experimentellen Gruppen zugeordnet waren: einer Infarktgruppe mit induziertem Myokardinfarkt durch permanente LAD-Ligatur (LAD-Gruppe) und einer Sham-Kontrollgruppe ohne Gefäßligatur zur Kontrolle des isolierten Einflusses der Thorakotomie.

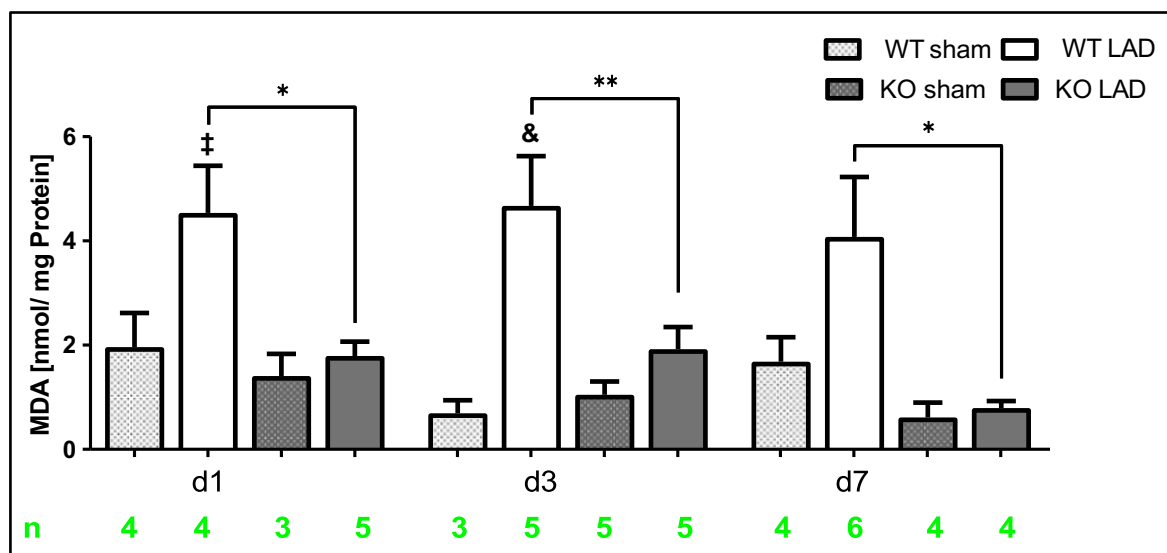


Abbildung 6: Lipidperoxidation in murinem infarzierten Myokardparenchym.

Die Lipidperoxidation im Myokardparenchym von WT- und PAD4^{-/-}-Mäusen an den postoperativen Tagen 1, 3 und 7 nach Induktion eines akuten Myokardinfarkts. Dabei werden die Subgruppen sham (isolierte Thorakotomie, ohne Ligatur des distalen RIVA) und LAD (permanente Ligatur des distalen RIVA mit Induktion eines Myokardinfarktes) unterschieden. N = 3-6 (grün). & p < 0,01 und ‡ p < 0,05 gegenüber der Sham-Gruppe, **p < 0,01, *p < 0,05 (One-Way-ANOVA mit Newman-Keuls-post-hoc-Test).

Ein Vergleich der Genotypen (WT vs. PAD4^{-/-}) ergab an den postoperativen Tagen 1, 3 und 7 signifikant niedrigere MDA-Konzentrationen in der PAD4^{-/-}-LAD-Gruppe im Vergleich zur WT-

LAD-Gruppe ($p < 0,01$ bis $< 0,05$). In der WT-Gruppe zeigten sich an den postoperativen Tagen 1 und 3 signifikant erhöhte MDA-Konzentrationen in der LAD-Gruppe im Vergleich zur WT-Sham-Kontrollgruppe, was auf eine gesteigerte Lipidperoxidation hinweist. Am 7. postoperativen Tag war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen WT-LAD- und WT-Sham-Gruppe nachweisbar, wenngleich die MDA-Konzentration in der WT-LAD-Gruppe weiterhin erhöht war. In der PAD4^{-/-}-LAD-Gruppe hingegen lagen die MDA-Werte an allen untersuchten Zeitpunkten (Tage 1, 3 und 7) signifikant unter denen der WT-LAD-Gruppe, was auf einen reduzierten oxidativen Stress in Abwesenheit von PAD4 schließen lässt.

4.3. Abhängigkeit der NETs-Bildung von PAD4 und ROS in Ionomycin-stimulierten PMN

Zu den Untersuchungen zur Rolle von PAD4 sowie von NOX2 bei der Bildung von NETs wurden erneut PMN aus WT- und PAD4^{-/-}-Mäusen isoliert. Die Zellen wurden – in Anlehnung an die vorhergehenden Experimente – vor der Stimulation für 30 min bei 37 °C mit 200 µM Cl-Amidin oder 10 µM DPI vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 4 µM Ionomycin über einen Zeitraum von 3 h bei 37°C.

Zur Quantifizierung der NETose wurde die im Zellkulturüberstand freigesetzte cfDNA fluorometrisch erfasst. Da cfDNA Hauptbestandteil von NETs ist, wird dieser Parameter in der Literatur häufig als Surrogatmarker für NETs herangezogen.^{41, 63-65}

