

Aus der Klinik und Poliklinik für  
Herzchirurgie, herzchirurgische Intensivmedizin und Thoraxchirurgie  
der Universität zu Köln  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Wahlers

**Untersuchungen zum Einfluss von Neutrophil  
Extracellular Traps und IL-6 auf HL-1  
Kardiomyozyten unter hypoxischen und  
normoxischen Bedingungen in vitro**

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

vorgelegt von  
Tom Podgorski  
aus Köln

promoviert am 06.10.2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
2022

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

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

#### Erklärung

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

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten: Frau Priv. Doz. Dr. Paunel-Görgülü.

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

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

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Priv. Doz. Paunel-Görgülü von mir selbst ausgeführt worden. Die Gewinnung der NETs erfolgte vorab durch die medizinisch-technischen Assistentinnen des Labors.

#### Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

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

Köln, den 06.10.2022

Unterschrift:  .....

## Danksagung

Ich danke Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Thorsten Wahlers für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in der Klinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Universitätsklinik Köln durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Paunel-Görgülü für die freundliche Überlassung dieses spannenden Promotionsthemas und für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Zudem danke ich dem Laborteam, insbesondere Laura Suhr, für ihre stetige moralische und fachliche Unterstützung. Ich werde unsere gemeinsame Laborerfahrung stets bei mir tragen. Mascha, Thuy-Diem, Till, Nedim, Leonie, Sarah und Nam Gyu danke ich für den regelmäßigen akademischen und gesellschaftlichen Austausch, der diese Arbeit begleitet hat.

Für Mama, Papa, Adrian, Martina und Anna

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>7</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>8</b>
1.1. Summary	10
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>12</b>
2.1. Myokardinfarkt	12
2.1.1. Epidemiologie und Ursache des Myokardinfarktes	12
2.1.2. Komplikationen und Therapie des Myokardinfarktes	12
2.2. Kardiales Remodeling	13
2.2.1. Phasen des Remodelings	13
2.2.2. Regulation des Remodelings durch Zytokine	14
2.3. Einfluss von PMN auf Myokardinfarkte	16
2.4. NETs	17
2.4.1. Ablauf der NETose	18
2.4.2. Einfluss von NETs auf verschiedenen Erkrankungen	19
2.4.3. Der Einfluss von NETs auf Myokardinfarkte	21
2.5. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	23
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
3.1. Material	25
3.2. Methoden	32
3.2.1. Isolierung von murinen PMN aus Knochenmark	32
3.2.2. NETs Gewinnung aus stimulierten PMN	33
3.2.3. Konzentrationsbestimmung der NETs	33
3.2.4. HL-1 Zellen	33
3.2.5. Auftauen und Kultivierung von HL1 Zellen	34
3.2.6. Hypoxische Zellkulturbedingungen	34
3.2.7. Splitten der Zellen	35
3.2.8. Quantifizierung der Zellen	35
3.2.9. Versuchsanordnung	36
3.2.10. In vitro Behandlung mit NETs	36
3.2.11. Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie	36
3.2.12. RNA Isolation mittels Trizol	38
3.2.13. RNA Aufreinigung	40

3.2.14.	Konzentrationsmessung von RNA	40
3.2.15.	Reverse Transkription	40
3.2.16.	Real time PCR	41
3.2.17.	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA Assay	43
3.2.18.	SDS-PAGE	44
3.2.19.	Western Blot	45
3.2.20.	Immundetektion von Proteinen	46
3.2.21.	Blot-Stripping	47
3.2.22.	Proliferationsassay	48
3.2.23.	Statistische Auswertung	48
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
4.1.	HIF-1 $\alpha$ Proteinexpression nach Hypoxie	49
4.2.	<i>IL-6</i> Genexpression in HL-1 Kardiomyozyten nach Zugabe von NETs unter normoxischen sowie hypoxischen Bedingungen	50
4.3.	Einfluss von NETs auf die Apoptoserate von Kardiomyozyten	51
4.4.	Expression von Phospho-Akt, MCL-1 und Connexin 43 in HL-1 Kardiomyozyten unter hypoxischen sowie normoxischen Bedingungen	53
4.5.	Proliferationsrate von HL-1 Kardiomyozyten nach NETs Zugabe	56
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>57</b>
5.1.	Regulation der <i>IL-6</i> Genexpression durch NETs	57
5.2.	Apoptotische Wirkung von NETs und IL-6	58
5.3.	Regulation der Connexin 43 Expression durch NETs und IL-6	62
5.4.	Kardiomyozytenproliferation durch NETs und IL-6	63
5.5.	Gesamtlimitierungen und Ausgangsfragen	63
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>65</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ALI	Acute lung injury
cDNA	komplementäre DNA
DAMPs	Danger associated molecular patterns
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FSC	Forward Scatter Detector
HO	Hypoxie
IL-6	Interleukin 6
LAD	Left anterior Descending coronary artery
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrix Metalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
NE	Neutrophile Elastase
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NO	Normoxie
PAD4	Protein Arginin Deaminase 4
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	Polymorphkerniger Granulozyt
PTCA	Perkutane Transluminale Coronarangioplastie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SSC	Side Scater Detector
TBVT	Tiefe Beinvenenthrombose
TFPI	tissue factor Pathway Inhibitor
vWF	von Willebrand Faktor

## 1. Zusammenfassung

Nach einem Myokardinfarkt (MI) kommt es zu Anpassungsvorgängen im infarzierten und umliegenden Gewebe, was als kardiales Remodeling beschrieben wird. Zu den ersten einwandernden Zellen gehören Polymorphkernige Granulozyten (PMN), welche als Teil des Immunsystems zur Abwehr von pathologischen Mikroorganismen, aber auch zur Destruktion von körpereigenem Gewebe fähig sind. Zu diesen anti-mikrobiellen und zytotoxischen Mechanismen gehört die Bildung von sogenannten *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs). Dabei handelt es sich um ein Gerüst aus DNA, welches aus dem Zellkern der PMN in den Extrazellularraum ausgelagert wurde. In dieses Gerüst sind anti-mikrobielle und zytotoxische Proteine eingelagert. Ursprünglich wurden NETs bei der Bekämpfung von Bakterien entdeckt. Jüngere Studien zeigen zudem einen zytotoxischen Effekt von NETs auf verschiedene Zelltypen. Dabei deuten mehrere Studien darauf hin, dass NETs zytotoxisch auf Kardiomyozyten wirken. So können NETs die Nekrose von Kardiomyozyten *in vitro* initiieren. Da es nach MI zu einem massivem Zelluntergang kommt und NETs mit ihren zytotoxischen Eigenschaften in erhöhter Konzentration nach MI gemessen werden können, wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Wirkung NETs auf die Vitalität von HL-1 Kardiomyozyten-Zelllinie *in vitro* haben. Insbesondere wurde die Apoptose der Kardiomyozyten und somit ein wichtiger Bestandteil des kardialen Remodelings untersucht.

Um einen Myokardinfarkt zu simulieren, wurden hypoxisch-inflammatorische Bedingungen geschaffen. HL-1 Kardiomyozyten wurden mit aufsteigenden NETs-Konzentrationen unter Normoxie (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) oder unter Hypoxie (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) inkubiert. Es erfolgte eine parallele Behandlung mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-6.

Hinsichtlich der NETs-Wirkung auf die Vitalität wurde das apoptotische Potential von NETs auf HL-1 Kardiomyozyten beschrieben. Das Protein pAkt wirkt als Teil des PI3K/Akt Signalweges anti-apoptotisch. Das Protein MCL-1 gehört zu den anti-apoptotischen Proteinen, welche über den PI3K/Akt Signalweg reguliert werden. Hier senkten NETs die Proteinexpression von pAkt und MCL-1 unter Hypoxie und IL-6 Zugabe. In Normoxie bzw. ohne IL-6 Zugabe zeigte sich eine solche Regulation nicht. Eine NETs-Konzentration abhängige Zunahme der Apoptoserate zeigte sich zwar nicht, jedoch kam es unter NETs Zugabe zu einer erhöhten Apoptoserate von Kardiomyozyten unter Hypoxie im Vergleich zu Kardiomyozyten unter Normoxie. Zusammenfassend haben NETs über die Senkung von pAkt und MCL-1 das Potential, apoptotisch auf HL-1 Kardiomyozyten zu wirken.

Ein wichtiger Bestandteil der Erregungsweiterleitung im Herzen ist die Expression des Proteins Connexin 43. Hier erhöhten NETs die Proteinexpression unter Normoxie. Der Hypoxie-induzierten Senkung von Connexin 43 wirkten NETs nicht entgegen. Zusätzlich wurde hier erstmals beobachtet, dass NETs die *IL-6* Genexpression in HL-1 Kardiomyozyten erhöhen.

Somit können NETs selbst zum pro-inflammatorischen Milieu beitragen. Eine Beeinflussung der Zellproliferation durch NETs konnte hier nicht nachgewiesen werden.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse bieten sich anschließende *in vivo* Untersuchungen an, um den Beitrag von NETs am kardialen Remodeling besser zu verstehen. Insbesondere die hier gemessene NETs-Wirkung auf den PI3K/Akt Signalweg gilt es, genauer zu erforschen.

## 1.1. Summary

After myocardial infarction (MI), adaptive processes occur in the infarcted and surrounding tissue, which is described as cardiac remodeling. Among the first immigrating cells are polymorphonuclear granulocytes (PMNs), which are part of the immune system and capable of defense against pathological microorganisms but also capable of destroying endogenous tissue. These anti-microbial and cytotoxic mechanisms include the formation of so-called Neutrophil Extracellular Traps (NETs). This is a scaffold of DNA that has been translocated from the nucleus of the PMN to the extracellular area. Anti-microbial and cytotoxic proteins are incorporated into this scaffold. Originally, NETs were discovered to fight bacteria. Recent studies also show a cytotoxic effect of NETs on various cell types. In this regard, several studies suggest that NETs may act cytotoxically on cardiomyocytes. For instance, NETs can initiate necrosis of cardiomyocytes in vitro. Because massive cell death occurs after MI and considering their cytotoxic properties as well as their increased concentration after MI, this research investigated the effect of NETs on the viability of HL-1 cardiomyocyte cell line in vitro. In particular, cardiomyocyte apoptosis was investigated, as it is thus an important component of cardiac remodeling.

Hypoxic-inflammatory conditions were created to simulate MI. HL-1 cardiomyocytes were incubated with ascending concentrations of NETs under normoxia (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, rest N<sub>2</sub>) or under hypoxia (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, rest N<sub>2</sub>). Parallel treatment of cells with the pro-inflammatory cytokine IL-6 was also performed.

Regarding NETs' effect on viability, the apoptotic potential of NETs on HL-1 cardiomyocytes was described here. The protein pAkt has an anti-apoptotic effect as part of the PI3K/Akt signaling pathway. The protein MCL-1 is one of the anti-apoptotic proteins regulated by the PI3K/Akt signaling pathway. Here, NETs decreased the protein expression of pAkt and MCL-1 under hypoxia and IL-6 addition. In normoxia or without IL-6 addition, such regulation did not occur. A NETs concentration-dependent increase in apoptosis rate was not observed, but there was an increased apoptosis rate of the hypoxic samples under NETs addition compared with the normoxic samples. In conclusion, NETs have apoptotic potential on HL-1 cardiomyocytes via lowering pAkt and MCL-1.

An important component of cardiac excitation conduction is the expression of the protein connexin 43. Here, NETs increased the protein expression under normoxia. The hypoxia-induced decrease in connexin 43 was not counteracted by NETs. In addition, NETs were found to increase IL-6 gene expression in HL-1 cardiomyocytes. Thus, NETs themselves may contribute to the pro-inflammatory conditions. NETs did not affect the cell proliferation of HL-1 cardiomyocytes.

Based on these results, subsequent in vivo studies are necessary for a better understanding of the contribution of NETs to cardiac remodeling. In particular, the NETs effect on the PI3K/Akt signaling pathway as a potential apoptotic mechanism needs further investigations.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Myokardinfarkt**

#### **2.1.1. Epidemiologie und Ursache des Myokardinfarktes**

Zu den häufigsten Todesursachen der westlichen Welt zählt der Myokardinfarkt (MI). Trotz intensiver Forschung und verbesserter Therapie wurden im Jahre 2015 5,5 % der Todesfälle in Deutschland auf einen Myokardinfarkt zurückgeführt.<sup>1</sup>

Auslöser eines Myokardinfarktes ist der Verschluss oder die Verengung eines Herzkranzgefäßes (Koronare Herzerkrankung, KHK). Ursächlich sind häufig atherosklerotische Prozesse in den Herzkranzgefäßen. Der genaue pathophysiologische Ablauf der Atherosklerose ist nicht eindeutig geklärt. Bisher sind u.a. folgende Risikofaktoren identifiziert: männliches Geschlecht, LDL-Cholesterin, Rauchen, Hypertonie, Diabetes Mellitus, Lp(a), Homocystein, sportliche Untätigkeit sowie genetische Prädisposition.<sup>2</sup> Diese Risikofaktoren begünstigen die Bildung einer Plaque in der Gefäßwand. Plaques wachsen nach intravasal und verengen das Lumen des Gefäßes.

Das akute Ereignis eines Myokardinfarktes wird durch die Ruptur der Plaque ausgelöst. Der freigelegte Inhalt aktiviert die Gerinnungskaskade und führt zur Bildung eines oder mehrerer Thromben. Diese verschließen das Lumen des Gefäßes weiter distal.<sup>3</sup> Kardiomyozyten werden durch diese Herzkranzgefäße mit Sauerstoff versorgt. In Folge des Verschlusses kommt es zur Sauerstoffunterversorgung und zur Nekrose sowie Apoptose von Kardiomyozyten.<sup>4</sup>

#### **2.1.2. Komplikationen und Therapie des Myokardinfarktes**

Ein großflächiger Verlust von Kardiomyozyten führt zur Einschränkung der Organfunktion. Dies geht mit einer verminderten Auswurfsleistung des Herzens (Ejektionsfraktion) einher. Die Verringerung der Ejektionsfraktion ist entscheidend für die langfristige Überlebenschancen.<sup>5</sup> Zu den möglichen lebensgefährlichen Folgen eines MI zählen u.a. Arrhythmien, Herzbeutelentzündungen sowie kardiogener Schock.

Zur Vermeidung der Komplikationen ist die Eindämmung der Infarktfläche entscheidend. Das Ausmaß des Infarktgebietes ist abhängig vom Versorgungsgebiet der betroffenen Gefäße sowie von der Dauer der Sauerstoffunterversorgung. Eine frühzeitige Reperfusion der betroffenen Gefäße bildet den wichtigsten Therapieansatz. Dadurch können sich Zellen, welche noch nicht irreversibel geschädigt sind, erholen und die Größe des Infarktgebietes wird möglichst gering gehalten. Empfohlene Therapieform ist derzeit die kathetergestützte PTCA (Perkutane Transluminale Coronarangioplastie).<sup>6</sup> Paradoxe Weise hat die Reperfusion auch negative Effekte auf das Gewebe. Während der Sauerstoffunterversorgung im Gewebe sammeln sich zytotoxische Substanzen wie Myoglobin und pro-inflammatorische Zytokine aus

den nekrotischen Zellen im Infarktgebiet an. Mit Wiederanschluss an den Blutkreislauf gelangen diese Substanzen in umliegendes Gewebe und führen dort zu weiterem Zellschaden. Man spricht von einer *Reperfusion-Injury*.<sup>7</sup>

Aufgrund der effizienten Therapiemöglichkeiten liegt die Überlebensrate erstmaliger Myokardinfarkte bei ca. 90%. Daraus resultiert jedoch eine hohe Anzahl an Patienten, welche an den Folgen des Infarktes in Form von Herzinsuffizienzen leiden.<sup>8</sup> Eine Ursache für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz ist das kardiale Remodeling.

## **2.2. Kardiales Remodeling**

### **2.2.1. Phasen des Remodelings**

In Folge des Myokardinfarktes kommt es zu Anpassungsvorgängen im infarzierten und umliegenden Gewebe. Ventrikeldilatation, Hypertrophie des Myokards sowie Fibrosierung des Gewebes werden als kardiales Remodeling zusammengefasst. Diese Anpassungsvorgänge sind zum einen unabdingbar, um den Verlust von funktionalem Gewebe zu kompensieren, zum anderen führen überschießende Anpassungsvorgänge zur insuffizienten Herzfunktion. Die Myokardhypertrophie erfolgt zur Aufrechterhaltung der Ejektionsfraktion. Als Reaktion auf die Volumenbelastung dilatiert zudem der Ventrikel.<sup>9</sup> Sobald diese Kompensationsmechanismen ausgereizt sind, entwickelt der Patient eine dekompenzierte Herzinsuffizienz. Ventrikuläre Dilatation steht zudem im Zusammenhang mit höheren Mortalitätsraten<sup>10</sup>, Herzinsuffizienzen sowie Arrhythmien<sup>11</sup>. Folglich liegt zwischen Adaptation und Dysfunktion nur ein schmaler Grat und das kardiale Remodeling muss präzise reguliert werden.

Das Remodeling lässt sich in drei Phasen einteilen. In der inflammatorischen Phase wird das Immunsystem aktiviert und die abgestorbenen Zellen entfernt. In der folgenden Phase ersetzen proliferative Zellen das abgestorbene Gewebe durch Granulationsgewebe. In der abschließenden Phase liegt im Infarktgebiet Narbengewebe vor.<sup>12</sup>

Die inflammatorische Phase wird durch den Hypoxie-bedingten Zelluntergang von Kardiomyozyten und weiterer Zellarten im kardialen Gewebe initiiert. Aus nekrotischen Zellen werden unkontrolliert Zellbestandteile freigesetzt. Diese werden als *danger associated molecular patterns* (DAMPs) vom Immunsystem erkannt. Immunzellen sowie nekrotische Kardiomyozyten setzen pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 frei.<sup>13</sup> Diese initiieren zusammen mit freigesetzten Chemokinen den Eintritt von Leukozyten in das kardiale Gewebe (Diapedese).<sup>14</sup> Eine frühzeitige Reperfusion der Gefäße begünstigt die Diapedese von Leukozyten zusätzlich. Polymorphkernige Neutrophile (PMN, auch neutrophile Granulozyten genannt) sowie Makrophagen sind für die Entfernung der Zellreste zuständig.<sup>15</sup> Zusätzlich wird die kollagene Grundstruktur im Infarktgebiet durch Kollagenasen sowie Matrix Metalloproteinasen (MMP) aufgelöst, woraus eine Verdünnung der Ventrikelwand resultiert.<sup>16</sup>

In der anschließenden proliferativen Phase wird die Inflammation inhibiert und Reparaturprozesse werden eingeleitet. PMN werden von Makrophagen phagozytiert. Anti-inflammatorische Zytokine, wie TGF- $\beta$ , reduzieren das pro-inflammatorische Milieu.<sup>17,18</sup> Eingewanderte sowie lokale Fibroblasten differenzieren zu Myofibroblasten. Diese füllen das zuvor ausgedünnte Infarktgebiet mit extrazellulärer Matrix aus Fibrin und Fibronectin.<sup>19,20</sup>

Das kardiale Remodeling läuft über einen langen Zeitraum ab. So kann die Ejektionsfraktion des Herzen auch noch Monate nach dem Ereignis sinken.<sup>21</sup> In dieser Zeit werden proliferative Zellen inhibiert und treten anschließend in die Apoptose ein. Zurück bleibt das definitive Narbengewebe, welches über keine kontraktile Eigenschaften verfügt.<sup>12</sup>

Das genaue Verständnis der Anpassungsvorgänge wird durch seine Komplexität sowie die Vielzahl beteiligter Zelltypen erschwert. Die Interaktion dieser Zellen muss präzise reguliert werden. Dies erfolgt unter anderem in Form von Zytokinen.

### **2.2.2. Regulation des Remodelings durch Zytokine**

Verschiedene Zellen tragen zur Zytokinsekretion bei: nekrotische Kardiomyozyten<sup>13</sup>, Makrophagen<sup>22</sup> und apoptotische Kardiomyozyten aus dem Infarkttrandgebiet<sup>14</sup>. Zellen verfügen über verschiedene Zytokinrezeptoren, an die Zytokine binden können. Rezeptorvermittelt können Zytokine sowohl kardiopathogene als auch kardioprotektive Prozesse auslösen.

