

Aus der

Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der
Universität Tübingen

**Einfluss des Tabakrauchens auf die PAD4 Expression
in neutrophilen Granulozyten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Mück, Jonas Karsten

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. S. Ehnert

2. Berichterstatter: Professorin Dr. R. Klein

Tag der Disputation: 10.03.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	10
1. Einleitung	13
1.1 <i>Tabakrauchen</i>	13
1.1.1 Mechanismen der Abhängigkeit	13
1.1.2 Epidemiologie	14
1.1.3 Schädliche Effekte	15
1.1.4 Einfluss auf das Immunsystem	17
1.1.5 Rauchen, Rauchstopp und neutrophile Granulozyten.....	19
1.2 <i>Der neutrophile Granulozyt</i>	20
1.2.1 Funktionen der neutrophilen Granulozyten	20
1.2.2 Pathologien	22
1.2.3 Bildung von Neutrophilen Extrazellulären Fallen (NETs)	23
1.2.4 NETopathien	25
1.2.5 Rauchen und NETose	27
1.3 <i>PAD4</i>	28
1.4 <i>Postoperative Komplikationen an der BGU Tübingen</i>	30
1.4.1 Prävalenzen und Risikogruppen.....	30
2. Ziele der Studie	34
3. Methoden	35
3.1 <i>Studiendesign und Ablauf</i>	35
3.2 <i>Begutachtung durch die Ethikkommission</i>	36
3.3 <i>Studienpopulation</i>	37
3.3.1 Studiengruppen	37
3.3.2 Subgruppen	37
3.3.3 Best Possible Matching	38
3.3.4 Ausschlusskriterien.....	39
3.3.5 Definition der postoperativen Komplikation	39

3.4	<i>Fragebögen zur Datenerhebung</i>	40
3.4.1	Allgemeiner Teil.....	40
3.4.2	Nutritional Risk Score (NRS 2002).....	41
3.4.3	Short Form 36 Items (SF-36).....	41
3.4.4	Rauchverhalten.....	42
3.4.5	Daten aus dem Krankenhausinformationssystem.....	42
3.4.6	Erhebungsbogen „Follow Up“ nach 6 Monaten.....	43
3.5	<i>Identifikation des stabilsten Housekeeping Gens</i>	44
3.6	<i>Ablauf der Probengewinnung zur PAD4 Analyse</i>	45
3.6.1	Blutabnahme.....	45
3.7	<i>Isolation von neutrophilen Granulozyten und Zellyse</i>	45
3.8	<i>Quantifizierung der relativen PAD4-mRNA Expression</i>	46
3.8.1	RNA-Isolation, Konzentrationsmessung und Integrity Check.....	46
3.8.2	cDNA-Synthese und konventionelle PCR zur Kontrolle.....	48
3.8.3	Relative Quantifizierung der Genexpression mit Real-Time qPCR SYBR Green.....	51
3.9	<i>PAD4 Quantifizierung auf Proteinebene</i>	53
3.9.1	Dot Blot Datenauswertung.....	55
3.10	<i>Statistische Auswertung</i>	55
4.	Ergebnisse	57
4.1	<i>Stabilste Housekeeping Gene für Neutrophile sind EF1α und RPL13a</i>	57
4.2	<i>Patientenkollektiv</i>	58
4.2.1	Nachträglicher Ausschluss von Patienten.....	58
4.2.2	Ausgeglichene Zusammensetzung der Studiengruppen.....	59
4.2.3	Verteilung an die aufnehmenden Fachabteilungen unterscheidet sich zwischen Rauchern und Nichtrauchern.....	61
4.3	<i>qPCR - PADI4 mRNA Expression ist bei Rauchern erhöht</i>	62
4.4	<i>DotBlot - Relative PAD4 Protein Expression zeigt keine Unterschiede im Gruppenvergleich</i>	63
4.5	<i>Mehr postoperative Komplikationen bei Rauchern – keine Verbindung zur PADI4 Expression erkennbar</i>	65
4.6	<i>Subgruppenanalysen</i>	66
4.6.1	Ehemalige Raucher haben keine erhöhte PADI4 Expression.....	66
4.6.2	Geschlechter zeigen keine wesentlichen Unterschiede bei der neutrophilen PADI4 Expression.....	67

4.6.3	Ältere haben häufiger erhöhte <i>PAD4</i> Expression.....	68
4.6.4	Umgekehrte Korrelation des BMI mit der <i>PADI4</i> Expression.....	69
4.6.5	Höhere <i>PADI4</i> Expression bei kardiovaskulärer und allgemeiner Multimorbidität 70	
4.6.6	Mehr Malnutrition bei Komplikationsverläufen und Rauchern.....	72
5.	Diskussion.....	73
5.1	<i>Einflussfaktoren auf die PADI4 Expression</i>	73
5.2	<i>Diskussion der Ergebnisse</i>	74
5.2.1	Gruppenkollektiv und qPCR Daten.....	74
5.2.2	Dot Blot nicht aussagekräftig.....	77
5.2.3	<i>PADI4</i> Expression und Komplikationsentwicklung	79
5.2.4	Kein Einfluss des Geschlechts auf die PAD4 Expression	81
5.2.5	Regeneration der PAD4 Regulation nach langjähriger Rauchabstinenz?	82
5.2.6	Im Alter höhere <i>PADI4</i> Expression und mehr Raucher unter den Multimorbiden. 84	
5.2.7	Mangelernährung durch Rauchen verstärkt die Komplikationsneigung.....	84
5.3	<i>Klinische Erkenntnisse</i>	86
5.3.1	<i>PAD4</i> als mögliches Therapietarget von Immundysregulationen bei Rauchern? – ein klinischer Ausblick.....	86
5.4	<i>Limitierungen der Arbeit</i>	90
6.	Zusammenfassung	92
7.	Anhang.....	94
7.1	<i>Material und Geräte</i>	94
7.1.1	Chemikalien	94
7.1.2	Puffer und Lösungen	95
7.1.3	Geräte.....	96
7.1.4	Softwares.....	97
7.1.5	Deskriptive Statistik mit Unterteilung in 3 Gruppen	97
7.1.6	Weitere NETopathien	98
8.	Literaturverzeichnis.....	105
9.	Erklärungen der Dissertationsschrift	129
10.	Danksagung	131

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über die Mechanismen der Abhängigkeitsentwicklung nach Benowitz et al 2010 [7].....	14
Abbildung 2: Raucheranteile in Deutschland aus dkfz: Tabakatlas 2015 S. 36 mit Erlaubnis zur Nutzung [6]	15
Abbildung 3: Allgemeine gesundheitliche Schäden des Tabakkonsums aus dkfz: Tabakatlas 2015 S.27 mit Erlaubnis zur Nutzung [6].....	17
Abbildung 4: Übersicht über die Funktionen der neutrophilen Granulozyten aus Mocsai 2013 [69] mit Erlaubnis zur Nutzung. ROS = Reactive oxygen species.	21
Abbildung 5: Übersicht über die gewebereparierenden Funktionen der Neutrophilen aus Wang 2018 [55] mit Erlaubnis zur Nutzung. VEGF = Vascular epithelial growth factor. MMP = Matrix-Metalloprotease.	22
Abbildung 6: Neutrophil Extracellular Traps aus Brinkmann et al. 2004 [114] mit erteilter Nutzungserlaubnis. E: Hochauflösende Rasterelektronenmikroskopie von NETs bestehend aus glatten Fasern und globulären Domänen. Bar = 500 µm. C: Rasterelektronenmikroskopie von Shigella flexneri gefangen in NETs. Bar = 500 nm.	24
Abbildung 7: Prävalenz der Komplikationen bei primären und Revisionsgelenkersatzoperationen an der BG Unfallklinik Tübingen nach Ehnert et al. 2019 [17]. Orange = mit Komplikation; Blau = ohne Komplikation.	30
Abbildung 8: Ergebnisse zu Risikofaktoren für postoperative Komplikationen (w/ = mit Komplikationen; w/o = ohne Komplikationen) aus Ehnert et al. 2019 [17]. A) & D): Boxplots mit Nutritional Risk Screening (NRS) bei primärer (links) und Revisionsoperation (rechts) nach Gelenkersatz (TJA). B) & E) = Kuchendiagramm mit Alkoholkonsum bei primärer (links) und Revisionsoperation (rechts) nach TJA. C) & F) = Kuchendiagramm mit Zigarettenkonsum bei primärer (links) und Revisionsoperation (rechts) nach TJA.	31
Abbildung 9: Übersicht über die Arbeitsschritte.	36
Abbildung 10: Schichten bei der Neutrophilenisolation mittels Lympholyte Poly; PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells; angelehnt an Cedarlane Laboratories' Protokoll [316]	45
Abbildung 11: Absorptionsspektren verschiedener RNA Proben unterschiedlicher Reinheit/Qualität [319].	48
Abbildung 12: Programm des Thermocyclers für die cDNA Synthese. Angelehnt an die Gebrauchsanleitung des Herstellers [318]. Einheiten der Zahlen über der Linie [°C]/Zahlen unter der Linie [Minuten].	50
Abbildung 13: Einstellung der Thermocycler für die Kontroll-PCR der synthetisierten cDNA mit dem Housekeeping Gen EF1α; °C = Grad Celsius; min = Minuten; sec = Sekunden. Annealing temperature = 56 °C für EF1α.....	50

Abbildung 14: Aufnahme des INTAS Science Imaging Gerätes einer PCR und eines Integrity Checks. Im Integrity Check stellt der linke Strich den größeren 28S-Anteil und der rechte Strich den kleineren 18S-Anteil dar. Wenn beide Striche in dieser Anordnung zu sehen sind, gilt die RNA als intakt.....	51
Abbildung 15: Einstellung des StepOnePlus qPCR Systems für die qPCR mit den HKGs EF1 α und RPL13a; die Temperaturen in den Zonen waren für EF1 α und RPL13a 56 Grad Celsius und für PADI4 60 Grad Celsius; min = Minuten; sec = Sekunden.....	53
Abbildung 16: A) Dot Blotter T790.1 von Carl Roth. B) Dot Blot Membran nach Proteinladung über Dot Blotter und Färbung mit Ponceau-S-Lösung.....	54
Abbildung 17: Ranking der geprüften Housekeeping Gene hinsichtlich der interindividuellen Stabilität in Neutrophilen durch die excel templates Normfinder, GeNorm, BestKeeper und deltaCt. Die Graphik bildet von innen nach außen die Ranking Stufen 1-5 ab. 1 stellt das interindividuell stabilste und somit beste Housekeeping Gen dar.....	57
Abbildung 18: Flow Chart zum Ausschluss von Patienten.....	59
Abbildung 19: Verteilung der Probanden an die Fachabteilungen. C) und D) zeigen die Aufteilung der Raucher in moderate und starke Raucher. HPRV = Hand-, Plastische, Rekonstruktive, Verbrennungschirurgie. Sonstige = Wirbelsäulenchirurgie, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie.....	62
Abbildung 20: A) & B): Relative PADI4 mRNA Expression im Gruppenvergleichen: NR = Nichtraucher (N = 42), R = Raucher (N = 42). Wilcoxon Test. MR = Moderate Raucher (N = 17); SR = Starke Raucher (N = 25). Kruskal-Wallis Test. C) Korrelationsanalyse innerhalb der Rauchergruppe: Pack Years gegen relative mRNA Expression von PAD4 (N = 42). Spearman r = 0,35, p = 0,02, Steigung = 0,05.....	63
Abbildung 21: A) & B): Relative PAD4 Protein-Expression im Dot Blot im Gruppenvergleich. NR = Nichtraucher (N = 40, n = 2); R = Raucher (N = 40). MR = Moderate Raucher (N = 16, n = 2); SR = Starke Raucher (N = 24, n = 2). Kruskal-Wallis Test. C) Korrelationsanalyse innerhalb der Rauchgruppe: Pack Years gegen relative Protein Expression von PAD4 (N = 40, n = 2). Spearman r = -0,0036, p = 0,97, Steigung = -0,009.....	64
Abbildung 22: Postoperative Komplikationen: A) Relative PADI4 mRNA Expression von Patienten mit (N = 14) und ohne (N = 70) Komplikationsentwicklung. Mann-Whitney Test. B) Kuchendiagramm mit Anteilen der Raucher (= R) und Nichtraucher (= NR) mit und ohne Komplikation (R mit: N = 11; NR mit: N = 3; R ohne: N = 31; NR ohne: N = 39) an der gesamten Population (N = 84). C) Säulendiagramm mit relativer PADI4 mRNA Expression zwischen Rauchern und Nichtrauchern mit und ohne Komplikation. 2way Anova Analyse. D) Venn-Diagramm zur näheren Beschreibung der Komplikationen. In Klammern kursiv die Anteile der jeweiligen Komplikationen an der Gesamtpopulation.....	66
Abbildung 23: A) Relative neutrophile PADI4 mRNA Expression in Bezug auf den aktuellen Rauchstatus. NR = Nichtraucher (N = 42); ER = Exraucher (N = 13); R = Raucher (N = 29). Kruskal-Wallis Test. B) PADI4 mRNA Expression im Gruppenvergleich unter Ausschluss von	

ehemaligen Rauchern und deren Kontrollen. Matching in Auswertung beachtet. NR = Nichtraucher (N = 29); R = Raucher (N = 29). Wilcoxon Matched Pairs-Test.	67
Abbildung 24: A)-C) zeigen die Verteilung der Geschlechter im detaillierten Gruppenvergleich. Die Gesamtgruppe der Raucher haben dieselbe Geschlechterverteilung wie Nichtraucher (Weiblich: N = 20; Männlich: N = 22). M = männlich (N = 44), W = weiblich (N = 40). D) PADI4 mRNA Expression im Geschlechtervergleich. M: Männlich (N = 44). W: Weiblich (N = 40). Mann-Whitney Test.	68
Abbildung 25: Zusammenhang des Alters mit der relativen PADI4 mRNA Expression. A) Boxplot mit altersabhängigen Gruppen: 30-49 Jahre: N = 24; 50-60 Jahre: N = 36; 61-75 Jahre: N = 26. Kruskal-Wallis Test. B) Korrelationsanalyse Alter gegen relative mRNA Expression von PAD4 (N = 84). Spearman $r = 0,09$, $p = 0,43$, Steigung = $0,093$	69
Abbildung 26: A) Abhängigkeit der relativen PADI4 mRNA Expression vom Body Mass Index (BMI) der Probanden. Einheit des BMI: kg/m^2 . 20-25,9: N = 31; 26-30: N = 32; >30: N = 21. Kruskal-Wallis Test B) Korrelationsanalyse BMI gegen gerauchte PY (N = 84). Spearman $r = -0,13$, $p = 0,23$, Steigung = $-0,46$	70
Abbildung 27: Abhängigkeit der relativen PADI4 mRNA Expression von der Anzahl der A) systemischen Erkrankungen und B) systemischen Medikamente der Probanden. A) Kruskal-Wallis Test. C) Aufschlüsselung der Multimorbiden (Probanden mit >4 systemischen Erkrankungen) in Raucher (R: N = 4) und Nichtraucher (NR: N = 3) und Abhängigkeit zur relativen PADI4 mRNA Expression. Mann-Whitney Test. D) Abhängigkeit der relativen PADI4 mRNA Expression von kardiovaskulären Vorschäden (reine arterielle Hypertonie nicht inbegriffen). Gesund: N = 74, Krank: N = 10. Mann-Whitney Test. E) Aufschlüsselung der kardiovaskulär Vorgeschädigten in Nichtraucher (NR: N = 3) und Raucher (R: N = 7). Mann-Whitney Test.	71
Abbildung 28: A) Scatter dot plot: Nutritional Risk Screening (NRS) im Gruppenvergleich. NR = Nichtraucher (N = 42); R = Raucher (N = 42). Mann-Whitney Test. B) Boxplot: NRS in Abhängigkeit zur Komplikationsentwicklung. Mit Komplikation (N = 14), Ohne Komplikation (N = 70). Mann-Whitney Test. C) Boxplot: Abhängigkeit der relativen PADI4 mRNA Expression vom NRS. 0: N = 52; 1: N = 20; 2-3: N = 12. Kruskal-Wallis Test.	72
Abbildung 29: Gruppierte Boxplots der replizierten relativen PAD4 Proteinexpression im 1. Durchlauf (= Run) (N = 80) und 2. Durchlauf (N = 72) des Dot Blots. Nichtraucher 1. Run: N = 40; 2. Run: N = 36. Moderate Raucher 1. Run: N = 16; 2. Run: N = 14. Starke Raucher 1. Run: N = 24; 2. Run: N = 22. Kruskal-Wallis Test.	78
Abbildung 30: Aufnahmen der Dot Blots: A) In Ponceaufärbung zum qualitativen Nachweis von Proteinen. B) Repräsentative Fluoreszenzaufnahme nach Antikörperinkubation von PAD4 und Zugabe von ECL-Lösung im ChemoCam. Auffallend hohe Hintergründe und hell leuchtende hämolytische Proben. Maßstab: 1 Dot = 3,2 mm.	78
Abbildung 31: NRS = Nutritional Risk Screening 2002 [303].	103
Abbildung 32: SF-36 = Short Form - 36.	104

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Mechanismen der Immundysregulation in Rauchern (nach Costenbader et al. 2006).</i>	18
<i>Tabelle 2: Liste der relevantesten Netopathien mit pathogenetischer Beteiligung der NETs. Weitere in Tabelle 17 im Anhang.</i>	26
<i>Tabelle 3: Erkrankungen mit erhöhter PAD4 Expression.</i>	30
<i>Tabelle 4: Systemische Risikofaktoren für postoperative Komplikationen.....</i>	33
<i>Tabelle 5: Verwendete PCR Primer [Primer BLAST].</i>	48
<i>Tabelle 6: Bestandteile der Mastermischungen für die cDNA Synthese.</i>	49
<i>Tabelle 7: Ansatz der Kontroll-PCR auf das Housekeeping Gen EF1a.....</i>	50
<i>Tabelle 8: Komponenten pro Well in der qPCR; HKG = Housekeeping Gen, PADI4 = Peptidyl- Arginin-Deiminase 4.</i>	52
<i>Tabelle 9: Verwendete Antikörper.</i>	55
<i>Tabelle 10: Allgemeine Beschreibung der Studiengruppen; mit Durchschnitt, Standardabweichung und die Reichweiten in Klammern kursiv.</i>	60
<i>Tabelle 11: Quotenverhältnisse des Rauchstatus zur Komplikationsentwicklung. In Klammern kursiv stehen die Prozentwerte. Odd's Ratio = 4.61. Contingency Test.</i>	65
<i>Tabelle 12: Verwendete Chemikalien (Lagerbedingungen).</i>	94
<i>Tabelle 13: Verwendete Puffer und Lösungen.</i>	95
<i>Tabelle 14: Verwendete Geräte.</i>	96
<i>Tabelle 15: Verwendete Software.</i>	97
<i>Tabelle 16: Allgemeine Beschreibung des Patientenkollektivs in 3 Gruppen differenziert; mit Durchschnitt, Standardabweichung und die Reichweiten in Klammern kursiv. Bei den Komplikationen lagen häufig kombinierte Komplikationen vor. Diese sind hier einzeln aufgeführt. PY = Pack Years; Endo = Endoprothetik; ASK = Arthroskopie; Trauma = Unfallchirurgie; SEP = Septische Chirurgie; HPRV = Hand-, Plastische, Rekonstruktive, Verbrennungschirurgie; Sonst, = Sonstige (z.B. Wirbelsäulenchirurgie, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie); NRS = Nutritional Risk Score; SF-36 = Short Form 36 Items; KöFu = Körperliche Funktionsfähigkeit; KöRo = Körperliche Funktionsfähigkeit; EmRo = Emotionale Rollenfunktion; Ages = Allgemeine Gesundheit. Kruskal-Wallis-Test zur Berechnung der p-Werte.....</i>	97
<i>Tabelle 17: Weitere NETopathien, ergänzend zu Tabelle 2. Für detailliertes Quellenverzeichnis bitte Autor kontaktieren.</i>	98

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

µmol/l	Mikromol pro Liter
Abb.	Abbildung
ANCA	Anti-Neutrophile Zytoplasmatische Antikörper
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
BGU	Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik
BMI	Body Mass Index
ca.	Circa
CD	Cluster of differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein
Ct	Cycle Threshold
DAMPs	Damage associated molecular patterns
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EET	Eosinophil extracellular traps
ECL	Enhanced chemoluminescent
etc.	et cetera
Fc-Rezeptor	Fragment crystallizable receptor
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
h	Stunde
HMGB-1	High-Mobility-Group-Protein B1
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
ID	Identifikationsnummer
IFN-1	Typ-1-Interferon
IL-8	Interleukin-8
i.v.	intravenös
LPS	Lipopolysaccharide
M	Stoffmengenkonzentration
mg	Milligramm
mg/d	Milligramm pro Tag
min.	minimal
Min.	Minuten
mind.	mindestens
ml	Milliliter
MPO	Myeloperoxidase

Abkürzungsverzeichnis

mtROS mitochondriale reaktive oxidative Sauerstoffverbindung
MS Multiple Sklerose
MW Mittelwert
mM Millimolar
MMP Matrix-Metallo-Protease
NADPH Oxidase Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat Oxidase
NE Neutrophile Elastase
NET Neutrophil extracellular traps
NF- κ B nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NRS Nutritional Risk Screening
NR-Skala Numerische Rating Skala
OD Optische Dichte
OP Operation
Ø Durchschnitt
PAD4 Peptidyl-Arginin-Deiminase 4
pDC Plasmacytoide dendritische Zellen
PE Präeklampsie
PMA Phorbol-12-myristat-13-acetat
postop. postoperativ
präop. präoperativ
prox. proximal
RIPA Radio Immuno Precipitation Assay
ROS reaktive oxidative Sauerstoffverbindungen
StAbw. Standardabweichung
SWI Siegfried -Weller - Institut
Tab. Tabelle
TGF- β Transforming Growth Factor - β
TLR Toll-like Rezeptor
TNF- α Tumor Nekrose Faktor α
U/min Umdrehungen pro Minute
v. a. vor allem

Abkürzungsverzeichnis

Anmerkung: In dieser Arbeit wurde hauptsächlich die männliche Form von Personengruppen verwendet, wobei stets alle Geschlechter gemeint sind, falls nicht explizit anders beschrieben.

Einleitung

„Ein leidenschaftlicher Raucher, der immer von der Gefahr des Rauchens für die Gesundheit liest, hört in den meisten Fällen auf - zu lesen.“

- Winston Churchill

1. Einleitung

Tabakkonsum stellt eine der häufigsten Abhängigkeitserkrankungen weltweit dar. Die enthaltenen Schadstoffe lassen Menschen nicht nur kürzer leben, sondern auch früher altern und erkranken [1]. Trotz sinkender Konsumentenzahlen sind circa (ca.) 30 % der deutschen Bevölkerung durch aktive oder passive Exposition von den gesundheitlichen Folgen betroffen (Tabakatlas Deutschland 2015 DKFZ). Diese Schäden sind bekanntermaßen vielfältig und weitreichend. Neben kardiovaskulären, pulmologischen und onkologischen Erkrankungen erscheint aus unfallmedizinischer Sicht die gestörte Wundheilung und erhöhte postoperative Komplikationsneigung von besonderem Interesse [2]. Besonders die immunzellulären Mechanismen hinter diesem Problem bleiben noch zu klären. Im Mausmodell konnten Wong *et al.* 2015 unter diabetischen Bedingungen eine Kausalität zwischen einer gesteigerten Bildung von Neutrophilen Extrazellulären Fallen (NETose) und gestörter Wundheilung nachweisen. Eine vermehrte NETose ging dabei mit erhöhter Expression und Aktivität der Peptidyl-Arginin-Deiminase 4 (PAD4) in neutrophilen Granulozyten einher [3]. Angesichts der wichtigen Rolle von neutrophilen Granulozyten bei der Wundheilung und der bekannten Immundysregulation von Rauchern ist es nun naheliegend hier einen ähnlichen Zusammenhang wie bei Diabetikern zu untersuchen [4]. Könnte Tabakkonsum eine gesteigerte Expression/Aktivität von PAD4 verursachen und so eine Schlüsselrolle in der verzögerten Wundheilung spielen?

1.1 Tabakrauchen

1.1.1 Mechanismen der Abhängigkeit

Der Beginn einer Tabakabhängigkeit wird insbesondere durch das soziale Umfeld einer Person und dessen Akzeptanz gegenüber dem Rauchen begründet [5]. Ein so entstandener regelmäßiger Konsum wird durch die verschiedenen als angenehm empfundenen Effekte des Rauchens positiv verstärkt. Hierbei wirkt

Einleitung

Nikotin als Transmitter an nikotinerger Acetylcholin-Rezeptoren unspezifisch im Körper und fördert im Gehirn damit die willkürliche Ausschüttung von Dopamin an Belohnungszentren des Gehirns [6]. Kurzfristige positiv-belohnende Effekte werden durch längerfristig-süchtig-machende Effekte verstärkt (genauere Übersicht siehe Abb. 1 (= Abbildung)).

Aufgrund von Anpassungen des Körpers, zum Beispiel (z.B.) durch synaptische Rezeptorreduktion, reichen körpereigene Transmitter nicht mehr aus, um eine Balance zu erreichen. Nun wird die externe Zufuhr von Nikotin zwangsläufig benötigt, um eine negative Gefühlslage zu vermeiden. Auf diesem Weg ist die körperliche und psychische Abhängigkeit erreicht [7]. All dies begründet die enorm hohe Verbreitung des Tabakrauchens.

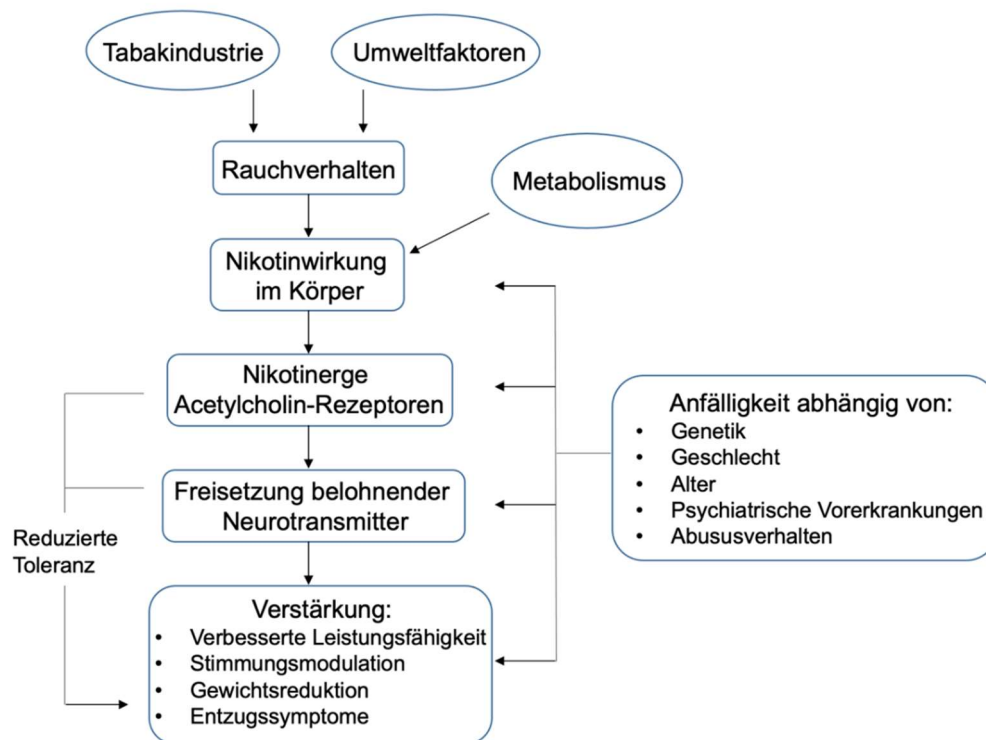


Abbildung 1: Überblick über die Mechanismen der Abhängigkeitsentwicklung nach Benowitz et al 2010 [7].

1.1.2 Epidemiologie

2015 rauchten weltweit 1,1 Milliarden Menschen Tabak. Überall sind es deutlich mehr männliche als weibliche Raucher. Es existieren enorme regionale Unterschiede in der Prävalenz und Entwicklung des Tabakkonsums [8].

Auch im gesundheitsbewussten Deutschland fanden sich 2015 trotz fallender Tendenzen 24,6 % Raucher unter den über 14-Jährigen, wobei ca. 33 % der Menschen zwischen 15 und 54 Jahren rauchten und der größte Raucheranteil

Einleitung

bei den 21- bis 39-Jährigen lag [9, 10]. Die Konsummenge betreffend lässt sich sagen, dass hier fallende Tendenzen zu sehen sind. So rauchten 1992 noch knapp 37 % der Jungen und Männer und 21,5 % der Mädchen und Frauen. Während 2013 nur noch 29 % der Jungen und Männer rauchten, wie die Diagramme von 2013 in Abb. 2 des Tabakatlas 2015 zeigen, blieb der Anteil der Frauen stabil [6]. Besonders der stark rauchende Anteil mit über 20 Zigaretten pro Tag hat sich innerhalb von 10 Jahren bei beiden Geschlechtern mehr als halbiert (2003: 30,2 % der männlichen Raucher ⇔ 2013: 12,1 % der männlichen Raucher), während der Anteil der Konsumenten mit bis zu 20 Zigaretten pro Tag stattdessen gestiegen ist [6] (Abb. 2).

In der mittleren bis höheren Altersklasse (30-64 Jahre) finden sich besonders viele starke Raucher mit einem Konsum von mehr als 20 Zigaretten pro Tag. In den jüngeren Gruppen (18-29 Jahre) hingegen sind die meisten moderate Raucher (bis 10 Zigaretten pro Tag) oder Gelegenheitsraucher [6, 11]. Das durchschnittliche Einstiegsalter des Rauchens ist seit den 1930er Jahren von 21 auf 17 Jahren gesunken [6].

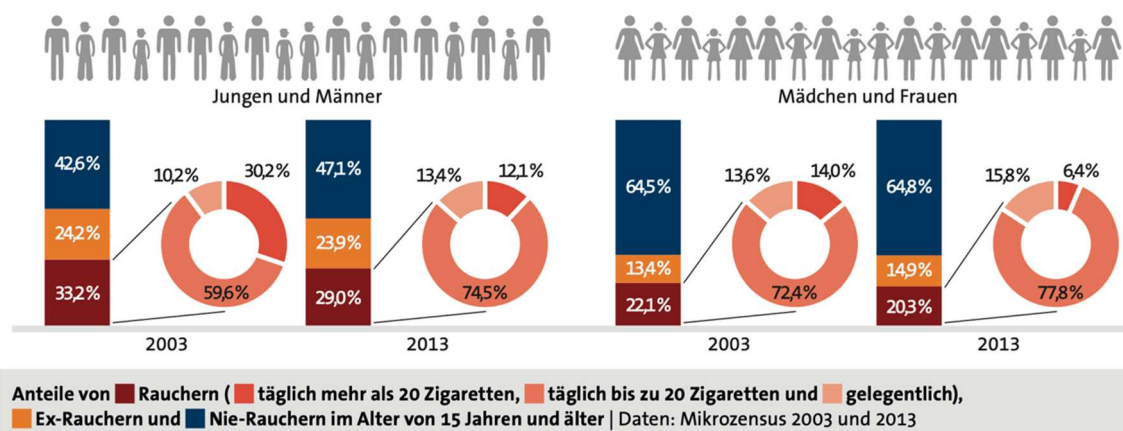


Abbildung 2: Raucheranteile in Deutschland aus dkfz: Tabakatlas 2015 S. 36 mit Erlaubnis zur Nutzung [6].

1.1.3 Schädliche Effekte

In Deutschland sterben jährlich 100.000 Menschen an den Folgen des Tabakrauchens, wobei 3 % der Todesfälle allein dem Passivrauchen verschuldet sind. Weltweit sterben etwa 6 Millionen Menschen pro Jahr an Folgen des Rauchens [9, 12].

Die direkten und indirekten finanziellen Schäden, die durch das Rauchen alleine in Deutschland entstehen, werden auf ca. 97 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt, wobei etwa ein Drittel als direkte Kosten aus dem Sektor der erweiterten

Einleitung

medizinischen Versorgung stammen [6, 13]. Die verbliebenen zwei Drittel sind indirekte Kosten aus den Wirtschaftsausfällen durch die um bis zu 77 % erhöhte Arbeitsunfähigkeit [14] und den verfrühten Renteneintritt [6].

Auf gesundheitlicher Seite bietet Tabakkonsum eine Bandbreite von schädlichen Effekten für den Körper. Dabei muss zwischen verschiedenen Modalitäten unterschieden werden: Einerseits direkte Effekte durch toxische und mutagene Schädigung des Zellmetabolismus und Erbguts und andererseits indirekte Effekte durch systemische Veränderungen im Hormonstatus, der vaskulären Gewebsversorgung, der Immunzellaktivität und der Oxygenierung. Diese Effekte wirken auf zahlreiche Gewebe des Körpers, u.a. weil nikotinerge Rezeptoren im Körper weit verbreitet sind (z.B. Gehirn, Lunge, Niere, Muskel, Endothel, Haut) und Tabak eine große Schadstoffbandbreite enthält [6, 15, 16]. Dies begründet die Vielfalt der Folgeerkrankungen des Tabakrauchens, welche in Abbildung (= Abb.) 3 zusammengefasst sind.

Für chirurgische Zentren wie die BG Unfallklinik Tübingen ist die Beeinträchtigung von Operationserfolgen von besonderem Interesse, da dies mit teils langwierigen, teuren und belastenden Komplikationen postoperativ einhergeht [17, 18]. Bekanntermaßen ist Tabakkonsum einer der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung von postoperativen Komplikationen, wie Wundheilungsstörungen [17]. Die Gewebsheilung ist ein inflammatorischer Prozess, weshalb es sinnvoll erscheint, genauer auf die Veränderungen des Immunsystems durch das Rauchen zu schauen [19]. Die aktuelle Studienlage zeigt außerdem, dass Zigarettenrauchen auf verschiedensten Ebenen eine Immundysregulation, also eine Suppression bei Pathogenbekämpfung (Infektneigung) und eine gleichzeitige Überreaktion an falscher Stelle (autoinflammatorische und Autoimmunerkrankungen), auszulösen scheint [20, 21].

Einleitung

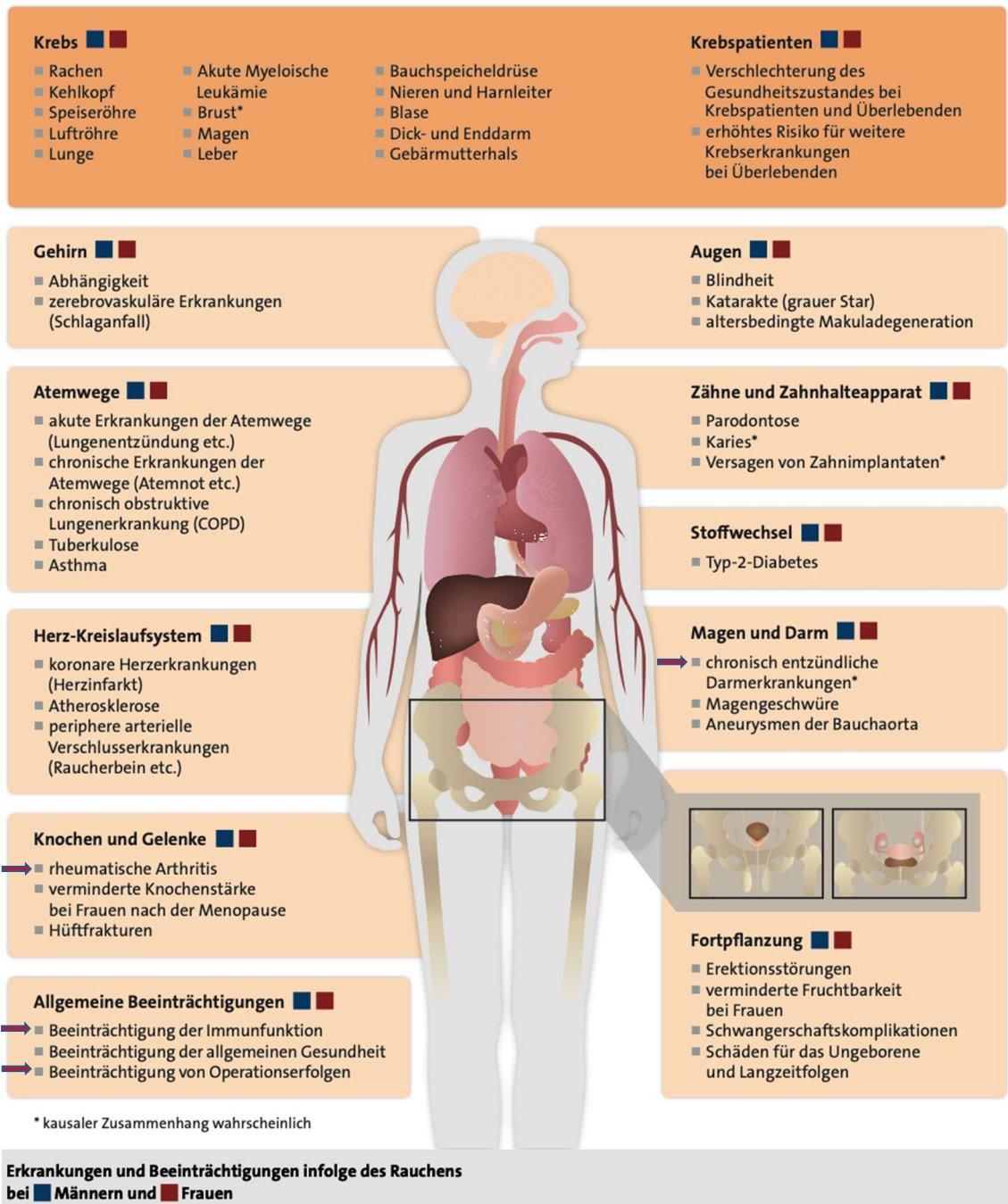


Abbildung 3: Allgemeine gesundheitliche Schäden des Tabakkonsums aus dkfz: Tabakatlas 2015 S.27 mit Erlaubnis zur Nutzung [6].

1.1.4 Einfluss auf das Immunsystem

Die deutlichen inflammatorischen und immunsuppressiven Veränderungen lokal an den Atemwegen durch Rauchttoxine wie Nikotin, freie Radikale (ROS), Cadmium, etc. sorgen bekanntermaßen für eine chronische Entzündung und Metaplasien einerseits sowie für eine erhöhte Infektanfälligkeit andererseits [21, 22]. Darüber hinaus stehen weitere generalisierte Effekte auf das Immunsystem im Vordergrund der aktuellen Forschung. So konnte bei Patienten welche einen

Einleitung

Gelenkersatz erhalten haben, gezeigt werden, dass Raucher eine signifikant supprimierte Immunantwort nach Operation (OP) aufweisen. Diese begünstigten eine deutlich erhöhte Komplikationsrate bei Operationen durch Infektionen [17].

Tabelle 1 zeigt eine grobe Übersicht über das Spektrum der immunmodulierenden Mechanismen des Rauchens:

Tabelle 1: Mechanismen der Immundysregulation in Rauchern (nach Costenbader et al. 2006).

Mechanismen		Referenz
Gewebsschädigung und erhöhte Apoptose	<ul style="list-style-type: none"> • Vermehrte Freisetzung freier Radikale • Erhöht die Expression von CD-95 auf Lymphozyten und erhöht so die Sensitivität auf apoptotische Signale • Führt zur Freisetzung von MMPs 	<ul style="list-style-type: none"> • [23-25] • [26] • [27] • [28, 29]
Immunsuppressiv	<ul style="list-style-type: none"> • Vermindert die Natürliche Killerzellaktivität • Induziert Veränderungen in T-Zellen und unterdrückt deren Aktivierung • Serumspiegel von IgG und IgM sind generell erniedrigt • Proinflammatorische Zytokine (IL-1β, IL-6 (gegensätzliche Ergebnisse in Literatur), TNF $-\alpha$, INF-γ (Interferon)) erniedrigt im Serum 	<ul style="list-style-type: none"> • [30-33] • [30, 32, 34, 35] • [32, 33, 36] • [17]
Inflammatorisch	<ul style="list-style-type: none"> • Sorgt für vermehrtes Fibrinogen im Serum • Erhöht die periphere Leukozytenzahl • Erhöht die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten und die Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen • Erhöht die Spiegel von CRP, IL-6 (gegensätzliche Ergebnisse in Literatur), ICAM-1 (Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül) und E-Selektin im Serum 	<ul style="list-style-type: none"> • [37, 38] • [25, 39] • [28, 29, 40] • [35, 41, 42]
Assoziierte Autoimmunerkrankungen	<ul style="list-style-type: none"> • Rheumatoide Arthritis • Systemischer Lupus Erythematoses • Multiple Sklerose • Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa v.a. bei ehemaligen Rauchern erhöht / bei aktuellen Rauchern allerdings erniedrigt) • Primäre biliäre Zirrhose • Immunhyperthyreose (Basedow) 	<ul style="list-style-type: none"> • [43-45] • [46, 47] • [48, 49] • [50, 51] • [52, 53] • [54]

Diese Zusammenstellung verdeutlicht den enormen, generalisierten und tiefreichenden Einfluss des Rauchens auf das systemische Immunsystem des Körpers. Auch wenn das Rauchen selten alleine für einen Krankheitsausbruch verantwortlich ist, so kann davon ausgegangen werden, dass es eine Risikoerhöhung bewirkt und als Auslöser immunologischer Erkrankungen bei genetisch prädisponierten Personen fungieren kann [55].

Auffällig ist der vielfache Zusammenhang zwischen dem Rauchen und dem Ausbruch von Autoimmunerkrankungen [46]. Pathophysiologische Mechanismen hinter diesem Zusammenhang scheinen v.a. die Beeinflussung der Expression von genetischen und immunologischen Faktoren durch das Rauchen zu sein

Einleitung

(z.B. Rheumafaktor, Anti-zyklischen citrullinierten Peptid Antigene (Anti-CCP-Antikörper), Anti-doppelstrang DNA Antikörper (Anti-ds-DNA-Antikörper)) [46]. Auch die Entstehung pathogener Lymphfollikel aus Lymphozyten wird diskutiert, welche für die vermehrte Bildung autoimmuner Antikörper gegen körpereigenes Gewebe verantwortlich sein sollen [21]. An dieser Stelle bedarf es weiterer Aufklärungsarbeit, da ein frühes Erkennen oder therapeutisches Eingreifen bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen viel Leidensdruck für den Patienten und Kosten für das Gesundheitssystem ersparen könnten.

1.1.5 Rauchen, Rauchstopp und neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten (im Folgenden „Neutrophile“ genannt) sind die am häufigsten vorkommenden angeborenen und omnipräsenten Immunzellen. Sie können auf viele Weisen die Heilungsstörung eines Gewebedefektes bedingen [56] und werden durch Zigarettenrauch dysreguliert [57]. Neueste Studien zeigen z.B., dass Zigarettenrauchen die bakteriziden Funktionen der Neutrophilen, v.a. die Phagozytose, die Produktion von $\text{TNF}\alpha$ (Tumor-Nekrose-Faktor) und diversen Wachstumsfaktoren, sowie die allgemeine Viabilität signifikant verschlechtert [58-60]. Dadurch trägt Zigarettenrauchen zur Immunsuppression bei. Andererseits finden sich bei Rauchern *in vivo* ein erhöhter oxidativer Stress mit systemischer Entzündung und besonderer Belastung für z.B. das Endothel [61]. Auch eine vermehrte Neutrophilie, sowie Aktivierung dieser Zellen kann bei Rauchern gefunden werden, da die neutrophile IL-8 Produktion (starkes Chemokin der Rekrutierung von Neutrophilen) durch Zigarettenrauch induziert und der Abbau blockiert wird [62, 63].

Allgemeine Regenerationseffekte des Rauchstopps drehen sich v.a. um die Verbesserung der Herz-/Kreislauf- und Lungenfunktion, sowie die Senkung des Krebsrisikos und Erweiterung der Lebenserwartung [64, 65]. Spezieller zum Immunsystem wurde an gesunden Freiwilligen herausgefunden, dass ein mind. 2-monatiger Rauchstopp die vorher deutlich erniedrigten mRNA Spiegel von inflammatorischen Proteinen in Neutrophilen (Interleukin (IL)-1 β , IL-8, Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α , vascular endothelial growth factor (VEGF) und Matrix Metalloproteinase (MMP)-8) teils signifikant wieder erhöht [60].

Durch diese Erkenntnisse des Raucheinflusses auf Neutrophile *in vitro*, in Mäusen und in gesunden Freiwilligen, ergeben sich neue Fragen: Welche

Einleitung

klinischen Ausprägungen bringen diese Veränderungen der Neutrophilen durch das Rauchen bei Patienten mit sich und falls ja, welche die beeinflussbaren Faktoren sind? An dieser Stelle wird weitere Aufklärungsarbeit benötigt, besonders beim Transfer auf Patienten, wie in dieser Arbeit geplant. Hierzu ergänzend werden im Folgenden die Neutrophilen sowie ihre Rolle bei Immunpathologien und im Heilungsprozess näher erläutert [66, 67].

1.2 Der neutrophile Granulozyt

Neutrophile Granulozyten sind die am meisten vertretenen Leukozyten. Sie sind Teil des angeborenen Immunsystems und gehören häufig zu den ersten Schritten einer Entzündungsreaktion an einer Gewebläsion. Physiologisch sind Neutrophile hier essenziell für die frühe Bekämpfung von Pathogenen und somit Verhinderung von Infekten [68]. Darüber hinaus zeigen neuere Studien immer mehr, welche modulierenden Effekte Neutrophile auf andere Immunzellen, wie Lymphozyten und dendritische Zellen, haben und so die bisher angenommene Komplexität dieser Zellen übersteigen [69-71]. So scheinen neutrophile Granulozyten auch eine besondere Rolle zu spielen, wenn es um die Entstehung von Immunpathologien geht [72-74]. Ein Mangel an Neutrophilen kann zu starker Immunsuppression und fataler Empfänglichkeit für bakterielle Infektionen führen [75].

