

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

***Einfluss der Neutrophil Extracellular Traps
(NETs)-Aktivität auf die Funktionalität und Vitalität
des Myokards nach einem Myokardinfarkt im
PAD4^{-/-}-Mausmodell***

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

vorgelegt von
Leena Georgi
aus Düsseldorf

promoviert am 28. Juli 2026

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

1. Gutachterin: Professorin Dr. rer. nat. A. Paunel-Görgülü
2. Gutachter: Privatdozent Dr. rer. nat. M. Mollenhauer

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.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht 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 Operationen an den Versuchstieren wurden durch Herrn PD Dr. med. Kaveh Eghbalzadeh mit meiner Assistenz durchgeführt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Prof. Dr. rer. nat. Adnana Paunel-Görgülü, Herrn Dr. med. Simon Grimm und Herrn Dr. med. Senai Bokredenghel von mir selbstständig ausgeführt worden. Hierbei erhielt ich zeitweise Unterstützung durch die medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Natalia Mierau und Frau Sabine Schmitt.

Der Multiplex Immunassay wurde als einzige Ausnahme durch Frau Prof. Dr. rer. nat. Adnana Paunel-Görgülü mit der Assistenz der medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Natalia Mierau und Frau Sabine Schmitt durchgeführt und der Datensatz wurde mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Auswertung der Daten erfolgte durch mich unter vorheriger Anleitung durch Frau Prof. Dr. rer. nat. Adnana Paunel-Görgülü.

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 01.02.2026

Unterschrift:

Danksagung

Ich möchte meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Adnana Paunel-Görgülü besonders für ihre überdurchschnittlich engagierte Betreuung danken. Es gibt keine Doktorand*innen in meinem Umfeld, die ähnlich viel fachliche und menschliche Unterstützung durch ihre Betreuungspersonen erhielten.

Als nächstes möchte ich Dr. Kaveh Eghbalzadeh danken: Einerseits für sein hohes Engagement während des Projekts sowie für die vielen fachlich, beruflich und persönlich bereichernden Gespräche, die wir führten. Auch über das Projekt hinaus bin ich für seine bedingungslose und außerordentliche Förderung dankbar. Ich bedanke mich bei Kaveh für seinen Beistand in herausfordernden Situationen und klare Worte sowie Mut im richtigen Moment.

Natalie Mierau und Sabine Schmitt möchte ich für das Teilen ihrer Laborerfahrung sowie ihre saubere, zuverlässige und ordentliche Arbeit danken. Jederzeit standen sie mir mit Rat und Tat zur Seite, wenn es nötig war und hatten immer ein offenes Ohr für eine Frage.

Als nächstes möchte ich dem Labor der Kardiologie der Uniklinik Köln, insbesondere der AG Mollenhauer unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Martin Mollenhauer, für das Zurverfügungstellen des Ultraschallgeräts danken. Des Weiteren danke ich Dr. Senai Bokredenghel und Martin Grimm für ihre geduldige Anleitung.

Außerdem danke ich Tina Teubner und Ben Süverkrüp für ihre ausdauernde, liebevolle und aufopferungsvolle Begleitung und Unterstützung in allen beruflichen und persönlichen belangen.

Zuletzt möchte ich meinem Mann Ben und meinem Sohn Eli Ocko Omar für ihre Unterstützung danken. Durch sie wurde das Wochenbett zur perfekten Gelegenheit eine Dissertationsschrift zu verfassen.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	10
2. EINLEITUNG	11
2.1 Relevanz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland	11
2.1.1. Was passiert nach dem MI?	12
2.2 Pathophysiologie des MI und kardiales Remodeling	13
2.2.1. Der MI: Definition, Diagnostik und Behandlung	13
2.2.2. Ischämische Gewebsschädigung des Myokards	14
2.2.3. Kardiales Remodeling	14
(1) Inflamationsphase	15
(2) Proliferative Phase	16
(3) Reifungsphase	17
2.2.4. Der Ursprung der NETs: PMNs und ihr Auftreten nach dem MI	19
2.2.5. NETs	20
(1) Lytische NETose	20
(2) Vitale NETose	23
2.2.6. PAD4	24
2.3 Ziel der Arbeit	27
3. MATERIAL UND METHODEN	28
3.1 Material	28
3.1.1. Mäuse	28
3.1.2. Materialien und Reagenzien	28
3.1.3. Geräte und Software	30
3.1.4. Medikamente und Verbrauchsmaterial	31
3.1.5. Verwendete Lösungen	34
3.2 Methoden	36
3.2.1. Versuchsaufbau	36
3.2.2. Operative Maßnahmen	37
(1) Anästhesie	37
(2) Myokardinfarkt-Modell durch permanente LAD-Ligatur	39
3.2.3. Postoperative kardiale Untersuchungen	40

(1)	Transthorakale Echokardiographie	40
(2)	Kardiale Punktion	43
(3)	Infarktquantifizierung mittels Triphenyltetrazoliumchlorid Färbung	44
3.2.4.	Post-MI Plasmaanalysen	44
(1)	Quantifizierung zellfreier DNA	44
(2)	Quantifizierung von Zytokinen	45
(3)	Quantifizierung von kardialem Troponin T	45
3.2.5.	Versuche an nativen murinen PMNs	46
(1)	PMN-Isolation aus dem Knochenmark mittels Dichtegradientenzentrifugation	46
(2)	Bestimmung der Zellzahl	47
(3)	Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-D-Lysin	47
(4)	Stimulation der NET-Freisetzung aus PMN mit PMA oder Ionomycin	47
(5)	Nachweis der NET-Freisetzung durch Immunfluoreszenz	48
3.3	Statistik	48
4.	ERGEBNISSE	49
4.1	PMNs von PAD4 ^{-/-} -Mäusen bilden keine NETs <i>in vitro</i>	49
4.2	PAD4 ^{-/-} -Mäuse erleiden verstärkten myokardialen Schaden nach MI	52
4.3	PAD4 ^{-/-} -Mäuse zeigen eine verstärkte akute inflammatorische Immunantwort nach MI	55
4.4	Die Kontraktionsfähigkeit des Myokards ist bei WT- und PAD4 ^{-/-} -Mäuse nach Induktion eines MI reduziert	58
4.5	Die Ventrikelwand der WT-Mäuse dünnt nach MI stärker aus	60
4.6	PAD4 ^{-/-} -Mäuse zeigten eine langfristig bessere kardiale Funktion nach MI	61
4.7	PAD4 ^{-/-} -Mäuse zeigten einen abgeschwächten klinischen Verlauf nach MI	65
5.	DISKUSSION	68
5.1	PAD4 reduziert die Inflammation und verbessert das Überleben in der akuten Phase nach MI	68
5.2	Der PAD4 ^{-/-} -Genotyp wirkt langfristig protektiv auf die kardiale Funktion	71
5.3	Zusammenfassung	72
5.4	Limitationen	73

5.5	Ausblick	74
6.	LITERATURVERZEICHNIS	76
7.	ANHANG	87
7.1	Abbildungsverzeichnis	87
7.2	Tabellenverzeichnis	88
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	89

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
AZV	Atemzugvolumen
BL	Baseline
Ca ²⁺	Calcium
CR	Complementrezeptoren
cfDNA	zellfreie Desoxyribonucleinsäure
citH3	citrulliniertes Histon 3
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
cTNT	kardiales Troponin
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonucleinsäure
DAMP	Schadenassoziiertes molekulares Muster
DAPI	4',6'-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d1	Versuchstag 1
d3	Versuchstag 3
d21	Versuchstag 21
HDAC	Histondeacetylase
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDV	Enddiastolisches Volumen
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ESV	Endsystolisches Volumen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kalbsserum
FcR	Fc-Rezeptoren
G	Gauge
x g	x-faches der Erdbeschleunigung
g	Gramm
HBSS	Hank's balancierte Salzlösung
HBSS prep	Hank's-balancierte-Salzlösung-Präparationslösung
HI	Herzinsuffizienz
HZV	Herzzeitvolumen
IE	internationale Einheit
IFN- γ	Interferon γ

IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
ING4	<i>Inhibitor of Growth Protein 4</i>
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LAD	<i>Left Anterior Descending</i> , auch <i>Ramus interventricularis anterior</i>
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVPW	Dicke der linken Herzhinterwand
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monozytenattraktionsprotein 1
mg	Milligramm
MI	Myokardinfarkt
ml	Milliliter
min	Minute
mm	Millimeter
mtDNA	mitochondriale DNA
mtROS	mitochondriale ROS
MPO	Myeloperoxidase
NE	Neutrophile Elastase
NET	Neutrophile extrazelluläre Falle
NF- κ B	Nuklearer Faktor κ B
ng	Nanogramm
NPM1	Nucleophosmin 1
OP	Operation
PAD4	Peptidylarginin-Deiminase Typ 4
PAD4 ^{-/-}	Peptidylarginin-Deiminase Typ 4 Knockout
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pg	Picogramm
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PRR	Mustererkennender Rezeptor
rpm	Umdrehungen pro Minute

P/S	Penicillin und Streptomycin
RFU	relative Fluoreszenzeinheit
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Sham	Kontrollgruppe
SV	Schlagvolumen
Syk	Milztyrosinkinase
TGF- β	Tumorstromungsfaktor β
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
TTE	Transthorakale Echokardiographie
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WT	Wildtyp
μm	Mikrometer
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

1. Zusammenfassung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems stellen die häufigste Todesursache in Deutschland dar. Im Jahr 2024 starben fast 360.000 Menschen an ihren Folgen, darunter circa 41.000 an einem Myokardinfarkt (MI). Doch auch wenn der MI überlebt wird, treten im Verlauf Komplikationen auf, die die Lebensqualität und das Überleben der Patient*innen mindern. Dazu gehört die chronische Herzinsuffizienz (HI). Seit 1935 ist bekannt, dass die Auswirkungen des MI über das unmittelbare Absterben der Kardiomyozyten bei Hypoxie hinausgehen. Jeder MI zieht ein kardiales Remodeling, als Heilungsprozess, nach sich, welches sich über mehrere Monate erstrecken kann und von pro- und antiinflammatorischen Signalen beeinflusst wird. Die Entwicklung einer chronischen HI ist eine Konsequenz des kardialen Remodelings post-MI. Zu den Einflussfaktoren des kardialen Remodelings zählen polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN), die durch Peptidylarginin-Deiminase-Typ-4-abhängige (PAD4) Bildung von Neutrophilen extrazellulären Fallen (NETs) die Inflammation beeinflussen. Bis zum heutigen Tag ist jedoch die genaue Rolle der NETs und PAD4 im kardialen Remodeling nicht bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war, es den Einfluss der NETs auf das post-MI-Remodeling und die Entstehung der chronischen HI nach MI zu untersuchen. Dazu wurde in einem PAD4-Knockout (PAD4^{-/-})-Mausmodell, die NETose unterdrückt und ein MI induziert. Nach 1, 3 und 21 Tagen wurde die Herzfunktion durch transthorakale Echokardiographie (TTE) und die Quantifizierung von Zytokinen im Serum untersucht, außerdem wurde der klinische Verlauf und die Größe des Infarktes quantifiziert. PAD4^{-/-}-Mäuse erlitten in der akuten Phase größere funktionelle myokardiale Schäden, waren einer stärkeren proinflammatorischen Reaktion ausgesetzt und hatten ein größeres Risiko in den ersten sieben Tagen nach MI zu versterben. Im Langzeitverlauf profitierten die PAD4^{-/-}-Mäuse jedoch von dem Knockout und hatten nach 21 Tagen geringere enddiastolische Volumina (EDV) und höhere Ejektionsfraktionen (EF), als die WT-Mäuse. Nach dem siebten Tag post-MI verstarben keine Tiere der PAD4^{-/-}-Gruppe mehr in diesem Versuch. Die zentrale Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass die Rolle von PAD4 im post-MI-Remodeling stark zeitabhängig ist: Der PAD4^{-/-}-Genotyp verschlechtert das Überleben und die kardiale Funktion in der akuten Phase nach MI und wirkt in der subakuten Phase protektiv. Im Kontext der aktuellen Forschung ergaben sich Indizien dafür, dass diese Rolle primär mit der Wirkung von PAD4 auf kardiale Myofibroblasten assoziiert ist. So bleiben weitere Versuche notwendig, um die Rolle von PAD4 im post-MI-Remodeling von der von NETs zu differenzieren.

2. Einleitung

2.1 Relevanz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland

Im Jahr 2024 starben fast 340.000 Menschen in Deutschland an den Folgen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Damit sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen ein weiteres Jahr in Folge die häufigste Todesursache in Deutschland.¹ 70.720 Opfer erlagen der ischämischen Herzkrankheit und 41.258 entfielen auf akute und rezidivierende Myokardinfarkte (MI).² So bilden akute und chronische myokardiale Durchblutungsstörungen circa ein Drittel der tödlich verlaufenden Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Außerdem starben 37.633 Menschen an einer Herzinsuffizienz (HI), die oft im Zusammenhang mit MIs und der ischämischen Herzkrankheit auftritt.² Denn 20-30 % der Patient*innen, die mit einem akuten MI hospitalisiert werden, entwickeln im Laufe des ersten Jahres eine HI, welche ihrerseits zum Tod führen und die Lebensqualität massiv einschränken kann.³⁻⁵ Von diesem Risiko sind besonders Patient*innen betroffen, die einen Vorderwandinfarkt erleiden, bei dem typischerweise der *Ramus interventricularis anterior* (LAD) betroffen ist.^{6,7} Zusammengenommen bildeten die chronische ischämische Herzkrankheit, akute MIs und HIs knapp 50 % der durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen bedingten Todesfälle im Jahr 2024 und somit einen relevanten Anteil der Todesursachen in Deutschland (siehe Abbildung 1). Die hohe Zahl an Betroffenen unterstreichen die Notwendigkeit, die Versorgungsstrategien ischämischer Herzerkrankungen zu verbessern, wofür weitere mechanistische Forschung notwendig ist.

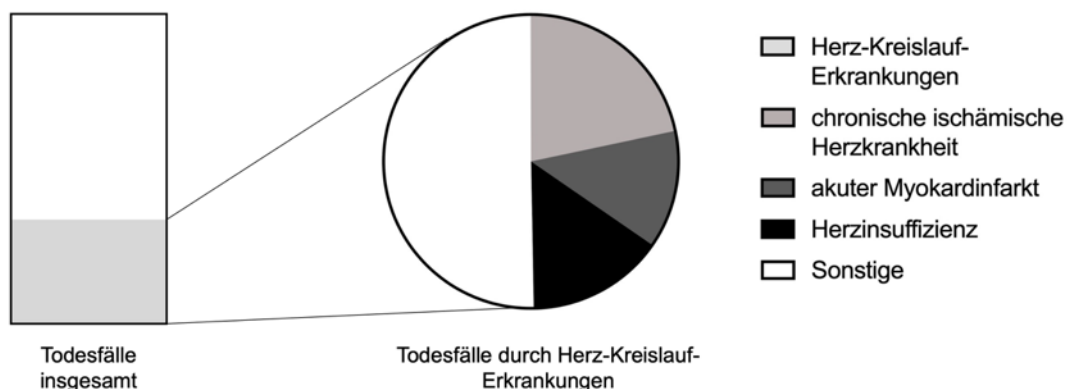


Abbildung 1: Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland 2024

Vereinfachte Darstellung der Aufschlüsselung durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachten Todesfälle in Deutschland im Jahr 2024

Quelle: Eigene Darstellung basierend auf Daten des Statistischen Bundesamtes^{1,2}

2.1.1. Was passiert nach dem MI?

Seit Tennant und Wiggers 1935 erstmals beschrieben, dass nach einem MI Veränderungen der Kontraktilität und Funktionalität des Myokards auftreten, ist dies Gegenstand der Forschung.⁸ Die Beobachtung einer Dilatation, Narbenbildung und Veränderungen der Kontraktionsgeometrie des betroffenen Ventrikels wurde durch Hochman und Bulkley 1982 als kardiales Remodeling benannt. Sie zogen den Schluss, dass diese Veränderungen durch Heilungsprozesse nach dem MI entstehen.⁹ Diese Heilungsprozesse werden von diversen Entzündungsprozessen begleitet und beeinflusst.^{8,10} Dazu zählt unter anderem auch die Gewebsinfiltration durch polymorphkernige Neutrophile Granulozyten (PMNs). Sind die PMNs im Zielgewebe angekommen, bilden sie Neutrophile extrazelluläre Fallen (NETs) aus. NETs bestehen aus extrazellulärer dekondensierter Desoxyribonukleinsäure (DNA) und angelagerten Proteinen, die Pathogene unschädlich machen können.¹¹ NETs können Entzündungsprozesse regulieren. Gleichzeitig haben sie zytotoxische Eigenschaften, können Gewebe schädigen und sind dadurch in der Pathophysiologie unterschiedlicher Erkrankungen aufgefallen.¹² Es wurde beispielsweise festgestellt, dass NETs Bestandteil von Thromben sind und eine treibende Rolle bei ihrer Bildung spielen können.¹³ Aber auch die Entstehung und das Bestehen chronisch entzündlicher Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis oder Multiplen Sklerose werden mit NETs in Zusammenhang gebracht.¹⁴ Obwohl es Hinweise gibt, dass NETs, durch ihre Beteiligung am Remodeling, eine entscheidende Rolle für das klinische Outcome nach einem MI haben können, ist das Ausmaß ihres Einflusses und der zugrundeliegende Mechanismus nicht vollständig verstanden.¹⁵ 2010 zeigten Li et al. im PAD4-Knockout (PAD4^{-/-})-Mausmodell, dass das Enzym Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) für die NETs-Bildung, ausgelöst durch unterschiedliche Stimuli, entscheidend ist.¹⁶ PAD4 citrulliniert Argininreste an Histon 3, wodurch die DNA dekondensiert und im Rahmen der NETose zugänglich wird. Darüber hinaus beeinflusst PAD4 durch diese posttranslationale Modifikation die Expression verschiedener Signalmoleküle. PAD4 wurde auch im Kontext verschiedener Erkrankungen, wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs, dokumentiert.¹⁷

Es ist davon auszugehen, dass NETs und PAD4 auch im kardialen Remodeling nach MIs eine große Bedeutung haben und neue Erkenntnisse, die ihre Mechanismen spezifizieren, der Behandlung kardial erkrankter Patient*innen dienen können. Neues Wissen über die komplexen Interaktionen im Post-MI-Geschehen kann zur Entdeckung neuer therapeutischer Ziele führen, die die Lebensqualität sowie das Überleben von Patient*innen positiv beeinflussen können. Es gilt zunächst den aktuellen Stand der Forschung betreffend MIs, kardialen Remodeling und dem Einfluss des Immunsystems auf das kardiale Remodeling, mit besonderem Augenmerk auf NETs und PAD4, detailliert zu erheben.

2.2 Pathophysiologie des MI und kardiales Remodeling

2.2.1. Der MI: Definition, Diagnostik und Behandlung

Als akuter MI wird eine plötzlich auftretende, ischämisch bedingte Schädigung der Herzmuskelzellen bezeichnet. Der MI kann je nach Ursache der Ischämie klassifiziert werden.¹⁸ Als häufigster Grund gilt die Ruptur oder Erosion von Plaques in Koronararterien und die darauffolgende Thrombusbildung. Der Thrombus, der sich auf dem rupturierten Plaque bildet, engt das Lumen der Koronararterie so ein, dass Teile des Myokards nicht mehr ausreichend durchblutet und somit hypoxisch werden.^{19,20} Wenn dieser Zustand bestehen bleibt, beginnen Myokardzellen durch verschiedene Zelltodprogramme, wie beispielsweise Apoptose, Nekrose und Nekroptose, abzusterben.^{18,21} Besonders im Rahmen der Nekrose und Nekroptose werden dabei proinflammatorische Mediatoren, wie *damage associated molecular patterns* (DAMPs) freigesetzt, die das Immunsystem aktivieren (siehe Abbildung 2).²²

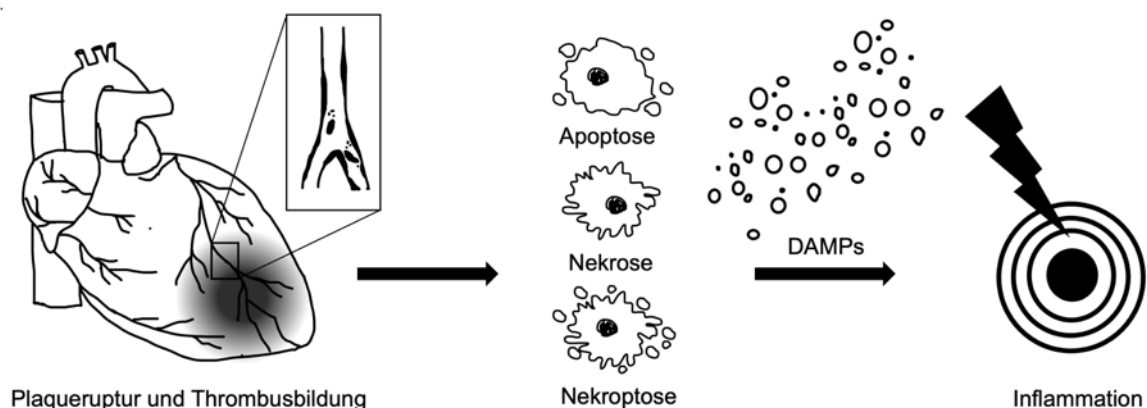


Abbildung 2: Aktivierung des Immunsystems nach MI

Nachdem ein Verschluss der Koronararterien zum Zelltod führt, werden proinflammatorische Mediatoren ausgeschüttet, die zur Immunreaktion führen.

Quelle: Eigene Darstellung

In der Behandlung von MIs steht eine zügige Diagnose und anschließende Wiedereröffnung der Gefäße im Mittelpunkt der Akutversorgung.²³ Hierzu wird der klinische Verdacht durch kardiale Biomarker im Blut bestätigt: Wenn das kardiale Troponin (cTNT) über die 99. Perzentile der oberen Referenzgrenze ansteigt, liegt eine Myokardschädigung vor. Diese wird durch einen Konzentrationsabfall oder -anstieg des cTNT als akut eingestuft und die Therapie des MIs kann erfolgen.^{18,24} Aufgrund des schnellen Zugangs zur perkutanen Koronarintervention, kann eine Reperfusion des betroffenen Myokards erreicht und der Schaden des Herzens oft begrenzt werden.^{5,23,25} Die breit zugängliche Behandlung führt zu

einer gestiegenen Überlebenschance der Patient*innen. Allerdings geht das wahrscheinlichere Überleben eines MI mit vermehrten Komplikationen im Langzeitverlauf einher: Die Entwicklung einer HI nach einem MI betrifft im ersten Jahr circa 30 % der Patient*innen.³⁻⁵ Eine HI ist die symptomatische Unfähigkeit des Herzens, ausreichend Blut zu befördern, damit der Körper mit Sauerstoff und anderen Nährstoffen versorgt ist. Dies kann akut im Rahmen eines MIs auftreten oder andauernd im Rahmen einer chronischen HI.²⁶ Obwohl die chronische HI in den letzten Jahren früher erkannt und stetig besser behandelt werden kann, fordert sie geringfügig mehr Todesopfer.²⁷ Hier zeigt sich ein großes Potential den Postinfarktverlauf durch Medikamente oder Interventionen so zu beeinflussen, dass die Lebensqualität und die Prognose der Patient*innen verbessert wird.²⁸

2.2.2. Ischämische Gewebsschädigung des Myokards

Der Untergang der Myokardzellen betrifft zunächst die Zellen, die durch das verschlossene Gefäß versorgt werden. Das restliche Myokard wird von anderen Arterien weiterhin mit Blut versorgt und bleibt intakt. Es gibt jedoch eine Grenzzone zwischen den betroffenen und nicht betroffenen Zellen, in der über das Überleben der Kardiomyozyten nicht unmittelbar entschieden ist. In dieser Grenzzone zwischen versorgten und hypoxischen Kardiomyozyten bildet sich ein Sauerstoffgradient und die Kardiomyozyten in diesem Bereich unterscheiden sich in ihrer Vitalität.^{29,30} Besonders in der Grenzzone finden Entzündungsprozesse statt, die zum Zelltod der Kardiomyozyten führen können und damit die Größe des MIs beeinflussen. Die Inflammation moduliert auch die Vernarbung des Gewebes, wodurch die Kontraktilität des Myokards beeinträchtigt werden kann.²⁹

2.2.3. Kardiales Remodeling

Kardiales Remodeling beschreibt die strukturellen Umbauprozesse des Herzens nach kardialer Schädigung. Die Veränderungen des Myokards erfolgen auf zellulärer, interstitieller, expressiver und molekularer Ebene und führen zur Veränderung von Größe, Form und Leistungsfähigkeit des Herzens. Kardiales Remodeling wird sowohl durch akute Schädigungen, wie sie beim MI auftreten als auch durch chronische Herzschädigungen, wie sie bei chronischen HIs bestehen, ausgelöst.³¹ So beginnt das kardiale Remodeling mit dem akuten MI und kann darüber hinaus mehrere Monate andauern.^{31,32} Das kardiale Remodeling involviert verschiedene Zelltypen und Prozesse: Neben Zytokinen, Kardiomyozyten und Immunzellen, wie Makrophagen, beeinflussen auch externe Faktoren, wie die Myokardischämie selbst, oder eine prolongierte mechanische Belastung des Herzens den Ablauf des Remodelings.^{31,33} Nachfolgend werden die drei Phasen des kardialen

Remodelings, die Inflammationsphase, die proliferative Phase und die Reifungsphase, detailliert beleuchtet³⁴

(1) Inflammationsphase

Das kardiale Remodeling beginnt mit dem Myokardschaden. Dem hypoxischen Schaden folgt die Freisetzung von DAMPs, die an verschiedene Rezeptoren binden und zur Initiierung der Immunantwort führen.^{4,35} Die Immunreaktion ist zwar notwendig, um das Gewebe von apoptotischen und nekrotischen Zellen zu befreien, kann allerdings auch ihrerseits gewebsschädigende Effekte haben und zum Untergang von Kardiomyozyten führen.³⁵ Die durch den MI freigesetzten DAMPs binden an mustererkennende Rezeptoren (PRRs) überlebender Zellen des Myokards und aktivieren diese. PRRs befinden sich auf der Zelloberfläche unterschiedlichster Zellen, dazu gehören auch Kardiomyozyten und Leukozyten, wie Makrophagen und PMNs.³⁶ Makrophagen können in proinflammatorische M1-Makrophagen und antiinflammatorische M2-Makrophagen unterteilt werden. Die Polarisierung der Makrophagen wird durch den Kontakt mit T1-Helferzellen und proinflammatorischen Zytokinen, wie beispielsweise Interleukin 6 (IL-6), Tumornekrose Faktor α (TNF- α), bakteriellen Lipopolysacchariden oder antiinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel Interleukin 10 (IL-10), induziert.³⁷ In der frühen proinflammatorischen Phase werden durch die Bindung der DAMPs an PRRs intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert. Über bekannte intrazelluläre Signalmoleküle, wie den Nuklearen Faktor κ B (NF- κ B) und die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), erfolgt die Signaltransduktion und folglich werden proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet. Dazu zählen unter anderem IL-6 und der TNF- α .³⁸ Zusätzlich werden Chemokine freigesetzt, die zur Migration von Leukozyten, wie PMNs und Monozyten, in das infarzierte Gewebe führen.³⁶ Die rekrutierten Monozyten, Makrophagen und PMNs bauen nekrotische Zellen und extrazelluläre Matrix (ECM) ab und sezernieren ihrerseits proinflammatorische Mediatoren.⁴ PMNs migrieren als erster rekrutierter Zelltyp ins Infarktareal. Durch ihre Aktivierung werden intrazelluläre Granula freigesetzt. Verschiedene Entzündungsmediatoren, Proteasen, wie die Neutrophile Elastase (NE), Enzyme, wie die Myeloperoxidase (MPO) und radikale Sauerstoffspezies (ROS) werden ausgeschüttet. Zusätzlich bilden PMNs auch im Infarktgeschehen NETs.³⁹ Die, durch die PMNs sezernierten, Mediatoren verstärken die lokale Inflammation, wodurch die Rekrutierung von Monozyten und die Differenzierung zu M1-Makrophagen gefördert wird. M1-Makrophagen sind wiederum an der Degradierung der ECM beteiligt.^{40,41} Die proinflammatorische Reaktion erreicht im Mausmodell ein bis drei Tage nach MI ihren Höhepunkt und ist gefolgt von der Transition zu einer antiinflammatorischen Reaktion.^{42,43}

(2) Proliferative Phase

Nach einigen Tagen verändert sich die Qualität der Immunantwort und im Myokard befinden sich vermehrt antiinflammatorische Zellen und Moleküle.^{34,44} M2-Makrophagen sezernieren IL-10 und Tumorstromafaktor- β (TGF- β) und stimulieren die Myokardreparatur. Zudem infiltrieren dendritische Zellen, regulatorische T-Lymphozyten und Myofibroblasten das Ischämiegebiet (siehe Abbildung 3).^{37,45} Dendritische Zellen befinden sich in nahezu allen peripheren Geweben, phagozytieren Umgebungsbestandteile und präsentieren diese Antigene auf ihrer Zelloberfläche.^{46,47} So können unter anderem regulatorische T-Lymphozyten aktiviert werden. Sie produzieren IL-10, unterdrücken die Inflammation und unterstützen die Polarisierung von M2-Makrophagen.³⁶ Myofibroblasten sind differenzierte kardiale Fibroblasten, die durch TGF- β und inflammatorische Signale, wie IL-6 aktiviert werden. Sie sezernieren ECM Bestandteile, wie Kollagen, und bilden kontraktile Proteine, wie α -Smooth Muscle Actin.^{34,42,48} Besonders in der Grenzzone differenzieren Fibroblasten zu Myofibroblasten und sind an der Bildung von Granulationsgewebe beteiligt.^{36,42} Eine übermäßige Fibroblastenaktivierung kann zu Kollagenablagerungen führen, die eine diastolische Dysfunktion begünstigen.⁴⁸ Zunächst wird ein ECM-Netz aus Fibrin und Fibronectin gebildet, welches als provisorisches Gerüst fungiert. Außerdem sind matrizelluläre Proteine im Infarktgewebe vorhanden. Diese erfüllen keine mechanische Funktion, sondern modulieren die inflammatorische Reaktion des kardialen Remodelings durch Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden.⁴⁹ Ein weiteres Kennzeichen dieser Phase ist die Ausbildung neuer Gefäße, getriggert durch den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF).⁵⁰ Insgesamt beansprucht die proliferative Phase circa 10 Tage.⁵¹

Leukozyten können kontextabhängig eine pro- oder antiinflammatorische Rolle in der Myokardreparatur spielen. Dies hängt von verschiedenen Faktoren in der Dynamik des Inflamationsprozesses ab.⁵²

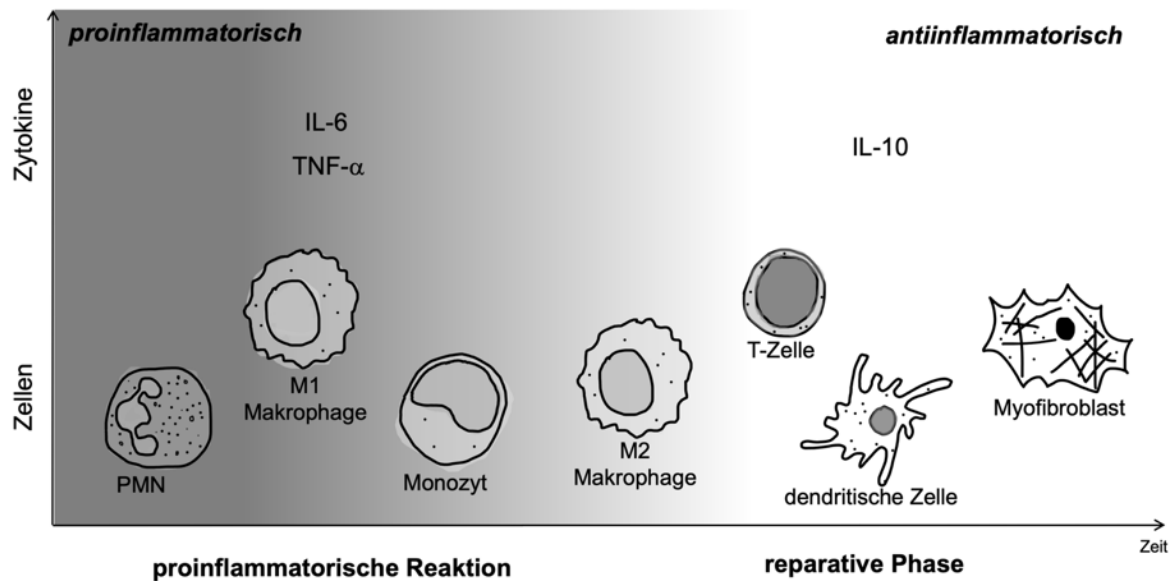


Abbildung 3: Leukozyten und Zytokine im Infarktgewebe nach MI

Im Verlauf der Zeit sind verschiedene Immunzellen und Zytokine im MI-Gewebe vorherrschend. Die initiale proinflammatorische Reaktion wird durch IL-6 und TNF- α vermittelt und PMNs, M1-Makrophagen und Monozyten dominieren im Infarktgewebe. Die antiinflammatorische Reaktion wird durch IL-10 induziert und es zeigen sich vermehrt M2-Makrophagen, T-Zellen, dendritische Zellen und Myofibroblasten im Gewebe.