IL-1 verfügt über kardiopathogene Eigenschaften. So weisen Mäuse mit defektem IL-1 Rezeptor nach Infarkt und Reperfusion eine besser erhaltene Kontraktilität und geringere Dilatation des Herzmuskels auf. Damit einher geht eine geringere Konzentration an PMN und Makrophagen im Gewebe. Zudem wird die proliferative Phase und damit die Fibrosierung des kardialen Gewebes abgeschwächt. Eine Veränderung der Infarktgröße wurde in dieser Studie nicht nachgewiesen.<sup>23</sup> Suzuki et al. beobachteten in Tierversuchen nach Applikation von IL-1-Rezeptor-Antagonisten verringerte Infarktgebiete. Zudem resultierte nach dieser IL-1 Neutralisation eine verringerte Apoptoserate der Kardiomyozyten.<sup>24</sup>

Trotzdem liegen auch Hinweise für einen kardioprotektiven Effekt von IL-1 vor. Die Applikation von anti-IL-1-beta Antikörpern nach LAD (*Left Anterior Descending coronary artery*) Ligation führt zu signifikanten Häufung von Ventrikelrupturen in Tierversuchen.<sup>25</sup>

TNF- $\alpha$  werden ebenfalls kardiopathogene Eigenschaften zugeschrieben. So erleiden TNF- $\alpha$  defiziente Mäuse nach LAD Ligation kleinere Infarktgebiete. Zudem wandern weniger Leukozyten in das infarzierte Gewebe ein (Maekawa et al. 2002). Hohe Konzentrationen von TNF- $\alpha$  im kardialen Gewebe sind mit einem höheren Risiko für Ventrikelrupturen assoziiert.<sup>26,27</sup> Außerdem induzieren hohe TNF- $\alpha$  Konzentrationen die Apoptose von Kardiomyozyten und tragen zu einem ungünstigen Ausgang des kardialen Remodelings bei.<sup>28</sup>

Dem widersprechen Studien, welche einen kardioprotektiven Effekt von TNF- $\alpha$  beschreiben. Herzinfarkte bei genveränderten Mäusen ohne TNF- $\alpha$  Rezeptor verursachen signifikant

größere Infarktgebiete. In diesem Zusammenhang konnte ein anti-apoptotischer Einfluss von TNF- $\alpha$  auf Kardiomyozyten unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden.<sup>29</sup> Bei Mäusen, welche vor MI-Induktion mit TNF- $\alpha$ -Neutralisatoren behandelt wurden, erfolgt eine höhere Anzahl an Ventrikelrupturen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch eine nachträgliche Applikation von TNF- $\alpha$  Neutralisatoren nach der MI-Induktion verursacht häufig Komplikationen. Die Anzahl der Ventrikelrupturen ist signifikant erhöht. Zudem weisen diese Herzen eine verminderte ventrikuläre Pumpfunktion sowie übermäßige Fibrose auf.<sup>30</sup>

Diese teilweise widersprechenden Studien verdeutlichen die genaue Regulierung, welche für ein suffizientes kardiales Remodeling notwendig ist. Folglich wird weitere Forschung benötigt, um die Regulierungsmechanismen besser zu verstehen.

Auch IL-6 hat Einfluss auf das kardiales Remodeling. Kardiomyozyten sind in der Lage, dieses zu sezernieren. Stimuliert werden insbesondere Kardiomyozyten der Infarkttrandgebiete durch hypoxische Bedingungen<sup>31</sup>, aber auch durch diverse Zytokine<sup>14</sup> sowie durch Angiotensin II<sup>32</sup>. Weitere Zellen wie PMN und Endothelzellen sind in der Lage, IL-6 zu sezernieren.<sup>11</sup> Herskowitz et al. beschrieben den Verlauf der IL-6 Konzentration im Serum von Ratten nach LAD-Ligation mit anschließender Reperfusion. Die maximale IL-6 Konzentration wird 60 min nach Reperfusion erreicht.<sup>13</sup> Auch in humanem Serum werden erhöhte Konzentrationen nach MI detektiert.<sup>33</sup>

Kardiomyozyten präsentieren verschiedene IL-6 Rezeptoren, welche das Transmembranprotein gp130 gemeinsam haben. Die Bindung von IL-6 oder Mitgliedern dieser Zytokinfamilie aktiviert die gp130-STAT3 Signalkaskade.<sup>34</sup> Sowohl pathogene als auch protektive Effekte resultieren aus der Aktivierung der Signalkaskade.

Für einen kardiopathogenen Effekt spricht die Senkung der Kontraktilität der Kardiomyozyten bei langfristiger Exposition mit IL-6.<sup>35</sup> Des Weiterem weisen Tierversuche, mit dauerhaft aktivierter gp130-STAT3 Signalkaskade, auf den schädlichen Einfluss von IL-6 hin. Nach induziertem MI werden erhöhte IL-6 Konzentrationen im Serum gemessen. Damit geht eine erhöhte Mortalitätsrate, mit höherer Wahrscheinlichkeit für Ventrikelrupturen sowie persistierender Inflammation, einher.<sup>36</sup> In Tierversuchen mit Infarktinduktion ohne Reperfusion wirkt sich die Applikation von IL-6-Rezeptor-Antagonisten positiv auf das kardiales Remodeling aus. Die linksventrikuläre Dilatation ist weniger ausgeprägt und die Kontraktilität bleibt erhalten.<sup>37</sup>

Die Inaktivierung der gp130-STAT3 Signalkaskade hat negative Auswirkungen auf das kardiales Remodeling und deutet somit auf einen protektiven Effekt. Dabei entstehen in Tierversuchen größere Infarktgebiete und höhere Apoptoseraten der Kardiomyozyten. Zudem wird in diesen Tieren eine stärker ausgeprägte *Reperfusion-Injury* im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen.<sup>38</sup> In Co-Kulturen aus Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten wirkt IL-6 als Stimulus zur Hypertrophie der Kardiomyozyten sowie zur Proliferation von

Fibroblasten. Somit beeinflusst IL-6 das kardiale Remodeling über verschiedene Zelltypen. Des Weiteren wirkt IL-6 anti-apoptotisch auf Kardiomyozyten und reduziert somit den Verlust an funktionellem Gewebe.<sup>32</sup>

Trotz des schädlichen Potentials von IL-6 hat sich eine anti-IL-6 Therapie bisher nicht bewährt, da der zellschädigende Effekt auch von anderen Mitgliedern der IL-6 Zytokinfamilie ausgelöst werden kann. In Tierversuchen mit IL-6 defizienten Mäusen weisen diese keine signifikanten Unterschiede in Mortalität, Infarktgröße oder linksventrikulärer Funktion auf. Andere Liganden des gp-130 Rezeptors wie z.B. Cardiotrophin-1 übernehmen in IL-6 defizienten Mäusen die Aktivierung des Signalweges. Die Applikation von IL-6 ergibt keinen zusätzlichen positiven Effekt.<sup>39</sup>

Die Beeinflussung des kardialen Remodelings ist bereits ein etabliertes Therapiekonzept. Die Applikation von ACE-Hemmern gehört neben der PTCA zu den wichtigsten Therapiestützen. ACE-Hemmer beeinflussen das kardiale Remodeling positiv, indem u.a. die Nachlast des Herzens durch Vasodilatation gesenkt wird. Die Ventrikeldilatation wird durch frühzeitige Applikation nach MI eingedämmt. Daraus resultiert eine Senkung der Mortalität sowie Morbidität nach MI.<sup>40</sup>

Trotz intensiver Forschung ist bislang keine erfolgreiche anti-inflammatorische Therapie auf Ebene der Zytokine etabliert. Grund dafür ist die Komplexität des kardialen Remodelings und die bisher unzureichend erforschte Regulation.<sup>41</sup> Jedoch könnte weitere Forschung zum Einfluss von Zytokinen auf das kardiale Remodeling neue Therapieoptionen eröffnen.

### **2.3. Einfluss von PMN auf Myokardinfarkte**

PMN gehören zum angeborenen Immunsystem. Zu ihren Aufgaben gehören u.a. die Beseitigung von Erregern und Zellresten sowie die Koordination des angeborenen und des erworbenen Immunsystems. Das Repertoire der anti-pathogenen Mechanismen umfasst die Phagozytose, die Degranulation von zytotoxischen Substanzen, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Bildung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) (s. 2.4).<sup>42</sup> Die Koordination des Immunsystems erfolgt durch Sezernierung von Zytokinen und Chemokinen.<sup>43</sup> Gebildet werden PMN im Knochenmark. Im Blutkreislauf haben PMN eine Überlebenszeit von wenigen Tagen. Erst unter inflammatorischen Bedingungen verlängert sich die Überlebenszeit von PMN.<sup>44</sup>

PMN gehören zu den ersten einwandernden Zellen bei einem Myokardinfarkt. Nach 1-3 Tagen erreicht die PMN Konzentration ihren maximalen Wert im Gewebe.<sup>45</sup> Sie werden durch Zytokine und Chemokine, welche ins Infarktgebiet während des Remodelings sezerniert und auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden, angezogen.<sup>46</sup> Das Eindringen von PMN ins Gewebe läuft in mehreren Schritten ab und wird Extravasation genannt. Zunächst nähern sich die PMN im Blut der Endothelwand. So erhalten die PMN Kontakt zu den Adhäsionsmolekülen des Endothels. Anschließend erfolgt die Diapedese in das Gewebe.<sup>47</sup> Kardiomyozyten werden

durch TNF- $\alpha$ , IL-1 sowie IL-6 zur Expression von *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) stimuliert.<sup>48 49</sup> PMN binden an diese Adhäsionsmoleküle der Kardiomyozyten.<sup>50</sup> Tierversuche belegen, dass PMN anschließend zur ROS Produktion stimuliert werden. Daraus resultiert Zellschaden an vitalen Kardiomyozyten im Infarkttrandgebiet.<sup>51</sup> In ICAM-1 defiziente Mäusen wird nach Infarktinduktion und Reperfusion weniger Zellschaden in Form von LDH, CK und Troponin gemessen.<sup>52</sup> Bei Inhibition der Leukozyten-Diapedese resultieren kleinere Infarktgebiete im Vergleich zur Kontrollgruppe.<sup>53</sup>

Während der inflammatorischen Phase entfernen PMN apoptotische sowie nekrotische Kardiomyozyten mittels Phagozytose und Freisetzung von ROS. Diverse Studien belegen, dass eine überschießende Aktivität schädlich auf das umliegende Gewebe wirkt. Die Hemmung des Immunsystems verhindert diesen Zellschaden. So führt die Inhibition der ROS Produktion zu geringerer kardialer Fibrose.<sup>54,55</sup> Zudem führt ein Mangel an PMN im Blut (Neutropenie) zu kleineren Infarktgebieten.<sup>53,56,57,57,58</sup> In Tierversuchen ergibt die Infarktinduktion und Reperfusion mit PMN-haltiger Lösung eine konzentrationsabhängige Zunahme des Gewebeschadens. Dabei nimmt die Kontraktionsfähigkeit der Herzen ab.<sup>59</sup>

Diese Erkenntnisse deuten auf den zytotoxischen Einfluss von PMN im Infarktgebiet hin. Somit trägt das Immunsystem selbst, zusätzlich zur Hypoxie, zum Zellschaden an vitalen Zellen bei. Eine generelle Unterdrückung des Immunsystems nach MI stellt trotzdem keine Therapieoption dar. Die Gabe von Glucocorticoiden nach MI führt zur Erhöhung der Sterblichkeitsrate.<sup>60</sup> Eine gezieltere Modulation der Immunantwort könnte neue Therapieoptionen ermöglichen. Weitere Forschung über die Interaktion von PMN und Kardiomyozyten wird benötigt. Inwiefern und mit welchen molekularen Mechanismen PMN am Zellschaden nach MI beteiligt sind, ist noch unzureichend erforscht.

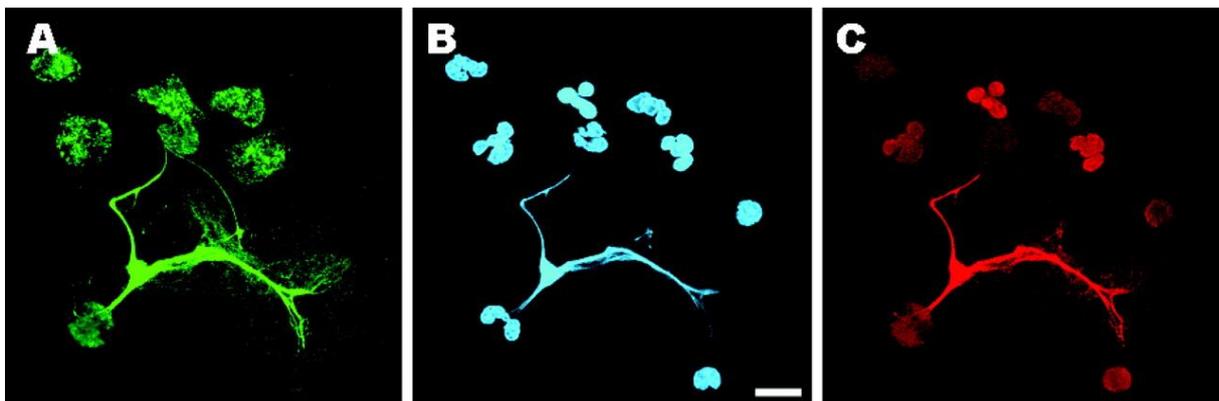
## **2.4. NETs**

PMN verfügen über mehrere Mechanismen des Zellunterganges. Vereinfacht wird unterschieden zwischen: Nekrose, Apoptose sowie NETose. Auslöser der Nekrose ist die Schädigung der Zellstruktur z.B. durch extreme Temperaturen, Kontakt zu Pathogenen oder hypoxische Bedingungen. Die Nekrose wird mikroskopisch durch den Verlust der Zellkernstruktur charakterisiert. Nach Auflösung der Zellmembran wird der Inhalt der Zelle unkontrolliert in das umliegende Gewebe freigesetzt. Dem gegenüber steht der kontrollierte Zelltod in Form der Apoptose. Diese kann durch den extrinsischen sowie intrinsischen Signalweg initiiert werden. Mikroskopisch ist die Apoptose durch kondensiertes und fragmentiertes Chromatin charakterisiert. Dabei bleibt die Zellkernmembran intakt. Die apoptotische Zelle wird anschließend von Makrophagen phagozytiert.<sup>61</sup>

Mit der NETose wurde ein zusätzlicher Weg des Zelluntergangs entdeckt. Im Jahr 2004 beobachteten Brinkmann et al. wie PMN Bakterien bekämpften, indem sie die Erreger mit einem Netz aus ihrem eigenen Chromatin einfingen und mittels antimikrobieller Proteine

eliminierten. Diese Struktur wurde als *Neutrophil Extracellular Trap* (NET) benannt.<sup>62</sup> Eingefangene Pathogene sind innerhalb der NETs einer hohen Konzentration von antimikrobiellen Proteinen ausgesetzt. Die Proteine haben ihren Ursprung im Zytosol, in Granula sowie im Zellkern der PMN. Den größten Anteil des Proteoms machen mit 70% Histone aus. Innerhalb des Zellkerns bilden Histone zusammen mit Chromatin einen Komplex, der als Nukleosom bezeichnet wird. Zu den antimikrobiellen Proteinen gehören u.a. Myeloperoxidase (MPO), Neutrophile Elastase (NE) und Cathepsin G.<sup>63</sup> Sowohl DNA als auch Histone verfügen über zytotoxische Eigenschaften.<sup>64 65</sup>

Verschiedene Pathogene sowie Proteine können die Freilassung von Chromatin und Proteinen auslösen. Dieser Vorgang wird als NETose bezeichnet. Zu den möglichen Auslösern der NETose gehören u.a.: Bakterien<sup>62</sup>, Pilze<sup>66</sup>, ROS<sup>67</sup>, proinflammatorische Mediatoren<sup>68</sup> und Interaktionen mit körpereigenen Zellen<sup>69</sup>. Des Weiteren wird die NETose durch den pH-Wert des Gewebes beeinflusst. Alkalisches Gewebe begünstigt die NETose.<sup>70</sup> Auch chronische Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 begünstigen den Eintritt der NETose.<sup>71</sup>



**Abb. 1: NETs im Immunfluoreszenzmikroskop** <sup>62</sup>

Deutlich von den vitalen PMN ist das feine Netz aus *Neutrophil Extracellular Traps* abzugrenzen. Dieses wird durch Anfärbung folgender Zellbestandteile nachgewiesen: A) Anfärbung der Neutrophilen Elastase B) Anfärbung der DNA C) Anfärbung von Nucleosomen

#### 2.4.1. Ablauf der NETose

Seit der Entdeckung durch Brinkman et al. wurden die Mechanismen der NETose intensiv erforscht. Dabei wurden verschiedene Formen der NETose entdeckt. Der folgende Abschnitt beschreibt den Ablauf der zuerst beobachteten „suizidalen“ NETose.

Die Bindung eines Triggers führt zur Aktivierung der NADPH-Oxidase und somit zur Bildung von ROS.<sup>61</sup> Diese dissoziieren NE aus der Zellmembran. Anschließend werden NE sowie MPO in den Zellkern transportiert.<sup>72</sup> Im Zellkern liegt kondensiertes Chromatin zusammen mit Histonen als Nukleosom vor. Zur NETose muss das Chromatin dekondensiert vorliegen. NE sowie MPO ermöglichen die Dekondensation im Zellkern.<sup>73,74</sup> Zusätzlich aktivieren ROS das Enzym PAD4 (Protein arginine deiminase 4). Dieses Enzym ermöglicht die posttranslationale Modifikation von Histonen im Zellkern. Dabei wird die Aminosäure Arginin durch die

Aminosäure Citrullin ausgetauscht. Diese Citrullinierung der Histone treibt die weitere Dekondensation von Chromatin voran.<sup>75-77</sup> Die Zellkernmembran wird mittels ROS aufgelöst. Anschließend tritt das dekondensierte Chromatin in das Zytosol ein und nimmt dort weitere Proteine aus dem Zytosol sowie aus den Granula auf. Anschließend wird die Zellmembran mittels ROS aufgelöst und die NETs werden in das extrazelluläre Gewebe freigegeben.<sup>78</sup> Die PMN sind nach Auflösung der Zellmembran zu keinen weiteren Abwehrmechanismen in der Lage.

Die NETose kann auch unabhängig von NADPH Oxidase und damit unabhängig von reaktiven Sauerstoffspezies erfolgen. Die Mechanismen dieser alternativen NETose sind noch nicht ausreichend erforscht. Gesichert ist, dass der Trigger entscheidet, ob die NETose abhängig oder unabhängig von NADPH Oxidase verläuft.<sup>79</sup>

Die vitale NETose läuft innerhalb von Minuten ab und ist damit schneller als die suizidale NETose. Im Anschluss an die Bildung des Chromatingerüsts sind die PMN weiterhin in der Lage, Phagozytose sowie die Ausschüttung chemotaktischer Substanzen zu betreiben. Auslöser für die vitale NETose ist der Kontakt mit Bakterien wie *Staph. Aureus*.<sup>80</sup> Auch die vitale NETose läuft ohne die Aktivierung der NADPH-Oxidase und ohne ROS ab. Die Dekondensation erfolgt ausschließlich durch NE. Nach Auflösung der Zellkernmembran wird das Chromatin mit Hilfe von Vesikeln in den Extrazellularraum transportiert. Die Zellmembran bleibt bei diesem Vorgang intakt.<sup>81</sup> Die Proteine der Granula werden ebenfalls nach extrazellulär transportiert und vermischen sich dort mit dem Chromatingerüst.<sup>82</sup>

Zudem kann das Chromatingerüst auch aus DNA der Mitochondrien bestehen. In dieser Sonderform der NETose bleibt die Zellstruktur ebenfalls intakt.<sup>83</sup>

Aktuelle Forschung ergab, dass nicht nur PMN in der Lage sind, NETs zu exprimieren. Weitere Immunzellen wie Eosinophile Granulozyten<sup>84</sup> sowie Monozyten<sup>85</sup> bilden ebenfalls *Extracellular Traps*.

#### **2.4.2. Einfluss von NETs auf verschiedenen Erkrankungen**

NETs haben einen wichtigen Anteil an der Immunreaktion und der Bekämpfung von Pathogenen. Besonders bei großen Pathogenen wie Pilzen tendieren PMN zum Einsatz von NETs.<sup>86</sup> Der Einfluss von NETs kann durch Applikation von DNase untersucht werden. Dies ist ein körpereigenes Enzym, welches das Chromatingerüst der NETs auflöst. Die Applikation führt bei septischen Mäusen zur Verschlechterung der Symptomatik sowie zur Zunahme der Bakterienzahl. Es resultieren größere Organschäden. Im Blut werden erhöhte IL-6 Konzentrationen gemessen.<sup>87</sup> Jedoch führt bei septischen Mäusen die Kombinationstherapie aus Antibiotika und DNase zu einer signifikanten Erhöhung der Überlebensrate im Vergleich zur Monotherapie mit Antibiotika.<sup>88</sup>

Auch ohne Anwesenheit von Pathogenen werden NETs vom Immunsystem genutzt. Zum Beispiel wirken NETs bei sterilen Inflammationen. Mäuse, welche nicht in der Lage sind, NETs zu bilden, benötigen zur Auflösung von sterilen Inflammation länger als Kontrollgruppen.<sup>89</sup>

Der positive immunologische Einfluss von NETs ist länger bekannt. Jedoch werden NETs als zweischneidiges Schwert betrachtet. Überschießende Immunreaktionen in Form von NETosen sind mit verschiedenen Krankheiten assoziiert. Erhöhte NETs-Konzentrationen wurden u.a. beschrieben bei: Präeklampsie<sup>90</sup>, Vaskulitiden der kleinen Gefäße<sup>91</sup>, septischer Arthritis<sup>92</sup>, Zystischer Fibrose<sup>93</sup>, verschiedenen Krebsarten<sup>94</sup>, SLE<sup>95</sup> und allergischen Reaktionen<sup>96</sup>.