Die Ionomycin-Stimulation führte zu einer signifikanten Erhöhung der cfDNA/NETs-Freisetzung in PMN von WT-Mäusen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (**Abbildung 7 A**). Dies belegt, dass Ionomycin als starker Stimulus eine ausgeprägte NETose in WT-PMN induziert. Eine Vorbehandlung mit Cl-Amidin oder DPI führte in den WT-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der freigesetzten cfDNA, was auf eine Beteiligung sowohl von PAD4-abhängigen Prozessen als auch der NOX2 bei der Ionomycin-induzierten NETs-Bildung hindeutet. In PAD4^{-/-}-PMN konnte hingegen nach Stimulation mit Ionomycin keine signifikante Zunahme der cfDNA detektiert werden. Bereits unter Kontrollbedingungen zeigte sich eine tendenziell niedrigere basale cfDNA-Freisetzung in PAD4^{-/-}-PMN im Vergleich zu WT-PMN. Zur weiterführenden funktionellen Validierung der PAD4-Aktivität wurde citrulliniertes Histon H3 (citH3) mittels Western Blot untersucht (**Abbildung 7 B**). Die Gesamtproteinmenge von Histon H3 zeigte keinen Unterschied zwischen WT- und PAD4^{-/-}-Zellen. In WT-PMN führte die Ionomycin-Stimulation bereits nach 30 min zu einer deutlichen Zunahme der citH3-Expression, während in PAD4^{-/-}-Zellen keine Citrullinierung nachweisbar war – unabhängig von der Stimulationsdauer. Dies bestätigt, dass PAD4 für die Ionomycin-induzierte Citrullinierung von Histon H3 essenziell ist und diese Reaktion in Abwesenheit des Enzyms vollständig ausbleibt. Ergänzend wurde die NETs-Bildung durch Immunfluoreszenzfärbung visualisiert, bei der citH3 (grün) und DNA mittels DAPI (blau) detektiert wurden (**Abbildung 7 C**). In Übereinstimmung

mit den quantitativen Ergebnissen zeigte sich in WT-PMN nach Ionomycin-Stimulation eine deutliche Zunahme von NETs. In PAD4^{-/-}-Zellen waren dagegen keine NETs-Strukturen sichtbar. Nach Vorbehandlung der WT-Zellen mit DPI waren noch vereinzelte NETs-Fasern nachweisbar, während Cl-Amidin die NETs-Freisetzung nahezu vollständig unterdrückte. Diese Befunde unterstreichen die zentrale Rolle von PAD4 in der NETose und bestätigt, dass die Inhibition von PAD4 die NETs-Bildung effektiv verhindert. Sie zeigen weiterhin, dass ROS ebenfalls eine Rolle bei der Ionomycin-induzierten NETs-Bildung spielen.

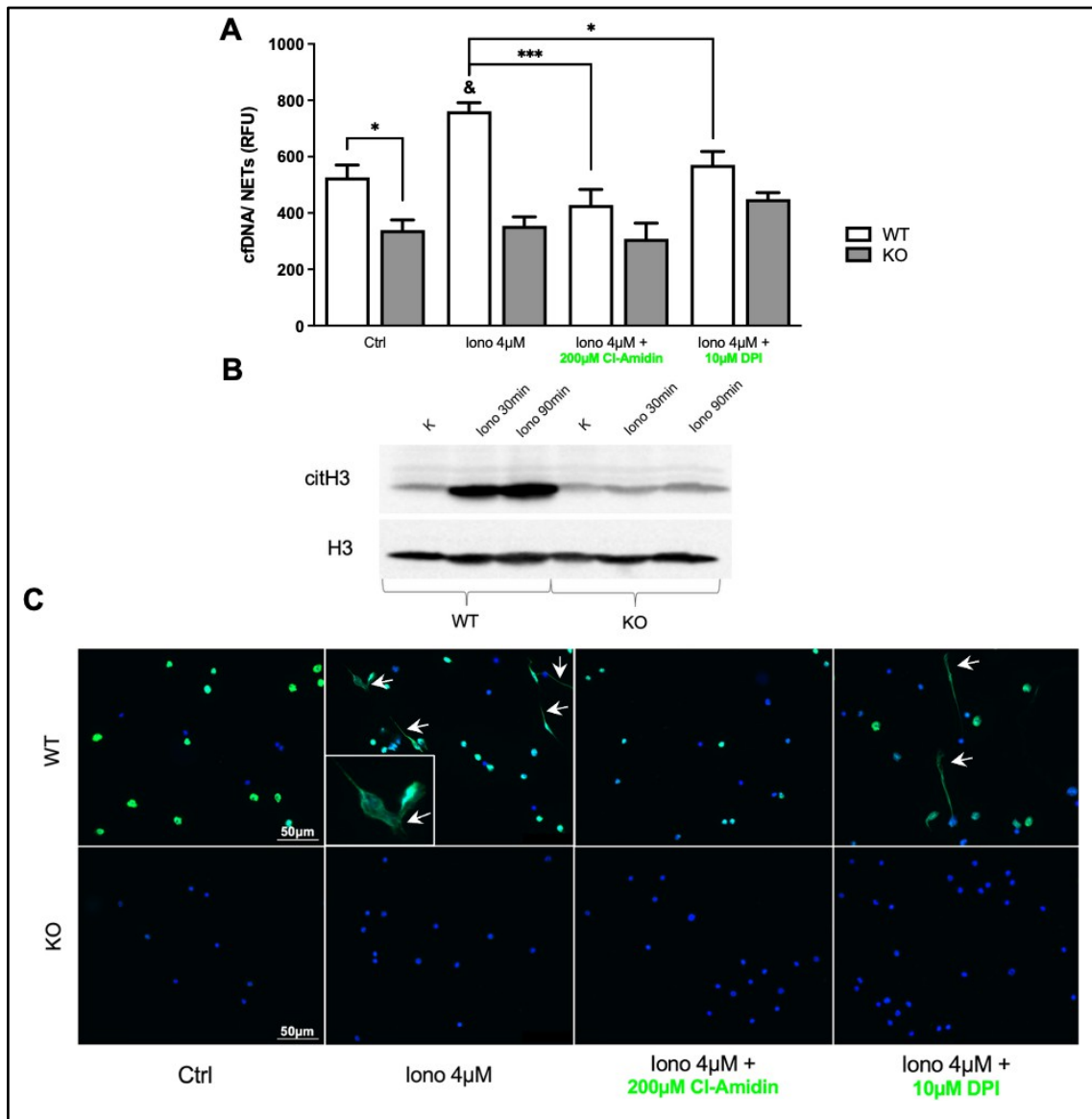


Abbildung 7: NETs-Erfassung in WT- und PAD4^{-/-}-PMN.