Quelle: Eigene Darstellung nach Pluijmert et al.⁴⁵

(3) Reifungsphase

Bis die Reifungsphase, und damit das kardiale Remodeling vollständig abgeschlossen ist, können Wochen bis Monate vergehen.⁵³ Während der Narbenreifung nimmt die Zahl an Immunzellen und Myofibroblasten im Myokard infolge von Apoptose weiter ab und extrazelluläre Proteine werden abgebaut. Antifibrotische Signale terminieren die Syntheseleistung der Myofibroblasten und einige Myofibroblasten gehen in einen Ruhezustand über, bezeichnet als Matrifibrozyten, über.^{49,54} Kollagenmoleküle der ECM werden quervernetzt und stabilisieren somit die Herzstruktur.⁵⁴ Neu ausgebildete Blutgefäße gehen zurück.⁵⁵ Die verbleibende Herzfunktion nach dem Remodeling hängt von einem sensiblen Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der ECM-Bestandteile im Myokard ab.⁵³ Auch wenn es sich zunächst um einen physiologischen Prozess handelt, der die Leistungsfähigkeit des Herzens wiederherstellen soll, konnte festgestellt werden, dass maladaptives oder auch prolongiertes Remodeling an der Pathophysiologie verschiedener kardialer Erkrankungen beteiligt ist.⁵⁶ Ein verstärkter Abbau der ECM kann beispielsweise zur Ausdünnung der Myokardwand führen und somit die Dilatation des linken Ventrikels oder eine Ruptur begünstigen. Wird zu viel ECM synthetisiert, kann es zu einer verminderten Myokardmotilität

kommen, die mit einer diastolischen Dysfunktion einhergehen und die Entstehung einer chronische HI begünstigen kann (siehe Abbildung 4).^{57,58}

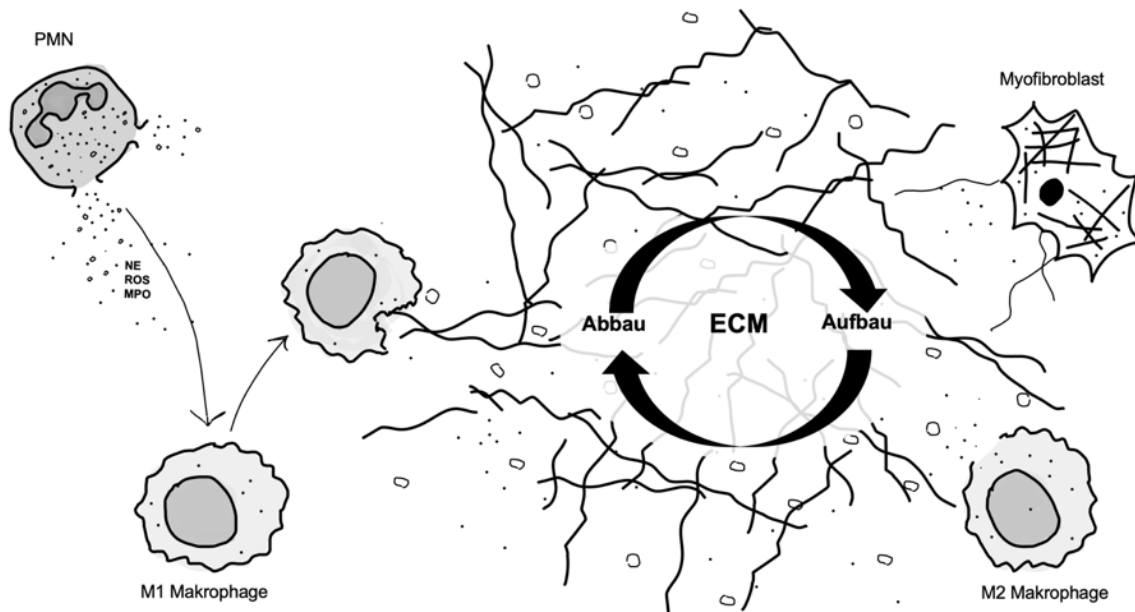


Abbildung 4: ECM-Synthese und Remodeling nach MI

Das Gleichgewicht des ECM-Ab- und Aufbau ist entscheidend für die Erholung der Herzfunktion nach MI. PMNs schütten ROS, NE und MPO aus und aktivieren M1-Makrophagen, die die ECM abbauen. Die ECM wird durch Myofibroblasten und unter Beteiligung von M2-Makrophagen aufgebaut.

Quelle: Eigene Darstellung

Die unterschiedlichen Prozesse, die die Inflammations-, Reifungsphase und Narbenreifung prägen, gehen mit charakteristischen Mediatoren und Zelltypen einher, die im Infarktareal nachweisbar sind (siehe Tabelle 1). Durch Untersuchungen der Zellzusammensetzung des Myokards, lässt sich ableiten, dass es nicht möglich ist, die Phasen strikt voneinander zu trennen, denn sie laufen zu Teilen parallel zueinander ab und gehen miteinander einher.⁵³

Tabelle 1: Remodelingphasen mit zugehörigen Biomarkern

Remodelingphase	Biomarker
Myokardschaden	Troponin ⁵⁹
Inflammationsphase	IL-6, TNF- α ⁵⁹
Proliferationsphase	Fibroblasten, Myofibroblasten ⁵⁵
Narbenreifung	Quervernetztes Kollagen ⁵⁵

Zusammenfassend ist herauszustellen, dass das kardiale Remodeling ein komplexer, zeitlich gestufter Heilungsprozess ist. Die Herzfunktion nach einem MI wird nicht allein durch die Größe des Ischämieareals bestimmt, sondern auch durch das kardiale Remodeling nach dem Ereignis.⁶⁰ Es liegt ein großes Potential in der Einflussnahme auf die Inflammation im Myokard, um das Remodeling und damit den Myokardschaden günstig zu beeinflussen.⁶¹

2.2.4. Der Ursprung der NETs: PMNs und ihr Auftreten nach dem MI

PMNs sind die ersten Zellen, die bei Entzündungen und Gewebsschädigungen rekrutiert werden.³⁹ Mittlerweile gibt es viele Hinweise, dass sie in der Infarktheilung eine entscheidende Rolle spielen könnten. PMNs reifen im Knochenmark aus ihren Vorläuferzellen, den Myeloblasten, heran und verweilen unter physiologischen Bedingungen zu 90 % dort.⁶² Bei MI-Patient*innen hingegen ist die Zahl der im Blutkreislauf zirkulierenden PMNs erhöht. Darüber hinaus korrelieren höhere PMN-Konzentrationen im peripheren Blut mit größeren Infarktarealen bei Patient*innen nach perkutaner Koronarintervention.³⁹

Der Abbau der PMNs im Infarktgewebe stellt einen Marker für die Auflösung der Inflammationsreaktion dar und hat eine wichtige antiinflammatorische Wirkung.^{63,64} Apoptotische PMNs schütten Signalmoleküle aus, die einerseits zu einer Hemmung der weiteren PMN-Infiltration und andererseits zur Rekrutierung phagozytierender Makrophagen führen. Makrophagen phagozytieren anschließend die untergegangenen PMNs. Dies ist ein wichtiger Mechanismus in der Auflösung der proinflammatorischen Reaktion. In M1-Makrophagen wird dadurch beispielsweise die Produktion von TNF- α gehemmt. Darüber hinaus wird die Polarisierung zu M2-Makrophagen und die Synthese antiinflammatorischer Botenstoffe, wie IL-10 und TGF- β verstärkt.⁶³

PMNs können durch unterschiedliche Mechanismen auf Pathogene oder Gewebsschädigungen reagieren, etwa durch rezeptorabhängige Phagozytose mit intrazellulärer Degradierung, die Ausschüttung antimikrobieller Granula, die Bildung von ROS und die Ausbildung von NETs.³⁹

Abhängig von ihrem Inhalt werden die Granula der PMNs in primäre, sekundäre und tertiäre Granula sowie sekretorische Vesikel unterteilt.^{65,66} Einzelne Granulabestandteile, wie MPO, wurden bereits in ihrer Auswirkung auf MIs untersucht und als prognostischer Marker identifiziert. In Patienten*innen mit einem ST-Hebungsinfarkt war eine erhöhte MPO-Plasmakonzentrationen am dritten oder vierten Tag nach MI mit erhöhtem Risiko schwerwiegender kardialer Komplikationen im Laufe der nächsten zwölf Monate assoziiert.⁶⁷

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Depletion von MPO mit einer reduzierten Leukozyteninfiltration im Infarktareal einhergeht. Dabei wurde im späteren Verlauf auch eine verringerte Dilatation des linken Ventrikels festgestellt.⁶⁸

2.2.5. NETs

Ein weiterer Abwehrmechanismus der PMNs ist die Bildung von NETs. Hierbei werfen PMNs netzartige Strukturen aus Chromatinfäden mit angelagerten Proteinen in den Extrazellulärraum aus. Bestandteil des Chromatins sind die Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4.¹¹ Innerhalb der NETs bilden sich Maschen mit einer Größe von $0,03 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$.⁶⁹ Proteine aus dem Zytoplasma und den Granula der PMNs lagern sich an und werden zu Bestandteilen der NETs. Dazu gehören beispielsweise NE, Lactoferrin und Cathepsin G.^{11,70} Auch MPO, das mit schwereren Verläufen bei MI-Patient*innen assoziiert ist, ist Bestandteil der NETs.⁶⁷ Neben einer antimikrobiellen Wirkung, triggern NETs Kaskaden im Rahmen der sterilen Inflammation.^{71,72} Inzwischen wurden neben Pathogenen, wie Bakterien, Viren und Pilzen auch physiologische NETs-Trigger identifiziert. Dazu gehören diverse Moleküle, die an der Inflammation beteiligt sind, unter anderem IL-8, IL-1 β , TNF- α , Komplementfaktor C5a und auch Cholesterolkristalle.^{58,73,74} Ex vivo kann die NETs-Bildung durch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Calcium (Ca^{2+})-Ionophore, wie zum Beispiel Ionomycin, induziert werden.^{58,74}

Nachdem NETs zum ersten Mal im Jahr 2004 durch Brinkmann et al. charakterisiert wurden, wurde im Jahr 2007 der Prozess der NETs-Bildung durch Fuchs et al. als weiterer Weg des programmierten Zelltodes identifiziert und folglich als NETose bezeichnet.^{11,75,76} Mittlerweile ist bekannt, dass neben der lytischen oder auch suizidalen NETose, bei der die PMNs zwangsläufig untergehen, auch eine vitale NETose existiert. Im Falle der vitalen NETose überlebt die Zelle und ist weiterhin zu Phagozytose und Chemotaxis fähig.⁷⁷ Welche Form der NETose unter welchen Bedingungen eingeleitet wird, ist nicht abschließend geklärt. Es gibt Beobachtungen, die zeigen, dass vitale NETose besonders durch bakterielle Lipopolysaccharide in Anwesenheit von Thrombozyten induziert wird.^{78,79}

(1) Lytische NETose

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien zu den zellulären Mechanismen der lytischen NETose veröffentlicht, wobei unterschiedliche Kaskaden beschrieben wurden.⁷⁴ Naccache et al. und Rosazza et al. führen dies auf verschiedene experimentelle Bedingungen wie die Verwendung unterschiedlicher Zellkulturmedien oder verschiedener NETose-Trigger und äußerst spezifische experimentelle Fragestellungen zu einzelnen Molekülen zurück.^{80,81} Zu

den Induktoren der lytischen NETose zählt neben IL-6, PMA und Pathogenen auch TNF- α .⁸² Neben unterschiedlichen möglichen NETose-Stimuli können auch diverse PRRs involviert sein: Dazu gehören beispielsweise Toll-like-Rezeptoren (TLR), Komplementrezeptoren (CR) und Fc-Rezeptoren (FcR).^{83,84} Die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und der cRaf-MEK-ERK-Kaskade infolge der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gilt als etablierter Mechanismus der lytischen NETose.⁷⁴ Dies führt zur Phosphorylierung der NADPH-Oxidase und damit zur Produktion von ROS.⁸⁵ In intrazellulären azurophilen Granula befindet sich ein Enzymkomplex, der als Azurosom bezeichnet wird. Das Azurosom besteht aus acht Proteinen, darunter NE, MPO und Cathepsin G. Unter dem Einfluss von ROS und MPO dissoziiert das Azurosom, wodurch NE freigesetzt wird, Zytoskelettelemente degradieren und in den Nucleus gelangt. Dort spaltet NE Histone, was zur Dekondensation der DNA im Zellkern beiträgt. MPO katalysiert die Bildung von ROS, welche die Freisetzung der NE steigert (siehe Abbildung 5).⁸⁶ Es folgt die Anlagerung verschiedener Proteine wie MPO und NE an die aufgelockerten DNA-Stränge sowie die Lyse der Zellmembran, was zum Zelltod der PMNs führt.⁷¹ Die Lyse der PMN-Zellmembran wird durch Gasdermin D vermittelt, das durch die NE aktiviert wird und auch an der Porenbildung bei anderen Formen des programmierten Zelltodes beteiligt ist.⁸⁷

Die hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration aktiviert zudem PAD4. Getriggert durch proinflammatorische Signale transloziert PAD4 in den Zellkern und katalysiert die Citrullinierung von Histon H3 (citH3). Dies führt seinerseits zur Dekondensation der DNA im Zellkern und wird als Voraussetzung für die NETose beschrieben (siehe Abbildung 5).^{88,89}

Neben dem cRaf-MEK-ERK-Signalweg wurde auch die Notwendigkeit der Aktivierung der Milztyrosinkinase (Syk) und der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) bei der durch PMA und Inflammationskomplexe induzierten NETose beschrieben.⁹⁰ Auch die durch das Bakterientoxin Pyocyanin induzierte NETose involviert PI3K und c-Jun-N-Terminale Kinasen (JNK).⁹¹ Derzeit wird angenommen, dass die beteiligten Rezeptoren und Signalkaskaden in Abhängigkeit von den jeweils genutzten NETose-Triggern und dem metabolischen Stadium der Zelle variieren können.⁸¹

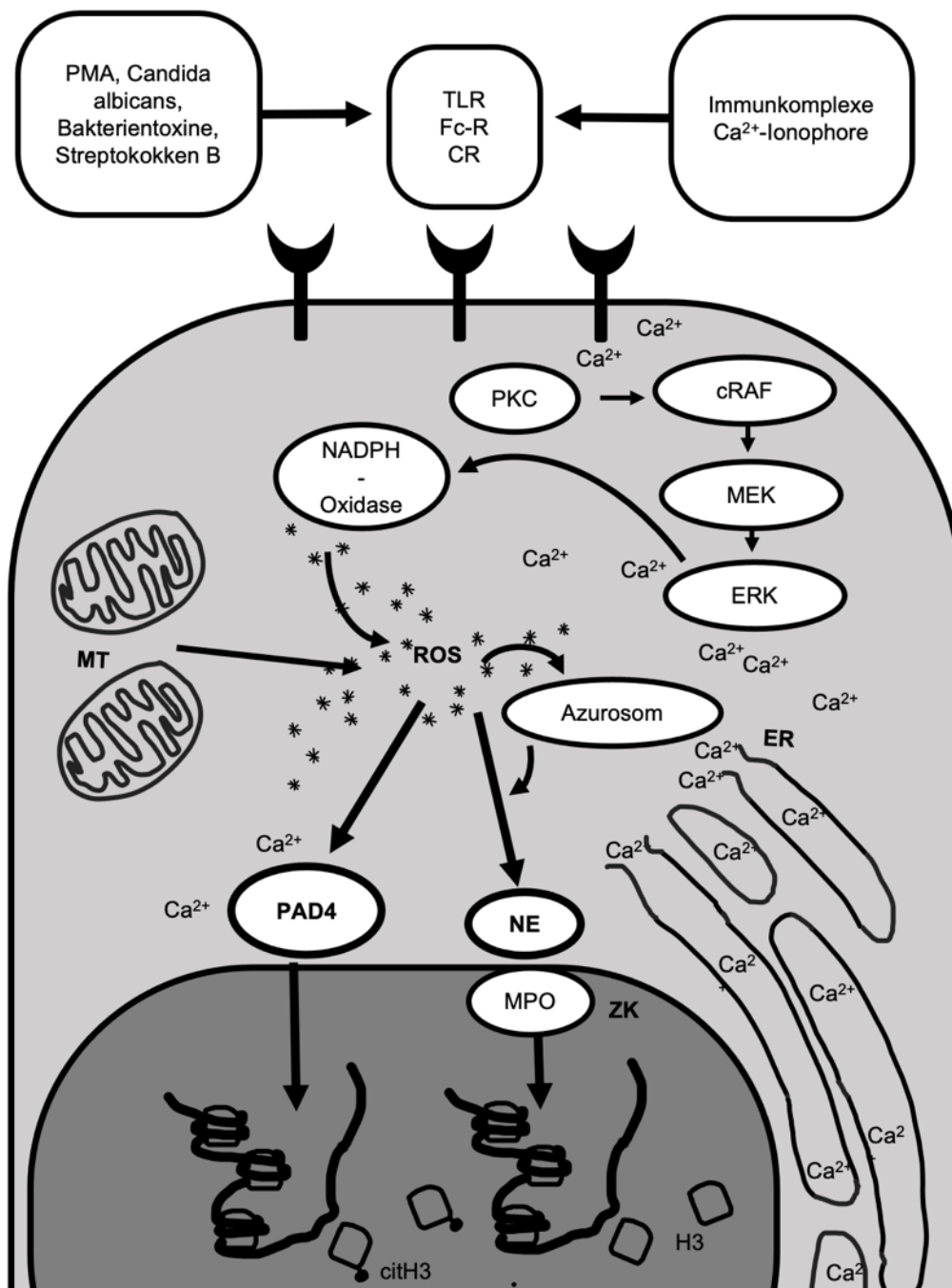


Abbildung 5: Lytische NETose

Im Rahmen der lytischen NETose werden durch proinflammatorische Trigger Ca²⁺-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) in den intrazellulären Raum freigesetzt. ROS gelangen aus den Mitochondrien (MT) ins Zytoplasma oder werden durch die NADPH-Oxidase gebildet. Am Ende der Kaskade steht entweder die Citrullinierung des Histons H3 oder die Spaltung von Histonen durch die NE. Dies führt zur Dekondensation der DNA im Zellkern (ZK) und ist eine Voraussetzung für die NETs-Bildung.

Quelle: Eigene Darstellung

(2) Vitale NETose

Die vitale NETose ermöglicht ein Überleben der PMNs, obwohl NETs aus nuklearer DNA ausgeworfen werden. Da die NETs durch Vesikel in den Extrazellulärraum transportiert werden, bleibt die Plasmamembran der Zelle intakt.⁷⁰ Die vitale NETose wurde zum ersten Mal im Jahr 2013 in einer Review durch Yipp und Kubes unter Verweis auf Daten von Clark et al. aus dem Jahr 2007 und Pilszczek aus dem Jahr 2010 beschrieben. Hier wurde die NETose unter anderem durch die Interaktion von TLR4 mit Lipopolysacchariden induziert.^{77,92,93} Außerdem wurde die vitale NETose als Reaktion auf Komplementfaktoren, Pathogene und aktivierte Thrombozyten beschrieben.⁸² Auch bei der vitalen NETose spielt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine entscheidende Rolle. PAD4 wird aktiviert und leitet die Dekondensation des Chromatins ein.⁹⁴ Da die vitale NETose innerhalb von 5 bis 60 Minuten abläuft, während die lytische NETose 2-4 Stunden dauert, gehen einige Arbeitsgruppen von der Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden aus. Ob und welche Überschneidungen es neben der PAD4-Aktivierung gibt, ist bislang unklar.^{93,95} Die Porenbildung in der nukleären Membran scheint durch das porenbildende Protein Gasdermin D zu erfolgen.⁸⁷

Als Reaktion auf *Staphylococcus aureus* werfen humane PMNs NETs aus, deren Generation von mitochondrialen ROS (mtROS) und dem mitochondrialen Komplex III abhängig ist.⁹⁶ Yousef et al. beobachteten NETs aus mitochondrialer DNA (mtDNA), die 15-20 Minuten nach der Stimulation mit Komplementfaktor C5a oder Lipopolysacchariden und Granulozyten/Makrophagen Koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) ausgeworfen wurden. Diese Form der NETose führte auch zum Überleben der PMNs und ist ROS-abhängig.⁹⁷ Außerdem konnte festgestellt werden, dass das Auswerfen von mtDNA eine aktive NADPH-Oxidase, Zytoskelettveränderungen und Adenosintriphosphat (ATP) als Produkt der Glykolyse erfordert. Ein genauer Mechanismus, der zur Bildung von NETs aus mtDNA führt, konnte noch nicht vollständig identifiziert werden.⁹⁸

Das Nomenklaturkomitee zum Thema Zelltod aus dem Jahr 2018, sieht den Gebrauch des Begriffs „NETose“ aufgrund des Überlebens der Zellen kritisch und rät folglich davon ab. Außerdem wird darauf hingewiesen, dass der Begriff „ETose“ passender wäre, da auch eosinophile und basophile Granulozyten sowie Mastzellen zum NET-Auswurf fähig sind.⁹⁹

NETs erfüllen wichtige Abwehrfunktionen im Körper, doch ist ihr vermehrtes Auftreten auch mit destruktiven Effekten assoziiert: Eine starke NETs-Bildung kann mit Gewebsschädigung und starker Inflammation in Zusammenhang gebracht werden.¹⁰⁰ NETs wurden in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen beobachtet. Dazu zählen sowohl Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus erythematodes oder die rheumatoide

Arthritis sowie Lungenerkrankungen wie die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Durch die komplexen Interaktionen des Immunsystems ist die konkrete Rolle der NETs in der Pathogenese nicht abschließend geklärt.^{14,15,101} Es scheint, dass sie prothrombotische Eigenschaften haben und förderlich auf die Ausbildung von Fibrinnetzen wirken.^{102,103} *In vitro* führte die Inkubation von pulmonalen Fibroblasten mit NETs zur Differenzierung zu Myofibroblasten, die durch die Stimulation eine erhöhte Kollagenbildung zeigten.¹⁰⁴ Zusätzlich wurden NETs als Bestandteil von rupturierten atherosklerotischen Plaques und Thromben nachgewiesen.¹⁰⁵ Sie aktivieren das Endothel zur Bildung prothrombotischer Faktoren und fördern die Thrombinbildung.^{106,107} Dies sind Aspekte, die die Pathophysiologie von MIs beeinflussen können.¹⁰⁸ Patient*innen mit akutem Koronarsyndrom zeigen häufig erhöhte NETs-Plasmakonzentrationen. Diese gelten nach dem Auftreten eines ST-Strecken-Hebungsinfarkts als prognostischer Hinweis für folgende kardiovaskuläre Ereignisse.^{109,110} Zusammenfassend ist zu bemerken, dass NETs eine ambivalente Rolle in der Immunantwort nach MIs haben und schädliche Auswirkungen auf das Ergebnis des Remodelings haben können.

2.2.6. PAD4

PAD4 ist eine von fünf Isoformen der Peptidylarginin-Deiminasen. Neben PAD4 existieren PAD1, PAD2, PAD3 und PAD6. Als humanes PAD5 wurde fälschlicherweise das murine Ortholog von PAD4 klassifiziert, was zu der abweichenden Nummerierung in der PAD-Familie führte.¹¹¹ PAD4 wird vorwiegend in Granulozyten, insbesondere PMNs sowie in Makrophagen exprimiert und unterscheidet sich von den anderen PADs durch eine Kernlokalisationssequenz, die die Translokation in den Zellkern ermöglicht. PAD4 ist vorwiegend im Cytoplasma, zytoplasmatischen Granula und im Zellkern lokalisiert.^{112,113}

PAD4 besteht aus 663 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 74 kDa. Das Protein kann in zwei Domänen unterteilt werden: Die N-terminale Region enthält die Kernlokalisationssequenz und besteht aus zwei immunglobulinähnlichen Subdomänen, während die C-terminale Region die katalytische Domäne enthält und sich als α - β -Propellerstruktur darstellt. Für die katalytische Aktivität von PAD4 ist die Bindung von Ca^{2+} an den fünf Ca^{2+} -Bindungsstellen entscheidend. Dies ermöglicht, dass PAD4 seine aktive Konformation einnimmt und steigert die katalytische Aktivität um das 10.000-fache. In seiner maximal aktiven Form liegt PAD4 als Homodimer vor. Die Substratinteraktion nahe dem aktiven Zentrum erfolgt über Rückgratinteraktionen, wodurch sich ein breites Substratspektrum ergibt.^{114,115}

Die Citrullinierung oder auch Deiminierung beschreibt die hydrolytische Spaltung von Arginin zu Citrullin und Ammoniak (siehe Abbildung 6).¹¹³ Zu den Substraten gehören Argininreste und Monomethylargininreste unterschiedlicher Proteine. Besonders an Histon H3 citrulliniert PAD4 Arginin 2, Arginin 8, Arginin 17 und Arginin 26, wodurch diese ihre positive Ladung verlieren und die Dekondensation der DNA begünstigt wird.^{115,116} Dies ist, wie bereits erläutert, eine Voraussetzung für die NETose mit nukleärer DNA.¹¹³ Weitere Substrate von PAD4 können H4, Transkriptionsfaktoren und Proteine wie p300, Nucleophosmin 1 (NPM1) und *Inhibitor of Growth Protein 4* (ING4) sein.^{17,117,118} Da PAD4 Monomethylarginin citrulliniert, ist es ein wichtiges Enzym, das die posttranslationale Modifikation der Methylierung antagonisieren kann.¹¹⁹

Einerseits kann die Citrullinierung der Histone durch die Dekondensation und die folgende Zugänglichkeit der DNA einen steigenden Einfluss auf die Transkription von Genen haben.¹²⁰ Andererseits interagiert PAD4 auch mit Transkriptionsfaktoren wie p53 und beeinflusst die Expression seiner Zielgene. Eine Inhibition von PAD4 begünstigt so den Zellzyklusarrest und die Apoptose. Dabei spielen Interaktionen mit anderen Enzymen, die posttranslationale Histonmodifikationen katalysieren, wie die Histondeacetylase 2 (HDAC2) eine Rolle.¹²¹ Außerdem kann PAD4 die Expression Östrogen-induzierter Gene unterdrücken, indem es Monomethylarginin citrulliniert und dabei die Methylgruppen entfernt.¹¹⁹

Die physiologischen Mechanismen, die zur Aktivierung von PAD4 führen, sind nicht vollständig verstanden.¹¹⁶ Einige Aspekte konnten identifiziert werden: PAD4 wird durch seine Ca^{2+} -Abhängigkeit reguliert sowie die Dimerisierung.^{115,122} Außerdem wirken verschiedene PKC-Isoformen auf die Aktivierung von PAD4 ein: Wie zuvor beschrieben, kann PAD4 durch die PKC ζ aktiviert werden. Außerdem wird PAD4 durch PKC α gehemmt.¹²³

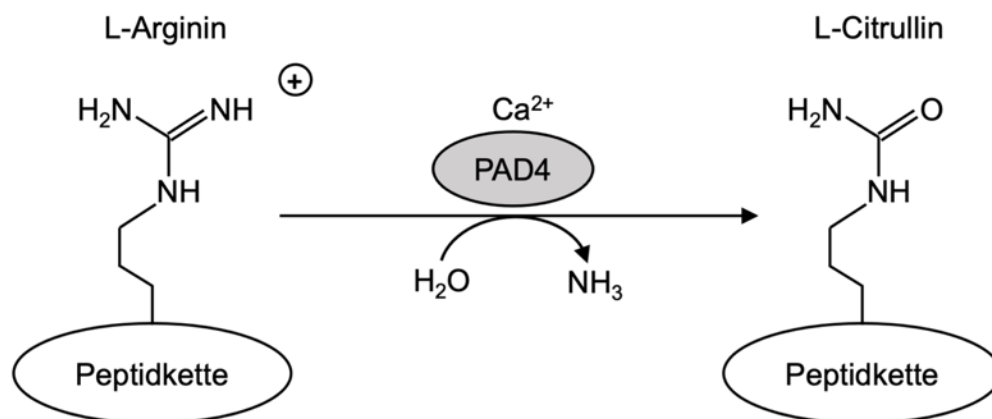


Abbildung 6: Citrullinierungsreaktion

PAD4 katalysiert die Ca²⁺-abhängige Citrullinierung von Arginin zu Citrullin, wodurch anstelle der positiven Ladung des L-Arginin eine neutrale Gruppe entsteht.