Ein besonderer Fokus der Forschung liegt auf dem Zusammenhang von NETs und Thrombosen. Bei Patienten mit Myokardinfarkt wurden in Thromben erhöhte Konzentrationen von NETs gemessen.<sup>97</sup> Auch bei Tiefer Beinvenenthrombose (TBVT) werden hohe NETs-Konzentrationen gemessen.<sup>98</sup> Die prothrombotischen Eigenschaften basieren auf mehreren Mechanismen. Das feine Chromatingerüst eignet sich, zum Einfangen von Erythrozyten, Fibrinogen sowie von-Willebrand-Faktor und begünstigt so die Bildung von Thromben.<sup>99</sup> Die intrinsische Gerinnungskaskade wird durch die Bindung von Faktor XII im Chromatingerüst aktiviert.<sup>100</sup> Zudem wird die extrinsische Gerinnungskaskade über die Bindung von *tissue factor* aktiviert.<sup>101</sup> Zusätzlich werden gerinnungshemmende Proteine wie *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) durch Proteine innerhalb der NETs abgebaut.<sup>102</sup> Die Zugabe von DNase baut das Chromatingerüst ab und führt so zur Auflösung der Thromben.<sup>103</sup>

Thromben in Herzkranzgefäßen können Auslöser für Myokardinfarkte sein (s. 2.1.1). Bei Untersuchungen von Thromben aus verschlossenen Herzkranzgefäßen wurde eine Korrelation zwischen NETs-Konzentration im Thrombus sowie Infarktgröße gemessen. Entsprechend korreliert die Konzentration von DNase im Thrombus anti-proportional zur Infarktgröße.<sup>104</sup>

Thromben und Emboli verursachen weitere ischämische Erkrankungen wie Schlaganfälle. Bei diesen führen hypoxischen Bedingungen zum Zelluntergang im zerebralen Gewebe. Im Zusammenhang mit Schlaganfällen wurden erhöhte NETs-Konzentrationen im Plasma von Patienten gemessen.<sup>105</sup>

Zusätzlich zu diesen indirekten Mechanismen können NETs direkten Zellschaden verursachen. So verfügen Histone über zytotoxische Eigenschaften. In Tierversuchen wurde nachgewiesen, dass Histone Pneumozyten beschädigen können und für die Entwicklung einer *Acute lung injury* (ALI) mitverantwortlich sein können.<sup>106</sup> Saffarzadeh et al. beschrieben ebenfalls die destruktive Wirkung von Histonen sowie MPO auf Epithel und Endothel im Lungengewebe.<sup>107</sup> Die Applikation von spezifischen Antikörpern, welche sich gegen Histone richten, führt zur Verringerung der Histon-Konzentration. Bei septischen Mäusen führt dies zur Verringerung der Mortalitätsrate.<sup>64</sup> Histone als wichtiger Bestandteil der NETs werden also

nicht nur gegen Pathogene eingesetzt, sondern richten sich auch gegen eigene Zellen. Ein weiterer Bestandteil der anti-mikrobiellen Proteine der NETs ist MMP-9. Mittels dieses Enzyms sind NETs in der Lage, die Apoptose von Endothelzellen zu initiieren.<sup>108</sup> Aktivierte Endothelzellen können die NETose von zuvor gebundenen PMN initiieren und somit sich selbst schaden.<sup>109</sup> Auch im Zusammenhang mit ANCA assoziierten Vaskulitiden wurde ein schädlicher Einfluss von NETs auf Endothelzellen nachgewiesen.<sup>110</sup>

Des Weiteren kann freigesetzte DNA (*cell free DNA* = cf-DNA) zytotoxisch auf Zellen wirken.<sup>65</sup> Diese kann aus nekrotischen Zellen stammen oder Bestandteil von NETs sein. Diese Variabilität führt zu Diskussionen in der Forschung. Einige Autoren definieren den Nachweis von cf-DNA im Plasma bereits als Nachweis für die Anwesenheit von NETs. Nauseef und Kubes fordern deshalb eine einheitliche Definition, wann die Messung von cf-DNA eindeutig NETs zugeordnet werden kann. Nicht nur der Ursprung von cf-DNA muss kritisch hinterfragt werden, sondern auch die verschiedenen Mechanismen der NETose müssen unterschieden werden. Als einheitliche Definition für den Nachweis von NETs schlagen die Autoren einen lokalisierte Nachweis folgender NETs Bestandteile vor: 1. Chromatingerüst, 2. Histone, 3. Neutrophile Elastase.<sup>111</sup> Bei Studien zu NETs muss deshalb die Methodik beachtet werden, ob eine Differenzierung zwischen cf-DNA und NETs vorgenommen wurde.

### **2.4.3. Der Einfluss von NETs auf Myokardinfarkte**

NETs wurden als Auslöser von Thromben identifiziert und somit ein indirekter Zusammenhang zu Myokardinfarkten festgestellt. Inwiefern NETs Anteil am kardialen Remodeling nach MI haben, ist jedoch kaum erforscht. Für einen direkten Einfluss sprechen mehrere Gründe. Zum einen wurden NETs Bestandteile im Plasma von MI Patienten gemessen, zum anderen wird die Interaktion von NETs mit Zellen des kardialen Gewebes beschrieben.

Nach MI lassen sich erhöhte Konzentrationen von cf-DNA im Plasma nachweisen.<sup>112,113</sup> Zudem weisen Patienten nach ST-Hebungs-Infarkt mit anschließender PTCA im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina Pectoris signifikant erhöhte Konzentrationen von NETs im Plasma auf. Im Verlauf nehmen diese Konzentrationen wieder ab.<sup>114</sup>

Als weiterer Marker für die Konzentration der NETs dient das abbauende Enzym DNase. Eine Regulierung der NETs-Konzentration durch den Abbau mittels DNase verhindert überschießende Immunreaktionen mit Zerstörung des umliegenden Gewebes. Diverse Studien beschreiben erhöhte DNase Konzentrationen im Plasma nach MI.<sup>104,115,116</sup> DNase ist ein protektiver Faktor gegen die zytotoxische Wirkung von NETs. Auch Bakterien nutzen diesen Schutzmechanismus. *Staphylococcus aureus* bildet Nukleasen wie DNase und erschwert damit die Beseitigung durch NETs.<sup>117</sup> Auch Kardiomyozyten sind in der Lage, DNase zu exprimieren. Eine erhöhte Expression von DNase wurde im Maus-Modell nach Ischämie detektiert.<sup>118</sup>

Die Applikation von DNase ermöglicht Untersuchungen, inwiefern Chromatin an der Zerstörung von kardialen Gewebe beteiligt ist. Savchenko et al. induzierten in Tierversuchen einen Myokardinfarkt mit anschließender Reperfusion. Die Applikation von DNase führt zu einer geringeren Infiltration von PMN und einer niedrigeren Konzentration von NETs im kardialen Gewebe. Zudem wird ein signifikant kleineres Infarktgebiet im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen. Die Ejektionsfraktion wird weniger verringert. Somit stellen Savchenko et al. einen protektiven Effekt von DNase und somit einen pathogenen Effekt von NETs in diesem Ischämie/Reperfusionsmodell in Aussicht.<sup>119</sup>

Ge et al. wählten einen ähnlichen Ischämie/Reperfusionsansatz. Zusätzlich zur DNase wurde das Fibrinolytikum rt-PA hinzugegeben. Diese Behandlung führt ebenfalls zu kleineren Infarktgebieten sowie niedrigeren PMN und NETs-Konzentrationen. Auch wird durch diese Kombinationstherapie eine relative Steigerung der Ejektionsfraktion erzielt.<sup>120</sup>

Vogel et al. gaben DNase sowie die Metalloproteinase ADAMTS 13 hinzu, welche den vWF spaltet und somit, wie rt-PA antithrombotisch wirkt. Im Vergleich zu den vorher beschriebenen Studien wurde das Gewebe nicht reperfundiert. Entsprechend wurde keine Verringerung der PMN Infiltration sowie NETs-Konzentration im Gewebe nachgewiesen. Die Kombinationstherapie senkt jedoch die Konzentration der Nukleosomen im Plasma signifikant. Im Narbengewebe wurden zudem mehr vitale Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet.<sup>121</sup>

Folglich scheint DNase einen positiven Effekt auf die Prognose von Herzinfarkten zu haben, indem zytotoxische Komponenten entfernt werden. Inwiefern die Ergebnisse auf das Chromatingerüst der NETs zurückzuführen sind, wird diskutiert. Vogel et al. führen den positiven Effekt von DNase auf die hohe Anzahl an nekrotischen Kardiomyozyten zurück. Dabei verfügen Kardiomyozyten über einen besonders hohen Anteil an Histonen.<sup>122</sup> Der positive Effekt der DNase wäre demnach auf den Abbau dieser Nukleosomen zurückzuführen.<sup>121</sup>

Dem widerspricht die Untersuchung von PAD4 defizienten Mäusen nach Infarkt. Die Aktivität von PAD4 ist wichtig für die NETose (s. 2.4.1). PAD4 defiziente Mäuse weisen ebenfalls signifikant kleinere Infarktareale auf. Die Kontraktionsfähigkeit des Myokards wird zudem weniger reduziert und die Nukleosomenzahl im Plasma ist im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer. Eine zusätzliche Applikation von DNase erzielt keinen zusätzlichen Nutzen. Daraus schlussfolgern die Autoren, dass der kardioprotektive Effekt der DNase auf den Abbau von NETs und nicht auf den Abbau von cf-DNA aus nekrotischen Zellen zurückzuführen ist.<sup>119</sup>

Des Weiteren liegen Untersuchungen zum Einfluss von NETs auf die verschiedenen Zellen des kardialen Gewebes vor. Die proliferative Phase des Remodelings ist durch die Aktivität von Fibroblasten gekennzeichnet. *In vitro* wurde die NETs-vermittelte-Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten in Lungengewebe beobachtet.<sup>123</sup> Zusätzlich ist die Entfernung

von Zellresten die wichtigste Aufgabe der inflammatorischen Phase des kardialen Remodelings. Die Entfernung erfolgt durch PMN sowie Makrophagen. Warnatsch et al. beobachten, dass NETs zum *Priming* von Makrophagen fähig sind und zur Aktivierung von Makrophagen beitragen können.<sup>124</sup>

Pashevin et al. untersuchten den Einfluss von NETs auf Kardiomyozyten. Dafür wurde eine Co-Kultur aus tierischen neonatalen Kardiomyozyten sowie PMN angelegt. Die PMN wurden mittels PMA zur NETose stimuliert. Die Co-Kultivierung führte zur Nekrose von Kardiomyozyten. Eine gesunkene Überlebensrate wird sowohl unter hypoxischen als auch normoxischen Bedingungen beobachtet.<sup>125</sup>

## 2.5. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Die Folgen eines Myokardinfarktes gehören zu den größten therapeutischen Herausforderungen in der Medizin. Die intensive Forschung auf dem Gebiet des kardialen Remodelings brachte neue Erkenntnisse über den Anteil des Immunsystems am kardialen Remodeling. Trotzdem sind die Protagonisten sowie die Regulation des kardialen Remodelings noch nicht ausreichend erforscht. Dabei wurde beobachtet, dass übermäßige Anpassungsvorgänge mit einem schlechten Outcome des Patienten assoziiert sind. Die Beeinflussung des kardialen Remodelings ist bereits eine wichtige Stütze der Therapie in Form von ACE Hemmern. Für eine anti-inflammatorische Therapie auf Basis der Zytokinregulation wird noch weitere Forschung benötigt. Der Einfluss von PMN nach Myokardinfarkten ist ein wichtiger Forschungsbereich. In den letzten Jahren rückten NETs als neu entdeckter Mechanismus des Immunsystems in den Mittelpunkt der Forschung. Dass NETs auch zytotoxisch auf körpereigene Zellen wirken können, ist bereits erwiesen. Zudem liegen Hinweise vor, dass NETs direkten Einfluss haben können auf die Zellen des kardialen Gewebes.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von NETs und IL-6 auf die Kardiomyozyten-Zelllinie HL-1 unter hypoxischen sowie normoxischen Bedingungen *in vitro* untersucht. Dadurch wurde untersucht, inwiefern NETs das Potential haben, die Vitalität der Kardiomyozyten zu beeinflussen. Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

- 1) Inwiefern haben NETs ein zellschädigendes Potential auf Kardiomyozyten und wie wirken sich ischämisch-inflammatorische Bedingungen auf die NETs Wirkung aus?
- 2) Tragen NETs zum inflammatorischen Milieu im nach MI bei?
- 3) Beeinflussen NETs die Proliferationsrate von Kardiomyozyten?

In dieser Arbeit wurden HL-1 Kardiomyozyten kultiviert und mit unterschiedlichen NETs-Konzentrationen behandelt. In einem zweiten Versuchsdurchgang wurden die Zellen zusätzlich mit dem Zytokin IL-6 behandelt, um inflammatorische Bedingungen eines Myokardinfarktes *in vitro* zu simulieren. Der Einfluss auf die Vitalität wurde mittels FACS sowie

Proliferationsassay gemessen. Mittels Western Blot wurde die Proteinexpression von pAkt, Connexin 43 sowie MCL-1 gemessen. Zusätzlich wurde mittels RT-PCR untersucht, inwiefern die Applikation von NETs zur Zytokinproduktion der HL-1 Kardiomyozyten führt.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

Chemikalien	
Acrylamid 30 %	BioRad Laboratories, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München
<i>Bovine Serum Albumine</i>	PAA, Cölbe
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform ≥ 99%, DAB	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 96% vergällt	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol <i>absolute</i> p. A.	AppliChem, Darmstadt
Glycerol	Sigma-Aldrich, München
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol ≥ 99,8%	Carl Roth, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol ≥99%	Carl Roth, Karlsruhe,
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
Na-Deoxycholat	Carl Roth, Karlsruhe
Nonidet-P40	US Biological, Salem, USA
<i>Nuclease-Free Water</i>	Qiagen, Hilden
Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x)	Cell Signaling Technology, Frankfurt a.M.
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Propidiumiodid	Carl Roth, Karlsruhe
Protease Inhibitor Cocktail (100x)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Rotiphorese® Acrylamid 30%	Carl Roth, Karlsruhe
SDS <i>Pellets</i>	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe,
Trichloressigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe
Tris HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Trizol® Reagent	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, München

---

 Laborartikel

Biosphere® <i>Filter Tips</i> (verschiedene Volumen)	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Blotting Filter Paper</i> 2,5 mm	invitrogen™
Eppendorf-Gefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen	BD Bioscience, Heidelberg
Falconröhrchen 15 ml	VWR, Darmstadt
Falconröhrchen 50 ml	VWR, Darmstadt
Filter 70 µm	BD Bioscience, Heidelberg
Kanülen, 0,45 x 12 mm	Terumo, Eschborn
Neubauer Kammer	LO Labor Optik, Lancing, UK
Multi®-SafeSeal® Tubes 0,2 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Multi®-SafeSeal® Tubes 0,5 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Multi®-SafeSeal® Tubes 1,5 ml	Carl Roth, Karlsruhe
MicroAmp® <i>Fast 96-Well Reaction Plate</i> (Applied Biosystems)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Microseal® <i>B` adhesive seals</i>	BioRad Laboratories, München
Mini Protean® <i>Glass Plates</i>	BioRad Laboratories, München
Mini Protean® <i>Stand and Clamp Kit</i>	BioRad Laboratories, München
<i>Nitrocellulose Blotting-Membrane</i> 0,2 µm	Peqlab, Erlangen
Petrischalen	VWR, Darmstadt
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen, 1 ml	BD Bioscience, Heidelberg
T <sub>75</sub> Flasche	BD Bioscience, Heidelberg
<i>Tissue Culture Plate</i> 6 Well	VWR, Darmstadt
<i>Tissue Culture Plate</i> 96 Well	BD Bioscience, Heidelberg

## Lösungen

CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, USA
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)</i>	Sigma-Aldrich, München
<i>FACS Clean Solution</i>	BD Bioscience, Heidelberg
<i>FACS Flow Solution</i>	BD Bioscience, Heidelberg
<i>FACS Rinse Solution</i>	BD Bioscience, Heidelberg
HBSS (ohne Ca+/Mg+)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

### Ponceau S

- 0,1 % Ponceau
- 3% Trichloressigsäure

### TBS

- 7,7 mM Tris (pH 7,5)
- 150 mM NaCl

### TBS-T

- 7,7 mM Tris (pH 7,5)
- 150 mM NaCl
- 0,05 % Tween 20

### 5% Milchpulver TBS-T

- TBS-T
- 5% Milchpulver

### HBSS prep

- HBSS
- 3% FBS

---

## Puffer

### Laemmli-Puffer (4x)

- 252 mM Tris-HCl
- 40% Glycerol
- 8% SDS
- 0,01% Bromphenolblau

### RIPA-Puffer

- 50 mM Tris pH = 8
- 150 mM NaCl
- 1 % Nonident-P40
- 0,5% Na-Deoxycholat
- 0,1 % SDS

### Laufpuffer

- 25 mM Tris (pH 8,3 – 8,8)
- 192 mM Glycin
- 0,1 % SDS

### Transferpuffer (25x)

- 12 mM Tris
- 96 mM Glycin

### *Blotting*-Puffer

- 40 ml Transferpuffer (25x)
- 50 ml Methanol
- Ad 500 ml aqua dest.

### Trenngelpuffer (4x)

- 1,5 M Tris (pH 8,8)
- 0,4 % SDS

### Sammelgelpuffer (4x)

- 0,5 M Tris (pH 6,8)
- 0,4 % SDS

### *Stripping*-Puffer

- 62,5 mM Tris (pH 6,8)
- 2% SDS

## Zellkultur

Claycomb <i>medium without L-glutamine</i>	Sigma-Aldrich, München
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe,
<i>Fetal Bovine Serum (FBS)</i>	Sigma-Aldrich, München
Fibronektin (1mg/ml)	Sigma-Aldrich, München
<i>Gelatine from bovine skin</i>	Sigma-Aldrich, München
<i>L-Ascorbic Acid, sodium salt</i>	Sigma-Aldrich, München
<i>L-Glutamine, 200 mM</i>	Sigma-Aldrich, München
<i>Norepinephrine-bitartrate salt</i>	Sigma-Aldrich, München
Penicillin-Streptomycin <i>with 10,000 units penicillin and 10 mg streptomycin per mL</i>	Sigma-Aldrich, München
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, München

### Gelatin/Fibronektin

- 0,2 mg/ml Gelatin
- 5µg/ml Fibronektin

### Norepinephrin-Ascorbinsäure

- 0,59 % L-Ascorbic Acid
- 0,32 % Norepinephrine-bitartrate salt

### Vollmedium

- Claycomb Medium
- 10 % FBS
- 0,1 mM Norepinephrin-Ascorbinsäure
- 2 mM L-Glutamin
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin

### Magermedium

- Claycomb Medium
- 0,5 % FBS
- 2 mM L-Glutamin
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin

---

## Antikörper

### Primärantikörper

Akt (pan) #4691 <i>rabbit antibody</i>	Cell Signaling Technology, Frankfurt a.M.
Beta-Actin #4967 <i>rabbit antibody</i>	Cell Signaling Technology, Frankfurt a.M.
Connexin 43 #3512 <i>rabbit antibody</i>	Cell Signaling Technology, Frankfurt a.M.
GAPDH 13H12 <i>mouse antibody</i>	Novus Biologicals, Wiesbaden
HIF-1 $\alpha$ #14179 <i>rabbit antibody</i>	Cell Signaling Technology, Frankfurt a.M.
Mcl-1 #5453 <i>rabbit antibody</i>	Cell Signaling Technology, Frankfurt a.M.
Phospho-Akt (Ser- 473) #9271 <i>rabbit antibody</i>	Cell Signaling Technology, Frankfurt a.M.

### Sekundärantikörper

<i>Polyclonal Goat Anti-Rabbit</i>	Dako, Hamburg
<i>Polyclonal Goat Anti-Mouse</i>	Dako, Hamburg

---

## Primer

### IL-6 Sigma-Aldrich, München

- For: 5'-CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA-3'
- Rev: 5'-GCAAGTGCATCATCGTTGTTTCAT-3'

### 18S Sigma-Aldrich, München

- For: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'
- Rev: 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'

---

## Zytokine

IL-6 (murin, rekombinant)    PeproTech, Hamburg

---

## Kits

BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
DNA-free™ Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Roti®-Mark WESTERN Protein-Marker und HRP Konjugat	Carl Roth, Karlsruhe

---

## Geräte

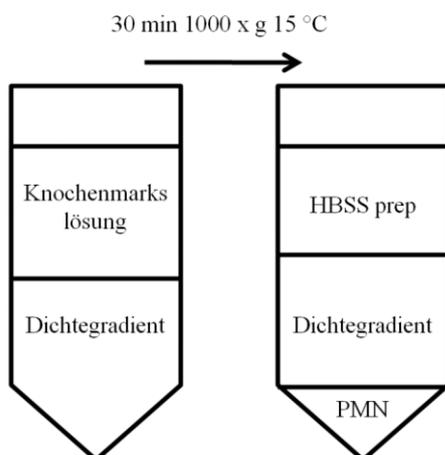
Brutschrank MCO-170AICUV-PE	Panasonic, Hamburg
Hypoxia Incubator Chamber	Stemcell Technologies, Köln
Mini-Protean® Tetra Cell	BioRad Laboratories, München
NanoDrop™ Spektralphotometer	2000/2000c Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Novex® Semi-Dry Blotter	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Perfect Spin 24R Zentrifuge	Peqlab, Erlangen
PowerPac™ HC Power Supply	BioRad Laboratories, München
Real Time PCR System (Applied Biosystems)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Sterilbank, Kojair	Vilppula, Finland
Thermo Shaker MKR13	Hettich Benelux, Geldermalsen, Netherlands
UP50H Ultraschallprozessor	Hielscher Ultrasonics, Teltow
Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
VWR <i>linear shacking water bath</i>	VWR, Darmstadt

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Isolierung von murinen PMN aus Knochenmark

Die Gewinnung der polymorphkernigen Leukozyten und der Neutrophil Extracellular Traps wurde von technischen Assistentinnen durchgeführt. Zur Gewinnung von Knochenmark wurden 8-12 Wochen alte C57/Bl6 Mäusen (CECAD Köln) verwendet. Femur und Tibia wurden entnommen und in DPBS eingelegt. Die anschließenden Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Dafür lagerten die Knochen für 10 min in 70 %igem Ethanol. Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden die Gelenkköpfe abgetrennt und die eröffneten Knochen in 15 ml HBSS + 3% FBS gelagert. Die Knochenmarkshöhle wurde mit HBSS + 3% FBS gespült, sodass sich das gelöste Knochenmark in der Petrischale sammelte. Um Gewebereste zu entfernen, wurde diese Lösung durch einen 70 µm Filter gespült. Nach Zentrifugation (5 min, 400 x g, 15°C) beinhaltete das entstandene Zellpellet Knochenmarkszellen.