1.2.1 Funktionen der neutrophilen Granulozyten

Neutrophile wandern chemotaktisch mithilfe von Antigenen pathogener Mikroben, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen aus der Blutbahn in einen Entzündungsherd im Gewebe ein [76, 77]. Nach der chemotaktischen Annäherung ist der neutrophile Granulozyt einer der ersten Immunzellen bei einer beginnenden Entzündung und dient zunächst der unspezifischen Erregerabwehr, um eine ausbreitende Infektion zu verhindern und die Heilung zu ermöglichen [69, 78]. Seine antipathogenen Werkzeuge sind die Phagozytose, die Exozytose antimikrobieller Substanzen, sowie die Bildung von NETs (= neutrophile extracellular traps), die im Anschluss näher behandelt werden [79, 80].

Die Phagozytose arbeitet über die Endozytose von Mikroben und deren Verdauung mit bakteriziden Stoffen wie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS,

Einleitung

respiratory burst) produziert von der NADPH (Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat) Oxidase [81] sowie antimikrobiellen granulären Proteinen [82]. Jene primären und sekundären Granula mit Enzymen, wie Myeloperoxidase (MPO), Neutrophile Elastase (NE), Defensine und weitere Proteasen, können auch mit Zytokinen und Chemokinen in die Umgebung sezerniert werden und auf diese Weise ein antimikrobielles Milieu schaffen [83, 84].

Neben solchen direkten antipathogenen Funktionen interagieren neutrophile Granulozyten auch mit verschiedenen anderen Zellen des erworbenen Immunsystems. So können sie über z.B. Antigenpräsentation [85] und Sekretion von Zytokinen [86] mit dem adaptierten Immunsystem kommunizieren und modulierend auf die Plasma-/ Gedächtniszellbildung wirken für eine spezifischere und langanhaltendere Immunantwort (Crosstalks mit anderen Immunzellen) [87].

Abb. 4 fasst die Grundzüge der antipathogenen Funktionen der Neutrophilen zusammen.

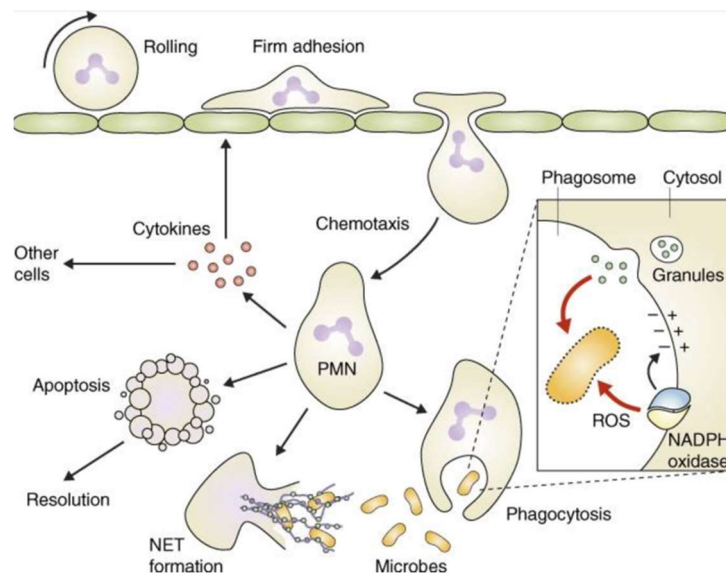


Abbildung 4: Übersicht über die Funktionen der neutrophilen Granulozyten aus Mocsai 2013 [69] mit Erlaubnis zur Nutzung. ROS = Reactive oxygen species.

Auch in Hinblick auf die Gewebsreparatur sind Neutrophile unabdingbar für die Defektheilung [88]. Sie phagozytieren nekrotische Zellüberreste aus dem Defekt [89], sezernieren diverse Wachstums- und Angiogenesefaktoren [90] und unterstützen die Auflösung der Inflammation durch Apoptose und Freisetzung von antiinflammatorischem und wachstumsförderndem Tissue Growth Factor- β (TGF- β) und Interleukin-10 (IL-10) [91]. Abb. 6 fasst den Beitrag der Neutrophilen zur Gewebsheilung zusammen.

Einleitung

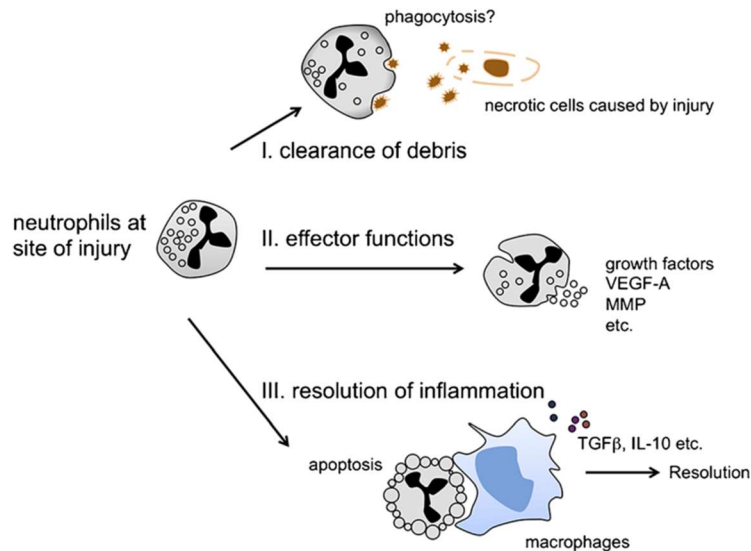


Abbildung 5: Übersicht über die gewebereparierenden Funktionen der Neutrophilen aus Wang 2018 [55] mit Erlaubnis zur Nutzung. VEGF = Vascular epithelial growth factor. MMP = Matrix-Metalloprotease.

1.2.2 Pathologien

Dysregulationen in Neutrophilen können zu diversen Immunpathologien, wie z.B. gestörter Wundheilung (lokal) oder Autoimmunerkrankungen (systemisch), führen [72-74]. Der Beitrag der Neutrophilen zu systemischen Inflammationspathologien reicht von Autoimmunpathogenesen [92] über dysregulierte Immunantworten bei bakterieller Sepsis [93] bis hin zur Bildung von Thrombosen, Atherosklerose, Anaphylaxien, metabolischen Erkrankungen und vielen weiteren entzündlichen Erkrankungen [69, 94, 95]. Die Rolle der NETose hierbei wird seit einigen Jahren zunehmend aufgedeckt [96]. Da solche systemischen Pathologien in ihrer Gesamtheit natürlich komplexe, zu weit reichende Mechanismen beinhalten, wird sich im Anschluss zunächst auf die pathologische Rolle der Neutrophilen und der NETose bei defekter Wundheilung konzentriert.

Wie zuvor bereits erklärt, sollen Neutrophile die Bekämpfung von Pathogenen im Wundbett initiieren und die Gewebereparatur unterstützen. Dysregulationen in Neutrophilen können allerdings den Heilungsprozess an verschiedenen Stellen behindern [97].

Einerseits können durch Überaktivierung der Neutrophilen vermehrt freigesetzte granuläre Proteasen das körpereigene Gewebe schädigen [98-100]. Das so geschädigte Gewebe kann dann wiederum über danger-/pathogen-associated molecular patterns (= DAMPs/PAMPs) neue Neutrophile rekrutieren [101]. Andererseits kann durch verminderte Aktivierung der Neutrophilen eine

Einleitung

insuffiziente Immunaktivierung bis zur Sepsis drohen [102-104]. Allerdings zeigten Dovi *et al.* 2003 auch, dass ein Mangel an Neutrophilen die Reepithelialisierung beschleunigen kann [105]. Wovon die erfolgreiche Wundheilung bei neutropenen Mäusen hier abhing, konnte 2003 nicht geklärt werden. Hingegen wurde vielfach gezeigt, dass fehlende Migration von Neutrophilen ins Wundgewebe ebenfalls die Heilung verzögert [106, 107].

Nach Erfüllung ihrer primären Aufgaben, gehen Neutrophile oft in die Apoptose über, wobei sich auch alternative Schicksale zeigen. Bei der sogenannten reversen transendothelialen Migration wandern aktivierte Neutrophile vom Entzündungsort wieder in die Blutbahn, wobei systemische Pathogene eliminiert werden, aber auch generalisierter Schaden resultieren kann [108-111]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine verlängerte neutrophile Reaktion ohne Resolution am Gewebsdefekt eine verbreitete Ursache chronischer Wunden darstellt [4, 77, 99].

In den letzten Jahren rückte besonders die Rolle der NETs in der Entwicklung chronischer Wunden in den Fokus der Forschung. Hierbei postulierten Wong *et al.* 2015 in Mäusen und Fadini *et al.* 2016 auch in Menschen den kausalen Zusammenhang von NETose und Bildung von Wundheilungsdefekten bei Diabetikern aufgrund der Überexpression von PAD4 als Schlüsselenzym der NETose. Des Weiteren fanden sie heraus, dass die Hemmung der NETose mit einer physiologischen Wundheilung in den Mäusen einherging [3, 112, 113]. Die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen sowie der Transfer auf bestimmte immundysregulierte Patientengruppen, wie in dieser Studie Raucher, könnte ein entscheidender Weg für die Frühdiagnostik und Behandlung von chronischen Wunden und anderen neutrophilen Immunpathologien von Risikogruppen darstellen.

1.2.3 Bildung von Neutrophilen Extrazellulären Fallen (NETs)

NETs sind Netzwerke aus dekondensiertem Chromatin von neutrophilen Granulozyten, die sowohl pathogene Partikel als auch zelleigene bakterizide Granula mit Proteasen „fangen“ und lokal halten [96, 114] (siehe Abb. 6). Dies verhindert die Ausbreitung von gewebsschädigenden Pathogenen und Proteasen und führt zu einer lokalen und somit höheren Wirksamkeit der Immunantwort auf Pathogene [114]. Die bakteriziden und proinflammatorischen

Einleitung

Komponenten sind dabei neben den granulären Proteinen, auch zitruillierte Histone und freie DNA sowie die freigesetzten Zytokine (Übersicht: [115]) [116].

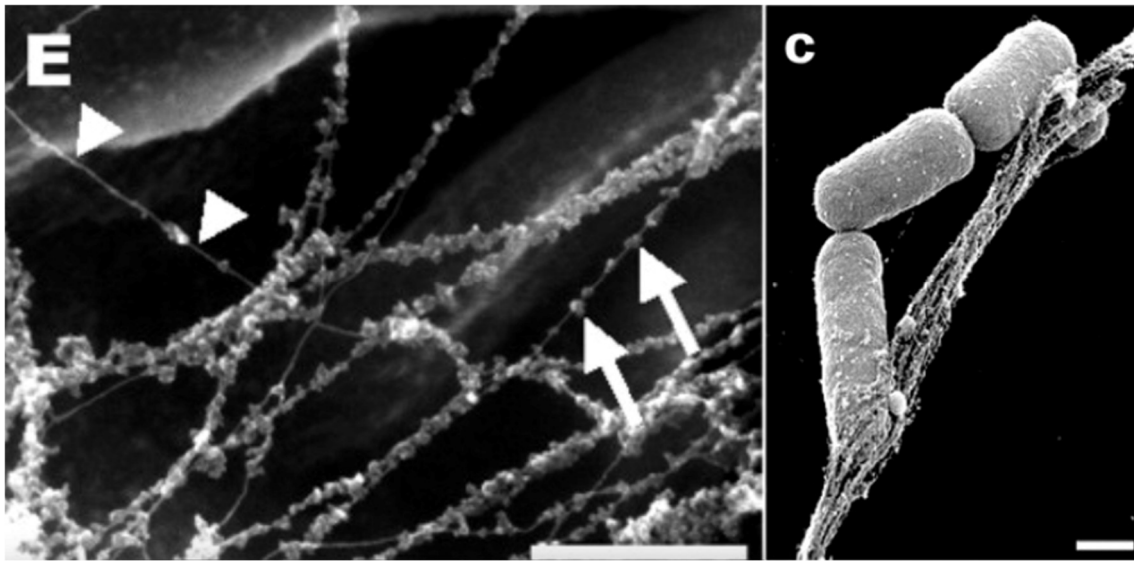


Abbildung 6: Neutrophil Extracellular Traps aus Brinkmann et al. 2004 [114] mit erteilter Nutzungserlaubnis. E: Hochauflösende Rasterelektronenmikroskopie von NETs bestehend aus glatten Fasern und globulären Domänen. Bar = 500 µm. C: Rasterelektronenmikroskopie von *Shigella flexneri* gefangen in NETs. Bar = 500 nm.

Die relevantesten pathogenen Stimuli für die Bildung von NETs stellen Bakterien und deren Lipopolysaccharide (LPS), sowie Viren- und Pilzinfektionen dar, welche durch NETs bekämpft werden sollen [117-121]. Auf humoraler Ebene finden sich Antikörper, Immunkomplexe und rekrutierende Zytokine, wie IL-8 und Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) [115, 122-124] als „intrinsische“ Auslöser. *In vitro* wird meist Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Calcium-Ionophor zur NET-Bildung genutzt [125, 126]. Hierbei geht man davon aus, dass der molekulare Mechanismus und die Proteinbesetzung der gebildeten NETs sich Stimulus-abhängig ändert [127, 128]. Außerdem sind der pH-Wert, die Sauerstoffsättigung und die Abhängigkeit zur NADPH Oxidase zu beachten, wobei genaue Signalwege noch umstritten sind [112, 129-132].

Ein vereinfachter Mechanismus der NETose kann wie folgt beschrieben werden: Im Fall der Aktivierung von Neutrophilen kommt es zum Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels aus dem endoplasmatischen Retikulum, wodurch die Protein Kinase C aktiviert wird und folglich die NADPH Oxidase in den Mitochondrien vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produzieren [115]. ROS und Calcium selbst aktivieren ihrerseits die Peptidyl-Arginin-Deiminase 4 (PAD4), welche die Seitenketten von Arginin z.B. an Histonen

Einleitung

citrullinieren [114]. Die konsekutive Strukturänderung bewirkt die Dekondensierung des Chromatins, wodurch ein lockeres DNA-Netz entsteht. Über die Aktivierung der MPO und der NE schwillt der Nucleus an und die Zellmembran lysiert, sodass das „klebrige“/„fangende“ DNA-Netzwerk aus der Zelle freigesetzt wird [115, 123, 129]. Die Freisetzung der NETs kann, abhängig vom Stimulus und Timing, in einer suizidalen oder vitalen NETose enden [133-135].

Physiologisch stellen NETs einen wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunabwehr dar, ohne deren Wirken die Bekämpfung vieler Pathogene erschwert bis insuffizient wird [112, 114]. Einige Bakterien, wie z.B. *Streptococcus pneumoniae*, sind jedoch über endogene DNasen in der Lage, sich vor NETs zu schützen [136, 137]. Trotz ihrer immunologischen Wichtigkeit bleibt eine baldige Auflösung/Resolution der NETs nach der akuten Inflammation durch DNasen und Makrophagen für die Verhinderungen von Schäden durch NETs elementar [138].

1.2.4 NETopathien

Übermäßige Bildung von NETs oder auch deren verzögerter Abbau können über Interaktionen mit dem umliegenden Gewebe und Immunsystem z.B. über Immunzellrekrutierung inflammatorisch schädigend wirken [139]. So können die antimikrobiellen Histone und Peptide in den NETs direkte zytotoxische Effekte auf verschiedene Gewebe (z.B. Endothel, Epithelien, etc.) verursachen und entsprechend auch die Wundheilung behindern [3, 113, 140]. Darüber hinaus sind diverse inflammatorische Systemerkrankungen bekannt, in denen eine fehlgesteuerte NETose pathogenetisch relevant ist. Dazu zählen diverse Autoimmunerkrankungen, atherosklerotische und thrombotische Erkrankungen, sowie Krebsentstehung- und metastasierung [141-144].

Wichtige grundlegende Mechanismen in der Autoinflammation durch NETs scheinen die Stimulierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC), sowie B- und T-Lymphozyten über die freigesetzten DNA-/Histonkomplexe und neutrophilen granulären Proteinen (z.B. Cathelicidin) zu sein. Dies resultiert in einer gesteigerten IFN-1 Produktion und Autoantikörpersynthese durch die Bildung pathologischer Lymphfollikel [141, 145-147], welche entscheidend für die Pathogenese von Autoimmun-/Inflammationserkrankungen sind [148, 149].

Einleitung

Weitere grundlegende, inflammatorisch rückkoppelnde Mechanismen stellen die Komplementaktivierung, ihre Interaktionen mit DAMPs und der Inflammassomaktivierung dar [150, 151]. NET-assoziierte Erkrankungen werden teilweise bereits als NETopathien bezeichnet und sind in Tabelle 2 aufgelistet:

Tabelle 2: Liste der relevantesten Netopathien mit pathogenetischer Beteiligung der NETs. Weitere in Tabelle 17 im Anhang.

NET-assoziierte Erkrankung	Pathogenetische Rolle der NETs	Referenz
Chronische diabetische Wunden	<ul style="list-style-type: none"> • Menge an NE und citH3 korrelieren mit Schwere der Wundheilungsstörung und der Amputationsrate • Diabetiker mit chronischen Wunden zeigen erhöhte PAD4 Expression und Aktivität, welche für schädliche NETose lokal verantwortlich ist • PAD4 Knockout und DNase-Behandlung kann im Mausmodell eine regelhafte Wundheilung bewirken • Im Menschen korrelieren zirkulierende NET-Komponenten (v.a. NE) mit Wundinfektionsneigung. • In menschlichen diabetischen Wunden waren NET-Komponenten stark erhöht 	[3, 113, 152, 153]
Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)	<ul style="list-style-type: none"> • NETose korreliert mit der Schwere der COPD und der Häufigkeit der Exazerbationen • Erhöhte PAD4 Genexpression und Proteinspiegel in COPD Lungen • NETs induzieren epithelialen/endothelialen Zelltod • Proteasen aus NETs können pulmonale Strukturproteine wie Kollagen und Elastin spalten 	[154-160]
Rheumatoide Arthritis (RA)	<ul style="list-style-type: none"> • Pathologie korreliert mit Akkumulation von DNA-MPO Komplexen und Antikörpern gegen zitrullinierte Histone (→ NET-Marker) • NETs v.a. auch in entzündeten Gelenken • PAD4 Aktivität korreliert mit NET-induzierten Autoantikörper wie anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) und mit Krankheits schwere. • Vermehrte anti-PAD4-Antikörper • Im Mausmodell für RA hat die Injektion von Chloramidin die PAD4-vermittelte Hypercitrullinierung gehemmt → Linderung der Krankheitsaktivität. 	[161-170]
Sepsis	<ul style="list-style-type: none"> • Vermehrt zirkulierende NETs sind assoziiert mit Multiorganversagen und schlechtem Outcome. • Mediatoren für Krankheits schwere durch Zellschäden und Entzündung können aus NET stammende Histone, zellfreie DNA, ROS-Produktion und inflammatorische Zytokine sein. • NETs von septischen Patienten scheinen keine antibakteriziden Funktionen zu erfüllen. • PAD4 defiziente Mäuse zeigen eine abgemilderte endotoxische Entzündungsreaktion ohne die Bakteriämie zu erhöhen. 	[171-177]
Systemischer Lupus erythematodes	<ul style="list-style-type: none"> • Bildung von NETs korreliert mit Krankheitsaktivität • SLE (Auto-)Immunkomplexe triggern über Fc-Rezeptoren NETose • Extrazelluläre neutrophile Histone, DNA und Proteine stimulieren u.a. pDC und autoreaktive B-Zellen zur Produktion von Autoantikörper und INF-1 	[178-185]

Einleitung

	<ul style="list-style-type: none"> • Verzögerung des NET-Abbaus geht mit der Schwere einer Lupus Nephritis einher • Allgemeine NET Schäden: Endothelschädigung, proinflammatorische Verstärkung v.a. durch Lupus-typische „low-density granulocytes“ • PAD4 Inhibierung zeigt eine Linderung 	
Tumorprogress und Metastasierung	<ul style="list-style-type: none"> • NETs gelten als essenziell, um ruhende Tumorzellen zu aktivieren • NETs verstärken das Wachstum von Melanomen, Magenkarzinomen, Mammakarzinomen, hepatozellulären Karzinomen, etc. • PAD4 wirkt als Co-Repressor für das Tumorsuppressorgen p53 und für p21 • Sowohl PAD4-Defizienz als auch fehlende G-CSF Freisetzung hemmen Tumorwachstum • Neutrophile granuläre Proteasen, wie NE und MMP-9, unterstützen Tumorzellen sich aus dem Zellverband zu lösen → Metastasierung 	[143, 186-197]
Venöse Thrombose/ Thromboembolie	<ul style="list-style-type: none"> • NETs binden auch Erythrozyten und Thrombozyten • Neutrophile Elastase in NETs inaktiviert den tissue factor pathway inhibitor (TFPI) • PAD4-citruillierte Histone sind elementar für die Thrombosebildung in Mäusen → prokoagulatorisch • NETs verstärken Fibrinablagerung → Thrombozytenadhäsion/-aktivierung/-aggregation • Aggregierte Thrombozyten verstärken ihrerseits wieder die NETose durch TLR4 	[198-204]

1.2.5 Rauchen und NETose

Für auffallend viele der NETopathien stellt das Rauchen einen Risikofaktor dar. Während kardiovaskuläre [205, 206], pulmonale [207, 208] und Krebserkrankungen [209-211] in Rauchern bereits lange und breit untersucht wurden, weiß man über die Immunsystemdysregulationen, wie chronische Wunden [212] und Autoimmunerkrankungen, z.B. RA [213], SLE [214] und Morbus Crohn [215] durch das Rauchen weit weniger.

Wie Rauchen die NETose dysreguliert und ob exzessive Bildung von NETs die treibende Kraft in der Ausbildung von NETopathien in Rauchern darstellt, bleibt zu klären. Nikotin stellt jedenfalls einen potenten NET Stimulus dar und Neutrophile von Rauchern weisen vermehrt spontane Bildung von NETs auf [216]. Im Mausmodell verstärkten Nikotin-induzierte NETs eine bereits bestehende Arthritis und die Behandlung mit Antagonisten am nikotinergeren Acetylcholin-Rezeptor inhibierten die NETose durch Nikotin und milderten die Erkrankung [216]. Außerdem wurde auch an menschlichen peripheren Neutrophilen gezeigt, dass Nikotin dosis-korrelierend ROS-unabhängig, dafür

Einleitung

aber Protein Kinase B und PAD4 abhängig, NETs mit hypercitruinierten Histonen bildeten [217].

Nikotin ist nicht mit Zigarettenrauch gleichzusetzen, aber auch für Zigarettenrauchextrakt (CSE) konnte im Mausmodell und *in vitro* gezeigt werden, dass NETose schneller induziert und gebildete NETs nur ineffektiv abgebaut werden können. Hierbei konnte außerdem die Stimulierung von pDC und T-Zellen durch CSE-induzierte NETs gezeigt werden. Dies lässt NETs abermals als pathogenetische Schlüsselkomponente von immunologischen Erkrankungen bei Rauchern erscheinen [20, 218]. In White *et al.* 2018 war die stimulierte NETose nach Vorbehandlung mit CSE und anderen Zigarettenrauchkomponenten inhibiert, während eine vermehrte spontane NETose beobachtet werden konnte [219]. Eine Dysregulation auf diese Weise ist sowohl mit einer Immunsuppression bei Erregerkontakt als auch mit einer Überregulation an falscher Stelle vereinbar. Speziell bei der COPD, die hauptsächlich durchs Rauchen verursacht ist, besitzt die NETose eindeutige pathogenetische Beteiligung [154, 207], vermutlich auch weil die Schäden des Rauchens in der Lunge am besten untersucht sind. In anderen Geweben und deren Erkrankungen ist die pathogenetische Rolle der NETs beim Rauchen nicht so einfach zu klären, jedoch nicht weniger wichtig. Sinnvoll bleibt es nicht nur in die einzelnen Krankheitsbilder zu schauen, sondern auch auf grundlegender Ebene zu untersuchen, ob wichtige Regulatoren der Nikotin-/CSE-induzierten NETose, wie das viel untersuchte PAD4 [217, 220], durch das Rauchen systemisch verändert werden.

1.3 PAD4

Das Enzym Peptidyl-Arginin-Deiminase Typ 4 wird hauptsächlich in CD34+ Zellen des Knochenmarks, wie Neutrophilen, aber auch anderen Immunzellen, sowie Krebszelllinien gebildet [197]. Wie der Name bereits vermittelt, katalysiert PAD4 die Deiminierung von Argininresten zu Zitrullin an Substraten, wie den Histonen 2, 3 und 4, sowie Vimentin und p300 [220-222]. Damit nimmt es Einfluss auf die Transkription von Genen [221, 222], die Apoptose [196, 223] und, am prominentesten, die angeborene Immunität v.a. über die NETose [3, 112, 217, 224].

Einleitung

Mehrere Studien zeigten, dass die Aktivität von PAD4 über Histoncitrullinierung und folgender Chromatindekondensierung direkt mit dem Auftreten von NETs kausal im Zusammenhang steht und in diesen Experimenten sogar als Schlüsselenzym fungiert [225-228]. Eine PAD4 Inhibition konnte die NETose durch verschiedenste getestete Stimuli verhindern, was die Wichtigkeit dieses Enzyms für die NETose unterstreicht [112, 123].

Darüber hinaus ist eine pathophysiologische Rolle der dysregulierten PAD4 Expression außerhalb der NETose durchaus denkbar: Zahlreiche Studien zu PAD4 Inhibitionen zeigten konsekutive Besserungen von entzündlichen Erkrankungen in Mäusen, wie diabetischer Wundheilungsstörung, RA, MS, Lupus-Schäden der Haut, Nieren und Gefäße sowie Kolitis und assoziiertem Kolonkarzinom [113, 170, 204, 229-231]. Zudem konnte gezeigt werden, dass PAD4 in den Sera von Tumorpatienten oft erhöht nachweisbar ist und in zahlreichen v.a. malignen Tumoren an Wachstum und Metastasierung [175, 232, 233] beteiligt sein kann. Andere PAD4 assoziierte Pathologien sind Atherosklerose und Herzinfarkt [234, 235], die Alzheimer Demenz [236], das Multiple Myelom [237], die tiefe Beinvenenthrombose [204] und die zystische Fibrose [238]. Dies verdeutlicht die weitreichende Beteiligung des hier untersuchten Enzyms.

Bisher bekannte Einflussfaktoren auf die PAD4 Aktivität bzw. Expression sind folgende: Stimuli für PAD4 sind diverse bakterielle Kontakte [114, 123, 226], sowie Zytokine (GM-CSF, IL-8, TNF- α , f-MLP) [123, 239, 240] und sonstige chemische Moleküle, wie Calciumionen, H₂O₂, Ionomycin, und PMA [114, 227, 239]. Östrogen erhöhte *in vitro* die PAD4 Expression [241], weshalb Experimente bezüglich der PAD4 Expression Einflussfaktoren wie das Geschlecht und das Alter beachten sollten. Über andere *in vitro* Einflüsse ist wenig bekannt.

PAD4-Inhibitoren zielen zumeist auf das intrazelluläre Calcium ab, da dieses als notwendiges Coenzym die Enzymaktivität ermöglicht und steigert [242]. GSK199 und GSK484 sind hierbei reversible und Chlor- und Flouramidin irreversible Inhibitoren über Calciumionenentzug [224]. Auch bereits eingesetzte Medikamente, wie das Zytostatikum Paclitaxel [243] und die Antibiotika Streptomycin und Chlorotetracyclin [244], gelten als potente PAD4 Inhibitoren. Relevanter im Vorfeld bleibt jedoch, dass sich eine erhöhte lokale und teilweise

Einleitung

auch systemische (zirkulierende Neutrophile) Expression von PAD4 bei diversen inflammatorischen Erkrankungen findet.

Tabelle 3: Erkrankungen mit erhöhter PAD4 Expression.

Erkrankung	PAD4 Expression lokal erhöht	PAD4 Expression systemisch erhöht	Quelle
Alzheimer Demenz	Ja	?	[236]
Chronische diabetische Wunden	Ja	Ja	[3, 113]
Maligne Tumorerkrankungen	Ja	Ja	[197]
Multiple Sklerose	Ja	Ja	[240, 245]
Rheumatoide Arthritis	Ja	Ja	[246]
RA-assoziierte Lungenerkrankungen bei Rauchern	Ja	?	[247, 248]
Rauchen	Ja (Lunge)	?	[249, 250]
Sepsis		Ja	[251]
SLE/Lupus-Nephritis	Ja	Ja	[252, 253]
Tiefe Venenthrombose	Ja	Ja	[254]
Zystische Fibrose	Ja	Ja	[238, 255]

Eine Verbindung zwischen Zigarettenrauchen und PAD4 wurde bisher nur vereinzelt und der Einfluss des Rauchens auf die PAD4 Expression in Neutrophilen zum jetzigen Kenntnisstand noch gar nicht untersucht. Die wenigen zu findenden Quellen werden in der Diskussion ab Kapitel 5.3.1 im Zusammenhang mit den hiesigen Ergebnissen diskutiert. Aufgrund der kürzlich entdeckten Relevanz von PAD4 bei verzögerter Wundheilung, wurde beim Studienkollektiv ebenfalls auf die Entwicklung ähnlicher postoperativer Komplikationen geachtet [3].

1.4 Postoperative Komplikationen an der BGU Tübingen

1.4.1 Prävalenzen und Risikogruppen

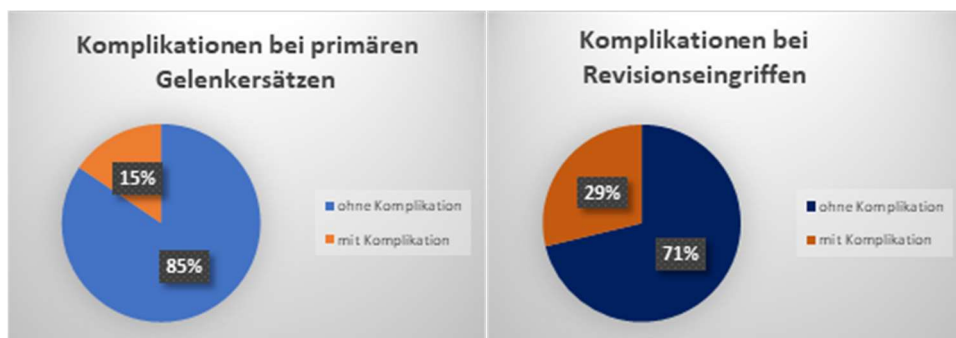


Abbildung 7: Prävalenz der Komplikationen bei primären und Revisionsgelenkersatzoperationen an der BG Unfallklinik Tübingen nach Ehnert et al. 2019 [17]. Orange = mit Komplikation; Blau = ohne Komplikation.

Einleitung

Allgemein gültige Zahlen für die Entwicklung postoperativer Komplikationen gibt es, aus oben genannten Gründen der Vielfalt von Einflussfaktoren, nicht. Prävalenzen lassen sich v.a. auf bestimmte Patientengruppen und bestimmte Eingriffe formulieren. Die Prävalenz der postoperativen Komplikationen an der BG Unfallklinik Tübingen lag in der repräsentativen Studie von Ehnert *et al.* 2019 bei primären Gelenkersatzeingriffen bei ca. 15 %, während sich Revisionseingriffe mit knapp 28 % deutlich komplikationsreicher zeigen. Bei Primäreingriffen waren die Hauptkomplikationen verzögerte Wundheilung (5,4 %), Infektionen (2,8 %) und notwendige Revisionseingriffe (1,2 %). Bei Revisionseingriffen waren die Hauptkomplikationen verzögerte Wundheilung (5,4 %), Infektionen (2,8 %) und notwendige Revisionseingriffe (1,2 %). Bei Revisionseingriffen, also einer operativen Sanierung einer vorbestehenden Komplikation, hingegen waren vor allem die Rate an Infektionen (6,5 %) und notwendigen Revisionseingriffen (8,3 %) deutlich höher. Als zusätzliche Risikofaktoren für eine Komplikationsentwicklung zeigten sich neben Mangelernährung und regelmäßigem Alkoholkonsum, vor allem auch der Zigarettenkonsum (Abb. 8).

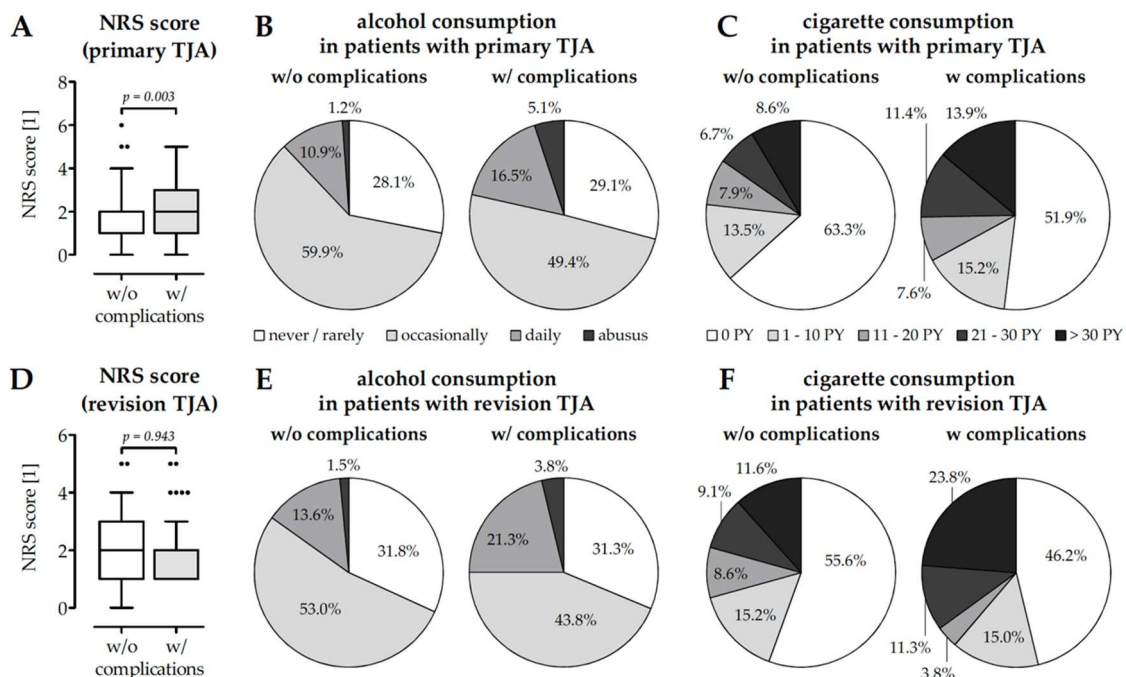


Abbildung 8: Ergebnisse zu Risikofaktoren für postoperative Komplikationen (w/ = mit Komplikationen; w/o = ohne Komplikationen) aus Ehnert *et al.* 2019 [17]. A) & D): Boxplots mit Nutritional Risk Screening (NRS) bei primärer (links) und Revisionsoperation (rechts) nach Gelenkersatz (TJA). B) & E) = Kuchendiagramm mit Alkoholkonsum bei primärer (links) und Revisionsoperation (rechts) nach TJA. C) & F) = Kuchendiagramm mit Zigarettenkonsum bei primärer (links) und Revisionsoperation (rechts) nach TJA.

Das Risiko der Entwicklung einer Komplikation war nach Ehnert *et al.* bei Revisionseingriffen deutlich erhöht. Mögliche Gründe wären z.B. die erhöhte Infektionsrate in diesen Wunden, die in mehr als doppelt so hoch war verglichen

Einleitung

mit Primäreingriffen [17, 256]. Zudem betrifft eine Komplikation häufiger durch Risikofaktoren chronisch vorbelastete Patienten. Diese Krankheitsfaktoren wirken logischerweise auch bei den späteren Revisionseingriffen. In der Revisionsgruppe und der Primärgruppe mit Komplikation war der Männeranteil jeweils 2/3, während in den komplikationslosen Eingriffen die Geschlechter ausgeglichen waren [17, 257]. Hier scheinen Östrogene eher förderlich und Testosteron-Derivate eher schädlich auf die Wundheilung zu wirken [258, 259]. Des Weiteren korrelierte ein Risiko für eine Mangelernährung, welche über den Nutritional Risk Score ermittelt wurde, positiv mit einer Komplikationsentwicklung. Bei Mangelzuständen des Ernährungsstatus kann die Heilung und Immunabwehr nur unzureichend stattfinden [260-262].

Täglicher Alkoholkonsum stellt einen entscheidenden Risikofaktor für die Entwicklung postoperativer Komplikationen dar. Der gewohnte Alkoholkonsum war bei Patienten mit Revisionseingriffen allgemein erhöht. Mit steigendem Alkoholkonsum korreliert auch ein schlechterer Allgemeinzustand, Mangelernährung und Krankheitsneigung [263, 264]. Biochemisch werden neben der Kollagensynthese und Reepithelialisierung vor allem die Angiogenese gestört [265-267].

Der von Ehnert *et al.* als am gravierendsten ermittelte Risikofaktor für Komplikationen war das starke Rauchen ab 20 PY. Die immunologischen, vaskulären, hypoxischen sowie toxischen Probleme des Rauchers schränken die Wundheilung sicherlich auf vielen Ebenen ein [17, 18, 268-270]. Interessanterweise war in keiner der Studiengruppen der Exraucher-Anteil signifikant unterschiedlich, was suggeriert, dass ein Rauchstopp das Komplikationsrisiko normalisieren könnte [17, 271].

Außerhalb der Studie von Ehnert *et al.* lassen sich noch einige weitere relevante Risikofaktoren nennen und erklären: So wurde vielfach bei Diabetikern eine erhöhte Komplikationsneigung postoperativ und eine verzögerte Wundheilung insbesondere beim diabetischen Fußsyndrom festgestellt [272-276].

Darüber hinaus wurden in dieser Studie aus allen Fachrichtungen der BGU Tübingen verschiedene Patienten mit verschiedenen Beschwerden aufgenommen und kategorisiert. Zwischen diesen Richtungen und OPs herrschen unterschiedliche Komplikationsraten, wobei die meisten sicherlich in

Einleitung

der Unfallchirurgie sowie der septischen Chirurgie zu sehen sind [277, 278], wohingegen z.B. Arthroskopien als komplikationsarm gelten [279].

Eine starke Korrelation der Komplikationen nach einer Operation findet sich mit dem Alter des Patienten, wobei mit steigendem Alter die Anzahl der relevanten Erkrankungen, die Malnutrition und die Gebrechlichkeit zunehmen. Die Regenerationsgeschwindigkeit nimmt analog zum Stoffwechsel mit dem Alter ab [280].

Viele weitere Faktoren, die kaum alle auszugleichen sind in einer Fall-Kontroll-Studie, spielen darüber hinaus eine Rolle bei verzögerter Wundheilung, Infektion und weiteren Komplikationen. Der Übersichtlichkeit halber und weil diese ohnehin in dieser Studie nicht beachtet werden konnten, werden sie nicht alle ausführlich aufgezählt (Übersicht siehe Tabelle 4). Eine gute Zusammenfassung über zelluläre Grundlagen bietet Makrantonaki *et al.* 2017 [280] und über detailliertere Ursachen einer verzögerten Heilung unter anderem Beyene *et al.* 2020 und Guo *et al.* 2010 [281-283].

Tabelle 4: Systemische Risikofaktoren für postoperative Komplikationen.

Risikofaktoren aus Ehnert <i>et al.</i> 2019	Stärke des Risikos nach Ehnert <i>et al.</i> 2019 (+ = niedriges; ++ = mäßiges; +++ = hohes Risiko)	Quelle
Revisionseingriffe	+++	[17]
Männliches Geschlecht	+	[17]
Malnutrition	++	[17]
Alkoholkonsum	++	[17, 265]
Präoperative Übelkeit/Erbrechen	+	[17]
Rauchen	++	[17]
Weitere Risikofaktoren:		
Stress		[284]
Diabetes Mellitus		[272, 285]
Septische Patienten & Unfallpatienten		[277, 278]
Hohes Alter		[286]
Fettleibigkeit		[287, 288]
Bewegungsmangel		[289, 290]
Späte postoperative Mobilisation		[291]
Multimorbidität		[286]
Immunsuppression		[292-294]
Medikamente (Glucocorticoide, Nicht-steroidale Antirheumatika (= NSAR), Chemotherapie)		[293-296]

Ziele der Studie

2. Ziele der Studie

Neutrophile gehören zu den ersten Immunzellen in der Entzündungsreaktion einer Wunde [128]. Diverse Stimuli sorgen für die Aktivierung von PAD4 und der NETose [123]. Die Idee dieser Studie beruht auf den Ergebnissen von Wong *et al.* 2015, die im Mausmodell übermäßig viele NETs und PAD4 in chronischen Wunden bei diabetischen Mäusen fanden. Bei Knockout oder anderer Inhibierung [297] des Enzyms PAD4 blieben diese chronischen Wunden genau wie die NETose sowohl bei diabetischen als auch Kontrollmäusen aus [3]. Daraus schloss man, dass Diabetes durch erhöhte PAD4 Expression und übermäßige NETose zur Bildung chronischer Wunden beiträgt. Von Fadini *et al.* 2016 wurden ähnliche Ergebnisse teilweise auf den Menschen übertragen. Die spontane NETose war bei diabetischen Neutrophilen erhöht allerdings schlechter auslösbar durch natürliche Stimuli [113]. Dies erklärt die diabetische Immunsuppression bei gleichzeitig verstärkter NETose.

Da auch Raucher ein stark dysreguliertes Immunsystem aufweisen, die Prävalenz von einigen „NETopathien“ bei ihnen erhöht ist und sie außerdem zu verzögerter Wundheilung und postoperativen Komplikationen neigen, ist es naheliegend die Rolle von PAD4 in dieser Pathogenese klinisch zu untersuchen [17]. Aus diesen Zusammenhängen ergeben sich die Ziele der hier durchgeführten Studie:

Primär sollte herausgefunden werden, ob Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern PAD4 in Neutrophilen quantitativ unterschiedlich exprimieren. Sekundär sollte herausgefunden werden, ob bei Rauchern ein Zusammenhang der PAD4 Expression zu einer erhöhten Komplikationsrate, analog zu Wong *et al.* 2015 und Fadini *et al.* 2016 nach (elektiver) Operation in der BG Unfallklinik Tübingen besteht.

3. Methoden

3.1 Studiendesign und Ablauf

Die vorliegende Studie wurde als eine prospektive klinisch-experimentelle Beobachtungsstudie designet. Nach der Aufklärung zur Studienteilnahme wurden folglich eingeschlossene Patienten bezüglich ihres Rauchstatus prinzipiell in Nichtraucher und Raucher eingeteilt und zur Minimierung von Einflussfaktoren gematcht (siehe Kapitel 3.3.3). Die Sammlung des 15 ml Vollblutes in EDTA-Röhrchen erfolgte präoperativ peripher venös im Rahmen einer standardmäßigen (studienunabhängigen) Venenpunktion (Ethikkommission: 666/2018BO2).

Hieraus wurden die Neutrophilen, die peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) und das Plasma isoliert. Für diese Studie waren nur die Neutrophilen relevant, die innerhalb von maximal 3 h nach Abnahme lysiert wurden. Die Proteine wurden sofort extrahiert und zusammen mit den restlichen Lysaten auf -80 °C konserviert. Mittels Dot Blot wurden die Proteine aufgetragen und der PAD4 Gehalt jeder Probe relativ zu den anderen Proben ermittelt. Hierbei wurde auf β -Actin normalisiert. Die RNA wurde aus den aufgetauten Lysaten isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde über eine konventionelle PCR einmal kontrolliert. Daraufhin wurde über eine qPCR die relative *PADI4* Expression, normalisiert auf *ribosomal protein L13 (RPL13a)* und *elongation factor 1 α (EF1 α)*, ermittelt. Diese Housekeeping Gene (HKGs) wurden vor Beginn der Probensammlung an gesunden Freiwilligen als am interindividuell stabilsten für Neutrophile geprüft. Während des stationären Aufenthaltes wurde so bald wie möglich nach der Blutentnahme mithilfe der Fragebögen eine ausführliche Patientenanamnese durchgeführt, um die Laborergebnisse einordnen zu können.

Die Datenerhebung des Fragebogens lief zumeist im stationären Verlauf ab, während der Follow-Up-Fragebogen telefonisch ungefähr 6 Monaten nach der OP und über das Kliniksystem Medico erfolgte.

Methoden

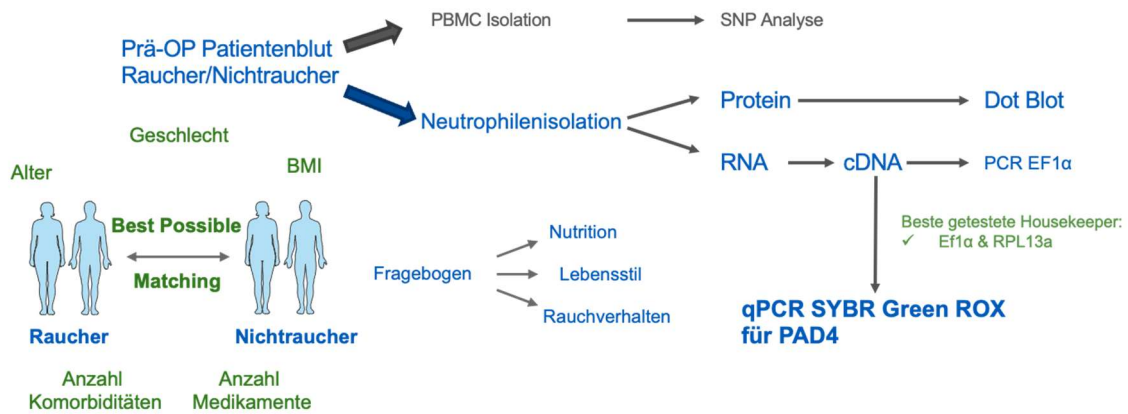


Abbildung 9: Übersicht über die Arbeitsschritte.