Quelle: Eigene Darstellung nach Rohrbach et. al.⁸⁸

PAD4-defiziente Mausmodelle werden in der Forschung genutzt, um den Einfluss von NETs auf Krankheiten zu untersuchen.¹²⁴ Die Dysregulation von PAD4 steht im Zusammenhang mit dem Fortschritt rheumatoider Arthritis, Thrombosebildung und systemischem Lupus erythematoses, wie es bereits für NETs beschrieben wurde.^{125,126} Septische Mäuse, die eine PAD4-Defizienz aufwiesen, zeigten in einem Versuch weniger Organdysfunktionen und eine höhere Überlebensrate als septische Wildtyp (WT)-Mäuse.¹²⁷ Auch myokardiale Erkrankungen werden von der PAD4-Aktivität beeinflusst. Martinod et al. zeigten 2016 in einem Mausmodell, dass die altersassoziierte kardiale Fibrose bei PAD4-defizienten Tieren geringer ausfällt als bei WT-Tieren. Ebenso fällt der Verlust der systolischen und diastolischen Funktion geringer aus. Ihre Daten weisen darauf hin, dass dieser Effekt mit der NETose regulierenden Rolle von PAD4 im Zusammenhang stehen könnte.¹²⁸ Außerdem ist die Entwicklung einer HI in einem Mausmodell für rheumatoide Arthritis durch die Gabe von PAD4-Inhibitoren reduziert worden. Die PAD4-Inhibition führte in dem Modell zu einer geringeren Infiltration des linken Ventrikels mit PMNs. Auch dieser Befund wird auf die Aktivierung der PMNs durch PAD4 und die entscheidende Rolle in der NETose zurückgeführt.¹²⁹ Neben seiner pathophysiologischen Rolle im Rahmen der NETs-Bildung kann PAD4 auch unabhängig von NETs in Pathophysiologien relevant sein. Bei der rheumatoiden Arthritis befindet sich eine hohe Konzentration durch PAD4 citrullinierter Proteine in der synovialen Flüssigkeit betroffener Gelenke.¹³⁰ Außerdem spielt PAD4 in der Entwicklung neurologischer Erkrankungen wie zum Beispiel Multipler Sklerose eine Rolle.¹¹² PAD4 ist somit nicht nur zentraler Mediator der

NETose, sondern auch ein potenzielles therapeutisches Ziel in der Post-MI-Regeneration und anderen Erkrankungen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sowohl die Funktion von PAD4 als auch NETs in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen und dem Post-MI-Remodeling nicht abschließend geklärt ist. Es wurden bisher sowohl schädliche als auch protektive Effekte von PAD4 und NETs beschrieben. Dieser Widerspruch kann darauf hindeuten, dass die Effekte kontextabhängig variieren könnten.

2.3 Ziel der Arbeit

Zahlreiche Patient*innen sind jährlich von MIs betroffen. Sofern sie die akute Phase überleben, entwickeln viele der Betroffenen Langzeitkomplikationen wie chronische HIs, die die Lebenserwartung und auch -qualität massiv einschränken. Die kardiale Funktion nach einem MI wird maßgeblich durch das kardiale Remodeling bestimmt, welches durch verschiedene Immunprozesse reguliert wird. Eine zentrale Rolle wird dabei den PMNs zugeschrieben, die durch die Ausbildung von NETs eine regulierende Wirkung auf die post-MI-Immunreaktion haben. Dadurch stellen sie potenziell relevante Zielstrukturen für präventive oder therapeutische Ansätze in der Prävention chronischer HIs nach MIs dar.

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob PAD4^{-/-}-Mäuse, die einen MI erleiden, durch das Ausbleiben der NETose profitieren und wie PAD4 die Funktion des Myokards, die Immunantwort, die Infarktgröße und das Überleben der Mäuse beeinflusst. Im Hinblick auf die ausbleibende NETose der PAD4^{-/-}-Mäuse, soll in dieser Arbeit ein umfassender Überblick über das Post-MI-Remodeling im Mausmodell erlangt werden. Dabei sollen kritische Zeitpunkte und Strukturen identifiziert werden, deren Modulation den Verlauf nach MI positiv beeinflussen könnte. Auf diese Weise soll ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der chronischen HI nach MIs erlangt werden, um zukünftig die Entwicklung präventiver Strategien der Patient*innenversorgung zu unterstützen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1. Mäuse

Für alle Experimente wurden C57BL/6J Mäuse des Jackson Labors verwendet. Der Knockout wurde durch die Deletion der Exons 9 und 10 im PAD4-Gen und dem Cre/loxP-System durch das Labor für kardiale Regeneration der Uniklinik Köln generiert und freundlicherweise für die Experimente zur Verfügung gestellt. Bei jedem Versuchstier wurde der Knockout mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verifiziert. Zu den Versuchszeitpunkten waren die Tiere 9-12 Wochen alt und es wurden ausschließlich männliche Mäuse verwendet. Die Tierhaltung erfolgte bei 22-24 °C zu einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus. Die Mäuse wurden mit Standardnagerfutter gefüttert und erhielten unbegrenzt Wasser.

Alle Tierversuche (OPs) wurden durch das Landesamt für Natur-, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen auf Grundlage des Tierschutzgesetzes (§§ 7 bis 10) genehmigt (LANUV, Deutschland, Nummer 84-02.04.2014.A234). Die Eingriffe wurden durch PD Dr. med. Kaveh Eghbalzadeh mit meiner Assistenz durchgeführt. Alle Untersuchungen sowie die postoperative Versorgung der Versuchstiere lagen in meinem Aufgabenbereich mit Ausnahme der Durchführung des Multiplex Immunassays.

3.1.2. Materialien und Reagenzien

Tabelle 2: Auflistung aller für die Experimente benutzter Materialien und Reagenzien, inklusive Antikörper und Kits

Bezeichnung	Hersteller
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Hydrochloride	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Ampuwa	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Anti-Histone H3 (citrulline R2 + R8 + R17) antibody ab5103	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Myeloperoxidase antibody ab9535	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Destilliertes Wasser (A. dest.)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Bezeichnung	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Dako Fluorescence Mounting Medium (Eindeckmedium)	Dako AG, Wiesentheid, Deutschland
dsDNA from Calf Thymus	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbeccos Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Evans-Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Farbreagenz A (H ₂ O ₂)	R & D Systems, Minneapolis, USA
Farbreagenz B (Tetramethylbenzidin)	R & D Systems, Minneapolis, USA
Fetal Calf Serum (FCS), premium	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Goat Anti-Rabbit IgG AF488 4412S	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Ionomycin	InvivoGen, San Diego, USA
Hanks´ Balanced Salt Solution (HBSS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mouse cTNT/TNNT2 ELISA Kit	Immunoway, Plano, USA
Mouse IL-10 DuoSet ELISA	R & D Systems, Minneapolis, USA
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Normal Goat Serum (NGS)	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Penicillin + Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Percoll, Easycoll	Biochrom GmbH, Schaffhausen, Schweiz
PMA (1mM) Assay Reagent	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ProcartaPlex 8-plex Immunoassay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Bezeichnung	Hersteller
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay-Kit	Invitrogen / Molecular Probes, Waltham, USA
Reagent Diluent (Reagenzverdünnungspuffer)	R & D Systems, Minneapolis, USA
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

3.1.3. Geräte und Software

Tabelle 3: Auflistung aller für die Experimente benutzter Geräte und benötigter Software

Bezeichnung	Hersteller
Allegra X-15R Centrifuge	Beckman Coulter, Brea, USA
Analysewaage ABT 100-5NM	Kern und Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Control Unit-MS	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Niederlande
Double three-way valve (Dreiwegehahn)	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Niederlande
Eppendorf Pipette Plus, verschiedene Volumina	Eppendorf-Germany, Wesseling, Deutschland
Evident OLYMPUS Zoom Stereo Mikroskop SZ51, binocular	Evident, Tokyo, Japan
Evident OLYMPUS KL1500 HAL, Beleuchtung für Stereomikroskope	Evident, Tokyo, Japan
Flat Heating Plate (Heizplatte)	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Niederlande
Gas Exhaust Unit (Abgaseinheit)	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Niederlande
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, Boston, USA
Heating Probe (Rektalthermometer)	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Niederlande
ImageJ	Entwickelt durch Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA

Bezeichnung	Hersteller
Induction Box for Mouse (Einleitungsbox)	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Niederlande
Infrarotlampe IL11	Beurer, Ulm, Deutschland
KERN Edelstahl-Tischwaage, FOB, bis 5 kg	Kern und Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Laminar Flow Cabinet	KOJAIR Tech Oy, Mänttä-Vilppula, Finnland
Luminex 200 System	R&D Systems, Minneapolis, USA
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, USA
MiniVent Ventilator for Mice (Model 845)	Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland
Nikon Eclipse Ti-U Fluorescence Microscope	Nikon, Minato, Japan
Evident OLYMPUS CKX31 Microscope	Evident, Tokyo, Japan
Transducer MX550S	FUJIFILM VisualSonics, Toronto, Kanada
UNOSORB Filter (Anästhesiegasfilter)	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Niederlande
Vaporizer Sigma Delta & Flowmeter CM2	UNO Life Science Solutions, Zevenaar, Niederlande
Vevo LAB	FUJIFILM VisualSonics, Toronto, Kanada
Victor X3 Multilabel Plate Reader	Perkin Elmer, Waltham, USA
VisualSonics Vevo 3100 Imaging System	FUJIFILM VisualSonics, Toronto, Kanada

3.1.4. Medikamente und Verbrauchsmaterial

Tabelle 4: Auflistung aller für die Experimente benutzter Medikamente und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
2-0 PROLENE Polypropylen-Faden	Ethicon, Inc., Raritan, USA
3M Durapore Fixierpflaster TM 1,25. cm x 9.1m	3M, Saint Paul, USA
6-0 PROLENE Polypropylen-Faden	Ethicon, Inc., Raritan, USA
8-0 PROLENE Polypropylen-Faden	Ethicon, Inc., Raritan, USA
70 µm Zellfilter	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

Bezeichnung	Hersteller
96-Well-Mikroplatte schwarz	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Aortic Cannula 1.9 mm with Luer Fitting	Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland
BD Microlance TM 3 26 G x 1/2	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
BD Plastipak 1 ml steril	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Baytril Bayer 25 mg/ml Injektionslösung Enrofloxacin	BAYER AG, Leverkusen, Deutschland
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	BAYER AG, Leverkusen, Deutschland
Buprenovet Multidose 0,3 mg/ml Injektionslösung	VetViva Richter GmbH, Wels, Österreich
Büroklammer 32mm	DURABLE Hunke & Jochheim GmbH & Co. KG, Iserlohn, Deutschland
Costar, 12-Well-Platte, transparent	Corning, New York, USA
Cutasept F Haut-Desinfizienz	BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Deckgläser, Stärke 1, rund, 12 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ES Kompressen 10 cm x 10 cm	Hartmann Gruppe, Heidenheim an der Brenz, Deutschland
Ebelin Wattestäbchen 500 Stk.	Ebelin, dm-drogeriemarkt, Karlsruhe, Deutschland
Einmal Arterienklemmen, Pean, steril 14 cm, gerade	Edlich & Habel, Buchholz, Deutschland
Einmalschere Stumpf, Peha-instrument	Hartmann Gruppe, Heidenheim an der Brenz, Deutschland
Einmalskalpell Figur 22	MediWare GmbH, Köln, Deutschland
Elektroden-Gel	P. J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln, Deutschland
epT.I.P.S. (Pipettenspitzen)	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
Extra Fine Graefe Forceps (Pinzette, stumpf)	Fine Science Tools GmbH,

Bezeichnung	Hersteller
	Heidelberg, Germany
Falcon Easy Grip Tissue Culture Dish 60 mm x 15 mm (Petrischale)	Corning, New York, USA
Fine Scissors	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Germany
Handheld Magnetic Plate Washer (Magnetische Plattenschiene)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Heparin-Natrium 5000 I.E./ml	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Introcan safety winged PUR (blau)	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Isofluran-Piramal Flüssigkeit	Piramal Group, Mumbai, Indien
Isotonische Kochsalzlösung, Injektionslösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Knete 10 Stangen	Idena, Golßen, Deutschland
MiniCollect EDTA Röhrchen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
No. 120 Nähgarn fusselfrei	Gütermann GmbH, Gutach-Breisgau, Deutschland
Nuncclon Delta 96-Well-Mikroplatte	R & D Systems, Minneapolis, USA
Objektträgerbox für 100 Stk.	GLW Storing Systems, Würzburg, Bayern
Pinzette, chirurgisch, gerade, Peha- instruments	Hartmann Gruppe, Heidenheim an der Brenz, Deutschland
Polysine Adhesion Microscope Slides, 25x75x1mm (Objektträger)	Epredia Inc., Portsmouth, USA
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf-Germany, Wesseling, Deutschland
Röhrchen 50 ml, 115 x 30 mm	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
S&T Forceps – SuperGrip Tips (Pinzette, spitz)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Germany
Sterican 0,30 x 12 mm BL/LB; 30G x ½"	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Ultraschallkontaktgel	Caeser & Lorenz GmbH, Hilden, Deutschland
Vannas Spring Scissors – 2 mm Cutting Edge	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Germany
Veet Haarentfernungscreme	Reckitt Benckiser Deutschland GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zählkammer Neubauer	LO - Labor Optik, Lancing, Vereinigtes Königreich

3.1.5. Verwendete Lösungen

HBSS-Präparationslösung (HBSS prep)

Tabelle 5: Ansatz für 50 ml HBSS prep (HBSS + 3 % FCS)

Material	Menge
HBSS	48,5 ml
FCS	1,5 ml

0,2% NaCl

Tabelle 6: Ansatz für 50 ml 0,2 % NaCl

Material	Menge
A. dest.	50 ml
NaCl	0,1 g

1,2% NaCl

Tabelle 7: Ansatz für 50 ml 1,2 % NaCl

Material	Menge
A. dest.	50 ml
NaCl	0,6 g

62% Percoll in HBSS prep

Tabelle 8: Ansatz für 10 ml 62 % Percoll in HBSS prep

Material	Menge
Ansatz für die Stocklösung der isotonischen Percolllösung	
Percoll	9 ml
1,5 M NaCl	1 ml
62% Percoll in HBSS prep	
Stock isotonischer Percolllösung	6,2 ml
HBSS prep	3,8 ml

4 % PFA in PBS

Tabelle 9: Ansatz für 500 ml 4 % PFA in PBS

Material	Menge
PBS, 60 °C	400 ml
PFA	20 g
Mit NaOH-Lösung auf pH 7,4 titrieren	
Erwärmen bis PFA vollständig gelöst ist, anschließend abkühlen	
Ad 500 ml PBS	

Blockierungspuffer

Tabelle 10: Ansatz für 10 ml Blockierungspuffer (PBS + 0,3 % TritonX-100 + 1 % BSA + 5 % NGS)

Material	Menge
PBS	8 ml
BSA	0,1 g
Triton X-100	30 µl
NGS	500 µl
Vollständig lösen	
Ad 10 ml PBS	

Färbepuffer

Tabelle 11: Ansatz für 50 ml Färbepuffer (PBS + 0,1 % TritonX-100)

Material	Menge
PBS	50 ml
Triton X-100	50 µl

3.2 Methoden

3.2.1. Versuchsaufbau

Die Auswirkungen der NETs-Bildung auf die akute und langfristige Heilung nach einem MI wurden in einem genetisch modifizierten PAD4^{-/-}-Mausmodell untersucht. Der MI wurde durch die permanente Ligatur der LAD induziert. Dies ist ein etabliertes Verfahren zur Erzeugung reproduzierbarer, transmuraler MIs.¹³¹ Die Mäuse wurden in zwei OP-Gruppen unterteilt: Die MI-Gruppe erhielt eine LAD-Ligatur, während bei der Kontrollgruppe (Sham) der Brustkorb eröffnet wurde, ohne die myokardiale Durchblutung zu manipulieren. Der zeitpunktsunabhängige Vergleich mit unbehandelten, Baseline (BL)-Tieren diente zur Kontrolle der Auswirkungen der chirurgischen Prozedur. An Tag 1, Tag 3 und Tag 21 nach der OP wurden die Mäuse untersucht: Es erfolgte eine transthorakale Echokardiographie (TTE), die Versuchstiere wurden gewogen, der Infarktbereich im Myokard wurde quantifiziert und es wurde Plasma zur anschließenden Analyse gewonnen (siehe Abbildung 7). Alle Maßnahmen wurden identisch an PAD4^{-/-}-Mäusen, WT-Mäusen und Mäusen der Kontrollgruppen durchgeführt. Aus diesem Ablauf ergaben sich 14 definierte Versuchsgruppen, die sich aus Genotyp (WT/PAD4^{-/-}), chirurgischer Intervention (MI/Sham/BL) und Untersuchungszeitpunkt (Tag1/3/21) zusammensetzen. Die Daten der Gruppen wurden ausgewertet und verglichen. Alle chirurgischen Eingriffe wurden von PD Dr. med. Kaveh Eghbalzadeh durchgeführt.

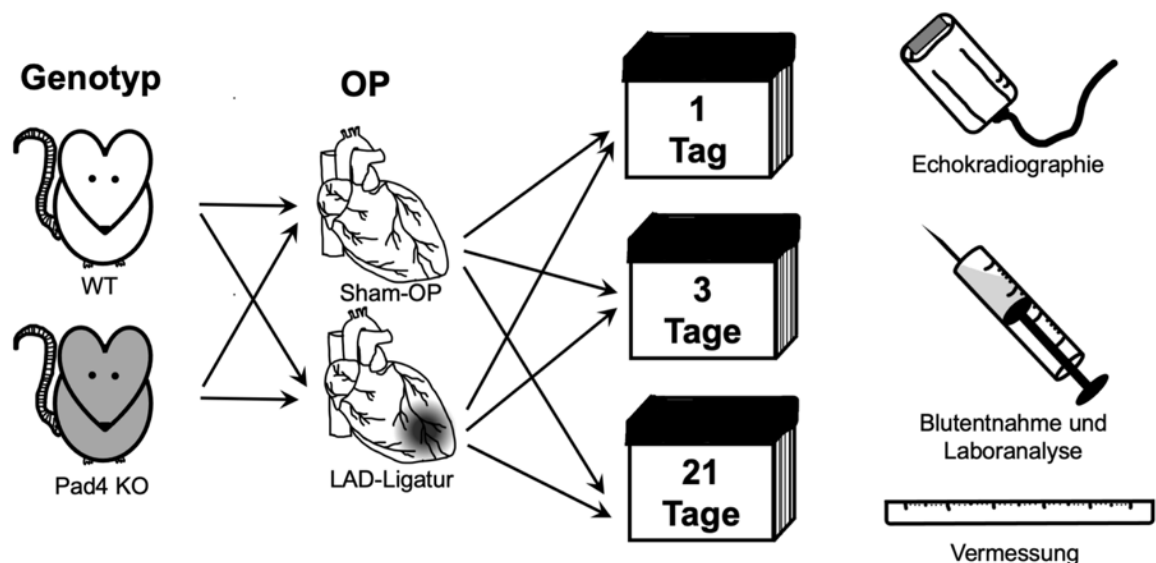


Abbildung 7: Übersicht der experimentellen Abläufe

3.2.2. Operative Maßnahmen

(1) Anästhesie

Die Mäuse erhielten zur Analgesie 30 Minuten vor Eingriffen oder Untersuchungen 0,1 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin subkutan. Die Anästhesie wurde inhalativ mit Isofluran eingeleitet und geführt. Über einen Schlauch wurde Sauerstoff mit 5 Volumen% (Vol.%) Isofluran versetzt (Control Unit-MS, UNO Roestvaststaal BV) und mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 l/min in die Einleitungsbox (Induction Box Mouse, UNO Roestvaststaal BV) geführt (siehe Abbildung 8A). Die Narkosetiefe wurde durch die Auslösung des interphalangealen Reflexes überprüft. Der interphalangeale Reflex wird durch die Kompression der Haut zwischen den Zehen ausgelöst, woraufhin Hüft- und Beinmuskulatur flektieren. Die optimale Narkosetiefe war erreicht, wenn er erloschen war, während die Maus regelmäßig, aber verlangsamt atmete.

Nach der Einleitung wurde die Maus auf eine Heizplatte (Flat Heating Plate, UNO Roestvaststaal BV) transferiert und fixiert. Die Heizplatte war auf 37 °C erwärmt, um die Körpertemperatur aufrechtzuerhalten. Zusätzlich wurde bei Bedarf eine Infrarotlampe zum Wärmen genutzt. Die Narkose wurde durch die Zufuhr von 1 l/min Sauerstoff mit 2-3 Vol.% Isofluran erhalten. Während des Eingriffs wurde die Narkosetiefe durch regelmäßige Überprüfung des interphalangealen Reflexes kontrolliert. Außerdem wurde während der gesamten Narkose die Körpertemperatur, Atemfrequenz und Herzfrequenz, durch ein Rektalthermometer (Heating Probe, UNO Roestvaststaal BV) und Sensoren in der Wärmeplatte überwacht (siehe Abbildung 8B). Die Augen der Maus wurden mit Bepanthen-Creme bedeckt, um ein Austrocknen der Augen bei fehlendem Lidschluss zu verhindern.

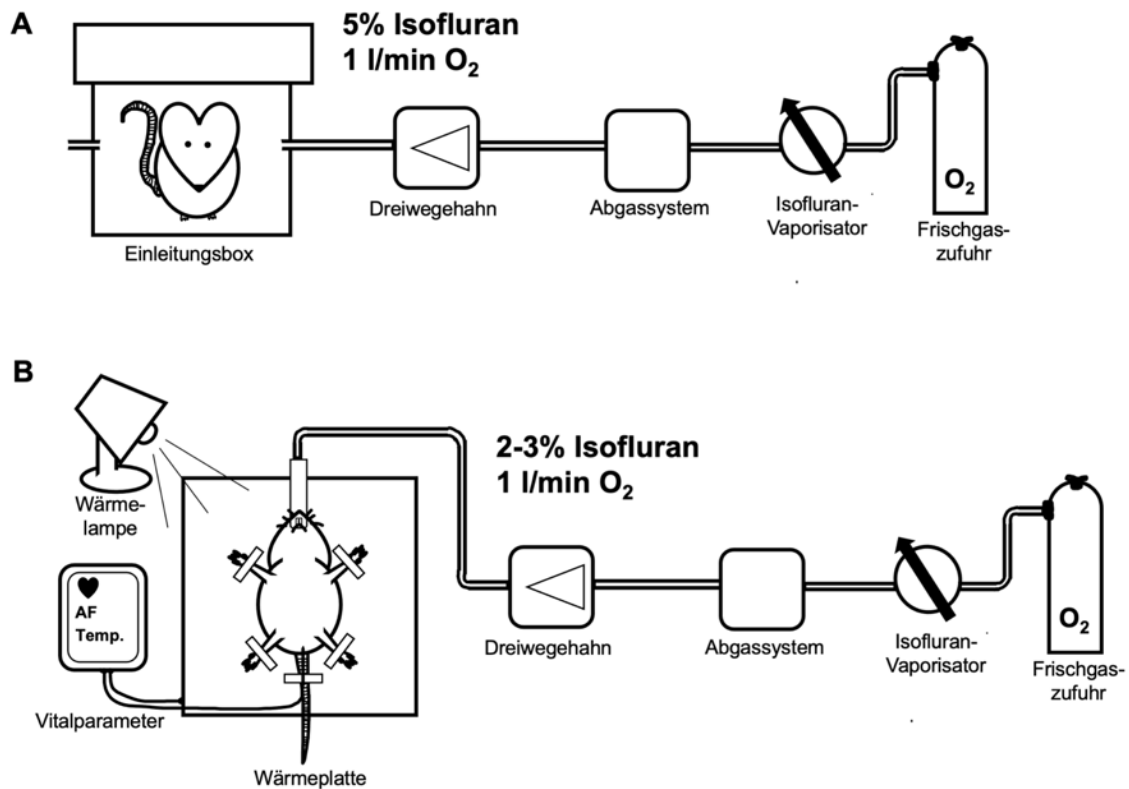


Abbildung 8: Darstellung der Anästhesie zur Einleitung und am (Operations-)Arbeitsplatz

Die inhalative Einleitung erfolgte in einer luftdichten Box (A), während die Narkose mit 2-3 Vol% Isofluran über einen Schlauch, in dem Mund und Nasenöffnung platziert war, aufrechterhalten wurde (B).

Wurde die Narkose zur Vorbereitung einer Thorakotomie benötigt, musste die Maus durch den Operateur PD Dr. med. Kaveh Eghbalzadeh intubiert werden. Ansonsten wäre der linke Lungenflügel nach der Eröffnung des Thorax aufgrund des fehlenden Unterdrucks im Pleuraspalt kollabiert. Die Lunge wurde während des Eingriffs durch ein Beatmungsgerät (MiniVent Ventilator for Mice, Hugo Sachs Elektronik) mit 150 Atemzügen/min ventiliert. Das Atemzugvolumen (AZV) berechnete sich gewichtsadaptiert:

$$AZV (\mu l) = 10 \times \text{Körpergewicht}$$

Bei PAD4^{-/-}-Mäusen war eine Reduktion des errechneten AZV um 10-20 % indiziert, da ein gehäuftes Versterben unmittelbar nach der Intubation und Standardbeatmung auftrat. Die einmalige Autopsie einer Maus deutete darauf hin, dass die Todesursache ein Pneumothorax war. Nach Reduktion des AZV bei PAD4^{-/-}-Mäusen häuften sich diese Todesfälle nicht mehr (Daten nicht veröffentlicht). Die Mäuse wogen im Alter von 9-12 Wochen 20-30 g, sodass bei leichteren Tieren das AZV um 10 % und bei schwereren Tieren um 20 % reduziert wurde.

Die Extubation erfolgte nach Stabilisierung der Spontanatmung. Bis zu fünf Stunden nach der Narkose wurden die Mäuse zum Wärmemanagement unter einer Infrarotwärmelampe (Infrarotlampe IL11, Beurer) gehalten. Zum postoperativen Schmerzmanagement wurden die Mäuse alle 12 Stunden mit 0,1 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin subkutan versorgt.

(2) Myokardinfarkt-Modell durch permanente LAD-Ligatur

Der operative Eingriff wurde von PD Dr. med. Kaveh Eghbalzadeh unter Assistenz der Autorin durchgeführt. Nach der Enthaarung durch Enthaarungscreme (Veet), wurde die Haut über dem *Musculus pectoralis* mit einer stumpfen Pinzette angehoben und durch eine Schere längs des Verlaufs der Rippenbögen inzidiert. Der *Musculus pectoralis* wurde stumpf freipräpariert. Unter Schonung der *Arteria mammaria interna* wurde der Muskel scharf durchtrennt, ebenso der darunter liegende *Musculus rectus abdominis*. Der fünfte Interkostalraum wurde unter Schonung des darunter befindlichen Myokards eröffnet. Die angrenzenden Rippen wurden mit einem 6-0 Faden (6-0 PROLENE Polypropylen Faden, Ethicon) gespreizt fixiert (siehe Abbildung 9). Die LAD wurde im *loco typico* zwischen den Ventrikeln mit einem 8-0 Faden (8-0 PROLENE Polypropylen Faden, Ethicon) unterstochen und ligiert. War die LAD im Situs nicht sichtbar, wurde eine Ligatur am *loco typico* vorgenommen. Die erfolgreiche Ligatur der LAD konnte am Verblässen des Myokards distal des Knotens erkannt werden. Ohne erfolgreiche Ligatur wurden die Versuchstiere aus dem Experiment ausgeschlossen. In den meisten Fällen wurde eine regionale Hypokinesie des Herzens ersichtlich. Am Ende des Eingriffs wurden 50 µg/g Körpergewicht Enrofloxacin subkutan als Infektionsprophylaxe injiziert. Bei der Sham-Gruppe wurde bei identischem Vorgehen lediglich keine LAD-Ligatur durchgeführt.

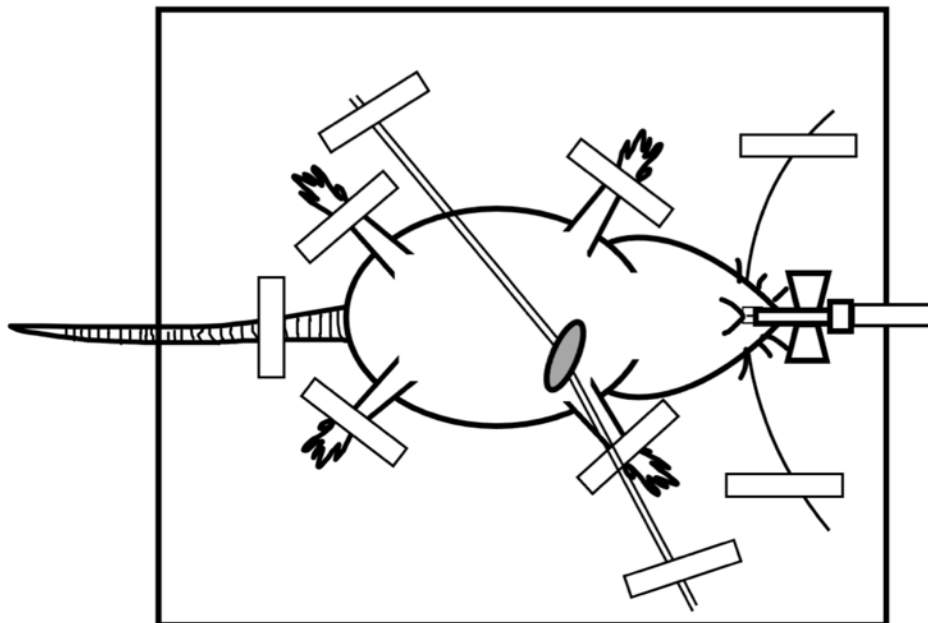
A**B**

Abbildung 9: OP-Situs nach Thorakotomie

Die Maus war an allen vier Extremitäten und dem Schwanz mit Fixierpflaster auf der Heizplatte befestigt und lag quer vor dem Operateur. Die Fotografie (**A**) wurde zu Zwecken der Übersichtlichkeit durch die schematische Darstellung der OP-Situation (**B**) ergänzt.