Um die Erythrozyten aus dem Zellpellet zu entfernen, wurde dieses in einer 0,2%igen NaCl Lösung resuspendiert. Nach 45 Sekunden wurde die Zellslyse durch die Zugabe von 14 ml 1,2%igem NaCl gestoppt. Anschließend wurde die Knochenmarkslösung durch einen 70 µm Filter gespült. Die gefilterte Lösung wurde für 5 min bei 400 x g und 15°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 5 ml HBSS resuspendiert. Die Isolation der PMN erfolgte mittels Zentrifugation über einen Dichtegradienten. Dafür wurde 62%iges Percoll in HBSS prep angesetzt. Davon wurden 5 ml in ein 15 ml Falcon überführt. Der Dichtegradient besaß eine Dichte von 1,13 g/ml. Die Lösung mit den resuspendierten Knochenmarkszellen wurde vorsichtig auf den Dichtegradienten geschichtet, ohne dass sich die beiden Schichten vermischten. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 30 min bei 1000 x g und 15 °C, wobei keine Bremse genutzt wurde. Die PMN sammelten sich im Zellpellet.



**Abb. 2: Isolierung der PMN vor der Zentrifugation (links) und nach der Dichtegradientenzentrifugation (rechts)**

Nachdem der Überstand entfernt worden war, wurden die PMN in 1 ml HBSS prep resuspendiert. Es folgte die Entfernung der Reste des Zellgradienten. Dafür wurde die Zelllösung zentrifugiert (5 min, 400 x g, 15°C) und mit 5 ml HBSS prep gewaschen. Dieser Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt. Das nun vorliegende Pellet wurde in 1 ml PBS aufgelöst. Es folgte die Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Kammer (s. 3.2.8).

### **3.2.2. NETs Gewinnung aus stimulierten PMN**

Auf eine 6-Well Platte wurden  $2 \times 10^6$  frisch isolierte PMN in 2 ml RPMI Medium mit 1% P/S sowie 2% FCS ausgesät. Zur Auslösung der NETose wurde Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) verwendet. In jedes Well wurden 10 µl einer 10 mM PMA-Stocklösung hinzugegeben. Anschließend inkubierten die 6-Well Platten für 3 h bei 37°C. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium vorsichtig entfernt. Es folgte ein Waschschrift mit 1 ml 37 °C warmen PBS, wonach das PBS wieder vorsichtig entfernt wurde. In jedes Well wurden 500 µl DPBS pipettiert. NETs, welche sich am Boden der Wells befanden, wurden durch kräftiges Auf- und Abpipettieren von der Platte gelöst. Die Lösung wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und zentrifugiert (5 min 50 x g 4 °C). Im Überstand befanden sich die NETs, welche bei -80°C gelagert wurden. Zur Überprüfung der NETs-Qualität wurde routinemäßig die Aktivität von MPO indirekt bestimmt. Hierfür wurden 50 µl TMB Substrat mit 50 µl NETs-Lösung versetzt und nach Abstoppen mit Schwefelsäure die Absorption bei 450 nm bestimmt (VictorX3, Perkin Elmer). Die Peroxidase-Aktivität sprach für die Anwesenheit von MPO und sprach somit für NETs.

### **3.2.3. Konzentrationsbestimmung der NETs**

Die NETs-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (NanoDrop 2000c, ThermoFisher Scientific). Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Extinktion einer Lösung proportional zu ihrer Konzentration. Gemessen wurde dabei bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dies entspricht dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Für die DNA liegt eine Konstante vor, wonach die Multiplikation von Extinktion und dieser Konstante (50 µg/ml) die RNA Konzentration ergibt.

$$c = \text{Extinktion}_{260 \text{ nm}} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

Die gelösten NETs wurden anschließend bei -80°C gelagert.

### **3.2.4. HL-1 Zellen**

HL-1 Kardiomyozyten stellen seit 1998 ein etabliertes Modell für *in vitro* Untersuchungen an Kardiomyozyten dar.<sup>126</sup> Diese aus Vorhoftumorzellen gewonnenen Kardiomyozyten sind widerstandsfähig und eignen sich besonders zur Kultivierung. Auch nachdem sie mehrfach passagiert wurden, behalten sie ihre Fähigkeit, spontan zu kontrahieren. Ihre morphologischen Eigenschaften ändern sich auch nach mehreren Teilungen nicht. Verwendet wurden Zellen von Passage 97 bis 109.

### 3.2.5. Auftauen und Kultivierung von HL1 Zellen

Die HL-1 Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Dabei waren sie in 1 ml 95%igem FBS (Sigma) mit 5% DMSO gelöst. Bevor die Zellen in Kultur genommen werden konnten, wurde das Vollmedium auf 37 °C erwärmt. Eine T<sub>75</sub>-Flasche wurde mit 3 ml Gelatin/Fibronektin beschichtet und für 1 h bei 37 °C gelagert (*Coating*). Sämtliche Medien für HL-1 Zellen sind lichtempfindlich und wurden deshalb lichtgeschützt gelagert. Ein Röhrchen mit gefrorenen HL-1 Zellen wurde im Wasserbad mit 37 °C zügig aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Anteil gefroren war. Die Zellsuspension musste kühl bleiben, um eine Reaktion des DMSO mit den Zellen zu verhindern. Die Zellen wurden aufgenommen, indem 200 µl 37°C warmes Vollmedium in das Röhrchen gegeben wurde. Die Zellsuspension wurde aufgenommen und in ein 15 ml Falcon pipettiert, in welches bereits 9 ml Vollmedium vorgegeben wurden. Dieses Falcon wurde bei 500 × g für 5 min und bei 4°C zentrifugiert. Während dieser Zeit wurde das Gelatin/Fibronektin aus der gecoateten T<sub>75</sub>-Flasche entfernt, in die T<sub>75</sub>-Flasche wurden 9 ml Vollmedium vorgelegt. Aus dem zentrifugierten Falcon wurde der Überstand abgesaugt und die HL-1 Zellen in 3 ml Vollmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde vorsichtig zum Medium der T<sub>75</sub>-Flasche hinzugegeben. Anschließend kultivierten die Zellen für 4 h bei 37 °C (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) im Brutschrank. Das Medium wurde anschließend abgesaugt, um die nicht adhärenen Zellen zu entfernen. Danach wurden 12 ml neues Vollmedium hinzugegeben. Bei der Zugabe von Lösungen wurde immer darauf geachtet, nicht direkt auf die Zellen zu pipettieren.

Wurden 3 × 10<sup>6</sup> Zellen aufgetaut, brauchten diese ca. 72 h, um eine Konfluenz von 100% zu erreichen. Das Vollmedium wurde täglich gewechselt. Dabei wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde das DPBS entfernt. Die T<sub>75</sub>-Flasche wurde mit 12 ml Vollmedium gefüllt. Um die Zellen für 72 h ohne Mediumwechsel zu kultivieren, wurde die doppelte Menge an Vollmedium verwendet.

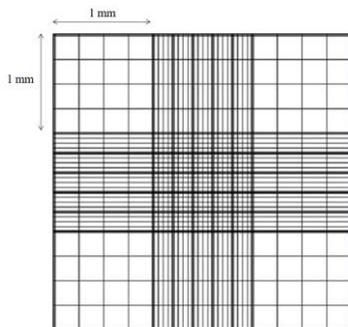
### 3.2.6. Hypoxische Zellkulturbedingungen

Zunächst wurden die Einzelteile der Hypoxiekammer mit Ethanol desinfiziert und unter die Sterilbank gestellt. Anschließend wurde die vorgesehene Platte eingesetzt. Eine Petrischale mit 20 ml sterilem Wasser wurde in die Kammer gestellt. Die Hypoxiekammer wurde luftdicht verschlossen. Der abführende und der zuführende Luftschlauch blieben geöffnet. Durch den zuführenden Schlauch wurde das hypoxische Gasgemisch (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) mit einer Geschwindigkeit von 20 l/min in die Hypoxiekammer geleitet. Durch den abführenden Schlauch entwich die Luft der Kammer. Nach 4 Minuten wurden beide Luftschläuche mit Klemmen verschlossen. Sowohl die Kontrollplatte (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) als auch die Hypoxiekammer lagerten für 20 Stunden im Brutschrank bei 37 °C.

### 3.2.7. Splitten der Zellen

Sobald die T<sub>75</sub>-Flasche zu 100 % konfluent war, wurden die HL-1 Zellen gesplittet. Dafür wurden 6-Well Platten mit 400 µl Gelatin/Fibronektin pro Well oder T<sub>75</sub> Flaschen mit 3 ml Gelatin/Fibronektin beschichtet. Diese lagerten für 1 h bei 37°C im Brutschrank. Das Medium der vollen T<sub>75</sub>-Flasche wurde entnommen und die Zellen wurden vorsichtig mit 6 ml warmen DPBS gewaschen. Das DPBS wurde wieder entfernt. Um die HL-1 Zellen zu lösen, wurden 3 ml Trypsin/EDTA hinzugegeben. Nach einer Minute wurde dieselbe Menge wieder abgesaugt und frische 3 ml Trypsin/EDTA hinzugegeben. Die T<sub>75</sub>-Flasche wurde nun für 5 min im Brutschrank gelagert. Die Trypsinierung wurde danach durch die Zugabe von 3 ml Vollmedium gestoppt. Anschließend wurde der Boden der Flasche mit dem Gemisch aus Trypsin/EDTA und Vollmedium gespült, um die HL-1 Zellen zu lösen. Diese Zellsuspension wurde dann in ein 15 ml Falcon gegeben. Um möglichst viele HL-1 Zellen zu gewinnen, wurde die Flasche mit 5 ml DPBS nochmals gespült. Diese Zellsuspension wurde ebenfalls in das 15 ml Falcon gegeben. Nach Zentrifugation (5 min, 500 x g, 4°C) lagen die HL-1 Zellen als Pellet vor. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 ml Magermedium resuspendiert. Die Zellzahl wurden mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 3.2.8. Quantifizierung der Zellen



**Abb. 3: Quadrantenmuster einer Neubauer-Zählkammer**

Die Bestimmung der Anzahl der Zellen erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Zur Vorbereitung wurde ein Deckglas auf die Trägerstege der Neubauer-Zählkammer geschoben. Dabei deuten Newton'sche Interferenzfarben über den Trägerstegen darauf hin, dass das Deckglas eng anliegt und befestigt ist. Der Abstand zwischen Deckglas und Boden der Neubauer-Zählkammer beträgt dann 0,1 mm. In den Boden sind Rillen eingelassen, die ein Quadrantenmuster ergeben (s. Abbildung 3). Die Fläche der großen äußeren Quadrate beträgt 1 mm<sup>2</sup>. Der Raum über einem großen Außenquadrat hat ein Volumen von 0,1 mm<sup>3</sup> (= 0,1 µl). Um die Konzentration einer Zellsuspension zu bestimmen, wurden 10 µl Zellsuspension mit Trypanblau 1:4 verdünnt. Das Trypanblau ermöglichte die Quantifizierung der vitalen Zellen, da abgestorbene Zellen keine intakte Membran mehr haben und das Färbemittel in die Zelle eindringen kann. Vitale Zellen erscheinen unter dem Mikroskop weiß. Abgestorbene Zellen erscheinen blau. Die angefärbte Zellsuspension wurde gemischt und in den Bereich zwischen

Boden der Neubauer-Kammer und Deckglas pipettiert. Aufgrund der Kapillarkräfte verteilt sich die Zellsuspension in der Neubauer-Kammer. Unter dem Lichtmikroskop wurden die vitalen Zellen in jedem großen Außenquadrat ausgezählt. Der Mittelwert wurde mit dem Faktor 4 multipliziert, da die Zellsuspension 1:4 verdünnt worden war. Das Produkt entsprach der Anzahl der Zellen pro 0,1 µl. Eine Multiplikation mit  $10^4$  ergab die Anzahl der Zellen pro ml.

$$\text{Mittelwert (Zellzahl der Außenquadrate)} \times 4 \times 10^4 = \text{Zellkonzentration (Zellen/ml)}$$

### **3.2.9. Versuchsanordnung**

Die in Magermedium gelösten HL-1 Zellen wurden auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Dafür wurden die gelösten Zellen zentrifugiert (5 min, 500 g, 4 °C) und in entsprechender Menge Magermedium aufgenommen.

Anschließend wurden  $1 \times 10^6$  HL-1 Zellen pro Well verteilt. Jedes Well wurde auf ein Volumen von 1,5 ml mit Magermedium aufgefüllt. Für den ersten Versuchsteil wurden zwei Platten à vier Wells benötigt. Für den zweiten Versuchsteil wurden zwei Platten à 5 Wells benötigt. Eine Platte diente als Kontrolle und kultivierte unter normoxischen Bedingungen (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) bei 37°C. Die zweite Platte kultivierte unter hypoxischen Bedingungen (5% CO<sub>2</sub>, 2% O<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) ebenfalls bei 37°C in einer Hypoxiekammer (Stemcell Technology).

### **3.2.10. In vitro Behandlung mit NETs**

Nachdem die Zellen 24 h in Magermedium kultivierten, wurde dieses abgesaugt. 1 ml DPBS wurde hinzugegeben und wieder entfernt. Anschließend wurden 1,5 ml neues Magermedium hinzugegeben. Die gefrorene NETs Lösung wurde langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden die NETs in den vorgesehenen Konzentrationen in die Wells pipettiert (0 ng/ml, 200 ng/ml, 333 ng/ml und 600 ng/ml). Parallel wurden für den zweiten Versuchsteil Zellen mit NETs und mit IL-6 (10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle diente ein Well ohne NETs sowie ohne IL-6. Für jeden Versuchsteil wurden zwei Platten verwendet. Eine Platte wurde unter normoxischen Bedingungen (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C) im Brutschrank kultiviert und diente als Kontrollgruppe. Die zweite Platte wurde in einer Hypoxiekammer (Stemcell Technology) bei 5% CO<sub>2</sub> sowie 2% O<sub>2</sub> gelagert.

Die Zellkulturplatten wurden nach 20 Stunden aus dem Brutschrank entnommen und die Hypoxiekammer geöffnet. Aus jedem Well wurde 1 ml Medium in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und für 1 min bei 17.200 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für nachfolgende Untersuchungen bei -80 °C gelagert. Die Platten wurden auf Eis gekühlt. Nach Trypsinierung der Zellen, wurden die Pellets ebenfalls bei -80°C eingefroren.

### **3.2.11. Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie**

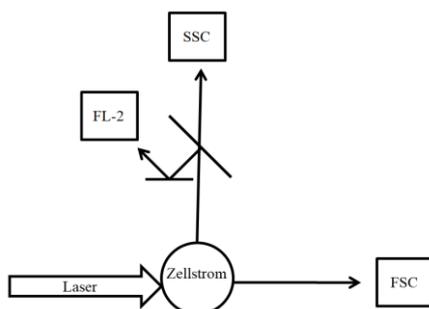
Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Bestimmung der Größe und der Komplexität der Zellen. FACS (Fluorescence activated cell sorting) bildet eine Sonderform der Durchflusszytometrie. Dabei werden fluoreszierende Farbstoffe genutzt. Diese können sich an

bestimmte Strukturen der Zellen anlagern. So können Zellen auf ihre Expression z.B. von Oberflächenmolekülen untersucht werden.

Die Zellen liegen in Suspension vor. Diese wird aufgenommen und von einem Hüllstrom geleitet. Dadurch reihen sich die einzelnen Zellen hintereinander an. Dieser geordnete Zellstrom wird in einem 90° Winkel von einem Laser getroffen. Der Laser wird von den einzelnen Zellen in mehrere Richtungen gestreut. Ein Detektor, der in Richtung des Laserstrahls liegt, misst das nach vorne gestreute Licht. Dieser Forward scatter detector (FSC) bestimmt die Größe einer Zelle. Im 90° Winkel zum Hüllstrom und zum Laser liegt der Side scatter detector (SSC). Dieser misst die Streuung der Zelle, die von der Komplexität des Zellinneren abhängig ist.

Zusätzlich können mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen weitere Merkmale der Zellen unterschieden werden. Laserstrahlen werden von Farbstoffen bei bestimmten Wellenlängen absorbiert. Dabei werden Elektronen in den Farbstoffen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Sobald die Elektronen wieder auf ihr Grundniveau fallen, wird ein Photon emittiert (=Fluoreszenz). Dieses Photon kann von Detektoren gemessen werden. Die Anzahl der Photonen ist proportional zur Menge der gebundenen Farbstoffe.

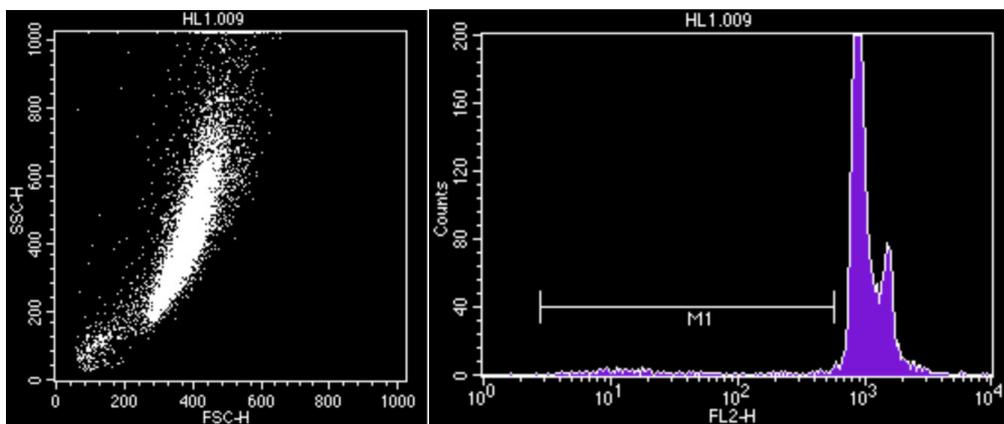
In dieser Arbeit wurde die Apoptoserate der Zellen mit Propidiumiodid gemessen.<sup>127</sup> Der Farbstoff Propidiumiodid interkaliert in die DNA. Zellen, die sich in einem späten Stadium der Apoptose befinden, weisen fragmentierte DNA auf. Lagert sich Propidiumiodid in diesen kleineren DNA-Fragmenten an, werden weniger Photonen emittiert als bei vitalen Zellen. Die unterschiedliche Menge an emittierten Photonen kann in Detektoren bestimmt werden. Propidiumiodid emittiert die meisten Photonen mit einer Wellenlänge von 617 nm. Diese Photonen werden im FL2-Detektor gemessen. Im Histogramm für die Detektion am FL2-Detektor werden die vitalen, ausdifferenzierten Zellen durch den G1 Peak repräsentiert (s. Abb. 5). Apoptotische Zellen mit fragmentierter DNA erscheinen aufgrund der schwächeren Fluoreszenz im sog. sub-G1 Bereich. Dieser wird nach visuellen Kriterien eingegrenzt. So wird eine prozentuale Angabe der apoptotischen Zellen ermöglicht. Es wurden die fluoreszierenden Eigenschaften von 10.000 Zellen pro Probe ermittelt (FACSCalibur, BD). Die Ergebnisse wurden mit der Software BD *CellQuestPro*<sup>TM</sup> ausgewertet.



**Abb. 4: Funktionsprinzip FACS Calibur**

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden 300 µl der Zellsuspension in ein FACS Röhrchen gegeben. Für jede Probe wurde ein eigenes FACS Röhrchen verwendet. Dieses wurde zentrifugiert (200 x g, 5 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml DPBS resuspendiert und abzentrifugiert (200 g, 5 min, 4 °C). Nach diesem Waschschrift wurde der Überstand wieder verworfen und das Pellet in 500 µl PBS resuspendiert. Dazu wurden 4 ml 70%iges Ethanol (-20°C) in das FACS Röhrchen gegeben. Anschließend wurde das FACS Röhrchen gevortext, bis Ethanol und DPBS vermischt waren. Das FACS Röhrchen wurden mit Parafilm luftdicht abgedeckt und bei -20°C für mindestens 2 h gelagert. Die Alkohollösung fixierte die Zellen und ermöglichte dem später hinzugefügten Propidiumiodid, die Zellmembran zu durchdringen.

Nach der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension für 5 min bei 400 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 ml DPBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde wieder zentrifugiert (5 min, 400 g, 4 °C) und der Überstand entfernt. Das Propidiumiodid (1 mg/ml) wurde 1:50 mit PBS verdünnt. Anschließend wurde das Zellpellet in 300 µl des verdünnten Propidiumiodids resuspendiert. Die FACS Röhrchen wurden für 30 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert. Das Propidiumiodid lagerte sich in dieser Zeit an die DNA an. Kurz vor der Messung der Proben im FACSCalibur™ (BD) wurden die Proben gevortext.



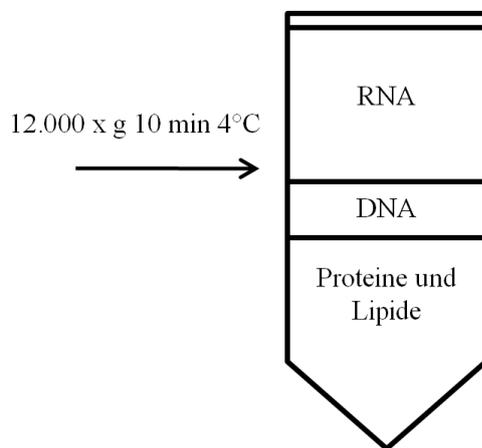
**Abb. 5: Beispiel-Histogramm der FACS Analyse**

links: Die Punktwolke beschreibt die Größe (FSC) sowie Komplexität (SSC) der HL-1 Kardiomyozyten; rechts: Der G1-Peak beschreibt die Anzahl der vitalen Zellen. Der Sub-G1-Bereich wurde visuell als M1 eingegrenzt und beschreibt die Anzahl der apoptotischen Zellen.