3.2 Begutachtung durch die Ethikkommission

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen prüfte die Studie am 20.09.2018 unter der Projekt-Nummer 666/2018BO2 und genehmigte ihre Durchführung.

Die Probengewinnung erfolgte auf Station mit Blutabnahme am OP-Morgen beim i.v. Zugang legen oder in der Prämedikationsambulanz der Anästhesisten bei der routinemäßigen präoperativen Blutentnahme. Da die Blutentnahme im Rahmen einer anästhesiologisch notwendigen Venenpunktion durchgeführt wurde, gab es keinen relevanten zusätzlichen Schaden durch die Studienteilnahme. Nach einigen Screeningfragen zur Studienkompatibilität, war die Grundvoraussetzung für die Teilnahme die freiwillige Einwilligung sowie die unterschriebene Einverständniserklärung. Im Vorhinein wurden die Studienteilnehmer ausführlich über die Ziele, den Ablauf, die Dauer, den wissenschaftlichen Nutzen sowie den Datenschutz informiert, bevor die Einverständniserklärung unterzeichnet wurde und in Kopie mit Kontaktadresse mitgegeben wurde. Darüber hinaus wurde die Möglichkeit eines flexiblen Studienausstiegs ohne Folgen betont. Die Probanden wurden nach Einwilligung zur Teilnahme über eine individuelle Identifikationsnummer (ID) verschlüsselt und so für Dritte unkenntlich gemacht. Zugang zu unverschlüsselten Patientendaten haben nur die Doktormutter, die Betreuerin und der Doktorand. Sämtliche Studienteilnehmer wurden über die Datenschutzbestimmungen aufgeklärt.

Methoden

3.3 Studienpopulation

Die Patientenakquirierung lief vom 02.09.2019 bis zum 17.09.2020, wobei die letzten telefonischen Follow-Up-Gespräche im Dezember 2020 geführt wurden. Eine nötige Populationsgröße von je mindestens 36 Probanden bei Nichtrauchern und Rauchern wurde vorher statistisch ermittelt. Eine statistische Beratung durch Herrn Dr. Blumenstock (Stellvertretender Leiter des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie Tübingen) ist erfolgt. Alle Probanden wurden an der BGU Tübingen rekrutiert.

3.3.1 Studiengruppen

Grundsätzlich wurden für die primäre Hypothese der Studie (der Einfluss des Rauchens auf die PAD4 Expression in Neutrophilen) Raucher und möglichst ähnliche Nichtraucher jeglicher Abteilung (präoperativ) gesucht. Raucher und Nichtraucher stellten die Hauptstudiengruppen dar, sodass hierfür die vorher ermittelte Mindestgruppengröße von 36 erreicht und übertroffen wurde. Zur näheren Differenzierung unterschied man bei den Rauchern bei tiefergehenden Analysen weiter zwischen moderaten und starken Rauchern, wobei die typische Einheit der Packungsjahre, oder auch Pack Years (PY) als Parameter der Rauchbelastung verwendet wurde [298]. PY berechnen sich folgendermaßen:

$$PY = \frac{\text{Anzahl gerauchter Zigaretten pro Tag}}{20} \times \text{Konsumjahre [299].}$$

Zu den Nichtrauchern zählten alle mit 0 PY und solche, die maximal 3 PY jemals geraucht haben und dabei seit mindestens 10 Jahren gar nicht mehr rauchten. Diese stellten die Kontrollgruppe dar. Alle anderen wurden bis zu einer Rauchbelastung von 20 PY den moderaten Rauchern und alle über 20 PY den starken Rauchern zugeordnet.

3.3.2 Subgruppen

Auch wenn für gewisse Subgruppenanalysen die Probandenanzahl zu niedrig ist, gibt es dennoch relevante Faktoren, bei denen ein Einfluss auf die PAD4 Expression wahrscheinlich ist. Hier wäre z.B. der Einfluss eines Rauchstopps vor relevant langer Zeit zu nennen, weshalb bei den Kontrollen auch eine kleine Rauchbelastung vor langer Zeit toleriert wurde. Hingegen sind in den Rauchergruppen ohne weitere Unterscheidung ehemalige Raucher genauso wie aktuelle Raucher betrachtet, da es einige Hinweise gibt, dass diese ähnliche

Methoden

Beeinträchtigungen bei postoperativen Komplikationen erleiden wie aktuelle Raucher [17]. Für eine weitere Subgruppenanalyse, bei der aktuelle und ehemalige Raucher differenziert betrachtet wurden (Kapitel 5.2.5), ist hier also auch die Einheit der Jahre seit Rauchstopp („Years since quitting“ = YSQ) relevant.

Außerdem erscheint der Vergleich der Geschlechter hinsichtlich der PAD4 Expression sinnvoll, da Männer auffällig höhere Komplikationsraten postoperativ aufweisen als Frauen und allgemein Unterschiede in der Immunantwort anzunehmen sind [17].

Darüber hinaus dürfte der Vergleich von jüngeren zu älteren sowie gesünderen zu kränkeren Patienten interessant werden, da in dieser Hinsicht ebenfalls Komplikationsraten und Immunsystem deutlich verschieden sind und beide Charakteristika im Matching berücksichtigt wurden.

BMI und Ernährungszustand sind ebenfalls starke Einflussfaktoren auf die Wundheilung bzw. Komplikationsneigung und wurden deshalb ebenfalls probatorisch hinsichtlich der *PADI4* Expression analysiert [17].

Da konkrete Einflussfaktoren in diesem Setting noch nicht untersucht sind, bleibt es sinnvoll diese heterogene Patientengruppen in den Übergruppen Raucher und Nichtraucher zu unterteilen und hinsichtlich möglichst vieler Faktoren ähnlich zu halten.

3.3.3 Best Possible Matching

In dieser Studie wurden keine gesunden Freiwilligen, sondern Patienten untersucht. Auch wenn durch die strikten Ausschlusskriterien versucht wurde, immundysregulierte Patienten weitgehend auszuschließen, so ist doch wenig über die Variablen der Expression des Enzyms PAD4 bekannt, sodass Einflussfaktoren wahrscheinlich bleiben. Zur bestmöglichen Isolierung des Faktors Rauchen wurde also versucht, die Kontrollen möglichst passend hinsichtlich bestimmter Charakteristika zu den untersuchten Rauchern zu wählen. Die Kategorien nach denen dieses bestmögliche Matching entschieden wurde, waren das Alter, das Geschlecht, der BMI und die Anzahl der systemischen Erkrankungen. Mit jedem weiterem Kriterium des Matchings wird die Auswahl passender Kontrollen weiter eingeschränkt. Daher hat man weitere mögliche Einflussfaktoren, wie dem Vorhandensein wahrscheinlich

Methoden

beeinflussender Erkrankungen (z.B. Diabetes Mellitus [3]) versucht, zwischen den Gruppen in der Summe ähnlich zu halten. In das individuelle Matching konnten diese Faktoren, aus oben genannten Gründen, jedoch nicht mit einfließen.

3.3.4 Ausschlusskriterien

Da die untersuchte Studienpopulation möglichst repräsentativ sein sollte, wurden gewisse Ausschlusskriterien für Patienten formuliert. Hier flossen die folgenden Charakteristika mit ein:

- Verweigerung der Studienteilnahme
- Ein Alter unter 30 oder über 75 Jahren
- Vorhanden sein von PAD4 beeinflussten Erkrankungen nach Tabelle 3: Erkrankungen mit erhöhter systemischer PAD4 Expression
- Einnahme von Chemotherapeutika oder Immunsuppressiva
- Vorhandensein chronischer Infektionserkrankungen: HIV, chronische Hepatitis B/C, etc.
- Akute Infektion mit eindeutig erhöhten Entzündungsparametern im Labor (kombinierte Erhöhung von CRP (>5 mg/l) und Leukozyten (>10.000/µl))
- Grobe Verschiebungen der Laborparameter (erhebliche Abweichung von mehr als 4 Laborparametern, z.B. bei Panzytopenie)
- Unfähigkeit der logischen verbalen Kommunikation

3.3.5 Definition der postoperativen Komplikation

Postoperative Komplikationen werden in dieser Studie als allgemein unerwünschte postoperative Ereignisse verstanden, die direkt auf die OP zurück zu führen sind und die Heilung so beeinträchtigen, dass eine medizinische Handlungskonsequenz entsteht. Hierzu zählen zur Haupteinteilung Kategorien, die unter Ehnert *et al.* 2019 bereits Anwendung fanden [17]: Tod, Infektion und Wundheilungsstörung der OP Wunde, sowie eine nicht geplante Folgeoperation aufgrund derselben Ursache/Misserfolg der ersten OP, eine Thrombose und sonstige Komplikationen, die anders nicht erfasst wurden. Die Komplikationsentwicklung hängt stark von vielen externen und internen Faktoren, wie z.B. die Ursache und Art der OP, akut gegen elektiv, Primär- gegen Revisionseingriff oder auch die körperlichen Konstitutionen der Patienten ab [17,

Methoden

283, 300, 301]. In dieser Studie stellte die klinische Korrelation der ermittelten PAD4 Expressionen zur Komplikationsentwicklung lediglich das sekundäre Ziel dar. Deshalb wurde nicht nur eine OP-Art, sondern viele verschiedene OPs gemischt kategorisiert, zwischen den Gruppen möglichst ausgeglichen und miteinander verglichen. Dies sollte bei der Ergebnisbewertung beachtet werden.

3.4 Fragebögen zur Datenerhebung

Bei der Befragung wurden vorgefertigte und standardisierte Fragebögen verwendet. Diese bestehen aus 9 Seiten und enthalten 7 Teile, die unten weiter erläutert werden. Jeder Abschnitt beleuchtet ein anderes Gebiet der Patientenanamnese, wodurch ein umfassendes Bild der allgemeinen Gesundheit/Erkrankungen, der Genussmittelkonsum, wie z.B. das Rauchverhalten, die physischen und psychischen Möglichkeiten und Gewohnheiten sowie die Ernährung und die Entwicklung nach der OP erfasst. Fehlende Informationen zu Vorerkrankungen oder Medikation sowie Laborwerte wurden aus dem Klinikinformationssystem der BGU Tübingen ergänzt.

3.4.1 Allgemeiner Teil

Zunächst erhielt jeder Patient eine persönliche ID zur Anonymisierung. Begonnen wurde mit der Nummer 0001 und dann fortlaufend aufsteigend den Teilnehmern zugewiesen. Für die Nachbefragung nach 6 Monaten wurden die Telefonnummern ermittelt. Am Anfang des Fragebogens wurden allgemeine Patienteninformationen wie das Alter, die Körpergröße und das Gewicht (zur Berechnung des Body Mass Index (BMI)) erfragt.

Darüber hinaus wurden die Lebensumstände vor der stationären Aufnahme (bei traumatologischen Patienten vor dem Unfall) abgebildet. Dazu zählen die Wohnverhältnisse, der Grad der Selbstständigkeit bei der Nahrungsbeschaffung, die Mobilität und der Pflegestatus.

Im Anschluss wurden regelmäßig eingenommene Medikamente sowie der Genussmittelkonsum ermittelt. Zudem wurde nach dem aktuellen Status des Magen-Darm-Traktes (Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Kau- oder Schluckstörungen, vermehrtes Husten nach dem Schlucken, Vorhandensein einer Zahnprothese) gefragt. Des Weiteren wurden Vor- und Nebenerkrankungen, vorausgegangene Krankenhausaufenthalte und bisherige

Methoden

Operationen erfasst. Auch der Beruf und die dazugehörige REFA-Klassifizierung wurden notiert. Diese Klassifizierung bewertet die körperliche Arbeitsschwere, sowie die Umstände und Haltung der Arbeit [302]. Zudem wurde das Aktivitätsniveau erfragt, welches von Hochleistungssport über Vereinssport und Gelegenheitssport bis zu keinem Sport reichte. Zusätzlich wurde das aktuelle Schmerzempfinden mit Hilfe der Numerischen Rating Skala (NR-Skala) von 0 bis 10 erfasst. 0 entsprach Schmerzfreiheit, 10 hingegen dem am stärksten vorstellbaren Schmerz [303]. Schließlich wurden noch der Nutritional Risk Score und der SF-36 Fragebogen erhoben

3.4.2 Nutritional Risk Score (NRS 2002)

Ein Abschnitt des allgemeinen Fragebogens stellt der Nutritional Risk Score (NRS) 2002 dar, welcher als standardisiertes Screening-Werkzeug zur Früherkennung und Risikoabschätzung einer Mangelernährung erstellt wurde [304]. Der NRS ist im Anhang als Abb. 31 im Detail zu sehen. Das Screening ist in Vor- und Hauptscreening unterteilt, wobei das Vorscreening 4 Fragen zum Gewicht und zur allgemeinen Gesundheit umfasst und das Hauptscreening ein mögliches Ernährungsrisiko und die vorliegende Krankheitsschwere aufzeigt. In dieser Studie wurde immer das vollständige Screening durchgeführt. Der ermittelte NRS ist somit die Summe aus den Punkten des Hauptscreenings und einem Extrapunkt bei Alter über 70 Jahren. Bei einer Gesamtzahl unter 3 Punkten besteht eher kein Risiko für Mangelernährung, wobei Werte ab 3 auffällig sind [304, 305].

3.4.3 Short Form 36 Items (SF-36)

Der Short Form 36 Items (SF-36) Fragebogen wurde angewandt, welcher bei Patienten oft zur Therapiekontrolle und Verlaufsbeurteilung genutzt wird. Er setzt sich aus Fragen für verschiedene Dimensionen der gesundheitsbezogenen Lebensqualität zusammen. Die Dimensionen beinhalten die körperliche Funktionsfähigkeit, die körperliche Rollenfunktion, die körperlichen Schmerzen, die Vitalität, die soziale Funktionsfähigkeit, die emotionale Rollenfunktion, das psychische Wohlbefinden, sowie die subjektive allgemeine Gesundheit [306, 307]. Auch hier ist der genaue Fragebogen im Anhang als Abbildung 33 zu finden.

Methoden

3.4.4 Rauchverhalten

Der für diese Studie wichtigste Abschnitt galt als Zusatz für aktuelle und ehemalige Raucher. Hier wurde zunächst nach dem Rauchstatus, inklusive der Kategorie Gelegenheitsraucher, gefragt. Ehemalige Raucher sollten dann die Jahre anzugeben, seit denen nicht mehr geraucht wurde (Years since quitting (YSQ)). Auch die Exposition durch Passivrauch wurde erfragt. Zusätzliche Informationen zu den Rauchgewohnheiten beinhalteten, auf welche Art (Zigaretten, Zigarillos, Zigarren, Pfeife) und welche Tabakmarke geraucht wurde, sowie die Anzahl der Zigaretten pro Tag und die Anzahl der Jahre, in denen geraucht wurde. So konnten die PY errechnet werden. Neben der Frage, wie viele Sporteinheiten (mindestens 30 min) der Proband pro Woche ausübte, wurde auch nach der Anzahl der Versuche des Rauchstopps gefragt. Dazu gehörend folgte die Frage nach dem Grund, wieder angefangen zu haben. Schließlich wurde auf bisherige Erfahrungen mit Nikotinersatzprodukten, wie E-Zigaretten, eingegangen und welche davon erfolgreich das Rauchverlangen unterdrückt hatten.

3.4.5 Daten aus dem Krankenhausinformationssystem

Als Grundlage dieses Abschnittes sollten nur Daten aus dem Krankenhausinformationssystem „Medico“ dienen, die im Laufe des stationären Aufenthaltes anfielen. Zuerst wurde die aufnehmende Fachabteilung nachgeschaut (Traumatologie, Endoprothetik, Alterstraumatologie, Sporttraumatologie, septische Chirurgie und Wirbelsäulenchirurgie). Neben der Angabe der zugehörigen Versicherung (Berufsgenossenschaft (BG) oder Gesetzliche Krankenversicherung (GKV)), wurde auch die Aufnahmediagnose mit ICD-10 Code erfasst. Zur Einordnung der Aufnahmediagnose wurde das Ausmaß (Polytrauma, Mehrfachverletzung, Monoverletzung), sowie die Art (Fraktur, Arthrose, Immobilisierende Schmerzen, Sonstige) und die Lokalisation (Obere oder untere Extremität, Becken, Wirbelsäule) der Läsion ermittelt. Darüber hinaus wurde zwischen operativer und konservativer Therapie unterschieden, wobei alle Probanden eine Operation erhalten sollten, da eventuelle Komplikationen postoperativ zur Studienfrage gehörten. Also wurde bei allen Teilnehmern weiter unterschieden zwischen elektiv und akut, sowie zwischen Primär- und Sekundäreingriff. Auch der Zeitraum von der stationären

Methoden

Aufnahme bis zur OP (in Tagen) sowie die Art der OP wurden erfasst. Weiterhin wurden die Dauer des stationären Aufenthaltes (in Tagen) und, falls angegeben, die poststationäre Versorgung (stationäre Rehabilitation, Alten-/Pflegeheim, anderes Krankenhaus, Entlassung nach Hause) nachgeschaut. Besonderen Wert hatten Komplikationen (Tod, Infektion, Wundheilungsstörung, notwendige Folgeoperation, Thrombose, sonstige Komplikation), die noch während dieses stationären Aufenthaltes aufgetreten sind. Zuletzt wurde noch die physiotherapeutische Mobilisierung außerhalb des Bettes (in Tagen) dokumentiert. Außerhalb des Fragebogens sollte zudem noch ein präoperatives Blutbild gespeichert werden.

3.4.6 Erhebungsbogen „Follow Up“ nach 6 Monaten

Beim Follow Up Erhebungsbogen wurde versucht, die Probanden nach etwa 6 Monaten postoperativ telefonisch zu erreichen. Aufgrund diverser Gründe, wie sehr schwierige Erreichbarkeit oder dem späten Einschluss der letzten Probanden, konnte bei einigen Patienten nicht die 6 Monate exakt eingehalten werden. Es ging beim Follow Up vor allem um den Heilungsverlauf, anamnestisch postoperative Komplikationen und die Alltagsbewältigung. Von besonderem Interesse waren mögliche Unterschiede im Vergleich zur Ausgangssituation. Zunächst wurde sichergestellt, dass der Patient noch an der Studie teilnehmen möchte und wenn ja, ob ein erneuter stationärer Aufenthalt notwendig gewesen ist. Auch das Datum der Befragung wurde notiert. Außerdem wurden wieder die allgemeinen Daten wie das Alter, Körpergewicht, Körpergröße und BMI ermittelt. Es wurde nach dem Vorliegen der postoperativen Komplikationen nach Ehnert *et al.* 2019 (Tod, Infektion, Wundheilungsstörung, notwendige Folgeoperation, Thrombose, sonstige Komplikation), die nach dem stationären Aufenthalt aufgetreten sind, gefragt. Darüber hinaus wurde, falls relevant, nach der Knochenbruchheilung (über das Röntgen kontrolliert) gefragt. Es wurde das subjektive Globalurteil des Patienten über den Heilungsverlauf (sehr gut, gut, mäßig, schlecht, sehr schlecht) erfasst, und ob eine Arbeitsunfähigkeit nach wie vor bestünde bzw. wie viele Wochen diese bestanden hätte. Dazu passend wurde eine eventuell notwendige berufliche Veränderung oder Umschulungsmaßnahmen am Arbeitsplatz wegen der ursprünglichen Aufnahmediagnose erfragt, sowie eine ggf. veränderte REFA-

Methoden

Klassifikation. Folgende Befunde aus der Erstbefragung wurden wieder erneut evaluiert: Mobilität, Aktivitätszustand und Schmerzbewertung, NRS 2002, SF-36, (FOOD 2013 Score).

Hiernach war die Fragebogenerhebung beendet und die Ergebnisse wurden in die vorgefertigte excel Tabelle übertragen.

3.5 Identifikation des stabilsten Housekeeping Gens

Der erste experimentelle Schritt im Labor fand noch vor der Akquisition der ersten Probanden statt. Da das Hauptziel der Studie die Quantifizierung der *PADI4* Expression mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) war, wurde das interindividuell stabilste, am wenigsten regulierte Housekeeping Gen (HKG) für Neutrophile zur Normalisierung benötigt [308]. Durch die Normalisierung des Zielgens auf diese stabilen HKGs werden Einflussfaktoren, wie z.B. Verdünnungsfehler der Proben und generell unterschiedliche Expressionsmengen von mRNA und Proteinen relativiert und die Messungen des Zielgens zwischen den Personen erst vergleichbar. Die Regulationsstärke und damit auch die Eignung eines Gens zur Normalisierung ist gewebsspezifisch und variiert, weshalb die Suche nach dem stabilsten HKG für neutrophile Granulozyten sinnvoll ist [309]. Es wurden Neutrophile aus dem Vollblut von gesunden Freiwilligen isoliert und daraus mittels Phenol-Chlorophorm Extraktion die mRNA isoliert. Die mRNA wurde photometrisch quantifiziert und über eine Gelelektrophorese auf Integrität geprüft. Aus dieser wurde dann komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Die zu verwendende cDNA-Menge für die qPCR wurde in der konventionellen PCR ermittelt. Mittels SYBR Green-basierte qPCR wurden die Threshold Cycles („Schwellenzyklen“) (Ct-Werte) und damit die Expressionsmengen der HKGs in den jeweiligen Proben ermittelt. Zur Identifizierung der stabilsten HKGs wurden etablierte Programme (geNorm [310, 311], BestKeeper [312], Normfinder [313], 2-Delta-Ct-Methode [314]) genutzt, welche die Ct-Werte der HKGs der verschiedenen Proben miteinander vergleichen. Je geringer die Abweichung, desto stabiler und damit besser geeignet als HKG.

Methoden

3.6 Ablauf der Probengewinnung zur PAD4 Analyse

3.6.1 Blutabnahme

Nach der oben beschriebenen Aufklärung, Patientenzustimmung und Fragebogenerhebung, wurden dem Patienten entweder über den i.v. Anästhesiezugang oder bei Abnahme des präoperativen Blutbildes, venöses Blut in 2 x 9 ml EDTA-Röhrchen abgenommen. Auf eine korrekte Abnahmetechnik sowie nicht zu langem Venenstau wurde geachtet, um die Blutzellen vor großem mechanischem Stress und Hämolyse zu schützen und so eine eventuelle Aktivierung der Neutrophilen zu vermeiden [315]. Die Proben wurden stets innerhalb von 3 Stunden nach Abnahme im Labor verarbeitet, lysiert und bei -80 °C konserviert.

3.7 Isolation von neutrophilen Granulozyten und Zellyse

Zur Isolierung der neutrophilen Granulozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation [316] wurde zunächst in drei 15 ml Tubes je 5 ml Lympholyte Poly Dichtegradientenmedium pipettiert. Anschließend wurden vorsichtig 5 ml des in EDTA-Röhrchen gelagerten Vollblutes (Verhältnis 1:1) auf das Dichtegradientenmedium geschichtet, sodass noch keine Durchmischung der beiden Flüssigkeiten stattfand. Daraufhin wurden die Reaktionsgefäße für 35 min auf 500 G mit ausgeschalteter Bremsfunktion und 90° Ausschwenkung zentrifugiert. Hiernach ergaben sich verschiedene Schichten der Vollblutbestandteile, die anhand ihrer Dichte voneinander getrennt wurden.

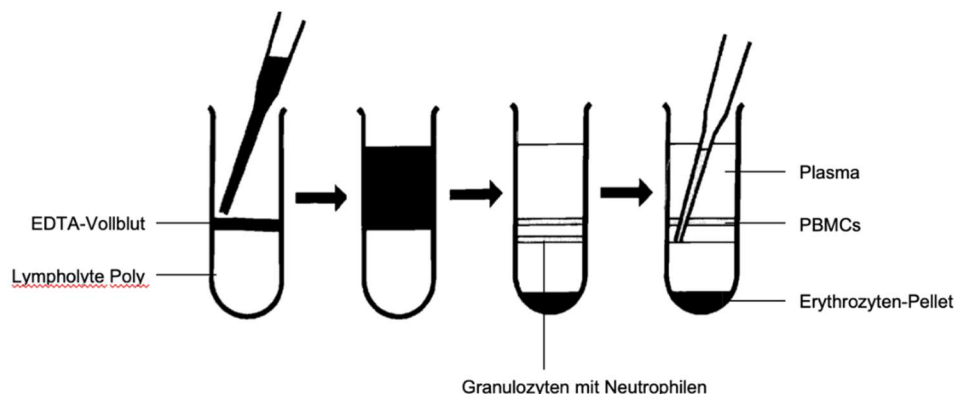


Abbildung 10: Schichten bei der Neutrophilenisolation mittels Lympholyte Poly; PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells; angelehnt an Cedarlane Laboratories' Protokoll [316]

Die oberste Phase ist hierbei eine plasmaähnliche gelbliche Flüssigkeit, während sich darunter 2 lockere weißliche Ringe in durchsichtigem Medium formen. Der

Methoden

obere Ring besteht aus den PBMCs, welche alle Immunzellen mit Ausnahme der Granulozyten, also Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten, darstellen. Der untere Ring enthält die polymorphnukleären Granulozyten (insbesondere die Neutrophilen [97]). Ganz unten als dunkelrotes Sediment liegt der Hauptteil der Erythrozyten an den Boden gepresst. Die einzelnen Phasen wurden mittels Pipette voneinander getrennt und so die (neutrophilen) Granulozyten isoliert und in 3 weitere Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Zellen zweifach mit PBS-Lösung gewaschen und wieder zentrifugiert (10 min, 400 G, Beschleunigung und Entschleunigung herabgesetzt). Bis hierher fanden alle Schritte bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurden nach dem letzten Waschschrift die granulozytären Pellets auf Eis gelegt und so auf ca. 4 °C gekühlt. Ein Drittel der Zellen wurde mittels RIPA-Puffer-Lösung zur Proteinisolierung lysiert und auf 4 °C 10 min lang bei 13.000 G zentrifugiert [317]. Der proteinhaltige Überstand wurde bei -80 °C gelagert. Die anderen 2 Drittel der Zellen wurden zur RNA-Isolation genutzt. Hierbei wurden die enthaltenen (neutrophilen) Granulozyten mit je 125 µl TriFast pro Reaktionsgefäß lysiert, in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert. Die Zeit von der Blutabnahme bis zur Zelllyse dauerte nie länger als 4 h, wobei die meisten Proben innerhalb von 3 h lysiert und die Zellaktivitäten gestoppt wurden.

3.8 Quantifizierung der relativen PAD4-mRNA Expression

3.8.1 RNA-Isolation, Konzentrationsmessung und Integrity Check

Aus dem TriFast-Lysat wurde die RNA gemäß des Standardprotokolls zur Phenol-Chlorophorm Extraktion von mRNA isoliert. Hierfür wurden die Proben bei 4 °C vollständig aufgetaut und bei 12.000 G für 10 min bei 4 °C zentrifugiert um Zelldebris zu entfernen. Der Überstand wurde in ein steriles Mikroreaktionsgefäß übertragen und 100 µl Chloroform je 500 µl TriFast, in diesem Fall also 50 µl Chloroform, hinzugegeben. Danach wurde die Suspension sorgfältig gemischt, bis eine homogene weiße Farbe erschien. Auf Eis wurde dann etwa 10 min inkubiert. Eine weitere Zentrifugation bei 14.000 G für 10 min bei 4 °C folgte. Die klare, obere Phase enthielt die RNA und musste in ein neues steriles Mikroreaktionsgefäß transferiert werden. Dieses wurde bereits vorbereitet mit halb so viel Isopropanol wie TriFast. In diesem Fall also 125 µl.

Methoden

Die Mikroreaktionsgefäße wurden zur Durchmischung invertiert und über Nacht bei -20 °C gelagert, um die RNA-Ausbeute zu erhöhen. Am nächsten Tag wurden die Proben zunächst bei 4 °C 10 min lang inkubiert und dann wieder bei 14.000 G und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig vom RNA-Pellet am Boden des Gefäßes getrennt und verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen, wobei wieder bei 14.000 G und 4 °C 10 min lang zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Anschließend wurde das Mikroreaktionsgefäß für ca. 10 min geöffnet stehen gelassen, um weiteres Verdampfen von Ethanol zu ermöglichen. Das Pellet wurde mit $30\text{ }\mu\text{l}$ DEPC H_2O resuspendiert. Nach vollständiger Auflösung wurde das Gefäß abermals für weitere 20 min zur finalen Evaporation von Ethanol geöffnet gelassen [318].

Zur Messung der RNA-Konzentration wurde die optische Dichte (OD) der Lösung mittels Omega Plate Reader und LVis Plate gemessen. Diese Platte besitzt 16 mögliche Messfenster, wobei nur diejenigen beladen wurden, bei welchen im zuvor durchgeführten Dust Check mit DEPC H_2O eine OD von unter 0,03 gemessen wurde. Im Anschluss an den Dust Check wurde mit den DEPC H_2O befüllten Messfenstern der Bezugswert für die Konzentrationsmessung ermittelt. Im Folgenden wurden die Messfenster mit $2\text{ }\mu\text{l}$ der zu messenden Proben beladen und erneut die OD gemessen. Neben der errechneten RNA-Konzentration erhielt man auch die Wellenlängenverhältnisse $260\text{ nm}/280\text{ nm}$ und $260\text{ nm}/230\text{ nm}$. Im Fall von Patientenproben sollen diese Werte, die die Reinheit der RNA (Abwesenheit von Salzen, Proteinen, unerwünschte Lösungen) widerspiegeln immer über 1,5 liegen.

Methoden

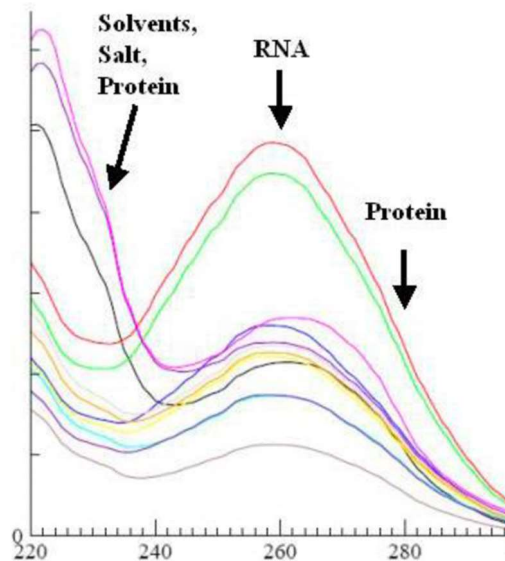


Abbildung 11: Absorptionsspektren verschiedener RNA-Proben unterschiedlicher Reinheit/Qualität [319].

Zur Kontrolle der Integrität der RNA wurde danach ein Integrity Check der Proben mittels Elektrophorese durchgeführt. Dafür wurden rechnerisch jeweils 400-500 ng der Proben in Extragefäße mit DEPC H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl verdünnt. Zuletzt wurde Loading Buffer (5X) im Verhältnis 1:5 zu den verdünnten Proben hinzugegeben, hier also 2,5 µl. Anschließend musste das Gel für die Elektrophorese hergestellt werden. Hierfür wurden 1,5-2 % Agarose mit 1X TBE in der Mikrowelle erhitzt und mit 7 µl Ethidiumbromid gemischt. Auf besonderen Kontaktschutz wurde geachtet. Das heiße Gel wurde in eine Form gegossen und nach Abkühlung und Aushärtung in die mit TBE gefüllte Gelkammer gelegt. In die einzelnen Geltaschen wurden nun die 10 µl der präparierten Proben bzw. 1,5 µl eines pUC19-Markers pipettiert. Die Gelelektrophorese lief bei 80 V für 45 min. Die fluoreszierenden Signale der so aufgetrennten Probe wurden unter UV-Licht im INTAS Science Imaging System fotografiert. Hierbei war auf das Vorhandensein zweier Banden (18S und 28S) pro Probe zu achten, um sicherzustellen, dass die RNA nicht degradiert war. Ein repräsentativer Integrity Check ist in Abb. 14 zu sehen.

3.8.2 cDNA-Synthese und konventionelle PCR zur Kontrolle

Tabelle 5: Verwendete PCR-Primer [Primer BLAST].

Gen (Protein)	Genbank -nummer	Primer Forward	Primer Reverse	Länge des Amplicon [bp]	Annealing Temperatur [°C]

Methoden

<i>β-Actin</i>	NM_0011 01.3	CGACAACGGCTCCG GCATGT	GCACAGTGTGGG TGACCCCG	461	64
<i>B2M</i>	NM_0040 48.2	AGATGAGTATGCCT GCCGTG	GCGGCATCTTCAA ACCTCCA	105	60
<i>EF1α</i>	NM_0014 02.5	CCCCGACACAGTAG CATTG	TGACTTTCCATCC CTTGAACC	98	56
<i>GAPDH</i>	NM_00 2046.4	GTCAGTGGTGGACC TGACCT	AGGGGTCTACATG GCAACTG	420	56
<i>GAPDH</i>	NM_0020 46.3	TGCACCACCAACTG CTTAGC	GGCATGGACTGT GGTCATGAG	87	59
<i>HPRT1</i>	NM_0001 94.2	CCCTGGCGTCGTGA TTAGTG	GAGCACACAGAG GGCTACAA	190	58
<i>HPRT1</i>	NM_0001 94.2	CCTGGCGTCGTGAT TAGTGA	CGAGCAAGACGTT CAGTCCT	137	58
<i>PADI4</i>	NM_0123 87.2	AGAGGTGACCCTGA CGATGA	CAGGTCTTCGCTG TCAAGCA	310	56
<i>RPL 13a</i>	NM_0124 23.3	AAGTACCAGGCAGT GACAG	CCTGTTTCCGTAG CCTCATG	100	56
<i>18S</i>	NR_0032 86	GGACAGGATTGACA GATTGAT	AGTCTCGTTCGTT ATCGGAAT	111	56

Intakte mRNA konnte nun *via* Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde das First Strand cDNA Synthese Kit von ThermoFisher nach Gebrauchsanleitung des Herstellers [319] genutzt. Das Kit nutzt eine M-MuLV reverse Transkriptase, die die einzelsträngige RNA zu einer doppelsträngigen DNA durch komplementäre Basenanlagerung ergänzt. Vor PCR-Beginn mussten die Komponenten in zwei Mastermischungen kombiniert werden:

Tabelle 6: Bestandteile der Mastermischungen für die cDNA-Synthese.

Bestandteil	Volumen	Finale Konzentration
Mastermischung 1 (für jede Probe einzeln)		
RNA-Probe	4,5 µl	Maximal 2500 ng RNA in DEPC auf 4,5 µl verdünnt
Primer oligo dT (0,5 µg/µl)	0,5 µl	15-20 pmol
Primer random hexamer (2 µg/µl)	0,5 µl	15-20 pmol
Mastermischung 2 (Volumina multipliziert mit Probenanzahl und Pipettierfehler von 10 %)		
5X reaction buffer	2 µl	1X
RiboLock Rnase Inhibitor (20 U/µl)	0,5 µl	10 U
10 mM dNTP-Mix	1 µl	1 mM
M-MULV Reverse Transkriptase (20 U/µl)	1 µl	20 U

Der Thermocycler wurde auf das folgende Programm eingestellt:

Methoden

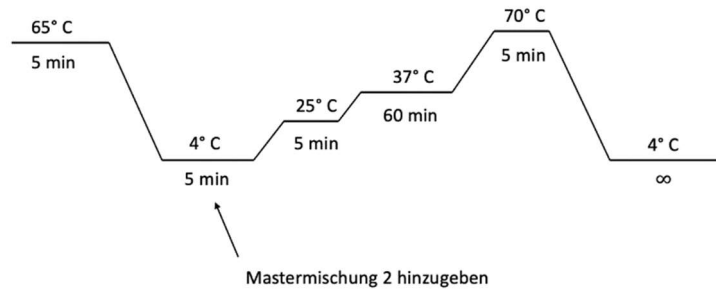


Abbildung 12: Programm des Thermocyclers für die cDNA-Synthese. Angelehnt an die Gebrauchsanleitung des Herstellers [318]. Einheiten der Zahlen über der Linie [°C]/Zahlen unter der Linie [Minuten].

Man ist bei der cDNA-Synthese davon ausgegangen, dass 100 % der RNA-Proben in cDNA umgesetzt wurden. Im Anschluss an die cDNA-Synthese wurden die Proben auf 10 ng/μl verdünnt, und es fand eine PCR zur Erfolgskontrolle mit einem der später genutzten Housekeeping Gene statt. Für die PCR wurde ebenfalls eine Mastermischung erstellt, der aus den folgenden Komponenten bestand:

Tabelle 7: Ansatz der Kontroll-PCR auf das Housekeeping Gen EF1 α .

Bestandteil	Volumen (Volumina multipliziert mit Probenanzahl und Pipettierfehler von 10 %)
DEPC-Wasser	4,5 μl
RedTaq PCR MasterMix Biozym	7,5 μl
Forward Primer EF1 α	0,75 μl
Reverse Primer EF1 α	0,75 μl

Die Zutaten wurden gut vermischt und zu 1,5 μl cDNA (= 15 ng) Probe ins PCR-Tube pipettiert. Das passende Programm im Thermocycler sah folgendermaßen aus:

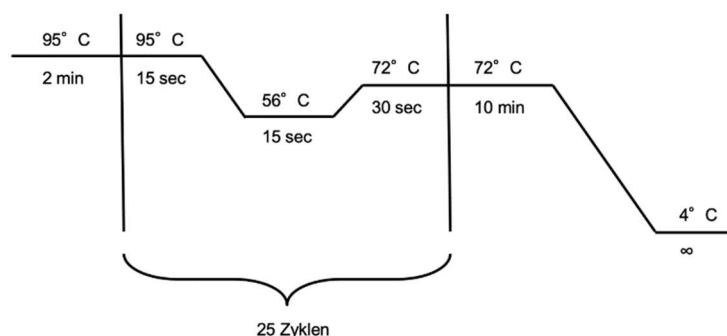


Abbildung 13: Einstellung der Thermocyclers für die Kontroll-PCR der synthetisierten cDNA mit dem Housekeeping Gen EF1 α ; °C = Grad Celsius; min = Minuten; sec = Sekunden. Annealing temperature = 56 °C für EF1 α .

Nach der PCR wurde eine Gelelektrophorese nach demselben Prozedere (2 g Agarose, 7 μl Ethidiumbromid, 3 μl pUC19-Marker, 80 V, 85 min) wie beim Integrity Check durchgeführt, nur dass statt der präparierten RNA (mit Loading

Methoden

Buffer) direkt 6,5 µl der PCR-Proben genutzt wurden. Mithilfe des INTAS Science Imaging Gerätes wurde kontrolliert, dass alle fluoreszierenden Banden vorhanden sind und bis hierhin keine Fehler aufgetreten sind.

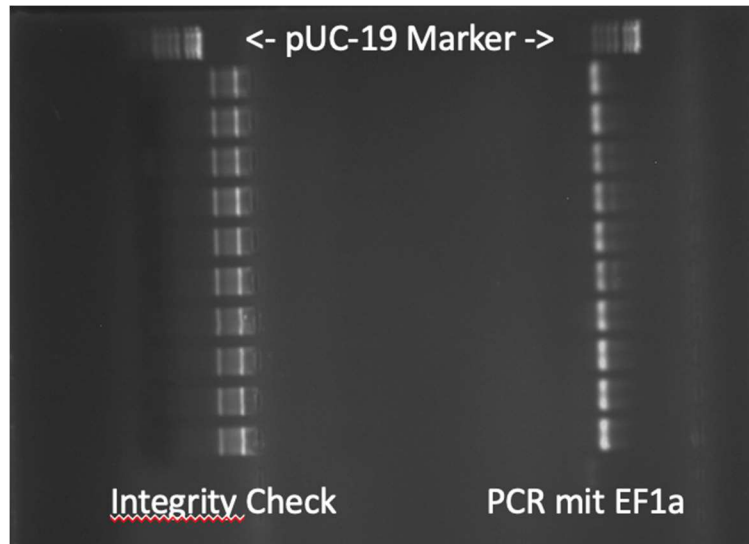


Abbildung 14: Aufnahme des INTAS Science Imaging Gerätes einer PCR und eines Integrity Checks. Im Integrity Check stellt der linke Strich den größeren 28S-Anteil und der rechte Strich den kleineren 18S-Anteil dar. Wenn beide Striche in dieser Anordnung zu sehen sind, gilt die RNA als intakt.

3.8.3 Relative Quantifizierung der Genexpression mit Real-Time qPCR SYBR Green

In der cDNA befinden sich die Mengen und Sequenzen der gesamten mRNA zum Zeitpunkt des Zelltodes des Neutrophilen. Um nun die Expression eines bestimmten Gens relativ (bezogen auf ein Normalisierungsgen) zu quantifizieren, braucht es eine Echtzeit quantitative PCR (Real-Time qPCR) mit den Zielgenen. Das Prinzip der qPCR läuft zusammengefasst wie folgt ab: Das Ziel-Gen in der cDNA wird mit einer spezifischen Primersequenz und einer hitzeresistenten Polymerase, wie bei der konventionellen PCR, amplifiziert, hier jedoch bis in die Sättigung (40 Zyklen). Hierbei interkaliert ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR Green) an doppelsträngige DNA (PCR-Produkte), dessen Signal proportional mit der Menge der PCR-Produkte detektiert werden kann. Der Zeitpunkt/Zyklus, in dem die Amplifikationsfluoreszenz erstmals signifikant über den Schwellenwert der Hintergrundfluoreszenz steigt, wird Cycle Threshold („Zyklus-Schwelle“; Ct) genannt. Je früher die Grenze erreicht wird, also je kleiner der Ct, desto größer ist die Menge des untersuchten Gens in der cDNA. Das fluoreszierende Signal ist nicht spezifisch für ein bestimmtes PCR-Produkt, sodass auch Primer-Dimere falschpositive Signale senden können. Zur Differenzierung wird am Schluss der

Methoden

qPCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, wobei kontinuierlich die Temperatur erhöht und dabei die Fluoreszenz gemessen wird. Je höher die nötige Temperatur ist, desto länger die Nukleinsäurekette [320, 321]. Um die Ergebnisse der einzelnen Proben zu vergleichen, werden die Ct-Werte des untersuchten Gens (hier *PADI4*) mit dem Ct-Wert des interindividuell möglichst stabilen Housekeeping Gens subtrahiert [322]. Daraus entsteht der ΔCt -Wert. Im Fall dieser Studie wurde zur weiteren Absicherung die beiden stabilsten Housekeeping Gene ausgewählt, die im Vorfeld für Neutrophile gefunden wurden. Dies hat das Ziel, Regulationen auf dieser Ebene möglichst auszugleichen. Aus den Ct-Werten der beiden HKGs wurde das geometrische Mittel errechnet und zur Normalisierung verwendet.

$$\Delta Ct_x = Ct_{PAD4} - \sqrt{(Ct_{EF1} \times Ct_{RPL13a})}$$

Rechnerisch wurde weiterhin jeder ΔCt -Wert mit dem Mittelwert aller ΔCt -Werte subtrahiert, um die relative Expression als $\Delta\Delta Ct$ jeder Probe zu erhalten:

$$\Delta\Delta Ct_x = \Delta Ct_x - \frac{\Delta Ct_1 + \Delta Ct_2 + \Delta Ct_3 + \dots + \Delta Ct_n}{n}$$

Um im Endergebnis keine negativen Werten zu erhalten und die Unterschiede der $\Delta\Delta Ct$ -Werte deutlicher zu machen (ein $\Delta\Delta Ct$ -Unterschied von 1 zwischen zwei Proben bedeutet bereits eine doppelte Genmenge), wurden alle $\Delta\Delta Ct$ -Werte als negativer Exponent zur Basis 2 gesetzt, also mit der folgenden Formel umgerechnet:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Vergleichswert}$$

Diese Vergleichswerte wurden folglich den Studiengruppen und im Verlauf der Studie auch anderen Charakteristika der Population nach geordnet und ausgewertet. Alle Werte wurden im Duplikat gemessen, woraus der Mittelwert errechnet wurde. Für die einzelne qPCR wurden folgende Ansätze erstellt:

Tabelle 8: Komponenten pro Well in der qPCR; HKG = Housekeeping Gen, *PADI4* = Peptidyl-Arginin-Deiminase 4.

Komponente	Volumen (pro Well)	
SYBR Green Master Mix 2x High Rox	10 μ l	
Forward Primer	0,5 μ l	
Reverse Primer	0,5 μ l	
DEPC Wasser	Bei HKGs: 7 μ l	Bei PAD4: 1 μ l
cDNA	Bei HKGs: 2 μ l (20 ng)	Bei PAD4: 8 μ l (80 ng)
Alle Ansätze im Duplikat, mit Negativprobe für jeden Primer und beim Erstellen eines Hauptgemisches Pipettierfehler von 10% beachten.		