3.2.3. Postoperative kardiale Untersuchungen

(1) Transthorakale Echokardiographie

Die Herzfunktion der Mäuse wurde an Tag 3 und Tag 21 echokardiographisch untersucht. Hierfür waren Anästhesie und Enthaarung gemäß Kapitel 3.2.2 erforderlich. Zur Untersuchung wurden das VisualSonics Vevo 3100 Imaging System (FUJIFILM VisualSonics), der Schallkopf MX550S (FUJIFILM VisualSonics) und Ultraschallgel genutzt. Die Einstellungen der parasternalen Längsachse und der kurzen Achse entsprechen den standardisierten

echokardiographischen Protokollen zur Evaluation der kardialen Funktion in Nagetieren.¹³² Die transthorakale Echokardiographie (TTE) ermöglichte die Bestimmung kardialer Funktionsparameter (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Übersicht über die durch die TTE ermittelten kardialen Funktionsparameter in der langen Achse

Parameter	Definition
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF)	Prozentualer Anteil des enddiastolischen Blutvolumens, welches in der Systole ausgeworfen wird.¹³³ $LVEF = \frac{SV}{EDV} \times 100$ SV = Schlagvolumen EDV = Enddiastolisches Volumen
Schlagvolumen (SV)	Blutvolumen, das pro Herzschlag in den Körperkreislauf ausgeworfen wird.¹³³ $SV = EDV - ESV$ EDV = Enddiastolisches Volumen ESV = Endsystolisches Volumen
Herzzeitvolumen (HZV)	Blutvolumen, welches pro Zeiteinheit in den Körperkreislauf ausgeworfen wird.¹³³ $HZV = SV \times \text{Herzfrequenz}$

Aufnahmen in der parasternalen Längsachse

Der Ultraschallkopf wurde entlang der Längsachse des Körpers parasternal links platziert und leicht in Richtung der rechten Schulter, entlang der Herzachse, gedreht. Die Qualität der Einstellung war hoch, wenn die Segel der Aortenklappen, der Ursprung der Aorta sowie der linke Ventrikel inklusive der Herzspitze erfasst wurde. Aufgenommen wurde mindestens ein Pumpzyklus des Myokards, der im Anschluss mit dem VevoLAB Computerprogramm ausgewertet wurde. Dazu wurden die Ventrikelgrenzen markiert (siehe Abbildung 10). Das Programm errechnete anschließend die LVEF, das Ventrikelvolumen und weitere Funktionsparameter des linken Ventrikels (siehe Tabelle 12). Außerdem wurde das EDV des linken Ventrikels bestimmt.

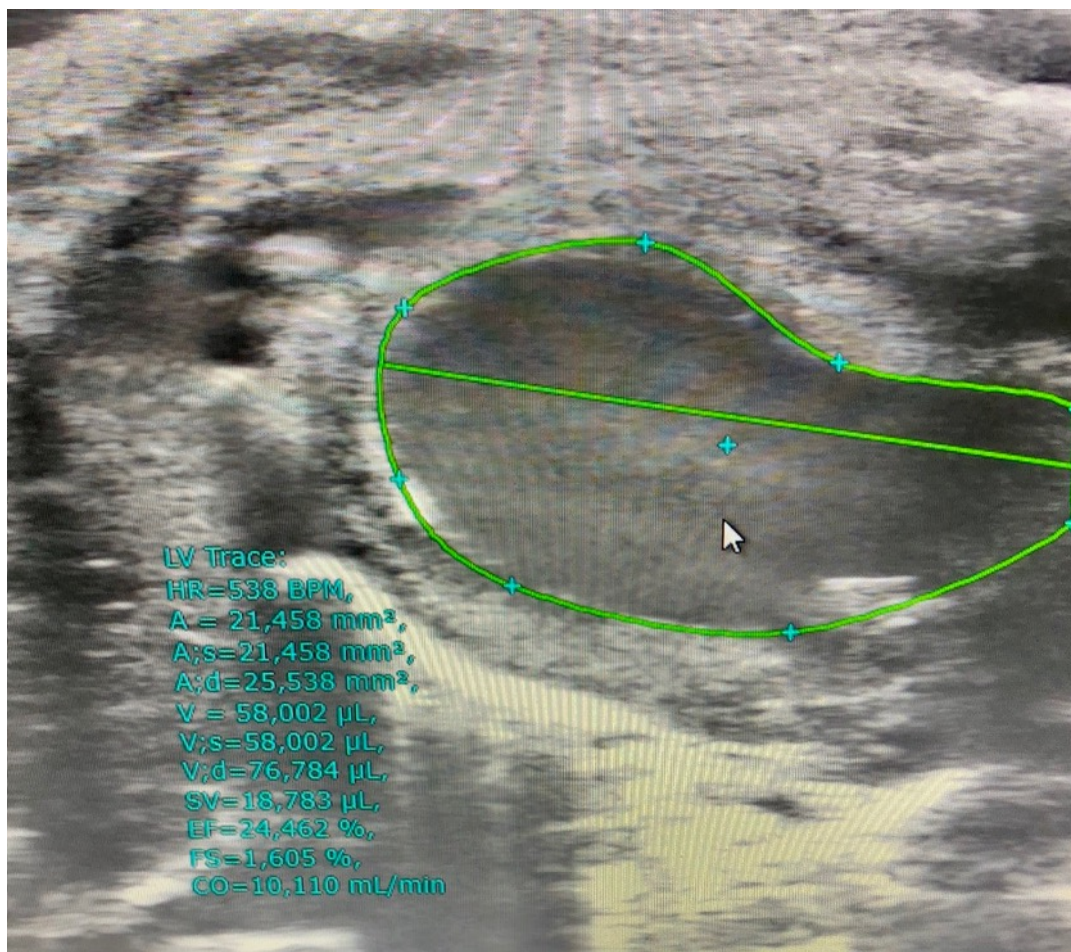


Abbildung 10: Bildschirmaufnahme der VevoLAB Ansicht in parasternaler Längsachse

Die Aufnahme zeigt ein TTE-Bild des Herzens in der parasternalen Längsachse. Als ersten Schritt der Messung wurde die Ventrikelbegrenzung markiert (grüne Linien).

Aufnahmen in der kurzen Achse

Aus der parasternalen Längsachse wurde der Schallkopf um 90° gedreht und es stellte sich ein Querschnitt durch die Ventrikel dar, der auf drei verschiedenen Ebenen aufgenommen wurde: Direkt unterhalb der atrioventrikulären Klappen, in der Mitte des Ventrikels und apikal wurden Aufnahmen im B- und im M-Modus gespeichert. Analog zu den Aufnahmen in der parasternalen Längsachse wurde die Auswertung mit Hilfe des VevoLAB Computerprogramms durchgeführt. Es konnte der Durchmesser des linken Ventrikels (LV) in der Systole und in der Diastole sowie die Hinterwand vermessen werden. So konnte die Reduktion des Ventrikeldurchmessers errechnet werden:

$$\Delta LV \text{ Durchmesser} = LV \text{ Durchmesser (Diastole)} - LV \text{ Durchmesser (Systole)}$$

(2) Kardiale Punktion

An Tag 1, Tag 3 und Tag 21 wurden Blutproben aus den Herzen der Mäuse entnommen. Es handelte sich um eine terminale Untersuchung, da das entnommene Blutvolumen von circa 1ml letal war.¹³⁴ Zur Vorbereitung wurden die Mäuse narkotisiert und auf dem Operationstisch fixiert (siehe 3.2.2).

Mit einer stumpfen Pinzette wurde die Haut des Oberbauchs angehoben, mit einer Schere eingeschnitten und der Schnitt wurde kranial erweitert. Unter der Haut kam das dünne Peritoneum mit den darunter liegenden Organen zum Vorschein. Das Peritoneum wurde bis zum Xiphoid eröffnet. Die Lebern der Tiere wurden behutsam unter Zuhilfenahme einer stumpfen Pinzette mobilisiert, sodass der Blick auf das Diaphragma frei war. Hierbei konnte sich ein Ligament zwischen Leber und Zwerchfell zeigen, welches vorsichtig durchtrennt wurde. Um die Sicht zu optimieren, wurde eine Klemme am Xiphoid befestigt und umgeschlagen fixiert. Unter dem Diaphragma stellte sich so die Herzspitze dar (siehe Abbildung 11).

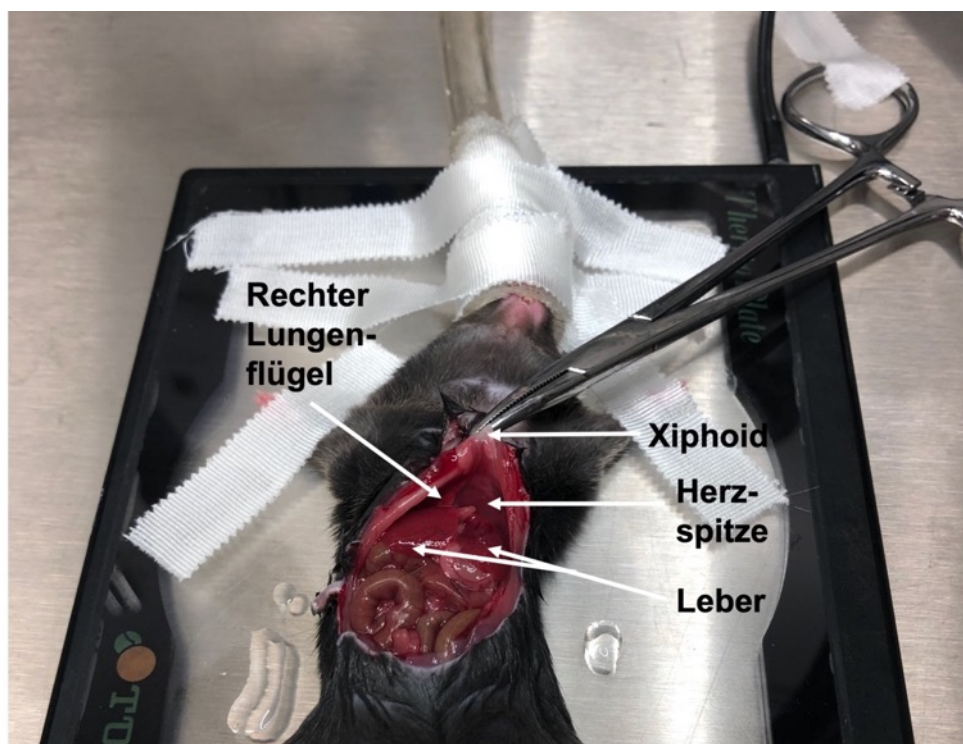


Abbildung 11: Vorbereitung der kardialen Blutentnahme einer LAD-ligierten Maus

Das eröffnete Abdomen ermöglichte die Sicht auf die Organe. Durch das Diaphragma sind die Herzspitze und der rechte Lungenflügel zu erkennen. Die Ansicht auf die Herzspitze variierte, da durch die Folgen der LAD-Ligatur die Anatomie der Herzspitze individuell beeinträchtigt war.

Das Herz wurde mit einer 30G-Kanüle und einer 1-ml-Spritze im 30°-Winkel punktiert. Bei erfolgreicher Punktion sollte die Position der Spritze nicht mehr geändert werden. Minimale Bewegungen konnten zum Sistieren des Blutflusses führen. War dies der Fall, wurde die Position vorsichtig korrigiert, bis mindestens 1ml Blut aus dem Herzen gewonnen war.

Nach der Punktion wurde das Blut in ein EDTA-Röhrchen (MiniCollect EDTA Röhrchen, Greiner Bio-One) überführt und 10 Minuten bei 6700 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Ohne das Zellpellet zu berühren wurde das Plasma mit einer Pipette abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

(3) Infarktquantifizierung mittels Triphenyltetrazoliumchlorid Färbung

Nach der kardialen Punktion wurde das Diaphragma mit einer Federschere eröffnet, um das Herz für die weitere Untersuchung zu entnehmen. Die thorakale Aorta wurde freipräpariert. Anschließend wurde die *Aorta ascendens* mit einer spitzen Pinzette 1-2 mm über ihrem Ursprung gehalten und mit der Federschere eng darüber durchtrennt. Das Herz wurde in PBS auf Eis gelagert und von Blut befreit. Anschließend wurde es bei -20 °C eingefroren, um das spätere Zerteilen in Scheiben zu ermöglichen. Die eingefrorenen Herzen wurden nach 60 Minuten mittels 22er Skalpell vom Knoten der LAD-Ligatur ausgehend nach apikal in fünf Scheiben geteilt und in lichtundurchlässige Mikroreaktionsgefäße gegeben. Diese wurden mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) befüllt, sodass die Herzscheiben vollständig bedeckt waren und anschließend 5 Minuten in einem 38 °C warmen Wasserbad erhitzt. TTC färbte metabolisch aktive Zellen rot, während infarzierte Zellen ungefärbt blieben. Anschließend wurden die Herzscheiben abgetupft, gewogen und fotografiert. Die verschiedenfarbigen Flächen wurden mit dem Programm ImageJ quantifiziert. Anschließend wurde anhand der gewonnenen Daten das Infarktgewicht errechnet:

$$\text{Infarktgewicht [g]} = \text{Herzscheibengewicht [g]} \times \left(\frac{\text{Infarktfläche [Pixel]}}{\text{Gesamtfläche der Herzscheibe [Pixel]}} \right)$$

3.2.4. Post-MI Plasmaanalysen

(1) Quantifizierung zellfreier DNA

Die zellfreie DNA (cfDNA) in den Plasmaproben wurde mit dem Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay-Kit (Invitrogen) bestimmt. Das fluoreszierende PicoGreen-Reagenz band spezifisch an doppelsträngige DNA (dsDNA), die sich in den Plasmaproben der Mäuse befand. Das Fluoreszenzsignal wurde gemessen. Im Vergleich zu einer in jedem Ansatz gemessenen DNA-Standardkurve wurden die DNA-Konzentrationen in den Plasmaproben ermittelt.

Dazu wurden 50 µl der Plasmaproben nach gründlichem Vortexen auf eine schwarze 96-Well-Platte aufgetragen. Jede Probe wurde in vier Wells aufgetragen, sodass eine Doppelbestimmung mit dem PicoGreen-Reagenz und eine Doppelbestimmung des Leerwerts mit PBS gemessen wurde. Bei zu geringem Plasmavolumen wurde die Probe mit PBS im Verhältnis 1:2 oder 1:3 verdünnt. Das PicoGreen-Reagenz wurde im Verhältnis 1:1000 in PBS verdünnt und es wurden jeweils 150 µl pro Well hinzugefügt. Zur Bestimmung des Leerwerts wurden alternativ 150 µl PBS genutzt. Der DNA-Standard (dsDNA from Calf Thymus, Sigma Aldrich) wurde ebenso doppelt als Mess- und Leerwert bestimmt. Die Konzentrationen entsprachen den Referenzwerte für 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml und 0,125 µg/ml. Sobald die 96-Well-Platte mit PicoGreen aufgefüllt war, wurde die Fluoreszenz mit dem Victor X3 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer) gemessen.

Der durchschnittliche Leerwert wurde vom durchschnittlichen Messwert jeder Plasmaprobe abgezogen. Anschließend konnte unter Zuhilfenahme der Standardkurve die DNA-Konzentration jeder Probe bestimmt werden. Wenn die Plasmaprobe zuvor verdünnt wurde, musste die ermittelte Konzentration mit dem entsprechenden Faktor multipliziert werden.

(2) Quantifizierung von Zytokinen

Aufgrund des limitierten Blutvolumens der Mäuse, das durch die kardiale Punktion gewonnen werden konnte, war das Plasmavolumen begrenzt. Um trotzdem mehrere Immunmediatoren erfassen zu können, wurde ein Multiplex Immunassay verwendet. Das Verfahren basiert auf einer Weiterentwicklung des *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Prinzips: Detektionsantikörper sind an Fluoreszenz- oder Streptavidin-kodierte magnetische Beads verbunden, die flusszytometrisch einem Zielprotein zugeordnet werden können.¹³⁵ So können im Gegensatz zum ELISA mehrere Zielproteine in einer Probe quantifiziert werden. Es wurde der ProcartaPlex Multiplex Immunoassay der Firma Thermo Fisher genutzt. Das Kit wurde mit entsprechenden Beads zur Bestimmung von acht Zielproteinen zusammengestellt: MCP-1, IL-6, TNF- α , Interleukin-1B (IL-1B), Interleukin-4 (IL-4), IL-10, Makrophagen-inflammatorisches Protein-1 α (MIP-1 α) und Interferon γ (IFN- γ). Die Arbeitsschritte wurden gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt und mit dem Luminex 200 System (R&D Systems) ausgelesen.

(3) Quantifizierung von kardialem Troponin T

Die cTNT-Konzentration in den Mausplasmaproben wurde mit dem Mouse cTNT/TNNT2 ELISA Kit der Firma ImmunoWay gemäß dem Herstellerprotokoll bestimmt. Das Kit folgt dem

Prinzip eines Sandwich-ELISA. Die im Lieferumfang enthaltenen Platten sind mit einem Antikörper beschichtet, der spezifisch murines cTNT/TNNT2 bindet und immobilisiert. Der Detektionsantikörper bindet cTNT und ist mit Biotin gekoppelt, wodurch die Bindung von Streptavidin-HRP erfolgt. Tetramethylbenzidin wird durch Streptavidin-HRP oxidiert, was zu einer farbmtrischen Reaktion führt. Die Intensität der Färbung wurde mit dem VictorX3 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer) quantifiziert. Anhand einer Standardreihe konnte die Konzentration von cTNT in der Plasmaprobe berechnet werden.

3.2.5. Versuche an nativen murinen PMNs

(1) PMN-Isolation aus dem Knochenmark mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die Versuchstiere wurden kurz vor Beginn der Isolation durch die zervikale Dislokation des Schädels getötet. Unmittelbar danach wurde die Haut der unteren Extremitäten entfernt. Nach Freilegung der Extremität wurde der Beckenring mit einer Schere durchtrennt und der Fuß entfernt. Danach wurde die Muskulatur von Femur und Tibia gelöst. Die freigelegten Knochen wurden in PBS auf Eis gelagert. Eine weitere Petrischale wurde mit HBSS Präparationslösung (HBSS prep) auf Eis vorbereitet. Nun wurde der Femurkopf, die Epikondylen, der Tibiakopf und der *Malleolus medialis* entfernt. Das Knochenmark wurde über eine 26G Kanüle mit HBSS prep aus den Röhrenknochen in die Petrischale gespült, bis der Knochen transparent erschien. Die HBSS-prep-Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit durch einen 70 µm Filter von größeren Gewebs- und Knochenbestandteilen befreit. Es folgte die Zentrifugation bei 15 °C für 5 Minuten bei 400 g. Der Überstand, der sich bildete, wurde vorsichtig abgegossen.

Anschließend erfolgte die osmotische Lyse der Erythrozyten. Das Pellet wurde 45 Sekunden lang in 6 ml 0,2 %iger Natriumchloridlösung bei Raumtemperatur resuspendiert. Die Reaktion wurde mit 6 ml 1,2 %iger Natriumchloridlösung gestoppt und es folgte die Zentrifugation bei 400 g für 5 Minuten bei 15 °C. Nach der Entfernung des Überstands wurde das Pellet in 5 ml HBSS resuspendiert.

Die PMNs wurden durch einen Percoll-Dichtegradienten von der übrigen Zellpopulation getrennt. Dazu wurden 5 ml 62 % Percoll in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und anschließend mit der HBSS-Zellsuspension überschichtet. Das Falcon wurde für 30 Minuten bei 1000 g und Raumtemperatur ohne Bremsfunktion zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das Pellet, in dem sich die PMNs befanden, in

10 ml HBSS prep resuspendiert und so gespült. Nach einer Zentrifugation bei 400 g und 15 °C für 5 Minuten wurde das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert.

(2) Bestimmung der Zellzahl

Nach der Isolation wurde durch die Neubauer Zählkammer die PMN-Konzentration bestimmt. In der Neubauer-Zählkammer befinden sich fest definierte Messfelder. Durch das Zählen der Zellen in den Quadraten konnte die Zellkonzentration der Flüssigkeit errechnet werden. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:3 mit Trypanblau verdünnt und auf die Zählkammer aufgetragen. Unter dem Mikroskop wurde die Zellzahl in vier Eckquadraten (L-Form) gezählt. Gezählt wurden die Zellen, die nicht durch Trypanblau gefärbt und damit vital waren. Die Konzentration wurde durch folgende Formel ermittelt:

$$c \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{gezählte Quadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Die Zielkonzentration zur Färbung der Zellbestandteile betrug $1,5 \times 10^6/\text{ml}$. Das erforderliche Volumen wurde in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und anschließend zentrifugiert. Nach 5 Minuten bei 15 °C und 400 g wurde der Überstand vorsichtig entfernt und die Zellen in RPMI-Medium mit 2 % FCS und Penicillin und Streptomycin (P/S) resuspendiert.

(3) Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-D-Lysin

Poly-D-Lysin (Sigma-Aldrich) wurde im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. 300 µl wurden jeweils auf runde 12 mm Deckgläser gegeben, die in 12-Well-Platten platziert waren. Es folgte die Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten. Danach wurden die Deckgläser mit 1 ml sterilem PBS gewaschen und eine Stunde unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden sie bei 4 °C über Nacht gelagert.

(4) Stimulation der NET-Freisetzung aus PMN mit PMA oder Ionomycin

In jedes Well wurden $1,5 \times 10^5$ PMN in 500 µl RPMI-Medium mit 2 % FCS und P/S ausgesät. Nach mindestens 30 Minuten Inkubation bei 37 °C hafteten die Zellen an den Deckgläsern und konnten zur NET-Freisetzung stimuliert werden. Die PMA-Stocklösung (1mM) wurde mit RPMI-Medium mit 2 % FCS und P/S zu einer Arbeitslösung mit einer Konzentration von 10 µM vorverdünnt. 2,5 µl der Arbeitslösung wurden pro Well für die Stimulation eingesetzt, sodass eine Stimulationskonzentration von 50 nM PMA erreicht wurde. Der Ionomycin-Stock (1,33mM) wurde äquivalent dazu zu einer Arbeitslösung mit einer Konzentration von 266 µM in RPMI-Medium mit 2 % FCS verdünnt. Zur Stimulation wurden 7,5 µl der Arbeitslösung pro Well eingesetzt, wodurch die Zielkonzentration von 4 µM Ionomycin pro Well erreicht wurde.

Die PMNs wurden zur Stimulation für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig mit der Pipette aus den Wells genommen, ohne dabei die Oberfläche der Deckgläser zu berühren und mit 1 ml PBS gewaschen. Zur Fixierung der PMNs wurden jeweils 800 µl 4 % Paraformaldehyd aufgetragen und für 50 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen und bei 4 °C über Nacht gelagert.

(5) Nachweis der NET-Freisetzung durch Immunfluoreszenz

Die Deckgläser wurden aus den Wells entnommen, vorsichtig auf Zellstoff abgetupft und in eine lichtundurchlässige feuchte Kammer zur Immunfärbung gelegt. Pro Deckglas wurden 300 µl Blockierungspuffer aufgetragen und 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit an den Seiten der Deckgläser mit einer Pipette abgenommen und das Glas abgetupft. Nun wurden die Deckgläser mit 200 µl 1:100 verdünntem polyklonalem Kaninchen anti-MPO-Antikörper (ab9535, Abcam) in Färbepuffer, für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Färbung von citrulliniertem Histon H3 (citH3) wurde alternativ ein polyklonaler Kaninchen anti-citH3-Antikörper (ab5103, Abcam), in einer Verdünnung von 1:500 in Färbepuffer verwendet. Die Färbung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkeit abgenommen, und die Zellen viermal vorsichtig mit PBS gewaschen. Dann wurde Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper (rabbit IgG AF 488, 4412S, Cell Signaling Technology) in 1:1000 Verdünnung aufgetragen und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper wurde mit Blockierungspuffer angesetzt. Erneut wurde die Flüssigkeit abgenommen und viermal mit PBS gewaschen. Zur Markierung der DNA wurden die Gläschen für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in einer Konzentration von 1 ng/ml inkubiert. Die Zellen wurden viermal mit PBS gewaschen und anschließend wurde 1 ml steriles Wasser für 2 Minuten auf die Gläschen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit Fluorescence Mounting Medium eingedeckt und mit dem Fluoreszenzmikroskop (Eclipse Ti-U Fluoreszenz Microscope, Nikon) analysiert.

3.3 Statistik

Alle Statistischen Analysen wurden mittels der GraphPad Prism 9 Software (GraphPad) erstellt. Um die Daten auf Normalverteilung zu überprüfen wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Wenn die Daten normalverteilt waren, wurde der ungepaarte t-Test zur Überprüfung der Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Gruppen genutzt. Nicht normalverteilte Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen. Zur Analyse von zwei Faktoren über mehrere Gruppen wurde der Two-way-ANOVA Test mit anschließendem

Tukey-Post-hoc-Test durchgeführt. In jedem Fall wurde das Signifikanzniveau als p kleiner als 0,05 definiert. Die Daten wurden als Säulendiagramme mit Standardabweichung $\pm$ Mittelwert dargestellt, wobei die einzelnen Datenpunkte dargestellt wurden.

4. Ergebnisse

4.1 PMNs von PAD4^{-/-}-Mäusen bilden keine NETs *in vitro*

Zur funktionellen Validierung des PAD4^{-/-}-Genotyps wurden PMNs aus dem Knochenmark isoliert und mit Ionomycin zur NETose stimuliert. Im Rahmen der NETose katalysiert PAD4 die Deiminierung von Argininresten im Histon H3 zu citH3. Nach der Stimulation wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung von MPO, citH3 und DAPI potenziell gebildete NETs dargestellt. Unbehandelte PMNs zeigten eine Kollokalisierung von MPO (grün) oder citH3 (grün) und DNA (blau). WT-PMNs bildeten nach Ionomycin-Stimulation NETs, die durch extrazelluläre DNA-Fäden (blau) mit angelagertem MPO oder citH3 (grün) sichtbar wurden. PAD4^{-/-}-PMNs zeigten trotz der Stimulation mit Ionomycin, keine NET-Bildung (siehe Abbildung 12). So konnte nachgewiesen werden, dass in PAD4^{-/-}-PMNs eine effektive Hemmung der NETose in PMNs erreicht wurde.

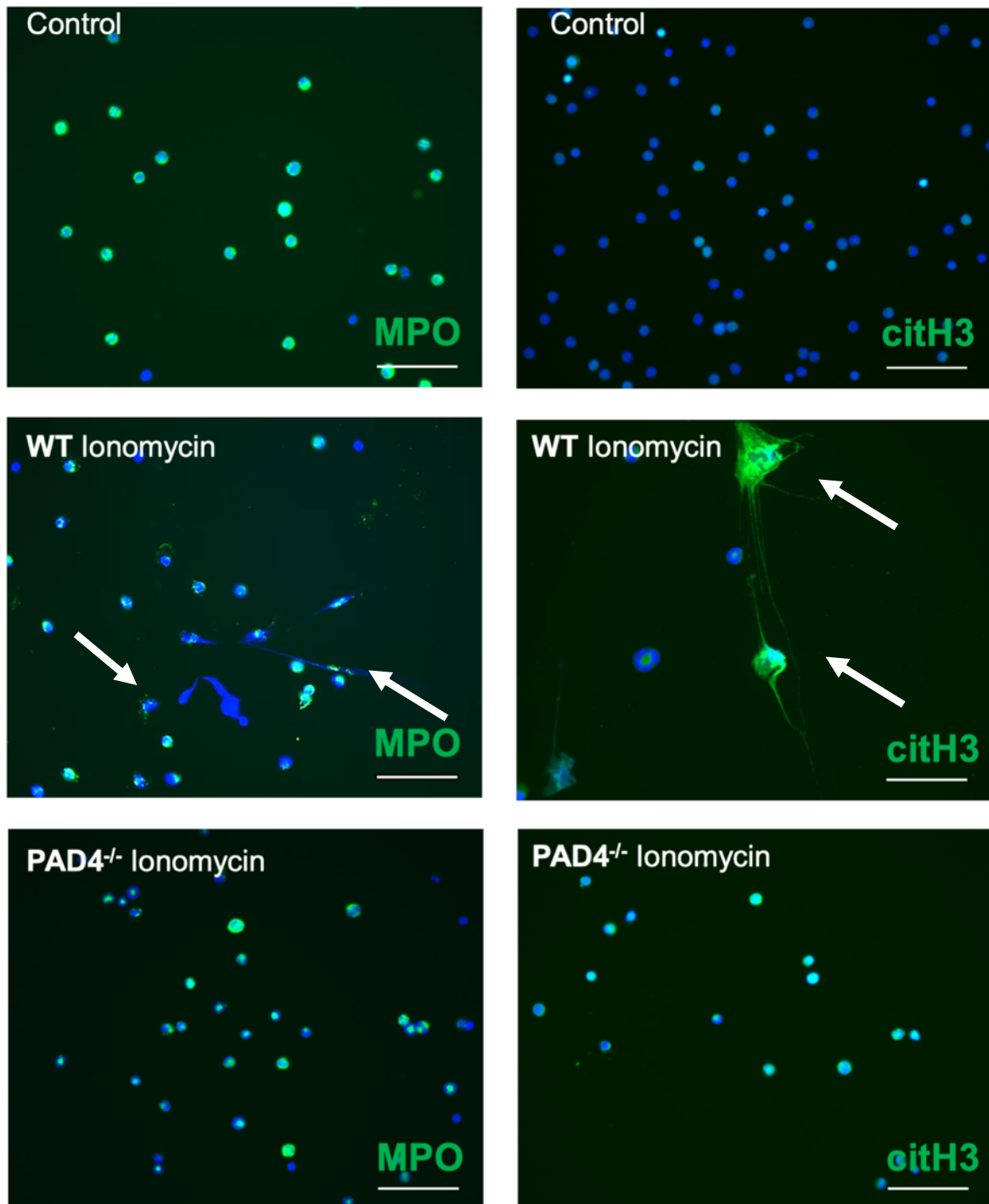


Abbildung 12: PAD4^{-/-}-PMNs zeigten keine NETose nach Ionomycin-Stimulation

PMNs wurden aus dem Knochenmark von WT-Mäusen bzw. PAD4^{-/-}-Mäusen isoliert. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung von MPO oder citH3 (grün) sowie die Färbung der DNA mittels DAPI (blau). Ionomycin-stimulierte WT-PMNs zeigten NETs-Bildung. Die NETs sind durch Pfeile markiert. Die Ionomycin-Stimulation von PAD4^{-/-}-PMNs führte nicht zur NETs-Bildung.
Skalierung: 50 µm

Zur quantitativen Bestätigung der NETose-Defizienz in PAD4^{-/-}-PMNs wurde der Anteil der cfDNA in den Zellüberständen von PMNs gemessen, die im Vorfeld mit Ionomycin stimuliert wurden. In unbehandelten Proben beider Genotypen lag das Signal bei etwa 2000 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU). Die Ionomycin-Stimulation der PAD4^{-/-}-PMNs führte zu keinem signifikanten Anstieg des Fluoreszenzsignals. Im Überstand der WT-PMNs stieg das Fluoreszenzsignal signifikant auf etwa 2500 RFU durch die Ionomycin-Stimulation an. Die Differenz zwischen den stimulierten PAD4^{-/-}-Zellen und WT-Zellen war nahezu signifikant ($p = 0,057$) (siehe Abbildung 13). Die Ergebnisse bestätigen, dass PAD4^{-/-}-PMNs keine NETs freisetzen können.