### 3.2.12. RNA Isolation mittels Trizol

Die Isolation der RNA erfolgte nach der single-step Methode von Chomczynski & Sacchi (1987) und basiert auf der Zugabe von Trizol. Dieses Reagenz besteht u.a. aus Guanidiniumthiocyanat, welches zur Zellyse und zur Inaktivierung der Nukleasen beiträgt. Des Weiteren ist Phenol beigemischt, welches die RNA löst und Proteine denaturiert. Das Phenol interagiert mit den hydrophoben Gruppen im Zentrum des Proteins und verursacht so dessen Präzipitation. Zusätzlich ermöglicht Phenol bei einem niedrigem pH-Wert die Trennung von

DNA und RNA. DNA liegt als Doppelstrang vor, wobei die negativ geladenen Phosphatgruppen nach außen zeigen. RNA liegt als Einzelstrang vor, weshalb negative Phosphatgruppen und positiv geladene Basen vorliegen. Die Protonen in der sauren Phenollösung lagern sich an die Phosphatgruppen der DNA und der RNA an. Die Gesamtladung der DNA ist somit ausgeglichen. Die positiven Ladungen der RNA ermöglichen Wassermolekülen, eine Hydrathülle zu bilden. Damit ist die DNA hydrophob, während die RNA hydrophil ist. Die Zugabe von Chloroform trägt zur Denaturierung von Proteinen bei und ermöglicht eine bessere Trennung von hydrophober und hydrophiler Phase. Nach Zentrifugation beinhaltet die obere wässrige Phase die RNA. In der Interphase befindet sich die DNA und in der unteren organischen Phase sind Proteine und Lipide gelöst. Das Ausfällen der RNA aus der wässrigen Phase erfolgt durch Zugabe von Isopropanol.



**Abb. 6: Phasentrennung nach Zentrifugation**

Zur RNA Isolation wurden 800 µl Trizol auf die Zellpellets gegeben, vorsichtig auf- und abpipettiert und für 5 min bei RT gelagert. Anschließend wurden 160 µl Chloroform hinzugegeben. Die Proben wurden für 15 Sekunden gemischt, indem die Proben wiederholt über Kopf gekippt wurden, und für 3 min bei RT gelagert. Es folgte die Trennung der Phasen mittels Zentrifugation (12.000 x g, 10 min, 4°C). Die wässrige Phase (s. Abb. 6) mit der RNA wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Anschließend wurden 400 µl Isopropanol zur gelösten RNA gegeben. Die Proben wurden durchmischt, indem sie viermal über Kopf gekippt wurden. Die Proben inkubierten für 10 min bei RT. Nach Zentrifugation (12.000 x g, 10 min, 4°C) bildete die RNA das Pellet. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 800 µl 75 %igem nukleasefreiem Ethanol resuspendiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert (7500 x g, 5 min, 4°C). Die RNA lag wieder als Pellet vor und der Überstand wurde gründlich entfernt. Damit das restliche Ethanol verdampfen konnte, standen die Eppendorf-Gefäße für 10 min mit geöffnetem Deckel bei RT. Je nach Größe der Pellets wurde die RNA in 20-60 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert.

### 3.2.13. RNA Aufreinigung

Um sicherzustellen, dass die Proben frei von Rest-DNA sind, wurden die Proben einem DNase Verdau unterzogen. Hierbei wurde nach Anleitung des DNA-free™ Kits (Thermo Fisher Scientific) verfahren. 1 µl DNase wurde zur gelösten RNA gegeben. Zu dieser Lösung wurde das 0,1-fache Volumen an 10x DNase I Buffer pipettiert. Anschließend inkubierten die Proben für 30 min bei 37°C. Die Aktivität der DNase wurde gestoppt, indem das 0,1-fache Volumen DNase Inactivation Reagent hinzugegeben wurde. Die Proben wurden gevortext und inkubierten für 2 min bei RT. Danach wurden die Proben mit 10.000 x g für 1,5 min bei 4°C zentrifugiert. Die DNase bildete das Pellet und die gereinigte RNA befand sich im Überstand. Dieser wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und konnte bei -80°C gelagert werden.

### 3.2.14. Konzentrationsmessung von RNA

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch am NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Die maximale Absorptionsrate für Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Für die RNA liegt eine Konstante vor, wonach die Multiplikation der Extinktion bei 260 nm und dieser Konstante (40µg/ml) die RNA Konzentration ergibt.

$$c = \text{Extinktion}_{260 \text{ nm}} \times 40\mu\text{g/ml}$$

Zusätzlich wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen. Dieser Bereich entspricht dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Der Quotient aus den Werten bei 260 nm und 280 nm sollte einen Wert von 1,8 nicht unterschreiten, da in diesem Fall die Proben zu sehr mit Proteinen verunreinigt sind.

### 3.2.15. Reverse Transkription

Für die anschließende *Real time* PCR wurde cDNA (komplementäre DNA) benötigt. Deshalb wurde das High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit (Applied Biosystems) zum Umschreiben der RNA in cDNA verwendet. Von jeder Probe wurden 500 ng RNA benötigt. Das passende Volumen wurde in RNA Multiply®-Pro Gefäße (0,2 ml) pipettiert. Die Gefäße wurden mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt, sodass die RNA in einer Konzentration von 0,05 µg/µl vorlag. Die Proben wurden auf Eis gelagert. Mit dem Kit wurde der *Mastermix* wie folgt angesetzt:

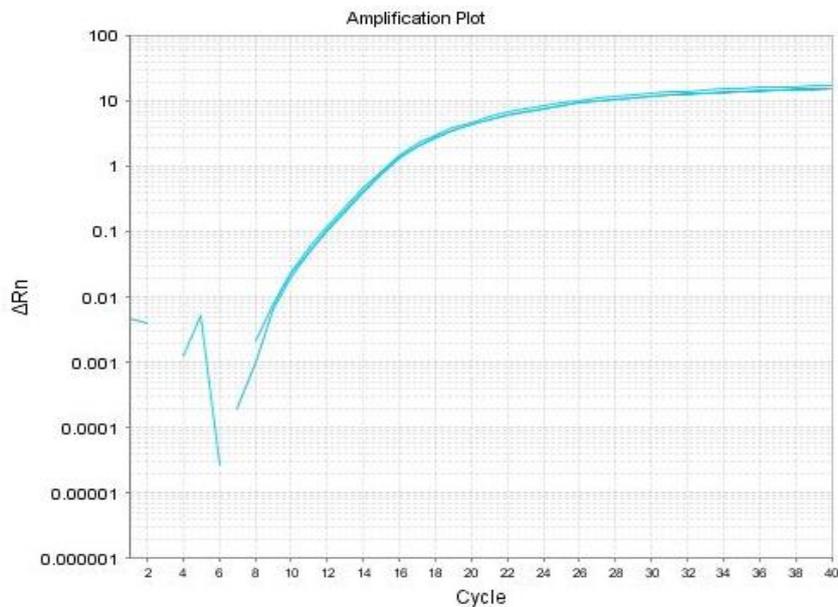
Nuklease-freies Wasser	4,2µl
10x RT Buffer	2,0 µl
25x dNTP Mix (100mM)	0,8 µl
10x Random <i>Primers</i>	2,0 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0 µl
<hr/>	
Gesamtmenge pro Probe	10 µl

10 µl *Mastermix* wurden zu jeder Probe in die Multiply®-Pro Gefäße gegeben. Die reverse Transkription wurde im Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems) durchgeführt unter folgenden Bedingungen:

Schritt	I	II	III	IV
Temperatur	25°C	37°C	85°C	4°C
Zeitdauer	10 min	120 min	5 min	

### 3.2.16. Real time PCR

Die konventionelle PCR ermöglicht die Amplifikation bestimmter Gensequenzen. Bei der Real Time PCR erfolgt die Detektion der Genprodukte während der Amplifikation. Dazu muss die zu untersuchende Gensequenz genau bekannt sein. In einem ersten Schritt wird die DNA bei 95°C denaturiert. Die doppelsträngige DNA teilt sich in zwei Einzelstränge auf. Die beiden hinzugefügten *Primer* sind komplementär zum Beginn der Gensequenz, welche amplifiziert werden soll. Bei 60°C findet das *Annealing* statt. Dabei legt sich ein *Primer* an die Gensequenz eines Einzelstrangs an. Der andere *Primer* legt sich an die entsprechende Gensequenz des zweiten Einzelstrangs an. Bei der anschließenden *Elongation* verlängert eine hitzeresistente DNA-Polymerase die beiden *Primer*, sodass zwei gleiche DNA-Doppelstränge entstehen. So wird die DNA-Sequenz verdoppelt. Die ursprüngliche cDNA dient als Vorlage (*Template*). Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt. Daraus resultiert im Idealfall eine exponentielle Zunahme der Gensequenzen. Fluoreszierende Stoffe (hier SYBR *Green*), welche in die DNA interkalieren, ermöglichen die Messung der Amplifikation während der Zyklen. Während der ersten und der letzten Zyklen ist das Verhältnis von Substrat zu Enzym suboptimal. Zudem überwiegen anfangs Gensequenzen, welche nicht untersucht werden sollen. Dieser *background* kann mittels der Software mathematisch entfernt werden. Dazu wurde eine *baseline* definiert. Diese *baseline* beschreibt den Bereich, in welchem die untersuchte Gensequenz noch nicht exponentiell zunimmt und vom *background* überlagert wird. Zudem wurde mit der Software ein *threshold* definiert. Dieser gibt den Abschnitt der Amplifikationskurven an, ab welcher ein exponentielles Wachstum stattfindet. Der Ct-Wert beschreibt die Anzahl der Zyklen, die eine Probe benötigt, um den *threshold* zu erreichen. Dabei ist der Ct-Wert invers zur Anzahl der Gensequenzen in der Probe. Je mehr von der gesuchten Gensequenz in den Proben vorhanden ist, desto schneller wird der *threshold* erreicht und desto kleiner ist der Ct-Wert.



**Abb. 7: Beispiel einer Amplifikationskurve für 18S: Eine exponentielle Vermehrung findet ca. zwischen Zyklus 10 und 16 statt.**

Die cDNA wurde auf die *IL-6* Expression untersucht. Damit die Expression quantifiziert werden konnte, wurde sie mit der Expression des *housekeeping-Gens 18S* verglichen. Dieses Gen eignet sich als Referenz, da es nicht durch äußere Einflüsse reguliert wird. Mit der delta-delta Methode wurde die relative Genexpression ermittelt. Dafür wurde die Differenz der Ct-Werte von *IL-6* (zu untersuchendes Gen) und *18S* (Vergleichs-Gen) berechnet. Dieser Differenz wurde der Ct-Wert der Kontrollprobe abgezogen. Diese zweifache Differenz wie folgt verwendet, um die relative Genexpression in Verhältnis zur Kontrollprobe auszudrücken:

$$\text{Relative Genexpression zur Kontrollprobe} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Um die optimale Template-Konzentration für die Real Time PCR zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe der cDNA angesetzt. Dafür wurde ein Anteil cDNA aus jeder Probe entnommen und gepoolt. Aus dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt mit Konzentrationen zwischen 2,5 ng/μl bis 0,02 ng/μl. 4 μl jeder Konzentration wurde als Triplet auf einer 96-Well Platte verteilt. Die Verdünnungsreihe wurde zweimal aufgetragen, da die Expression für das *IL-6* Gen und für das *18S* Gen untersucht werden sollte. Nach Zugabe des *Mastermix* (s. unten) wurde die Real Time PCR gestartet. Um die Spezifität der *Primer* zu prüfen, wurde auch eine Schmelzkurve ermittelt. Als Negativprobe wurde ein Triplet mit Nuklease-freiem Wasser verwendet (NTC, No Template Control). Für das *IL-6* Gen wurde die beste Amplifikation bei einer Template-Konzentration von 2,5 ng/μl gemessen. Für das *18S* Gen liegt die optimale Amplifikation bei 0,02 ng/μl.

	<i>IL-6</i>	<i>18S</i>
Template Konzentration	2,5 ng/μl	0,02 ng/μl

Die Proben ohne Zugabe von IL-6 wurden auf ihre IL-6 Expression untersucht. Zunächst wurden die Proben auf eine Konzentration von 2,5 ng/μl für IL-6 bzw. 0,02 ng/μl für 18S verdünnt. Von jeder Probe wurden 4 μl als Triplet in eine 96-Well Platte pipettiert. In drei Wells wurde nucleasefreies Wasser pipettiert. Anschließend wurden in jedes Well 8,5 μl *Mastermix* gegeben. Dieser beinhaltet unterschiedliche Primer, je nachdem welches Gen untersucht wurde:

*IL-6 Genexpression*

2x SyBR Green master mix	6,25 μl
Primer F IL-6 (10 μM)	0,375 μl
Primer R IL-6 (10μM)	0,375 μl
Nuklease-freies Wasser	1,5 μl

---

Gesamtvolumen 8,5 μl

*18S Genexpression*

2x SyBR Green master mix	6,25 μl
Primer F 18S (10μM)	0,125 μl
Primer R (10μM)	0,125 μl
Nuklease-freies Wasser	2 μl

---

Gesamtvolumen 8,5 μl

Anschließend erfolgte die Durchführung und Auswertung der Real Time PCR mittels StepOnePlus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems) unter folgenden Bedingungen:

Schritt	I	II (40 Zyklen)	
Temperatur	95°C	95°C	60°C
Zeitdauer	10 min	12 sec	60 sec

### 3.2.17. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA Assay

Um die Gesamtkonzentration der Proteine in den Proben zu messen, wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Dieses basiert auf zwei Reaktionsschritten. Zuerst bilden Cu<sup>2+</sup>-Ionen mit den Stickstoffatomen der Peptidketten einen

Chelatkomplex. Im vorliegenden alkalischen Milieu werden die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen reduziert. Diese Reaktion ist als Biuret-Reaktion bekannt. In einem zweiten Schritt bildet ein  $\text{Cu}^{1+}$  Ion mit zwei BCA (bicinchoninic acid) Molekülen einen Chelatkomplex. Diese Reaktion führt zu einem violetten Farbumschlag. Anschließend kann die Konzentration der Proteine photometrisch bestimmt werden. Die Lösung hat ihre maximale Absorptionsrate bei einer Wellenlänge von 562 nm und ist in diesem Bereich proportional zur Proteinkonzentration. Die Quantifizierung erfolgt durch Vergleich mit einer Verdünnungsreihe BSA mit bekannten Konzentrationen.

Die HL-1 Zellpellets wurden in 30-40  $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer resuspendiert. Proteaseinhibitoren und Phosphataseinhibitoren wurden im Verhältnis 1:100 dem RIPA-Puffer hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend mittels Sonifizierung lysiert. Die Sonifizierung erfolgte durch 10 Stöße mittels UP50H Ultraschallprozessor (Hielscher®) (0,5 Cycle, 80 % Amplitude). Für die anschließende Proteinbestimmung wurden die Proben 1:6 mit PBS verdünnt. Auf eine 96-Well Platte wurden 10  $\mu\text{l}$  der sonifizierten Proben und der BSA Standardreihe als Duplet verteilt. Das *Working Reagent* wurde aus den Anteilen A und B aus dem Kit im Verhältnis 50:1 hergestellt. In jedes Well wurden 200  $\mu\text{l}$  *Working Reagent* pipettiert. Die Platte wurde luftdicht verschlossen und für 30 min bei 37°C lichtgeschützt im Brutschrank kultiviert. Danach wurde die Absorption am Victor X3 Multimode Plate Reader (PerkinElmer) bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Aus den Werten der BSA Standardreihe wurde eine Ausgleichsgerade ermittelt. Anhand dieser wurde die Proteinkonzentration der Proben errechnet.

### **3.2.18. SDS-PAGE**

Die SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ist ein Verfahren zum Sortieren von Proteinen nach ihrer Größe. Dabei durchlaufen die Proteine ein Gel, welches wie ein Sieb wirkt. Große Proteine durchlaufen das Gel langsamer als kleine Proteine. Die Geschwindigkeit ist von der Porengröße des Gels abhängig und somit vom Anteil an Acrylamid. Das Gel besteht aus zwei Abschnitten. Das obere Sammelgel beinhaltet Taschen, in welche die Proben gefüllt werden. Das untere Trenngel ist der Bereich, wo die Sortierung der Proteine stattfindet.

Zur Herstellung der Gele wurde das Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Module verwendet. Zunächst wurden die Glasplatten mit 70%igem Ethanol gereinigt und in das Halterungssystem eingesetzt. Dann wurde das 10 %ige Trenngel in den Bereich zwischen den Glasplatten gegossen. Bei der Herstellung der Gele wurde darauf geachtet, dass das APS zuletzt hinzugegeben wurde, da dieses die Polymerisation auslöste. Über das Trenngel wurde Ethanol gegossen, um die obere Kante zu glätten. Nach 20 min war das Gel auspolymerisiert und das Ethanol wurde entfernt. Auf das Trenngel wurde das Sammelgel geschichtet und ein 15er-Kamm eingesetzt. Das Sammelgel benötigte 20 min für die Polymerisation. Die Gele waren wie folgt zusammengesetzt:

	Sammelgel Trenngel	
30% Acrylamid	650 µl	2,5 ml
H <sub>2</sub> O	3 ml	3,125 ml
4x Trenngelpuffer	-	1,875 ml
4x Sammelgelpuffer	1,25 ml	-
TEMED	10 µl	10 µl
APS	25 µl	25 µl

Von jeder Probe wurden 20 µg bis 35 µg Protein (je nach Antikörper) mit Laemmli-Puffer + Mercaptoethanol versetzt. Die Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit dem Laemmli-Puffer (4x) versetzt und für 7 min bei 95°C erhitzt.

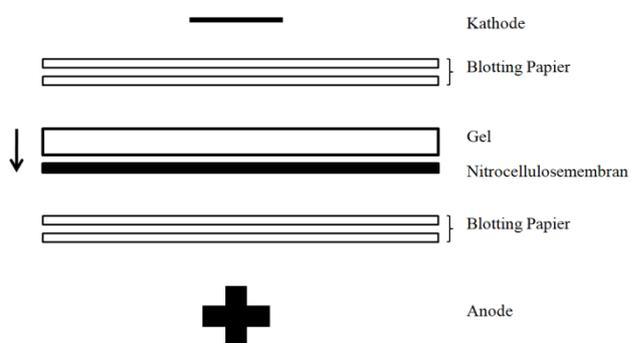
Die Wärmeenergie und das Mercaptoethanol lösen die Wasserstoffbrückenbindungen sowie die Disulfidbrücken. Der Laemmli-Puffer beinhaltet das anionische Detergens SDS. Dieses lagert sich über hydrophobe Wechselwirkungen in konstanten Abständen an die Peptidketten an. Die Eigenladung der Proteine wird auf diese Weise überdeckt. Das Protein ist insgesamt negativ geladen. Durch diese Schritte werden die Proteine denaturiert und schnurartig in die Länge gezogen. Die Tertiär- und Sekundärstruktur ist aufgehoben. Dieser Zustand ist optimal für die Größentrennung in den Gelen.

Die Gele wurden in eine Mini Protean<sup>®</sup> Tetra Cell (BioRad) gestellt. Bei 4 Gelen wurde die Kammer mit 1100 ml Laufpuffer gefüllt. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass der Raum zwischen zwei Gelen randvoll mit Laufpuffer ist. Anschließend wurden die Kämme aus den Gelen gezogen und die Proben in die Geltaschen pipettiert. Zur Kontrolle der Größe der Proteine wurde eine Tasche mit 5 µl Roti<sup>®</sup>-Mark Western Protein Marker gefüllt. Dieser Standard besteht aus Proteinen von bekannter Größe. Anhand dieser Skala konnte die Größe der detektierten Proteinbanden abgeschätzt werden. Zunächst wurde eine Spannung von 60 V in der Kammer eingestellt. Die Proteine in den Taschen durchwandern in Richtung der Anode erst das Sammelgel. Sobald die Proteine das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Nachdem die Proteine auch das Trenngel durchlaufen hatten, wurde die Spannungsquelle ausgeschaltet und das Sammelgel wurde entfernt. Das Trenngel wurde in Transferpuffer überführt.

### 3.2.19. Western Blot

Die Übertragung von Proteinen auf eine Membran wird als Western Blot bezeichnet. Durch die elektrische Spannung, welche senkrecht zum Gel mit den Proteinbanden angelegt ist, wandern die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode. Dabei bleiben sie aufgrund ionischer und polarer Wechselwirkungen an der Nitrocellulosemembran, welche in Richtung der Anode liegt, haften. Hier wurden Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,2 µm

genutzt. Die Anordnung der sortierten Proteinbanden bleibt auch auf der Nitrocellulosemembran erhalten. In dieser Arbeit erfolgte das Blotting nach dem Semi-Dry Blotting Prinzip. Gel und Nitrocellulosemembran wurden übereinandergelegt. Diese Zusammenlagerung wurde von jeweils zwei 2,5 mm dicken Blotting Papieren flankiert. Die Blotting Papiere wurden zuvor in Transferpuffer getränkt. Dieser dient als Ionenreserve bei der Anlegung der Spannung und der resultierenden Proteinwanderung. Anschließend wurde diese Anordnung in den Novex® Semi-Dry Blotter gelegt. Das Gel lag dabei in Richtung der Kathode. Die Nitrocellulosemembran lag in Richtung der Anode (s. Abb. 8). Entstandene Luftblasen im Bereich zwischen Gel und Nitrocellulosemembran wurden durch leichten Druck entfernt. Der Novex® Semi-Dry Blotter wurde vorsichtig zugeschraubt. Für 2 h wurde eine Spannung von 23 V angelegt.