Das StepOnePlus Real Time qPCR System wurde folgendermaßen eingestellt:

Methoden

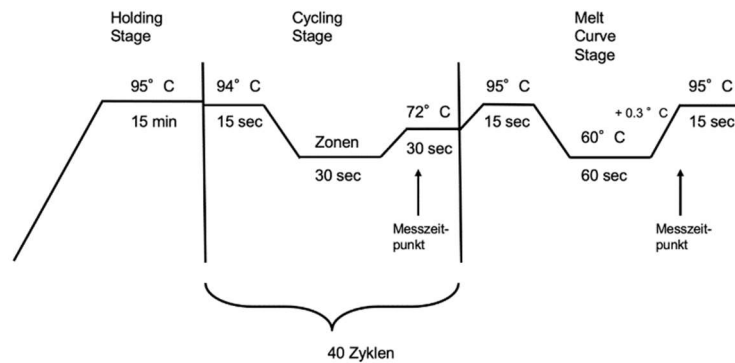


Abbildung 15: Einstellung des StepOnePlus qPCR Systems für die qPCR mit den HKGs EF1 α und RPL13a; die Temperaturen in den Zonen waren für EF1 α und RPL13a 56 Grad Celsius und für PADI4 60 Grad Celsius; min = Minuten; sec = Sekunden.

3.9 PAD4 Quantifizierung auf Proteinebene

Die in RIPA lysierten Neutrophilen dienten, wie in Kapitel 3.7 beschrieben, der Proteinisolierung. Nach dem Auftauen musste die Protein-Konzentration der RIPA Lysate mittels Lowry Assay bestimmt werden [323].

Hier wurde auf einer 96-Well-Platte in Triplikaten 2 μ l eines bovinen Serum Albumin (= BSA) Standards in den Konzentrationen 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0 μ g/ μ l untereinander aufgetragen. In die übrigen Wells wurden 2 μ l der Proteinproben im Triplikat pipettiert. Im Folgenden wurden pro Well 150 μ l der Lösung A hinzugegeben und schüttelnd für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend gab man pro Well 30 μ l der Lösung B hinzu und wartete 1 h bis die Absorption mittels Plate Reader bei 750 nm gemessen wurde. Die Proteinkonzentrationen errechnete man über die gemessene optische Dichte anhand der Standardkurve der BSA-Verdünnung [323].

Die Proteinlösungen wurden auf eine gemeinsame Konzentration und das gleiche Volumen verdünnt und die Proteine dann über den Dot Blotter auf eine Nitrocellulose Membran zu übertragen. Der Dot Blot dient der relativen Quantifizierung eines spezifischen Proteins, in diesem Fall des PAD4 und des Housekeepers β -Actin, aus einer Proteinisolierung z.B. mittels RIPA-Puffer. Auf einer Protein-bindenden Nitrocellulose Membran werden Proteine immobilisiert. Anschließend werden die freien Bindungsstellen der Membran über BSA geblockt, damit im Folgenden spezifische Antikörper für das Target Protein mit ihrer Fab-Region nur an den korrekten Proteinantigenen binden können. Im zweiten Inkubationsschritt binden der sekundäre Antikörper spezifisch an die Fc-Regionen der Target Antikörper. Diese sekundären Antikörper sind wiederum an

Methoden

ihrer Fc-Region mit einem Enzym gekoppelt, welches bei Luminolkontakt zu einer proportional messbaren Chemilumineszenz führt. So wird eine relative Proteinquantifizierung möglich. Der Aufbau und Ablauf sah wie folgt aus:

Im Dot Blotter lag unten das Whatman Paper und darüber die Nitrocellulose Membran. Oben auf setzte man den Deckel des Gerätes, der die Löcher zur Probenladung beinhielt. Der Boden und der Deckel des Gerätes mussten luftdicht verschlossen werden, da im Boden des Gerätes am Auffangbecken eine Pumpe über einen geeigneten Schlauch angeschlossen wurde, welches die RIPA-Proteinlösungen aus den Löchern des Deckels durch die Membran und das Papier absaugen sollte [324]. Die geladenen Proben mussten dasselbe Volumen und denselben Proteingehalt aufweisen und die Versuche im Duplikat stattfinden. Letztlich wurden 20 µg, verdünnt auf 100 µl, jeder Probe pro Durchgang geladen.

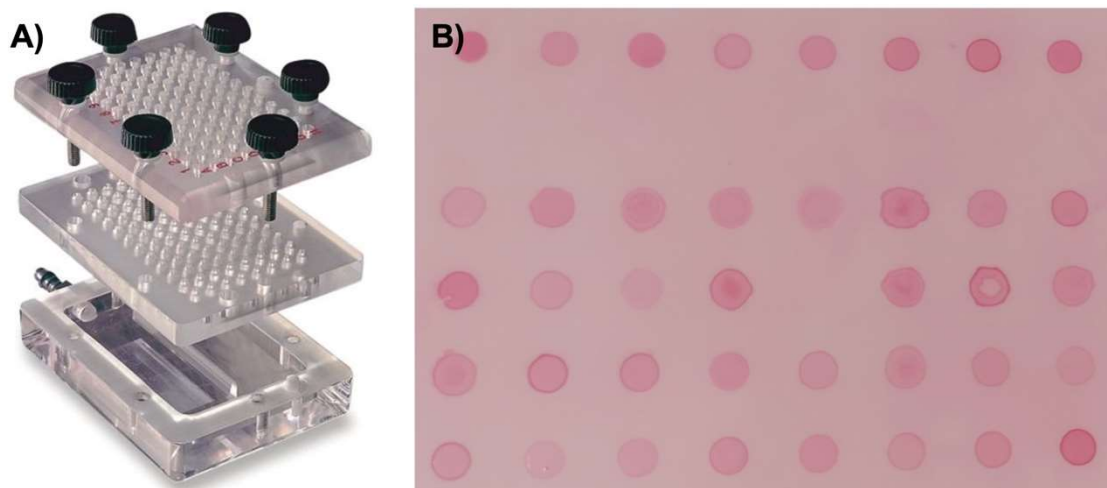


Abbildung 16: A) Dot Blotter T790.1 von Carl Roth. B) Dot Blot Membran nach Proteinladung über Dot Blotter und Färbung mit Ponceau-S-Lösung.

Nach Abschluss des Dot Blots überprüfte man mit Hilfe einer 5-minütigen Inkubation in Ponceau-Lösung das Gesamtprotein auf der Membran. Nach fotografischer Dokumentation musste Ponceau mit Leitungswasser ausgewaschen werden [325]. Nach kurzer Waschung in TBS-T wurde die Membran für 1 h mit 5 % BSA in TBS-T inkubiert und so die nicht beladenen Stellen der Membran blockiert. Anschließend wurde erneut mit TBS-T gewaschen und mit dem primären Antikörper von zunächst PAD4 (1:500 Verdünnung in TBS-T) bei 4 °C schüttelnd über Nacht inkubiert. Danach wurde die Membran weitere 3 mal 10 min in TBS-T gewaschen und mit dem sekundären Antikörper anti-Mouse (1:10.000 Verdünnung in TBS-T) für 2 h bei

Methoden

Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Die Membran wurde weitere 3-mal mit TBS-T gewaschen, während die enhanced chemoluminescent (ECL)-Lösung vorbereitet wurde. Die Membran wurde mit ECL-Lösung bedeckt und für 1 min lichtgeschützt inkubiert [326]. Die Proteinsignale wurden mit dem INTAS ChemoCam System bei möglichst optimaler Belichtungszeit und Pixelanzahl detektiert. Danach wurde die Membran von den genutzten Antikörpern über Proteinstripping befreit. Dafür wurde die Membran 1 min lang in demineralisiertem Wasser, dann 1 min in 200 mM NaOH, gefolgt von wieder 1 min in demineralisiertem Wasser und schließlich 1 min in TBS-T schüttelnd inkubiert [317, 325]. Nach erneutem blockieren wurde die Membran nun mit den Housekeeper β -Actin Antikörper (1:10.000 Verdünnung in TBS-T) in derselben Weise inkubiert wie bereits bei PAD4 erläutert. Im Anschluss an die nächtliche Inkubation bei 4 °C wurde nun allerdings als sekundärer Antikörper anti-Rabbit Antikörper genutzt. Sonst blieb die Prozedur dieselbe wie beim PAD4 Antikörper.

Tabelle 9: Verwendete Antikörper.

Protein	Isotyp	Konzentration (in TBS-T)	Hersteller	No.	Größe [kDa]
β -Actin	rabbit	1:10000	Cell Signaling	4970	45
PAD4	mouse	1:500	Santa Cruz Biotechnology	Sc-365369	75
Mouse IgG	horse	1:10000	Cell Signaling	7076	-
Rabbit IgG	goat	1:10000	Cell Signaling	7074	-

3.9.1 Dot Blot Datenauswertung

Zur Messung der Dot-Intensität und damit der Target-Proteinmenge wurden die aufgenommenen Bilder des INTAS ChemoCam Systems mit Hilfe der Software ImageJ analysiert. Die ermittelten Werte der Dot Intensität (= Helligkeit der Punkte) bei PAD4 wurden auf die Intensitäten bei β -Actin normalisiert und auf die Gesamtheit relativiert. Die relativen Proteinmengen wurden den Studiengruppen zugeteilt und ausgewertet. Die Proteinladung und -messung wurden im Duplikat durchgeführt und ausgewertet. Aufgrund zu großer Probenzahl wurden Referenzproben ausgewählt, die auf allen Membranen mitgeladen wurden, um alle Intensitäten vergleichen zu können.

3.10 Statistische Auswertung

Die Daten wurden über das Statistikprogramm GraphPad Prism (Version 8, MA, USA) ausgewertet. Ergebnisse wurden als Tabellen, Box Plots (Box und

Methoden

Whiskers – Tukey), Kuchendiagramme und Venn-Diagramm dargestellt. Die jeweilige Probandenzahl einer Gruppe (N) und die Replikate (n) sind in der Abbildungslegende aufgeführt. Generell galt, dass bei den Werten nicht von einer Gausschen Verteilung ausgegangen wurde, da die Gruppengröße hierfür zu klein war. Um zwei Gruppen zu vergleichen, die zueinander gematcht wurden und damit, nach Rücksprache mit der statistischen Beratung, als verbundene Stichproben galten, nutzte man den Wilcoxon Test. Beim Vergleich zweier Gruppen ohne Matching wurde der Mann-Whitney U-Test angewandt. Bei der Analyse mehrerer Variablen wurde der Kruskal-Wallis one-way ANOVA mit Dunn's multiplen Vergleichstest genutzt. Der Bezug eines Messwertes zu zwei Variablen gelang mit der Gruppenanalyse two-way ANOVA. Zur Feststellung einer Korrelation zwischen Variablen, nutzte man den Spearman r Test, wobei r^2 zeigt, wie viele der Werte auf der Trendlinie liegen und durch den Zusammenhang erklärt werden können. Beim Signifikanztest wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt. Die statistische Auswertung dieser Arbeit wurde von Frau Serna-Higueta unter der Leitung von Prof. Martus des Instituts für Medizinische Biometrie Tübingen beraten und begutachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Stabilste Housekeeping Gene für Neutrophile sind *EF1 α* und *RPL13a*

Zur Testung des stabilsten Housekeeping Gens zur qPCR-Normalisierung von PAD4 wurden die Neutrophilen von gesunden Freiwilligen isoliert und auf die folgenden üblich genutzten Housekeeping Gene geprüft: *EF1 α* , *β -Actin*, *RPL13a*, *HPRT*, *B2M*, *18S* und *GAPDH*.

Die genutzten Auswertungsprogramme zeigten, wie in Abb. 17 zu sehen, im Schnitt *EF1 α* , *RPL13a* und *HPRT* als die stabilsten HKGs an. Zur weiteren Sicherheit vor zufälligen individuellen Regulationen wurde das geometrische Mittel aus den beiden stabilsten HKGs verwendet. Da *HPRT* in der konventionellen PCR nur extrem schwach detektierbar war, entschied man sich für die Kombination *EF1 α* und *RPL13a*.

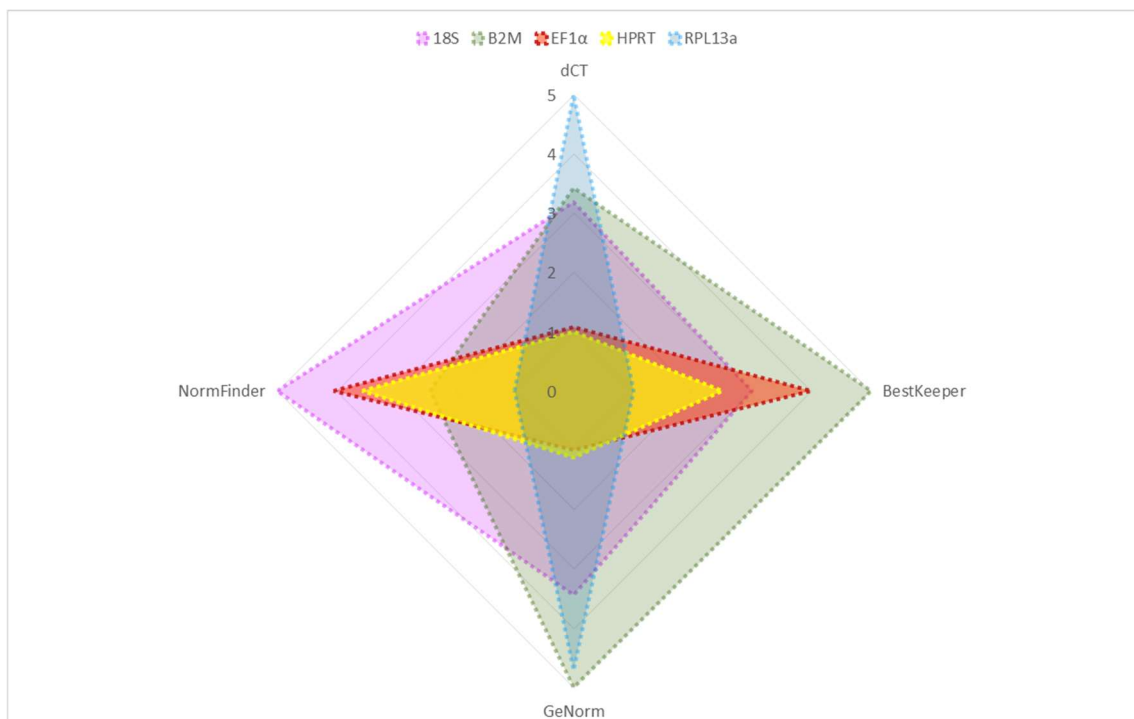


Abbildung 17: Ranking der geprüften Housekeeping Gene hinsichtlich der interindividuellen Stabilität in Neutrophilen durch die excel templates Normfinder, GeNorm, BestKeeper und deltaCt. Die Graphik bildet von innen nach außen die Ranking Stufen 1-5 ab. 1 stellt das interindividuell stabilste und somit beste Housekeeping Gen dar.

Ergebnisse

4.2 Patientenkollektiv

Insgesamt erklärten sich 117 Patienten bereit, an der Studie teilzunehmen. Davon sind 84 Patienten in die Endauswertung eingeflossen. Gründe für den nachträglichen Ausschluss waren zum Beispiel, dass keine brauchbaren Proben erlangt werden konnten oder dass Patienten, trotz Screeningfragen zur Kompatibilität, im Nachhinein nicht die Einschlusskriterien erfüllten. Auch das Fehlen eines passenden Matchings aus der jeweils anderen Gruppe führte zum nachträglichen Ausschluss eines Probanden. Die 84 eingeschlossenen Patienten waren bezüglich ihres Rauchstatus prinzipiell in Nichtraucher und Raucher einzuteilen und wurden entsprechend hinsichtlich Alter, Geschlecht, BMI, sowie Anzahl von Erkrankungen und regelmäßig eingenommener Medikamente gematcht. Die Zusammensetzung sowie die Charakteristika des Kollektivs werden nachfolgend geschildert.

4.2.1 Nachträglicher Ausschluss von Patienten

Für das Hauptziel der Quantifizierung der *PADI4* mRNA über qPCR galt folgendes: In den meisten Fällen wurden Patienten, die Ausschlusskriterien aufwiesen, gar nicht erst eingeschlossen. Bei 10 Patienten war nach Studieneinschluss keine oder nicht genügend Blutprobe zu gewinnen. 17 Probanden mussten nachträglich ausgeschlossen werden, da sich beim Erheben des Fragebogens oder bei der Kontrolle im Kliniksystem Ausschlusskriterien zeigten, die vorab nicht erfasst wurden. 6 Patienten blieben zum Studienabschluss ohne passenden Matching-Partner und wurden deshalb im Endergebnis nicht berücksichtigt (Abb. 18).

Ergebnisse

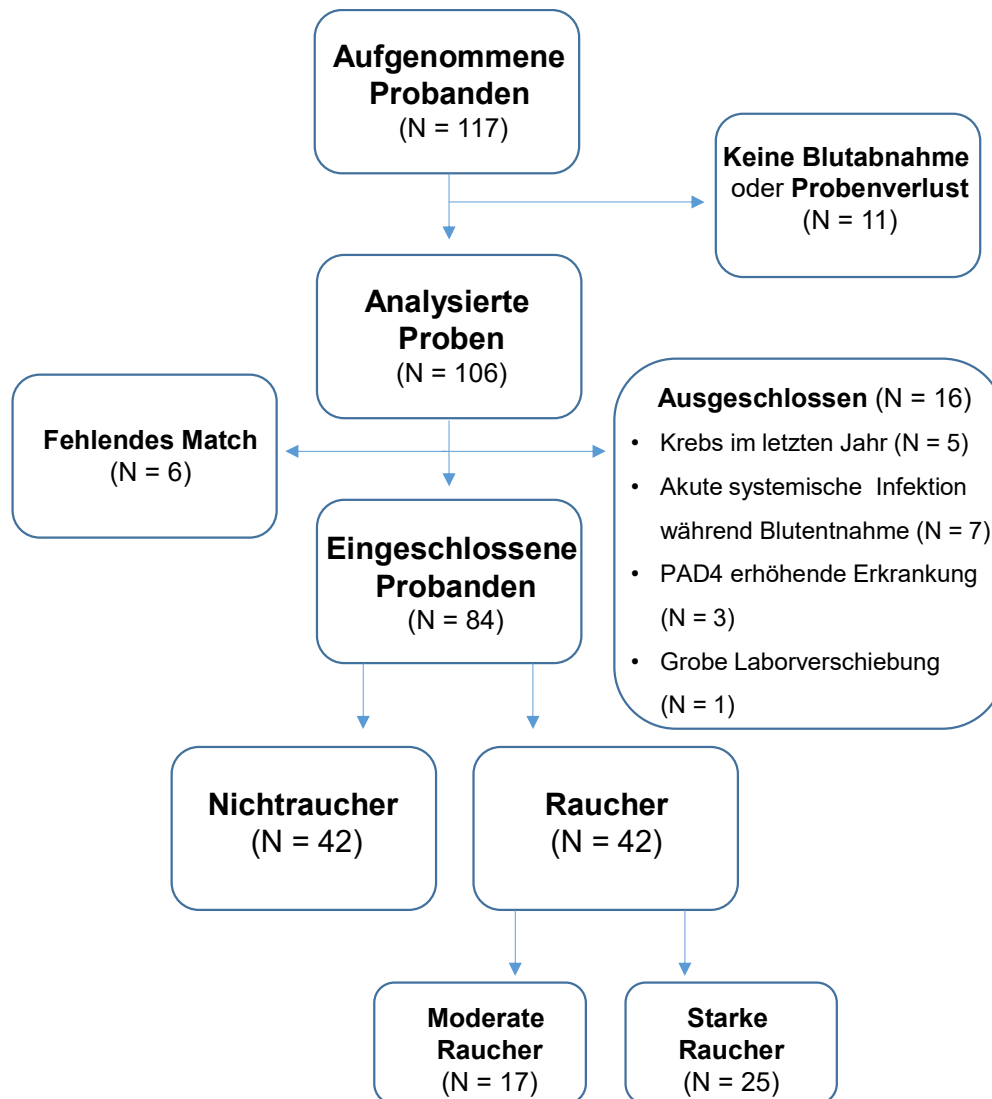


Abbildung 18: Flow Chart zum Ausschluss von Patienten.

Für die Auswertung der Dot Blot Ergebnisse kam es durch experimentell bedingte Fehler, wie hämolytischen Proben, die mit der ECL-Lösung reagierten oder der mangelnden Proteinkonzentration geschuldet, zum weiteren Probenverlust. Im ersten Durchgang des Dot Blots konnten 80 Proben ausgewertet werden, im zweiten noch 72.

4.2.2 Ausgeglichene Zusammensetzung der Studiengruppen

Grundsätzlich wurde darauf geachtet, dass für jeden untersuchten Raucher eine passende Kontrolle aufgenommen wird. Da die Raucher in manchen Ergebnissen weiter aufgeteilt wurden in moderate (1-20 PY) und starke (>20 PY) Raucher, enthält die gemeinsame Kontrollgruppe am meisten Probanden (Kontrollgruppe: 42; moderate Raucher: 17; starke Raucher: 25).

Ergebnisse

Zur Minimierung der Einflussfaktoren und Verbesserung der Vergleichbarkeit der Gruppen wurden die Probanden entsprechend des vorher erklärten Matchings ausgewählt. Die Charakterisierung der Hauptgruppen zeigt eine ausgeglichene Geschlechterverteilung mit je 20 Frauen und 22 Männern bei Rauchern und Nichtrauchern. Alter, BMI, die Anzahl systemischer Erkrankungen und regelmäßig eingenommener systemischer Medikamente waren ebenfalls ähnlich. Auffällig ist, dass Raucher im Schnitt mit 54,5 Jahren diskret jünger waren (Nichtraucher: 55,8 Jahre) und einen leicht niedrigeren BMI (R: 27,0 \Leftrightarrow NR: 28,1 $\frac{kg}{m^2}$) aufwiesen. Trotz dessen litten sie an etwas mehr Erkrankungen (R: 2,05 \Leftrightarrow NR: 1,86) und nahmen mehr systemische Medikamente regelmäßig ein (R: 1,95 \Leftrightarrow NR: 1,89; siehe Tabelle 16). Diese Erkenntnisse waren jedoch aufgrund des sorgfältigen Matchings nicht signifikant.

Im Anhang findet sich als Tabelle 16 zusätzlich die Beschreibung des Patientenkollektivs, wenn man moderate (1-20 PY) von starken (>20 PY) Rauchern getrennt betrachtet. Moderate Raucher zeigten nämlich ein auffällig (aber nicht signifikant) niedrigeres Alter (ca. 6,5 Jahre), weniger Erkrankungen (durchschnittlich 0,7 Krankheiten weniger) und auch deutlich weniger regelmäßig eingenommene Medikamente (durchschnittlich 1,6 Medikamente weniger) als starke Raucher. Auch im Vergleich zu den Nichtrauchern unterschieden sich die moderaten Raucher bezüglich des Alters deutlich (ca. 6 Jahre), interessanterweise aber nicht so stark in der Anzahl der Erkrankungen. Auch in der Geschlechterverteilung ergaben sich Unterschiede zwischen moderaten und starken Rauchern angesichts der unterschiedlichen Prävalenzen des starken Rauchens zwischen den Geschlechtern. So dominierten bei den moderaten Rauchern etwas die Frauen, während mehr Männer bei den starken Rauchern zu finden waren (Tab. 10).

Tabelle 10: Allgemeine Beschreibung der Studiengruppen; mit Durchschnitt, Standardabweichung und die Reichweiten in Klammern kursiv.

Studiengruppen	Nichtraucher	Raucher	Niedrigster p-Wert
Geschlecht	♀: 20 ♂: 22	♀: 20 ♂: 22	
Ø Alter [Jahre]	55,8 ± 11,3 (74 – 32)	54,5 ± 11,1 (74 – 33)	0,46
Ø Body Mass Index (BMI) [$\frac{kg}{m^2}$]	28,1 ± 3,8 (21,5 – 36,9)	27,0 ± 3,6 (21,3 – 37,7)	0,22

Ergebnisse

Ø Anzahl systemischer Erkrankungen		1,86 ± 1,67 (0 – 7)	2,05 ± 2,02 (0 – 9)	0,86
Ø Anzahl regelmäßig eingenommener Medikamente		1,89 ± 2,71 (0 – 13)	1,95 ± 2,98 (0 – 13)	0,82
NRS		0,43 ± 0,62 (0 – 2)	0,67 ± 0,92 (0 – 3)	0,4
SF-36	KöFu:	63	71,3	0,11
	KöRo:	41,5	49,4	0,3
	Schmerz:	43,3	50,5	0,2
	Vitalität:	59,8	52,6	0,16
	SoFu:	90,9	92,7	0,34
	EmRo:	85,4	77,1	0,61
	Psyche:	81	78,6	0,37
	AGes:	70,6	70,6	0,74
Gesamt		42	42	

Zusätzliche Erklärungen: NRS = Nutritional Risk Score; SF-36 = Short Form 36 Items; KöFu = Körperliche Funktionsfähigkeit; KöRo = Körperliche Funktionsfähigkeit; EmRo = Emotionale Rollenfunktion; AGes = Allgemeine Gesundheit. Mann-Whitney-Test zur Berechnung der p-Werte.

4.2.3 Verteilung an die aufnehmenden Fachabteilungen unterscheidet sich zwischen Rauchern und Nichtrauchern

Da zwischen verschiedenen Fachabteilungen unterschiedliche Komplikationsraten bestehen, wurde beim Gruppenausgleich, Raucher und Nichtraucher, versucht, ein ähnliches Verhältnis der aufnehmenden Fachabteilungen zwischen den Gruppen herzustellen. Wie Abb. 19 zeigt, kam der Hauptteil der Patienten aus der Endoprothetik, da hier die Neigung zu postoperativen Komplikationen (wie in Ehnert *et al.* 2019 [17]) einen besonderen Stellenwert für Patienten, Gesundheitssystem und Wirtschaft besitzt, der objektiver erscheint als die teils sehr verschiedenen Trauma- und septischen Operationen. Zwischen den Hauptgruppen Nichtraucher versus Raucher waren die Verteilungen größtenteils ausgeglichen. Bei den Rauchern gab es einige Arthroscopien (R: 12; NR: 5) mehr und einige Gelenkersatzoperationen (Endoprothetik) (R: 16; NR: 21) weniger als bei den Nichtrauchern.

Innerhalb der Raucher existieren bei der weiteren Differenzierung zwischen moderaten und starken Rauchern größere Unterschiede. Bei den moderaten Rauchern waren deutlich mehr Arthroscopien ($N_{\text{Arthroscopie}} = 8$) statt endoprothetischen Operationen ($N_{\text{Endoprothetik}} = 3$) zu finden als bei den starken Rauchern ($N_{\text{Arthroscopie}} = 4$; $N_{\text{Endoprothetik}} = 13$). Während moderate Raucher außerdem mehr aus der Traumatologie ($N_{\text{Traumatologie}} = 3$) kamen, stammten mehr starke Raucher auch aus kleineren Fächern der BG Unfallklinik, die unter „Sonstiges“ zusammengefasst wurden ($N_{\text{Sonstige}} = 3$).

Ergebnisse

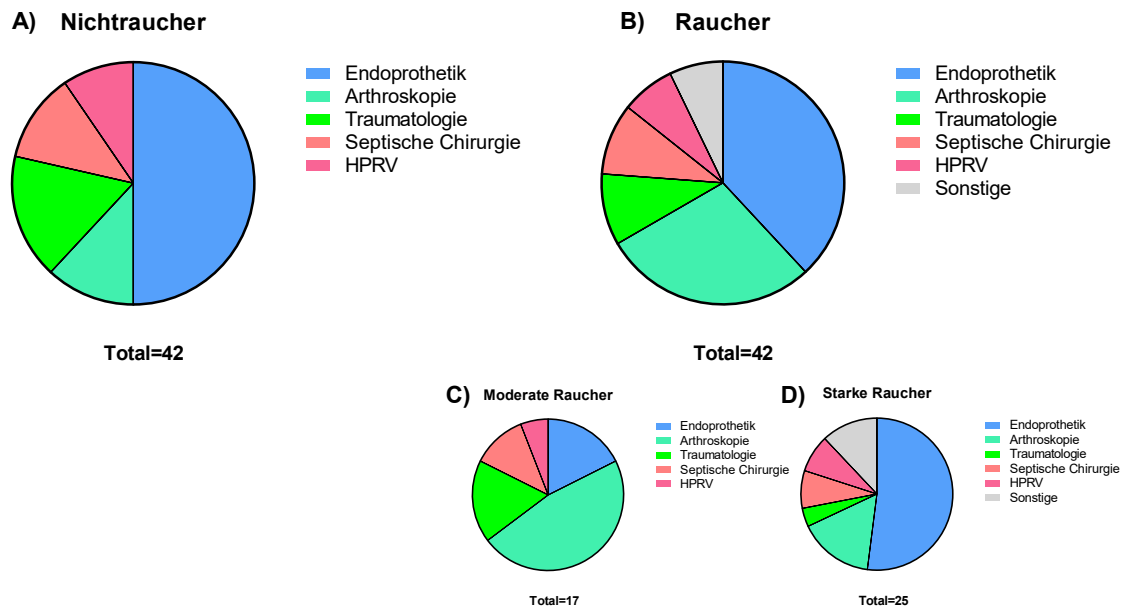


Abbildung 19: Verteilung der Probanden an die Fachabteilungen. C) und D) zeigen die Aufteilung der Raucher in moderate und starke Raucher. HPRV = Hand-, Plastische, Rekonstruktive, Verbrennungschirurgie. Sonstige = Wirbelsäulenchirurgie, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie.

4.3 qPCR - *PADI4* mRNA Expression ist bei Rauchern erhöht

Das primäre Ziel dieser Studie war es, die neutrophile *PADI4* Expression von Rauchern und Nichtrauchern zu vergleichen. Die Auswertung im Gruppenvergleich zeigt eine signifikant höhere relative *PADI4* Expression ($p = 0,04$) in Neutrophilen von starken Rauchern (>20 PY) gegenüber Nichtrauchern. Auch wenn keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gesamtheit an Rauchern bzw. milden Rauchern gegenüber Nichtrauchern festgestellt wurden, sind die Tendenzen des höheren *PADI4* eindeutig zu erkennen ($p = 0,06$). Die Korrelationsanalyse ergibt eine positive Korrelation zwischen den gerauchten PYs und der relativen *PADI4* Expression (Steigung = 0,05), wobei Spearman $r = 0,35$ signifikant ($p = 0,02$) ist. Diese Daten verdeutlichen, dass Rauchen einen Risikofaktor für erhöhte neutrophile *PADI4* Expression darstellt.

Ergebnisse

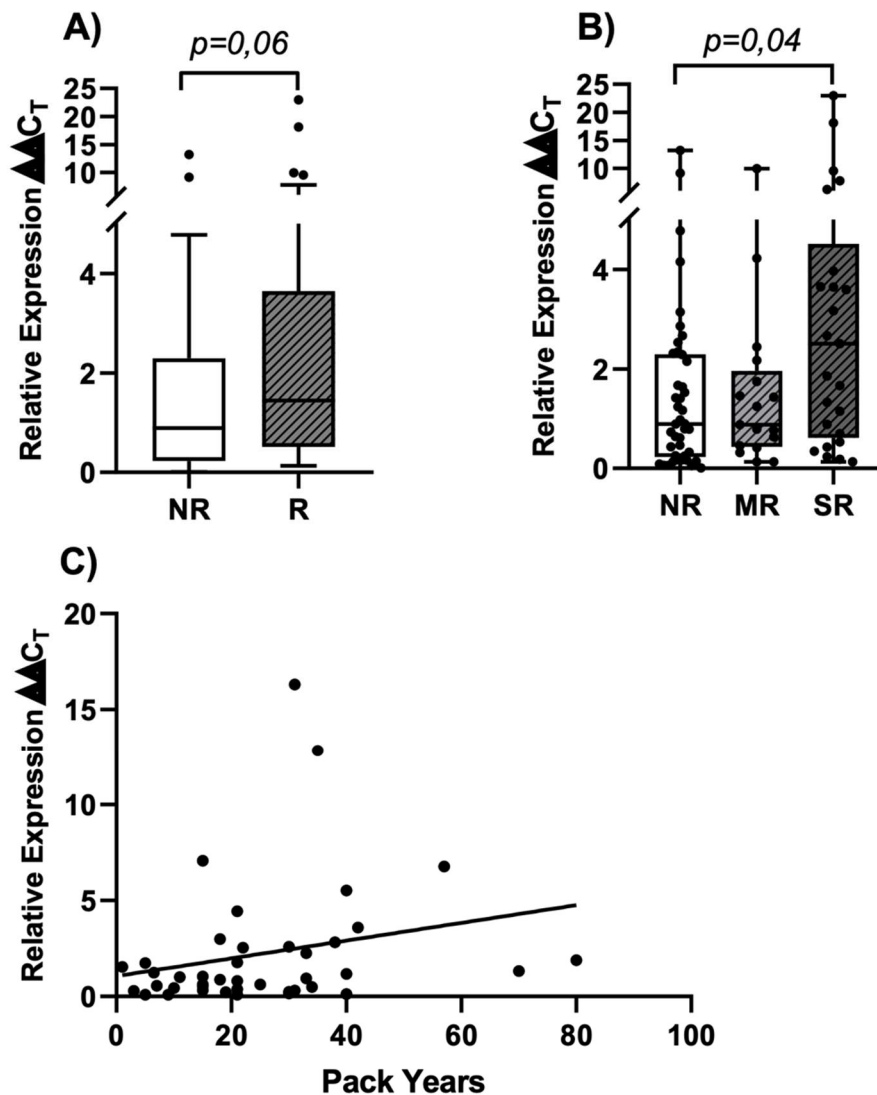


Abbildung 20: A) & B): Relative PADI4 mRNA Expression im Gruppenvergleichen: NR = Nichtraucher (N = 42), R = Raucher (N = 42). Wilcoxon Test. MR = Moderate Raucher (N = 17); SR = Starke Raucher (N = 25). Kruskal-Wallis Test. C) Korrelationsanalyse innerhalb der Rauchergruppe: Pack Years gegen relative mRNA-Expression von PAD4 (N = 42). Spearman $r = 0,35$, $p = 0,02$, Steigung = 0,05.

4.4 DotBlot - Relative PAD4 Protein Expression zeigt keine Unterschiede im Gruppenvergleich

Zur Komplettierung der Expressionsanalyse von *PADI4* wurden ebenfalls die relativen PAD4 Protein Spiegel der Neutrophilen mittels Dot Blot ermittelt. Bei der Detektion der relativen PAD4 Protein Spiegel ergaben sich einige Probleme mit sehr schwachen Signalen und hohem Hintergrundsignal, die dazu führten, dass die Blots einige Male wiederholt werden mussten und dies niedrig konzentrierte RIPA-Proteinproben aufbrauchte. Zudem zeigte sich durch Hämolyse einiger Proben eine fälschliche Reaktion des Hämoglobins mit der ECL-Lösung, sodass diese Proben nicht in das Endergebnis einfließen. So kam es zum Verlust einiger

Ergebnisse

Proben. Insgesamt zeigen die Dot Blot Daten, dass es keinen nennenswerten Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern in der neutrophilen Proteinexpression von PAD4 gab. Auch die Korrelationsanalyse mittels Spearman Rho ergab innerhalb der Raucher keine signifikante Korrelation der gerauchten PYs und der relativen PAD4 Proteinexpression.

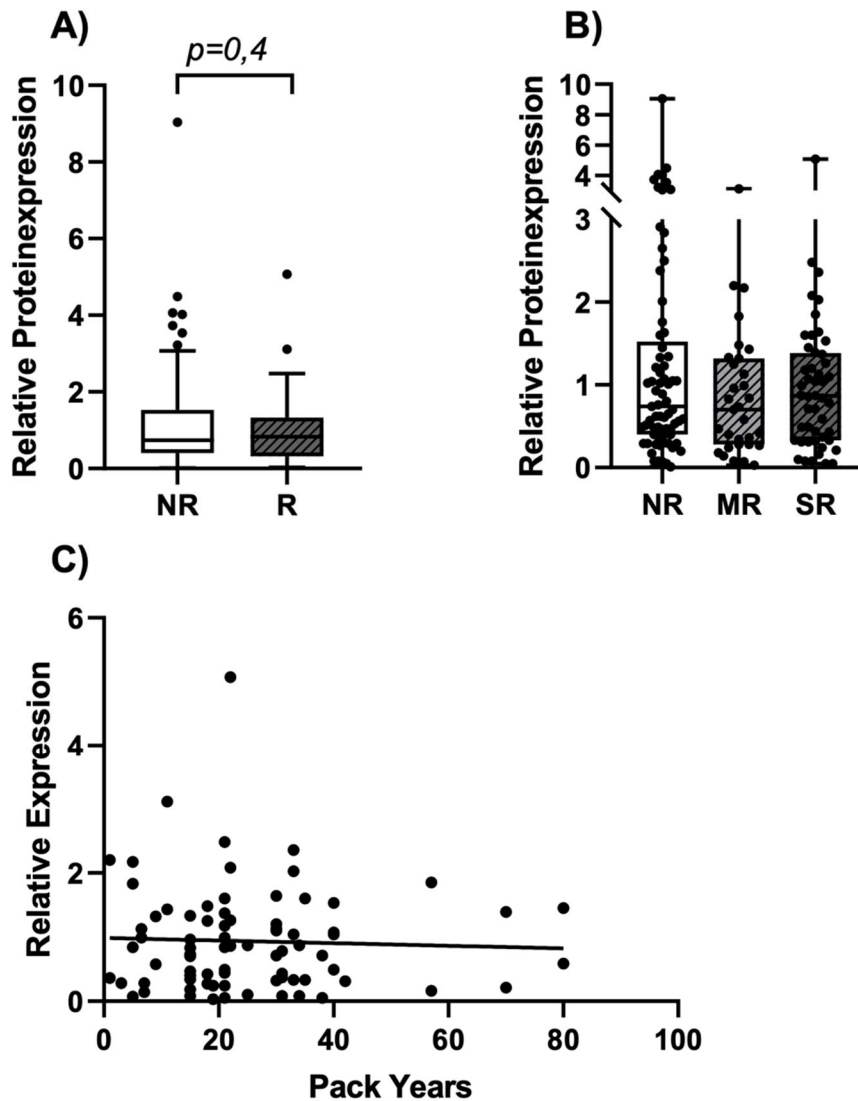


Abbildung 21: A) & B): Relative PAD4 Protein-Expression im Dot Blot im Gruppenvergleich. NR = Nichtraucher (N = 40, n = 2); R = Raucher (N = 40). MR = Moderate Raucher (N = 16, n = 2); SR = Starke Raucher (N = 24, n = 2). Kruskal-Wallis Test. C) Korrelationsanalyse innerhalb der Rauchgruppe: Pack Years gegen relative Protein Expression von PAD4 (N = 40, n = 2). Spearman $r = -0,0036$, $p = 0,97$, Steigung = $-0,009$.

Ergebnisse

4.5 Mehr postoperative Komplikationen bei Rauchern – keine Verbindung zur *PADI4* Expression erkennbar

Die sekundäre These der Studie basiert auf der Arbeit von Wong *et al.* 2015 [3] die zeigte, dass eine erhöhte *PADI4* Expression in diabetischen Wunden mit verschlechterter Wundheilung korreliert. Um zu untersuchen, ob ein ähnlicher Zusammenhang bei Rauchern besteht, wurden die Verlaufsuntersuchungen im Kliniksystem bis 12 Monate nach ihrer Operation in der BGU Tübingen kontrolliert und 6 Monate postoperativ ein Follow Up Telefonat u.a. zur Komplikationserfassung geführt. 14 von 84 eingeschlossenen Probanden (16,7 %) entwickelten innerhalb von 12 Monaten nach ihrer OP eine Komplikation entsprechend der oben genannten Definition. Kombinationen von Komplikationen, wie im Venn-Diagramm unter Abbildung 22 D) gezeigt, waren üblich. Am häufigsten war die Kombination aus einer Infektion, Wundheilungsstörung und konsekutiven Folgeoperation zur Sanierung (N = 6). Abb. 22 A) zeigt, dass Probanden mit einer postoperativen Komplikation eine diskret höhere relative *PADI4* mRNA Expression im Vergleich zu Probanden ohne Komplikation aufwiesen. Wenn man Abb. 22 B) und Tabelle 11 hinzuzieht, erkennt man, dass von 14 Komplikationen 11 betroffene Probanden von den 42 Rauchern (26,2 % der Raucher) stammten. Bei den Nichtrauchern waren es gerade einmal 3 von 42 (7,1 % der Nichtraucher). Das Odd's Ratio betrug 4,61. Abb. 22 C) zeigt, dass die relative *PADI4* mRNA Expression bei Rauchern und Nichtrauchern mit Komplikationen nur marginal erhöht war im Vergleich zu Rauchern und Nichtrauchern ohne Komplikation. Dahingegen zeigten abermals Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern, scheinbar unabhängig von der Komplikationsentwicklung, eine deutlich höhere *PADI4* Expression.

Tabelle 11: Quotenverhältnisse des Rauchstatus zur Komplikationsentwicklung. In Klammern kursiv stehen die Prozentwerte. Odd's Ratio = 4.61. Contingency Test.

84 Probanden (100 %)	Raucher	Nichtraucher	Gesamt
Mit Komplikation	11 (13,1 %)	3 (3,6 %)	14
Ohne Komplikation	31 (36,9 %)	39 (46,4 %)	70
Gesamt	42	42	Odd's Ratio: 4,61

Ergebnisse

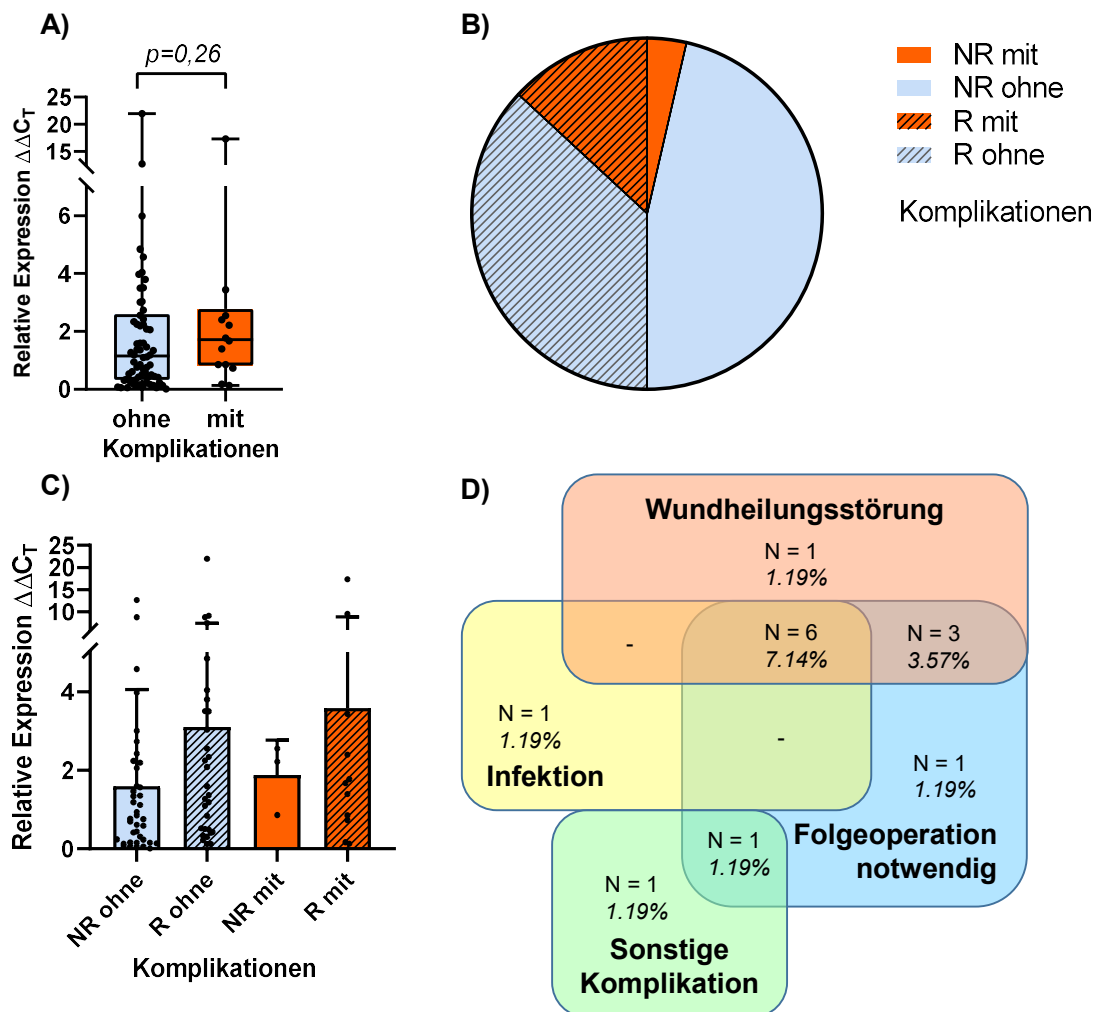


Abbildung 22: Postoperative Komplikationen: A) Relative *PADI4* mRNA Expression von Patienten mit ($N = 14$) und ohne ($N = 70$) Komplikationsentwicklung. Mann-Whitney Test. B) Kuchendiagramm mit Anteilen der Raucher (= R) und Nichtraucher (= NR) mit und ohne Komplikation (R mit: $N = 11$; NR mit: $N = 3$; R ohne: $N = 31$; NR ohne: $N = 39$) an der gesamten Population ($N = 84$). C) Säulendiagramm mit relativer *PADI4* mRNA Expression zwischen Rauchern und Nichtrauchern mit und ohne Komplikation. 2way Anova Analyse. D) Venn-Diagramm zur näheren Beschreibung der Komplikationen. In Klammern kursiv die Anteile der jeweiligen Komplikationen an der Gesamtpopulation.