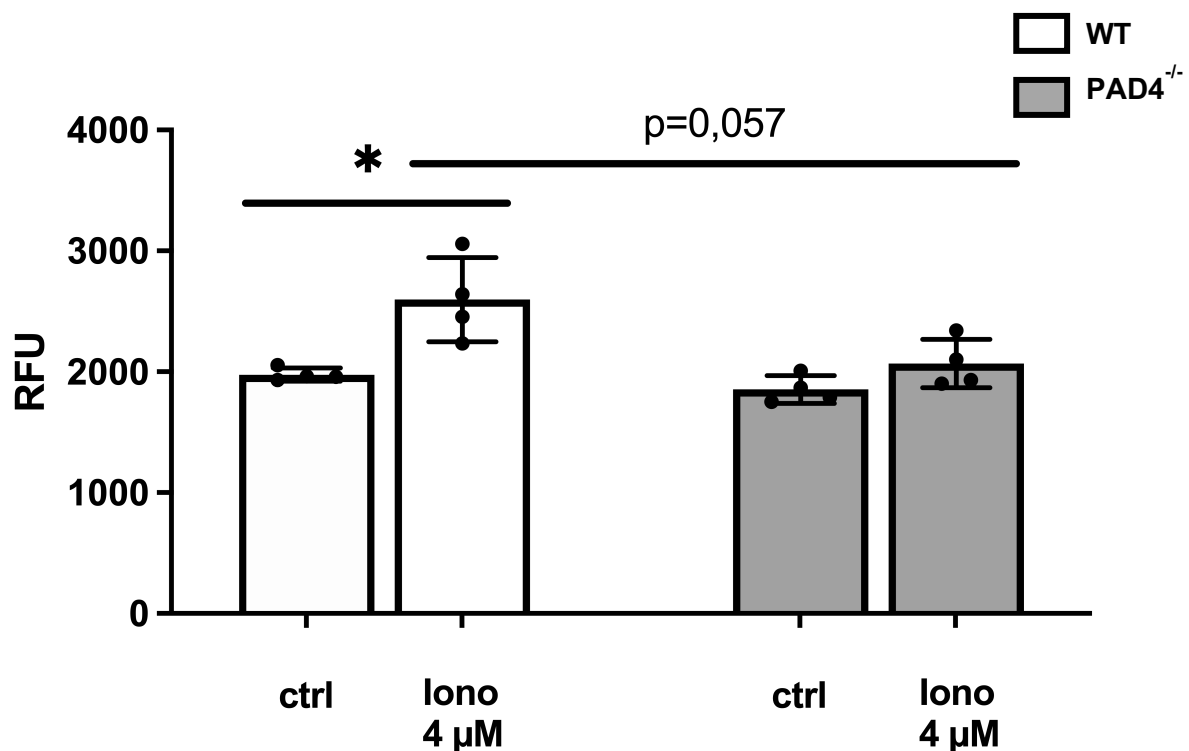


Abbildung 13: PAD4^{-/-}-PMNs produzierten nach Stimulation weniger cfDNA

Die NETs-Bildung wurde *in vitro* durch Stimulation von PMNs mit 4 μm Ionomycin für 3 Stunden bei 37 °C induziert. Anschließend wurde die cfDNA in den Zellüberständen durch das Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay gemessen und als relative Fluoreszenzeinheit (RFU) dargestellt. Die Ionomycin-Stimulation zeigte nur im Zellüberstand der WT-PMNs einen signifikanten Anstieg des Fluoreszenzsignals im Vergleich zur unbehandelten Probe. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt; jeder Punkt entspricht einem Datenpunkt; $n = 4$; * $p < 0,05$; p-Werte ermittelt durch Mann-Whitney-U-Test.

4.2 PAD4^{-/-}-Mäuse erleiden verstärkten myokardialen Schaden nach MI

Zur Untersuchung der Auswirkungen der NETs auf den kardialen Schaden *in vivo*, wurde in PAD4^{-/-}-Mäusen und WT-Mäusen durch Ligatur der LAD ein MI induziert, was einem etablierten MI-Modell in Kleintieren entspricht.¹³¹ An Tag 1 und Tag 3 nach MI wurde das Herz entnommen und die Infarktgröße mit TTC bestimmt. TTC färbt vitale Zellen rot, indem es durch Dehydrogenasen zu rotem Formazan reduziert wird. Nicht-vitales Gewebe bleibt blass (siehe Abbildung 14A).¹³⁶

Die gemessene Infarktfläche wurde auf das Gewicht normiert und als relativer Anteil des Gesamtherzgewichts angegeben. Die Messung des MIs zeigte, dass an Tag 1, der MI im Herz der PAD4^{-/-}-Tiere deutlich größer ausfiel als die der WT-Mäuse: Im Durchschnitt waren 27,36 % des Gewebes bei WT-Mäusen betroffen, bei PAD4^{-/-}-Mäusen waren es 43,07 %. An Tag 3 war durchschnittlich 10,52 % des Myokardgewebes bei WT-Mäusen infarziert und 17,34 % bei PAD4^{-/-}-Mäusen. Die Reduktion der Infarktgröße von Tag 1 zu Tag 3 kann durch die ödematöse Wandschwellung, die dem Infarkt an Tag 1 folgt, erklärt werden. Zusätzlich führen frühe Abbauprozesse der infarzierten Zellen zur Reduktion des infarzierten Bereichs.¹³⁷ Die Infarktflächenreduktion der PAD4^{-/-}-Mäuse von Tag 1 zu Tag 3 fiel stärker aus, als die der WT-Mäuse und zeigte einen Trend zur Signifikanz ($p = 0,057$) (siehe Abbildung 14B). Diese Ergebnisse belegen, dass PAD4^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen insbesondere in der akuten Phase größere MIs aufweisen.

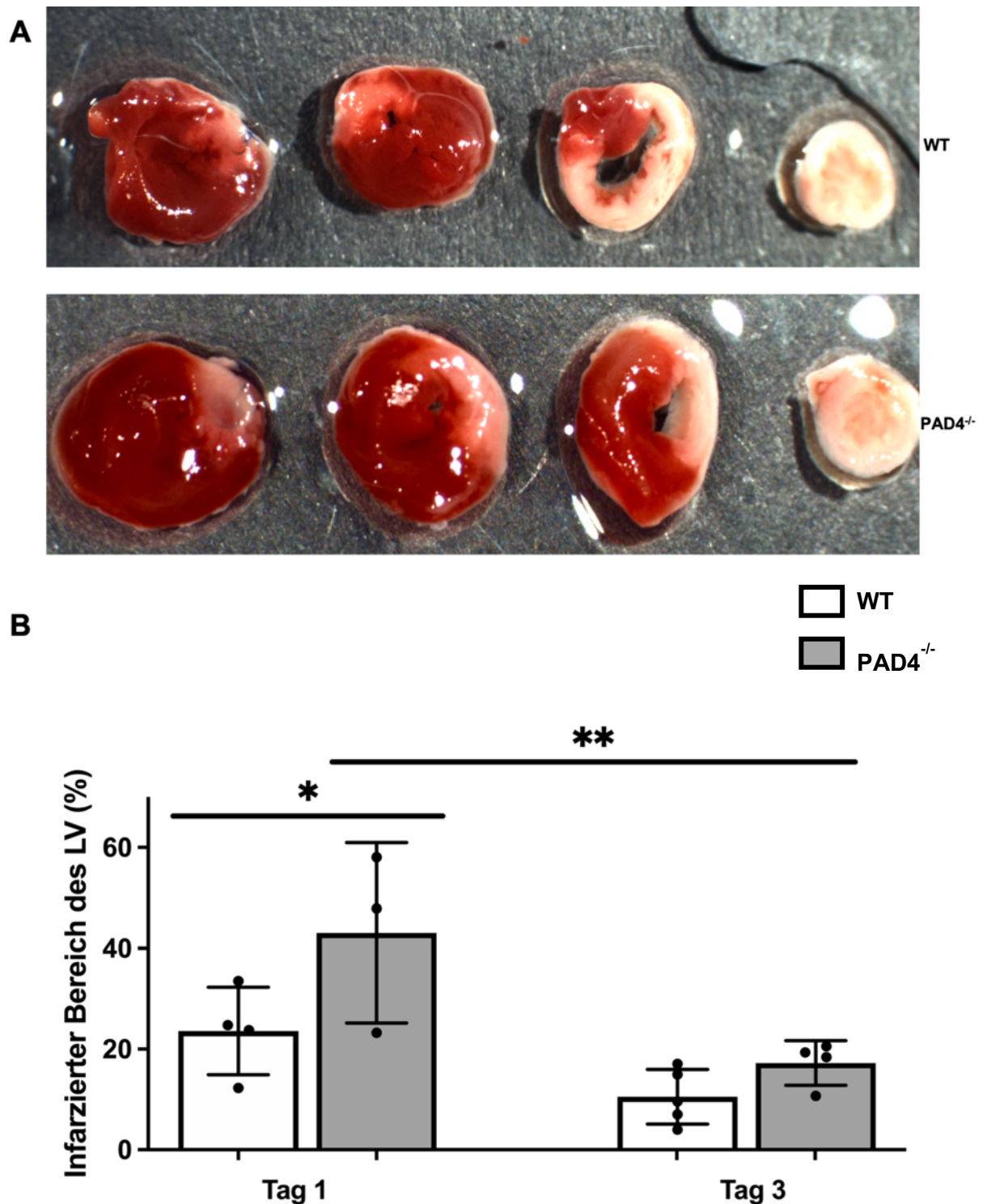


Abbildung 14: PAD4^{-/-}-Mäuse zeigen größeres Infarktareal

(A) Repräsentative TTC-Färbung des Myokards von WT- und PAD4^{-/-}-Mäusen an Tag 1 nach MI. Vitales Gewebe wurde rot gefärbt, infarziertes Gewebe erschien hellrosa bis weiß. (B) Quantifizierung des infarzierten Myokards einen Tag (n=3) und drei Tage (n=5) nach MI. Mit dem Computerprogramm ImageJ wurde die infarzierte Fläche ermittelt und anschließend auf das Herzgewicht normiert. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt; jeder Punkt entspricht einem Datenpunkt; * p < 0,05, ** p < 0,01; p-Werte ermittelt durch two-way ANOVA Test und Tukey-Post-hoc-Test.

Die cTNT-Konzentration gilt nicht nur als diagnostisches Kriterium für MIs, sondern korreliert 72 Stunden nach MI auch mit der Größe des Myokardschadens und kann daher zur Quantifizierung herangezogen werden.¹³⁸ Plasmaproben wurden an Tag 1 und Tag 3 nach MI gesammelt. Anschließend wurde mittels ELISA die cTNT-Konzentration in allen Gruppen ermittelt. Die cTNT-Konzentrationen wurden mit den Werten der Sham-Mäuse des jeweiligen Genotyps verglichen. Der Anstieg von cTNT beginnt zwei bis vier Stunden nach dem MI und hält bis zu 14 Tage an.¹³⁹ Es zeigte sich, dass in Plasmaproben der Sham-Tiere beider Genotypen keine relevanten cTNT-Konzentrationen nachweisbar waren. An Tag 1 konnte signifikant erhöhtes cTNT im Plasma der PAD4^{-/-}-Mäuse im Vergleich zur Sham-Kontrollgruppe gemessen werden. Die cTNT-Plasmakonzentration der PAD4^{-/-}-Mäuse war signifikant höher als die der WT-Mäuse. Bis Tag 3 reduzierte sich die Konzentration signifikant (siehe Abbildung 15). Zusammen mit den Ergebnissen der Infarktquantifizierung deutet auch die erhöhte cTNT-Konzentration im Plasma der PAD4^{-/-}-Mäuse auf einen größeren kardialen Schaden an Tag 1 nach MI hin. Außerdem konnte bestätigt werden, dass der Eingriff ohne LAD-Ligatur keinen myokardialen Schaden verursachte.

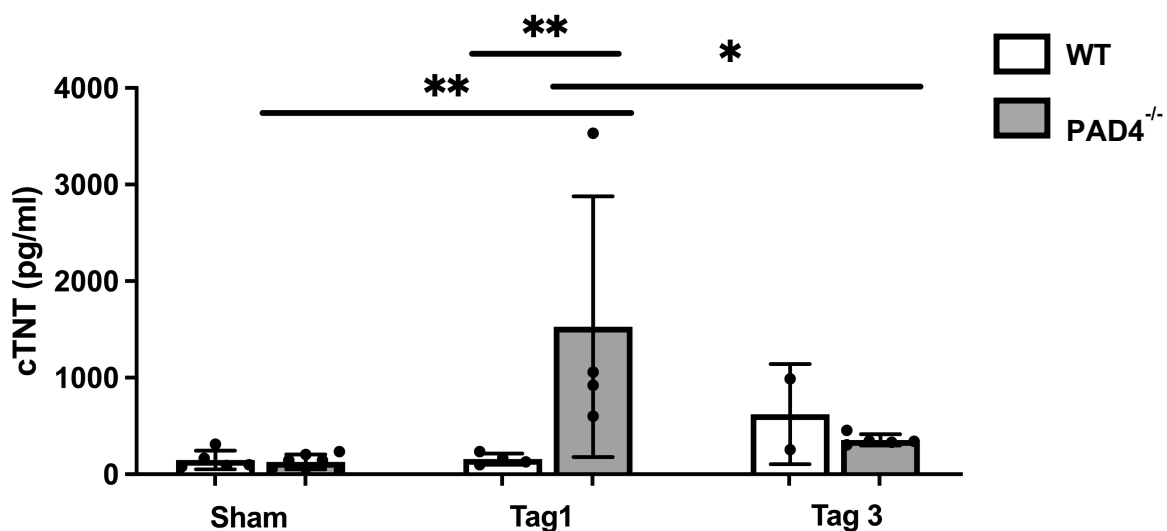


Abbildung 15: Erhöhte cTNT-Plasmakonzentration in PAD4^{-/-}-Mäusen in der akuten Phase nach MI

Die Plasmatroponinspiegel an Tag 1 (n=5-7) und Tag 3 (n=2-3) nach MI wurden durch ELISA ermittelt. Als Kontrollgruppe dienten Plasmaproben der Sham-operierten Mäuse. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt; jeder Punkt entspricht einem Datenpunkt; * p < 0,05; ** p < 0,01; p-Werte ermittelt durch two-way ANOVA-Test mit Tukey-post-hoc-Test.

Darüber hinaus wurde die cfDNA-Konzentration im Plasma der Versuchstiere an Tag 1, Tag 3, und Tag 21 nach MI bestimmt. In diesem Kontext kann die cfDNA-Plasmakonzentration einen weiteren Hinweis auf das Ausmaß des zellulären Schadens geben, der durch die MIs entstand. Als Vergleich dienten die Sham-Kontrollgruppen. Im Plasma der PAD4^{-/-}-Mäuse stieg

die cfDNA-Konzentration an Tag 1 signifikant im Vergleich zu den Werten der WT-Gruppe an. Die cfDNA-Konzentration war zudem signifikant höher als im Plasma der Sham-Mäuse. An Tag 3 war die cfDNA-Plasmakonzentration der PAD4^{-/-}-Mäuse signifikant geringer als an Tag 1. In WT-Mäusen war die cfDNA-Konzentration vergleichbar mit denen der Sham-Kontrollgruppe. (siehe Abbildung 16). Die erhöhte cfDNA-Konzentration im Plasma der PAD4^{-/-}-Mäuse unterstützt, neben cTNT-Konzentration und Infarktquantifizierung, den Befund eines ausgeprägteren myokardialen Schadens nach MI.

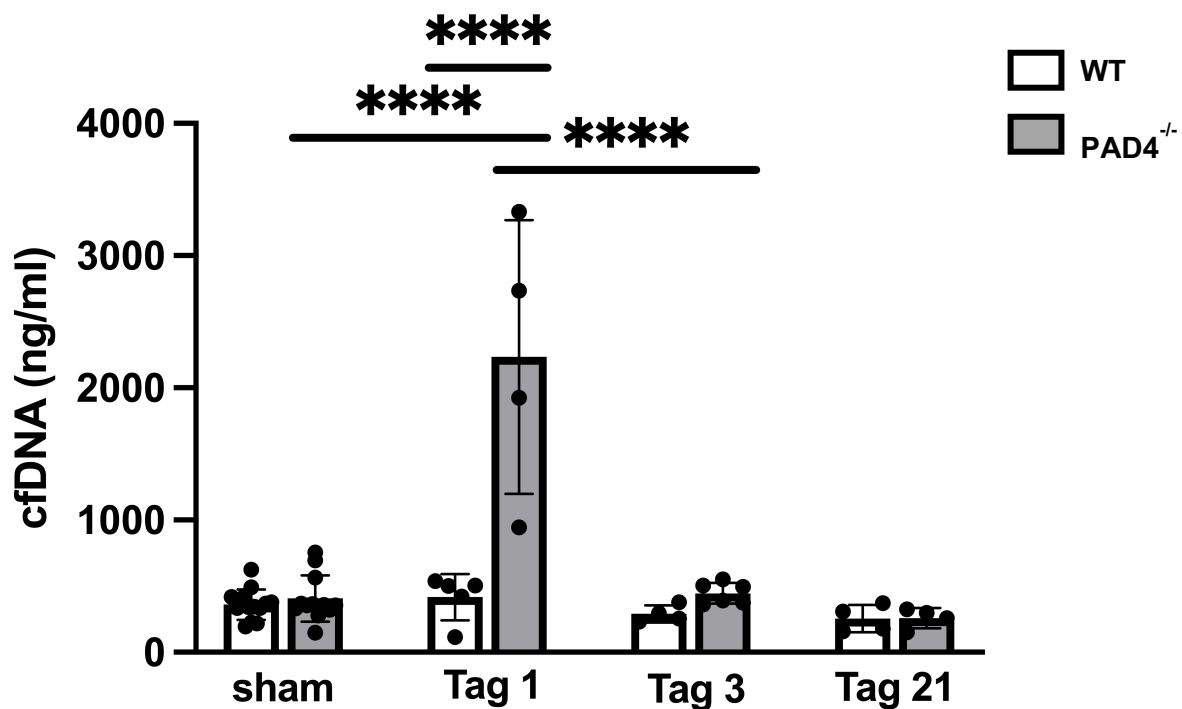


Abbildung 16: Erhöhte cfDNA-Plasmakonzentrationen bei PAD4^{-/-}-Mäusen in der akuten Phase nach MI

Die cfDNA-Konzentration im Plasma der Versuchstiere an Tag 1 (n=4-5), Tag 3 (n=4-6) und Tag 21 (n=4) nach MI wurde durch den Quant-iT Assay bestimmt. Zur Kontrolle wurde die cfDNA-Konzentration der Sham und BL-Mäuse beider Genotypen herangezogen. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt; jeder Punkt entspricht einem Datenpunkt; **** p < 0,0001; p-Werte ermittelt durch two-way ANOVA Test und Tukey-Post-hoc-Test.

4.3 PAD4^{-/-}-Mäuse zeigen eine verstärkte akute inflammatorische Immunantwort nach MI

Zur Analyse der systemischen Immunantwort nach MI, wurden Zytokinkonzentrationen im Plasma der Mäuse an Tag 1 und Tag 3 nach MI bestimmt. Durch die Nutzung des ProcartaPlex 8-plex Immunoassay Kits konnten bis zu acht Zytokine in nur einem Versuchsansatz untersucht werden. Aussagekräftige Daten konnten dabei für TNF- α , IFN- γ , IL-6 und MCP-1 erhoben werden. Die Daten der Sham-Mäuse wurden in einer Gruppe zusammengefasst, da die ausgewählten Immunmodulatoren im Plasma der Sham-Tiere unterhalb der

Nachweisgrenze lag (siehe Abbildung 17). So konnte gezeigt werden, dass der Einfluss auf die Immunreaktion durch die operative Prozedur ohne LAD-Ligatur zu vernachlässigen war.

TNF- α ist ein zentraler Mediator im kardialen Remodeling nach MI: Es fördert indirekt die Degradierung der ECM und begünstigt die Dilatation des linken Ventrikels.¹⁴⁰ Außerdem sind hohe TNF- α -Plasmakonzentrationen mit der Entwicklung einer HI nach MI assoziiert.¹⁴¹ PAD4^{-/-}-Mäuse zeigten an Tag 1 nach MI einen deutlichen und signifikanten Anstieg der TNF- α -Plasmakonzentration auf maximal 11,34 pg/ml (siehe Abbildung 17A). An Tag 3 nach MI normalisierte sich der TNF- α Plasmaspiegel. Die WT-Mäuse zeigten keine signifikanten TNF- α Konzentrationsänderungen nach MI. Die Ergebnisse deuten auf eine ausgeprägtere proinflammatorische Reaktion in PAD4^{-/-}-Mäusen an Tag 1 nach MI hin.

Im Infarktbereich wird IFN- γ vornehmlich von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen freigesetzt. Nach dem Auftreten eines MIs leitet IFN- γ chemotaktisch die Infiltration myeloischer Zellen in das infarzierte Gewebe ein. Die reduzierte Infiltration myeloischer Zellen geht mit einer schlechteren Herzfunktion und einem geringeren Überleben nach MI einher. Besonders in der Akutphase nach einem MI hat IFN- γ eine hohe regulatorische Bedeutung.^{142,143} Die Plasmakonzentration von IFN- γ ist an Tag 3 in der Gruppe der PAD4^{-/-}-Mäuse signifikant höher als die der WT-Mäuse (siehe Abbildung 17B). Die Konzentration betrug bis zu 2,69 pg/ml. Die WT-Mäuse zeigten zu keinem Zeitpunkt nach MI einen Konzentrationsanstieg von IFN- γ .

IL-6 ist ein zentraler inflammatorischer Mediator der akuten Phase nach MI. Es ist mit größeren Infarktarealen und einer ungünstigeren Langzeitprognose assoziiert.^{144,145} An Tag 1 waren die IL-6 Plasmakonzentrationen in PAD4^{-/-}-Mäusen signifikant höher als die der WT-Mäuse (siehe Abbildung 17C). An Tag 3 waren die Konzentrationen wieder geringer und ohne signifikanten Unterschied zueinander und zu denen der Sham-Gruppe.

MCP-1 rekrutiert Makrophagen und Monozyten zum Infarktareal und begünstigt die inflammatorische Gewebsschädigung sowie kardiales Remodeling im Ischämie-Reperfusion-Modell nach MI.¹⁴⁶ Die MCP-1 Plasmakonzentration verhielt sich analog zur IL-6-Plasmakonzentration: An Tag 1 war eine signifikant höhere Plasmakonzentration in den Proben der PAD4^{-/-}-Mäuse als in den Proben der WT-Mäuse messbar (siehe Abbildung 17D).

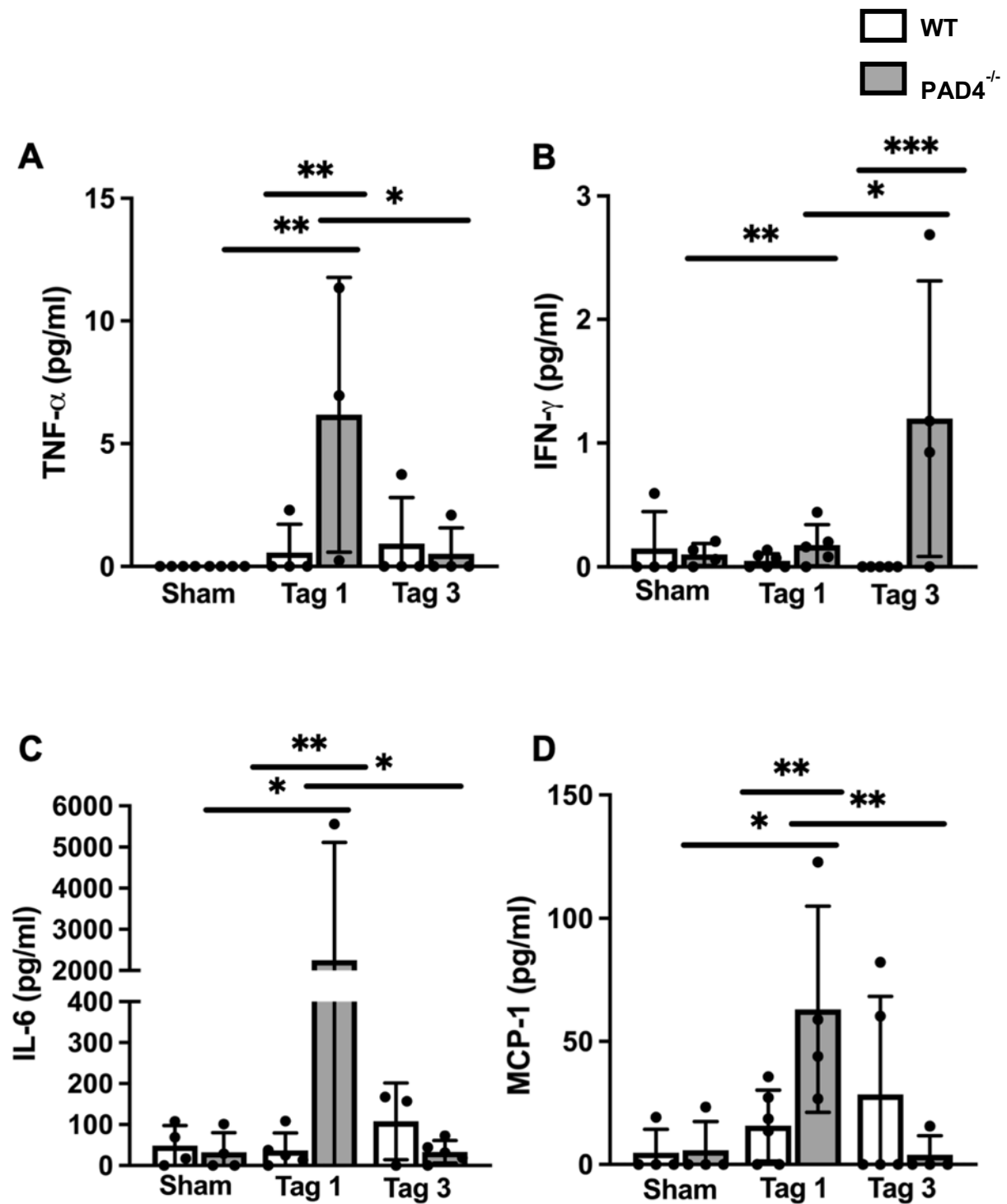


Abbildung 17: TNF-α, IFN- γ, IL-6 und MCP-1 Plasmakonzentration nach MI

Die Plasmakonzentration wurde mit Hilfe des ProcartaPlex 8-plex Immunoassays bestimmt. Dazu wurden Plasmaproben von WT- und PAD4^{-/-}-Mäusen verwendet (n=3-4). Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt; jeder Punkt entspricht einem Datenpunkt; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; p-Werte ermittelt durch two-way ANOVA Test und Tukey-Post-hoc Test.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die proinflammatorische Mediatoren TNF- α , IL-6 und MCP-1 an Tag 1 nach MI im Plasma der PAD4^{-/-}-Mäuse signifikant erhöht waren. Außerdem war das, auf die Inflammation regulatorisch wirkende, IFN- γ im Plasma der PAD4^{-/-}-Mäuse an Tag 3 nach MI erhöht. Dies deutet auf eine gesteigerte frühe Inflammation der PAD4^{-/-}-Mäuse und eine folglich verstärkte Reparaturantwort hin.