**Abb. 8: Anordnung im Novex® Semi-Dry Blotter**

Anschließend wurde die Kammer geöffnet und die Nitrocellulosemembran für 3 min in Ponceau S Färbung gelagert. So wurde kontrolliert, ob die Übertragung der Proteine funktioniert hat. Die angefärbte Membran wurde mit destilliertem Wasser entfärbt (3 x 5 min). Es folgte die immunologische Markierung.

### 3.2.20. Immundetektion von Proteinen

Mit Hilfe von Antikörpern ist es möglich, bestimmte Proteine auf der Nitrocellulosemembran zu detektieren. Dafür werden zwei Antikörper verwendet. Der Primärantikörper richtet sich gegen ein Epitop am gesuchten Protein. Der Sekundärantikörper bindet an den Fc-Anteil des Primärantikörpers und ist an ein HRP-Enzym gekoppelt. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Luminol, wobei die entstehende Chemolumineszenz detektiert werden kann. Luminol wird im letzten Schritt als Entwicklungssubstrat hinzugegeben. Je mehr Proteine vorliegen, desto mehr Chemolumineszenz kann gemessen werden.

Die Nitrocellulosemembran wurde in einem 50 ml Falcon mit 5% Milchpulver-TBS-T für 1 h inkubiert. Das Milchpulver blockte die unspezifischen Bindungsstellen an der Nitrocellulosemembran, sodass der Primärantikörper nur an das gesuchte Epitop bindet. Nach dem *Blocken* wurde die Membran mit TBS-T gewaschen (3 x 5 min), um verbliebenes

Milchpulver zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper in 5% BSA-TBS-T. Folgende Antikörper und Verdünnungen wurden verwendet: HIF-1  $\alpha$  (1:1000), pAkt (1:800), Connexin 43 (1:1000), MCL-1 (1:1000), beta-Aktin (1:1000), Akt (1:1000), GAPDH (1:8000). Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C. Im darauffolgenden Waschschrift mit TBS-T (3 x 5 min) wurden die nicht gebundenen Antikörper entfernt. Da die verwendeten Primärantikörper aus Hasen (Rabbit) gewonnen wurden, richtete sich der Sekundärantikörper (anti-Rabbit) gegen den Fc-Anteil von Rabbit-Antikörpern. Der Sekundärantikörper wurde 1:1000 mit TBS-T verdünnt. Zusätzlich wurde Roti®-Mark Western HRP-Konjugat im Verhältnis 1:4000 dazugegeben, um die Detektion des Proteinmarkers zu ermöglichen. Die Nitrocellulosemembran inkubierte lichtgeschützt für 1 h in 4 ml dieser Lösung. Darauf folgten drei Waschschriffe mit TBS-T für jeweils 5 min, um die ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran vollständig mit Pierce® ECL Western Blotting Substrate benetzt. Dieses Substrat stellt das Luminol für die Chemilumineszenz-Reaktion zur Verfügung. Zuvor wurde es nach Herstellerangaben aus Anteil A und B im Verhältnis 1:1 zusammengemischt. Die resultierende Chemilumineszenz wurde mit Hilfe des ChemiDoc™XRS Gel Imaging Systems detektiert.

Die Proteine beta-Aktin und GAPDH dienen als *Housekeeping*-Protein. Die Expression dieser Gene wird nicht reguliert. Um die Expression der gesuchten Proteine zu ermitteln, wurde die Chemilumineszenz dieser Proteine in Relation zum jeweiligen *Housekeeping*-Protein gesetzt. pAkt wurde in Relation zu Akt gesetzt. Connexin 43 und MCL-1 wurden in Relation zu beta-Aktin gesetzt. HIF-1  $\alpha$  wurde mit GAPDH verglichen.

### **3.2.21. Blot-Stripping**

Zur Detektion von *Housekeeping* Proteinen ist es zunächst erforderlich, die bisher gebundenen Antikörper von der Nitrocellulosemembran zu entfernen. Dieser Vorgang wird als *Stripping* bezeichnet. Auf diesen Schritt folgten das Blocken sowie die Inkubation mit Primärantikörpern gegen das *Housekeeping*-Protein.

Die Nitrocellulosemembran wurde in 40 ml *Stripping* Puffer gelegt. Diesem Puffer wurden zuvor 312  $\mu$ l Mercaptoethanol beigemischt. Die Membran inkubierte in dieser Lösung, während sie in einem Wasserbad bei 60°C geschüttelt wurde. Die Dauer der Inkubation betrug zwischen 15 bis 17 Minuten je nach Dicke der Proteinbanden. Anschließend wurde der *Stripping*-Puffer entfernt und die Membran mit PBS gewaschen (3 x 5 min). Danach folgte ein Waschschrift über 5 min mit TBS-T. Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend wie zuvor beschrieben für das Blocken sowie die Inkubation mit Antikörpern genutzt.

### **3.2.22. Proliferationsassay**

Zur Bestimmung der Proliferationsrate von HL-1 Zellen wurde das CellTiter96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay genutzt. Diese Lösung besteht aus MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] und PES [Phenazine Ethosulfate]. Proliferierende Zellen stellen NADPH und NADH für ihren Stoffwechsel her. Diese Reduktionsmittel reduzieren MTS zu Formazan. Das Formazan löst sich im Zellmedium und verfärbt dieses gelb. Der Farbumschlag kann photometrisch bei 490 nm gemessen werden. Die Absorptionsrate ist dabei proportional zur Anzahl der proliferierenden Zellen.

Zunächst wurden 96-Well Platten mit 50 µl Gelatin-Fibronektin für 1 h bei 37 °C beschichtet. Die HL-1 Kardiomyozyten wurden aus der T<sub>75</sub>-Flasche gelöst und anschließend mittels Neubauer-Kammer gezählt. Anschließend wurden die HL-1 Kardiomyozyten in Magermedium auf eine Konzentration von 5 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml eingestellt. Das Gelatin/Fibronektin wurde aus den Wells entfernt und zwei Wells wurden mit 100 µl Magermedium gefüllt. In die restlichen Wells wurde ein Volumen von 100 µl (= 5 x 10<sup>4</sup> Zellen) verteilt. Anschließend kultivierten die Zellen für 24 h im Brutschrank.

Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit DPBS gewaschen. Anschließend folgte die *in vitro* Behandlung mit NETs (s. 3.2.8). 20 µl des CellTiter96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Reagenz wurden nach 20-stündiger Inkubation in jedes Well gegeben. Dabei wurde das Reagenz direkt in das Medium pipettiert. Anschließend wurde die Platte leicht geschwenkt, damit sich das Reagenz gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden für 1,5 h in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurde die Absorption photometrisch bei 490 nm gemessen (Victor<sup>™</sup> X3 Multimode Plate Reader, PerkinElmer).

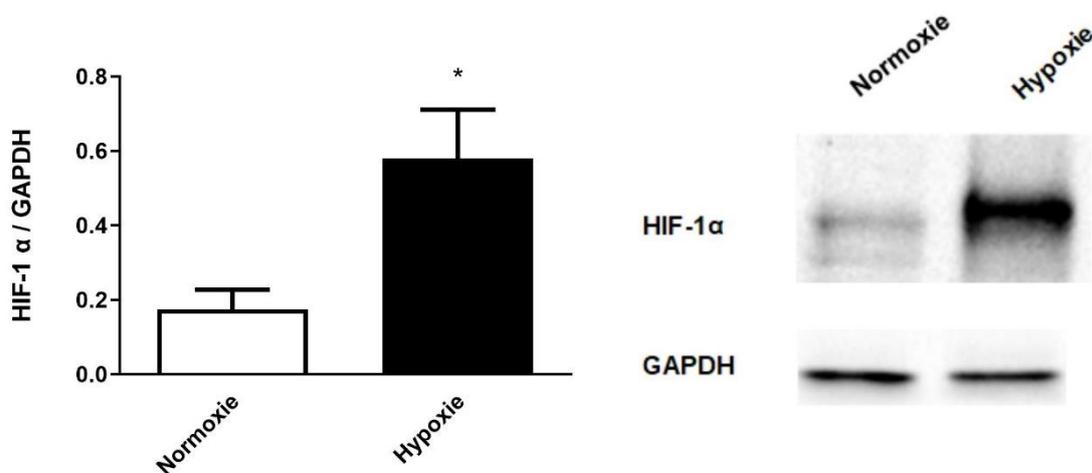
### **3.2.23. Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung wurde die Software GraphPad Prism (San Diego, Kalifornien USA) verwendet. Der Vergleich mehrerer Proben erfolgte mittels ANOVA Tests nach Newman-Keuls. Zur Überprüfung der Signifikanz wurden ungepaarte t-Tests eingesetzt. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert <0,05 angenommen. Sämtliche Daten wurden als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. HIF-1 $\alpha$ Proteinexpression nach Hypoxie

Um die ischämische Umgebung eines Myokardinfarktes zu simulieren, wurden Zellen unter Hypoxie oder Normoxie kultiviert. Zur Bestätigung des Versuchsaufbaus wurde der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  untersucht. Dieses Protein wird von Zellen unter hypoxischen Bedingungen exprimiert und reguliert diverse Gene, welche an der Adaptation unter hypoxischen Bedingungen beteiligt sind. Es konnte eine signifikante Erhöhung der HIF-1 $\alpha$  Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 9).

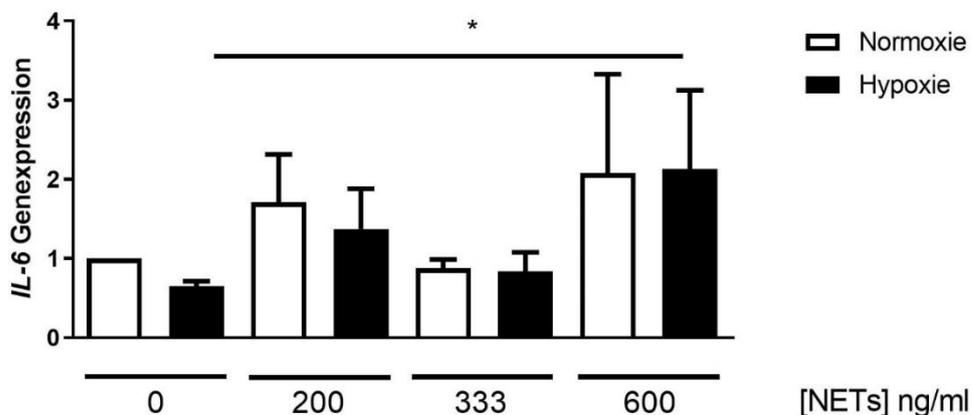


**Abb. 9: HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression von HL-1 Zellen unter hypoxischen sowie normoxischen Bedingungen.**

Die HL-1 Kardiomyozyten wurden für 20 h unter normoxischen (NO: 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) sowie hypoxischen (HO: 2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) Bedingungen kultiviert. Mittels Western Blot wurde die Proteinexpression untersucht. Die Quantifizierung erfolgte nach Blot-Stripping und Inkubation mit einem anti-GAPDH Antikörper. Dafür wurde HIF-1 $\alpha$  in ein relatives Verhältnis zu GAPDH gesetzt. Ein Beispiel für einen Blot wird bildlich dargestellt. (n=4); \*p<0,05

#### 4.2. *IL-6* Genexpression in HL-1 Kardiomyozyten nach Zugabe von NETs unter normoxischen sowie hypoxischen Bedingungen

Neben vielen anderen Zellen sind Kardiomyozyten in der Lage das Zytokin *IL-6* zu produzieren. Dieses pro-inflammatorische Zytokin wird u.a. von Immunzellen sezerniert und trägt zur inflammatorischen Phase des kardialen Remodelings bei. Verschiedene Auslöser für die *IL-6* Produktion, wie hypoxische Bedingungen oder andere Zytokine, sind bekannt. Mittels RT-PCR wurde die NETs-induzierte Regulation des *IL-6* Gens ermittelt. Dazu wurden HL-1 Kardiomyozyten mit NETs in aufsteigender Konzentration inkubiert. Um die ischämischen Bedingungen eines MIs zu simulieren, wurden Zellen unter normoxischen sowie hypoxischen Bedingungen kultiviert.



**Abb. 10 Relative *IL-6* Genexpression in HL-1 Kardiomyozyten nach NETs Zugabe.**

HL-1 Kardiomyozyten wurden für 20 h mit unterschiedlichen NETs-Konzentrationen kultiviert (0 ng/ml; 200 ng/ml; 333 ng/ml; 600 ng/ml). Der Versuch erfolgte unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) sowie hypoxischen (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) Bedingungen. Die relative *IL-6* Expression wurde mittels delta-delta C<sub>T</sub> Methode errechnet. (n=8) \*p<0,05

In Abb. 10 wird die relative *IL-6* Genexpression dargestellt. Die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen führte zu keiner signifikanten Regulation. Allenfalls ohne die Zugabe von NETs sowie unter einer geringen NETs-Konzentration von 200 ng/ml deutete sich eine geringfügige Herabregulierung an. Unter höheren NETs-Konzentrationen zeigte sich kein Unterschied in der Regulation zwischen hypoxischen und normoxischen Bedingungen. Die Zunahme der NETs-Konzentration wies keinen durchgehenden linearen Zusammenhang mit der Genexpression auf. Die Zugabe von 600 ng/ml NETs führte zu einer deutlichen Hochregulation der *IL-6* Genexpression. Dabei wurde die relative Genexpression im Vergleich zur hypoxischen Nullprobe mehr als verdoppelt. Trotz breiter Standardabweichung war eine signifikante Regulation zwischen der hypoxischen Nullprobe sowie jener hypoxischen Probe nachweisbar.

### 4.3. Einfluss von NETs auf die Apoptoserate von Kardiomyozyten

Zur Ermittlung des zellschädlichen Potentials von NETs wurde die Apoptoserate in HL-1 Kardiomyozyten mittels FACS ermittelt. Dabei wurden NETs in verschiedenen Konzentrationen mit HL-1 Kardiomyozyten inkubiert (s. 3.2.9). Um die Wirkung von NETs bei einem Myokardinfarkt zu simulieren, wurden die Zellen für 20 h unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Die Kontrollgruppe wurde dabei in Normoxie kultiviert. Im zweiten Versuchsteil wurde zusätzlich IL-6 in gleichbleibender Konzentration von 10 ng/ml hinzugegeben, um das inflammatorische Milieu eines MIs zu simulieren. Durch Festlegung des M1 Bereiches (bzw. Sub-G1 Bereich) wurde die Menge der apoptotischen Zellen festgelegt. Abb. 11 zeigt jeweils ein Histogramm normoxischer und hypoxischer Zellen.

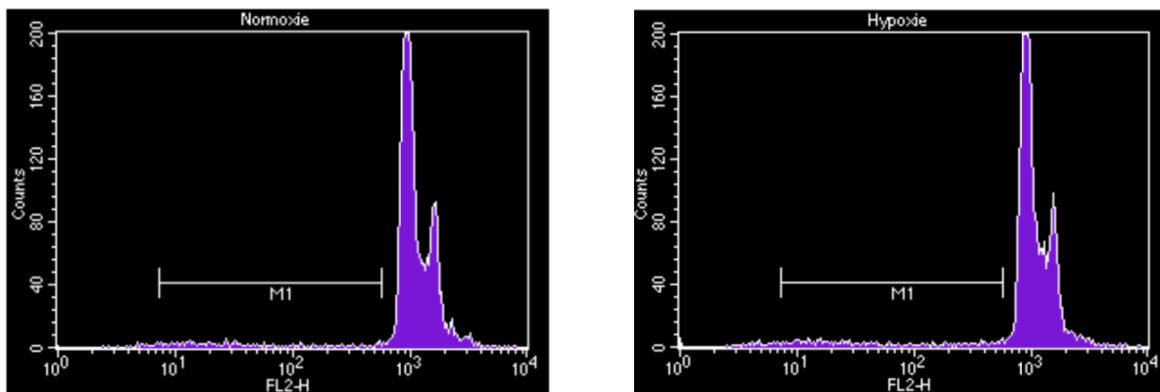


Abb. 11 Histogramm von HL-1 Kardiomyozyten im FACS nach Normoxie bzw. Hypoxie

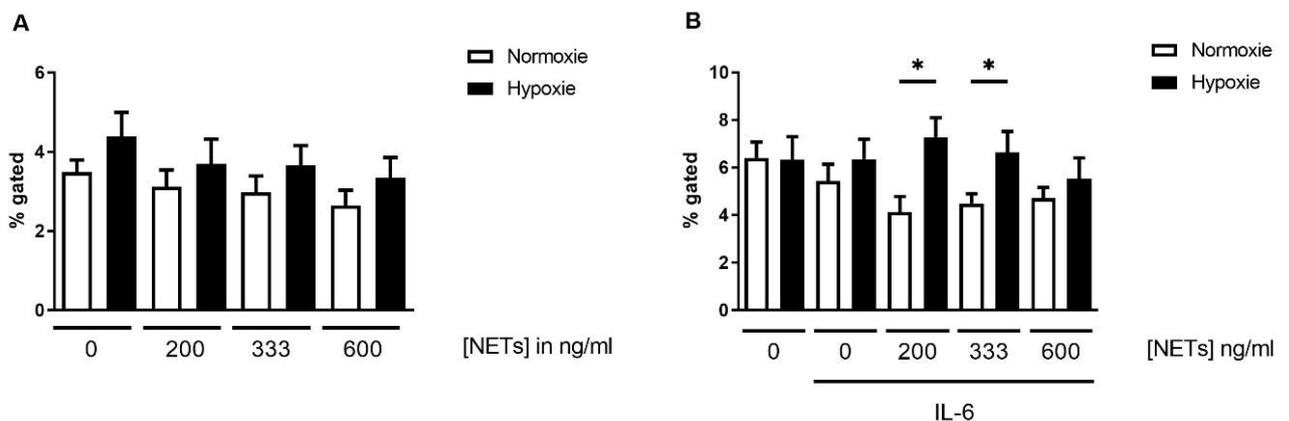


Abb. 12: Einfluss von NETs und IL-6 auf die Apoptoserate von HL-1 Kardiomyozyten unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen.

HL-1 Kardiomyozyten wurden mit verschiedenen NETs-Konzentrationen (0 ng/ml, 200 ng/ml, 333 ng/ml, 600 ng/ml) für 20 h bei normoxischen Bedingungen (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) bzw. hypoxischen Bedingungen (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) kultiviert (A). In parallelen Versuchsansätzen wurden HL-1 Kardiomyozyten zusätzlich mit 10 ng/ml IL-6 behandelt (B). Mittels Propidiumiodid wurde die DNA angefärbt. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde mittels FACS quantifiziert, indem die Zellen im Sub-G1-Bereich bestimmt wurden. n= 6-8; \*p<0,05

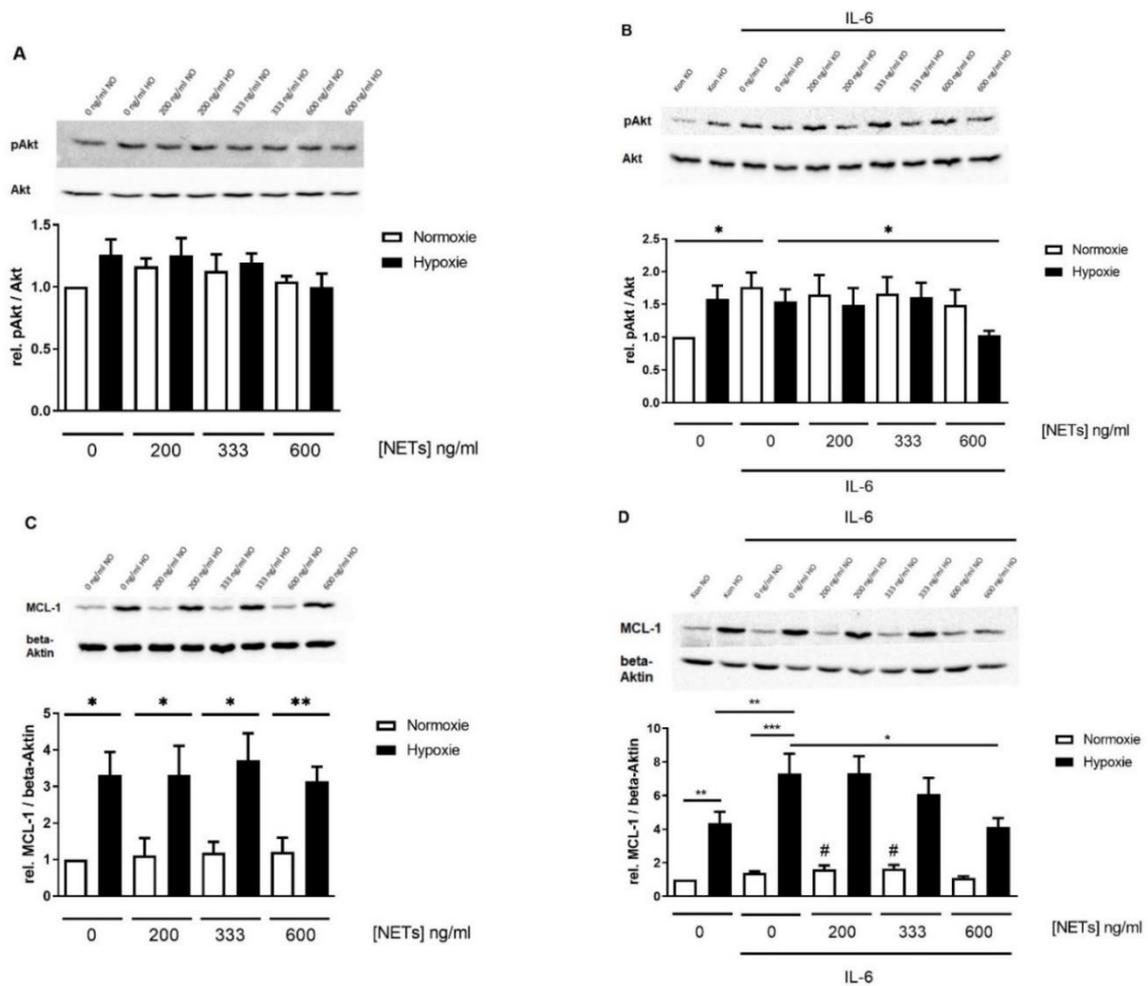
Abb. 12 beschreibt den prozentualen Anteil von apoptotischen HL-1 Kardiomyozyten. Ohne die Zugabe von IL-6 führten hypoxische Bedingungen tendenziell zu einer höherer

Apoptoserate als normoxische Bedingungen. Dieser Zusammenhang stellte sich bei sämtlichen NETs-Konzentrationen dar. Mit steigender NETs-Konzentration nahm sowohl unter hypoxischen als auch unter normoxischen Bedingungen die Apoptoserate tendenziell ab. Die niedrigste Apoptoserate zeigte sich unter normoxischen Bedingungen bei einer NETs-Konzentration von 600 ng/ml.