4.6 Subgruppenanalysen

4.6.1 Ehemalige Raucher haben keine erhöhte *PADI4* Expression

Viele Publikationen, wie auch Ehnert *et al.* 2019 [17], zeigten, dass es bezüglich vieler Risiken, wie dem der postoperativen Komplikationsentwicklung, keine Unterschiede zwischen aktuellen und ehemaligen Rauchern gibt. Dementsprechend wurden in dieser Studie die ehemaligen mit den aktuellen Rauchern zur großen Gruppe der Raucher zusammengefasst. Wie Abb. 23 jedoch zeigt, scheinen ehemalige Raucher sich in Bezug auf die neutrophile *PADI4* Expression eher den Nichtrauchern anzunähern. Von den hier extra dargestellten ehemaligen Rauchern stammten 7 von den moderaten Rauchern

Ergebnisse

(1-20 PY) und 6 von den starken Rauchern (> 20 PY). Auch wenn der gezeigte Unterschied nicht signifikant ist, ist die Tendenz deutlich. Ehemalige Raucher als eigene Gruppe zu betrachten, vernachlässigt das Matching zu den anderen Gruppen. Also können hier andere Faktoren, wie Alter, BMI, Erkrankungen, etc. ebenfalls eine Rolle spielen. Die Raucher waren im Schnitt 3,2 Jahre älter, hatten einen um etwa $1 \frac{\text{kg}}{\text{m}^2}$ niedrigeren BMI, 0,5 Krankheiten weniger und nahmen ca. 0,9 Medikamente weniger ein als die 13 ehemaligen Raucher (männlich: 8, weiblich: 5). Dieses sekundäre Ergebnis zeigt, dass eine gesonderte Betrachtung ausschließlich aktueller Raucher mit ihren nichtrauchenden Matchingkontrollen sinnvoll scheint. Hier zeigt die Analyse über den Wilcoxon Test einen signifikanten Unterschied der *PADI4* mRNA Expression im Gruppenvergleich trotz deutlich niedrigerer Probandenzahl.

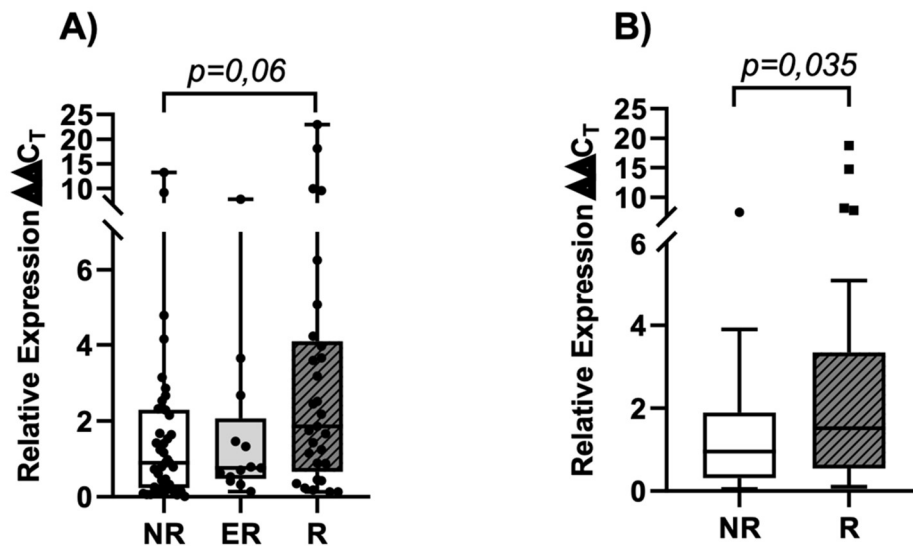


Abbildung 23: A) Relative neutrophile *PADI4* mRNA Expression in Bezug auf den aktuellen Rauchstatus. NR = Nichtraucher (N = 42); ER = Exraucher (N = 13); R = Raucher (N = 29). Kruskal-Wallis Test. B) *PADI4* mRNA Expression im Gruppenvergleich unter Ausschluss von ehemaligen Rauchern und deren Kontrollen. Matching in Auswertung beachtet. NR = Nichtraucher (N = 29); R = Raucher (N = 29). Wilcoxon Matched Pairs-Test.

4.6.2 Geschlechter zeigen keine wesentlichen Unterschiede bei der neutrophilen *PADI4* Expression

Das Geschlecht stellte nicht nur ein Matchingkriterium dar, sondern spielt auch bei der Entwicklung von Wundheilungsstörungen auf der einen Seite und der Prävalenz von Autoimmunerkrankungen auf der anderen Seite eine wichtige Rolle [17, 327, 328]. Grundsätzlich ist ein möglicher Einfluss des Geschlechts beim Hauptgruppenvergleich Nichtraucher gegen Raucher hier zu

Ergebnisse

vernachlässigen, da in beiden Gruppen wegen des Matchings genau gleich verteilt wurde. Bei der Differenzierung der Raucher in moderate und starke Raucher fällt auf, dass mehr Frauen in den moderaten und mehr Männer bei den starken Rauchern zu finden sind. Darüber hinaus zeigte sich allerdings im Geschlechtervergleich insbesondere bezüglich der relativen *PADI4* mRNA Expression keinen Unterschied.

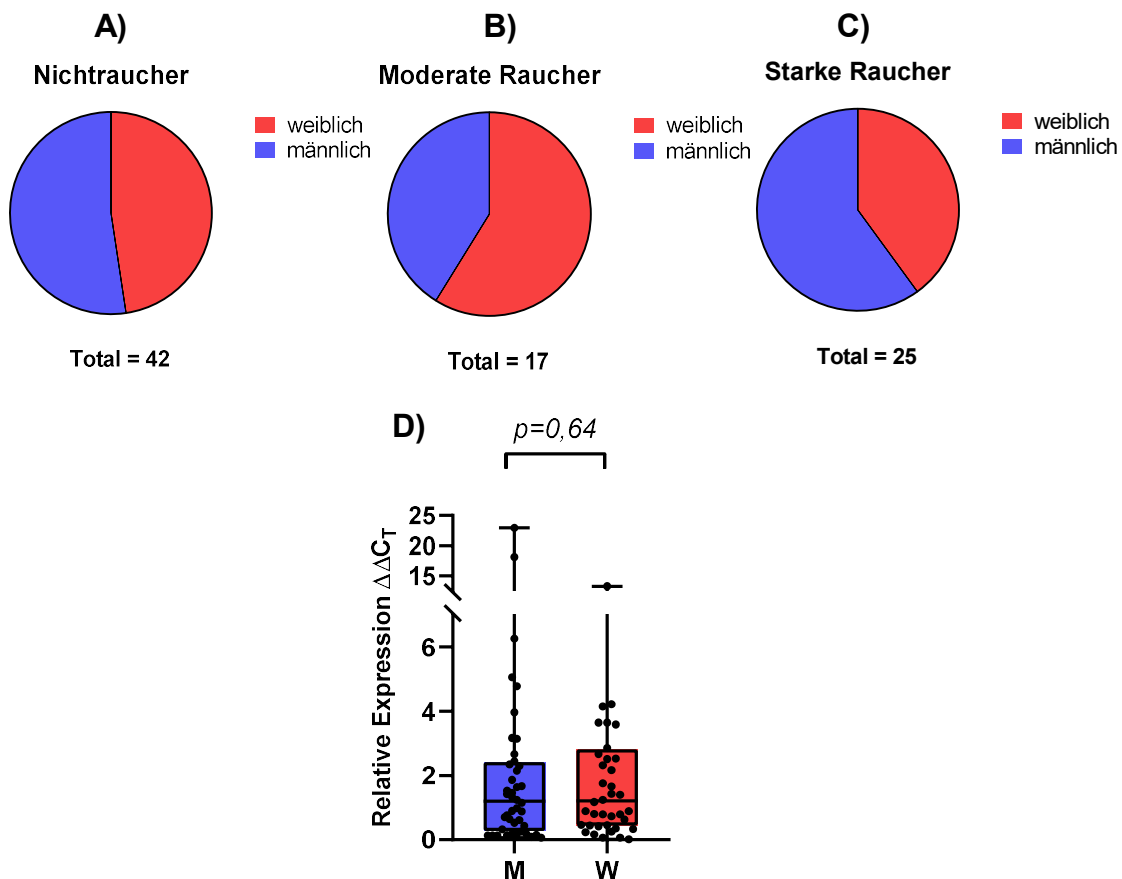


Abbildung 24: A) - C) zeigen die Verteilung der Geschlechter im detaillierten Gruppenvergleich. Die Gesamtgruppe der Raucher haben dieselbe Geschlechterverteilung wie Nichtraucher (Weiblich: N = 20; Männlich: N = 22). M = männlich (N = 44), W = weiblich (N = 40). D) *PADI4* mRNA Expression im Geschlechtervergleich. M: Männlich (N = 44). W: Weiblich (N = 40). Mann-Whitney Test.

4.6.3 Ältere haben häufiger erhöhte *PAD4* Expression

Das Alter eines Patienten spielt allgemein in der Gesundheitsversorgung und speziell auch beim Risiko einer postoperativen Komplikationsentwicklung eine große Rolle [17, 329-332]. Umso auffälliger ist der mittlere Altersunterschied der Subgruppe der moderaten Raucher zu den starken Rauchern sowie Nichtrauchern (ca. 6-7 Jahre). Aus diesem Grund erscheint eine Analyse der relativen *PADI4* mRNA Expression in Abhängigkeit vom Alter sinnvoll. Hier zeigen der Altersgruppenvergleich und die Korrelationsanalyse, dass ein

Ergebnisse

diskreter, aber nicht signifikanter Zusammenhang zwischen diesen beiden Faktoren besteht. Die Korrelationsanalyse in Abb. 25 B) zeigt zudem auf, dass die meisten überdurchschnittlich hohen *PADI4* $\Delta\Delta C_t$ -Werte bei Patienten im höheren Alter ab 50 Jahren gemessen wurden. Die ermittelte Korrelationsstärke (Steigung, Spearman r) war jedoch nicht signifikant, da auch bei älteren Patienten niedrige *PADI4* Werte häufiger sind als hohe.

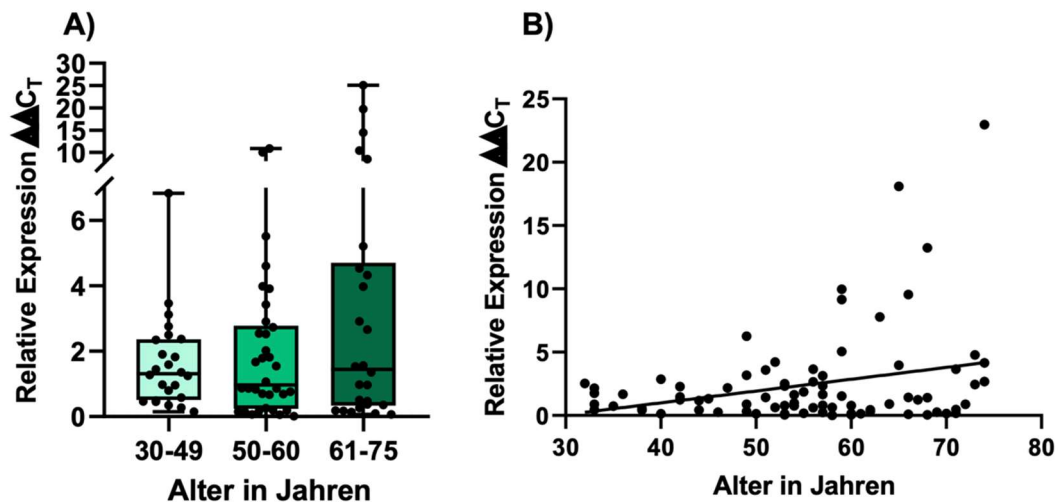


Abbildung 25: Zusammenhang des Alters mit der relativen *PADI4* mRNA Expression. A) Boxplot mit altersabhängigen Gruppen: 30-49 Jahre: $N = 24$; 50-60 Jahre: $N = 36$; 61-75 Jahre: $N = 26$. Kruskal-Wallis Test. B) Korrelationsanalyse Alter gegen relative mRNA-Expression von *PADI4* ($N = 84$). Spearman $r = 0,09$, $p = 0,43$, Steigung = $0,093$.

4.6.4 Umgekehrte Korrelation des BMI mit der *PADI4* Expression

Der Body Mass Index (BMI) als Maß von Über- oder Untergewicht stellte in dieser Studie ebenfalls ein Matchingkriterium dar und hat, wie das Alter auch, einen wichtigen Einfluss auf die Morbidität eines Patienten. Insofern wurde auf einen möglichen Zusammenhang zwischen BMI und der relativen *PADI4* mRNA Expression geschaut. Wie man in Abb. 26 A) erkennt, zeigt sich ein Trend von höheren relativen Expressionen des Enzyms mit niedrigerem BMI ($20-25,9$ vs. >30 $\frac{kg}{m^2}$): $p = 0,48$). Zusätzlich fiel durch Abb. 26 B) auf, dass Raucher mit mehr PYs), also höherer Rauchbelastung, tendenziell einen niedrigeren BMI aufwiesen. Diese Zusammenhänge waren jedoch nicht signifikant.

Ergebnisse

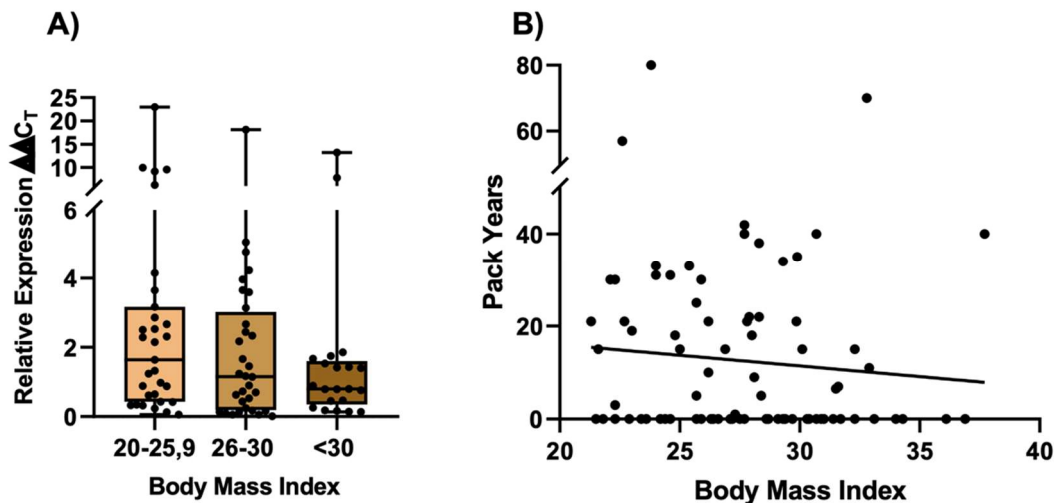


Abbildung 26: A) Abhängigkeit der relativen *PADI4* mRNA Expression vom Body Mass Index (BMI) der Probanden. Einheit des BMI: kg/m^2 . 20-25,9: $N = 31$; 26-30: $N = 32$; >30: $N = 21$. Kruskal-Wallis Test B) Korrelationsanalyse BMI gegen gerauchte PY ($N = 84$). Spearman $r = -0.13$, $p = 0,23$, Steigung = $-0,46$.

4.6.5 Höhere *PADI4* Expression bei kardiovaskulärer und allgemeiner Multimorbidität

Multimorbidität spielt ohne Zweifel für das Gesundheitssystem und die Disposition für weitere Erkrankungen wie Wundheilungsstörungen und Infektionen eine große Rolle [283, 333]. Zudem wiesen die rauchenden Probanden, speziell die starken Raucher (>20 PY, siehe Anhang), verglichen mit allen Nichtrauchern mehr systemische Erkrankungen auf und nahmen mehr systemische Medikamente regelmäßig ein. Diese beiden Faktoren werden hier als allgemeine Indikatoren der Multimorbidität gewertet. Insofern ist eine Auswertung der relativen *PADI4* mRNA Expression in Abhängigkeit der Morbidität (Anzahl der Erkrankungen und Medikamente), wie in Abb. 27 A) und B), interessant.

Die Daten zeigen einen gewissen positiven Zusammenhang zwischen der Morbidität und den *PADI4* mRNA Spiegeln, insbesondere bei den Probanden mit mehr als 4 Erkrankungen und Medikamenten. Multimorbide Patienten (Definition in dieser Studie: Probanden mit >4 systemischen Erkrankungen) scheinen also eine höhere *PADI4* Expression in Neutrophilen aufzuweisen. Schlüsselt man multimorbide Probanden weiter in Raucher und Nichtraucher auf, so fällt auf, dass hohe *PADI4* Werte vor allem durch rauchende Multimorbide verursacht wurden und weniger durch Nichtraucher (Abb. 27 C).

Ergebnisse

Wie im Hintergrund zu Krankheiten mit PAD4 Beteiligung in Tabelle 4 gezeigt, spielt das Enzym auch bei der Pathogenese von Atherosklerose eine Rolle. Daher wurden die kardiovaskulär Vorgeschädigten (mit koronarer Herzkrankheit, Z.n. Herzinfarkt, Herzinsuffizienz oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit; reine arterielle Hypertonie wurde nicht gewertet) mit der Restpopulation in der relativen *PADI4* mRNA Expression verglichen. Kardiovaskulär vorgeschädigte Probanden (N = 10) hatten signifikant höhere *PADI4* $\Delta\Delta C_t$ Werte als die Restpopulation (Abb. 27 D). Auch bei dieser näheren Differenzierung der kardiovaskulär Vorgeschädigten fiel auf, dass Raucher die Mehrheit der hohen *PADI4* Expressionen ausmachten (Abb. 27 E).

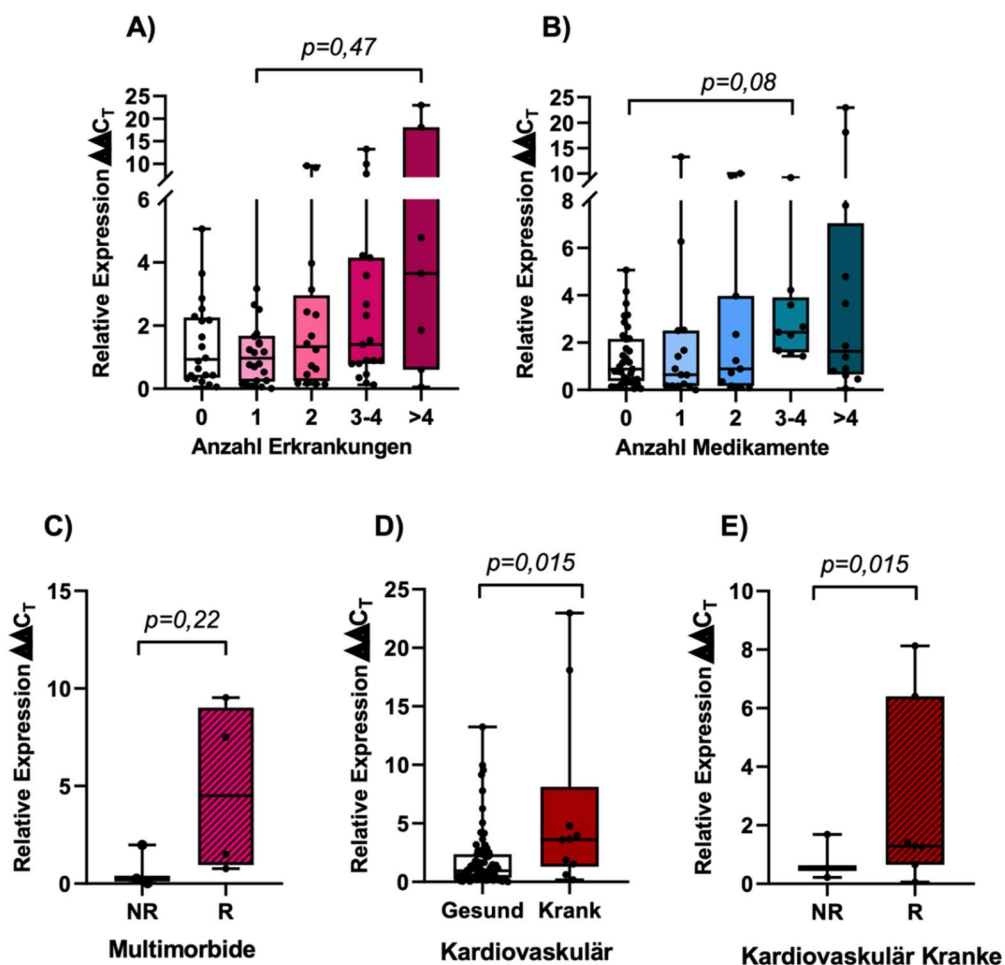


Abbildung 27: Abhängigkeit der relativen *PADI4* mRNA Expression von der Anzahl der A) systemischen Erkrankungen und B) systemischen Medikamente der Probanden. A) Kruskal-Wallis Test. C) Aufschlüsselung der Multimorbiden (Probanden mit >4 systemischen Erkrankungen) in Raucher (R: N = 4) und Nichtraucher (NR: N = 3) und Abhängigkeit zur relativen *PADI4* mRNA Expression. Mann-Whitney Test. D) Abhängigkeit der relativen *PADI4* mRNA Expression von kardiovaskulären Vorschäden (reine arterielle Hypertonie nicht inbegriffen). Gesund: N = 74, Krank: N = 10. Mann-Whitney Test. E) Aufschlüsselung der kardiovaskulär Vorgeschädigten in Nichtraucher (NR: N = 3) und Raucher (R: N = 7). Mann-Whitney Test.

Ergebnisse

4.6.6 Mehr Malnutrition bei Komplikationsverläufen und Rauchern

Das Nutritional Risk Screening/Score wurde als Instrument zur Detektion von Mangelernährung bereits vielfach in Hinblick auf den klinischen Outcome von Patienten getestet. Je höher dieser ausfällt, desto höher das Risiko für prognostisch ungünstige Mangelernährung [17, 334, 335]. Aufgrund seiner Aussagekraft auch in Bezug auf das Risiko einer Komplikationsentwicklung nach orthopädischen Operationen [17, 336], wurde das NRS auch in dieser Studie miterfasst (siehe Anhang Abb. 31).

Wie Abb. 28 A) und B) zeigen, fand sich sowohl bei Patienten mit Komplikationen (\bar{x} mit Komplikation: 0,86 \leftrightarrow \bar{x} ohne Komplikation: 0,49) als auch bei Rauchern (\bar{x} R: 0,66 \leftrightarrow \bar{x} NR: 0,42) ein höherer durchschnittlicher NRS und somit ein erhöhtes Risiko für eine Mangelernährung in diesen Gruppen.

Weiterhin zeigt Abb. 28 C), dass durchaus ein Trend von höheren *PADI4* $\Delta\Delta C_t$ Werten bei höherem NRS zu sehen ist, insbesondere bei einem NRS ab 2. In dieser Studiengruppe schienen also durch Mangelernährung gefährdete Patienten auch hoch-/dysregulierte *PADI4* Expression in Neutrophilen (mit dem entsprechenden immunologischen Risiko) aufzuweisen.

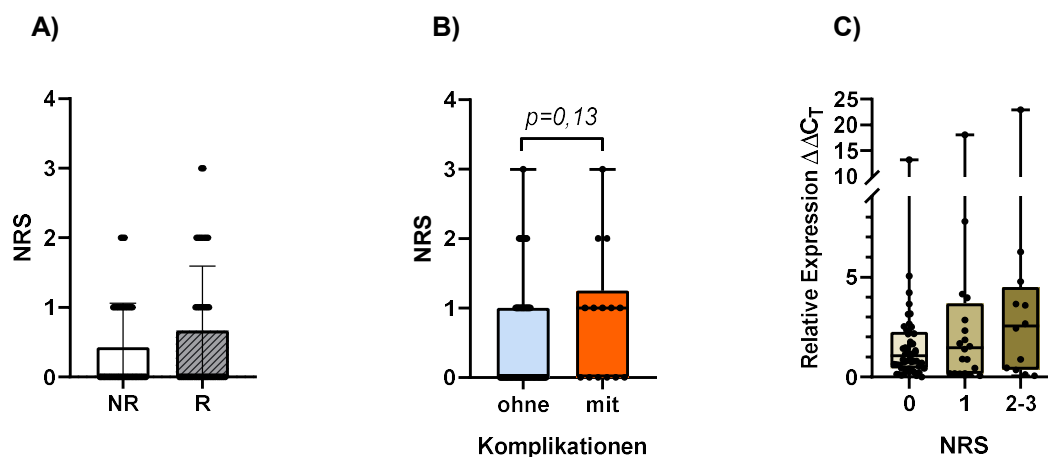


Abbildung 28: A) Scatter dot plot: Nutritional Risk Screening (NRS) im Gruppenvergleich. NR = Nichtraucher (N = 42); R = Raucher (N = 42). Mann-Whitney Test. B) Boxplot: NRS in Abhängigkeit zur Komplikationsentwicklung. Mit Komplikation (N = 14), Ohne Komplikation (N = 70). Mann-Whitney Test. C) Boxplot: Abhängigkeit der relativen *PADI4* mRNA Expression vom NRS. 0: N = 52; 1: N = 20; 2-3: N = 12. Kruskal-Wallis Test.

5. Diskussion

Klinisch chirurgische Relevanz erhielt PAD4 vor allem durch die Assoziation beim Diabetiker mit verzögerter Wundheilung und Entstehung chronischer Wunden [3, 113]. Aufgrund der Analogie von Immunveränderungen der Raucher zu Diabetikern, wurde hier die Verbindung des Rauchens zu PAD4 weiter untersucht und darüber hinaus ein möglicher Zusammenhang zu postoperativen Komplikationen, analog zu Wong *et al.* 2015 und Ehnert *et al.* 2019, getestet [3, 17].

5.1 Einflussfaktoren auf die *PADI4* Expression

Trotz der zahlreichen Berichte über die Gefahren einer Dysregulation von PAD4 und konsekutiv der NETose, ist wenig über die Ursachen dieser PAD4 Störungen bekannt [112, 232, 235, 251, 337]. Speziell bei Nikotinabusus assoziierten Pathologien finden sich auffällig viele Ähnlichkeiten mit so genannten NETopathien (siehe Tabelle 2, Kapitel 1.2.4). Da bereits für Diabetiker ein ähnlicher immunologischer Zusammenhang hinsichtlich PAD4, NETose und Wundheilung gefunden wurde, war es das Ziel dieser Studie, die große Risikogruppe der Raucher ebenfalls auf ihre PAD4 Expression zu untersuchen [3, 17, 113]. Die Identifikation von Einflussfaktoren auf die PAD4 Expression/Dysregulation ist auch über diese Studie hinaus aus verschiedenen pathogenetischen und potenziell therapeutischen Gründen für assoziierten Krankheiten (Tabelle 2 & 3) relevant.

Die in der qPCR ermittelten relativen *PADI4* mRNA Expressionen in den untersuchten 84 Probanden ergaben eine große Streuung, was vermuten lässt, dass dieses Enzym eine vielseitig beeinflusste Stellschraube im neutrophilen Granulozyten darstellt. Besonders bei starker Rauchbelastung lagen hochregulierte *PADI4* mRNA Spiegel vor, was zeigt, dass Nikotinabusus direkt oder indirekt Einfluss auf die Regulation dieses Schlüsselenzyms hat. Dieses Erkenntnis deckt sich mit bisherigen Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass Nikotin ein starker Induktor der NETose in einem PAD4 abhängigen Muster ist [217]. Aufgrund der Heterogenität auch innerhalb der starken Raucher ist eine lineare direkte Verbindung unwahrscheinlich. Vermittelnde Effekte könnten dabei jedoch eine Rolle spielen, bspw. dass Rauchen bei einigen Menschen einen

Diskussion

gewissen Effekt (z.B. Endothelentzündung bei kardiovaskulärer Schädigung und konsekutiver Aktivierung von Neutrophilen (vergleiche Abb. 28 D)) auslöst und dieser dann direkt die *PADI4* Expression bedingt [225, 338]. Eine weitere Erklärung für die stark unterschiedlichen Spiegel wäre, dass eine genetische Disposition benötigt wird und dann durch schädigende exogene Einflüsse, wie dem Rauchen, im Sinne eines Two-Hit-Modells, es zu einer starken Dysregulation des Enzyms kommt, welche durchaus pathogen sein kann (siehe Tabelle 3). Dafür spricht die Assoziation besonders hoher PAD4 Spiegel mit einer wachsenden Bandbreite bestimmter ‚single nucleotide polymorphisms‘ (= SNPs) [339]. Auf diese Weise könnten Risikopatienten über SNP-Analyse in Hinblick auf PAD4 assoziierte Pathologien (siehe Tabelle 3) identifiziert werden. Zusammenfassend bedarf es hier sicherlich noch einiges an Aufklärungsarbeit, um genaue Regulationen zu verstehen. Die Identifikation von Risikogruppen, wie den Diabetikern und Rauchern ist dennoch klinisch vorerst die relevantere Aufgabe. Wahrscheinliche Einflüsse, die in den Ergebnissen gezeigt wurden, werden im Folgenden diskutiert.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Gruppenkollektiv und qPCR Daten

Der Vergleich der Hauptgruppen zeigte durch ein erfolgreiches Matching keine größeren Unterschiede in den dargestellten Charakteristika, sodass beim Vergleich der relativen *PADI4* mRNA Expression dieser beiden Gruppen Einflussfaktoren minimiert wurden und von einem validen Ergebnis ausgegangen werden kann (siehe Tabelle 10). Raucher haben also eine erhöhte *PADI4* Expression in neutrophilen Granulozyten. Ein signifikanter Bezug zur postoperativen Komplikationsentwicklung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Abb. 20 B) zeigt, dass hauptsächlich die starken Raucher (>20 PY) die hohen *PADI4* mRNA $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte ausmachten. Daher scheint ein Blick auf die Charakteristika von moderaten gegenüber starken Rauchern im Vergleich sinnvoll (siehe Tabelle 16 im Anhang).

Hier ist der Altersunterschied sehr prominent. Moderate Raucher waren deutlich jünger als die beiden anderen Gruppen. Dies wurde bereits in Ehnert *et al.* 2019 beobachtet, dass rauchende Patienten mit ähnlichen Erkrankungen aber

Diskussion

aufgrund schlechterer Knochenqualität und -heilung im Schnitt ca. 5 Jahre früher behandelt wurden als die nichtrauchende Kontrollgruppe [17, 340]. Der hier entdeckte Altersunterschied kann für eine diskrete Differenz in einigen weiteren Kategorien verantwortlich gemacht werden: Dem Geschlecht (die meisten starken Raucher sind männlich [6]), der Anzahl von Erkrankungen und Medikamenten (Ältere haben mehr Erkrankungen) und der Verteilung an die entsprechenden Fachrichtungen (Ältere bekommen mehr Gelenkersatzoperationen gegenüber Arthroskopien bei Jüngeren [341]) (Tabelle 16). Eine mögliche Erklärung für den Altersunterschied zwischen moderaten und starken Rauchern wäre, dass moderate Raucher durch persistierendes Rauchen im Laufe der Zeit 20 PYs erreichen werden und damit aus der Gruppe der moderaten Raucher zu den starken Rauchern übergehen. Mit zusätzlichen Jahren erhöhen sich gleichermaßen das Alter und die PYs. Dies kann das höhere Alter der starken Raucher erklären.

Die Kontrollen lagen in den meisten deskriptiven Charakteristika zwischen den moderaten und starken Rauchern. Eine logische Erklärung ist die Mischung von Matching Partnern von moderaten und starken Rauchern in eine gemeinsame Gruppe. Ein Matching Partner eines starken Rauchers wies normalerweise immer noch ein höheres Alter und damit etwas mehr Krankheiten und Medikamente auf als ein moderater Raucher. Auffällig ist ebenfalls, dass, obwohl die moderaten Raucher durchschnittlich 5 Jahre jünger waren als die nichtrauchenden Kontrollen, sie bereits eine annähernd gleiche Anzahl an Erkrankungen aufwiesen – im Schnitt auch mehr als ihre direkten Matching Partner. Diese Erkenntnis bestätigt ebenfalls vorherige Ergebnisse aus Ehnert *et al.* 2019, bei denen die durchschnittlich 5 Jahre jüngeren Raucher bereits gleich viele Erkrankungen aufwiesen als die älteren Kontrollen [17].

Auch in Bezug auf die Operationsindikationen und -arten ergaben sich durch den Altersunterschied Differenzen: Bei moderaten Rauchern gab es weniger Endoprothetik-(Gelenkersatz-) Patienten als bei den älteren Kontrollen und starken Rauchern. Ebenfalls passend zum Altersunterschied fanden sich bei moderaten Rauchern relativ gesehen deutlich mehr arthroskopische Operationen, die häufig endoprothetischen Eingriffen vorausgehen, als in den anderen beiden Gruppen. Das mittlere Alter bei Patienten der Endoprothetik war

Diskussion

61,7 Jahre versus 48,1 Jahre bei Patienten mit Arthroskopie. Traumatologische Patienten waren nochmal etwas jünger. Diese typischen Altersunterschiede sind aus der Literatur vorbekannt und logisch: Die Kohorte für Gelenkersatzoperationen war in Fang *et al.* 2015 im Mittel 60,5 Jahre und in Friberger Pajalic *et al.* 2018 für Arthroskopien sogar nur 39 Jahre alt [341, 342]. Die Konsequenz dieser Unterschiede ist, dass der Gruppenvergleich besonders hinsichtlich postoperativer Komplikationsentwicklung mit Differenzierung der Raucher in moderat und stark, trotz passendem Matchings vorsichtig zu betrachten ist. Gewisse Charakteristika, allen voran das Alter, waren natürlicherweise zu verschieden und nahmen so Einfluss.

Des Weiteren war die hohe Variation der ermittelten *PADI4* Werte auch zwischen Probanden mit ähnlichen Charakteristika auffällig. Die Korrelationsanalyse aus Abb. 20 C) zu PYs mit relativer *PADI4* mRNA Expression zeigt eine schwache Korrelation, hohe Variabilität und viele übermäßig hohe *PADI4* $\Delta\Delta\text{Ct}$ Werte bei steigenden PYs gegenüber einer mehrheitlichen Baseline. Diese Beobachtung lässt, wie weiter oben bereits beschrieben, auf eine multifaktorielle Beeinflussung der Regulation des Enzyms mit Beteiligung einer individuellen genetischen Disposition vermuten. Die Reviews von Rohrbach 2012 und Liu *et al.* 2021 und Tabelle 3 dieser Thesis zeigen auf molekularer (Calcium-Ionen, Bicarbonat, ROS, Ionomycin, etc.) und klinischer Ebene (RA, SLE, Diabetes, Sepsis, Thrombose, etc.) diverse Einflussfaktoren und Gefahren der PAD4 Regulation [225, 343]. Selbst auf genetischer Ebene konnten bereits PAD4 SNPs als Varianten bei einigen Individuen gefunden werden, die über Hypercitrullinierung durch PAD4 mit RA in Verbindung stehen [339, 344]. Die vorhin erwähnte Theorie einer genetischen Prädisposition mit Dekompensation durch exogene Noxen erscheint auf diese Weise wahrscheinlicher.

Abschließend lassen sich die hier gefundenen Ergebnisse der *PADI4* Erhöhung durch das Rauchen gut mit einigen Erkenntnissen aus der Literatur in Einklang bringen: So wurde an menschlichen peripheren Neutrophilen gezeigt, dass Nikotin dosis-korrelierend ROS-unabhängig, dafür aber Protein Kinase B und eben PAD4 abhängig NETs mit hypercitrullinierten Histonen bilden [217]. Des Weiteren hat eine PAD4 Inhibierung zuverlässig die NETose bei diversen Stimuli inklusive des Zigarettenrauchs verhindert [123]. So kommt auch die relevante

Diskussion

Verbindung des Rauchens zu den pathogenetisch viel diskutierten NETs und ihren NETopathien auf.

5.2.2 Dot Blot nicht aussagekräftig

Zur Komplettierung der Expressionsanalyse wurde neben der *PADI4* mRNA Quantifizierung auch die relativen PAD4 Proteinspiegel im Dot Blot ermittelt. Wie in Abb. 29 zu sehen, korrelierten selbst die beiden Replikate untereinander nicht miteinander. Das verdeutlicht, dass der Dot Blot, zumindest bei einem der beiden Durchläufe, wahrscheinlich methodische Schwierigkeiten enthielt, die die Ergebnisse einiger Proben auf Proteinebene eingeschränkt haben. Hierbei sei erwähnt, dass die Aufnahmen des 2. Durchlaufs tendenziell von besserer Qualität waren. In der Bildentwicklung fielen, wie in Abb. 30 B) zu sehen, teils schwache Signale mit hohen Hintergrundsignalen auf, insbesondere für die mehrfache Nutzung derselben Membranen für das Housekeeping Protein β -Actin. Die hier gezeigte Aufnahme der Chemilumineszenz nach Antikörperinkubation mit PAD4 fand stets als erste statt und war von deutlich besserer Qualität. Neben den hohen Hintergrundsignalen gaben einige Proben sehr intensive Signale ab, wobei von einer Reaktion des Hämoglobins mit der ECL-Lösung und somit falsch positiven Signalen ausgegangen werden kann. Diese u.a. forensisch genutzte Chemilumineszenz von Luminol, Wasserstoffperoxid und Hämoglobin ist proportional zur Menge der jeweiligen Komponenten und hat bei hämolytischen Proben in dieser Studie zu Ausreißern mit falsch hohen Signalen und verfälschten Ergebnissen geführt [345]. Deshalb wurden Proben mit einer Dot Intensität von mehr als der doppelten Standardabweichung nicht in die Auswertung eingeschlossen. Weitere Fehlerquellen für eben genannte Probleme könnten auch zu hohe Antikörperkonzentrationen, zu niedrige Antigenkonzentrationen bei relativ zu wenigem Waschen in TBS-T sein [346]. Zusätzlich kam es auf Proteinebene zum Probenverlust: Die mehrfache Adjustierung der Einstellungen des Verfahrens verbrauchte gewisse Mengen der Proben, die darüber hinaus teils niedrige Konzentrationen aufwiesen, sodass die Ladungsmenge der Proteine im Duplikat sehr begrenzt war (20 μ g pro Durchlauf). Bei einigen niedrigkonzentrierten Proben ergab sich nicht genug Volumen für das Duplikat. Auch die hämolysierten

Diskussion

Proben konnten aus oben genannten Gründen als verloren angesehen werden, da die PAD4-/ β -Actin-Signale überdeckt wurde und nicht isoliert messbar waren. Eben genannte Faktoren führten zu Ungenauigkeiten der Methode in dieser Studie. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die qPCR weitaus validere Ergebnisse lieferte. In der Literatur wurde außerdem beschrieben, dass höhere *PADI4* mRNA Spiegel auch eine höhere NETose Rate bedingen. Somit besitzt die ermittelte *PADI4* mRNA Überregulation bei Rauchern durchaus klinische Relevanz [347]. Aus diesen Gründen wurden die meisten Ergebnisse mit der relativen *PADI4* mRNA Expression dargestellt.

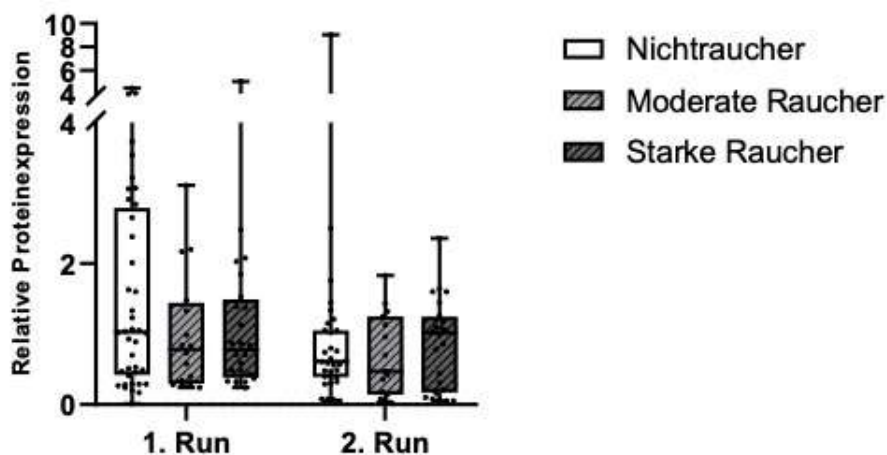


Abbildung 29: Gruppierter Boxplots der replizierten relativen *PAD4* Proteinexpression im 1. Durchlauf (= Run) ($N = 80$) und 2. Durchlauf ($N = 72$) des Dot Blots. Nichtraucher 1. Run: $N = 40$; 2. Run: $N = 36$. Moderate Raucher 1. Run: $N = 16$; 2. Run: $N = 14$. Starke Raucher 1. Run: $N = 24$; 2. Run: $N = 22$. Kruskal-Wallis Test.

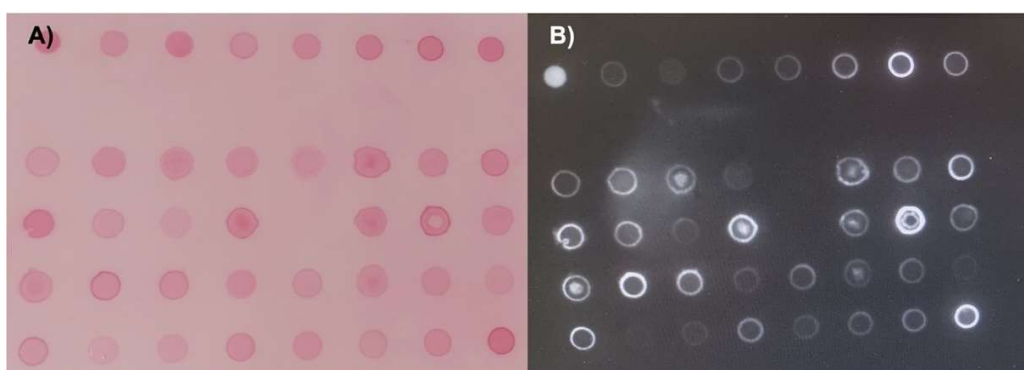


Abbildung 30: Aufnahmen der Dot Blots: A) In Ponceaufärbung zum qualitativen Nachweis von Proteinen. B) Repräsentative Fluoreszenzaufnahme nach Antikörperinkubation von *PAD4* und Zugabe von ECL-Lösung im ChemoCam. Auffallend hohe Hintergründe und hell leuchtende hämolytische Proben. Maßstab: 1 Dot = 3,2 mm.

Diskussion

5.2.3 *PADI4* Expression und Komplikationsentwicklung

Das sekundäre klinische Ziel der Studie war es, zu untersuchen, ob erhöhte *PADI4* Expressionen auch mit einer erhöhten postoperativen Komplikationsrate vergesellschaftet sind. Abb. 22 A) zeigte eine höhere relative *PADI4* mRNA Expression bei Patienten mit postoperativer Komplikation, wobei Abb. 22 B) aufzeigt, dass fast 4-mal so viele Raucher wie Nichtraucher in der Komplikationsgruppe waren (konform mit der Literatur [17]). Vorher wurde gezeigt, dass Raucher eine deutlich höhere relative *PADI4* mRNA Expression aufwiesen. Abb. 22 C) bewies dann auch bei der Differenzierung der Komplikationsgruppe in Raucher und Nichtraucher, dass die hohen *PADI4* mRNA Expressionen innerhalb der Komplikationsgruppe vor allem durch das Rauchen zu begründen war und der Faktor Komplikationsentwicklung nebensächlich schien. Der hohe Anteil von Rauchern mit hohen *PADI4* mRNA Spiegeln innerhalb der Komplikationsgruppe fiel dennoch stark auf, angesichts der Tatsache, dass viele komplikationslose Raucher auch nicht erhöhte Level aufwiesen. Die Daten suggerieren also, dass hohe *PADI4* mRNA Expressionen einen Risikofaktor bei Rauchern für die Komplikationsentwicklung darstellte.

In Wong *et al.* 2015 wurde eine deutlich beschleunigte Reepithelialisierung bei PAD4-defizienten Mäusen in diabetischen Verhältnissen gezeigt, weshalb postuliert wurde, dass Diabetes mit erhöhter *PADI4* Expression, konsekutiver exzessiver NETose und daraus resultierender verlängerter Wundheilung einherging [3]. Ähnliches ist also auch bei Rauchern anzunehmen, sollte jedoch spezifischer überprüft werden. Um eindeutige Aussagen, über den Zusammenhang zwischen hoher *PADI4* mRNA Expression und Komplikationsentwicklung treffen zu können, braucht es einheitliche Operationen und eine allgemein größere Stichprobe, um auch die Population in der Komplikationsgruppe zu erhöhen. Auch die Untersuchung auf NETs und PAD4 in chronischen Wunden selbst würde einen direkteren klinischen Bezug beweisen. Gleichzeitig könnte durch den Einsatz von PAD4 Inhibitoren sowie auch DNasen zum NET-Abbau therapeutische Lösungsansätze untersucht werden, ebenfalls analog zu Wong *et al.* 2015 [3, 224, 348]. Das Venn Diagramm aus Abb. 22 D) spiegelt die häufige Kombination der Komplikationen Infektion der OP-Wunde, daraus resultierender Wundheilungsstörung und einer nötigen Folgeoperation wider. Dies repräsentiert eine umfassende Immunstörung mit

Diskussion

gestörter Immunabwehr und Gewebsregeneration. Im Vergleich hierzu zeigte Ehnert *et al.* 2019 an einer weitaus größeren Population Wundheilungsstörungen als Hauptursache gefolgt von gerade einmal halb so vielen Infektionen. Kombinationen von Komplikationen, wie hier prädominierend, stellten eher die Ausnahme dar [17]. Ursache hierfür könnte sein, dass in Ehnert *et al.* 2019 nur Patienten mit Gelenkersatzoperationen betrachtet wurden, während in der vorliegenden Studie viel unterschiedlichere Operationen betrachtet wurden, auch wenn die Endoprothetik den Hauptteil ausmachte. Angesichts der in Ehnert *et al.* 2019 entdeckten Suppression proinflammatorischer Zytokine von Rauchern, ergibt die hier beobachtete postoperative Anfälligkeit für Wundinfekte ebenfalls Sinn [17].