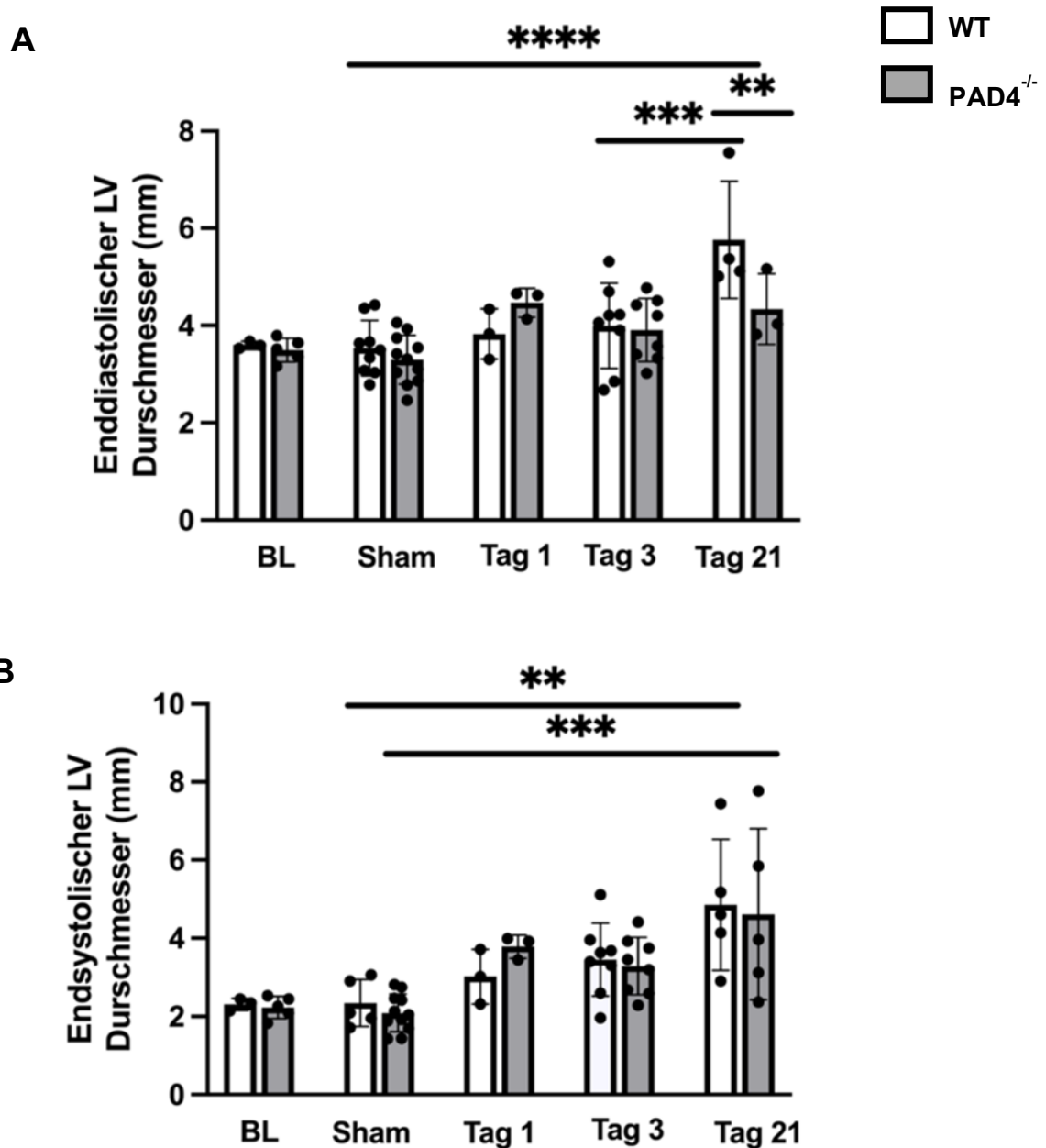
4.4 Die Kontraktionsfähigkeit des Myokards ist bei WT- und PAD4^{-/-}-Mäuse nach Induktion eines MI reduziert

Der Durchmesser des linken Ventrikels im Verlauf der Herzaktion dient als Maß zur Beurteilung der Ventrikelarchitektur sowie der Funktionsfähigkeit des Herzens.¹⁴⁷ Der mittventrikuläre Durchmesser des linken Ventrikels wurde sowohl in der Systole als auch in der Diastole bestimmt. Zwischen den Daten der Sham- und BL-Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede, wodurch gezeigt werden konnte, dass der enddiastolische und endsystolische Ventrikeldurchmesser nicht durch die Thorakotomie beeinflusst wurde. Der enddiastolische Ventrikeldurchmesser beider Genotypen stieg an Tag 1 nach MI nicht signifikant im Vergleich zur Sham-Gruppe an (siehe Abbildung 18A). An Tag 21 zeigte sich ein signifikant erhöhter Ventrikeldurchmesser der WT-Mäuse sowohl im Vergleich zu den Sham-WT-Mäusen als auch im Vergleich zu den WT-Mäusen an Tag 3 nach MI. Der enddiastolische Ventrikeldurchmesser der WT-Mäuse war an Tag 21 signifikant höher als der der PAD4^{-/-}-Mäuse. Die Dilatation des Ventrikels ist zu jedem Zeitpunkt als Konsequenz des kardialen Remodelings nach MI zu verstehen.

Der endsystolische Ventrikeldurchmesser der PAD4^{-/-}-Mäuse war an Tag 21 im Vergleich zur PAD4^{-/-}-Sham-Gruppe signifikant erhöht (siehe Abbildung 18B). Die WT-Mäuse zeigten an Tag 21 auch einen signifikant größeren Ventrikeldurchmesser am Ende der Systole als die WT-Sham-Mäuse. Dies deutete eine reduzierte Inotropie der PAD4^{-/-}-Mäuse und der WT-Mäuse an Tag 21 nach MI an. Der Anstieg des Ventrikeldurchmessers am Ende der Systole in Mäusen beider Genotypen erfolgte, wie es im Rahmen einer progredienten Herzinsuffizienz zu erwarten wäre.³¹ Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen.

Die fraktionelle Verkürzung des linken Ventrikels ist ein echokardiographisches Maß, das zur Beurteilung der systolischen Funktion genutzt werden kann. Sie wird aus dem relativen Unterschied zwischen enddiastolischem und endsystolischem Ventrikeldurchmesser errechnet.¹⁴⁸ Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der fraktionellen Verkürzung der BL- und Sham-Gruppe. Die fraktionelle Verkürzung war in beiden Genotypen an Tag 1

nach MI im Vergleich zur jeweiligen Sham-Gruppe signifikant reduziert und stieg im Verlauf der Zeit nicht signifikant an. Es zeigte sich ein Trend der stärkeren Reduktion der fraktionellen Verkürzung der WT-Mäuse an Tag 1 als die der PAD4^{-/-}-Mäuse, doch dieser Unterschied war nicht signifikant. Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten und zwischen den Genotypen war nicht signifikant (siehe Abbildung 18C).



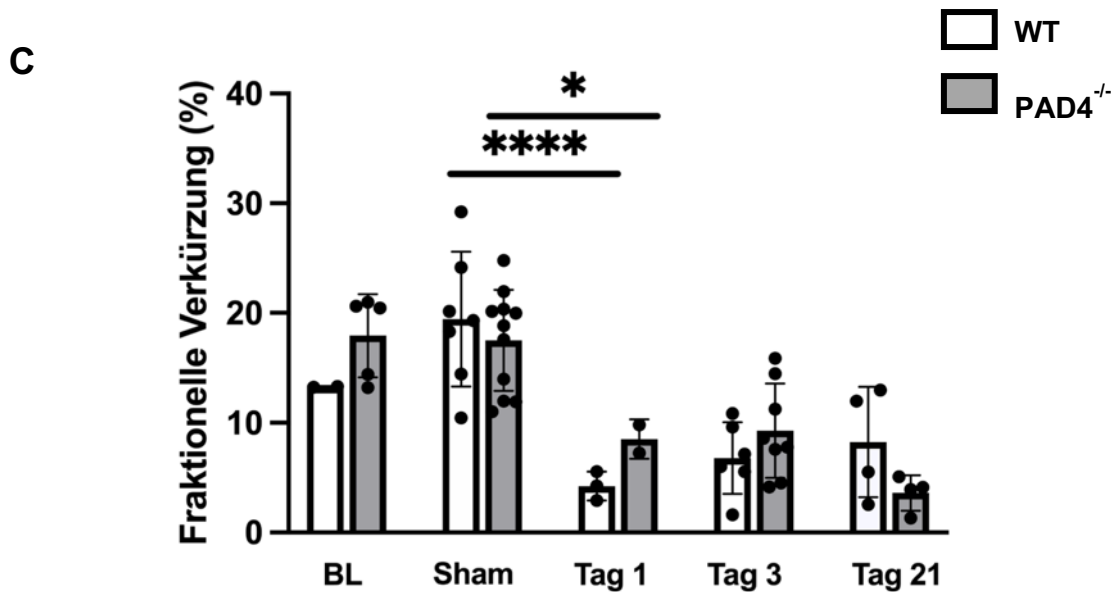


Abbildung 18: Auswirkung des MI auf die Myokardkontraktilität und Ventrikeldurchmesser

Der (A) enddiastolische und der (B) endsystolische mittventrikuläre Durchmesser wurden an Tag 3 und Tag 21 nach MI mittels TTE gemessen und mit Hilfe des VisualSonic Vevo 3100 Imaging System quantifiziert. (C) Darstellung der fraktionellen Verkürzung im M-Mode an Tag 3 und Tag 21 nach MI. BL-Mäuse und Mäuse mit Sham-OP dienten als Kontrolle (n=3-11). Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt; jeder Punkt entspricht einem Datenpunkt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; p-Werte ermittelt durch two-way ANOVA Test und Tukey-Post-hoc-Test.

4.5 Die Ventrikelwand der WT-Mäuse dünnt nach MI stärker aus

Mittels TTE wurde die Breite der linksventrikulären Hinterwand (LVPW) ermittelt. Diese wurde sowohl enddiastolisch (siehe Abbildung 19A) als auch endsystolisch (siehe Abbildung 19B) vermessen. Die LVPW verändert sich durch einen MI und die folgenden Remodelingprozesse. Der Wert kann die morphologischen Veränderungen des Herzens unter dem Einfluss des PAD4-Knockout im Vergleich zum WT abbilden. Außerdem kann die LVPW die kardiale Restfunktion beeinflussen.^{148,149} Die Kontrollgruppen beider Genotypen (BL und Sham) zeigten, dass die operative Prozedur keinen Einfluss auf die LVPW hatte. An Tag 1 nach MI zeigte sich endsystolisch eine signifikante Ausdünnung der linken Ventrikelhinterwand in PAD4^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen (siehe Abbildung 19B). An Tag 3 konnte hingegen eine signifikante Reduktion der Ventrikelhinterwand der WT-Mäuse im Vergleich zu PAD4^{-/-}-Mäusen gemessen werden (siehe Abbildung 19A, B). 21 Tage nach MI gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. Die initial geringere LVPW der PAD4^{-/-}-Mäuse an Tag 1 kann als Hinweis auf einen verstärkten akuten Schaden der Myokardstruktur unmittelbar nach MI interpretiert werden. Die höhere LVPW der PAD4^{-/-}-Mäuse an Tag 3 deutet zusammen mit den geringeren enddiastolischen Ventrikeldurchmesser auf einen besseren Funktions- und Strukturerhalt des Myokards im Langzeitverlauf hin.

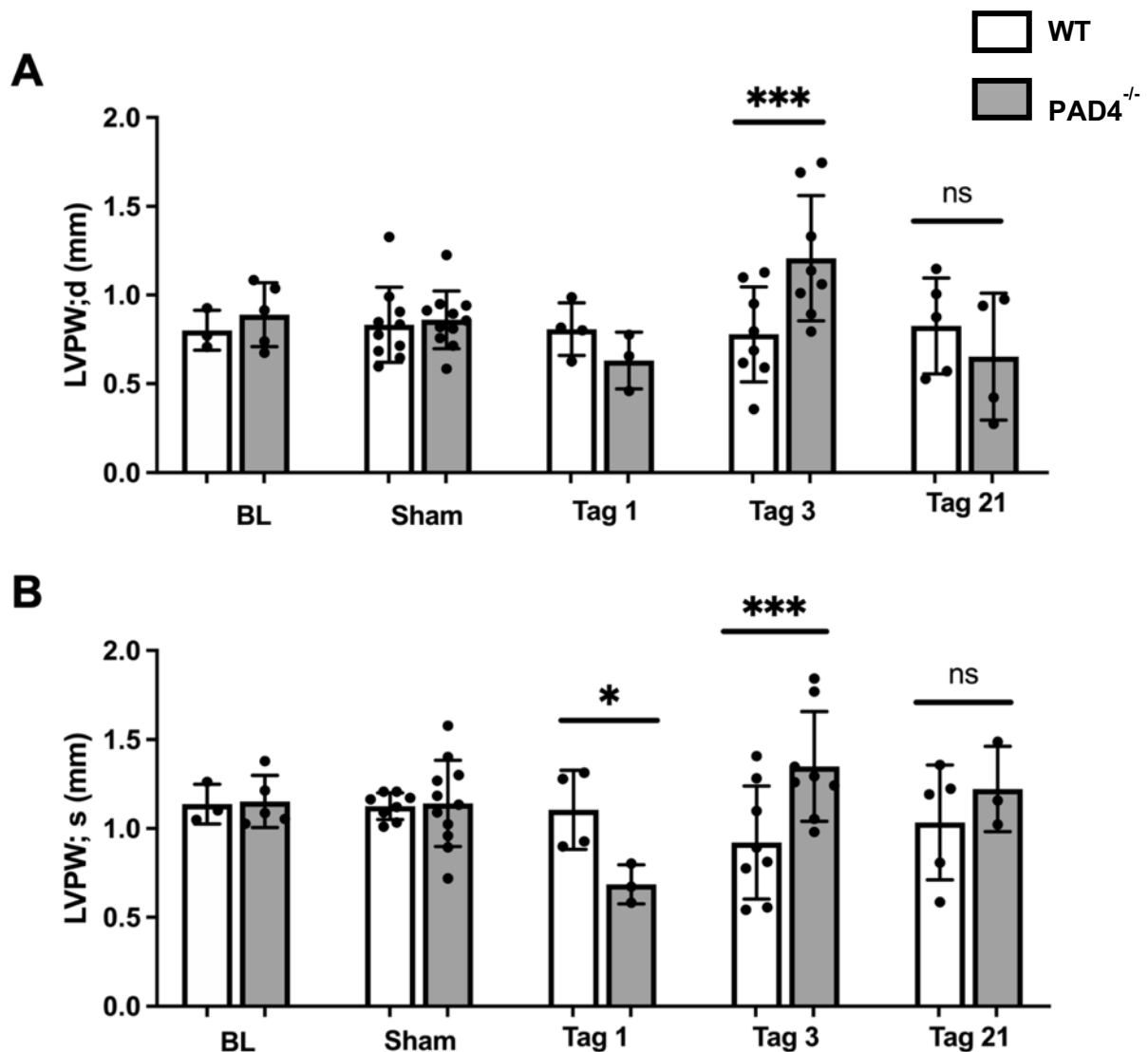


Abbildung 19: Systolische und diastolische LVPW nach MI oder Sham-OP in WT- und PAD4^{-/-} Mäusen

Die LVPW wurde an BL-Mäusen, Sham-Mäusen sowie an Tag 1, Tag 3 und Tag 21 nach MI durch TTE ermittelt (n=3-11). Die Auswertung erfolgte mittels VisualSonics Vevo 3100 Imaging System. **(A)** Die LVPW der Diastole **(B)** Die LVPW der Systole. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt; jeder Punkt entspricht einem Datenpunkt; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; p-Werte ermittelt durch two-way ANOVA Test und Tukey-Post-hoc-Test.

4.6 PAD4^{-/-}-Mäuse zeigten eine langfristig bessere kardiale Funktion nach MI

Mittels TTE wurden nach MI echokardiographische Funktionsparameter des Herzens erhoben. Neben dem enddiastolischen Volumen (EDV), dem Schlagvolumen (SV) und der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) wurde auch das Herzzeitvolumen (HZV) bestimmt. Darüber hinaus konnten die durch den MI aufgetretenen Wandbewegungsstörungen

dargestellt werden. Sie dienten der Validierung der erfolgreichen LAD-Ligatur (siehe Abbildung 20).

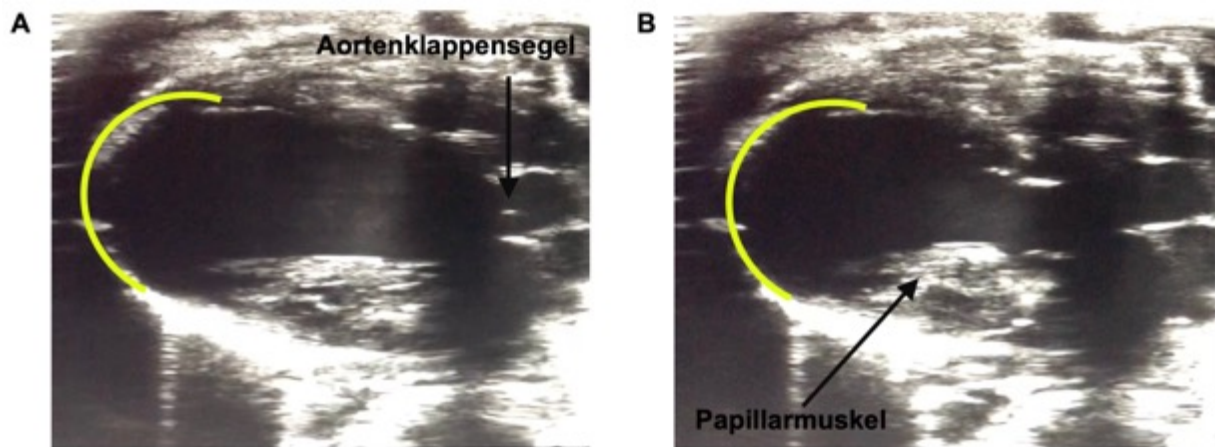


Abbildung 20: Repräsentative Darstellung der parasternalen Längsachse im TTE eines Herzens mit MI an Tag 3

Zur Validierung der MIs eigneten sich TTE-Aufnahmen, in denen die Wandbewegungsstörungen sichtbar wurden, die bei einer suffizienten Ligatur der LAD zu erwarten waren. Die Herzspitze (gelbe Markierung) veränderte ihre Form von der (A) enddiastolischen zur (B) endsystolischen Aufnahme kaum. Alle Aufnahmen wurden mit Hilfe des VisualSonics Vevo 3100 Imaging System ausgewertet.

Das EDV gilt als indirektes Maß für die Vorlast des Herzens. Ein erniedrigtes EDV kann ein Hinweis auf eine diastolische Dysfunktion sein, während ein erhöhtes EDV mit einer dilatativen Herzinsuffizienz einhergehen kann. Das EDV kann als Konsequenz des kardialen Remodelings nach MI bewertet werden.¹⁵⁰ Die Bestimmung des EDV ergab bei BL- und Sham-Mäusen beider Genotypen im Mittel etwa 60 μ l (siehe Abbildung 21). Bis Tag 3 gab es keine signifikanten EDV-Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Sham und BL). Eine nicht signifikante Tendenz zur Erhöhung des EDV der PAD4^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu dem der WT-Mäuse deutete sich jedoch an Tag 1 an. An Tag 21 war das EDV der PAD4^{-/-}-Herzen signifikant erhöht im Vergleich zur Sham-Gruppe. Das EDV der WT-Herzen war an Tag 21 signifikant erhöht im Vergleich zum EDV der WT-Herzen an Tag 3 nach MI. Am finalen Versuchstag, Tag 21, war das EDV der WT-Mäuse signifikant höher als das der PAD4^{-/-}-Mäuse was insgesamt auf eine stärkere diastolische Dysfunktion der WT-Mäuse hindeutet.

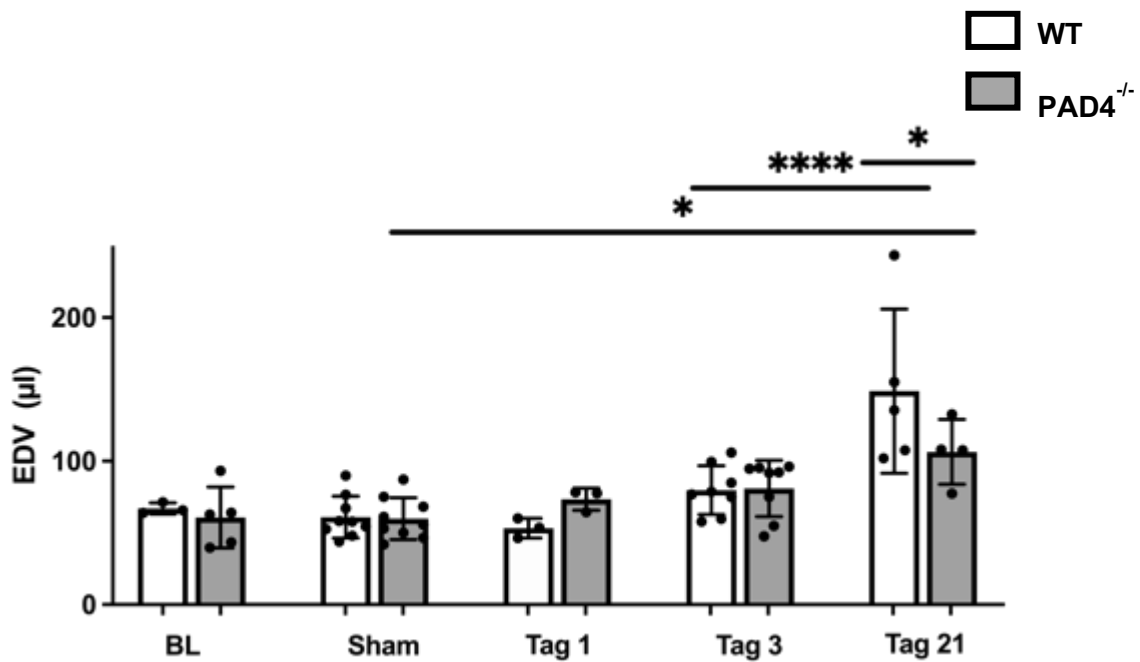


Abbildung 21: EDV nach MI in PAD4^{-/-}-Mäusen und WT-Mäusen

Die Mäuse wurden an Tag 1, Tag 3 und Tag 21 nach MI sowie als BL- und Sham-Mäuse mittels TTE untersucht (n=3-9). Die Auswertung erfolgte anschließend mit Hilfe des VisualSonics Vevo 3100 Imaging System. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt; jeder Punkt entspricht einem Datenpunkt; * p < 0,05, **** p < 0,0001; p-Werte ermittelt durch two-way ANOVA Test und Tukey-Post-hoc-Test

Das SV war zu allen untersuchten Zeitpunkten nach MI in beiden Genotypen reduziert (siehe Abbildung 22). Der Unterschied in den Genotypen war ab Tag 1 signifikant im Vergleich zur BL-Gruppe. Es gab zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen. Das Volumen, das pro Schlag in den Kreislauf gelang, war also in beiden Genotypen trotz erhöhter Füllung des Ventrikels ab Tag 1 reduziert. Dies weist auf eine systolische Funktionsstörung durch den MI hin.

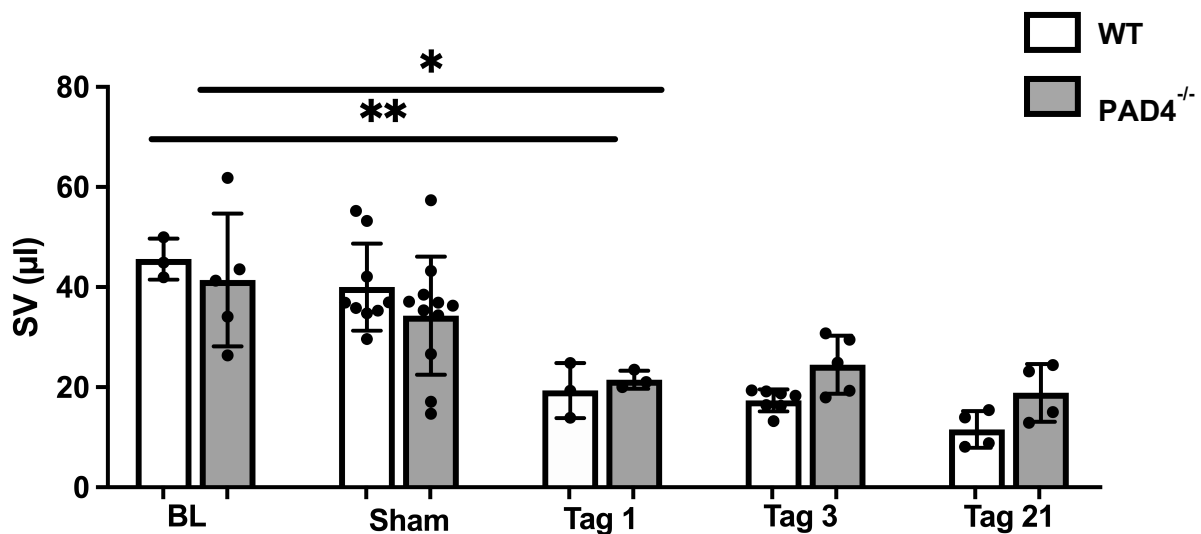


Abbildung 22: SV nach einem MI in PAD4^{-/-}-Mäusen und WT-Mäusen

Die Mäuse wurden an Tag 1, Tag 3 und Tag 21 nach MI sowie als BL und Sham-Mäuse mittels TTE untersucht (n=3-11). Die Auswertung erfolgte anschließend mit Hilfe des VisualSonics Vevo 3100 Imaging System. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt; jeder Punkt entspricht einem Datenpunkt; * p < 0,05, ** p < 0,01; p-Werte ermittelt durch two-way ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test.

Die LVEF ist ein wichtiger diagnostischer Parameter zur Beurteilung der systolischen Herzfunktion.¹⁵⁰ Der Sham-Eingriff verursachte keine deutlichen Abweichungen der LVEF im Vergleich zu den BL-Mäusen (siehe Abbildung 23). Die Kontrollgruppen zeigten eine LVEF von etwa 65 %. Dadurch wurde ausgeschlossen, dass die operative Prozedur selbst einen Einfluss auf die LVEF hatte. Der MI führte in allen Versuchsgruppen zu einer ausgeprägten Reduktion der LVEF, was auf eine systolische Dysfunktion hinwies. Zwischen Tag 3 und Tag 21 reduzierte sich die LVEF der WT-Mäuse signifikant, was als Auswirkung des adversen Remodelings zu verstehen ist. An Tag 21 war die LVEF der WT-Mäuse signifikant geringer als die der PAD4^{-/-}-Mäuse. Trotz erhöhtem EDV (siehe Abbildung 21) verfügten die PAD4^{-/-}-Mäuse somit über eine erhöhte LVEF. Dies zeigte, dass die globale systolische Funktion des Herzens im Langzeitverlauf in PAD4^{-/-}-Mäusen profitierte.

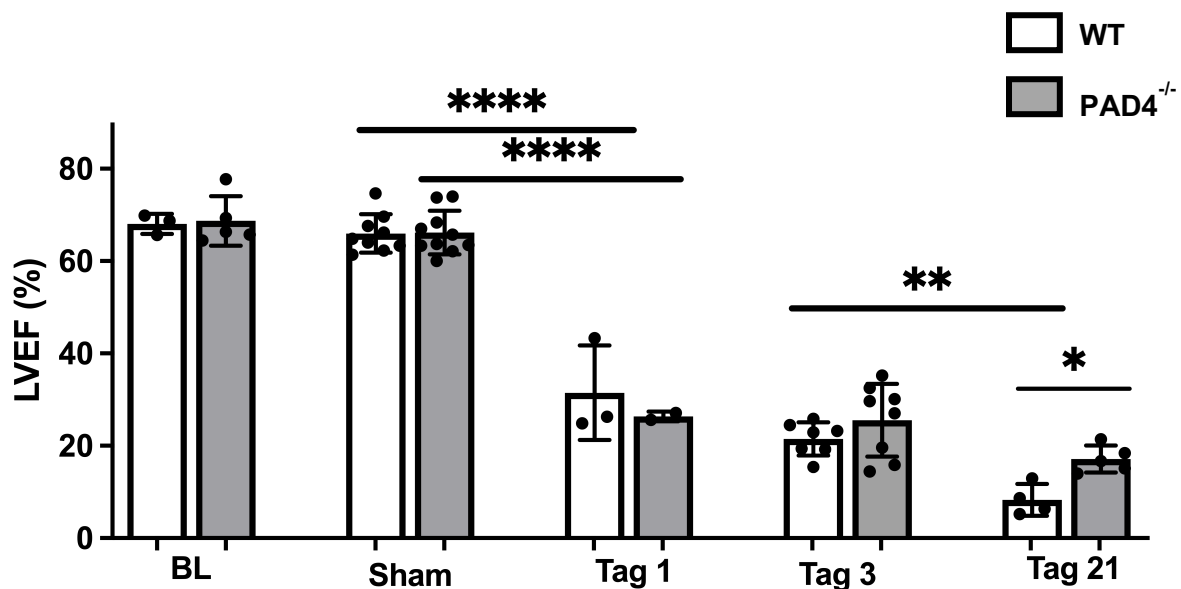


Abbildung 23: LVEF nach einem MI in PAD4^{-/-}-Mäusen und WT-Mäusen

Die Mäuse wurden an Tag 1, Tag 3 und Tag 21 nach MI sowie als BL und Sham-Mäuse durch TTE untersucht (n=3-11). Die Auswertung erfolgte anschließend mit Hilfe des VisualSonics Vevo 3100 Imaging System. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt; jeder Punkt entspricht einem Datenpunkt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$; p-Werte ermittelt durch two-way ANOVA Test und Tukey-Post-hoc-Test.

4.7 PAD4^{-/-}-Mäuse zeigten einen abgeschwächten klinischen Verlauf nach MI

Als klinische Verlaufsparemeter wurden der Gewichtsverlust und das Überleben nach MI dokumentiert und ausgewertet. Die Ausgangsgewichte von PAD4^{-/-}-Mäusen und WT-Mäusen unterschieden sich nicht signifikant (siehe Abbildung 24). Am Tag 3 war der Gewichtsverlust jedoch signifikant unterschiedlich: PAD4^{-/-}-Mäuse verloren durchschnittlich 1,55 g Körpergewicht und WT-Mäuse 2,92 g (siehe Abbildung 25A). Der Gewichtsverlust kann als Indikator für den allgemeinen Gesundheitszustand von Labormäusen herangezogen werden. Ein isolierter Gewichtsverlust ist kein spezifischer Marker, allerdings korrelierte er mit der geringeren Herzleistung und konnte in diesem Versuch als Gesundheitsparameter interpretiert werden.¹⁵¹

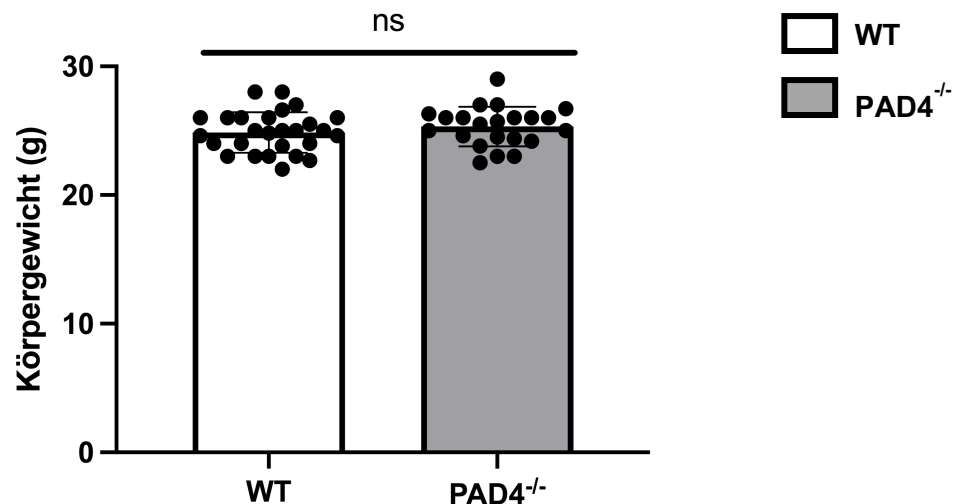


Abbildung 24: Präoperatives Körpergewicht

Das Gewicht wurde unmittelbar vor der OP ermittelt und bezieht sich somit auf das Alter zwischen neun und zwölf Wochen. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt; jeder Punkt entspricht einem Datenpunkt; ns $p > 0,05$; p-Wert ermittelt durch Student's t-Test.