A) Quantifizierung von cfDNA/NETs in WT- und PAD4^{-/-}-PMN nach Stimulation mit 4 μM Ionomycin für 3h bei 37 °C. Zusätzlich wurden einige Zellen vor der Stimulation für 30 min mit 200 μM Cl-Amidin (pan-PAD-Inhibitor) und 10 μM DPI (unspezifischen Hemmer der Flavoproteine) vorbehandelt. Die unbehandelten Zellen (Ctrl) dienten als Kontrolle. N = 4-6. & p < 0,01 gegenüber der Kontrollgruppe, ***p < 0,001, *p < 0,05 (One-Way-ANOVA mit Newman-Keuls-post-hoc-Test, Student-Test).

B) Proteinexpression von citrulliniertem Histone H3 (citH3) und Histone H3 in WT- und PAD4^{-/-}-PMN nach 30 bzw. 90 min Stimulation bei 37 °C mit Ionomycin.

C) Immunfluoreszenzfärbung von NETs (weiße Pfeile) nach Stimulation mit 4μM Ionomycin mit und ohne Inhibitoren. Blau: Zellkerne (DAPI-). Grün: Citrulliniertes Histone H3. Maßstabsbalken = 50 μm.

5. Diskussion

Der akute Myokardinfarkt stellt eine der zentralen klinischen Manifestationen kardiovaskulärer Erkrankungen dar und zählt in Deutschland zu den häufigsten Todesursachen.¹ Bei einem akuten Myokardinfarkt werden PMN als zentrale Akteure des angeborenen Immunsystems rasch aktiviert und in den pathologischen Prozess integriert.^{6, 7, 9, 10} Ihre Rekrutierung erfolgt über komplexe Signalwege, die durch endogene Gefahrenmuster (DAMPs) vermittelt werden.⁸⁻¹¹ Die PMN übernehmen vielfältige Funktionen, darunter die Phagozytose nekrotischen Zellmaterials, die Freisetzung entzündungsmodulierender Mediatoren sowie die Produktion von ROS und die Bildung von NETs.^{8, 9, 13, 14} In diesem Zusammenhang spielt das Enzym PAD4 eine entscheidende Rolle bei der NETs-Bildung. PAD4 katalysiert die Citrullinierung von Histon H3, was eine Dekondensation des Chromatins bewirkt und damit die Freisetzung von NETs ermöglicht.^{37, 40, 44, 45} Angesichts der bekannten Rolle von PAD4 bei der NETs-Bildung stellt sich die Frage, welchen Beitrag das Enzym darüber hinaus im Kontext der ROS-Generierung leistet. Während die Rolle von PAD4 in der NETs-Bildung durch Histon-Citrullinierung hinreichend belegt ist, deuten Studien auf eine komplexe Wechselwirkung zwischen PAD4 und der ROS-Produktion hin.^{66, 67, 68} Die genauen Mechanismen dieser Beziehung sind jedoch noch nicht vollständig geklärt und bedürfen weiterer Forschung. Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss des Enzyms PAD4 im Rahmen der ROS-Generierung.

Studien, darunter die Untersuchungen von Robinson et al. und Cross et al., konnten belegen, dass NOX2 in PMN eine relevante Quelle für ROS darstellt.^{21, 22, 69, 70} In diesem Kontext spielen die durch die Proteinkinase-C-vermittelte Signaltransduktion eine entscheidende Rolle.^{20, 21} Die Stimulation der NOX2 durch PMA über die Proteinkinase C gilt mittlerweile als etablierter Standard und wird zur gezielten Induktion von ROS eingesetzt.^{69, 71} Diese Methode ermöglicht eine spezifische Aktivierung der NOX2 und erlaubt dadurch eine differenzierte Analyse ROS-vermittelter Reaktionen in PMN. Neben der Proteinkinase-C-vermittelten Aktivierung stellt auch die intrazelluläre Kalziumkonzentration einen wichtigen Faktor für die generelle ROS-Produktion dar. Eine allgemeine Erhöhung des Kalziumspiegels führt ebenfalls zur ROS-Generierung.^{30-32, 72}

Zur funktionellen Untersuchung der zugrunde liegenden Signalwege kamen in der vorliegenden Arbeit der pan-PAD-Inhibitor Cl-Amidin sowie der unspezifische Flavoprotein-Inhibitor Diphenyliodonium (DPI) zur NOX2-Hemmung in PMNs zum Einsatz. Cl-Amidin ist ein irreversibler Inhibitor der PADs, der über eine kovalente Bindung an das aktive Zentrum die enzymatische Aktivität blockiert. Er wird zur Untersuchung PAD-abhängiger Prozesse herangezogen, insbesondere im Zusammenhang mit der NETs-Bildung.⁵⁹ Obwohl Cl-Amidin nicht selektiv für PAD4 ist und mehrere PAD-Isoformen hemmt, bietet er dennoch eine

etablierte Möglichkeit zur initialen funktionellen Inhibition der PAD-Aktivität im zellulären Kontext.⁵⁹ DPI hemmt unspezifisch Flavoproteine und beeinflusst dadurch neben der NADPH-Oxidase auch weitere flavinabhängige Enzymsysteme, darunter mitochondriale Atmungskomplexe, Cytochrom-P450-Reduktasen sowie Nitric-Oxide-Synthasen. Unter Berücksichtigung dieser breiten Zielstruktur ist die Anwendung von DPI zur selektiven Hemmung einzelner ROS-Quellen nur eingeschränkt interpretierbar und erfordert eine sorgfältige, kritische Interpretation der erhobenen Daten.⁶⁰