Bei der Betrachtung der Komplikationsentwicklung muss allgemein die eingeschränkte klinische Aussagekraft beachtet werden. Bei solch unterschiedlichen Operationen der Probanden spielten verschiedenste nicht berücksichtigte Faktoren sicherlich eine Rolle bei der Komplikationsentwicklung. So zeigten Suda *et al.* 2014 in septisch orthopädischen Operationen folgende Faktoren als wichtig: Das Ausmaß und die Lokalisation des Gewebsschadens, offene gegenüber geschlossenen Frakturen, chirurgisch elektiver gegenüber traumatisch bedingtem Schaden, die Keimbelastung der Wunde sowie eventuelle Fremdmaterialimplantation [277, 280, 283]. In Folge dessen ergeben sich verschiedenste Komplikationsraten zwischen Endoprothetik, Traumatologie, septischer Chirurgie und Arthroskopie. Hierbei führen die septische Chirurgie und Traumatologie mit durchschnittlich bis zu 29 % Komplikationen [277, 278], während Arthroskopien mit nur ca. 5 % deutlich komplikationsärmer verlaufen [279]. Im Vergleich der Daten von Suda *et al.* 2014 mit der vorliegenden Studie waren die höchsten Komplikationsraten ebenfalls aus der septischen und traumatologischen Chirurgie, nämlich 23 %, gefolgt von endoprothetischen Operationen mit 16,2 % [277]. Ehnert *et al.* 2019 zeigte für endoprothetische Operationen insgesamt eine Komplikationsrate von 20 % und damit auch vereinbar mit den vorliegenden Funden [17]. Aus diesen Erkenntnissen lässt sich also schließen, dass es zu viele Einflussfaktoren gab, u.a. weil die Operationen zu unterschiedlich waren und so die Vergleichbarkeit eingeschränkt und die Vereinheitlichung der Komplikationen erschwert wurden.

Diskussion

Auch wenn darauf geachtet wurde, dass die Verteilung an die verschiedenen Fachrichtungen ungefähr ausgeglichen ist (siehe Tabelle 16: Beschreibung der Studiengruppen), bleiben dennoch Unterschiede auch innerhalb der aufnehmenden Fachabteilungen und erst recht zwischen den Gruppen stehen, weshalb die Ergebnisse mit Vorsicht zu betrachten sind.

5.2.4 Kein Einfluss des Geschlechts auf die PAD4 Expression

Frauen und Männer weisen Unterschiede im Immunsystem, speziell bei ihren Neutrophilen auf. Gupta *et al.* 2020 zeigten eine Östrogen-abhängige übermäßige Responsivität der Neutrophilen von Frauen zu INF-1. Dies sei Teil der unterschiedlichen Entzündungsreaktion und Prävalenz von Autoimmungeschehen zwischen Männern und Frauen [349]. Auch in Bezug auf NETs zeigte Yuan 2018 eine negative Korrelation zwischen Testosteron und NET Freisetzung unter Calcium Ionophor Stimulation, wobei für alle weiteren Stimuli, inklusive den physiologischen NET Stimuli, keine geschlechtsabhängigen Unterschiede festgestellt wurden [350]. Dies steht im Kontrast mit Ergebnissen von Blazkova *et al.* 2017, bei denen junge, nicht-schwangere Frauen reifere und responsivere Neutrophile mit höherer Kapazität/Neigung zur NETose aufwiesen als Schwangere, ältere Frauen und Männer [351]. Auch Giaglis *et al.* 2016 postulierten einen „pro-NETotischen Effekt“ von erhöhten Leveln an Östrogen und G-CSF, wobei diese Arbeitsgruppe, im Gegensatz zu Blazkova *et al.* 2016 der Schwangerschaft eine besondere Neigung zur NETose zusprach [352].

Bei genauer Betrachtung der Zusammensetzung der moderaten und starken Raucher in der vorliegenden Studie ist aufgefallen, dass bei starken Rauchern der Hauptteil männlich war (angesichts der deutlich höheren Prävalenz des starken Rauchens bei Männern in Deutschland ist dies nicht verwunderlich [353]). Zum vollständigen Geschlechterausgleich der Hauptgruppen waren also mehr Frauen bei den moderaten Rauchern zu finden. Angesichts der erwähnten Literatur könnte diese Imbalance durchaus einen verzerrenden Effekt auf die *PADI4* Expressionen der Gruppen gehabt haben.

Auch in Dong *et al.* 2008 hat Östrogen *in vitro* die *PADI4* Expression in MCF-7-Zellen erhöht [241], was im Einklang war mit den Ergebnissen von Yasuda *et al.* 2019, bei denen Östrogenderivate in Neutrophilen-ähnlichen HL-60-Zellen die *PADI4* Expression mit konsekutiver Citrullinierung und NETose steigerte [354].

Diskussion

Im Kontrast zu diesen Ergebnissen konnte in dieser Studie kein Unterschied in der *PADI4* mRNA Expression zwischen den Geschlechtern festgestellt werden (siehe Abb. 24). Mögliche Gründe für Ungenauigkeiten in der hiesigen Studie wären Fehlen eines Matchings zwischen den Geschlechtern. Verschiedene Einflussfaktoren ohne Matching könnten also einen Östrogen-bedingten Unterschied verschleiert haben. Eine weitere Ungenauigkeit ist die fehlende Erfassung des Zeitpunktes im Menstruationszyklus während der Blutentnahme, sowie die fehlende Trennung von klimakterischen zu fertilen Patientinnen. Das durchschnittliche Alter der Teilnehmerinnen dieser Studie lag bei über 50 Jahren. Somit befanden sich die meisten Probandinnen im Klimakterium mit stark erniedrigtem Östrogen zum Untersuchungszeitpunkt, weshalb die Östrogenwirkung vermutlich nicht repräsentativ abgebildet wurde [355-358]. Eine Schwäche der *in vitro* Studien, wie Yasuda *et al.* 2019, ist dagegen stets die eingeschränkte Übertragbarkeit einer Zelllinie auf den gesamten Menschen aus zytologischer und pharmakodynamischer sowie –kinetischer Sicht. *In vivo* zeigte Östrogen erst ab hohen Spiegel (z.B. während der Schwangerschaft) einen pro-NEtischen Effekt [352], wohingegen die Ergebnisse von Yuan 2018, im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, keinen Unterschied hinsichtlich der NETose-Neigung zwischen den Geschlechtern feststellte [350]. Eine Studie zur spezifischen PAD4 Messung bei gesunden, gematchten Frauen und Männern in Abhängigkeit zu miterfassten Östrogenspiegeln könnte hilfreich sein.

5.2.5 Regeneration der PAD4 Regulation nach langjähriger Rauchabstinenz?

In Ehnert *et al.* 2019 wurde zwischen ehemaligen und aktuellen Rauchern nicht unterschieden und alle in die Gruppe der Raucher eingeschlossen. Das Verhältnis von aktiven zu ehemaligen Rauchern war hier in allen Gruppen interessanterweise gleich (Primäre Gelenkersatzoperationen mit und ohne Komplikationen, sowie Revisionseingriffe mit und ohne Komplikationen) [17]. Dies deutet darauf hin, dass aktive gegenüber ehemaligen Rauchern ähnliche Raten an postoperativen Komplikationen (und ggf. immunologischen Veränderungen) aufweisen. Nach diesem Vorbild wurden in der vorliegenden Studie ehemalige und aktuelle Raucher ebenfalls zusammen betrachtet. Im

Diskussion

Kontrast dazu finden sich jedoch einige andere Risiken, wie das Krebsrisiko nach Rauchstopp deutlich reduziert im Vergleich zum persistierenden Rauchen. Das kardiovaskuläre Risiko kann sich nach einigen Jahren der Rauchabstinenz sogar dem Risiko der Nichtraucher angleichen [64, 65, 359], weshalb eine allgemeine Beachtung der YSQ bei der Bewertung der Nikotinbelastung (PY) von Patienten überlegt werden sollte. Wong *et al.* 2012 fanden zudem heraus, dass ein temporärer Rauchstopp einige Wochen vor einer Operation das Risiko für die Entwicklung einer postoperativen Komplikation senkt [271], wobei dies, nach Gonzalez *et al.* 2018, für Infektionsraten von primären Gelenkersatzoperationen erst nach 1 Jahr Rauchabstinenz galt [360].

So ähnlich scheint es auch in Bezug auf die neutrophile *PADI4* Expression zu sein. In dieser Studie konnte ein deutlicher Unterschied in der relativen *PADI4* mRNA Expression zwischen aktuellen und ehemaligen Rauchern gefunden werden, während ehemalige Raucher sich den Nichtrauchern angleichen (siehe Abb. 23). Unter Ausschluss der ehemaligen Raucher von den aktuellen Rauchern ergaben sich trotz geringerer Gruppengröße deutlichere, sogar signifikante Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern in ihrer *PADI4* mRNA Expression. Auffällig war hier, dass die Gruppe der ehemaligen im Vergleich zu den aktuellen Rauchern im Schnitt 3 Jahre jünger waren und auffällig weniger Erkrankungen und Medikamenteneinnahmen aufwiesen ($R = 2,2 \Leftrightarrow ER = 1,7$; nicht signifikant) und sich so hinsichtlich ihrer Gesundheitsbelastungen wieder den Nichtrauchern annäherten. Diese anzunehmende Regeneration des Immunsystems nach Rauchstopp wurde bereits 1983 immunologisch von Hersey *et al.* festgestellt über eine erhöhte Aktivität der natürlichen Killerzellen und einen Anstieg von Immunglobulinen [33]. Meliska *et al.* bestätigten diese Funde später [361]. Morozumi *et al.* 2004 zeigten ähnlich wie Ehnert *et al.* 2019 eine Herunterregulation diverser proinflammatorischer Zytokine in Rauchern und eine Regeneration nach Rauchstopp [60]. Angesichts solcher immunologischer Veränderungen und erhöhten Infektneigungen diverser Arten durch das Rauchen (respiratorisch [362, 363], digestiv [364], bakteriämisch-septisch [365], sowie erhöhten postoperativen Infektionsraten [17]) erscheint eine Regeneration der NETose bzw. ihrer Enzyme durch Abstinenz durchaus logisch. Ein Rauchstopp scheint zusammenfassend, die *PADI4* Expression normalisieren zu können in Kohärenz mit der bekannten Regeneration des Körpers.

Diskussion

5.2.6 Im Alter höhere *PADI4* Expression und mehr Raucher unter den Multimorbiden

Eine gewisse Korrelation zwischen dem Alter und der relativen *PADI4* mRNA Expression wurde entdeckt. Hierbei ist besonders auffällig, dass fast alle besonders hohen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte (>5) ab einem Alter von 50 Jahren aufgetreten sind und auch die basalen *PADI4* $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte im fortgeschrittenen Alter höher waren als bei jüngeren Probanden. Nun wurde im Hintergrund dieser Arbeit sowie in einigen Publikationen, wie Lee *et al.* 2017 und Qiu *et al.* 2017 [20, 141], die Vermutung aufgestellt, dass Rauchen die NETose dysregulieren könnte und vielleicht so die Autoimmun-/Autoinflammationserkrankungen, die mit dem Rauchen vergesellschaftet sind, entstehen lassen könnte. Wenn man auf das durchschnittliche Alter bei Erstdiagnose vieler NET-/PAD4-assoziiierter Erkrankungen schaut, stellt man fest, dass beides im höheren Alter (>50 Jahre) vermehrt auftritt. Beispiele sind die späte Form der Multiplen Sklerose [366], die Rheumatoide Arthritis [367], Lungenkrebs und andere Krebserkrankungen [368] sowie Atherosklerose und Thrombose [369]. Insofern erscheint der hier festgestellte Zusammenhang des höheren Alters und höherer *PADI4* mRNA Expression passend.

Die Assoziation von hohen *PADI4* Spiegeln zu Multimorbidität und vor allem kardiovaskulären Vorschäden innerhalb der Studienpopulation konnte auf die erhöhte Dichte an starken Rauchern in diesen Subgruppen zurückgeführt werden. Multimorbide und kardiovaskulär Kranke, die nicht geraucht haben, zeigten eine auffällig niedrigere *PADI4* mRNA Expression, auch wenn die Fallzahlen für solche Subanalysen sehr gering waren und kein Matching griff. Dennoch passt diese Assoziation gut zu bestehender Literatur, wie Knight *et al.* 2014 und Liu *et al.* 2018, in denen im Mausmodell PAD4 ausgelöste NETose kardiovaskuläre/atherosklerotische Schäden verursachten und PAD4 Inhibition die Schäden verhinderten [348, 370, 371].

5.2.7 Mangelernährung durch Rauchen verstärkt die Komplikationsneigung

Folgende Erkenntnisse lassen sich aus den Ergebnissen zum BMI (Kapitel 4.6.4) und NRS (Kapitel 4.6.6) in Verbindung mit dem Rauchstatus und der *PADI4* Expression gewinnen: Rauchen stellt bekanntermaßen einen Risikofaktor auf

Diskussion

vielen verschiedenen Ebenen für eine gestörte Wundheilung dar [17, 18]. Auch wenn vielfach bewiesen wurde, dass Mangelernährung ein entscheidender Risikofaktor für postoperative Komplikationen ist, wurde bisher wenig über Mangelernährung als entscheidende Ursache für die postoperative Komplikationsneigung bei Rauchern berichtet [17, 334, 335]. Harris *et al.* 2016 fasste als Review die vielfältigen metabolischen Effekte des Rauchens fundiert zusammen [372]: Im Zentrum steht hierbei die Appetit stillende Komponente des Nikotins sowie die daraus folgende erhöhte Gefahr der Mangelernährung im Alter mit konsekutiver Gebrechlichkeit und körperlichem Verfall bei Rauchern [17, 372]. Die vorliegenden Ergebnisse aus Kapitel 4.6.4, dass Raucher dieser Studie einen niedrigeren BMI aufwiesen, decken sich also mit den Erkenntnissen aus früheren Arbeiten, wie Williamson *et al.* 1991, bei denen aktuelle Raucher einen $>1 \frac{\text{kg}}{\text{m}^2}$ niedrigeren BMI aufwiesen als Nicht- und Exraucher [373]. Auch dass Raucher hinsichtlich Mangelernährung ein erhöhtes Risiko aufweisen (siehe Kapitel 4.6.6), bestätigt das bisher gültige Wissen der Literatur: Silva *et al.* 2015 zeigte über eine multivariate Analyse die Hauptrisikofaktoren für Malnutrition, wobei aktuelles und ehemaliges Rauchen neben niedrigem Sozialstatus und einem Alter ab 60 Jahren wesentlichen Risikofaktoren darstellten [374]. Sowohl Rauchen als auch Mangelernährung führen alleine bereits zu einem erhöhten operativen Risiko [17, 336, 375], kumuliert jedoch sicherlich nochmals stärker. Also lohnt es sich, angesichts der vorliegenden Ergebnisse, einerseits bei Rauchern besonders auf die Prophylaxe einer Mangelernährung zu achten. Andererseits sollte weitere Forschung bezüglich Veränderungen des PAD4/NETose Systems von Mangelernährten betrieben werden, da in dieser Studie tatsächlich ein niedrigerer BMI und erhöhter NRS mit gesteigerter *PADI4* Expression einherging. Studien zu diesem Zusammenhang sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu finden. Ob hier ein echter Zusammenhang besteht oder ob die erhöhten *PADI4* mRNA Werte nur durch die Mehrheit an Rauchern in der Gruppe mit NRS >1 ($n_{\text{NRS}>1} = R + NR = 9 + 3$) begründet sind, bleibt offen. Könnte die erhöhte Komplikationsneigung von Mangelernährten ebenfalls durch vermehrte PAD4 Expression und NETose entstehen?

Diskussion

5.3 Klinische Erkenntnisse

Aktuell existieren in der Literatur nicht viele Quellen, die speziell den Zusammenhang des Rauchens und dem neutrophilen Enzym PAD4 behandeln. Es gibt jedoch starke Hinweise darauf, dass PAD4 in Rauchern und ihren assoziierten Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen könnte. Durch diese Hinweise wird den hier gefundenen Ergebnissen einer Hyperregulation von *PADI4* in Neutrophilen durchs Rauchen einen klinischen Kontext verliehen.

5.3.1 PAD4 als mögliches Therapietarget von Immundysregulationen bei Rauchern? – ein klinischer Ausblick

Die überregulierten *PADI4* Expressionen lassen sich als hyperinflammatorische Fehlregulation beschreiben. Einige Publikationen sprechen von einer generellen Immunsuppression von Rauchern, die für die erhöhte Komplikationsneigung verantwortlich zu machen wären [17, 376, 377]. PAD4 ist kein typischer Inflammationsmarker und doch eine wichtige Stellschraube in einem viel beteiligten, angeborenen proinflammatorischen Immunmechanismus. Hier scheint also eine gewisse Diskrepanz zwischen den Funden einer generellen Suppression vieler entzündlicher Zytokine und der Überregulation des ebenfalls proinflammatorischen Enzyms PAD4 bei Rauchern zu geben. Ein erklärender Kompromiss ist das Konzept einer Immundysregulation statt generellen Immunsuppression. Das Immunsystem ist also an unangebrachter Stelle, (z.B. den eigenen durch Schadstoffe veränderten Körper) überaktiv (→ autoimmun und autoinflammatorisch) und an benötigter Stelle unteraktiv (→ Immunsuppression und Infektneigung) [113, 378] (siehe hierzu Tabelle 1).

Die Rolle und Relevanz von PAD4 in der Bildung von NETs ist eines der umstritteneren Themen in der Literatur. Während Gruppen wie Li *et al.* (und andere) PAD4 als grundlegend für die NETose und die angeborene Immunabwehr bewiesen [112, 224, 225, 227, 229, 370, 379, 380], zeigten andere Gruppen, teils über *PADI4* (-/-) Mäuse, PAD4 unabhängige NETose hinsichtlich spezieller Trigger, wie Influenza, Klebsiella, polybakterielle Sepsis (infektiös) und Lupus Nephritis (nicht-infektiös) [177, 381-383]. Trotzdem kann die Überexpression von PAD4 zu exzessiver NETose führen [228, 251, 384]. Umgekehrt führt die Hemmung von PAD4, artifiziell meist durch Chloramidin, zur Hemmung der NETose trotz PMA-Stimulierung [123, 228, 251]. Zudem

Diskussion

publizierten Hawez *et al.* 2019 die eindeutige Korrelation zwischen der microRNA-155 (miR-155), der *PADI4* mRNA Expression und der konsekutiven NETose durch PMA [347]. Dies verdeutlicht nicht nur die Relevanz von PAD4 für die NETose, sondern darüber hinaus auch den Einfluss der *PADI4* mRNA Expression, wie sie in dieser Studie untersucht wurde, auf die NETose. Hier bedarf es insgesamt noch Aufklärungsarbeit über genaue Mechanismen und Abhängigkeiten dieses scheinbar omnipräsenten Verteidigungsmechanismus.

Von einer guten Aussagekraft der Ergebnisse der vorliegenden Studie auf die NETose bei Rauchern kann jedoch ausgegangen werden. In Nikotin und Zigarettenrauch induzierter NETose spielt *PADI4* nämlich eine entscheidende Rolle: Hosseinzadeh *et al.* 2016 zeigten an isolierten Neutrophilen von Menschen und Mäusen, dass Nikotin über nikotinerge Acetylcholinrezeptoren NETose dosiskorrelierend und vor allem PAD4-abhängig triggert [217]. Hierbei kann die Vermutung aufkommen, dass die bei Rauchern erhöhte ROS vermittelnd auf die erhöhte NETose wirken könnte [385]. Interessanterweise wurde eine Beteiligung von intrazellulärer ROS bei der Nikotin-induzierten NETose noch in derselben Studie von Hosseinzadeh *et al.* 2016 widerlegt [217, 386]. Die Rolle von extrazellulärer ROS bleibt noch unklar.

Darüber hinaus bewiesen Tatsiy und McDonald 2018, dass eine PAD4-Inhibition die NETose hinsichtlich aller getesteten/physiologischen Stimuli suffizient inhibiert hat, was dieses Enzym als essenziell für die physiologische NETose darstellt [123, 217]. Des Weiteren erkannten Qiu *et al.* 2017 das Rauchen als Trigger der NETose, die pDC zur INF-1 Synthese überaktivierten und so Th1- und Th17-Zellen stimulierten. Dies führte zur Bildung pathologischer, autoimmuner Lymphfollikel und Autoantikörpersynthese [20]. Angesichts der neuen Erkenntnis, dass Rauchen die neutrophile *PADI4* Expression erhöht, scheint es durch diese Erkenntnisse naheliegend zu sein, dass PAD4 ein entscheidender Vermittler bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen durch das Rauchen sein könnte. Die genauere Untersuchung von PAD4 Regulationen in bestimmten Patientengruppen bleibt auch deshalb sinnvoll, weil Wong *et al.* 2015 und Fadini *et al.* 2016 für diabetische Verhältnisse explizit die Chloramidin-vermittelte Unterdrückung dieses Enzyms mit dem erfolgreichen Ausbleiben von zirkulierender sowie wundständiger NETose und konsekutiven Wundheilungsstörungen für diabetische Verhältnisse korreliert haben [3, 113].

Diskussion

Also gilt es, PAD4 im Kontext der (diabetischen) Wundheilungsstörungen als unentbehrlichen Teil der NETose zu sehen.

Darüber hinaus kann PAD4 auch als extrazellulärer, NETose-unabhängiger Treiber von Immunkrankheiten wirken und als Target gesehen werden. Bisherige Berichte über eine extrazelluläre Hypercitrullinierung von Proteinen ist z.B. für die Rheumatoide Arthritis beschrieben, die u.a. über pulmonale PAD Expression durch das Rauchen ausgelöst werden kann [43, 249, 387]: Autoantikörpern gegen citrullinierte Proteine, wie ACPA, korrelieren mit der Krankheitsaktivität, wobei in Mäusen die Schwere der RA durch eine PAD4 Hemmung gemildert wurde [388-390]. Auch bei der Sepsis und im hämorrhagischen Schock sind zirkulierende Histone wichtige Schadensmediatoren. Hierbei konnte Biron *et al.* 2018 durch eine PAD4 Defizienz den Organschaden reduzieren und das Überleben von septischen Mäusen verbessern [174, 251]. Da PAD4 darüber hinaus die p21 Expression und die Apoptose p53-abhängig (Tumorsuppressorgene) hemmt, liegt eine pathogenetische Beteiligung bei gewissen Karzinomen nahe [196], wobei insbesondere Lungenkarzinomzellen interessanterweise viel PAD4 exprimieren [248]. Zudem korreliert in den Lungen von Rauchern mit COPD überaktives PAD4 mit erhöhter Infektneigung [250]. Schließlich auch in der Thromboseentstehung scheint Plasma-PAD4 das antikoagulatorische ADAMTS13 (= A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domain) zu hemmen und so eine prothrombotische Rolle zu spielen [391]. Diese Beispiele von NETose-unabhängiger PAD4 Aktivität zeigen die besondere Notwendigkeit der Entwicklung nicht bloß eines NETose-Inhibitors, sondern speziell eines klinisch anwendbaren PAD4-Hemmers [220, 343]. Welche weiteren Kontexte für PAD4 bestehen, ob es sich auf systemische (Auto-)Inflammation/(Auto-)Immunität oder sogar Tumorentstehung/-metastasierung ausweiten lässt, bleibt klinisch-experimentell zu prüfen.

PAD4 ist sicherlich nicht generell „schlecht“. Es ist zu erwarten, dass ein allgemeines Inhibieren/Senken des PAD4 nicht jede Wundheilungsstörung, Autoimmunerkrankung oder Krebsmetastasierung verhindern kann und damit, universell angewendet, sicher nicht sinnvoll bzw. sogar schädlich sein könnte. Trotz der vielfältigen Beteiligung von dysreguliertem PAD4 konnte u.a. Li *et al.* 2010 zeigen, dass ein PAD4 Knockout mit konsekutivem Ausbleiben der NETose

Diskussion

die Anfälligkeit und Schwere für Infektionen im Mausmodell bei der nekrotisierenden Faszitis erhöhen kann, in dem die Wundfläche in PAD4 (-/-) Mäusen ca. 4 mal größer wurde als bei PAD4 (+/+)-Mäusen [112]. In derselben Arbeit wurde jedoch auch herausgefunden, dass extrazelluläres PAD4, das immunologisch wirksame Histone citrulliniert, durchaus entbehrlich für die Erregerabwehr war [112]. Unter Einsatz von DNasen wiesen beide Mausarten wieder die gleiche Erregerabwehr auf, was darauf hindeutet, dass nur die NETose durch den PAD4 Knockout eingeschränkt wurde und die Neutrophilen sonst funktionell erhalten blieben [112]. Kongruente Ergebnisse zeigten Saha *et al.* 2019 mit der gastrointestinalen Infektion von PAD4 (-/-)- und (+/+)-Mäusen durch *Citrobacter rodentium* [392]. Dadurch wird verdeutlicht, dass die PAD4 abhängige NETose (korrekt reguliert), sowie eine physiologische PAD4 Expression an sich, wichtige Komponenten des angeborenen Immunsystems darstellen und nicht nur Krankheitswert, sondern auch protektiven Wert besitzen [112, 392]. Interessanterweise zeigte sich in 2 Studien eine lokale Überexpression von PAD4 in speziellen Malignomen sogar als therapeutisch nützlich, um diese auf bestimmte Therapeutika zu sensibilisieren [393, 394].

Folglich könnte es sein, dass allgemein eine „baseline PAD4 Expression“, wie bei den meisten Patienten dieser Studie, regelrecht und wichtig ist. Hingegen entwickeln einige Menschen mit evtl. entsprechender Disposition und exogener Belastung (wie dem Rauchen) stark überregulierte Werte, die zu den PAD4/NET-assoziierten Pathologien führen können [228, 347] (siehe Tabelle 3 und 5). Eine PAD4 senkende/inhibierende Therapie könnte als Teil der individualisierten Medizin für solche Patienten mit deutlich überregulierter Expression interessant sein und sollte in zukünftigen klinischen Studien überprüft werden [220, 337, 395]. Momentan sind solche Forschungen, vor allem für eine PAD4 Hemmung bei der rheumatoiden Arthritis ausgelegt [337, 389, 390, 396]. Eine Erweiterung der Bereiche wäre sinnvoll.

Weiteres Forschungspotenzial beherbergt die Genetik mit bestimmten Single Nucleotide Polymorphisms (= SNPs) im menschlichen Genom, die teils mit erhöhter PAD4 Expression auftreten [339]. Der PAD4 Polymorphismus 104 C/T beispielsweise wurde bei einer asiatischen Population mit einem stark erhöhtem Risiko für das Auftreten von RA korreliert [397]. Suzuki *et al.* zeigten bereits 2003,

Diskussion

dass gewisse PAD4-Risikohaplotypen für RA eine erhöhte ACPA-Produktion mit Krankheitsverschlechterung bedingen [398]. Die Detektion der Risikopatienten weiterer PAD4 assoziierter Pathologien, wie verzögerter Wundheilung und Autoimmunerkrankungen (neben RA) bietet eine interessante, bisher ungeklärte Möglichkeit der Prävention, Früherkennung und Behandlung.

Als direkte Anschlussarbeit an die hiesige Studie wäre die Untersuchung chronischer Wunden von Rauchern auf NETs und PAD4 Spiegel bzw. lokale PAD4 Marker, wie hypercitruilliniertem Histon 3, sowie der therapeutische Versuch der PAD4 Inhibition und DNase Einsatz von Interesse [3].

5.4 Limitierungen der Arbeit

Jede Studie hat Schwächen. Sie zu erkennen, ist zur Ergebniseinordnung und zukünftigen Verbesserung nötig. In der vorliegenden Studie ergaben sich drei hauptsächliche Probleme, die die Aussagekraft einschränken: Erstens wiesen die hier gezeigten Auswertungen und Identifikationen anderer Einflussfaktoren auf die *PADI4* Expression, abgesehen vom Rauchen, kein valides Matching zwischen den Gruppen auf, sodass Einflussfaktoren eine Rolle spielten. Dies galt bei den Vergleichen von Patienten mit und ohne Komplikation, sowie dem Geschlecht, dem Alter, dem BMI, der Mangelernährung und der Morbidität. Hier könnte in größer angelegten Querschnittsstudien eine validere, multivariate Analyse erfolgen. Die hier gezeigten Abhängigkeiten erhöhter *PADI4* Expressionen (Rauchen, Rauchabstinenz, Alter, Mangelernährung, Morbidität, etc.) sollten in zukünftigen klinischen Studien zu PAD4 und NETose adäquat beachtet werden.

Zweitens ergaben sich, wie weiter oben angesprochen, Einschränkungen in der klinischen Aussagekraft der Studie durch den Vergleich verschiedenster OP-Arten bzgl. Komplikationsentwicklung. Zwar bestätigte sich das Rauchen als wichtiger, allgemeiner Risikofaktor für allgemein komplikative Verläufe, doch war der Zusammenhang mit den *PADI4* Expressionen keinesfalls unbeeinflusst. An dieser Stelle sind Studien mit Untersuchung chronischer Wunden und anderer postoperativer Komplikationen auf NETose und PAD4 unersetzlich.

Drittens zeigt sich methodisch, ebenfalls wie zuvor diskutiert, die Limitierung, dass die Dot Blots teilweise sehr schwache Signale mit hohen Hintergrundsignalen zeigten. Wenn man sich die großen Unterschiede der

Diskussion

beiden Replikate hinsichtlich ihrer relativen PAD4 Proteinexpressionen anschaut (siehe Abb. 29), wird deutlich, dass die Diskrepanz sehr wahrscheinlich methodischer Natur ist. Ein weiteres Problem ergibt sich hier mit hämolytischen Proben, bei denen viel freies Hämoglobin vorliegt, welches bei der Bildentwicklung mit dem Luminol der ECL-Lösung reagiert [345]. Hier könnte durch kolorimetrische Detektion der Signale Abhilfe geschaffen werden, wobei hier von einer geringeren Sensitivität als bei der Lumineszenz-basierten Detektion ausgegangen werden muss. Auf Proteinebene ist also das Ergebnis stark eingeschränkt, wobei laut Hawez *et al.* 2019 die *PAD4* mRNA Expression sehr gut mit der NETose Rate korreliert, weshalb von einer guten klinischen Aussagekraft der hiesigen mRNA Messungen ausgegangen werden darf [347]. Schließlich fiel bei der Erhebung der Fragebögen auf, dass die Interpretation der Fragen nicht nur zwischen den Probanden, sondern auch beim selben Probanden longitudinal (bei Aufnahme gegenüber Follow Up) unterschiedlich sein konnte. Ein Beispiel war das Passivrauchen, das zunächst oft verneint wurde, wobei die Frage nach dem Rauchen in Räumen bejaht wurde. Eine Lösung hierfür wäre die verbale Vereinfachung, Konkretisierung und Standardisierung der mündlichen Fragenformulierung.

6. Zusammenfassung

PAD4 ist ein Schlüsselenzym der NETose in neutrophilen Granulozyten, welches bei Dysregulation an verschiedenen Erkrankungen beteiligt sein kann. Die vorliegende Fall-Kontroll-Studie beschäftigte sich mit der präoperativen Messung der relativen PAD4 Expression in peripher-venösen Neutrophilen und der Korrelation einer möglichen Dysregulation mit dem Rauchen. An der BG Unfallklinik Tübingen wurden hierfür 84 Patienten, 42 Raucher und 42 Nichtraucher eingeschlossen. Ihnen wurde präoperativ Blut abgenommen und hieraus neutrophile Granulozyten isoliert. In diesen Zellen wurde die relative Expression von PAD4 in Abhängigkeit des Rauchstatus untersucht. Die Messung der Enzymexpression erfolgte in der qPCR auf mRNA-Ebene und im Dot Blot auf Proteinebene. Sekundär galt das klinische Ziel, eine mögliche Korrelation der PAD4 Expression mit der Neigung zu postoperativen Komplikationen zu detektieren. Analog zur Blutentnahme und Granulozytenisolierung wurden über einen Fragebogen die wichtigsten Patientencharakteristika sowie Konsumverhalten, Lebensstil und körperliche Möglichkeiten erfasst. Über das Kliniksystem und einem Follow Up Telefonat wurde 6 Monate nach der OP der Heilungsverlauf erfasst. Die Patienten wurden entsprechend der Einschlusskriterien balanciert ausgewählt und dabei auf ein best possible Matching zwischen Rauchern und Nichtrauchern geachtet, um Einflussfaktoren zu minimieren.

Die qPCR-Ergebnisse zeigten deutlich höhere *PADI4* mRNA Expressionen bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern. Besonders hohe Expressionen fanden sich bei starken Rauchern, wobei die Varianz groß war. Auf Proteinebene, bei der keine Gruppenunterschiede erkennbar waren, schränkten methodische Fehler die Aussagekraft deutlich ein. Raucher entwickelten deutlich mehr postoperative Komplikationen gegenüber Nichtrauchern, wobei hierdurch auch die diskret höhere *PADI4* mRNA Expression in der Komplikationsgruppe zu erklären waren. Bei der Suche nach Einflussfaktoren auf die *PADI4* Expression fiel auf, dass ehemalige Raucher, die der Rauchergruppe zugeteilt waren, sich hinsichtlich ihrer *PADI4* Expression den Nichtrauchern angleichen, weshalb von einer Regeneration der Expression ausgegangen wurde. Zudem fanden sich vor allem ein höheres Alter, ein niedrigerer BMI/höherer NRS und scheinbar die (kardiale)

Zusammenfassung

Multimorbidität als Einflussfaktoren, wobei hier, ähnlich wie bei den Komplikationen, diejenigen mit sehr hoher Expression geraucht haben. Welcher Faktor hier den anderen bedingt hat, blieb offen. Zusammenfassend erhöht Rauchen also das Risiko einer Hyperexpression von *PADI4* und kann damit als potenzieller Risikofaktor für diverse PAD4- und einige NET-assoziierte Pathologien gesehen werden. Bezüglich postoperativer Komplikationen konnte in dieser Studie kein Zusammenhang zu erhöhter präoperativer *PADI4* mRNA oder Protein Expression festgestellt werden. Bei zukünftigen Studien um das Enzym und den Immunmechanismus muss vor allem das Rauchen als wichtiger Einflussfaktor beachtet werden.

„Mit dem Rauchen aufzuhören, ist kinderleicht. Ich habe es schon hundertmal geschafft.“ – Mark Twain

Anhang

7. Anhang

7.1 Material und Geräte

7.1.1 Chemikalien

(gelagert bei ...°C)

Tabelle 12: Verwendete Chemikalien (Lagerbedingungen).

Chemikalien	Hersteller
2 M NaOH (20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
2-Mercaptoethanol (4°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Agarose (20°C)	Genaxxon, Ulm, Germany
Borsäure (20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Bromphenolblau (20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
BSA (Bovine serum albumin) (4°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Chloroform 100 % (20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Kupfersulfat-pentahydrat (Cu ₂ SO ₄ *5 H ₂ O) (20°C) (lichtgeschützt)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Demineralisiertes Wasser (ddH ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
DEPC (Diethylpyrocarbonat) (4°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
DMSO (Dimethylsulfoxid) (-20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Desoxycholsäure (20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
EDTA (Ethylenediaminetetraacetat) (20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Ethanol 70 % (20°C)	Apotheke UKT
Ethidiumbromid (4°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
First Strand cDNA synthesis Kit (-20°C)	ThermoFisher, USA
Folin Reagenz (20°C)	Sigma-Aldrich, MO, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 % (4°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Isopropanol 100 % (20°C)	VWR, PA, USA
Leupeptin (-20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Luminol (-20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
p-Cumarsäure (20°C)	Sigma-Aldrich, MO, USA
Pepstatin A (-20°C)	Sigma-Aldrich, MO, USA
TriFast TM (4°C)	Ehemals Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany
Guanidinthiocyanat (20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Ammoniumthiocyanat (20°C)	Sigma-Aldrich, MO, USA
Natriumacetat (20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Glycerol (20°C)	Sigma-Aldrich, MO, USA
Roti Aqua Phenol (4°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluorid) (-20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany

Anhang

Dulbecco's Phosphate-buffered saline (DPBS) Pulver (20°C)	Biochrom, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Phosphate-buffered saline (PBS) Lösung (20°C)	Sigma-Aldrich, MO, USA
Ponceau S (20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
pUC19 DNA/Mspl (HpaII) Marker (4°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
RedTaq PCR Mastermix (-20°C)	Genaxxon, Ulm, Germany / Biozym
Methanol (20°)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃) (20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Natriumchlorid (NaCl) (20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Natriumfluorid (NaF) (20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Natrium-Orthovanadat (Na ₃ VO ₄) (-20°C)	Sigma-Aldrich, MO, USA
Natrium-Kalium-Tartrat (Na-K-Tartrate) (lichtgeschützt) (20°C)	Sigma-Aldrich, MO, USA
SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) (20°C)	Sigma-Aldrich, MO, USA
Tergitol Typ NP40 70 % (20°)	Sigma-Aldrich, MO, USA
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (4°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Tris Base (20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Tween-20 (20°C)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
SYBR Green Master Mix 2x High Rox (500nM), Cat#: M3052 (-20°C)	Genaxxon, Ulm, Germany
Lympholyte Poly Medium (CL5070) (20°C) (lichtgeschützt)	Cedarlane Laboratories, Canada

7.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 13: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösungen	Bestandteile
Selbstgemachtes TriFast (4°C) (lichtgeschützt)	0.8 M Guanidinthiocyanat, 0.4 M Ammoniumthiocyanat, 0.1 M Natriumacetatlösung, 5 % Glycerol, in ddH ₂ O, 38 % Phenol
TBE (Tris/Borate/EDTA) Puffer (20°C)	TRIS 0.89 M, Borsäure 0.89 M, 20 mM, pH 8.3
PBS (Phosphate buffered saline) (20°C)	Gibco, Thermo Fisher Scientific (USA)
TRIS pH 8.8 (20°C)	1.5 M Tris in ddH ₂ O, pH 8.8
1 M TRIS pH 6.8 (20°C)	1 M Tris in ddH ₂ O, pH 6.8
Tris 100 mM (20°C)	100 mM TRIS in ddH ₂ O, pH 8.5
RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay) Puffer (-20°C)	10 mM TRIS Base, 100 mM NaCl, 0.5 % Tergitol, 0.5 % DOC, 10 mM EDTA, folgende kurz vor Verwendung hinzugeben: 1 µg/mL Pepstatin A, 5 µg/mL Leupeptin, 1 mM PMSF, 5 mM

Anhang

	NaF, 1 mM Natrium- Orthovanadat, 10 mM DMSO, pH 7.6
Tris 10 mM ungepuffert (20°C)	10 mM Tris in ddH ₂ O, pH 10-10.5
TBS 10x (Tris buffered saline) (20°C)	100 mM TRIS, 1.5 M NaCl in ddH ₂ O, pH 7.6
1 % Essigsäure-Lösung (20°C)	1 % Essigsäure in ddH ₂ O
Sulforhodamine B Working Solution	0.4 % Sulforhodamine B in 1 % Acetic Acid
p-Cumarsäure Lösung (-20°C)	90 mM p-Coumaric Säure in DMSO
Luminol Lösung (-20°C)	250 mM Luminol in DMSO
Dot Blot ECL Lösung	100 mM TRIS mit 0.06 % H ₂ O ₂ , 1.25 mM Luminol, 0.2 mM p-Coumaric Acid
PCR Loading Buffer 5x (4°C)	300 mM Tris pH 6.8, 50 % Glycerol, 5 mM EDTA, 10 % SDS, 0.05 % Bromphenol Blau, 12.5 % 2-Mercaptoethanol
200 mM NaOH (20°C)	10 % 2 M NaOH in ddH ₂ O
Ponceau S Lösung (20°C)	0.1 % Ponceau S in 1 % Essigsäure
TBS (Tris Buffered Saline) -10X (20°C)	100 mM TRIS, 1.5 M NaCl, in ddH ₂ O, pH 7.6
TBS-T (20°C)	10 % TBS 10x, 0.1 % Tween-20 in ddH ₂ O
BSA Blocking Buffer für Dot Blot (4°C)	5 % BSA in TBS-T
Lowry Lösung A	0.02 % Na-K-Tartrat, 0.01 % CuSO ₄ , 2 % Na ₂ CO ₃ , 100 mM NaOH
Lowry Lösung B	33 % Folin Reagenz in ddH ₂ O

7.1.3 Geräte

Tabelle 14: Verwendete Geräte.

Geräte	Hersteller
Kleine Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Große Zentrifuge	Heraeus Fresco 21, Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Thermocycler, Arktik	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Thermocycler, Veriti	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
StepOnePlus, Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Agarose Gel Kammer	Bio-Rad, CA, USA
Tubes (0.5 mL, 1 mL, 1.5 mL, 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Tubes (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria
PCR Tubes	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Schüttler	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Germany
Whatman Papier	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Nitrocellulose Membran	Carl Roth, Karlsruhe, Germany

Anhang

Chemocam Imager 3.2	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Germany
INTAS Science Imaging	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Germany
Plate Reader	Omega plate reader, BMG Labtech, Ortenberg, Germany
Pipetten	Corning, New York, USA; Eppendorf, Hamburg Germany
Dot Blotter T790.1	Carl Roth, Karlsruhe, Germany

7.1.4 Softwares

Tabelle 15: Verwendete Software.

Software	Hersteller	Version
Endnote	Claritave Analytics (USA)	Endnote X9
Microsoft Word	Microsoft Inc., Redmond (USA)	Microsoft Word 2021
Microsoft Excel	Microsoft Inc., Redmond (USA)	Microsoft Excel 2021
Microsoft PowerPoint	Microsoft Inc., Redmond (USA)	Microsoft PowerPoint 2021
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc. (USA)	GraphPad Prism 8
ImageJ	Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, University of Wisconsin (USA)	ImageJ 1.52g

7.1.5 Deskriptive Statistik mit Unterteilung in 3 Gruppen

Tabelle 16: Allgemeine Beschreibung des Patientenkollektivs in 3 Gruppen differenziert; mit Durchschnitt, Standardabweichung und die Reichweiten in Klammern kursiv. Bei den Komplikationen lagen häufig kombinierte Komplikationen vor. Diese sind hier einzeln aufgeführt. PY = Pack Years; Endo = Endoprothetik; ASK = Arthroskopie; Trauma = Unfallchirurgie; SEP = Septische Chirurgie; HPRV = Hand-, Plastische, Rekonstruktive, Verbrennungschirurgie; Sonst, = Sonstige (z.B. Wirbelsäulenchirurgie, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie); NRS = Nutritional Risk Score; SF-36 = Short Form 36 Items; KöFu = Körperliche Funktionsfähigkeit; KöRo = Körperliche Funktionsfähigkeit; EmRo = Emotionale Rollenfunktion; Ages = Allgemeine Gesundheit. Kruskal-Wallis-Test zur Berechnung der p-Werte.

Studiengruppen	Kontrollen	1-20 PY	>20 PY	Niedrigster p-Wert
Geschlecht	♀: 20 ♂: 22	♀: 10 ♂: 7	♀: 10 ♂: 15	
Ø Alter [Jahre]	55,8 ± 11,3 (74 – 32)	50,7 ± 11,8 (73 – 33)	57,2 ± 9,8 (74 – 38)	0,28
Ø Body Mass Index (BMI) [$\frac{kg}{m^2}$]	28,1 ± 3,8 (21,5 – 36,9)	27,4 ± 3,4 (21,6 – 32,9)	26,7 ± 3,7 (21,3 – 37,7)	0,45

Anhang

Ø	Anzahl	1,86 ± 1,67 (0 – 7)	1,65 ± 1,28 (0 – 4)	2,32 ± 2,36 (0 – 9)	>0,99
Ø	Anzahl regelmäßig eingenommener Medikamente	1,89 ± 2,71 (0 – 13)	1 ± 1,32 (0 – 6)	2,6 ± 3,56 (0 – 13)	0,51
Komplikationen		Tod: 0 Infektion: 1 Wundheilungs- störung: 2 Nötige Folgeoperation : 2 Thrombose: 0 Sonstiges: 0	Tod: 0 Infektion: 2 Wundheilungs- störung: 2 Nötige Folgeoperation: 3 Thrombose: 0 Sonstiges: 1	Tod: 0 Infektion: 3 Wundheilungs- störung: 6 Nötige Folgeoperation : 5 Thrombose: 0 Sonstiges: 0	Nur als VENN- Diagramm
NRS		0,43 ± 0,62 (0 – 2)	0,41 ± 0,81 (0 – 3)	0,84 ± 0,92 (0 – 3)	0,17
SF-36	KöFu:	63	74,7	69,2	0,24
	KöRo:	41,5	54,7	46	0,78
	Schmerz:	43,3	61,3	43,5	0,04
	Vitalität:	59,8	52,5	52,6	0,61
	SoFu:	90,9	84,4	98	0,34
	EmRo:	85,4	77,1	92	0,72
	Psyche:	81	77,3	79,5	>0,99
	AGes:	70,6	76,1	67	0,37
Gesamt		42	17	25	

7.1.6 Weitere NETopathien

Tabelle 17: Weitere NETopathien, ergänzend zu Tabelle 2. Für detailliertes Quellenverzeichnis bitte Autor kontaktieren.