71,43 % der PAD4^{-/-}-Mäuse überlebten den Versuchszeitraum bis Tag 21, während nur 55,56 % der WT-Mäuse überlebten (siehe Abbildung 25B). Es zeigte sich ein Unterschied im Zeitpunkt des Versterbens: PAD4^{-/-}-Mäuse starben ausschließlich in der akuten Phase nach MI an Tag 1. Alle WT-Mäuse überlebten den MI bis Tag 3 und starben dann zwischen Tag 3 und Tag 8. Die WT-Mäuse, die den achten Tag überlebten, starben nicht vor Ende des Versuchszeitraums. Dadurch konnte eine vulnerable Phase der PAD4^{-/-}-Mäuse in der akuten Phase des MI festgestellt werden, wobei WT-Mäuse eher im Langzeitverlauf verstarben. Es konnte keine signifikante Hazard Ratio ermittelt werden, wobei dies auf die Unterschiede der Gruppen im Verlauf der Zeit zurückzuführen ist. Dies deutet in Zusammenschau mit den inflammatorischen Daten und echokardiographischen Daten darauf hin, dass WT-Mäuse im Rahmen des Remodelings klinisch schlechtere Verläufe erzielten.

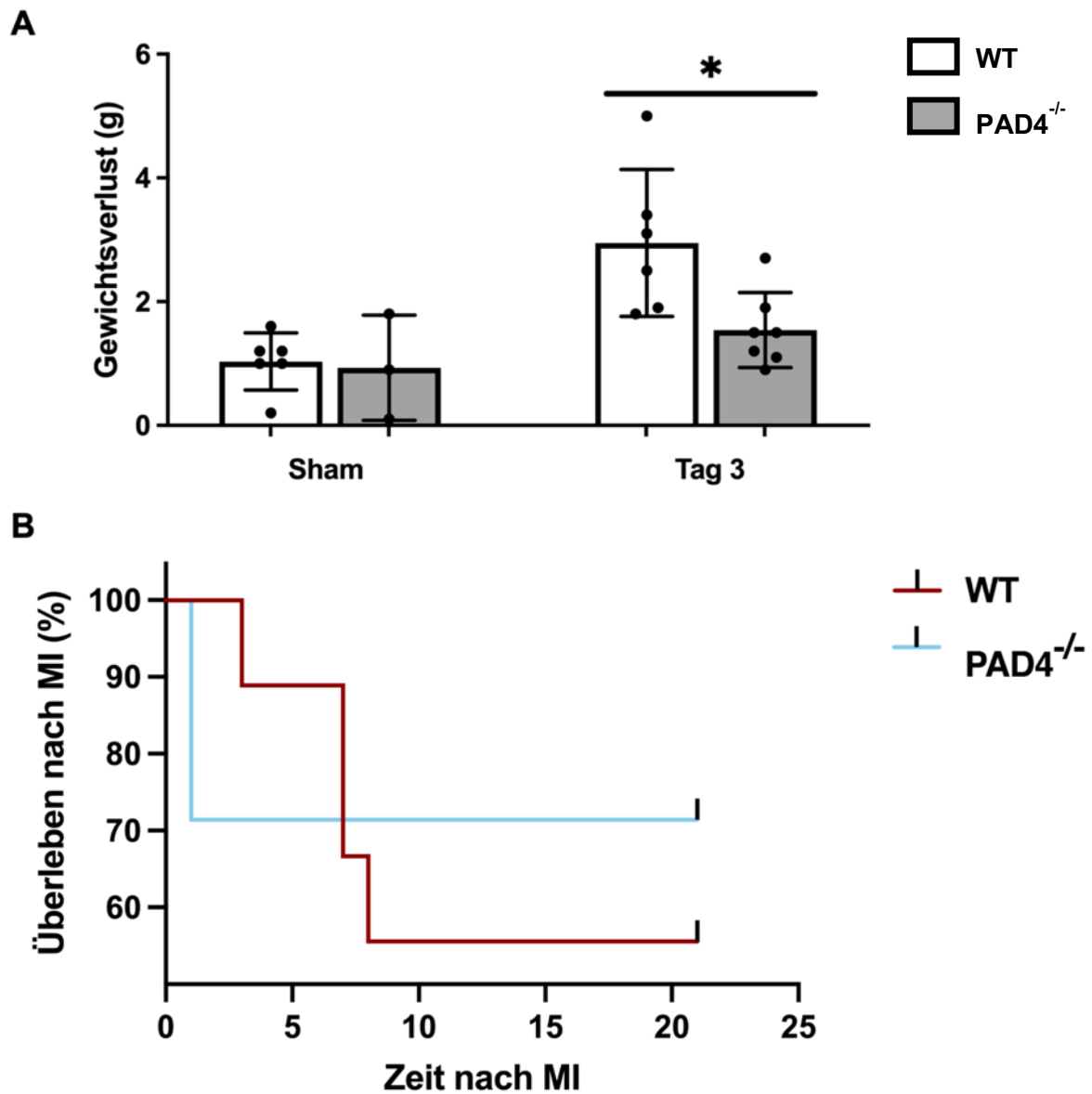


Abbildung 25: PAD4^{-/-}-Mäuse erleiden einen geringeren Gewichtsverlust und sterben in der akuten Phase nach einem MI

(A) Gewichtsverlust zwischen OP-Tag und Tag 3 nach Sham-Operation oder MI-Induktion. (B) Kaplan Meier Kurve der WT und PAD4^{-/-}-Versuchstiere (n=9) nach MI. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt; jeder Punkt entspricht einem Datenpunkt; * $p < 0,05$; p-Werte ermittelt durch two-way ANOVA Test und Tukey-Post-hoc-Test.

5. Diskussion

Diese Arbeit hatte es sich zum Ziel gesetzt den Effekt von NETs und PAD4 auf das myokardiale Remodeling nach MI im Mausmodell zu untersuchen. Dazu wurden PAD4^{-/-}-Mäuse genutzt, die durch ihre Genotypen nicht zur NETose fähig waren. Der Fokus wurde auf die inflammatorische Reaktion, die kardiale Funktion, die Entwicklung einer HI und den klinischen Verlauf der Versuchstiere gesetzt. Im Folgenden gilt es die Ergebnisse kritisch im Rahmen des aktuellen Forschungsstandes zu reflektieren und einzuordnen.

5.1 PAD4 reduziert die Inflammation und verbessert das Überleben in der akuten Phase nach MI

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass durch Einflussnahme auf die akute Inflammation, das Überleben unmittelbar nach MI beeinflusst werden kann. Im PAD4^{-/-}-Genotyp wurde die NETose stark beeinträchtigt und andere PAD4-abhängige Prozesse wurden darüber hinaus unterbunden. Der Mechanismus, in dem PAD4 NETs-abhängig und NETs-unabhängig auf das kardiale Remodeling nach MI wirkt, muss jedoch weiter eruiert werden, da die vorliegenden Daten diese Differenzierung nur eingeschränkt zulassen. Obwohl in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass der PAD4^{-/-}-Genotyp auf die langfristige kardiale Funktion protektiv wirkte, trat bei PAD4^{-/-}-Mäusen in der akuten Phase nach MI zunächst ein größerer Schaden auf. Es ist bekannt, dass PAD4 wichtiger Bestandteil der klassischen lytischen NETose ist und durch den PAD4^{-/-}-Genotyp eine reduzierte NETose erfolgt.⁸⁸ Auch wenn NETs mit verstärkter Inflammation und maladaptiven Remodeling assoziiert sind, zeigte sich in der akuten Phase nach MI eine stärkere Inflammation und ein schlechteres Überleben der PAD4^{-/-}-Mäuse. Diese Ergebnisse waren überraschend, doch stimmen sie mit weiteren Forschungsergebnissen der Arbeitsgruppe für kardiale Regeneration der Uniklinik Köln überein und werfen ein neues Licht auf PAD4 im kardialen Remodeling nach MI. Eine pharmakologische PAD-Inhibition im Mausmodell konnte mit einem größeren akuten kardialen Schaden an Tag 1 nach MI assoziiert werden, der mit denen der PAD4^{-/-}-Mäuse vergleichbar war.¹⁵² Außerdem konnte gezeigt werden, dass NETs die Expression inflammatorischer Gene in M1-Makrophagen unter hypoxischen Kulturbedingungen hemmen, was zu den erhöhten TNF- α , IL-6 und MCP-1-Plasmaspiegeln in PAD4^{-/-}-Mäusen an Tag 1 nach MI passt.¹⁵³ Hier gilt es einen differenzierten Blick auf die Ergebnisse zu werfen, um Hypothesen zum Pathomechanismus zu entwickeln.

TNF- α steigt im Plasma der PAD4^{-/-}-Mäuse in der akuten Phase nach MI stärker an als in WT Tieren, wobei PAD4^{-/-}-Mäuse in dieser Phase gleichzeitig eine erhöhte Mortalität zeigten. Diese Ergebnisse entsprechen dem aktuellen Stand der Forschung zur Bedeutung von TNF- α nach MI: TNF- α wird als negativer prognostischer Marker nach MI eingesetzt und gilt als starker Treiber der Inflammation, der andere Immunzellen zum MI rekrutiert. Des Weiteren

fördert TNF- α die Apoptose der Kardiomyozyten und es wird ein negativ inotroper Effekt auf das Myokard beschrieben, der jedoch in der Konstellation der vorliegenden Arbeit nicht ersichtlich war.^{140,141,154} Neben der erhöhten akuten Mortalität, korrelierte auch in den vorliegenden Ergebnissen eine besonders starke akute Myokardschädigung der PAD4^{-/-}-Mäuse mit einer hohen TNF- α Plasmakonzentration. Ob dieser Effekt mit dem Fehlen von NETs zusammenhängt, bleibt jedoch unklar.

IL-6 stieg in der akuten Phase nach MI in PAD4^{-/-}-Mäusen, die einen stärkeren Myokardschaden zeigten als WT-Mäuse. Auch diese Korrelation zwischen hohen IL-6-Plasmaspiegeln und größeren Myokardschäden nach MI ist vorbeschrieben.¹⁵⁵ IL-6 wird in der akuten Phase des MIs mit stärkeren Entzündungsreaktionen in Zusammenhang gebracht. Besonders hohe IL-6 Plasmakonzentrationen können mit einer reduzierten LVEF und einer höheren Mortalität einhergehen, wie sie auch in der vorliegenden Studie auftraten.¹⁴⁴ Auch wenn 2025 gezeigt werden konnte, dass NETs in fibroblastenartigen Synoviozyten bei rheumatoider Arthritis die IL-6-Ausschüttung triggern, gibt es viele bekannte Signale, die zu erhöhten IL-6-Plasmaspiegeln führen können, sodass auch hier kein sicherer und generalisierbarer Rückschluss auf die Rolle von NETs oder NETs-unabhängigen PAD4 Effekten möglich ist.¹⁵⁶

Auch MCP-1 ist an Tag 1 nach MI bei den stärker kardial geschädigten PAD4^{-/-}-Mäusen erhöht. Neben proinflammatorischen Effekten, wie der Rekrutierung von Monozyten zum Infarktgewebe nach einem MI, scheint MCP-1 auch eine protektive Wirkung auf Kardiomyozyten zu haben. Es konnte gezeigt werden, dass Kardiomyozyten von Ratten durch MCP-1 vor der Hypoxie induzierten Apoptose geschützt werden konnten.¹⁵⁷ Außerdem kann MCP-1 die Differenzierung von kardialen Fibroblasten zu Myofibroblasten fördern und zu einer besseren kardialen Funktion nach MI führen.¹⁵⁸ Die hohe Konzentration von MCP-1 im Plasma der PAD4^{-/-}-Mäuse kann als unspezifischer Hinweis auf das Überwiegen schädigender MCP-1 Wirkungen im post-MI-Remodeling gedeutet werden: Zwar gehen erhöhte MCP-1-Plasmakonzentrationen mit der erhöhten akuten Wahrscheinlichkeit zu versterben und größeren Infarktflächen der PAD4^{-/-}-Mäuse einher, doch bedarf diese Hypothese aufgrund der Komplexität des myokardialen Remodelings weiterer Untersuchungen. MCP-1 und NETs haben eine sich gegenseitig verstärkende Funktion im Rahmen von MIs, werden aber auch von anderen Faktoren beeinflusst, sodass auch hier kein direkter Rückschluss auf die spezifische Wirkung von NETs im post-MI-Remodeling möglich ist.¹⁵⁹

Neben den inflammatorischen Markern, zeigte auch die Ventrikelarchitektur akute Effekte des PAD4^{-/-}-Genotyps auf das myokardiale Remodeling: Die LVPW der PAD4^{-/-}-Mäuse war an

Tag 1 nach MI zunächst reduziert und nahm an Tag 3 zu. Auffällig ist, dass die LVPW nicht das unmittelbare LAD-Versorgungsgebiet abbildet, was typischerweise die Vorderwand des linken Ventrikels darstellt und damit nicht direkt von der Ischämie betroffen sein sollte.¹⁶⁰ Die Reduktion der LVPW der PAD4^{-/-}-Mäuse an Tag 1 kann aufgrund des großen Ausmaßes des Myokardschadens als Ausweitung des Infarktgebiets auf die Grenzzone interpretiert werden. Das Ansteigen der LVPW an Tag 3 kann als Schwellung im Rahmen der Immunreaktion interpretiert werden.^{28,161}

Zusammenfassend ist herauszustellen, dass durch die vorliegenden Daten unklar bleibt, ob die schädigende Wirkung des PAD4^{-/-}-Genotyps in der akuten Phase nach MI durch die reduzierte NETose oder durch andere PAD4-abhängige Mechanismen bedingt ist. Zwar konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass PMNs gewonnen aus PAD4^{-/-}-Mäusen nicht in der Lage sind NETs zu bilden, doch schließt dies nicht aus, dass PAD4 auf anderen Wegen auf das post-MI Remodeling einwirkt. Weitere Ergebnisse der Arbeitsgruppe für kardiale Regeneration der Uniklinik Köln können die Einordnung der Ergebnisse unterstützen. Holthausen et al. publizierte im Jahr 2025 wegweisende Daten, die weitere Hinweise zur Beantwortung dieser Fragen aufbringen: Es konnte gezeigt werden, dass die Expression inflammatorischer Gene in Makrophagen durch die PAD4-abhängige Translokation von NF-κB in den Nukleus reguliert wird. So spielt PAD4 eine bedeutende Rolle in der Polarisation von M1-Makrophagen.¹⁵² Hier ist es wichtig zu erwähnen, dass die Inflammation besonders in der akuten Phase nach MI mit einer protektiven Wirkung auf das Myokard assoziiert ist.¹⁶² Somit könnte die NETs-unabhängige, aber PAD4-abhängige Unterdrückung proinflammatorischer Makrophagen eine weitere Erklärung für den verstärkten kardialen Schaden in PAD4^{-/-}-Mäusen in der akuten Phase nach MI liefern.¹⁶³ In der Studie von Eghbalzadeh et. al konnte gezeigt werden, dass NETs die Makrophagenpolarisation *in vitro* sowohl unter anti- als auch proinflammatorischen Kulturbedingungen zum antiinflammatorischen M2-Typ begünstigen. Diese Ergebnisse zeigten, dass NETs im Rahmen einer Hypoxie einen antiinflammatorischen Effekt haben können.¹⁵³ Nach Myokardinfarkten zeigte sich in humanen Ventrikeln Verstorbener eine erhöhte Präsenz von citH3 im betroffenen Myokard und in der Grenzzone des MI. PAD4^{-/-}-Mäuse zeigten nach MI deutlich geringere Nachweise von citH3 im Myokard als WT-Mäuse. Da das Produkt von PAD4, citH3, ein Bestandteil von NETs darstellt, kann dies darauf hindeuten, dass NETs in der akuten Phase nach MI auch im humanen infarzierten Herzen eine Rolle spielen könnten.¹⁵² Diese Hinweise sind vereinbar mit der der Arbeit zugrundeliegenden Annahme, dass NETs im myokardialen Remodeling eine pathologische Relevanz haben könnten, die zu diesem Zeitpunkt nicht weiter beschrieben ist. Um jedoch die schädigenden Wirkungen des PAD4^{-/-}-Genotyps in der akuten Phase nach MI eindeutig auf NETs zurückführen zu können fehlen Daten, die diesen Mechanismus eingrenzen.

5.2 Der PAD4^{-/-}-Genotyp wirkt langfristig protektiv auf die kardiale Funktion

Im langfristigen Verlauf zeigte sich ein signifikanter positiver Effekt des PAD4^{-/-}-Genotyps auf die Herzfunktion und die Gewichtsentwicklung der Mäuse. Besonders die Entwicklung der HI der PAD4^{-/-}-Mäuse war in der vorliegenden Arbeit gemildert: Das SV und die LVEF der PAD4^{-/-}-Mäuse waren an Tag 21 signifikant höher als die der WT-Mäuse. Diese Ergebnisse konnten in nachfolgenden Studien der Arbeitsgruppe für kardiale Regeneration reproduziert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische PAD4- und PAD2-Inhibition ab Tag 7 nach MI ebenfalls positive Auswirkungen auf die SV und das LVEF hatte.¹⁵²

Es konnte gezeigt werden, dass der PAD4^{-/-}-Genotyp sowie die PAD4 und PAD2 Inhibition durch den pan-PAD Inhibitor BB-CI-Amidin (ab Tag 7) nach MI mit einer kleineren Fibrosezone im Herzen assoziiert ist.¹⁵² Die reduzierte Fibrose, die mit einer Verbesserung der kardialen Funktion einhergeht, könnte ebenfalls auf NETs-abhängige oder NETs-unabhängige PAD4 Effekte zurückzuführen sein. Studien belegen, dass sowohl die Expression von TGF- β in Makrophagen als auch die Kollagenproduktion in kardialen Fibroblasten durch PAD4 beeinflusst werden: Die Bildung von Kollagen in Fibroblasten konnte NETs unabhängig durch Inhibition von PAD4 unterbunden werden.^{152,164}

Auf der anderen Seite zeigten Shao et al., dass NETs *in vitro* die Formation von Fibroblasten zu kollagenproduzierenden Myofibroblasten induzieren kann.¹⁶⁵ Dies deutet darauf hin, dass eine NETs-induzierte Fibrose, die in PAD4^{-/-}-Mäusen ausbleibt, ein Grund für die verbesserte kardiale Funktion der PAD4^{-/-}-Mäuse sein kann. Diese Hypothese leitet sich jedoch nicht von den vorliegenden Daten ab und sollte in weiteren Experimenten überprüft werden.

Auch in anderen kardialen Erkrankungen wurden bereits fibrosefördernde Effekte von NETs diskutiert: In einem PAD4^{-/-}-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass bei Vorlasterhöhung durch Aortenkonstriktion PAD4^{-/-}-Mäuse eine bessere LVEF als WT-Mäuse hatten. Mechanistisch wird eine mitochondriale Dysfunktion durch ausbleibende NETose postuliert.¹⁶⁶ Im Kontext der altersbedingten kardialen Dysfunktion konnte gezeigt werden, dass IL-6- und TNF- α -Plasmaspiegel in PAD4^{-/-}-Mäusen auch reduziert waren. Chemotaktische Zytokine, wie MCP-1 waren altersbedingt hochreguliert, jedoch bewirkte der PAD4^{-/-}-Genotyp eine Reduktion dieses Effekts, die im post-MI Setting dieser Arbeit nicht beobachtet werden konnte. Mechanistisch wurde die NETs-abhängige Förderung der Fibrose in altersbedingten kardialen Dysfunktionen erwägt, die auch im post-MI Setting eine Rolle spielen könnte.¹⁶⁷ Auch wenn

diese Erkrankungen in ihrer Pathophysiologie nicht mit der eines MI übereinstimmen, könnten diese Erkenntnisse auch im post-MI Remodeling eine Rolle spielen. Dies zu belegen, erfordert weitere Untersuchungen.

Eine weitere Hypothese für die langfristig protektiven Effekte im post-MI-Remodeling in PAD4^{-/-}-Mäusen, könnte eine verstärkte regulatorische Gegenreaktion sein, worauf sich ein Hinweis aus der vorliegenden Arbeit ableiten lässt: An Tag 3 nach MI zeigte sich in PAD4^{-/-}-Mäusen eine Erhöhung des IFN- γ -Plasmaspiegels. IFN- γ kann zur Rekrutierung von Monozyten beitragen, die wiederum nekrotische Zellreste entfernen und reparative Prozesse im Myokard begünstigen.¹⁶⁸ Besonders in der akuten Phase ist eine hohe IFN- γ Aktivität mit einer immunregulierenden Funktion assoziiert, die sich förderlich auf das post-MI-Remodeling auswirken kann, wie es auch mit den vorliegenden Ergebnissen vereinbar wäre. Da an Tag 3 nach MI die inflammatorische Phase abklingen und der reparativen Phase weichen sollte, dann die Erhöhung des IFN- γ -Plasmaspiegels in PAD4^{-/-}-Mäusen als Hinweis auf eine verstärkte regulatorische Gegenreaktion nach der initialen starken Schädigung des Myokards interpretiert werden.⁴⁵ Von einer solchen regulatorischen Immunreaktion könnte die Myokardfunktion langfristig profitieren, wie es die Daten für den PAD4^{-/-}-Genotypen zeigten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass besonders die langfristigen positiven Effekte des PAD4^{-/-}-Genotyps zwar mit NETs zusammenhängen können, in der Zusammenschau mit aktuellen Veröffentlichungen, allerdings vermehrt Hinweise zu finden sind, dass PAD4 nicht primär durch NETs maladaptives Remodeling nach MI fördert.

5.3 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten die folgenden Ergebnisse festgestellt werden:

1. Im Vergleich zur WT-Kohorte wurde bei PAD4^{-/-}-Mäusen ein stärkerer myokardialer Schaden an Tag 1 nach MI festgestellt. Außerdem zeigten PAD4^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Mortalität an Tag 1 nach MI. Diese ging mit einer stärkeren inflammatorischen Reaktion mit erhöhten Plasmaspiegeln von TNF- α , IL-6 und MCP-1 einher.
2. An Tag 3 wurde ein erhöhter Plasmaspiegel von IFN- γ in PAD4^{-/-}-Mäusen nachgewiesen, was ein Hinweis auf eine verstärkte immunmodulierende Reaktion sein könnte. Außerdem hatten PAD4^{-/-}-Mäuse, wenn sie die akute Phase überlebten, eine bessere Überlebenschance bis zum Ende des Versuchszeitraums als WT-Mäuse und einen geringeren Gewichtsverlust.

3. Im TTE konnte gezeigt werden, dass PAD4^{-/-}-Mäuse langfristig bessere kardiale Funktionen erzielten als WT-Mäuse. An Tag 21 hatten PAD4^{-/-}-Mäuse ein geringeres EDV, was auf eine geringere dilatative HI hinwies und ein höheres SV und eine höhere LVEF, was eine bessere systolische Funktion zeigte.
4. Daraus ergibt sich, dass PAD4 im Remodeling nach MI eine zweischneidige Rolle abhängig vom Zeitpunkt der Infarktentwicklung spielt. In der akuten Phase scheint PAD4 assoziiert mit einer reduzierten Inflammation die kardiale Funktion klinisch relevant zu verbessern, während der langfristige Verlauf von dem PAD4^{-/-}-Genotyp profitierte.

5.4 Limitationen

Auch wenn die vorliegende Arbeit relevante und reproduzierbare Ergebnisse zum Einfluss von NETs und PAD4 nach MI lieferte, gibt es drei auffällige Limitationen:

1. Kleine Versuchsgruppen reduzieren die statistische Aussagekraft der Daten
2. PAD4^{-/-}-Genotyp als Modell für NETs-Defizienz
3. Begrenzte mechanistische Daten liefern Hinweise, die mit aktueller Literatur interpretiert werden können, jedoch Raum für weitere Forschungsfragen offenlässt

Durch den experimentellen Aufbau, der sowohl zwei verschiedene Genotypen als auch drei verschiedene Zeitpunkte miteinander vergleichen sollte, ist die Größe der Vergleichsgruppen klein (n = 2 - 11). So könnten eventuell signifikante Unterschiede in den erhobenen Parametern nicht detektiert werden. Um eine höhere statistische Belastbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, sollten Untersuchungen mit größeren Versuchsgruppen angeschlossen werden.

Besonders die Nutzung des PAD4^{-/-}-Genotyps zur Beantwortung wissenschaftlicher Fragen zur Auswirkung von NETs sollte kritisch betrachtet werden. Zwar konnte in den Ergebnissen gezeigt werden, dass PMNs, isoliert aus PAD4^{-/-}-Mäusen, *in vitro* keine NETs bildeten, allerdings vernachlässigte das experimentelle Design, die verschiedenen NETose-Wege, die jeweils durch unterschiedliche Trigger experimentell provoziert werden können. Auch wenn davon ausgegangen wurde, dass PAD4 für die NETose zwingend nötig ist, wurden durch Kenny et al. im Jahr 2017 Ergebnisse erzielt, die die Arbeitsgruppe zu dem Schluss führten, dass PAD4 keine Voraussetzung für die erfolgreiche NETose ist.¹⁶⁹ Diese Studie ist allerdings kritisch zu hinterfragen: Um die Funktion von PAD4 zu untersuchen wurde ein spezifischer PAD4-Inhibitor (Trifluoracetatsalz) eingesetzt. Er wurde in sehr hohen Konzentrationen

eingesetzt, die die IC₅₀-Werte für Enzyme der gleichen Familie, PAD2, PAD3 und PAD1 um ein Vielfaches überschritt.^{169,170} 2018 konnten Tatsiy und McDonald mit einem selektiven PAD4-Inhibitor GSK484 und einem NETose-spezifischen Nachweisverfahren zeigen, dass dieser die NETose verhindert.⁹⁰ So ist davon auszugehen, dass PAD4 für die lytische NETose notwendig ist. Um zu verstehen, welche Einflüsse NETs auf die Entwicklung nach einem MI haben und welche Einflüsse anderen Effekten des PAD4^{-/-}-Genotypen zuzuordnen sind, sind weitere Untersuchungen nötig. Außerdem zeigten die vorliegenden Ergebnisse, dass die akute Wirkung von PAD4 von der Beurteilung der subakuten Wirkung im post-MI-Setting differenziert werden muss. Aufgrund der weiteren Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe für kardiale Regeneration der Uniklinik Köln wurde klar, dass PAD4 neben der NETose auf verschiedenste Mechanismen nach MI einwirkt, sodass die Ergebnisse auf NETs-abhängige und NETs-unabhängige Effekte durch PAD4 zurückzuführen sind.

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich in ihrem experimentellen Setting auf die Detektion von klinisch messbaren Unterschieden, die durch einen PAD4^{-/-}-Genotypen nach einem MI auftraten. Hierbei wurden verschiedene Parameter erhoben, um den „Ist-Zustand“ der Herzfunktion und des klinischen Verlaufs zu beschreiben. Außer der Erhebung der Immunmodulatoren im Plasma der Mäuse wurden keine Experimente im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, die Hinweise auf die Mechanismen liefern könnten, die den Gruppenunterschieden zugrunde liegen.

5.5 Ausblick

Durch die aktuellen Publikationen der Arbeitsgruppe für kardiale Regeneration der Uniklinik Köln konnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu großen Teilen validiert und weiter kontextualisiert werden. Die vorliegende Arbeit, nach Einordnung in den aktuellen Stand der Forschung legt nahe, dass zukünftige Untersuchungen eine Differenzierung der zeitlichen und mechanistischen Ebene berücksichtigen sollten: Zunächst sollte die akute Inflammation nach MI (Tag 1) von der reparativen Phase des Remodelings (Tag 7) getrennt betrachtet werden. Darüber hinaus sollte differenziert betrachtet werden, welche Effekte durch NETs und welche Effekte durch PAD4 hervorgerufen werden.

Dass citH3 in der akuten Phase nach MI vermehrt im Myokard und in der Grenzzone vorhanden sind, konnte durch Holthausen et al. sowohl im Mausmodell als auch an Ventrikelpunkten Verstorbener MI-Patient*innen gezeigt werden und unterstreicht die Relevanz von PAD4 im post-MI Remodeling. NETs begünstigen die Polarisierung antiinflammatorischer M2-Makrophagen *in vitro*. Welche Mechanismen weiterhin zur starken inflammatorischen

Reaktion in PAD4^{-/-}-Mäusen nach MI beitragen, ist nicht abschließend geklärt und sollte in zukünftigen Untersuchungen eruiert werden.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass ein PAD4^{-/-}-Genotyp im akuten post-MI Setting mit einem besseren langfristigen Krankheitsverlauf einhergeht. Ob diese klinischen Effekte an NETs-abhängigen oder NETs-unabhängigen PAD4-Effekten liegen, konnte nicht geklärt werden. Zur genaueren Beschreibung der Rolle von PAD4 und von NETs im post-MI-Remodeling sind weitere Untersuchungen nötig.