Unsere Ergebnisse bestätigen die Befunde von Robinson et al. und Cross et al., die NOX2 als relevante Quelle der ROS-Produktion in PMN identifizieren konnten.^{68, 69} Die Analyse der intrazellulären ROS-Bildung nach Stimulation von WT- und PAD4^{-/-}-PMN mit PMA verdeutlichte eine ausgeprägte ROS-Generierung, die durch die signifikante Reduktion des ROS-Signals nach Vorbehandlung mit DPI in beiden Genotypen zusätzlich gestützt wurde. Die Hemmung von PAD4 durch den pan-PAD-Inhibitor Cl-Amidin hatte hingegen keinen nachweisbaren Einfluss auf die PMA- oder Ionomycin-induzierte ROS-Produktion in WT-PMN. Dies deutet darauf hin, dass PAD4 unter den gewählten Bedingungen nicht direkt an der NOX2-vermittelten ROS-Generierung beteiligt ist. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Zhou et al., die in humanen neutrophilen Granulozyten eine funktionelle Verbindung zwischen PAD4 und den cytosolischen Untereinheiten der NADPH-Oxidase beschrieben haben.⁶⁷ Zhou et al. zeigten, dass PAD4 mit den Untereinheiten p47^{phox} und p67^{phox} interagiert und somit die Aktivierung des NADPH-Oxidasekomplexes unterbinden, was zu einer beeinträchtigten Abtötung phagozytierter Bakterien führe.⁶⁷ Die Diskrepanz zu unseren Daten könnte auf artspezifische Unterschiede zwischen murinen und humanen Neutrophile sprechen.⁷² Insgesamt legen unsere Ergebnisse jedoch nahe, dass PAD4 unter den hier verwendeten Bedingungen keine essentielle Rolle in der NOX2-vermittelten ROS-Generierung von murinen PMN spielt.

Neben der NOX2 stellt die mitochondriale ROS-Generierung ebenfalls einen relevanten Aspekt in dieser Arbeit dar. Die mitochondriale ROS-Bildung resultiert vor allem aus der Elektronenleckage an den Komplexen I und III der Atmungskette, kann aber auch durch flavinabhängige Enzyme wie das α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (KGDHC) und das Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC) beeinflusst werden (vgl. Kapitel 1.2.1).²⁵⁻³² Darüber hinaus stellt der Kalzium-induzierte Öffnungsmechanismus der mPTP eine weitere Quelle mitochondrialer ROS dar. Diese Öffnung wird durch erhöhte zytosolische Kalziumkonzentrationen ausgelöst, etwa infolge der Stimulation mit Kalzium-Ionophoren, und führt zur verstärkten Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus den Mitochondrien.^{25, 31, 32} Doughan et al. beschreiben in ihrer Studie, dass die NADPH-Oxidase die mitochondriale ROS-Produktion beeinflussen kann.⁷³ In der vorliegenden Arbeit ließ sich dieser Effekt jedoch nicht

nachweisen. Unsere Analysen zeigten, dass sowohl PMA als auch Ionomycin in beiden Genotypen eine signifikante Zunahme der mitochondrialen ROS-Produktion induzierten. Weder DPI noch Cl-Amidin hatten in diesem Zusammenhang einen hemmenden Effekt, was dafürspricht, dass die mitochondriale ROS-Bildung in PMN unabhängig von NOX2 und PAD4 erfolgt.

Wie bereits zuvor erwähnt geht der akute Myokardinfarkt mit einer ausgeprägten Bildung von ROS einher, die wesentlich zur Schädigung zellulärer Strukturen beitragen.^{9-11, 74, 75} Die peroxidative Modifikation membranständiger Lipide zählt dabei zu den zentralen Mechanismen oxidativer Zellschädigung.^{33, 34} MDA ist ein bekannter Surrogatparameter für Lipidperoxidation und wird in experimentellen und klinischen Studien zur Beurteilung oxidativer Gewebeschädigung herangezogen. Als Abbauprodukt mehrfach ungesättigter Fettsäuren entsteht MDA im Rahmen freier Radikalreaktionen mit Membranlipiden.^{33, 34, 35} Trotz seiner weiten Verbreitung unterliegt die Verwendung von MDA gewissen Limitationen. Dazu zählen unter anderem die begrenzte Spezifität gegenüber bestimmten Lipidperoxidationswegen, mögliche Interferenzen bei der photometrischen oder kolorimetrischen Quantifizierung (z. B. durch TBA-reaktive Substanzen), sowie Schwankungen in der Stabilität der Probe je nach Lagerung und Aufarbeitung. Zudem repräsentiert MDA lediglich einen Teilaspekt des komplexen oxidativen Geschehens und lässt keine direkte Aussage über die Intensität einer Inflamationsreaktion.⁷⁵ Dennoch bleibt MDA aufgrund seiner breiten Etablierung, der methodischen Standardisierbarkeit und der relativen Vergleichbarkeit zwischen Studien ein praktikabler und häufig eingesetzter Marker zur quantitativen Erfassung oxidativer Prozesse im Gewebe.^{33, 34, 35, 75} Ziel der vorliegenden Untersuchung war es Rückschlüsse auf eine mögliche funktionelle Beteiligung von PAD4 an oxidativen Stressmechanismen im Myokardparenchym zu ermöglichen. Hierzu wurde die MDA-Konzentration im infarzierten Myokardgewebe von Wildtyp- und PAD4^{-/-}-Mäusen an den postoperativen Tagen 1, 3 und 7 nach permanenter LAD-Ligatur bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Einbeziehung einer Sham-Kontrollgruppe zur Kontrolle der Thorakotomie. Die MDA-Messungen zeigten über alle Zeitpunkte hinweg eine Induktion der Lipidperoxidation infolge des Myokardinfarkts in beiden Genotypen. In der Wildtyp-Kohorte war die MDA-Konzentration in der LAD-Gruppe gegenüber der WT-Sham-Kontrollgruppe an den Tagen 1, 3 und 7 signifikant erhöht, was den erwarteten Anstieg oxidativen Stresses in der akuten postischämischen Phase widerspiegelt. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den PAD4^{-/-}-Mäusen eine geringere Lipidperoxidation im Vergleich zu den WT-Mäusen, was auf eine möglicherweise schwächere Entzündungsreaktion und einen reduzierten oxidativen Stress in dieser Gruppe schließen lässt. Diese in vivo Ergebnisse widersprechen jedoch den in vitro Beobachtungen, in denen gezeigt wurde, dass die ROS-Generierung unabhängig von PAD4 erfolgt. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte

darin liegen, dass PAD4^{-/-}-Mäuse nach einem Infarkt tendenziell eine kleinere Infarktgröße aufweisen, was wiederum mit einer geringeren Myokardzellschädigung und reduziertem Zelltod einhergeht. Studien von Du et al. stützen diese Annahme und zeigen, dass die Anwendung von PAD4-Inhibitoren zu einer signifikanten Verkleinerung der Infarktareale führen kann.⁷⁶ Weiterhin ist bei der Interpretation der in vivo Ergebnisse zu berücksichtigen, dass neben neutrophilen Granulozyten auch andere Zelltypen, insbesondere infiltrierende Makrophagen, zur Gesamt-ROS-Produktion beitragen können.⁷⁷⁻⁷⁹ Dieser Umstand stellt einen wesentlichen Unterschied zur in vitro Situation dar, in der ausschließlich isolierte PMN untersucht wurden, ohne Einflüsse anderer ROS-produzierender Zellen. In diesem Zusammenhang zeigten Holthaus et al., dass PAD4^{-/-}-Mäuse an Tag 3 und 7 nach Myokardinfarkt eine signifikant reduzierte Inflammation im Myokardparenchym aufwiesen, was mit einer verminderten Infiltration und Aktivierung von Makrophagen einhergeht.⁸⁰ Ein weiterer möglicher Faktor, der zur reduzierten Lipidperoxidation im Myokardgewebe der PAD4^{-/-}-Mäuse beigetragen haben könnte, ist eine generell geringere inflammatorische Reaktion der PMN. Dies deutet auf eine Limitation der vorliegenden Studie hin, da keine PMN aus den infarzierten WT- und PAD4^{-/-}-Mäusen isoliert wurden, um in vitro zu untersuchen, ob PAD4^{-/-}- und WT-PMN tatsächlich vergleichbare Mengen an ROS produzieren. Stattdessen wurde in dieser Arbeit lediglich die Gesamt-ROS-Produktion im Myokardgewebe über die Lipidperoxidation gemessen.

Eine weitere zentrale Funktion stellt die Bildung von NETs dar, die im Rahmen der in vitro Experimente genauer untersucht wurde.³⁸⁻⁴⁰ Die Untersuchung der Bildung von NETs nach Stimulation mit dem Kalziumionophor Ionomycin zeigte in WT-PMN eine signifikant verstärkte NETs-Bildung, die durch den Nachweis von citrulliniertem Histon H3 eindeutig bestätigt wurde. Diese Ergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle des kalziumabhängigen Enzyms PAD4 in der NETose. PAD4 katalysiert die Citrullinierung von Histon H3, was einen entscheidenden Schritt in der Dekondensation des Chromatins darstellt und somit die Freisetzung der NETs ermöglicht. Dieser Prozess der Chromatin-Dekondensation ist eine wesentliche Voraussetzung für die NETose und damit für eine relevante Funktion der PMN in der Immunabwehr.³⁸⁻⁴⁵ Die Rolle von PAD4 für die Bildung von NETs wurde bereits vielen Studien ausführlich beschrieben.^{38, 40, 44, 45, 51-55, 61}

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine relevante Reduktion der Ionomycin-induzierten NETs-Bildung in WT-PMN nach Vorbehandlung mit dem panPAD-Inhibitor Cl-Amidin sowie nach Vorbehandlung mit DPI. Diese Befunde weisen darauf hin, dass sowohl PAD4 als auch die NOX2 essenzielle Funktionen in der Regulation der NETose übernehmen. Die Western-Blot-Analysen bestätigen hierbei, dass citrulliniertes Histon H3 in den WT-PMN detektiert werden konnte, während es in den PAD4-defizienten Zellen erwartungsgemäß nicht

nachweisbar war. Die Rolle der NOX2 bei der NETs-Bildung wird unter anderem durch die Ergebnisse von Kirchner et al. gestützt, die zeigten, dass die Hemmung von NOX2 durch DPI in PMN gesunder Erwachsener zu einer signifikanten Reduktion der NET-Bildung führt.⁸¹

Im Gegensatz dazu demonstrierten Douda et al., dass eine durch Calcium-Ionophore wie A23187 oder Ionomycin induzierte NETose weitgehend unempfindlich gegenüber DPI ist und somit als weitgehend NOX2-unabhängig betrachtet werden kann.⁸² Diese Form der NET-Bildung beruht auf alternativen Signalwegen, die unter anderem einen Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels, die Aktivierung von SK3-Kanälen und die Bildung mitochondrialer ROS umfassen.⁸²

Diese Befunde verdeutlichen, dass NETose durch unterschiedliche Stimuli über variierende und teilweise überlappende molekulare Signalmechanismen ausgelöst werden kann.

Künftige Studien sollten die isolierte Analyse von neutrophilen Granulozyten nach Myokardinfarkt bei Wildtyp- und PAD4-defizienten Mäusen fokussieren, um den spezifischen Beitrag von PAD4 zur Regulation inflammatorischer Prozesse zu charakterisieren. Eine gezielte Untersuchung der ROS-Produktion sowie der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in PMN könnte Aufschluss darüber geben, ob die reduzierte Inflammation in PAD4^{-/-}-Mäusen primär auf eine verminderte PMN-Aktivierung oder auf eine veränderte Interaktion mit anderen Immunzellpopulationen zurückzuführen ist.

5.1. Bewertung der Hypothesen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei zentrale Hypothesen untersucht, die die Rolle von PAD4 in der ROS-Generierung, der ROS-abhängigen NETs-Bildung in PMN sowie der oxidativen Gewebeschädigung im infarzierten murinen Myokardparenchym.

Hypothese 1: PAD4 beeinflusst die ROS-Produktion in PMN.