NET assoziierte Erkrankung	Pathogenetische Rolle der NETs	Referenz
Anti-Neutrophil Zytoplasmatische Antikörper (ANCA) – assoziierte Vaskulitis, Kawasaki Vaskulitis	<ul style="list-style-type: none"> NET-Formationen zirkulierend, an kleinen Gefäßen, in der Niere und in Hautläsionen korrelieren mit Krankheitsaktivität V.a. suizidale NET Formation NET-Formation abhängig von ROS und PAD Enzymen, angereichert mit citrullinierten Histonen 	[181, 183, 399-404]

Anhang

	<ul style="list-style-type: none"> • Vermehrte spontane NETose bei ANCA-Induktion umstritten, aber vermutet • ANCAs gegen Proteinase 3 und MPO in 90 % der AAV-Patienten • DNase 1-Mangel wird angenommen → verzögerter NET-Abbau • Vermehrte NETs üben Endothelzellschäden aus und aktivieren Komplementsystem → proinflammatorisch/-koagulatorisch 	
Atherosklerose/-thrombose	<ul style="list-style-type: none"> • NETs induzieren die Aktivierung von Endothelzellen, Antigen-präsentierenden Zellen und Thrombozyten • Verstärkung der Schaumzellbildung • Plaquestabilisierung durch neutrophile Proteasen • PAD4 Inhibierung mildert Erkrankung drastisch ab • Induktion der Gerinnungskaskade • → proinflammatorisch und -koagulatorisch 	[142, 235, 405-407]
Asthma	<ul style="list-style-type: none"> • Eher Eosinophile extrazelluläre Fallen (EET), einige Patienten auch mit NETs (neutrophiles Asthma = schwerwiegender mit Steroidresistenz) • Im neutrophilen Asthma sind IL-8, die Neutrophilenanzahl und NETs erhöht • NETs aktivieren proinflammatorische Moleküle TLR4 und “nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells”(NF-κB) • NETs können in der Lunge über Proteasen und proinflammatorische Zytokine das Epithel und Endothel schädigen • NETs triggern Mucinhypersekretion und erhöhen dessen Viskosität => obstruktiv • Genauere Pathomechanismen noch nicht untersucht 	[139, 159]
Acute respiratory distress syndrome	<ul style="list-style-type: none"> • Krankheitsverlauf korreliert mit exzessiver NETose in Lungenmikrozirkulation, Interstitium und Alveolarraum 	[408{Grégoire, 2018 #58, 409, 410}]

Anhang

(ARDS), SARS-CoV-19	<ul style="list-style-type: none"> • Krankheitsschwere und -mortalität korrelieren mit systemischem Priming zur NETose, vermehrte zirkulierende NETs und verzögertem NET-Abbau • Allgemeine alveoläre NET-Schäden durch freie Histone, DNA, Peptide: Endothel- und Epithelschädigung, Mucinhypersekretion und -eindickung, systemische und lokale proinflammatorische Verstärkung → Gefahr des Zytokinsturms • NETs scheinen an der Thromboseneigung von ARDS- und SARS-CoV-19 Patienten beteiligt zu sein • Mausmodell: Partielle PAD4 Defizienz und DNase-1 Behandlung reduzierten NETs und Lungenschaden (vollständige PAD4 Defizienz ließ den Infektions-assoziierten Schaden steigen) 	
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CEDs)	<ul style="list-style-type: none"> • NETs in Colitis ulcerosa und Morbus Crohn v.a. an Entzündungsherden aktiv • Colitis ulcerosa: NETs im Kolon mit exazerbierter Inflammation vergesellschaftet → proinflammatorische Wirkung • NET assoziierte Proteine im entzündeten Kolon überexprimiert auch im Vergleich zu Crohn-Patienten • Freigesetzte MPO und NE schädigen die epitheliale Barriere (induzierte Apoptose von Epithelzellen, Spaltung von E-Cadherinen und Tight Junctions) • NETs wirken prothrombotisch in CEDs • NETose und Proteinexpression sind abhängig von TNF-α → Erfolgreiche Therapie mit anti-TNF-α oder DNase 1 reduzierte in Patienten den NET assoziierten Schaden 	[411, 412]
Diabetes Mellitus Typ1/Typ2 und diabetische Komplikationen	<ul style="list-style-type: none"> • NETose kann durch Hyperglykämie induziert werden, aber auch in normoglykämien Diabetikern scheint die Bildung erhöht. 	[413, 414]

Anhang

	<ul style="list-style-type: none"> • Typ 1: Inhibition der NETose lindert Krankheitsentwicklung • Typ 1: Inhibierung von PAD4 konnte Diabetesentstehung präventiv verhindern • PAD4 → Zitrullinierung im Pankreas → Autoantikörper → B-Zell-Zerstörung • Pankreatischer β-Zelltod korreliert mit NETose über induzierende dsDNA-spezifische IgGs • Vermehrte NET-Peptide (v.a. NE und Proteinase 3) und verschiedene freie DNA-Moleküle aktivieren pDC zur IFN-α Produktion → Autoimmunität • Typ 2: NET-Produkte stark erhöht; Erhöhte Spiegel an zellfreier DNA hängt mit kardiovaskulären, retinalen und Nierenerkrankungen des Diabetikers zusammen 	
Gallensteinbildung	<ul style="list-style-type: none"> • NETs werden für die Gallensteinbildung benötigt • Inhibierung von PAD4 und ROS-Produkten verhindert Gallensteinbildung <i>in vivo</i> • NETs sorgen für den Zusammenschluss der Kristalle zu größeren Konkrementen 	[415]
Gicht	<ul style="list-style-type: none"> • NETose, induziert durch Harnsäurekristalle, scheint hier eine anti-inflammatorische Rolle zu spielen → Freisetzung lytischer Enzyme, die inflammatorische Zytokine am Entzündungsherd spalten → NETs könnten die Entwicklung einer chronischen Gichtattacke verhindern 	[416]
Multiple Sklerose (MS)	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte PAD4 Spiegel und erhöhtes TNF-α verstärkt die Zitrullinierung von Myelin Basic Protein → Destabilisierung der Myelinmembran in der weißen Substanz • Patientenserum zeigte geschlechtsabhängig erhöhte Spiegel von MPO-DNA-Komplexen, aber keine Korrelation zur Krankheitsaktivität → ggf. geschlechtsspezifische Unterschiede in der Pathogenese 	[230, 240]

Anhang

Präeklampsie (PE)	<ul style="list-style-type: none"> • Schwangere mit PE weisen hohe Plasmaspiegel an dsDNA, MPO und Histonen auf → vermehrte NETose • Hohe DNA Spiegel korrelieren bei PE mit erhöhter Koagulation • PE-Plasma stimuliert Neutrophile von Kontrollen zur NET Bildung • Zirkulierende Mikropartikel aus geschädigtem Endothel scheinen der Hauptauslöser für die NETose zu sein • weniger plazentare Störungen bei PAD4 defiziente Mäuse 	[417]
Psoriasis	<ul style="list-style-type: none"> • NETs sind an der Entwicklung der Autoimmunität beteiligt (zitruillierte Histone und Peptide als Autoantigene) • Neutrophile werden zu Psoriasis-Läsionen rekrutiert, um Mikroabszesse zu bilden und proinflammatorische Zytokine (IL-6, IL-8, IL-17) zu produzieren → Erhöhte Expression von IL-37, welches NETose in der Haut auslöst • Korrelation mit Pathologie, auch in Abwesenheit einer Infektion • NETs verstärken die Entzündung über die Aktivierung des epidermalen Crosstalks (TLR4/IL-36R-abhängig) 	[418]
Sjögren-Syndrom	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte PAD-Antikörperspiegel im Serum von Patienten nachweisbar • Vermehrt Autoantikörper gegen PAD4 und zitruilliertes Histon 1 	[419, 420]
Zystische Fibrose	<ul style="list-style-type: none"> • Große Mengen an freier DNA aus NETs sind im Patientensputum nachweisbar → erhöhen Viskosität • DNase-1 reduziert Viskosität in Patienten • Patienten haben weniger Surfactant Protein-D, das wichtig ist für den Abbau der NETs in der Lunge → Korrelation mit Entzündung durch NET-Akkumulation • NETs induzieren epithelialen und endothelialen Schaden in der Lunge 	[140, 421-425]

Abb. 3: Screening auf Mangelernährung im Krankenhaus

Nutritional Risk Screening (NRS 2002)

nach Kondrup J et al., Clinical Nutrition 2003; 22: 415-421

Empfohlen von der Europäischen Gesellschaft für Klinische Ernährung und Stoffwechsel (ESPEN)

Vorscreening:

- Ist der Body Mass Index < 20,5 kg/m² ? ja nein
- Hat der Patient in den vergangenen 3 Monaten an Gewicht verloren? ja nein
- War die Nahrungszufuhr in der vergangenen Woche vermindert? ja nein
- Ist der Patient schwer erkrankt? (z.B. Intensivtherapie) ja nein

- ⇒ Wird eine dieser Fragen mit „Ja“ beantwortet, wird mit dem Hauptscreening fortgefahren
- ⇒ Werden alle Fragen mit „Nein“ beantwortet, wird der Patient wöchentlich neu gescreent.
- ⇒ Wenn für den Patienten z.B. eine große Operation geplant ist, sollte ein präventiver Ernährungsplan verfolgt werden, um dem assoziierte Risiko vorzubeugen.

Hauptscreening:

Störung des Ernährungszustands	Punkte
Keine	0
Mild Gewichtsverlust > 5%/ 3 Mo. <u>oder</u> Nahrungszufuhr < 50-75% des Bedarfes in der vergangenen Woche	1
Mäßig Gewichtsverlust > 5%/ 2 Mo. <u>oder</u> BMI 18,5-20,5 kg/m ² <u>und</u> reduzierter Allgemeinzustand (AZ) <u>oder</u> Nahrungszufuhr 20-60% des Bedarfes in der vergangenen Woche	2
Schwer Gewichtsverlust > 5% /1 Mo. (>15% / 3 Mo.) <u>oder</u> BMI <18,5 kg/m ² und reduzierter Allgemeinzustand oder Nahrungszufuhr 0-25% des Bedarfes in der vergangenen Woche	3

+

Krankheitsschwere	Punkte
Keine	0
Mild z.B. Schenkelhalsfraktur, chronische Erkrankungen besonders mit Komplikationen: Leberzirrhose, chronisch obstruktive Lungenerkrankung, chronische Hämodialyse, Diabetes, Krebsleiden	1
Mäßig z.B. große Bauchchirurgie, Schlaganfall, schwere Pneumonie, hämatologische Krebserkrankung	2
Schwer z.B. Kopfverletzung, Knochenmarktransplantation, intensivpflichtige Patienten (APACHE-II >10)	3

+ 1 Punkt, wenn Alter ≥ 70 Jahre

≥ 3 Punkte	Ernährungsrisiko liegt vor, Erstellung eines Ernährungsplanes
< 3 Punkte	wöchentlich wiederholtes Screening. Wenn für den Patienten z.B. eine große Operation geplant ist, sollte ein präventiver Ernährungsplan verfolgt werden, um das assoziierte Risiko zu vermeiden

Übersetzt und bearbeitet von Dr. Tajana Schütz, Dr. Luzia Valentini und Prof. Dr. Mathias Plauth. Kontakt: elke-tajana.schuetz@charite.de, Tel. 030-450 514 059

Abbildung 31: NRS = Nutritional Risk Screening 2002 [303].

Anhang

3. SF-36 Fragebogen

Score	1	2	3	4	5	
1. Wie würden Sie Ihren Gesundheitszustand beschreiben?	Ausgezeichnet	Sehr gut	Gut	Weniger gut	Schlecht	
2. Im Vergleich zum vergangenen Jahr, wie würden Sie Ihren derzeitigen Gesundheitszustand beschreiben?	Jetzt viel besser	Jetzt etwas besser	Wie vor einem Jahr	Jetzt etwas schlechter	Jetzt viel schlechter	
Im Folgenden sind einige Tätigkeiten beschrieben, die Sie vielleicht an einem normalen Tag ausüben. Sind Sie durch Ihren derzeitigen Gesundheitszustand bei diesen Tätigkeiten eingeschränkt? Wenn ja, wie stark?						
Score	1	2	3			
3a. anstrengende Tätigkeiten: schnell laufen, schwere Gegenstände heben, anstrengenden Sport treiben, etc.	Ja, stark...	Ja, etwas...	Nein, gar nicht...	...eingeschränkt		
3b. mittelschwere Tätigkeiten: einen Tisch verschieben, staubsaugen, kegeln, Golf spielen, etc.	Ja, stark...	Ja, etwas...	Nein, gar nicht...			
3c. Einkaufstaschen heben oder tragen	Ja, stark...	Ja, etwas...	Nein, gar nicht...			
3d. mehrere Treppenabsätze steigen	Ja, stark...	Ja, etwas...	Nein, gar nicht...			
3e. einen Treppenabsatz steigen	Ja, stark...	Ja, etwas...	Nein, gar nicht...			
3f. sich biegen, knien, bücken	Ja, stark...	Ja, etwas...	Nein, gar nicht...			
3g. mehr als 1 Kilometer zu Fuß gehen	Ja, stark...	Ja, etwas...	Nein, gar nicht...			
3h. mehrere Straßenkreuzungen weit zu Fuß gehen	Ja, stark...	Ja, etwas...	Nein, gar nicht...			
3i. eine Straßenkreuzung weit zu Fuß gehen	Ja, stark...	Ja, etwas...	Nein, gar nicht...			
3j. sich baden oder anziehen	Ja, stark...	Ja, etwas...	Nein, gar nicht...			
Hatten Sie in den vergangenen 4 Wochen aufgrund Ihrer körperlichen Gesundheit irgendwelche Schwierigkeiten bei der Arbeit oder anderen alltäglichen Tätigkeiten im Beruf bzw. zu Hause?						
Score				1	2	
4a. Ich konnte nicht so lange wie üblich tätig sein				Ja	Nein	
4b. Ich habe weniger geschafft als ich wollte				Ja	Nein	
4c. Ich konnte nur bestimmte Dinge tun				Ja	Nein	
4d. Ich hatte Schwierigkeiten bei der Ausführung				Ja	Nein	
Hatten Sie in den letzten 4 Wochen aufgrund seelischer Probleme irgendwelche Schwierigkeiten bei der Arbeit oder anderen alltäglichen Tätigkeiten im Beruf bzw. zu Hause (z.B. weil Sie sich niedergeschlagen oder ängstlich fühlten)?						
Score				1	2	
5a. Ich konnte nicht so lange wie üblich tätig sein				Ja	Nein	
5b. Ich habe weniger geschafft als ich wollte				Ja	Nein	
5c. Ich konnte nicht so sorgfältig wie üblich arbeiten				Ja	Nein	
Score	1	2	3	4	5	
6. Wie sehr haben ihre körperlichen Gesundheit o. seelischen Probleme in den vergangenen 4 Wochen Ihre Kontakte zu Familie, Freunden, Nachbarn oder Bekannten beeinträchtigt?	Überhaupt nicht	Etwas	Mäßig	Ziemlich	Sehr	
Score	1	2	3	4	5	6
7. Wie stark waren Ihre Schmerzen in den vergangenen 4 Wochen	Keine Schmerzen	Sehr leicht	Leicht	Mäßig	Stark	Sehr stark
Score	1	2	3	4	5	
8. Inwieweit haben die Schmerzen Sie in den vergangenen 4 Wochen bei der Ausübung Ihrer Alltagstätigkeiten zu Hause und im Beruf behindert?	Überhaupt nicht	Ein Bisschen	Mäßig	Ziemlich	Sehr	
In diesen Fragen geht es darum, wie Sie sich fühlen und wie es Ihnen in den vergangenen 4 Wochen gegangen ist. (Bitte kreuzen Sie an was Ihrem Befinden am ehesten entspricht). Wie oft waren sie in den letzten 4 Wochen...						
Score	1	2	3	4	5	6
9a. ...voller Schwung?	Immer	Meistens	Oft	Manchmal	Selten	Nie
9b. ...sehr nervös?	Immer	Meistens	Oft	Manchmal	Selten	Nie
9c. ...so niedergeschlagen, dass Sie nichts aufheuern konnte	Immer	Meistens	Oft	Manchmal	Selten	Nie
9d. ...ruhig und gelassen?	Immer	Meistens	Oft	Manchmal	Selten	Nie
9e. ...voller Energie?	Immer	Meistens	Oft	Manchmal	Selten	Nie
9f. ...entmutigt und traurig?	Immer	Meistens	Oft	Manchmal	Selten	Nie
9g. ...erschöpft?	Immer	Meistens	Oft	Manchmal	Selten	Nie
9h. ...glücklich?	Immer	Meistens	Oft	Manchmal	Selten	Nie
9i. ...müde?	Immer	Meistens	Oft	Manchmal	Selten	Nie
Score	1	2	3	4	5	
10. Wie häufig haben Ihre körperliche Gesundheit o. seelischen Probleme in den vergangenen 4 Wochen Ihre Kontakte zu anderen Menschen (Besuche der Freunden, etc.) beeinträchtigt?	Immer	Meistens	Manchmal	Selten	Nie	
Inwieweit trifft jede der folgenden Aussagen auf Sie zu?						
Score	1	2	3	4	5	6
11a. Ich scheinne etwas leichter als andere krank zu werden	Trifft ganz zu	Trifft weitgehend zu	Weiß nicht	Trifft weitgehend nicht zu	Trifft gar nicht zu	Trifft ganz zu
11b. Ich bin genauso gesund wie alle anderen, die ich kenne	Trifft ganz zu	Trifft weitgehend zu	Weiß nicht	Trifft weitgehend nicht zu	Trifft gar nicht zu	Trifft ganz zu
11c. Ich erwarte, dass meine Gesundheit nachlässt	Trifft ganz zu	Trifft weitgehend zu	Weiß nicht	Trifft weitgehend nicht zu	Trifft gar nicht zu	Trifft ganz zu
11d. Ich erfreue mich ausgezeichneter Gesundheit	Trifft ganz zu	Trifft weitgehend zu	Weiß nicht	Trifft weitgehend nicht zu	Trifft gar nicht zu	Trifft ganz zu

Abbildung 32: SF-36 = Short Form - 36.

8. Literaturverzeichnis

1. West, R., *Tobacco smoking: Health impact, prevalence, correlates and interventions*. Psychol Health, 2017. **32**(8): p. 1018-1036.
2. El-Zawawy, H.B., et al., *Smoking delays chondrogenesis in a mouse model of closed tibial fracture healing*. J Orthop Res, 2006. **24**(12): p. 2150-8.
3. Wong, S.L., et al., *Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing*. Nat Med, 2015. **21**(7): p. 815-9.
4. Wilgus, T.A., S. Roy, and J.C. McDaniel, *Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2013. **2**(7): p. 379-388.
5. Piña, J.A., et al., *Social Influences on Nicotine-Related Behaviors*. Int Rev Neurobiol, 2018. **140**: p. 1-32.
6. dkfz, D.K.-. *Tabakatlas*. 2015.
7. Benowitz, N.L., *Nicotine addiction*. N Engl J Med, 2010. **362**(24): p. 2295-303.
8. Ng, M., et al., *Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012*. Jama, 2014. **311**(2): p. 183-92.
9. Organization, W.H., *WHO report on the global tobacco epidemic 2021: addressing new and emerging products*. 2021.
10. Johannes Zeiher, B.K., Cornelia Lange, *Rauchen bei Erwachsenen in Deutschland*. Journal of Health Monitoring, RKI Berlin, 2017.
11. Seitz, N.-N., John, L., Atzendorf, J., Rauschert, C. & Kraus, L, *Kurzbericht Epide- miologischer Suchtsurvey 2015*. IFT Institut für Therapieforschung, München, 2019.
12. Neubauer, S., et al., *Mortality, morbidity and costs attributable to smoking in Germany: update and a 10-year comparison*. Tob Control, 2006. **15**(6): p. 464-71.
13. DKFZ, D.K., *Tabakatlas Deutschland 2020 – auf einen Blick*. 2020.
14. Lesmes, G.R. and K.H. Donofrio, *Passive smoking: the medical and economic issues*. Am J Med, 1992. **93**(1a): p. 38s-42s.
15. Abate, M., et al., *Cigarette smoking and musculoskeletal disorders*. Muscles Ligaments Tendons J, 2013. **3**(2): p. 63-9.
16. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, C., *The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress*. 2014.
17. Ehnert, S., et al., *Smoking Dependent Alterations in Bone Formation and Inflammation Represent Major Risk Factors for Complications Following Total Joint Arthroplasty*. Journal of clinical medicine, 2019. **8**(3): p. 406.
18. Grønkjær, M., et al., *Preoperative smoking status and postoperative complications: a systematic review and meta-analysis*. Ann Surg, 2014. **259**(1): p. 52-71.
19. Serra, M.B., et al., *From Inflammation to Current and Alternative Therapies Involved in Wound Healing*. International journal of inflammation, 2017. **2017**: p. 3406215.
20. Qiu, S.L., et al., *Neutrophil extracellular traps induced by cigarette smoke activate plasmacytoid dendritic cells*. Thorax, 2017. **72**(12): p. 1084-1093.

Literaturverzeichnis

21. Stämpfli, M.R. and G.P. Anderson, *How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 377-84.
22. Prevention, C.f.D.C.a., *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General*. 2010.
23. Pryor, W.A. and K. Stone, *Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **686**: p. 12-27; discussion 27-8.
24. Pryor, W.A., et al., *Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage*. Chem Res Toxicol, 1998. **11**(5): p. 441-8.
25. Smith, C.J. and T.H. Fischer, *Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction*. Atherosclerosis, 2001. **158**(2): p. 257-67.
26. van der Vaart, H., et al., *Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review*. Thorax, 2004. **59**(8): p. 713-21.
27. Bijl, M., et al., *Effects of smoking on activation markers, Fas expression and apoptosis of peripheral blood lymphocytes*. Eur J Clin Invest, 2001. **31**(6): p. 550-3.
28. Seagrave, J., et al., *Effects of cigarette smoke exposure and cessation on inflammatory cells and matrix metalloproteinase activity in mice*. Exp Lung Res, 2004. **30**(1): p. 1-15.
29. Churg, A., et al., *Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **27**(3): p. 368-74.
30. Hughes, D.A., et al., *Numerical and functional alterations in circulatory lymphocytes in cigarette smokers*. Clin Exp Immunol, 1985. **61**(2): p. 459-66.
31. Robbins, C.S., et al., *Cigarette smoke exposure impairs dendritic cell maturation and T cell proliferation in thoracic lymph nodes of mice*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6623-8.
32. Moszczyński, P., et al., *Immunological findings in cigarette smokers*. Toxicol Lett, 2001. **118**(3): p. 121-7.
33. Hersey, P., D. Prendergast, and A. Edwards, *Effects of cigarette smoking on the immune system. Follow-up studies in normal subjects after cessation of smoking*. Med J Aust, 1983. **2**(9): p. 425-9.
34. Yamada, R., et al., *Association between a single-nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-3 gene and rheumatoid arthritis in Japanese patients, and maximum-likelihood estimation of combinatorial effect that two genetic loci have on susceptibility to the disease*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(3): p. 674-85.
35. Zeidel, A., et al., *Immune response in asymptomatic smokers*. Acta Anaesthesiol Scand, 2002. **46**(8): p. 959-64.
36. Burton, R.C., *Smoking, immunity, and cancer*. Med J Aust, 1983. **2**(9): p. 411-2.
37. Kannel, W.B., R.B. D'Agostino, and A.J. Belanger, *Fibrinogen, cigarette smoking, and risk of cardiovascular disease: insights from the Framingham Study*. Am Heart J, 1987. **113**(4): p. 1006-10.

Literaturverzeichnis

38. Smith, T., et al., *High bat (Chiroptera) diversity in the Early Eocene of India*. *Naturwissenschaften*, 2007. **94**: p. 1003-1009.
39. Petitti, D.B. and H. Kipp, *The leukocyte count: associations with intensity of smoking and persistence of effect after quitting*. *Am J Epidemiol*, 1986. **123**(1): p. 89-95.
40. Garey, K.W., et al., *Markers of inflammation in exhaled breath condensate of young healthy smokers*. *Chest*, 2004. **125**(1): p. 22-6.
41. Bermudez, E.A., et al., *Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women*. *Am J Cardiol*, 2002. **89**(9): p. 1117-9.
42. Tracy, R.P., et al., *Lifetime smoking exposure affects the association of C-reactive protein with cardiovascular disease risk factors and subclinical disease in healthy elderly subjects*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(10): p. 2167-76.
43. Klareskog, L., et al., *Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Seminars in Immunology*, 2011. **23**(2): p. 92-98.
44. Harrison, B.J., et al., *The association of cigarette smoking with disease outcome in patients with early inflammatory polyarthritis*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(2): p. 323-30.
45. Hutchinson, D., *Are cases of rheumatoid arthritis in smokers and lifelong nonsmokers representative of different rheumatoid disease processes? Comment on the article by Harrison et al*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(12): p. 2942-3.
46. Costenbader, K.H. and E.W. Karlson, *Cigarette smoking and autoimmune disease: what can we learn from epidemiology?* *Lupus*, 2006. **15**(11): p. 737-45.
47. Freemer, M.M., T.E. King, Jr., and L.A. Criswell, *Association of smoking with dsDNA autoantibody production in systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2006. **65**(5): p. 581-4.
48. Handel, A.E., et al., *Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e16149.
49. Simon, K.C., et al., *Combined effects of smoking, anti-EBNA antibodies, and HLA-DRB1*1501 on multiple sclerosis risk*. *Neurology*, 2010. **74**(17): p. 1365-1371.
50. Mahid, S.S., et al., *Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis*. *Mayo Clin Proc*, 2006. **81**(11): p. 1462-71.
51. Abraham, N., et al., *Is smoking an indirect risk factor for the development of ulcerative colitis? An age- and sex-matched case-control study*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003. **18**(2): p. 139-46.
52. Parikh-Patel, A., et al., *Risk factors for primary biliary cirrhosis in a cohort of patients from the united states*. *Hepatology*, 2001. **33**(1): p. 16-21.
53. Gershwin, M.E., et al., *Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: a controlled interview-based study of 1032 patients*. *Hepatology*, 2005. **42**(5): p. 1194-202.
54. Vestergaard, P., *Smoking and thyroid disorders--a meta-analysis*. *Eur J Endocrinol*, 2002. **146**(2): p. 153-61.
55. Newkirk, M.M., et al., *Chronic smoke exposure induces rheumatoid factor and anti-heat shock protein 70 autoantibodies in susceptible mice and humans with lung disease*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(4): p. 1051-61.

Literaturverzeichnis

56. Wang, J., *Neutrophils in tissue injury and repair*. Cell Tissue Res, 2018. **371**(3): p. 531-539.
57. White, P.C., et al., *Cigarette smoke modifies neutrophil chemotaxis, neutrophil extracellular trap formation and inflammatory response-related gene expression*. Journal of Periodontal Research, 2018. **53**(4): p. 525-535.
58. Zhang, Y., et al., *Suppression of Neutrophil Antimicrobial Functions by Total Particulate Matter From Cigarette Smoke*. Frontiers in immunology, 2018. **9**: p. 2274-2274.
59. Agarwal, C., T.K. Baron, and D.S. Mehta, *Hidden truth of circulating neutrophils (polymorphonuclear neutrophil) function in periodontally healthy smoker subjects*. J Indian Soc Periodontol, 2016. **20**(2): p. 157-60.
60. Morozumi, T., et al., *Alterations of gene expression in human neutrophils induced by smoking cessation*. Journal of Clinical Periodontology, 2004. **31**(12): p. 1110-1116.
61. Sela, S., et al., *The involvement of peripheral polymorphonuclear leukocytes in the oxidative stress and inflammation among cigarette smokers*. Isr Med Assoc J, 2002. **4**(11): p. 1015-9.
62. Hoonhorst, S.J., et al., *Increased activation of blood neutrophils after cigarette smoking in young individuals susceptible to COPD*. Respir Res, 2014. **15**(1): p. 121.
63. Mortaz, E., et al., *Cigarette smoke induces CXCL8 production by human neutrophils via activation of TLR9 receptor*. Eur Respir J, 2010. **36**(5): p. 1143-54.
64. Taylor, D.H., Jr., et al., *Benefits of smoking cessation for longevity*. American journal of public health, 2002. **92**(6): p. 990-996.
65. Jha, P., *The hazards of smoking and the benefits of cessation: a critical summation of the epidemiological evidence in high-income countries*. Elife, 2020. **9**.
66. Phillipson, M. and P. Kubes, *The Healing Power of Neutrophils*. Trends Immunol, 2019. **40**(7): p. 635-647.
67. Kovtun, A., et al., *The crucial role of neutrophil granulocytes in bone fracture healing*. Eur Cell Mater, 2016. **32**: p. 152-62.
68. MacLeod, A.S. and J.N. Mansbridge, *The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds*. Advances in wound care, 2016. **5**(2): p. 65-78.
69. Mócsai, A., *Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond*. J Exp Med, 2013. **210**(7): p. 1283-99.
70. van Gisbergen, K.P., et al., *Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN*. J Exp Med, 2005. **201**(8): p. 1281-92.
71. Puga, I., et al., *B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen*. Nat Immunol, 2011. **13**(2): p. 170-80.
72. Tanno, H., et al., *Invariant NKT cells promote skin wound healing by preventing a prolonged neutrophilic inflammatory response*. Wound Repair Regen, 2017. **25**(5): p. 805-815.
73. Németh, T. and A. Mócsai, *The role of neutrophils in autoimmune diseases*. Immunol Lett, 2012. **143**(1): p. 9-19.

Literaturverzeichnis

74. Zhou, G.X. and Z.J. Liu, *Potential roles of neutrophils in regulating intestinal mucosal inflammation of inflammatory bowel disease*. J Dig Dis, 2017. **18**(9): p. 495-503.
75. Afzal, W., et al., *Autoimmune Neutropenia Updates: Etiology, Pathology, and Treatment*. South Med J, 2017. **110**(4): p. 300-307.
76. Schnoor, M., et al., *Crossing the Vascular Wall: Common and Unique Mechanisms Exploited by Different Leukocyte Subsets during Extravasation*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 946509.
77. Ellis, S., E.J. Lin, and D. Tartar, *Immunology of Wound Healing*. Curr Dermatol Rep, 2018. **7**(4): p. 350-358.
78. Lämmermann, T., et al., *Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo*. Nature, 2013. **498**(7454): p. 371-5.
79. Nordenfelt, P. and H. Tapper, *Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils*. J Leukoc Biol, 2011. **90**(2): p. 271-84.
80. Lacy, P., *Mechanisms of degranulation in neutrophils*. Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology, 2006. **2**(3): p. 98-108.
81. Leto, T.L. and M. Geiszt, *Role of Nox family NADPH oxidases in host defense*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(9-10): p. 1549-61.
82. Soehnlein, O., *Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil-derived granule proteins*. J Mol Med (Berl), 2009. **87**(12): p. 1157-64.
83. Sheshachalam, A., et al., *Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 448.
84. Xu, X. and L. Håkansson, *Degranulation of primary and secondary granules in adherent human neutrophils*. Scand J Immunol, 2002. **55**(2): p. 178-88.
85. Lin, A. and K. Loré, *Granulocytes: New Members of the Antigen-Presenting Cell Family*. Frontiers in Immunology, 2017. **8**(1781).
86. Tamassia, N., et al., *Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the "dark side of the moon"*. Eur J Clin Invest, 2018. **48 Suppl 2**: p. e12952.
87. Costa, S., et al., *Recent advances on the crosstalk between neutrophils and B or T lymphocytes*. Immunology, 2019. **156**(1): p. 23-32.
88. Nathan, C., *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(3): p. 173-82.
89. Westman, J., S. Grinstein, and P.E. Marques, *Phagocytosis of Necrotic Debris at Sites of Injury and Inflammation*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 3030.
90. Dalli, J., et al., *Heterogeneity in neutrophil microparticles reveals distinct proteome and functional properties*. Mol Cell Proteomics, 2013. **12**(8): p. 2205-19.
91. Soehnlein, O. and L. Lindbom, *Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(6): p. 427-39.
92. Kaplan, M.J., *Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases*. Arthritis Res Ther, 2013. **15**(5): p. 219.
93. Shen, X.F., et al., *Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update*. J Cell Mol Med, 2017. **21**(9): p. 1687-1697.
94. Kapoor, S., A. Opneja, and L. Nayak, *The role of neutrophils in thrombosis*. Thromb Res, 2018. **170**: p. 87-96.

Literaturverzeichnis

95. Jönsson, F., et al., *Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis*. J Clin Invest, 2011. **121**(4): p. 1484-96.
96. Papayannopoulos, V., *Neutrophil extracellular traps in immunity and disease*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(2): p. 134-147.
97. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
98. Faurschou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1317-27.
99. Briggaman, R.A., et al., *Degradation of the epidermal-dermal junction by proteolytic enzymes from human skin and human polymorphonuclear leukocytes*. J Exp Med, 1984. **160**(4): p. 1027-42.
100. Moor, A.N., D.J. Vachon, and L.J. Gould, *Proteolytic activity in wound fluids and tissues derived from chronic venous leg ulcers*. Wound Repair Regen, 2009. **17**(6): p. 832-9.
101. Wlaschek, M. and K. Scharffetter-Kochanek, *Oxidative stress in chronic venous leg ulcers*. Wound Repair Regen, 2005. **13**(5): p. 452-61.
102. Hampson, P., et al., *Neutrophil Dysfunction, Immature Granulocytes, and Cell-free DNA are Early Biomarkers of Sepsis in Burn-injured Patients: A Prospective Observational Cohort Study*. Ann Surg, 2017. **265**(6): p. 1241-1249.
103. Lektrom-Himes, J.A. and J.I. Gallin, *Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes*. N Engl J Med, 2000. **343**(23): p. 1703-14.
104. Roos, D. and S.K. Law, *Hematologically important mutations: leukocyte adhesion deficiency*. Blood Cells Mol Dis, 2001. **27**(6): p. 1000-4.
105. Dovi, J.V., L.K. He, and L.A. DiPietro, *Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(4): p. 448-55.
106. Devalaraja, R.M., et al., *Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice*. J Invest Dermatol, 2000. **115**(2): p. 234-44.
107. Liu, M., et al., *Formylpeptide receptors mediate rapid neutrophil mobilization to accelerate wound healing*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e90613.
108. D'Amico, G., et al., *Adhesion, Transendothelial Migration, and Reverse Transmigration of In Vitro Cultured Dendritic Cells*. Blood, 1998. **92**(1): p. 207-214.
109. Hirano, Y., M. Aziz, and P. Wang, *Role of reverse transendothelial migration of neutrophils in inflammation*. Biol Chem, 2016. **397**(6): p. 497-506.
110. Wu, D., et al., *Reverse-migrated neutrophils regulated by JAM-C are involved in acute pancreatitis-associated lung injury*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 20545.
111. de Oliveira, S., E.E. Rosowski, and A. Huttenlocher, *Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(6): p. 378-91.
112. Li, P., et al., *PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps*. J Exp Med, 2010. **207**(9): p. 1853-62.
113. Fadini, G.P., et al., *NETosis Delays Diabetic Wound Healing in Mice and Humans*. Diabetes, 2016. **65**(4): p. 1061-71.
114. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.

Literaturverzeichnis

115. Vorobjeva, N.V. and B.V. Chernyak, *NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology*. Biochemistry (Moscow), 2020. **85**(10): p. 1178-1190.
116. Urban, C.F., et al., *Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans*. PLoS Pathog, 2009. **5**(10): p. e1000639.
117. Grinberg, N., et al., *Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic Escherichia coli*. Infect Immun, 2008. **76**(6): p. 2802-7.
118. Pilsczek, F.H., et al., *A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus*. J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7413-25.
119. Byrd, A.S., et al., *An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to Candida albicans*. J Immunol, 2013. **190**(8): p. 4136-48.
120. Raftery, M.J., et al., *β 2 integrin mediates hantavirus-induced release of neutrophil extracellular traps*. Journal of Experimental Medicine, 2014. **211**(7): p. 1485-1497.
121. Jenne, C.N., et al., *Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps*. Cell Host Microbe, 2013. **13**(2): p. 169-80.
122. Yousefi, S., et al., *Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps*. Cell Death Differ, 2009. **16**(11): p. 1438-44.
123. Tatsiy, O. and P.P. McDonald, *Physiological Stimuli Induce PAD4-Dependent, ROS-Independent NETosis, With Early and Late Events Controlled by Discrete Signaling Pathways*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2036.
124. Behnen, M., et al., *Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via Fc γ RIIIB and Mac-1*. J Immunol, 2014. **193**(4): p. 1954-65.
125. Hoppenbrouwers, T., et al., *In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review*. PLoS One, 2017. **12**(5): p. e0176472.
126. Petretto, A., et al., *Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis*. PLOS ONE, 2019. **14**(7): p. e0218946.
127. Martinod, K., et al., *Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis*. J Thromb Haemost, 2016. **14**(3): p. 551-8.
128. Amulic, B., et al., *Neutrophil function: from mechanisms to disease*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 459-89.
129. Ravindran M, K.M., Palaniyar N., *Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology*. Biomolecules., 2019: p. 9(8):365.
130. Doua, D.N., et al., *SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(9): p. 2817-22.
131. Naffah de Souza, C., et al., *Alkaline pH Promotes NADPH Oxidase-Independent Neutrophil Extracellular Trap Formation: A Matter of*

Literaturverzeichnis

- Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Citrullination and Cleavage of Histone*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1849.
132. Branitzki-Heinemann, K., et al., *Formation of Neutrophil Extracellular Traps under Low Oxygen Level*. Frontiers in immunology, 2016. **7**: p. 518-518.
133. Yuen J, P.F., Douda DN, Riedl M, Cherry A, Ulanova M, Kahr WHA, Palaniyar N and Licht C, *NETosing Neutrophils Activate Complement Both on Their Own NETs and Bacteria via Alternative and Non-alternative Pathways*. Front. Immunol., 2016: p. 7:137.
134. Yipp, B.G. and P. Kubes, *NETosis: how vital is it?* Blood, 2013. **122**(16): p. 2784-94.
135. Yipp, B.G., et al., *Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo*. Nature Medicine, 2012. **18**(9): p. 1386-1393.
136. Beiter, K., et al., *An endonuclease allows Streptococcus pneumoniae to escape from neutrophil extracellular traps*. Curr Biol, 2006. **16**(4): p. 401-7.
137. Wilton, M., et al., *Secreted Phosphatase and Deoxyribonuclease Are Required by Pseudomonas aeruginosa To Defend against Neutrophil Extracellular Traps*. Infect Immun, 2018. **86**(9).
138. Farrera, C. and B. Fadeel, *Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process*. J Immunol, 2013. **191**(5): p. 2647-56.
139. Wan, R., et al., *Neutrophil extracellular traps amplify neutrophil recruitment and inflammation in neutrophilic asthma by stimulating the airway epithelial cells to activate the TLR4/ NF- κ B pathway and secrete chemokines*. Aging (Albany NY), 2020. **12**(17): p. 16820-16836.
140. Saffarzadeh, M., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones*. PLOS ONE, 2012. **7**(2): p. e32366.
141. Lee, K.H., et al., *Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review*. Autoimmun Rev, 2017. **16**(11): p. 1160-1173.
142. Döring, Y., O. Soehnlein, and C. Weber, *Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis*. Circ Res, 2017. **120**(4): p. 736-743.
143. Masucci, M.T., et al., *The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis*. Frontiers in Immunology, 2020. **11**(1749).
144. Pinegin, B., N. Vorobjeva, and V. Pinegin, *Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity*. Autoimmunity Reviews, 2015. **14**(7): p. 633-640.
145. Döring, Y., et al., *Auto-Antigenic Protein-DNA Complexes Stimulate Plasmacytoid Dendritic Cells to Promote Atherosclerosis*. Circulation, 2012. **125**(13): p. 1673-1683.
146. Soni, C., et al., *Plasmacytoid Dendritic Cells and Type I Interferon Promote Extrafollicular B Cell Responses to Extracellular Self-DNA*. Immunity, 2020. **52**(6): p. 1022-1038.e7.

Literaturverzeichnis

147. Parackova, Z., et al., *Neutrophil Extracellular Trap Induced Dendritic Cell Activation Leads to Th1 Polarization in Type 1 Diabetes*. *Frontiers in Immunology*, 2020. **11**(661).
148. Crow, M.K., M. Olfieriev, and K.A. Kirou, *Type I Interferons in Autoimmune Disease*. *Annu Rev Pathol*, 2019. **14**: p. 369-393.
149. Psarras, A., P. Emery, and E.M. Vital, *Type I interferon-mediated autoimmune diseases: pathogenesis, diagnosis and targeted therapy*. *Rheumatology*, 2017. **56**(10): p. 1662-1675.
150. Denning, N.-L., et al., *DAMPs and NETs in Sepsis*. *Frontiers in immunology*, 2019. **10**: p. 2536-2536.
151. Kahlenberg, J.M., et al., *Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages*. *J Immunol*, 2013. **190**(3): p. 1217-26.
152. Njeim, R., et al., *NETosis contributes to the pathogenesis of diabetes and its complications*. *J Mol Endocrinol*, 2020. **65**(4): p. R65-r76.
153. Yang, C.T., et al., *Hydrogen sulfide primes diabetic wound to close through inhibition of NETosis*. *Mol Cell Endocrinol*, 2019. **480**: p. 74-82.
154. Dicker, A.J., et al., *Neutrophil extracellular traps are associated with disease severity and microbiota diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2018. **141**(1): p. 117-127.
155. Trivedi A, K.M., Bade G, Talwar A, *Orchestration of Neutrophil Extracellular Traps (Nets), a Unique Innate Immune Function during Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Development*. *Biomedicines*, 2021. **9**(1): p. 53.
156. Grabcanovic-Musija, F., et al., *Neutrophil extracellular trap (NET) formation characterises stable and exacerbated COPD and correlates with airflow limitation*. *Respir Res*, 2015. **16**(1): p. 59.
157. Dubois, A.V., et al., *Influence of DNA on the activities and inhibition of neutrophil serine proteases in cystic fibrosis sputum*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012. **47**(1): p. 80-6.
158. Zawrotniak, M., et al., *Aspartic Proteases and Major Cell Wall Components in *Candida albicans* Trigger the Release of Neutrophil Extracellular Traps*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2017. **7**: p. 414-414.
159. Wright, T.K., et al., *Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease*. *Respirology*, 2016. **21**(3): p. 467-75.
160. Lugli, E.B., et al., *Expression of citrulline and homocitrulline residues in the lungs of non-smokers and smokers: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis*. *Arthritis research & therapy*, 2015. **17**(1): p. 9-9.
161. Wang, W., W. Peng, and X. Ning, *Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the serum of patients with rheumatoid arthritis*. *Int J Rheum Dis*, 2018. **21**(2): p. 415-421.
162. Khandpur, R., et al., *NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(178): p. 178ra40.
163. Toes, R. and D.S. Pisetsky, *Pathogenic effector functions of ACPA: Where do we stand?* *Ann Rheum Dis*, 2019. **78**(6): p. 716-721.

Literaturverzeichnis

164. Trouw, L.A., et al., *Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways*. *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(7): p. 1923-31.
165. Pratesi, F., et al., *Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps*. *Ann Rheum Dis*, 2014. **73**(7): p. 1414-22.
166. Chen, W., et al., *Neutrophil Function in an Inflammatory Milieu of Rheumatoid Arthritis*. *Journal of immunology research*, 2018. **2018**: p. 8549329-8549329.
167. Carmona-Rivera, C., et al., *Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis*. *Sci Immunol*, 2017. **2**(10).
168. Corsiero, E., et al., *Single cell cloning and recombinant monoclonal antibodies generation from RA synovial B cells reveal frequent targeting of citrullinated histones of NETs*. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2016. **75**(10): p. 1866.
169. Pollmann, S., et al., *Anti-PAD4 autoantibodies in rheumatoid arthritis: levels in serum over time and impact on PAD4 activity as measured with a small synthetic substrate*. *Rheumatology international*, 2012. **32**(5): p. 1271-1276.
170. Jonsson, M.K., et al., *Peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) activity in early rheumatoid arthritis*. *Scand J Rheumatol*, 2020. **49**(2): p. 87-95.
171. Li, R.H.L., et al., *A novel approach to identifying and quantifying neutrophil extracellular trap formation in septic dogs using immunofluorescence microscopy*. *BMC Veterinary Research*, 2018. **14**(1): p. 210.
172. Ekaney, M.L., et al., *Impact of plasma histones in human sepsis and their contribution to cellular injury and inflammation*. *Crit Care*, 2014. **18**(5): p. 543.
173. Keshari, R.S., et al., *Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e48111.
174. Xu, J., et al., *Extracellular histones are major mediators of death in sepsis*. *Nat Med*, 2009. **15**(11): p. 1318-21.
175. Abrams, S.T., et al., *Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013. **187**(2): p. 160-9.
176. Hashiba, M., et al., *Neutrophil extracellular traps in patients with sepsis*. *J Surg Res*, 2015. **194**(1): p. 248-54.
177. Martinod, K., et al., *PAD4-deficiency does not affect bacteremia in polymicrobial sepsis and ameliorates endotoxemic shock*. *Blood*, 2015. **125**(12): p. 1948-56.
178. Wang, H., et al., *Neutrophil Extracellular Trap Mitochondrial DNA and Its Autoantibody in Systemic Lupus Erythematosus and a Proof-of-Concept Trial of Metformin*. *Arthritis Rheumatol*, 2015. **67**(12): p. 3190-200.
179. Smith, C.K. and M.J. Kaplan, *The role of neutrophils in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. *Curr Opin Rheumatol*, 2015. **27**(5): p. 448-53.
180. Fousert, E., R. Toes, and J. Desai, *Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Take the Central Stage in Driving Autoimmune Responses*. *Cells*, 2020. **9**(4).