6. Literaturverzeichnis

1. Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der ICD-10 und nach Geschlecht für 2024. 15.10.2025. https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html (accessed 03.02.2026).
2. Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt 2024. 15.10.2025. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html> (accessed 03.02.2026).
3. Jenca D, Melenovsky V, Stehlik J, et al. Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors. *ESC Heart Fail* 2021; **8**(1): 222-37.
4. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res* 2012; **110**(1): 159-73.
5. Lewis EF, Moyer LA, Rouleau JL, et al. Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: the CARE study. *J Am Coll Cardiol* 2003; **42**(8): 1446-53.
6. Santoro GM, Carrabba N, Migliorini A, Parodi G, Valenti R. Acute heart failure in patients with acute myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Eur J Heart Fail* 2008; **10**(8): 780-5.
7. Masci PG, Ganame J, Francone M, et al. Relationship between location and size of myocardial infarction and their reciprocal influences on post-infarction left ventricular remodelling. *Eur Heart J* 2011; **32**(13): 1640-8.
8. Robert Tennant CJW. The Effect of Coronary on Myocardial Contraction. *American Journal of Physiology* 1935; **112**(2): 351-61.
9. Hochman JS, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation* 1982; **65**(7): 1446-50.
10. Bhatt AS, Ambrosy AP, Velazquez EJ. Adverse Remodeling and Reverse Remodeling After Myocardial Infarction. *Curr Cardiol Rep* 2017; **19**(8): 71.
11. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; **303**(5663): 1532-5.
12. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 2018; **18**(2): 134-47.
13. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* 2012; **10**(1): 136-44.
14. Fousert E, Toes R, Desai J. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Take the Central Stage in Driving Autoimmune Responses. *Cells* 2020; **9**(4).
15. Langseth MS, Andersen GO, Husebye T, et al. Neutrophil extracellular trap components and myocardial recovery in post-ischemic acute heart failure. *PLoS One* 2020; **15**(10): e0241333.

16. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* 2010; **207**(9): 1853-62.
17. Yang C, Dong ZZ, Zhang J, et al. Peptidylarginine deiminases 4 as a promising target in drug discovery. *Eur J Med Chem* 2021; **226**: 113840.
18. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation* 2018; **138**(20): e618-e51.
19. Brener SJ. Insights into the pathophysiology of ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J* 2006; **151**(6 Suppl): S4-10.
20. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res* 2014; **114**(12): 1852-66.
21. Lodrini AM, Goumans MJ. Cardiomyocytes Cellular Phenotypes After Myocardial Infarction. *Front Cardiovasc Med* 2021; **8**: 750510.
22. Venereau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol* 2015; **6**: 422.
23. Byrne RA, Rossello X, Coughlan JJ, et al. [2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes]. *G Ital Cardiol (Rome)* 2024; **25**(2 Suppl 2): e1-e112.
24. Brinkmann C, Schofer J. [4th universal definition of myocardial infarction 2018 : What is new?]. *Herz* 2018; **43**(8): 681-8.
25. Keeley EC, Hillis LD. Primary PCI for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2007; **356**(1): 47-54.
26. Bundesärztekammer (BÄK) KBK, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz, Version 4.0. 2023. https://register.awmf.org/assets/guidelines/nvl-006l_S3_Chronische_Herzinsuffizienz_2023-12.pdf (accessed 04.02.2026).
27. Stephan Ensminger VR, Thomas Voigtgländer, Thomas Meinertz, Kurt Bestehorn, Ariane Pott, Mirja Rohjans, Ria Kress, Michael Wichert. 36. Deutscher Herzbericht - Update 2025. In: e.V. DH, editor.: Georg Thieme Verlag KG; 2025.
28. Leanca SA, Crisu D, Petris AO, et al. Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction: From Physiopathology to Treatment. *Life (Basel)* 2022; **12**(8).
29. Wan Ab Naim WN, Mokhtarudin MJM, Lim E, Chan BT, Ahmad Bakir A, Nik Mohamed NA. The study of border zone formation in ischemic heart using electro-chemical coupled computational model. *Int J Numer Method Biomed Eng* 2020; **36**(11): e3398.
30. Rexius-Hall ML, Khalil NN, Escopete SS, et al. A myocardial infarct border-zone-on-a-chip demonstrates distinct regulation of cardiac tissue function by an oxygen gradient. *Sci Adv* 2022; **8**(49): eabn7097.
31. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000; **35**(3): 569-82.

32. Kramer CM, Lima JA, Reichek N, et al. Regional differences in function within noninfarcted myocardium during left ventricular remodeling. *Circulation* 1993; **88**(3): 1279-88.
33. 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. *Front Immunol* 2021; **12**: 664457.
34. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol* 2014; **11**(5): 255-65.
35. Leoni G, Soehnlein O. (Re) Solving Repair After Myocardial Infarction. *Front Pharmacol* 2018; **9**: 1342.
36. Anzai A, Ko S, Fukuda K. Immune and Inflammatory Networks in Myocardial Infarction: Current Research and Its Potential Implications for the Clinic. *Int J Mol Sci* 2022; **23**(9).
37. Kim Y, Nurakhayev S, Nurkesh A, Zharkinbekov Z, Saparov A. Macrophage Polarization in Cardiac Tissue Repair Following Myocardial Infarction. *Int J Mol Sci* 2021; **22**(5).
38. Nian W, Huang Z, Fu C. Immune cells drive new immunomodulatory therapies for myocardial infarction: From basic to clinical translation. *Front Immunol* 2023; **14**: 1097295.
39. Ma Y, Yabluchanskiy A, Lindsey ML. Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2013; **6**(1): 11.
40. Dutta P, Nahrendorf M. Monocytes in myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; **35**(5): 1066-70.
41. O'Rourke SA, Dunne A, Monaghan MG. The Role of Macrophages in the Infarcted Myocardium: Orchestrators of ECM Remodeling. *Front Cardiovasc Med* 2019; **6**: 101.
42. Chalise U, Becirovic-Agic M, Lindsey ML. The cardiac wound healing response to myocardial infarction. *WIREs Mech Dis* 2023; **15**(1): e1584.
43. Lindsey ML, Brunt KR, Kirk JA, et al. Guidelines for in vivo mouse models of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2021; **321**(6): H1056-H73.
44. Ortega-Gomez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med* 2013; **5**(5): 661-74.
45. Pluijmert NJ, Atsma DE, Quax PHA. Post-ischemic Myocardial Inflammatory Response: A Complex and Dynamic Process Susceptible to Immunomodulatory Therapies. *Front Cardiovasc Med* 2021; **8**: 647785.
46. Anzai A, Anzai T, Nagai S, et al. Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling. *Circulation* 2012; **125**(10): 1234-45.
47. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**: 767-811.
48. Venugopal H HA, Humeres C, Frangogiannis NG. Properties and Functions of Fibroblasts and Myofibroblasts in Myocardial Infarction. *Cells* 2022.
49. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res* 2016; **119**(1): 91-112.

50. Gordon O, Gilon D, He Z, et al. Vascular endothelial growth factor-induced neovascularization rescues cardiac function but not adverse remodeling at advanced ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; **32**(7): 1642-51.
51. Peet C, Ivetic A, Bromage DI, Shah AM. Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2020; **116**(6): 1101-12.
52. Puhl SL, Steffens S. Neutrophils in Post-myocardial Infarction Inflammation: Damage vs. Resolution? *Front Cardiovasc Med* 2019; **6**: 25.
53. Ghasemi O, Ma Y, Lindsey ML, Jin YF. Using systems biology approaches to understand cardiac inflammation and extracellular matrix remodeling in the setting of myocardial infarction. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2014; **6**(1): 77-91.
54. Frangogiannis NG. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest* 2017; **127**(5): 1600-12.
55. Matsui Y, Morimoto J, Uede T. Role of matricellular proteins in cardiac tissue remodeling after myocardial infarction. *World J Biol Chem* 2010; **1**(5): 69-80.
56. Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther* 2009; **123**(2): 255-78.
57. Silva AC, Pereira C, Fonseca A, Pinto-do OP, Nascimento DS. Bearing My Heart: The Role of Extracellular Matrix on Cardiac Development, Homeostasis, and Injury Response. *Front Cell Dev Biol* 2020; **8**: 621644.
58. Wu Y, Wei S, Wu X, Li Y, Han X. Neutrophil extracellular traps in acute coronary syndrome. *J Inflamm (Lond)* 2023; **20**(1): 17.
59. Gackowski A. Remodeling of the heart: so much is known, so much remains to be discovered. *Pol Arch Intern Med* 2024; **134**(2).
60. Logeart D, Taille Y, Derumeaux G, et al. Patterns of left ventricular remodeling post-myocardial infarction, determinants, and outcome. *Clin Res Cardiol* 2024.
61. Reis Filho JR, Cardoso JN, Cardoso CM, Pereira-Barretto AC. Reverse Cardiac Remodeling: A Marker of Better Prognosis in Heart Failure. *Arq Bras Cardiol* 2015; **104**(6): 502-6.
62. Strydom N, Rankin SM. Regulation of circulating neutrophil numbers under homeostasis and in disease. *J Innate Immun* 2013; **5**(4): 304-14.
63. Loh W, Vermeren S. Anti-Inflammatory Neutrophil Functions in the Resolution of Inflammation and Tissue Repair. *Cells* 2022; **11**(24).
64. Bratton DL, Henson PM. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol* 2011; **32**(8): 350-7.
65. Xu X, Hakansson L. Degranulation of primary and secondary granules in adherent human neutrophils. *Scand J Immunol* 2002; **55**(2): 178-88.
66. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; **89**(10): 3503-21.

67. Kacprzak M, Zielinska M. Prognostic value of myeloperoxidase concentration in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Int J Cardiol* 2016; **223**: 452-7.
68. Askari AT, Brennan ML, Zhou X, et al. Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Exp Med* 2003; **197**(5): 615-24.
69. Pires RH, Felix SB, Delcea M. The architecture of neutrophil extracellular traps investigated by atomic force microscopy. *Nanoscale* 2016; **8**(29): 14193-202.
70. 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. *Front Immunol* 2016; **7**: 302.
71. Hidalgo A, Libby P, Soehnlein O, Aramburu IV, Papayannopoulos V, Silvestre-Roig C. Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology. *Cardiovasc Res* 2022; **118**(13): 2737-53.
72. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med* 2017; **23**(3): 279-87.
73. Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, et al. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One* 2012; **7**(10): e48111.
74. Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry (Mosc)* 2020; **85**(10): 1178-90.
75. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; **176**(2): 231-41.
76. Yousefi S, Simon HU. NETosis - Does It Really Represent Nature's "Suicide Bomber"? *Front Immunol* 2016; **7**: 328.
77. Pilsczek FH, Salina D, Poon KK, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus. *J Immunol* 2010; **185**(12): 7413-25.
78. Pieterse E, Rother N, Yanginlar C, Hilbrands LB, van der Vlag J. Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol* 2016; **7**: 484.
79. Tan C, Aziz M, Wang P. The vitals of NETs. *J Leukoc Biol* 2021; **110**(4): 797-808.
80. Naccache PH, Fernandes MJ. Challenges in the characterization of neutrophil extracellular traps: The truth is in the details. *Eur J Immunol* 2016; **46**(1): 52-5.
81. Rosazza T, Warner J, Sollberger G. NET formation - mechanisms and how they relate to other cell death pathways. *FEBS J* 2021; **288**(11): 3334-50.
82. Huang J, Hong W, Wan M, Zheng L. Molecular mechanisms and therapeutic target of NETosis in diseases. *MedComm (2020)* 2022; **3**(3): e162.
83. Hook JS, Patel PA, O'Malley A, et al. Lipoproteins from Staphylococcus aureus Drive Neutrophil Extracellular Trap Formation in a TLR2/1- and PAD-Dependent Manner. *J Immunol* 2021; **207**(3): 966-73.

84. Chen T, Li Y, Sun R, et al. Receptor-Mediated NETosis on Neutrophils. *Front Immunol* 2021; **12**: 775267.
85. Hakikim A, Fuchs TA, Martinez NE, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol* 2011; **7**(2): 75-7.
86. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep* 2014; **8**(3): 883-96.
87. Sollberger G, Choidas A, Burn GL, et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci Immunol* 2018; **3**(26).
88. Rohrbach AS, Slade DJ, Thompson PR, Mowen KA. Activation of PAD4 in NET formation. *Front Immunol* 2012; **3**: 360.
89. Singh J, Boettcher M, Dolling M, et al. Moonlighting chromatin: when DNA escapes nuclear control. *Cell Death Differ* 2023; **30**(4): 861-75.
90. Tatsiy O, McDonald PP. Physiological Stimuli Induce PAD4-Dependent, ROS-Independent NETosis, With Early and Late Events Controlled by Discrete Signaling Pathways. *Front Immunol* 2018; **9**: 2036.
91. Rada B, Jendrysik MA, Pang L, et al. Pyocyanin-enhanced neutrophil extracellular trap formation requires the NADPH oxidase. *PLoS One* 2013; **8**(1): e54205.
92. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007; **13**(4): 463-9.
93. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood* 2013; **122**(16): 2784-94.
94. Baz AA, Hao H, Lan S, et al. Neutrophil extracellular traps in bacterial infections and evasion strategies. *Front Immunol* 2024; **15**: 1357967.
95. Wang H, Kim SJ, Lei Y, et al. Neutrophil extracellular traps in homeostasis and disease. *Signal Transduct Target Ther* 2024; **9**(1): 235.
96. Dunham-Snary KJ, Surewaard BG, Mewburn JD, et al. Mitochondria in human neutrophils mediate killing of *Staphylococcus aureus*. *Redox Biol* 2022; **49**: 102225.
97. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* 2009; **16**(11): 1438-44.
98. Yousefi S, Stojkov D, Germic N, et al. Untangling "NETosis" from NETs. *Eur J Immunol* 2019; **49**(2): 221-7.
99. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 2018; **25**(3): 486-541.
100. Dömer D, Walther T, Möller S, Behnen M, Laskay T. Neutrophil Extracellular Traps Activate Proinflammatory Functions of Human Neutrophils. *Front Immunol* 2021; **12**: 636954.
101. Porto BN, Stein RT. Neutrophil Extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing? *Front Immunol* 2016; **7**: 311.

102. Thakur M, Junho CVC, Bernhard SM, Schindewolf M, Noels H, Doring Y. NETs-Induced Thrombosis Impacts on Cardiovascular and Chronic Kidney Disease. *Circ Res* 2023; **132**(8): 933-49.
103. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**(36): 15880-5.
104. Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, et al. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J Pathol* 2014; **233**(3): 294-307.
105. Pertiwi KR, van der Wal AC, Pabittei DR, et al. Neutrophil Extracellular Traps Participate in All Different Types of Thrombotic and Haemorrhagic Complications of Coronary Atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2018; **118**(6): 1078-87.
106. Folco EJ, Mawson TL, Vromman A, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Endothelial Cell Activation and Tissue Factor Production Through Interleukin-1alpha and Cathepsin G. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018; **38**(8): 1901-12.
107. Thalin C, Hisada Y, Lundstrom S, Mackman N, Wallen H. Neutrophil Extracellular Traps: Villains and Targets in Arterial, Venous, and Cancer-Associated Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019; **39**(9): 1724-38.
108. Arroyo LH, Lee RT. Mechanisms of plaque rupture: mechanical and biologic interactions. *Cardiovasc Res* 1999; **41**(2): 369-75.
109. Dong Y, Zhang Y, Yang X, Yan C, Feng Y. Recent Insights into Neutrophil Extracellular Traps in Cardiovascular Diseases. *J Clin Med* 2022; **11**(22).
110. Liu J, Yang D, Wang X, et al. Neutrophil extracellular traps and dsDNA predict outcomes among patients with ST-elevation myocardial infarction. *Sci Rep* 2019; **9**(1): 11599.
111. Mondal S, Thompson PR. Protein Arginine Deiminases (PADs): Biochemistry and Chemical Biology of Protein Citrullination. *Acc Chem Res* 2019; **52**(3): 818-32.
112. Jones JE, Causey CP, Knuckley B, Slack-Noyes JL, Thompson PR. Protein arginine deiminase 4 (PAD4): Current understanding and future therapeutic potential. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2009; **12**(5): 616-27.
113. Anzilotti C, Pratesi F, Tommasi C, Migliorini P. Peptidylarginine deiminase 4 and citrullination in health and disease. *Autoimmun Rev* 2010; **9**(3): 158-60.
114. Jia Y, Jia R, Taledaohan A, Wang Y, Wang Y. Structure-Activity Relationship of PAD4 Inhibitors and Their Role in Tumor Immunotherapy. *Pharmaceutics* 2024; **16**(3).
115. Arita K, Shimizu T, Hashimoto H, Hidaka Y, Yamada M, Sato M. Structural basis for histone N-terminal recognition by human peptidylarginine deiminase 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**(14): 5291-6.
116. 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. *J Thromb Haemost* 2021; **19**(7): 1607-17.
117. Lee YH, Coonrod SA, Kraus WL, Jelinek MA, Stallcup MR. Regulation of coactivator complex assembly and function by protein arginine methylation and demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(10): 3611-6.

118. Zhai Q, Wang L, Zhao P, Li T. Role of citrullination modification catalyzed by peptidylarginine deiminase 4 in gene transcriptional regulation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2017; **49**(7): 567-72.
119. Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, et al. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 2004; **118**(5): 545-53.
120. Wang Y, Li M, Stadler S, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol* 2009; **184**(2): 205-13.
121. Li P, Wang D, Yao H, et al. Coordination of PAD4 and HDAC2 in the regulation of p53-target gene expression. *Oncogene* 2010; **29**(21): 3153-62.
122. Lee CY, Lin CC, Liu YL, Liu GY, Liu JH, Hung HC. Molecular Interplay between the Dimer Interface and the Substrate-Binding Site of Human Peptidylarginine Deiminase 4. *Sci Rep* 2017; **7**: 42662.
123. Neeli I, Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Front Immunol* 2013; **4**: 38.
124. Hemmers S, Teijaro JR, Arandjelovic S, Mowen KA. PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. *PLoS One* 2011; **6**(7): e22043.
125. Fresneda Alarcon M, McLaren Z, Wright HL. Neutrophils in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Same Foe Different M.O. *Front Immunol* 2021; **12**: 649693.
126. Sorvillo N, Mizurini DM, Coxon C, et al. Plasma Peptidylarginine Deiminase IV Promotes VWF-Platelet String Formation and Accelerates Thrombosis After Vessel Injury. *Circ Res* 2019; **125**(5): 507-19.
127. Biron BM, Chung CS, Chen Y, et al. PAD4 Deficiency Leads to Decreased Organ Dysfunction and Improved Survival in a Dual Insult Model of Hemorrhagic Shock and Sepsis. *J Immunol* 2018; **200**(5): 1817-28.
128. Martinod K, Witsch T, Erpenbeck L, et al. Peptidylarginine deiminase 4 promotes age-related organ fibrosis. *J Exp Med* 2017; **214**(2): 439-58.
129. Heger LA, Schommer N, Fukui S, et al. Inhibition of protein arginine deiminase 4 prevents inflammation-mediated heart failure in arthritis. *Life Sci Alliance* 2023; **6**(10).
130. Spengler J, Lugonja B, Ytterberg AJ, et al. Release of Active Peptidyl Arginine Deiminases by Neutrophils Can Explain Production of Extracellular Citrullinated Autoantigens in Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid. *Arthritis Rheumatol* 2015; **67**(12): 3135-45.
131. De Villiers C, Riley PR. Mouse models of myocardial infarction: comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion. *Dis Model Mech* 2020; **13**(11).
132. Zacchigna S, Paldino A, Falcao-Pires I, et al. Towards standardization of echocardiography for the evaluation of left ventricular function in adult rodents: a position paper of the ESC Working Group on Myocardial Function. *Cardiovasc Res* 2021; **117**(1): 43-59.
133. Pironti G. State-of-the-art methodologies used in preclinical studies to assess left ventricular diastolic and systolic function in mice, pitfalls and troubleshooting. *Front Cardiovasc Med* 2023; **10**: 1228789.

134. André Dülsner RdH, Christine Krüger, Marina Pils, Kira Scherer, Barthel Schmelting, Matthias Schmidt, Heike Weinert, Thomas Jourdan Gesellschaft für Versuchstierkunde. Empfehlungen zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren. 2017: Gesellschaft für Versuchstierkunde; 2017.
135. Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008; **63**(8): 879-84.
136. Schiffner R, Bischoff SJ, Matziolis G, Schmidt M. Evaluation of a vital staining protocol with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride for cancellous bone in a sheep model. *Res Vet Sci* 2017; **114**: 131-5.
137. Pozo E, Sanz J. Imaging techniques in the evaluation of post-infarction function and scar. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2014; **67**(9): 754-64.
138. Babuin L, Jaffe AS. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ* 2005; **173**(10): 1191-202.
139. Daubert MA, Jeremias A. The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: review of the current findings. *Vasc Health Risk Manag* 2010; **6**: 691-9.
140. Sun M, Chen M, Dawood F, et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state. *Circulation* 2007; **115**(11): 1398-407.
141. Tian M, Yuan YC, Li JY, Gionfriddo MR, Huang RC. Tumor necrosis factor-alpha and its role as a mediator in myocardial infarction: A brief review. *Chronic Dis Transl Med* 2015; **1**(1): 18-26.
142. Hoyer FF, Nahrendorf M. Interferon-gamma regulates cardiac myeloid cells in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2019; **115**(13): 1815-6.
143. Finger S, Knorr M, Molitor M, et al. A sequential interferon gamma directed chemotactic cellular immune response determines survival and cardiac function post-myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2019; **115**(13): 1907-17.
144. Tollefsen IM, Shetelig C, Seljeflot I, Eritsland J, Hoffmann P, Andersen GO. High levels of interleukin-6 are associated with final infarct size and adverse clinical events in patients with STEMI. *Open Heart* 2021; **8**(2).
145. Gabriel AS, Martinsson A, Wretling B, Ahnve S. IL-6 levels in acute and post myocardial infarction: their relation to CRP levels, infarction size, left ventricular systolic function, and heart failure. *Eur J Intern Med* 2004; **15**(8): 523-8.
146. Zhu Y, Hu C, Du Y, et al. Significant association between admission serum monocyte chemoattractant protein-1 and early changes in myocardial function in patients with first ST-segment elevation myocardial infarction after primary percutaneous coronary intervention. *BMC Cardiovasc Disord* 2019; **19**(1): 107.
147. Rodrigues JC, Rohan S, Dastidar AG, et al. The Relationship Between Left Ventricular Wall Thickness, Myocardial Shortening, and Ejection Fraction in Hypertensive Heart Disease: Insights From Cardiac Magnetic Resonance Imaging. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2016; **18**(11): 1119-27.

148. Gao S, Ho D, Vatner DE, Vatner SF. Echocardiography in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 2011; **1**: 71-83.
149. Benavides-Vallve C, Corbacho D, Iglesias-Garcia O, et al. New strategies for echocardiographic evaluation of left ventricular function in a mouse model of long-term myocardial infarction. *PLoS One* 2012; **7**(7): e41691.
150. Galli A, Lombardi F. Postinfarct Left Ventricular Remodelling: A Prevailing Cause of Heart Failure. *Cardiol Res Pract* 2016; **2016**: 2579832.
151. Pal E, Shokoples B, Naik S, Hogue K, Chalifour LE. A surgical recovery matrix to evaluate post-surgical recovery in mice using sham and myocardial infarction models of cardiac surgery as prototypes. *PLoS One* 2025; **20**(5): e0323317.
152. 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. *Transl Res* 2025; **280**: 1-16.
153. Eghbalzadeh K, Georgi L, Louis T, et al. Compromised Anti-inflammatory Action of Neutrophil Extracellular Traps in PAD4-Deficient Mice Contributes to Aggravated Acute Inflammation After Myocardial Infarction. *Front Immunol* 2019; **10**: 2313.
154. Gonzalvez M, Ruiz-Ros JA, Perez-Paredes M, et al. [Prognostic value of tumor necrosis factor-alpha in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction]. *Rev Esp Cardiol* 2007; **60**(12): 1233-41.
155. Groot HE, Al Ali L, van der Horst ICC, et al. Plasma interleukin 6 levels are associated with cardiac function after ST-elevation myocardial infarction. *Clin Res Cardiol* 2019; **108**(6): 612-21.
156. Li Z, Liu Y, Zhang Y, Zhang Z, Lei S, Shen H. NETs promote fibroblast-like synoviocytes producing IL-6 to enhance T follicular helper cell response in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2025; **44**(9): 3419-32.
157. Tarzami ST, Calderon TM, Deguzman A, Lopez L, Kitsis RN, Berman JW. MCP-1/CCL2 protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis by a G(alpha i)-independent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **335**(4): 1008-16.
158. Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, et al. Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res* 2006; **99**(8): 891-9.
159. Hofbauer TM, Ondracek AS, Mangold A, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce MCP-1 at the Culprit Site in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Front Cell Dev Biol* 2020; **8**: 564169.
160. Salto-Tellez M, Yung Lim S, El-Oakley RM, Tang TP, ZA AL, Lim SK. Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: a quantifiable and highly reproducible experimental model. *Cardiovasc Pathol* 2004; **13**(2): 91-7.
161. Manrique A, Gerbaud E, Derumeaux G, et al. Cardiac magnetic resonance demonstrates myocardial oedema in remote tissue early after reperfused myocardial infarction. *Arch Cardiovasc Dis* 2009; **102**(8-9): 633-9.
162. Matter MA, Paneni F, Libby P, et al. Inflammation in acute myocardial infarction: the good, the bad and the ugly. *Eur Heart J* 2024; **45**(2): 89-103.

163. van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol* 2007; **170**(3): 818-29.
164. Akboua H, Eghbalzadeh K, Keser U, Wahlers T, Paunel-Gorgulu A. Impaired non-canonical transforming growth factor-beta signalling prevents profibrotic phenotypes in cultured peptidylarginine deiminase 4-deficient murine cardiac fibroblasts. *J Cell Mol Med* 2021; **25**(20): 9674-84.
165. Shao Y, Guo Z, Yang Y, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to myofibroblast differentiation and scar hyperplasia through the Toll-like receptor 9/nuclear factor Kappa-B/interleukin-6 pathway. *Burns Trauma* 2022; **10**: tkac044.
166. Ichimura S, Misaka T, Ogawara R, et al. Neutrophil Extracellular Traps in Myocardial Tissue Drive Cardiac Dysfunction and Adverse Outcomes in Patients With Heart Failure With Dilated Cardiomyopathy. *Circ Heart Fail* 2024; **17**(6): e011057.
167. Van Bruggen S, Kraisin S, Van Wauwe J, et al. Neutrophil peptidylarginine deiminase 4 is essential for detrimental age-related cardiac remodelling and dysfunction in mice. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2023; **378**(1890): 20220475.
168. Feng Q, Li Q, Zhou H, et al. The role of major immune cells in myocardial infarction. *Front Immunol* 2022; **13**: 1084460.
169. Kenny EF, Herzig A, Kruger R, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife* 2017; **6**.
170. Jones JE, Slack JL, Fang P, et al. Synthesis and screening of a haloacetamidine containing library to identify PAD4 selective inhibitors. *ACS Chem Biol* 2012; **7**(1): 160-5.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland 2024	14
Abbildung 2	Aktivierung des Immunsystems nach MI	16
Abbildung 3	Leukozyten und Zytokine im Infarktgewebe nach MI	20
Abbildung 4	ECM-Synthese und Remodeling nach MI	21
Abbildung 5	Lytische NETose	25
Abbildung 6	Citrullinierungsreaktion	29
Abbildung 7	Übersicht der experimentellen Abläufe	39
Abbildung 8	Darstellung der Anästhesie zur Einleitung und am (Operations)-Arbeitsplatz	41
Abbildung 9	OP-Situs nach Thorakotomie	43
Abbildung 10	Bildschirmaufnahme der VevoLAB Ansicht in parasternaler Längsachse	45
Abbildung 11	Vorbereitung der kardialen Blutentnahme einer LAD-ligierten Maus	46
Abbildung 12	PAD4 ^{-/-} -PMNs zeigten keine NETose nach Ionomycin-Stimulation	53
Abbildung 13	PAD4 ^{-/-} -PMNs produzierten nach Stimulation weniger cfDNA	54
Abbildung 14	PAD4 ^{-/-} -Mäuse zeigen größeres Infarktareal	56
Abbildung 15	Erhöhte cTNT-Plasmakonzentration in PAD4 ^{-/-} -Mäusen in der akuten Phase nach MI	57
Abbildung 16	Erhöhte cfDNA-Plasmakonzentrationen bei PAD4 ^{-/-} -Mäusen in der akuten Phase nach MI	58
Abbildung 17	TNF- α , IFN- γ , IL-6 und MCP-1 Plasmakonzentration nach MI	60
Abbildung 18	Auswirkung des MI auf die Myokardkontraktilität und Ventrikeldurchmesser	62
Abbildung 19	Systolische und diastolische LVPW nach MI oder Sham-OP in WT- und PAD4 ^{-/-} -Mäusen	64
Abbildung 20	Repräsentative Darstellung der parasternalen Längsachse im TTE eines Herzens mit MI an Tag 3	65
Abbildung 21	EDV nach MI in PAD4 ^{-/-} -Mäusen und WT-Mäusen	66
Abbildung 22	SV nach einem MI in PAD4 ^{-/-} -Mäusen und WT-Mäusen	67
Abbildung 23	LVEF nach einem MI in PAD4 ^{-/-} -Mäusen und WT-Mäusen	68
Abbildung 24	Präoperatives Körpergewicht	69
Abbildung 25	PAD4 ^{-/-} -Mäuse erleiden einen geringeren Gewichtsverlust und sterben in der akuten Phase nach einem MI	70

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Remodelingphasen mit ihren zugehörigen Biomarkern	21
Tabelle 2	Auflistung aller für die Experimente benutzter Materialien und Reagenzien, inklusive Antikörper und Kits	31
Tabelle 3	Auflistung aller für die Experimente benutzter Geräte und benötigter Software	33
Tabelle 4	Auflistung aller für die Experimente benutzter Medikamente und Verbrauchsmaterialien	34
Tabelle 5	Ansatz für 50 ml HBSS prep (HBSS + 3 % FCS)	37
Tabelle 6	Ansatz für 50 ml 0,2 % NaCl	37
Tabelle 7	Ansatz für 50 ml 1,2 % NaCl	37
Tabelle 8	Ansatz für 10 ml 62 % Percoll in HBSS prep	38
Tabelle 9	Ansatz für 500 ml 4 % PFA in PBS	38
Tabelle 10	Ansatz für 10 ml Blockierungspuffer (PBS + 0,3 % TritonX-100 + 1 % BSA + 5 % NGS)	38
Tabelle 11	Ansatz für 50 Färbepuffer (PBS + 0,1 % TritonX-100)	38
Tabelle 12	Übersicht über die durch die TTE ermittelten kardialen Funktionsparameter in der langen Achse	44

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Das zugrunde liegende Manuskript für diese Dissertation wurde bereits am 01.10.2019 in *Frontiers in Immunology* veröffentlicht.¹⁵³