Diese Fragestellung wurde durch die gezielte Stimulation von WT- und PAD4^{-/-}-PMN mit PMA und Ionomycin unter Anwendung der Inhibitoren Cl-Amidin und DPI analysiert. Die PMA-Stimulation führte in beiden Genotypen zu einer deutlichen ROS-Produktion, die durch Vorbehandlung mit dem Flavoprotein-Inhibitor DPI signifikant reduziert werden konnte. Dies bestätigt die Beteiligung von NOX2 als primärer ROS-Quelle in PMN, wie bereits durch Robinson et al. und Cross et al. beschrieben.^{68, 69} Die Hemmung von PAD4 durch Cl-Amidin hatte hingegen keinen nachweisbaren Effekt auf die ROS-Produktion – weder nach PMA- noch nach Ionomycin-Stimulation. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass PAD4 in den untersuchten Bedingungen **keine direkte regulatorische Funktion auf die NOX2-vermittelte ROS-Produktion in PMN ausübt**, womit Hypothese 1 **nicht gestützt** werden

kann. Auch ein möglicher Einfluss auf alternative ROS-Quellen, wie die mitochondriale ROS-Bildung, konnte nicht belegt werden, da sowohl DPI als auch Cl-Amidin in diesem Kontext keine Wirkung zeigten.

Hypothese 2: Die PAD4-abhängige Bildung von NETs ist unter anderem von der intrazellulären ROS-Produktion abhängig.

Diese Hypothese konnte im Rahmen der vorliegenden Experimente bestätigt werden. Die Stimulation mit Ionomycin induzierte in WT-PMN eine ausgeprägte NETs-Bildung, welche durch die Zunahme von citrulliniertem Histon H3 im Western Blot verifiziert wurde. Die Vorbehandlung mit Cl-Amidin führte zu einer signifikanten Reduktion der NETs-Bildung, was die Rolle von PAD4 für die Histonmodifikation und Chromatindekondensation unterstreicht. Zusätzlich zeigte die Hemmung der NOX2 durch DPI ebenfalls eine deutliche Reduktion der NETs-Generierung. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren Arbeiten von Wang et al. und Kirchner et al., die sowohl PAD4 als auch NOX2 als zentrale Regulatoren der NETose identifizierten.^{49, 81} Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen daher Hypothese 2 und belegen eine funktionelle **Abhängigkeit der PAD4-vermittelten NETs-Bildung von NOX2-abhängiger ROS-Produktion.**

Hypothese 3: PAD4^{-/-}-Mäuse weisen eine geringere Lipidperoxidation im infarzierten Myokardgewebe auf.

Die MDA-Messungen im infarzierten Herzgewebe von WT Mäusen zeigten über alle Zeitpunkte hinweg eine Induktion von oxidativem Stress infolge des Infarkts. In den infarzierten PAD4^{-/-}-Myokardparenchym war zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Zunahme der Lipidperoxidation im Vergleich zur Sham-Gruppe erkennbar.

Zu berücksichtigen ist, dass die hier bestimmte Lipidperoxidation **nicht zelltypspezifisch** ist. Im infarzierten Myokard tragen neben PMN auch Makrophagen, Kardiomyozyten und Endothelzellen zur ROS-Produktion bei. Die Diskrepanz zwischen den in vitro erzielten Ergebnissen – welche eine PAD4-unabhängige ROS-Generierung in PMN zeigten – und der deutlich reduzierten Lipidperoxidation in PAD4^{-/-}-Herzen könnte daher auf zelluläre Wechselwirkungen oder systemische Unterschiede in der Inflamationsantwort zurückzuführen sein. Die fehlende Isolierung von PMN aus dem infarzierten Myokard stellt in diesem Zusammenhang eine Limitation dar, da keine gezielte Analyse der ROS- und Zytokinantwort PAD4-defizienter PMN in vivo erfolgen konnte.

5.2. Fazit

Diese Dissertation untersucht die Rolle der PAD4 im Kontext des akuten Myokardinfarkts, mit Fokus auf ihre Beteiligung an der ROS-Generierung, NETs-Bildung und Lipidperoxidation. Es zeigte sich, dass PAD4 unter den gewählten in vitro Bedingungen keinen Einfluss auf die NOX2- oder mitochondrienvermittelte ROS-Produktion in PMN hat. Im Gegensatz dazu konnte die essentielle Funktion von PAD4 in der NETose durch Histon-Citrullinierung bestätigt werden, wobei eine Abhängigkeit von intrazellulärer ROS vorlag. In vivo Messungen zeigten eine tendenziell reduzierte Lipidperoxidation in PAD4^{-/-}-Mäusen. Die Ergebnisse belegen die zentrale Rolle von PAD4 in der Regulation der NET-Bildung, während der Einfluss des Enzyms auf oxidativen Stress im infarzierten Myokard weiterer Aufklärung bedarf.

6. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. Todesursachenstatistik in Deutschland. 2021 ed. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt 2023. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
2. Burke AP, Virmani R. Pathophysiology of acute myocardial infarction. *Medical Clinics of North America* 2007; 91(4): 553-72. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
3. Herold G. Innere Medizin. Köln: Selbstverlag; 2024.
4. Thygesen K. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *European Heart Journal*. Band: 40, Nummer: 3, 2018, doi: 10.1093/eurheartj/ehy462, p.237-269. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
5. Byrne RA, Rossello X, Coughlan J, et al. 2023 ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes: developed by the task force on the management of acute coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care* 2024; 13(1): 55-161. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
6. Vilahur G, Juan-Babot O, Peña E, Oñate B, Casaní L, Badimon L. Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2011; 50(3): 522-33. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
7. Kologrivova I, Shtatolkina M, Suslova T, Ryabov V. Cells of the immune system in cardiac remodeling: main players in resolution of inflammation and repair after myocardial infarction. *Frontiers in immunology* 2021; 12: 664457. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
8. van Hout GP, Arslan F, Pasterkamp G, Hoefer IE. Targeting danger-associated molecular patterns after myocardial infarction. *Expert opinion on therapeutic targets* 2016; 20(2): 223-39. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
9. Ong S-B, Hernández-Reséndiz S, Crespo-Avilan GE, et al. Inflammation following acute myocardial infarction: multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacology & therapeutics* 2018; 186: 73-87. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
10. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leucocyte Biology* 2007; 81(1): 1-5. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
11. Christia P, Frangogiannis NG. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *European journal of clinical investigation* 2013; 43(9): 986-95. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
12. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2019. S. 339.
13. Chen B, Frangogiannis NG. Chemokines in myocardial infarction. *Journal of cardiovascular translational research* 2021; 14(1): 35-52. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
14. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circulation research* 2004; 94(12): 1543-53. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
15. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circulation research* 2018; 122(6): 877-902. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
16. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Do Yoo Y. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Molecules and cells* 2011; 32(6): 491-509. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
17. Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1987; 84(5): 1404-7. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
18. Raedschelders K, Ansley DM, Chen DDY. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacology & Therapeutics* 2012; 133(2): 230-55. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
19. Murphy K, Weaver C. Janeway Immunologie. 9. Auflage. Berlin: Springer Spektrum; 2018.
20. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87(1): 245-313. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
21. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. Nox family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biology and Medicine* 2014; 76: 208-26. (Zuletzt