Auch nach Zugabe von IL-6 führte Hypoxie tendenziell zu einer Zunahme der Apoptoserate im Vergleich zur Normoxie. Die alleinige Zugabe von IL-6 führte unter Hypoxie zu keiner signifikanten Veränderung der Apoptoserate, während IL-6 unter Normoxie zu einer leichten Abnahme der Apoptoserate führte. Eine stetige Abnahme der Apoptoserate mit steigender NETs-Konzentration konnte im Gegensatz zum ersten Versuchsteil nicht nachgewiesen werden. Die Zugabe von NETs führte unter Hypoxie zu einer tendenziellen Steigerung der Apoptoserate, während NETs in Normoxie tendenziell zu einer Senkung führten. Dabei ließ sich eine Signifikanz im Vergleich zur jeweiligen Gegenprobe bei 200 ng/ml sowie 333 ng/ml nachweisen. Bei 600 ng/ml NETs kam es zu keinem signifikanten Unterschied in der Apoptoserate von Normoxie zu Hypoxie.

#### 4.4. Expression von Phospho-Akt, MCL-1 und Connexin 43 in HL-1 Kardiomyozyten unter hypoxischen sowie normoxischen Bedingungen

Zur genaueren Untersuchung des zellschädigenden bzw. zellprotektiven Potentials von NETs sowie IL-6 wurde die Expression verschiedener Proteine mittels Western Blot untersucht. HL-1 Kardiomyozyten wurden, wie zuvor beschrieben, mit NETs in verschiedenen Konzentrationen für 20 h inkubiert. Zusätzlich wurde in einem zweiten Versuchsteil IL-6 für die Dauer der Inkubation hinzugefügt (s. 3.2.9). Die Applikation des Zytokins diente der Simulation von inflammatorischen Bedingungen eines Myokardinfarktes. Die Quantifizierung erfolgte mit den gleichen Vergleichsproteinen wie im ersten Versuchsteil.



**Abb. 13: Einfluss von NETs auf die Expression von pAkt und MCL-1 in HL-1 Kardiomyozyten**

HL-1 Kardiomyozyten wurden für 20 h unter normoxischen (NO: 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) sowie hypoxischen (HO: 2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) Bedingungen kultiviert. Des Weiteren wurden NETs in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert (0 ng/ml; 200 ng/ml; 333 ng/ml; 600 ng/ml) sowie IL-6 (10 ng/ml, Kon ohne IL-6). Die Proteinexpression von pAkt (A & B) wurde gegen die Expression von Akt quantifiziert. Die Proteinexpression von MCL-1 (C & D) wurde gegen beta-Aktin quantifiziert. Ein Beispiel für einen Blot wird jeweils bildlich dargestellt. n=5-7; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; #p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle ohne IL-6 und ohne NETs in Normoxie

Die Expression von Phospho-Akt (pAkt) wurde im Verhältnis zur Gesamtmenge an Akt (auch bekannt als Protein Kinase B) untersucht (s. Abb. 13). Als Teil der PI3K-Akt Signalkaskade hat pAkt eine anti-apoptotische Wirkung durch Interaktion mit diversen apoptotischen Proteinen. Die Expression dieses anti-apoptotischen Proteins liefert Hinweise auf das zellschädigende Potential von NETs. Ohne die Zugabe von NETs kommt es zu einer deutlichen Zunahme der pAkt Expression unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Mit steigender NETs-Konzentration und unter hypoxischen Bedingungen kam es zu einer sichtbaren, aber nicht signifikanten Abnahme der pAkt Expression. Die Zugabe von NETs führte unter Normoxie bei 200 ng/ml zu einer leichtgradigen Zunahme der pAkt-Expression. Nach dieser initialen Erhöhung deutete sich eine Abnahme der Proteinkonzentration unter steigenden NETs-Konzentrationen an. Eine statistische Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden. (s. Abb. 13 A)

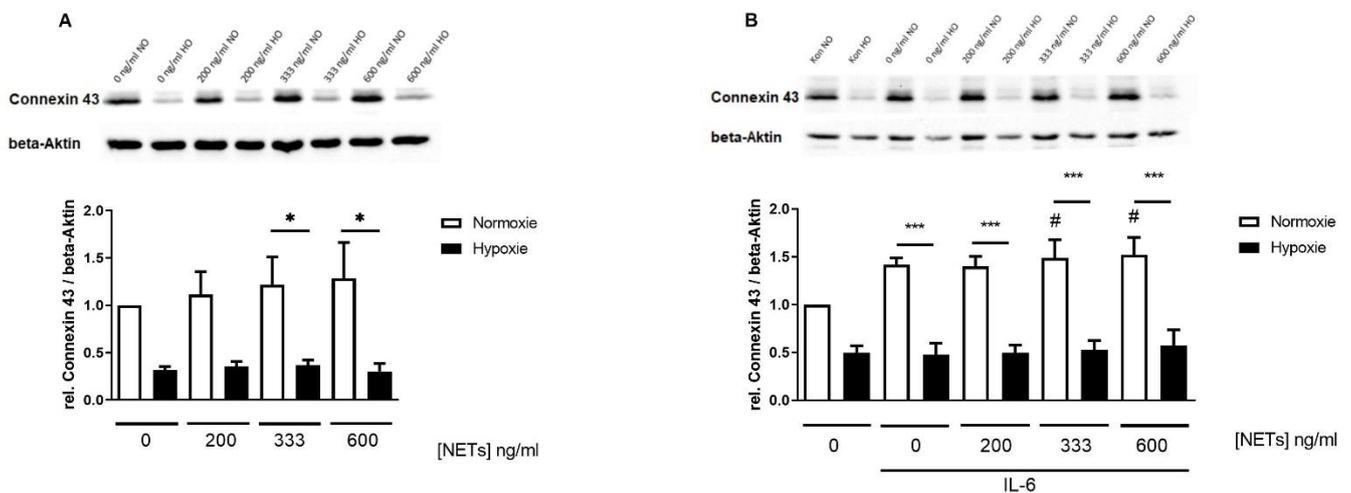
Während im ersten Versuchsteil die pAkt Proteinexpression unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen tendenziell erhöht war, folgte auf die IL-6 Applikation eine tendenziell niedrigere Proteinexpression unter hypoxischen als unter normoxischen Bedingungen (s. Abb. 13 B). Nach Zugabe von 600 ng/ml NETs und IL-6 kam es bei Hypoxie im Vergleich zum ersten Versuchsteil sogar zu einer signifikanten Verringerung der Proteinexpression. Die normoxischen Proben zeigten auch bei steigender Konzentration von NETs unter IL-6 Applikation keine nennenswerte Regulation von pAkt.

Das MCL-1 Protein gehört zur BCL-2 Familie und wirkt anti-apoptotisch. Dabei wird MCL-1 positiv von pAkt reguliert. Die Proteinexpression im Zusammenhang mit verschiedenen NETs-Konzentrationen liefert Hinweise auf das zellschädigende Potential von NETs. Verglichen wurden die Werte mit dem Zytoskelett Protein  $\beta$ -Aktin (s. Abb. 13 C & D). Unter hypoxischen Bedingungen kam es bei sämtlichen NETs-Konzentrationen zu einer Hochregulierung von MCL-1. NETs hatten weder unter hypoxischen noch unter normoxischen Bedingungen Einfluss auf die MCL-1 Regulation.

Nach Inkubation mit IL-6 war die MCL-1 Proteinexpression nach hypoxischer Inkubation wie im ersten Versuchsteil im Vergleich zur Normoxie erhöht (s. Abb. 13 D). Schon ohne Zugabe von NETs oder IL-6 war die Hochregulierung unter Hypoxie signifikant. Nach alleiniger IL-6 Zugabe konnte eine signifikante Zunahme der Expression in der hypoxischen Probe im Vergleich zur normoxischen Probe detektiert werden. Die Hochregulierung bei Hypoxie war dabei nach IL-6 Zugabe signifikant größer als die Hochregulation ohne IL-6. Unter normoxischen Bedingungen führte die Zugabe von IL-6 zu einer minimalen Erhöhung der Proteinexpression. Bei einer NETs-Konzentration von 200 ng/ml und 333 ng/ml war die MCL-1 Expression signifikant erhöht im Vergleich zur normoxischen Kontrollprobe. Eine höhere NETs-Konzentration führte zu einer stetigen Abnahme innerhalb der hypoxischen Proben. Die

Herabregulierung bei 600 ng/ml war im Verhältnis zur Proteinexpression ohne NETs aber mit IL-6 signifikant.

Um zu prüfen, ob NETs Einfluss auf die Funktionsfähigkeit von HL-1 Kardiomyozyten haben, wurde die Expression von Connexin 43 untersucht (s. Abb. 14). Unter hypoxischen Bedingungen kam es zu einer deutlichen Verringerung der Connexin 43 Expression im Vergleich zu normoxischen Bedingungen. Dabei kam es zu mehr als einer Halbierung der Connexin 43 Expression. Die Zugabe von NETs führte bei Hypoxie zu keiner Regulation. Unter den normoxischen Proben führte die Inkubation mit NETs zu einer tendenziellen Zunahme der Connexin 43 Expression. Die Zunahme zeigte sich von der Kontrollprobe bis zur Maximalkonzentration von 600 ng/ml durchgehend. Die Regulation war bei 333 ng/ml sowie 600 ng/ml NETs im Vergleich zur jeweiligen hypoxischen Gegenprobe statistisch signifikant. Wie im ersten Versuchsteil (Abb. 14 A) führte Hypoxie auch unter IL-6 Applikation (Abb. 14 B) zu einer Senkung der Connexin 43 Expression unabhängig von der NETs-Konzentration. Unter Normoxie führte die alleinige Gabe von IL-6 zu einer Erhöhung der Proteinexpression. Die Erhöhung der normoxischen Proben war dabei bei sämtlichen NETs-Konzentrationen signifikant zur hypoxischen Gegenprobe. Während es ohne IL-6 bei Normoxie zu einem tendenziellen Anstieg von Connexin 43 mit zunehmender NETs-Konzentration kam, war dieser Anstieg mit IL-6 bei 333 ng/ml sowie 600 ng/ml NETs signifikant.

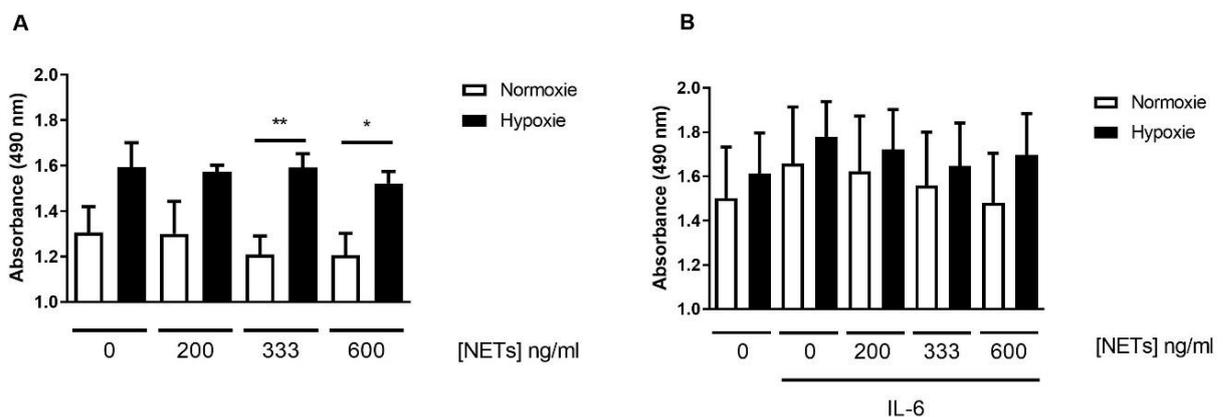


**Abb. 14: Einfluss von NETs auf die Expression von Connexin 43 in HL-1 Kardiomyozyten**

HL-1 Kardiomyozyten wurden für 20 h unter normoxischen (NO: 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) sowie hypoxischen (HO: 2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden mit steigenden NETs-Konzentrationen behandelt (0 ng/ml; 200 ng/ml; 333 ng/ml; 600 ng/ml) (A). Parallel wurden Zellen mit ansteigenden NETs-Konzentrationen und zusätzlich IL-6 (10 ng/ml) behandelt (B). Die Proteinexpression von Connexin 43 wurde gegen die Expression von beta-Aktin quantifiziert. Ein Beispiel für einen Blot wird jeweils bildlich dargestellt. n=5-7; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001; #p<0,05 im Vergleich zur normoxischen Kontrollprobe ohne NETs und ohne IL-6

#### 4.5. Proliferationsrate von HL-1 Kardiomyozyten nach NETs Zugabe

Um festzustellen, ob NETs in der Lage sind die Proliferation von HL-1 Kardiomyozyten zu beeinflussen, wurden Zellen mit verschiedenen NETs-Konzentrationen bzw. IL-6 unter hypoxischen oder normoxischen Bedingungen kultiviert. IL-6 trug zur Simulation der inflammatorischen Umgebung bei. Dem Medium wurde anschließend die Lösung des CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assays zugeführt. Mittels photometrischer Bestimmung konnte dadurch auf die Proliferationsrate der Zellen zurückgeschlossen werden. (s. Abb. 15)



**Abb. 15: Proliferationsrate von HL-1 Kardiomyozyten nach NETs Zugabe bzw. IL-6 Zugabe.**

HL-1 Kardiomyozyten wurden für 20 h mit aufsteigenden NETs-Konzentrationen (0 ng/ml, 200 ng/ml, 333 ng/ml, 600 ng/ml) (A) und zusätzlich 10 ng/ml IL-6 (B) kultiviert. Die Proben wurden unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) oder hypoxischen Bedingungen (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) kultiviert. Anschließend wurde das CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay zur Bestimmung der Proliferationsrate eingesetzt. Die Proliferationsrate wurde anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm ermittelt. n= 4-5; \*p<0,05; \*\*p<0,01

In sämtlichen Proben wurde eine Erhöhung der Proliferationsrate unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen. Die Zunahme war bei NETs-Konzentrationen von 333 ng/ml sowie 600 ng/ml im Vergleich zur normoxischen Probe gleicher NETs-Konzentration signifikant erhöht. Unter normoxischen Bedingungen deutete sich mit zunehmender NETs-Konzentration eine minimale Abnahme der Proliferationsrate an.

Auch unter Zugabe von IL-6 nahm die Proliferationsrate unter hypoxischen Bedingungen zu. Dieser Zusammenhang zeigte sich unabhängig von der NETs Zugabe. Die alleinige Applikation von IL-6 führte zu einer Erhöhung der Proliferation, sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen. Wie im ersten Versuchsteil deutete sich unter hypoxischen Bedingungen mit zunehmender NETs-Konzentration eine leichtgradige nicht signifikante Abnahme der Proliferationsrate an. Dabei lag eine breite Standardabweichung der Ergebnisse vor.

## 5. Diskussion

PMN gehören zu den ersten einwandernden Zellen im kardialen Gewebe nach MI. Eine 2004 entdeckte Fähigkeit der PMN ist die Bildung sogenannter NETs. Um deren zellschädigendes Potential auf das kardiale Gewebe zu untersuchen, wurden HL-1 Kardiomyozyten mit NETs in aufsteigender Konzentration inkubiert. Zur Simulation der Bedingungen eines MIs wurden die Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, wobei der Hypoxienachweis durch die Messung des HIF-1  $\alpha$  Proteins mittels Western Blot erbracht wurde. Die inflammatorische Umgebung wurde näherungsweise durch die Applikation von IL-6 simuliert.

### 5.1. Regulation der *IL-6* Genexpression durch NETs

Das Zytokin IL-6 ist ein wichtiger Mediator innerhalb des kardialen Remodelings. Wie IL-6 kardioprotektiv oder pathogen während des kardialen Remodelings wirkt, wird gegenwärtig erforscht. Dabei wurden Zytokine als Auslöser der NETose bereits beschrieben.<sup>68,128,129</sup> Inwiefern NETs jedoch selbst zur Sekretion von Zytokinen beitragen können, ist bisher unklar. Deshalb wurde im Zuge dieser Arbeit die NETs-induzierte *IL-6* Genexpression in HL-1 Kardiomyozyten untersucht.

Dabei wurde erstmals beobachtet, dass NETs die *IL-6* Genexpression in HL-1 Zellen hochregulieren können.

Dieses Ergebnis reiht sich in den aktuellen Forschungsstand ein, wonach NETs nicht nur eine anti-mikrobielle Wirkung, sondern auch eine inflammatorische Wirkung auf die Umgebung haben.<sup>130</sup> In Co-Kulturen aus Makrophagen und NETs konnte bereits eine Erhöhung der Sekretion verschiedener Zytokine (u.a. IL-6) nachgewiesen werden.<sup>131</sup> Nach Inkubation mit NETs war die *IL-1* Genexpression in bronchialen Epithelzellen signifikant erhöht.<sup>132</sup> In einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe wurde die Genexpression von *IL-6* in Kardiomyozyten nach MI *in vivo* gemessen. Dabei wurden PAD4-defiziente Mäuse verwendet, welche nicht in der Lage sind, NETs zu bilden. Es zeigte sich eine gesenkte *IL-6* Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe, sodass eine inflammatorische Wirkung von NETs über IL-6 auch *in vivo* bestehen könnte.<sup>133</sup>

Aber auch anti-inflammatorische Wirkungen werden NETs zugeschrieben. Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe ergaben eine Herabregulation der *IL-6* und *TNF- $\alpha$*  Genexpression und Sekretion in Makrophagen, welche unter hypoxischen Bedingungen und mit NETs inkubiert wurden, während das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 auf Genebene aktiviert und sezerniert wurde. Zudem führten NETs zu einer Polarisierung der Makrophagen zu anti-inflammatorischen M2b Makrophagen.<sup>133</sup> Weitere Studien beschreiben, wie Monozyten unter NETs-Einwirkung zu anti-inflammatorischen M2 Makrophagen differenzieren.<sup>134</sup>

Somit begünstigen NETs sowohl inflammatorische als auch anti-inflammatorische Prozesse. Dies scheint von der Zielzelle abzuhängen. Während NETs über HL-1 Kardiomyozyten

inflammatorisches Potential haben, können sie über Makrophagen anti-inflammatorisch wirken. Bei der Einordnung des inflammatorischen Potentials nach MI muss dabei beachtet werden, dass Kardiomyozyten nur circa 30% der Zellen im Herzen ausmachen und daher die Wirkung auf andere Zellen berücksichtigt werden muss.<sup>135</sup> Zusätzlich wird IL-6 durch viele weitere Faktoren reguliert. Dies wäre ein Erklärungsansatz, warum die *IL-6* Genexpression in Kardiomyozyten durch NETs *in vitro* und *in vivo* erhöht wird, Eghbalzadeh et al. jedoch trotzdem eine Erhöhung der IL-6 Konzentration im Plasma bei NETs-inkompetenten Mäusen feststellten. Folglich haben NETs zwar das Potential, über Kardiomyozyten inflammatorisch zu wirken, *in vivo* erfolgt die IL-6 Sekretion jedoch auch unabhängig von NETs. Ihr Anteil an der Gesamtsekretion von IL-6 bedarf weiterer Abklärung.

Dafür wäre der Nachweis einer NETs-induzierten IL-6 Sekretion aus Kardiomyozyten notwendig. Eine entsprechende Sekretion konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, da im Medium der HL-1 Zellen kaum detektierbare IL-6 Konzentrationen gemessen wurden. Allenfalls nach Applikation der maximalen NETs-Konzentration deutete sich ein Anstieg der IL-6 Konzentration an (Daten nicht dargestellt). Dieses Ergebnis konnte bei anschließenden Versuchen jedoch nicht repliziert werden. Eine Wiederholung der IL-6 Bestimmung mittels eines sensitiveren ELISA Assays könnte den Nachweis der NETs-induzierten Zytokinsekretion erbringen.