Literaturverzeichnis

181. Frangou, E., et al., *An emerging role of neutrophils and NETosis in chronic inflammation and fibrosis in systemic lupus erythematosus (SLE) and ANCA-associated vasculitides (AAV): Implications for the pathogenesis and treatment.* *Autoimmun Rev*, 2019. **18**(8): p. 751-760.
182. Hakkim, A., et al., *Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis.* *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. **107**(21): p. 9813-9818.
183. van Dam, L.S., et al., *Intrinsically Distinct Role of Neutrophil Extracellular Trap Formation in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis Compared to Systemic Lupus Erythematosus.* *Arthritis Rheumatol*, 2019. **71**(12): p. 2047-2058.
184. Lood, C., et al., *Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease.* *Nat Med*, 2016. **22**(2): p. 146-53.
185. Villanueva, E., et al., *Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus.* *J Immunol*, 2011. **187**(1): p. 538-52.
186. Olsson, A.-K. and J. Cedervall, *NETosis in Cancer – Platelet–Neutrophil Crosstalk Promotes Tumor-Associated Pathology.* *Frontiers in Immunology*, 2016. **7**(373).
187. Berger-Achituv, S., et al., *A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting.* *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 48.
188. Demers, M., et al., *Priming of neutrophils toward NETosis promotes tumor growth.* *Oncoimmunology*, 2016. **5**(5): p. e1134073.
189. Albrengues, J., et al., *Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice.* *Science*, 2018. **361**(6409).
190. Park, J., et al., *Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps.* *Sci Transl Med*, 2016. **8**(361): p. 361ra138.
191. Kanamaru, R., et al., *Low density neutrophils (LDN) in postoperative abdominal cavity assist the peritoneal recurrence through the production of neutrophil extracellular traps (NETs).* *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 632.
192. van der Windt, D.J., et al., *Neutrophil extracellular traps promote inflammation and development of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic steatohepatitis.* *Hepatology*, 2018. **68**(4): p. 1347-1360.
193. Cools-Lartigue, J., et al., *Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis.* *J Clin Invest*, 2013. **123**(8): p. 3446-58.
194. Leal, A.C., et al., *Tumor-Derived Exosomes Induce the Formation of Neutrophil Extracellular Traps: Implications For The Establishment of Cancer-Associated Thrombosis.* *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 6438.
195. Tohme, S., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress.* *Cancer Res*, 2016. **76**(6): p. 1367-80.
196. Li, P., et al., *Regulation of p53 target gene expression by peptidylarginine deiminase 4.* *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(15): p. 4745-58.
197. Chang, X. and J. Han, *Expression of peptidylarginine deiminase type 4 (PAD4) in various tumors.* *Molecular Carcinogenesis*, 2006. **45**(3): p. 183-196.

Literaturverzeichnis

198. Martinod, K. and D.D. Wagner, *Thrombosis: tangled up in NETs*. Blood, 2014. **123**(18): p. 2768-2776.
199. Fuchs, T.A., et al., *Extracellular DNA traps promote thrombosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(36): p. 15880-5.
200. Massberg, S., et al., *Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases*. Nat Med, 2010. **16**(8): p. 887-96.
201. Clark, S.R., et al., *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. Nat Med, 2007. **13**(4): p. 463-9.
202. von Brühl, M.L., et al., *Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo*. J Exp Med, 2012. **209**(4): p. 819-35.
203. Savchenko, A.S., et al., *VWF-mediated leukocyte recruitment with chromatin decondensation by PAD4 increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice*. Blood, 2014. **123**(1): p. 141-8.
204. Martinod, K., et al., *Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(21): p. 8674-8679.
205. Fowkes, F.G., et al., *Smoking, lipids, glucose intolerance, and blood pressure as risk factors for peripheral atherosclerosis compared with ischemic heart disease in the Edinburgh Artery Study*. Am J Epidemiol, 1992. **135**(4): p. 331-40.
206. Lakier, J.B., *Smoking and cardiovascular disease*. Am J Med, 1992. **93**(1a): p. 8s-12s.
207. Wheaton, A.G., et al., *Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Smoking Status - United States, 2017*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2019. **68**(24): p. 533-538.
208. Madan, R., S. Matalon, and M. Vivero, *Spectrum of Smoking-related Lung Diseases: Imaging Review and Update*. J Thorac Imaging, 2016. **31**(2): p. 78-91.
209. Purdue, M.P. and D.T. Silverman, *Clearing the Air: Summarizing the Smoking-related Relative Risks of Bladder and Kidney Cancer*. European urology, 2016. **70**(3): p. 467-468.
210. O'Keefe, L.M., et al., *Smoking as a risk factor for lung cancer in women and men: a systematic review and meta-analysis*. BMJ Open, 2018. **8**(10): p. e021611.
211. Fircanis, S., et al., *The relation between cigarette smoking and risk of acute myeloid leukemia: an updated meta-analysis of epidemiological studies*. Am J Hematol, 2014. **89**(8): p. E125-32.
212. Ferro, T.N., et al., *Smoking in trauma patients: the effects on the incidence of sepsis, respiratory failure, organ failure, and mortality*. J Trauma, 2010. **69**(2): p. 308-12.
213. Nyhäll-Wåhlin, B.M., et al., *Smoking is a strong risk factor for rheumatoid nodules in early rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(5): p. 601-6.
214. Chua, M.H.Y., et al., *Association Between Cigarette Smoking and Systemic Lupus Erythematosus: An Updated Multivariate Bayesian Metaanalysis*. J Rheumatol, 2020. **47**(10): p. 1514-1521.

Literaturverzeichnis

215. Higuchi, L.M., et al., *A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women*. The American journal of gastroenterology, 2012. **107**(9): p. 1399-1406.
216. Lee, J., et al., *Nicotine drives neutrophil extracellular traps formation and accelerates collagen-induced arthritis*. Rheumatology, 2016. **56**(4): p. 644-653.
217. Hosseinzadeh, A., et al., *Nicotine induces neutrophil extracellular traps*. J Leukoc Biol, 2016. **100**(5): p. 1105-1112.
218. Zou, Y., et al., *Neutrophil extracellular traps induced by cigarette smoke contribute to airway inflammation in mice*. Exp Cell Res, 2020. **389**(1): p. 111888.
219. White, P.C., et al., *Cigarette smoke modifies neutrophil chemotaxis, neutrophil extracellular trap formation and inflammatory response-related gene expression*. J Periodontal Res, 2018. **53**(4): p. 525-535.
220. Jones, J.E., et al., *Protein arginine deiminase 4 (PAD4): Current understanding and future therapeutic potential*. Current opinion in drug discovery & development, 2009. **12**(5): p. 616-627.
221. Cuthbert, G.L., et al., *Histone deimination antagonizes arginine methylation*. Cell, 2004. **118**(5): p. 545-53.
222. Wang, Y., et al., *Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylimination*. Science, 2004. **306**(5694): p. 279-83.
223. Yao, H., et al., *Histone Arg modifications and p53 regulate the expression of OKL38, a mediator of apoptosis*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(29): p. 20060-20068.
224. Lewis, H.D., et al., *Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation*. Nat Chem Biol, 2015. **11**(3): p. 189-91.
225. Rohrbach, A.S., et al., *Activation of PAD4 in NET formation*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 360.
226. Li, P., et al., *PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps*. Journal of Experimental Medicine, 2010. **207**(9): p. 1853-1862.
227. Wang, Y., et al., *Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation*. J Cell Biol, 2009. **184**(2): p. 205-13.
228. Leshner, M., et al., *PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 307.
229. Knight, J.S., et al., *Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(12): p. 2199-206.
230. Moscarello, M.A., et al., *Inhibition of peptidyl-arginine deiminases reverses protein-hypercitrullination and disease in mouse models of multiple sclerosis*. Dis Model Mech, 2013. **6**(2): p. 467-78.
231. Witalison, E.E., et al., *Molecular targeting of protein arginine deiminases to suppress colitis and prevent colon cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(34): p. 36053-36062.
232. Shi, L., et al., *Endogenous PAD4 in Breast Cancer Cells Mediates Cancer Extracellular Chromatin Network Formation and Promotes Lung Metastasis*. Mol Cancer Res, 2020. **18**(5): p. 735-747.

Literaturverzeichnis

233. Yuzhalin, A.E., et al., *Colorectal cancer liver metastatic growth depends on PAD4-driven citrullination of the extracellular matrix*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 4783.
234. Du, M., et al., *Inhibition of peptidyl arginine deiminase-4 protects against myocardial infarction induced cardiac dysfunction*. Int Immunopharmacol, 2020. **78**: p. 106055.
235. Franck, G., et al., *Roles of PAD4 and NETosis in Experimental Atherosclerosis and Arterial Injury*. Circulation Research, 2018. **123**(1): p. 33-42.
236. Acharya, N.K., et al., *Neuronal PAD4 expression and protein citrullination: Possible role in production of autoantibodies associated with neurodegenerative disease*. Journal of Autoimmunity, 2012. **38**(4): p. 369-380.
237. Li, M., et al., *A Novel Peptidylarginine Deiminase 4 (PAD4) Inhibitor BMS-P5 Blocks Formation of Neutrophil Extracellular Traps and Delays Progression of Multiple Myeloma*. Molecular cancer therapeutics, 2020. **19**(7): p. 1530-1538.
238. Yadav, R., et al., *Systemic levels of anti-PAD4 autoantibodies correlate with airway obstruction in cystic fibrosis*. J Cyst Fibros, 2019. **18**(5): p. 636-645.
239. Neeli, I., S.N. Khan, and M. Radic, *Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils*. J Immunol, 2008. **180**(3): p. 1895-902.
240. Mastronardi, F.G., et al., *Increased citrullination of histone H3 in multiple sclerosis brain and animal models of demyelination: a role for tumor necrosis factor-induced peptidylarginine deiminase 4 translocation*. J Neurosci, 2006. **26**(44): p. 11387-96.
241. Dong, S., Z. Zhang, and H. Takahara, *Estrogen-enhanced peptidylarginine deiminase type IV gene (PADI4) expression in MCF-7 cells is mediated by estrogen receptor-alpha-promoted transactors activator protein-1, nuclear factor-Y, and Sp1*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(7): p. 1617-29.
242. Knuckley, B., et al., *Substrate specificity and kinetic studies of PADs 1, 3, and 4 identify potent and selective inhibitors of protein arginine deiminase 3*. Biochemistry, 2010. **49**(23): p. 4852-63.
243. Pritzker, L.B. and M.A. Moscarello, *A novel microtubule independent effect of paclitaxel: the inhibition of peptidylarginine deiminase from bovine brain*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1388**(1): p. 154-60.
244. Knuckley, B., Y. Luo, and P.R. Thompson, *Profiling Protein Arginine Deiminase 4 (PAD4): a novel screen to identify PAD4 inhibitors*. Bioorg Med Chem, 2008. **16**(2): p. 739-45.
245. Wood, D.D., et al., *Myelin localization of peptidylarginine deiminases 2 and 4: comparison of PAD2 and PAD4 activities*. Lab Invest, 2008. **88**(4): p. 354-64.
246. Harney, S.M.J., et al., *Genetic and genomic studies of PADI4 in rheumatoid arthritis*. Rheumatology, 2005. **44**(7): p. 869-872.
247. Samara, K.D., et al., *Upregulation of citrullination pathway: From Autoimmune to Idiopathic Lung Fibrosis*. Respiratory Research, 2017. **18**(1): p. 218.

Literaturverzeichnis

248. Baka, Z., et al., *Increased serum PAD4 and RF in lung cancer is not associated with anti CCP antibody production*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2011. **70**(Suppl 2): p. A4.
249. Makrygiannakis, D., et al., *Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2008. **67**(10): p. 1488.
250. Kilsgård, O., et al., *Peptidylarginine deiminases present in the airways during tobacco smoking and inflammation can citrullinate the host defense peptide LL-37, resulting in altered activities*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012. **46**(2): p. 240-8.
251. Biron, B.M., 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): p. 1817-1828.
252. Massarenti, L., et al., *Peptidylarginine deiminase-4 gene polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis*. Scand J Rheumatol, 2019. **48**(2): p. 133-140.
253. Hanata, N., et al., *Peptidylarginine Deiminase 4 Promotes the Renal Infiltration of Neutrophils and Exacerbates the TLR7 Agonist-Induced Lupus Mice*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1095.
254. Toni, I.M., et al., *Increase Expression of the Genes PADI4, MPO and ELANE in the Chronic Phase of DVT Patients*. Blood, 2019. **134**(Supplement_1): p. 4921-4921.
255. Yadav, R., et al., *Systemic levels of anti-PAD4 autoantibodies correlate with airway obstruction in cystic fibrosis*. Journal of Cystic Fibrosis, 2019. **18**(5): p. 636-645.
256. Edwards, R. and K.G. Harding, *Bacteria and wound healing*. Curr Opin Infect Dis, 2004. **17**(2): p. 91-6.
257. Al-Taki, M., et al., *Effect of Gender on Postoperative Morbidity and Mortality Outcomes: A Retrospective Cohort Study*. Am Surg, 2018. **84**(3): p. 377-386.
258. Hardman, M.J. and G.S. Ashcroft, *Estrogen, not intrinsic aging, is the major regulator of delayed human wound healing in the elderly*. Genome Biol, 2008. **9**(5): p. R80.
259. Gilliver, S.C., J.J. Ashworth, and G.S. Ashcroft, *The hormonal regulation of cutaneous wound healing*. Clin Dermatol, 2007. **25**(1): p. 56-62.
260. McDaniel, J.C., et al., *Omega-3 fatty acids effect on wound healing*. Wound Repair Regen, 2008. **16**(3): p. 337-45.
261. Arnold, M. and A. Barbul, *Nutrition and wound healing*. Plast Reconstr Surg, 2006. **117**(7 Suppl): p. 42s-58s.
262. Heyman, H., et al., *Benefits of an oral nutritional supplement on pressure ulcer healing in long-term care residents*. J Wound Care, 2008. **17**(11): p. 476-8, 480.
263. Rehm, J., et al., *Alcohol-related morbidity and mortality*. Alcohol Res Health, 2003. **27**(1): p. 39-51.
264. Eliassen, M., et al., *Preoperative alcohol consumption and postoperative complications: a systematic review and meta-analysis*. Ann Surg, 2013. **258**(6): p. 930-42.
265. Radek, K.A., et al., *Acute ethanol exposure impairs angiogenesis and the proliferative phase of wound healing*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(3): p. H1084-90.

Literaturverzeichnis

266. Fitzgerald, D.J., et al., *Effects of acute ethanol exposure on the early inflammatory response after excisional injury*. Alcohol Clin Exp Res, 2007. **31**(2): p. 317-23.
267. Greiffenstein, P. and P.E. Molina, *Alcohol-induced alterations on host defense after traumatic injury*. J Trauma, 2008. **64**(1): p. 230-40.
268. McMaster, S.K., et al., *Cigarette smoke inhibits macrophage sensing of Gram-negative bacteria and lipopolysaccharide: relative roles of nicotine and oxidant stress*. Br J Pharmacol, 2008. **153**(3): p. 536-43.
269. Sørensen, L.T., et al., *Acute effects of nicotine and smoking on blood flow, tissue oxygen, and aerobic metabolism of the skin and subcutis*. J Surg Res, 2009. **152**(2): p. 224-30.
270. Ahn, C., P. Mulligan, and R.S. Salcido, *Smoking-the bane of wound healing: biomedical interventions and social influences*. Adv Skin Wound Care, 2008. **21**(5): p. 227-36; quiz 237-8.
271. Wong, J., et al., *Short-term preoperative smoking cessation and postoperative complications: a systematic review and meta-analysis*. Can J Anaesth, 2012. **59**(3): p. 268-79.
272. Gu, A., et al., *Postoperative Complications and Impact of Diabetes Mellitus Severity on Revision Total Knee Arthroplasty*. J Knee Surg, 2020. **33**(3): p. 228-234.
273. Ting, C., et al., *Impairment of immune systems in diabetes*. Adv Exp Med Biol, 2012. **771**: p. 62-75.
274. Berbudi, A., et al., *Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System*. Curr Diabetes Rev, 2020. **16**(5): p. 442-449.
275. Quattrini, C., et al., *Reduced vascular endothelial growth factor expression and intra-epidermal nerve fiber loss in human diabetic neuropathy*. Diabetes Care, 2008. **31**(1): p. 140-5.
276. Galkowska, H., et al., *Neurogenic factors in the impaired healing of diabetic foot ulcers*. J Surg Res, 2006. **134**(2): p. 252-8.
277. Suda, A.J., et al., *High complication rate after septic orthopaedic implant removal of the lower leg*. Arch Orthop Trauma Surg, 2014. **134**(12): p. 1655-60.
278. Abe, T., et al., *Trauma complications and in-hospital mortality: failure-to-rescue*. Critical Care, 2020. **24**(1): p. 223.
279. Hagino, T., et al., *Complications after arthroscopic knee surgery*. Arch Orthop Trauma Surg, 2014. **134**(11): p. 1561-4.
280. Makrantonaki, E., M. Wlaschek, and K. Scharffetter-Kochanek, *Pathogenesis of wound healing disorders in the elderly*. J Dtsch Dermatol Ges, 2017. **15**(3): p. 255-275.
281. Beyene, R.T., S.L. Derryberry, Jr., and A. Barbul, *The Effect of Comorbidities on Wound Healing*. Surg Clin North Am, 2020. **100**(4): p. 695-705.
282. Menke, N.B., et al., *Impaired wound healing*. Clinics in Dermatology, 2007. **25**(1): p. 19-25.
283. Guo, S. and L.A. Dipietro, *Factors affecting wound healing*. J Dent Res, 2010. **89**(3): p. 219-29.
284. Kiecolt-Glaser, J.K., et al., *Slowing of wound healing by psychological stress*. Lancet, 1995. **346**(8984): p. 1194-6.

Literaturverzeichnis

285. Wan, R., et al., *Diabetic wound healing: The impact of diabetes on myofibroblast activity and its potential therapeutic treatments*. Wound Repair Regen, 2021. **29**(4): p. 573-581.
286. Turrentine, F.E., et al., *Surgical risk factors, morbidity, and mortality in elderly patients*. J Am Coll Surg, 2006. **203**(6): p. 865-77.
287. Tjeertes, E.K.M., et al., *Obesity--a risk factor for postoperative complications in general surgery?* BMC anesthesiology, 2015. **15**: p. 112-112.
288. Greco, J.A., 3rd, et al., *The effect of weight loss surgery and body mass index on wound complications after abdominal contouring operations*. Ann Plast Surg, 2008. **61**(3): p. 235-42.
289. Emery, C.F., et al., *Exercise accelerates wound healing among healthy older adults: a preliminary investigation*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2005. **60**(11): p. 1432-6.
290. Emery, N.J., et al., *Cognitive adaptations of social bonding in birds*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 2007. **362**(1480): p. 489-505.
291. Ramos Dos Santos, P.M., et al., *Effects of early mobilisation in patients after cardiac surgery: a systematic review*. Physiotherapy, 2017. **103**(1): p. 1-12.
292. Bootun, R., *Effects of immunosuppressive therapy on wound healing*. Int Wound J, 2013. **10**(1): p. 98-104.
293. Wagner, A.E., et al., *Dexamethasone impairs hypoxia-inducible factor-1 function*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **372**(2): p. 336-40.
294. Dong, Y.L., et al., *Effect of ibuprofen on the inflammatory response to surgical wounds*. J Trauma, 1993. **35**(3): p. 340-3.
295. Kolb, B.A., et al., *Effects of early postoperative chemotherapy on wound healing*. Obstet Gynecol, 1992. **79**(6): p. 988-92.
296. Scappaticci, F.A., et al., *Surgical wound healing complications in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab*. J Surg Oncol, 2005. **91**(3): p. 173-80.
297. Kaur, T., et al., *Modulating neutrophil extracellular traps for wound healing*. Biomater Sci, 2020. **8**(11): p. 3212-3223.
298. De Vita, M.J., et al., *Pack-years of tobacco cigarette smoking as a predictor of spontaneous pain reporting and experimental pain reactivity*. Exp Clin Psychopharmacol, 2019. **27**(6): p. 552-560.
299. Bernaards, C.M., et al., *Is calculating pack-years retrospectively a valid method to estimate life-time tobacco smoking? A comparison between prospectively calculated pack-years and retrospectively calculated pack-years*. Addiction, 2001. **96**(11): p. 1653-61.
300. Lakomkin, N., et al., *Incidence and predictive risk factors of postoperative sepsis in orthopedic trauma patients*. J Orthop Traumatol, 2017. **18**(2): p. 151-158.
301. Wang, J., et al., *Postoperative adverse events in patients with diabetes undergoing orthopedic and general surgery*. Medicine (Baltimore), 2019. **98**(14): p. e15089.
302. Rentenversicherung, D., *Leitlinien zur Rehabilitationsbedürftigkeit - Leistungen zur Teilhabe am Arbeitsleben*. 2005.
303. Williamson, A. and B. Hoggart, *Pain: a review of three commonly used pain rating scales*. J Clin Nurs, 2005. **14**(7): p. 798-804.

Literaturverzeichnis

304. Drescher, T., et al., *Comparison of two malnutrition risk screening methods (MNA and NRS 2002) and their association with markers of protein malnutrition in geriatric hospitalized patients*. Eur J Clin Nutr, 2010. **64**(8): p. 887-93.
305. Kondrup, J., et al., *Nutritional risk screening (NRS 2002): a new method based on an analysis of controlled clinical trials*. Clin Nutr, 2003. **22**(3): p. 321-36.
306. Tarlov, A.R., et al., *The Medical Outcomes Study. An application of methods for monitoring the results of medical care*. Jama, 1989. **262**(7): p. 925-30.
307. RAND, C., *36-Item Short Form Survey (SF-36)*. 1989.
308. Eisenberg, E. and E.Y. Levanon, *Human housekeeping genes, revisited*. Trends Genet, 2013. **29**(10): p. 569-74.
309. Kozera, B. and M. Rapacz, *Reference genes in real-time PCR*. J Appl Genet, 2013. **54**(4): p. 391-406.
310. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biology, 2002. **3**(7): p. research0034.1.
311. Mestdagh, P., et al., *A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization*. Genome Biology, 2009. **10**(6): p. R64.
312. Pfaffl, M.W., et al., *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations*. Biotechnology Letters, 2004. **26**(6): p. 509-515.
313. Andersen, C.L., J.L. Jensen, and T.F. Ørntoft, *Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets*. Cancer Res, 2004. **64**(15): p. 5245-50.
314. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
315. World Health, O., *WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy*. 2010, World Health Organization: Geneva.
316. Cedarlane, L., *Lympholyte®-poly*.
317. Abcam, *Western Blotting - A Beginners Guide*.
318. Peqlab, *peqGOLD TriFast Datenblatt*.
319. ThermoFisher, *First Strand cDNA Synthesis Kit #K1612 - Manual*.
320. Holzapfel, B. and L. Wickert, *Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete*. Biologie in unserer Zeit, 2007. **37**(2): p. 120-126.
321. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome Res, 1996. **6**(10): p. 986-94.
322. Watson, S., et al., *Determination of suitable housekeeping genes for normalisation of quantitative real time PCR analysis of cells infected with human immunodeficiency virus and herpes viruses*. Virol J, 2007. **4**: p. 130.
323. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
324. CarlRoth, *Gebrauchsanweisung - Blotting/Transfer-Geräte*.

Literaturverzeichnis

325. Bolt, M.W. and P.A. Mahoney, *High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. Anal Biochem, 1997. **247**(2): p. 185-92.
326. Abcam, *Dot Blot protocol*.
327. Ji, J., J. Sundquist, and K. Sundquist, *Gender-specific incidence of autoimmune diseases from national registers*. J Autoimmun, 2016. **69**: p. 102-6.
328. Kronzer, V.L., S.L. Bridges, Jr., and J.M. Davis, 3rd, *Why women have more autoimmune diseases than men: An evolutionary perspective*. Evol Appl, 2021. **14**(3): p. 629-633.
329. Rodgers, J.L., et al., *Cardiovascular Risks Associated with Gender and Aging*. J Cardiovasc Dev Dis, 2019. **6**(2).
330. Arnold, M., et al., *Age-dependent differences in demographics, risk factors, co-morbidity, etiology, management, and clinical outcome of acute ischemic stroke*. J Neurol, 2008. **255**(10): p. 1503-7.
331. Merhe, A., et al., *Is age an independent risk factor for perioperative mortality and morbidity after radical prostatectomy? Analysis of the American college of surgeons national surgical quality improvement program database*. Arab J Urol, 2020. **18**(2): p. 72-77.
332. Chikuda, H., et al., *Impact of age and comorbidity burden on mortality and major complications in older adults undergoing orthopaedic surgery: an analysis using the Japanese diagnosis procedure combination database*. BMC Musculoskelet Disord, 2013. **14**: p. 173.
333. Navickas, R., et al., *Multimorbidity: What do we know? What should we do?* J Comorb, 2016. **6**(1): p. 4-11.
334. Hersberger, L., et al., *Nutritional risk screening (NRS 2002) is a strong and modifiable predictor risk score for short-term and long-term clinical outcomes: secondary analysis of a prospective randomised trial*. Clin Nutr, 2020. **39**(9): p. 2720-2729.
335. Felder, S., et al., *Association of nutritional risk and adverse medical outcomes across different medical inpatient populations*. Nutrition, 2015. **31**(11-12): p. 1385-93.
336. Ihle, C., et al., *[Malnutrition in Elderly Trauma Patients - Comparison of Two Assessment Tools]*. Zeitschrift fur Orthopadie und Unfallchirurgie, 2017. **155**(2): p. 184-193.
337. Abdel-Magid, A.F., *Great Therapeutic Potential of Peptidylarginine Deiminase 4 (PAD4) Inhibitors: Treatment of Rheumatoid Arthritis, Epigenetic Tools, Regulation of Pluripotency in Stem Cells, and More*. ACS medicinal chemistry letters, 2016. **8**(1): p. 19-21.
338. Lykhatskyi, P., et al., *EFFECT OF TOBACCO SMOKE ON ROS PRODUCTION AND INFLAMMATION IN RATS OF DIFFERENT AGE*. Georgian Med News, 2018(Issue): p. 150-157.
339. Mergaert, A.M., et al., *Reduced Anti-Histone Antibodies and Increased Risk of Rheumatoid Arthritis Associated with a Single Nucleotide Polymorphism in PADI4 in North Americans*. International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(12): p. 3093.
340. Pearson, R.G., et al., *Do smokers have greater risk of delayed and non-union after fracture, osteotomy and arthrodesis? A systematic review with meta-analysis*. BMJ Open, 2016. **6**(11): p. e010303.

Literaturverzeichnis

341. Fang, M., et al., *The Effect of Advancing Age on Total Joint Replacement Outcomes*. Geriatr Orthop Surg Rehabil, 2015. **6**(3): p. 173-9.
342. Friberger Pajalic, K., A. Turkiewicz, and M. Englund, *Update on the risks of complications after knee arthroscopy*. BMC Musculoskelet Disord, 2018. **19**(1): p. 179.
343. Liu, X., et al., *PAD4 takes charge during neutrophil activation: Impact of PAD4 mediated NET formation on immune-mediated disease*. J Thromb Haemost, 2021. **19**(7): p. 1607-1617.
344. Song, S.T., et al., *Association of Single Nucleotide Polymorphisms of PADI4 and HLA-DRB1 Alleles with Susceptibility to Rheumatoid Arthritis-Related Lung Diseases*. Lung, 2016. **194**(5): p. 745-753.
345. Ahn, K.S., et al., *Luminol chemiluminescence biosensor for glycated hemoglobin (HbA1c) in human blood samples*. Biosens Bioelectron, 2016. **75**: p. 82-7.
346. Mahmood, T. and P.C. Yang, *Western blot: technique, theory, and trouble shooting*. N Am J Med Sci, 2012. **4**(9): p. 429-34.
347. Hawez, A., et al., *MiR-155 Regulates PAD4-Dependent Formation of Neutrophil Extracellular Traps*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2462.
348. Van Avondt, K., L. Maegdefessel, and O. Soehnlein, *Therapeutic Targeting of Neutrophil Extracellular Traps in Atherogenic Inflammation*. Thromb Haemost, 2019. **119**(4): p. 542-552.
349. Gupta, S., et al., *Sex differences in neutrophil biology modulate response to type I interferons and immunometabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(28): p. 16481-16491.
350. Yuan, X.Z., *Sex differences in neutrophil extracellular trap formation*. University of Toronto, 2018.
351. Blazkova, J., et al., *Multicenter Systems Analysis of Human Blood Reveals Immature Neutrophils in Males and During Pregnancy*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2017. **198**(6): p. 2479-2488.
352. Giaglis, S., et al., *Multimodal Regulation of NET Formation in Pregnancy: Progesterone Antagonizes the Pro-NETotic Effect of Estrogen and G-CSF*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 565.
353. Lampert, T., E.v.d. Lippe, and S. Müters, *Prevalence of smoking in the adult population of Germany*. 2013, Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
354. Yasuda, H., et al., *17- β -estradiol enhances neutrophil extracellular trap formation by interaction with estrogen membrane receptor*. Arch Biochem Biophys, 2019. **663**: p. 64-70.
355. Lyttle Schumacher, B.M., J.E. Mersereau, and A.Z. Steiner, *Cycle day, estrogen level, and lead follicle size: analysis of 27,790 in vitro fertilization cycles to determine optimal start criteria for gonadotropin-releasing hormone antagonist*. Fertil Steril, 2018. **109**(4): p. 633-637.
356. Beverly G Reed, M.a.B.R.C., MD, *The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation*. 2018.
357. Peacock K, K.K., *Menopause*. StatPearls, 2021.
358. Gurralla, R., et al., *Alterations in the estrogen receptor profile of cardiovascular tissues during aging*. Geroscience, 2021. **43**(1): p. 433-442.

Literaturverzeichnis

359. Pirie, K., et al., *The 21st century hazards of smoking and benefits of stopping: a prospective study of one million women in the UK*. Lancet, 2013. **381**(9861): p. 133-41.
360. Gonzalez, A.I., et al., *Is There an Association Between Smoking Status and Prosthetic Joint Infection After Primary Total Joint Arthroplasty?* J Arthroplasty, 2018. **33**(7): p. 2218-2224.
361. Meliska, C.J., et al., *Immune function in cigarette smokers who quit smoking for 31 days*. J Allergy Clin Immunol, 1995. **95**(4): p. 901-10.
362. Flory, J.H., et al., *Socioeconomic risk factors for bacteraemic pneumococcal pneumonia in adults*. Epidemiol Infect, 2009. **137**(5): p. 717-26.
363. Godoy, P., et al., *Smoking may increase the risk of influenza hospitalization and reduce influenza vaccine effectiveness in the elderly*. Eur J Public Health, 2018. **28**(1): p. 150-155.
364. Rogers, M.A., et al., *Higher rates of Clostridium difficile infection among smokers*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e42091.
365. Huttunen, R., et al., *Obesity and smoking are factors associated with poor prognosis in patients with bacteraemia*. BMC Infect Dis, 2007. **7**: p. 13.
366. Guillemin, F., et al., *Older Age at Multiple Sclerosis Onset Is an Independent Factor of Poor Prognosis: A Population-Based Cohort Study*. Neuroepidemiology, 2017. **48**(3-4): p. 179-187.
367. Kato, E., et al., *The age at onset of rheumatoid arthritis is increasing in Japan: a nationwide database study*. Int J Rheum Dis, 2017. **20**(7): p. 839-845.
368. de Groot, P.M., et al., *The epidemiology of lung cancer*. Transl Lung Cancer Res, 2018. **7**(3): p. 220-233.
369. Sumin, A.N., et al., *[Prevalence of multifocal atherosclerosis in different age groups]*. Kardiologija, 2012. **52**(6): p. 28-34.
370. Liu, Y., et al., *Myeloid-Specific Deletion of Peptidylarginine Deiminase 4 Mitigates Atherosclerosis*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1680.
371. Knight, J.S., et al., *Peptidylarginine deiminase inhibition reduces vascular damage and modulates innate immune responses in murine models of atherosclerosis*. Circ Res, 2014. **114**(6): p. 947-56.
372. Harris, K.K., M. Zopey, and T.C. Friedman, *Metabolic effects of smoking cessation*. Nat Rev Endocrinol, 2016. **12**(5): p. 299-308.
373. Williamson, D.F., et al., *Smoking cessation and severity of weight gain in a national cohort*. N Engl J Med, 1991. **324**(11): p. 739-45.
374. Silva, F.R., et al., *Factors associated with malnutrition in hospitalized cancer patients: a cross-sectional study*. Nutr J, 2015. **14**: p. 123.
375. Zhang, Y., et al., *Malnutrition delayed wound healing after tooth extraction by HMGB1-related prolonged inflammation*. Int Immunopharmacol, 2021. **96**: p. 107772.
376. Lugade, A.A., et al., *Cigarette Smoke Exposure Exacerbates Lung Inflammation and Compromises Immunity to Bacterial Infection*. The Journal of Immunology, 2014. **192**(11): p. 5226.
377. Chen, H., et al., *Tobacco smoking inhibits expression of proinflammatory cytokines and activation of IL-1R-associated kinase, p38, and NF-kappaB in alveolar macrophages stimulated with TLR2 and TLR4 agonists*. J Immunol, 2007. **179**(9): p. 6097-106.

Literaturverzeichnis

378. Shiels, M.S., et al., *Cigarette smoking and variations in systemic immune and inflammation markers*. J Natl Cancer Inst, 2014. **106**(11).
379. Knight, J.S., et al., *Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus*. J Clin Invest, 2013. **123**(7): p. 2981-93.
380. Liu, Y., et al., *Peptidylarginine deiminases 2 and 4 modulate innate and adaptive immune responses in TLR-7-dependent lupus*. JCI Insight, 2018. **3**(23).
381. Hemmers, S., et al., *PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22043.
382. Claushuis, T.A.M., et al., *Role of Peptidylarginine Deiminase 4 in Neutrophil Extracellular Trap Formation and Host Defense during Klebsiella pneumoniae-Induced Pneumonia-Derived Sepsis*. J Immunol, 2018. **201**(4): p. 1241-1252.
383. Gordon, R.A., et al., *Lupus and proliferative nephritis are PAD4 independent in murine models*. JCI Insight, 2017. **2**(10).
384. Thiam, H.R., et al., *NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(13): p. 7326-7337.
385. Valavanidis, A., T. Vlachogianni, and K. Fiotakis, *Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles*. Int J Environ Res Public Health, 2009. **6**(2): p. 445-62.
386. Matthews, J.B., et al., *Effect of nicotine, cotinine and cigarette smoke extract on the neutrophil respiratory burst*. J Clin Periodontol, 2011. **38**(3): p. 208-18.
387. Chang, K., et al., *Smoking and rheumatoid arthritis*. International journal of molecular sciences, 2014. **15**(12): p. 22279-22295.
388. Darrah, E., et al., *Erosive rheumatoid arthritis is associated with antibodies that activate PAD4 by increasing calcium sensitivity*. Sci Transl Med, 2013. **5**(186): p. 186ra65.
389. Fisher, B.A. and P.J. Venables, *Inhibiting citrullination in rheumatoid arthritis: taking fuel from the fire*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(1): p. 108.
390. Suzuki, A., et al., *Decreased severity of experimental autoimmune arthritis in peptidylarginine deiminase type 4 knockout mice*. BMC Musculoskelet Disord, 2016. **17**: p. 205.
391. Sorvillo, N., et al., *Plasma Peptidylarginine Deiminase IV Promotes VWF-Platelet String Formation and Accelerates Thrombosis After Vessel Injury*. Circ Res, 2019. **125**(5): p. 507-519.
392. Saha, P., et al., *PAD4-dependent NETs generation are indispensable for intestinal clearance of Citrobacter rodentium*. Mucosal Immunol, 2019. **12**(3): p. 761-771.
393. Duan, Q., et al., *Overexpression of PAD4 suppresses drug resistance of NSCLC cell lines to gefitinib through inhibiting Elk1-mediated epithelial-mesenchymal transition*. Oncol Rep, 2016. **36**(1): p. 551-558.

Literaturverzeichnis

394. Zhou, Q., et al., *Peptidylarginine deiminase 4 overexpression resensitizes MCF-7/ADR breast cancer cells to adriamycin via GSK3 β /p53 activation*. *Cancer Manag Res*, 2019. **11**: p. 625-636.
395. Aliko, A., et al., *Discovery of Novel Potential Reversible Peptidyl Arginine Deiminase Inhibitor*. *International journal of molecular sciences*, 2019. **20**(9): p. 2174.
396. Willis, V.C., et al., *Protein arginine deiminase 4 inhibition is sufficient for the amelioration of collagen-induced arthritis*. *Clin Exp Immunol*, 2017. **188**(2): p. 263-274.
397. Hua, J. and W. Huang, *Peptidylarginine deiminase 4 -104C/T polymorphism and risk of rheumatoid arthritis: A pooled analysis based on different populations*. *PLoS One*, 2018. **13**(3): p. e0193674.
398. Suzuki, A., et al., *Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis*. *Nat Genet*, 2003. **34**(4): p. 395-402.
399. Söderberg, D. and M. Segelmark, *Neutrophil Extracellular Traps in ANCA-Associated Vasculitis*. *Frontiers in immunology*, 2016. **7**: p. 256-256.
400. Kallenberg, C.G., *Pathogenesis of ANCA-associated vasculitides*. *Ann Rheum Dis*, 2011. **70 Suppl 1**: p. i59-63.
401. Kessenbrock, K., et al., *Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis*. *Nat Med*, 2009. **15**(6): p. 623-5.
402. Sangaletti, S., et al., *Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity*. *Blood*, 2012. **120**(15): p. 3007-18.
403. Yoshida, M., et al., *Neutrophil extracellular trap components in fibrinoid necrosis of the kidney with myeloperoxidase-ANCA-associated vasculitis*. *Clin Kidney J*, 2013. **6**(3): p. 308-12.
404. Yoshida, Y., et al., *Enhanced formation of neutrophil extracellular traps in Kawasaki disease*. *Pediatr Res*, 2020. **87**(6): p. 998-1004.
405. Drechsler, M., et al., *Hyperlipidemia-Triggered Neutrophilia Promotes Early Atherosclerosis*. *Circulation*, 2010. **122**(18): p. 1837-1845.
406. Soehnlein, O., *Multiple Roles for Neutrophils in Atherosclerosis*. *Circulation Research*, 2012. **110**(6): p. 875-888.
407. Moreno, J.A., et al., *In vitro and in vivo evidence for the role of elastase shedding of CD163 in human atherothrombosis*. *European Heart Journal*, 2011. **33**(2): p. 252-263.
408. Farsalinos, K., et al., *Current smoking, former smoking, and adverse outcome among hospitalized COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis*. *Ther Adv Chronic Dis*, 2020. **11**: p. 2040622320935765.
409. Vassallo, A., et al., *The counter-intuitive role of the neutrophil in the acute respiratory distress syndrome*. *Br Med Bull*, 2019. **131**(1): p. 43-55.
410. Grégoire, M., et al., *Impaired efferocytosis and neutrophil extracellular trap clearance by macrophages in ARDS*. *European Respiratory Journal*, 2018. **52**(2): p. 1702590.
411. Gottlieb, Y., et al., *Neutrophil extracellular traps in pediatric inflammatory bowel disease*. *Pathol Int*, 2018. **68**(9): p. 517-523.
412. Dinallo, V., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Sustain Inflammatory Signals in Ulcerative Colitis*. *J Crohns Colitis*, 2019. **13**(6): p. 772-784.

Literaturverzeichnis

413. Diana, J., et al., *Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes*. Nature Medicine, 2013. **19**: p. 65-73.
414. Sodr , F.M.C., et al., *Peptidylarginine Deiminase Inhibition Prevents Diabetes Development in NOD Mice*. Diabetes, 2021. **70**(2): p. 516.
415. Muñoz, L.E., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Initiate Gallstone Formation*. Immunity, 2019. **51**(3): p. 443-450.e4.
416. Schauer, C., et al., *Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines*. Nat Med, 2014. **20**(5): p. 511-7.
417. Erpenbeck, L., et al., *PAD4 Deficiency Decreases Inflammation and Susceptibility to Pregnancy Loss in a Mouse Model*. Biology of reproduction, 2016. **95**(6): p. 132-132.
418. Lin, A.M., et al., *Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis*. J Immunol, 2011. **187**(1): p. 490-500.
419. Dwivedi, N., et al., *Deimination of linker histones links neutrophil extracellular trap release with autoantibodies in systemic autoimmunity*. Faseb j, 2014. **28**(7): p. 2840-51.
420. Nissinen, R., et al., *Peptidylarginine deiminase, the arginine to citrulline converting enzyme, is frequently recognized by sera of patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and primary Sjögren syndrome*. Scandinavian Journal of Rheumatology, 2003. **32**(6): p. 337-342.
421. Manzenreiter, R., et al., *Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy*. Journal of Cystic Fibrosis, 2012. **11**(2): p. 84-92.
422. Henke, M.O. and F. Ratjen, *Mucolytics in cystic fibrosis*. Paediatr Respir Rev, 2007. **8**(1): p. 24-9.
423. Nayak, A., et al., *An Insight into the Diverse Roles of Surfactant Proteins, SP-A and SP-D in Innate and Adaptive Immunity*. Frontiers in immunology, 2012. **3**: p. 131-131.
424. Noah, T.L., et al., *Bronchoalveolar lavage fluid surfactant protein-A and surfactant protein-D are inversely related to inflammation in early cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(6): p. 685-91.
425. Shak, S., et al., *Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(23): p. 9188-9192.

9. Erklärungen der Dissertationsschrift

Die Doktorarbeit wurde in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen, Siegfried-Weller-Institut für unfallmedizinische Forschung, unter Betreuung von Frau PD Dr. sc. hum. Sabrina Ehnert und Frau Caren Linnemann und unter der Institutsleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas K. Nüssler durchgeführt.

Die Studie wurde von Frau PD Dr. sc. hum. Sabrina Ehnert konzipiert.

Die Datenerhebung erfolgte in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen.

Die Blutentnahmen wurden mit schriftlichem Einverständnis der Patienten der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen durch mich, Jonas Mück, eigenständig durchgeführt.

Die Befragungen während des Klinikaufenthalts und danach telefonisch wurden von mir, Jonas Mück, eigenständig durchgeführt.

Die *PADI4* mRNA- und Protein-Messungen mit der Realtime qPCR und dem Dot Blot wurden im Siegfried-Weller-Institut für Unfallmedizinische Forschung der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen von Frau PD Dr. sc. hum. Sabrina Ehnert betreut und von mir, Jonas Mück, eigenständig durchgeführt.

Sämtliche Verfahren und Messungen wurden unter Anleitung und Aufsicht von Frau Caren Linnemann (PhD Studierende) und Frau Bianca Braun (Labortechnische Assistentin) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung wurde unter Aufsicht von Frau Serna-Higueta unter der Leitung von Prof. Martus des Instituts für Medizinische Biometrie Tübingen von mir, Jonas Mück, durchgeführt.

Die Nutzung der externen Abb. 2 und 3 vom DKFZ, Frau Katrin Schaller, Abb. 4 von Herrn Attila Mocsai, Abb. 5 von Herrn Jing Wang, Abb. 6 von Herrn Volker

Erklärungen der Dissertationsschrift

Brinkmann und Abb. 7 von Frau PD Dr. sc. hum. Sabrina Ehnert wurden von den jeweiligen Erstautoren der jeweiligen Publikationen genehmigt und in der Schrift entsprechend als Quelle angegeben. Die Nutzungserlaubnisse wurden per eMail erteilt und entsprechend an das Promotionsbüro Tübingen weitergeleitet.

Die Korrektur der Arbeit erfolgte durch Frau PD Dr. sc. hum. Sabrina Ehnert.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich entsprechend gekennzeichnet. Die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten an der Eberhard Karls Universität Tübingen wurden beachtet. Ich erkläre außerdem, dass die hier vorliegende Dissertation ausschließlich in diesem Promotionsverfahren eingereicht wurde und dass diesem Promotionsverfahren keine anderen endgültigen Promotionsverfahren vorausgegangen sind. Das Ergebnis der Plagiatsprüfung ergab keine bedenklichen Funde. Weiterhin erkläre ich, dass kein Strafverfahren gegen mich läuft. Mir ist bewusst, dass bei Falschangaben ein eventuell verliehener akademischer Grad wieder entzogen werden kann. Zuletzt erkläre ich, dass keine finanziellen oder kommerziellen Interessen oder Hintergründe hinter dieser Arbeit standen. Auch hier sind mir die Folgen von Falschangaben bekannt.

Tübingen,

Danksagung

10. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Frau PD Dr. sc. hum. Sabrina Ehnert für die Bereitstellung des Themas sowie die intensive und fördernde Betreuung.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. sc. hum. Caren Linnemann für ihre souveräne und ausdauernde Unterstützung bis zur Fertigstellung dieser Arbeit, sowie die kontinuierliche Hilfe bei den Experimenten.

Die Zusammenarbeit mit euch beiden hat große Freude bereitet und wäre ohne euch nicht möglich gewesen.

Auch Herrn Prof. Nüssler danke ich äußerst für die Aufnahme in sein Labor und die hochklassige, wissenschaftliche Unterstützung.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Serna-Higueta unter der Leitung von Prof. Martus für die umfangreiche Beratung bei der statistischen Auswertung.

Außerdem möchte ich mich besonders bei meiner Freundin, Lucy, meinen Eltern, meinen Geschwistern, Tobi und Luisa, sowie meinen Freunden, Daud, Felix, Lukas und vielen weiteren Tübingern, Freiburgern und Bonnern für die moralische Unterstützung und Stärkung bedanken.

Ich liebe euch!