abgerufen am 25.05.2025)

- 22 Han C-H, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA, Lambeth JD. Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: identification of an activation domain in p67phox. *Journal of Biological Chemistry* 1998; **273**(27): 16663-8. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 23 Mutschler W, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M, eds. *Duale Reihe Biochemie*. 5. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2020.
- 24 Han C-H, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA, Lambeth JD. Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: identification of an activation domain in p67phox. *Journal of Biological Chemistry* 1998; **273**(27): 16663-8. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 25 Vorobjeva N, Galkin I, Pletjushkina O, et al. Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2020; **1866**(5): 165664. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 26 Sousa JS, D'Imprima E, Vonck J. Mitochondrial respiratory chain complexes. *Membrane protein complexes: structure and function* 2018: 167-227. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 27 Scialo F, Sriram A, Fernandez-Ayala D, et al. Mitochondrial ROS produced via reverse electron transport extend animal lifespan. *Cell metabolism* 2016; **23**(4): 725-34. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 28 Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry* 2004; **279**(47): 49064-73. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 29 Starkov AA. An update on the role of mitochondrial α -ketoglutarate dehydrogenase in oxidative stress. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2013; **55**: 13-6. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 30 Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, et al. Mitochondrial α -ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *Journal of Neuroscience* 2004; **24**(36): 7779-88. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 31 Bernardi P, Rasola A, Forte M, Lippe G. The mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology. *Physiological reviews* 2015; **95**(4): 1111-55. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 32 Vorobjeva N, Galkin I, Pletjushkina O, et al. Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2020; **1866**(5): 165664. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 33 Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications* 2017; **482**(3): 419-25. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 34 Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry* 2017; **524**: 13-30. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 35 Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *Journal of Leucocyte Biology* 1996; **59**(2): 229-40. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 36 Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *science* 2004; **303**(5663): 1532-5. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 37 Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *Journal of Leucocyte Biology* 1996; **59**(2): 229-40. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 38 Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *The Journal of Immunology* 2012; **189**(6): 2689-95. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 39 Adrover JM, Aroca-Crevillén A, Crainiciuc G, et al. Programmed 'disarming' of the neutrophil proteome reduces the magnitude of inflammation. *Nature immunology* 2020; **21**(2):

135-44. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

40 Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, Waterman CM. Cellular mechanisms of NETosis. Annual review of cell and developmental biology 2020; 36(1): 191-218. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

41 Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: preanalytical variables. Clinica Chimica Acta 2015; 450: 243-53. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

42 Marsman G, Zeerleder S, Luken BM. Extracellular histones, cell-free DNA, or nucleosomes: differences in immunostimulation. Cell death & disease 2016; 7(12): e2518-e. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

43 Yang H, Biermann MH, Brauner JM, Liu Y, Zhao Y, Herrmann M. New insights into neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in inflammation. Frontiers in immunology 2016; 7: 302. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

44 Tan C, Aziz M, Wang P. The vitals of NETs. *Journal of leukocyte biology* 2021; **110**(4): 797-808. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

45 Kenny EF, Herzig A, Krüger R, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife* 2017; **6**: e24437. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

46 Castanheira FV, Kubes P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. Blood, The Journal of the American Society of Hematology 2019; 133(20): 2178-85. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

47 Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. Nature chemical biology 2011; 7(2): 75-7. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

48 Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. Journal of cell biology 2010; 191(3): 677-91. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

49 Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, et al. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyl elimination. Science 2004; 306(5694): 279-83. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

50 Yousefi S, Mihalache C, Kozłowski E, Schmid I, Simon H-U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. Cell Death & Differentiation 2009; 16(11): 1438-44. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

51 Mondal S, Thompson PR. Protein arginine deiminases (PADs): biochemistry and chemical biology of protein citrullination. Accounts of chemical research 2019; 52(3): 818-32. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

52 Jones J, Causey C, Knuckley B, Slack-Noyes JL, Thompson PR. Protein arginine deiminase 4 (PAD4): Current understanding and future therapeutic potential. Current opinion in drug discovery & development 2009; 12(5): 616. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

53 Ranaivoson FM, Bande R, Cardaun I, et al. Crystal structure of human peptidylarginine deiminase type VI (PAD6) provides insights into its inactivity. IUCrJ 2024; 11(3): 395-404. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

54 Nakashima K, Hagiwara T, Ishigami A, et al. Molecular characterization of peptidylarginine deiminase in HL-60 cells induced by retinoic acid and 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3. Journal of Biological Chemistry 1999; 274(39): 27786-92. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

55 Arita K, Hashimoto H, Shimizu T, Nakashima K, Yamada M, Sato M. Structural basis for Ca²⁺-induced activation of human PAD4. Nature structural & molecular biology 2004; 11(8): 777-83. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

56 Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Puijn GJ. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. Bioessays 2003; 25(11): 1106-18. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

57 Liu X, Arfman T, Wichapong K, Reutelingsperger CPM, Voorberg J, Nicolaes GAF. PAD4 takes charge during neutrophil activation: Impact of PAD4 mediated NET formation on immune-mediated disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2021; **19**(7): 1607-17. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

58 Nakashima K, Hagiwara T, Yamada M. Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. Journal of Biological Chemistry 2002;

- 277(51): 49562-8. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 59 Luo Y, Arita K, Bhatia M, et al. Inhibitors and inactivators of protein arginine deiminase 4: functional and structural characterization. *Biochemistry* 2006; 45(39): 11727-36. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 60 Wind S, Beuerlein K, Eucker T, et al. Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. *British journal of pharmacology* 2010; 161(4): 885-98. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 61 Hoppenbrouwers T, Autar AS, Sultan AR, et al. In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. *PloS one* 2017; 12(5): e0176472. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 62 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: 1-13. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 63 Demyanets S, Stojkovic S, Mauracher LM, et al. Surrogate Markers of Neutrophil Extracellular Trap Formation are Associated with Ischemic Outcomes and Platelet Activation after Peripheral Angioplasty and Stenting. *J Clin Med* 2020; 9(2). (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 64 Czaikoski PG, Mota JMSC, Nascimento DC, et al. Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis. *PloS one* 2016; 11(2): e0148142. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 65 Azzouz D, Khan MA, Palaniyar N. ROS induces NETosis by oxidizing DNA and initiating DNA repair. *Cell Death Discovery* 2021; 7(1): 113. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 66 Amulic B, Hayes G. Neutrophil extracellular traps. *Current Biology* 2011; 21(9): R297-R8. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 67 Zhou Y, An L-L, Chaerkady R, et al. Evidence for a direct link between PAD4-mediated citrullination and the oxidative burst in human neutrophils. *Scientific reports* 2018; 8(1): 15228. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 68 Robinson JM, Badwey JA. The NADPH oxidase complex of phagocytic leukocytes: a biochemical and cytochemical view. *Histochemistry and cell biology* 1995; 103(3): 163-80. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 69 Cross AR, Segal AW. The NADPH oxidase of professional phagocytes—prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 2004; 1657(1): 1-22. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 70 Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* 2003; 5(14): 1317-27. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 71 Zoccarato F, Deana R, Cavallini L, Alexandre A. Generation of hydrogen peroxide by cerebral-cortex synaptosomes: Stimulation by ionomycin and plasma-membrane depolarization. *European journal of biochemistry* 1989; 180(2): 473-8. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 72 Nauseef WM. Human neutrophils ≠ murine neutrophils: Does it matter? *Immunological reviews* 2023; 314(1): 442-56. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 73 Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circulation research* 2008; 102(4): 488-96. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 74 Hori M, Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovascular research* 2009; 81(3): 457-64. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 75 Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine* 1990; 9(6): 515-40. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 76 Du M, Yang W, Schmult S, Gu J, Xue S. Inhibition of peptidyl arginine deiminase-4 protects against myocardial infarction induced cardiac dysfunction. *International Immunopharmacology* 2020; 78: 106055. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)
- 77 Finkel TH, Pabst MJ, Suzuki H, et al. Priming of neutrophils and macrophages for enhanced release of superoxide anion by the calcium ionophore ionomycin. Implications for regulation of the respiratory burst. *Journal of Biological Chemistry* 1987; 262(26): 12589-96.

(Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

78 Canton M, Sánchez-Rodríguez R, Spera I, et al. Reactive oxygen species in macrophages: sources and targets. *Frontiers in immunology* 2021; **12**: 734229. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

79 Morris G, Gevezova M, Sarafian V, Maes M. Redox regulation of the immune response. *Cellular & Molecular Immunology* 2022; **19**(10): 1079-101. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

80 Holthaus M, Xiong X, Eghbalzadeh K, et al. Loss of peptidylarginine deiminase 4 mitigates maladaptive cardiac remodeling after myocardial infarction through inhibition of inflammatory and profibrotic pathways. *Translational Research* 2025; **280**: 1-16. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

81 Kirchner T, Möller S, Klinger M, Solbach W, Laskay T, Behnen M. The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps. *Mediators of inflammation* 2012; **2012**(1): 849136. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

82 Douda DN, Khan MA, Grasemann H, Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015; **112**(9): 2817-22. (Zuletzt abgerufen am 25.05.2025)

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des PAD4-Enzyms	16
Abbildung 2: Bedeutung von PADs und NOX2 für die Bildung zellulärer ROS nach Stimulation mit PMA.....	31
Abbildung 3: Bedeutung von PADs und NOX2 für die Bildung zellulärer ROS nach Stimulation mit Ionomycin	32
Abbildung 4: Erfassung mitochondrialer ROS nach Stimulation von PMN mit PMA.	33
Abbildung 5: Erfassung mitochondrialer ROS nach Stimulation von PMN mit Ionomycin.....	34
Abbildung 6: Lipidperoxidation in murinem infarzierten Myokardparenchym.....	35
Abbildung 7: NETs-Erfassung in WT- und PAD4 ^{-/-} -PMN.	37

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien.....	18
Tabelle 2: Puffer und Lösungen.....	18
Tabelle 3: Antikörper	20
Tabelle 4: Proteinanalytik-Reagenzien und Marker.....	20
Tabelle 5: Kits.....	20
Tabelle 6: Zellkulturmedien	20
Tabelle 7: Stimulatoren und Inhibitoren.....	20
Tabelle 8: Fluoreszenzbasierte Nachweisreagenzien	21
Tabelle 9: Geräte und Zubehör.....	21
Tabelle 10: Laborutensilien	21
Tabelle 11: Software.....	22
Tabelle 12: Standard-Konzentrationsreihe aus der Anwendungsanleitung des TBARS- (Trichloroacetic Acid (TCA) Method)-Assay-Kits (Cayman Chemical®).	25
Tabelle 13: Standard-Konzentrationsreihe aus BSA nach dem Protokoll des Pierce™ -BCA-Protein-Assay-Kits (ThermoFischer scientific®).....	27
Tabelle 14: Zusammensetzung der Gelphasen für SDS-Page.....	27