Zudem widerspricht der Literatur, dass es zu keiner Zunahme der *IL-6* Genexpression durch Hypoxie kam.<sup>13,14,31</sup> Ursächlich dafür könnten die hypoxieresistenten Eigenschaften von HL-1 Kardiomyozyten sein.<sup>136</sup> Als weitere Einschränkung muss darauf hingewiesen werden, dass keine lineare Zunahme der *IL-6* Genexpression mit steigender NETs-Konzentration gemessen wurde. Dies könnte mit zu geringen Konzentrationsabstufungen erklärt werden. Anschließende Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurden deshalb mit NETs-Konzentrationen von 1000 ng/ml durchgeführt.<sup>133</sup>

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit das pro-inflammatorische Potential von NETs auf die Genexpression von Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Der Gesamtbeitrag muss wegen der Wirkung auf weitere Zellen noch genauer untersucht werden. Der Anteil am kardialen Remodeling muss weiter erforscht werden, um die Rolle von NETs als potenzieller Angriffspunkt einer anti-inflammatorischen Therapie zu eruieren. Dabei müssen die einzelnen Phasen des kardialen Remodelings beachtet werden. Während NETs in der inflammatorischen Phase IL-6 Sekretionen fördern könnten, wäre ein anti-inflammatorischer Effekt in der proliferativen Phase über Makrophagen denkbar.

## **5.2. Apoptotische Wirkung von NETs und IL-6**

Mit Einsetzen der Ischämie bei MI kommt es zum massiven Zelluntergang. Die Zahl der apoptotischen Zellen ist dabei wesentlich größer als die Zahl der nekrotischen Zellen.<sup>4</sup> Das zytotoxische Potential von cf-DNA bzw. von Histonen, welche das Gerüst von NETs bilden, ist

bereits beschrieben worden.<sup>65,137</sup> Zudem wurden bei MI erhöhte Konzentrationen von cf-DNA beschrieben.<sup>113,116</sup> Inwiefern die destruktiven Effekte nach MI der cf-DNA nekrotischer Zellen oder NETs zugeschrieben werden können, wird gegenwärtig diskutiert. Dabei ist bisher unzureichend erforscht, ob NETs überhaupt das Potential haben, Apoptosen auszulösen. Deshalb wurde hier die Wirkung von IL-6 und NETs auf die Proteine pAkt sowie MCL-1 mittels Western Blot ermittelt und mit der Apoptoserate verglichen.

Akt als Teil des PI3K/Akt Signalweges wirkt in seiner phosphorylierten Form pAkt auf diverse Proteine, u.a. durch Inhibition der pro-apoptotischen Bcl-Proteine wie Bax. Eine Hochregulierung der pAkt Proteinexpression kann u.a. anti-apoptotische Prozesse induzieren und kann Kardiomyozyten vor Hypoxie-induzierter Apoptose schützen.<sup>138</sup> Die Aktivierung von Akt bildet somit einen *survival pathway* in Kardiomyozyten. Ein solcher Effekt wurde für Kardiomyozyten in Hypoxie mehrfach beschrieben.<sup>138,139</sup> MCL-1 gehört zur Familie der anti-apoptotischen Bcl-Proteine, welche über den PI3K/Akt Signalweg reguliert werden können, und wirkt sowohl auf den extrinsischen als auch den intrinsischen Apoptoseweg.<sup>140</sup> Die Inhibition von MCL-1 führt in Kardiomyozyten zu einem massiven Zelluntergang.<sup>141</sup>

Vergleichbare Studien über die Regulation von pAkt oder MCL-1 durch NETs sind bisher nicht bekannt. Hier konnte das erste Mal beschrieben werden, dass NETs die pAkt und MCL-1 Proteinexpression in Kardiomyozyten herabregulieren können. Dieser Effekt ließ sich beobachten bei zusätzlicher Inkubation mit IL-6 und unter hypoxischen Bedingungen. Damit ging bei 200 ng/ml und 333 ng/ml eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate unter Hypoxie und IL-6 im Vergleich zur normoxischen Gegenprobe einher, welche sich jedoch nicht bei maximaler NETs-Konzentration darstellte. Eine NETs-Konzentration abhängige Steigerung der Apoptoserate zeigte sich somit trotz der Wirkung auf pAkt und MCL-1 nicht. Ein solcher Effekt muss durch weitere Studien genauer untersucht werden, da ein NETs-induzierter Zelluntergang bereits mehrfach beschrieben wurde. Zudem wäre eine NETs-bedingte Apoptosesteigerung bei höherer Dosierung sowie im späteren Zeitverlauf denkbar. Trotzdem wird ein möglicher Wirkmechanismus der NETs ersichtlich. Über die Herabregulation von pAkt, könnten NETs die Proteinexpression des anti-apoptotischen Proteins MCL-1 senken und somit die Apoptose von Kardiomyozyten ermöglichen.

So wurde bereits in Co-Kulturen aus PMN und Kardiomyozyten nach Auslösung der NETose eine Zunahme der Nekrose gemessen. Pashevin et al. beobachteten diese Zunahme der Nekrose in Normoxie. Nach kurzzeitiger Hypoxie (30 min) mit anschließender Reperfusion (3 h) wurde eine zusätzliche Nekroseszunahme beobachtet.<sup>125</sup> Diese Studie beschreibt also eine Zunahme des Zelltodes durch NETs in Normoxie und in Hypoxie, jedoch wurden nur nekrotische Kardiomyozyten detektiert. Die Nekrose stellt jedoch einen eigenen Weg des Zellunterganges dar und unterscheidet sich grundlegend von der Apoptose. Somit sind die Ergebnisse von Pashevin et al. nur eingeschränkt mit dem hier beschriebenen apoptotischen

Potential von NETs vergleichbar. Jedoch weisen beide Arbeiten auf die zellschädigende Wirkung von NETs auf Kardiomyozyten hin. Eine separate Untersuchung des nekrotischen Potentials würde klären, unter welchen Bedingungen NETs Apoptosen oder Nekrosen in Kardiomyozyten auslösen. Pashevin et al. deuteten bereits daraufhin, dass die Wirkung von NETs von der Zielzelle abhängt. Zusätzlich wurde bereits ein nekrotischer Effekt von NETs auf andere Zellen, wie Hepatozyten<sup>142</sup> sowie auf renale Tubulusepithelzellen<sup>143</sup> beschrieben. Dem muss entgegengebracht werden, dass Nekrosen im gesamten Zellsterben nach MI eine quantitativ untergeordnete Rolle spielen. Ein solcher nekrotischer Effekt hätte nach MI nur einen geringen Einfluss, da die Zahl apoptotischer Kardiomyozyten deutlich überwiegt.<sup>4</sup>

Wie von Pashevin et al. vermutet, hing auch hier der NETs Effekt von den Umgebungsbedingungen ab. Ohne die Zugabe von IL-6 kam es bei pAkt allenfalls zu einer minimalen Expressionssenkung, wobei die MCL-1 Expression ohne IL-6 sogar keine Regulation durch NETs zeigte. Die ausbleibende Regulation ohne IL-6, zusammen mit den Versuchsergebnissen bei IL-6-Zugabe, weisen darauf hin, dass NETs über eine pAkt- und MCL-1-Achse apoptotisch auf Kardiomyozyten wirken können, solange gewisse Umgebungsbedingungen für Kardiomyozyten vorliegen. Die Untersuchung unter Hypoxie und IL-6 simuliert näherungsweise die Wirkung von NETs unter ischämisch-hypoxischen Bedingungen eines Myokardinfarktes.

Zusätzlich zur inflammatorischen Wirkung von IL-6 hängt die NETs-Wirkung von der Sauerstoffversorgung der Zelle ab. Unter Normoxie kam es zu keiner signifikanten Senkung der Apoptoserate. Jedoch wurde in Normoxie eine geringe, aber signifikante MCL-1 Erhöhung durch NETs detektiert. Inwiefern eine solche geringe MCL-1 Heraufregulierung einen Effekt auf die Apoptoserate hat ist fraglich. Eine Hochregulation von MCL-1 unter normoxischen Bedingungen wäre jedoch insbesondere in Infarkttrandgebieten von Interesse. Eine entsprechende Wirkung auf pAkt wurde nicht gemessen.

*In vitro* Studien, welche unter Normoxie abliefen, zeigten bereits apoptotische Effekte von NETs. So wurden bei umbilikalischen Endothelzellen NETs-induzierte Apoptosen *in vitro* und in Normoxie gemessen. Verursacht wurde der Zellschaden durch Matrix-Metalloproteine (MMP), welche im NETs-Gerüst eingelagert sind.<sup>108</sup> Auch bei glomerulären Endothelzellen wirkten NETs zytotoxisch mithilfe der integrierten Histone.<sup>106,137</sup> Dass NETs-Bestandteile wie Histone<sup>106</sup> und MPO<sup>144</sup> apoptotisch auf Zellen wirken, wurde bereits beschrieben. Mit Blick auf diese Studien wurde auch in Normoxie eine Erhöhung der Apoptoserate sowie eine Herabsenkung von pAkt und MCL-1 erwartet. Dabei könnten HL-1 Kardiomyozyten mit ihren hypoxieresistenten Eigenschaften eine Sonderstellung haben.

Das hier *in vitro* gemessene apoptotische Potential von NETs ist nur bedingt mit *in vivo* Studien vereinbar. So gibt es auch *in vivo* Studien, die einen protektiven Effekt von NETs ins Spiel bringen. Nach permanenter LAD Ligatur in PAD4-defizienten Mäusen wurden höhere

Konzentrationen von cf-DNA gemessen. Dabei kam es im Vergleich zu WT-Mäusen zu einer massiven Zunahme der cTnT-Konzentration im Plasma. Auch das Infarktgebiet war tendenziell größer.<sup>133</sup> Daraus lässt sich vermuten, dass ohne den protektiven Einfluss von NETs ein größerer Zellschaden im Herzen post-MI entsteht. Das hier gemessene apoptotische Potential von NETs über pAkt und MCL-1 müsste *in vivo* zunächst bestätigt werden und würde dann nur eine untergeordnete Rolle spielen. Inwiefern dieser protektive Effekt auf eine Senkung der Apoptoserate zurückzuführen ist, muss zudem genauer erforscht werden. Eine Erklärung für protektive NETs-Eigenschaften, wäre eine indirekte Wirkung über andere Zellarten oder *IL-6* Genexpressionserhöhungen. *IL-6* führte hier zu einer Proteinexpressionserhöhung von pAkt und MCL-1 und wirkt somit dem direkten NETs-Effekt auf Kardiomyozyten entgegen. Dem widerspricht jedoch das Ergebnis, wonach NETs erst mit *IL-6* die pAkt und MCL-1 Expression senken. Ein protektiver NETs Effekt würde, wie von Autoren wie Vogel et al. postuliert, dafürsprechen, dass der Zellschaden nach MI eher auf die zytotoxische cf-DNA und nicht auf die NETs-Wirkung zurückgeführt werden könnte.<sup>121</sup>

Andere *in vivo* Studien beschreiben ebenfalls ein apoptotisches Potential, wobei sie NETs einen zellschädigenden Effekt beim MI zuschreiben. So beschrieben Savchenko et al. in einem Ischämie/Reperusionsmodell nach Applikation von DNase und somit Reduzierung der NETs-Konzentration eine Verringerung des Infarktgebietes. Ebenso stellten sie im Gegensatz zu Eghbalzadeh et al. kleinere Infarktgebiete in PAD-4 defizienten Mäusen fest.<sup>119</sup> Allerdings relativierten Ge et al. den zellschädigenden Effekt von NETs im Ischämie/Reperusionsmodell. Die Autoren kritisieren dabei die Methodik zur Messung des Infarktgebietes bei Savchenko et al.<sup>120</sup> Jedoch wurde bei STEMI Patienten nach PTCA eine signifikante Korrelation zwischen NETs-Konzentration in Infarktnähe und Infarktgröße gemessen.<sup>104,145</sup> In diesen *in vivo* Studien scheinen NETs im Gegensatz zu Eghbalzadeh et al. einen zellschädigenden Effekt nach MI zu haben und dieser Effekt würde, anders als von Vogel et al. postuliert, NETs und nicht der cf-DNA nekrotischer Zellen zugeschrieben werden. Bevor die hier *in vitro* gemessene pAkt und MCL-1 Senkung als Mechanismus in Betracht gezogen wird, müsste zunächst eine solche Proteinregulation *in vivo* gemessen werden.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit das apoptotische Potential von NETs über die Herabregulierung von pAkt und MCL-1 *in vitro*. Dieser Effekt wirkt sich jedoch nur unter inflammatorischen-hypoxischen Bedingungen aus. Eine Wirkung auf pAkt und MCL-1 muss noch *in vivo* bestätigt werden, um den Einfluss von NETs während eines MIs besser zu verstehen. Die hier fehlende Apoptosesteigerung macht weitere Messungen mit unterschiedlicher Methodik erforderlich, insbesondere da die hier gewählte PI-Färbung nur einen Teil des Apoptoseprozesses erfasst. Beispielsweise bieten sich zur Messung früher Apoptosestadien die Färbung mit Annexin-V oder ein BH3-Profilung an. Auch das nekrotische Potential von NETs muss genauer untersucht werden.

### 5.3. Regulation der Connexin 43 Expression durch NETs und IL-6

Des Weiteren wurde die Regulation der Connexin 43 Proteinexpression als Zellfunktionsmarker untersucht. Dieses Protein ist der Grundbaustein der sogenannten *gap junctions*, welche Erregungsweiterleitung ermöglichen, und ist somit unabdingbar für eine rhythmische Kontraktion des Herzmuskels. Nach MI kommt es zu einem elektrischen Remodeling, welches u.a. durch die Senkung der Connexin 43 Expression charakterisiert wird. Diese Verschlechterung der Zell-Zell Kommunikation steht im Verdacht, post-MI zu Arrhythmien und somit zum plötzlichen Herztod zu führen.<sup>146</sup>

Während die Inkubation in Hypoxie eine starke Senkung der Connexin 43 Expression bewirkte, führte die zusätzliche Inkubation mit NETs zu keiner signifikanten Wirkung. Unter Normoxie deutete sich eine tendenzielle Zunahme der Connexin 43 Expression an, welche nach Zugabe von IL-6 und unter einer NETs-Konzentration von 333 ng/ml bzw. 600 ng/ml signifikant zur normoxischen Kontrollprobe war.

Eine Connexin 43 Erhöhung wurde auch in Kardiomyozyten nach ischämischer Präkonditionierung beobachtet. Diese kurzzeitigen ischämischen Intervalle wirkten protektiv und verringerten das Infarktgebiet nach LAD Ligation.<sup>2,147</sup> Folglich könnte die Connexin 43 Erhöhung durch NETs einen protektiven Mechanismus in Normoxie und somit im Infarkttrandgebiet darstellen. Zudem führte die Inkubation der Kardiomyozyten mit IL-6 zu einer Connexin 43 Proteinexpressionserhöhung, auch ohne die Zugabe von NETs. Da NETs das Potential haben, die *IL-6* Genexpression in HL-1 Kardiomyozyten zu erhöhen, könnten NETs auch indirekt protektiv auf Kardiomyozyten wirken. Eine Connexin 43 Beeinflussung durch IL-6 wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Bei H9c2 Kardiomyozyten, welche bis zu 3 Tage mit 10 ng/ml IL-6 inkubiert wurden, zeigte sich ebenfalls eine Connexin 43 Erhöhung. Einer solchen Erhöhung wurden protektive Eigenschaften zugeschrieben.<sup>148</sup> Severino et al. waren hingegen nicht in der Lage, eine Erhöhung der Connexin 43 Expression in HL-1 Kardiomyozyten zu messen, obwohl verschiedene Konzentrationen von IL-6 genutzt wurden (1, 10, 100 ng/ml). Die Inkubation erfolgte über 24 Stunden oder 48 Stunden und somit ähnlich zu dieser Arbeit (20 Stunden). Unabhängig davon mit welchem Zytokin behandelt wurde (TNF- $\alpha$ , IL-12, CRP, Epi, Ang II), konnten die Autoren keine Connexin 43 Expressionserhöhung messen.<sup>149</sup> Obwohl der Versuchsaufbau von Severino et al. dieser Arbeit mit Hinblick auf die IL-6 Konzentration sowie die Inkubationsdauer gleicht, wurde hier eine Expressionserhöhung durch IL-6 festgestellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen somit daraufhin, dass NETs direkt und indirekt über IL-6 auf die Erhöhung von Connexin 43 wirken können.

Für die Untersuchung der Connexin 43 Expression muss einschränkend erwähnt werden, dass es sich bei HL-1 Kardiomyozyten um Zellen atrialen Ursprungs handelt. Während die Regulation der Connexin 43 Expression im Ventrikelmyokard häufig untersucht wurde, sind Untersuchungen zum atrialen Myokard seltener.<sup>149</sup> Somit ist bisher unzureichend erforscht,

inwiefern Erkenntnisse zur Zell-Zell Kommunikation von HL-1 Zellen auf Ventrikelmuskel übertragbar sind.

#### **5.4. Kardiomyozytenproliferation durch NETs und IL-6**

Nach MI kommt es zum großflächigen Zelluntergang u.a. von Kardiomyozyten. Das fehlende Gewebe wird durch einwandernde Fibroblasten aufgefüllt.<sup>20</sup> Im Zuge des kardialen Remodelings kann es außerdem zur Hypertrophie der Kardiomyozyten und somit zur Zunahme der Zellgröße kommen. Eine Zunahme der Zellzahl (Hyperplasie) wurde von der Forschung lange ausgeschlossen, da Kardiomyozyten als postmitotisch und somit als teilungsunfähig galten. Umso wichtiger war die Erkenntnis, dass auch adulte Kardiomyozyten eine limitierte Kapazität zur Zellteilung behalten.<sup>150</sup> Die Aktivierung des regenerativen Potentials von Kardiomyozyten würde eine neue Therapieoption nach MI eröffnen. In dieser Arbeit wurde deshalb das regenerative Potential von NETs und IL-6 untersucht.

Dabei führte die Zugabe von NETs führte zu keiner signifikanten Regulation der Proliferationsrate. In Normoxie zeigte sich eine tendenzielle Proliferationsenkung mit steigender NETs-Konzentration und IL-6. Bei hypoxisch inkubierten Kardiomyozyten stellte sich eine solche Tendenz nicht dar. Dies könnte damit erklärt werden, dass eine Proliferationsenkung durch NETs im Vergleich zum proliferativen Effekt von Hypoxie eine untergeordnete Rolle spielt. Das Protein pAkt kann proliferativ auf Kardiomyozyten wirken.<sup>151</sup> Eine Proliferationsenkung, welche mit der pAkt Herabregulierung einhergeht, konnte hier jedoch nicht festgestellt werden. Insofern ist fraglich, inwiefern NETs direkten Einfluss auf die Proliferationsrate haben und ob der Einfluss eine tragende Rolle nach MI spielen könnte. Jedoch wäre ein indirekt proliferativer Effekt denkbar, da die *IL-6* Genexpression in HL-1 Kardiomyozyten durch NETs erhöht wird und hier eine tendenzielle Steigerung der Proliferationsrate durch IL-6 gemessen wurde. Eine NETs-bedingte IL-6 Sekretion aus Kardiomyozyten oder anderen Zellarten würde einen Mechanismus zur Proliferationsinduktion ermöglichen. Dass NETs keine direkte proliferative Wirkung ausüben, sondern durch indirekte Mechanismen wirken, wurde bereits in anderen Zellarten nachgewiesen. So können NETs pankreatische Sternzellen aktivieren, welche wiederum zur Proliferation von Pankreastumorzellen beitragen.<sup>152</sup> Die antimikrobiellen Bestandteile von NETs sind ebenfalls in der Lage, Tumorzellen zu stimulieren. So wird ein proliferativer Effekt von Neutrophiler Elastase bei Lungentumoren beschrieben.<sup>153</sup>

#### **5.5. Gesamtlimitierungen und Ausgangsfragen**

Zu den Gesamtlimitierungen dieser Arbeit zählt, dass der Einfluss der NETs und IL-6 nur im Zusammenhang mit einer Zelllinie studiert wurde. Insbesondere HL-1 Kardiomyozyten unterscheiden sich in ihrem Metabolismus deutlich von primären Kardiomyozyten. Diese Zelllinie wurde aufgrund bestehender Erfahrungen der Arbeitsgruppe und aufgrund der

unkomplizierten Kultivierung verwendet. Des Weiteren stammen die hier verwendeten Kardiomyozyten von einer hohen Passage ab. Zusätzliche Untersuchungen mit iPS (induced pluripotent stem cells)-Kardiomyozyten, welche humanen oder murinen Stammzellen entstammen, könnten eine differenziertere Analyse der Apoptoseprozesse nach Hypoxie ermöglichen. Erkenntnisse zur Reaktion von HL-1 Kardiomyozyten lassen sich nur bedingt auf das menschliche Herz übertragen.

Zudem wurden die Bedingungen eines Myokardinfarktes durch Hypoxie sowie IL-6 nur annähernd simuliert, während tatsächlich diverse Zellen und Zytokine beteiligt sind. Somit müssen die Ergebnisse dieser Arbeit *in vivo* studiert werden.

Auf dieser Arbeit aufbauende Studien könnten die NETs Wirkung in einem Ischämie/Reperusionsmodels studieren, da die PMN Infiltration insbesondere während der Reperfusion stattfindet. Zudem könnte die Verwendung von höheren NETs-Konzentrationen, wie im Verlauf durch die Arbeitsgruppe genutzt, genauere Informationen über die NETs Wirkung liefern.

In Hinblick auf die Ausgangsfragen lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit folgendermaßen zusammenfassen:

- 1) NETs haben das Potential, die *IL-6* Genexpression in HL-1 Kardiomyozyten zu stimulieren.
- 2) NETs haben die Fähigkeit, apoptotische Signalwege zu regulieren. Die NETs-Wirkung ist abhängig von der Sauerstoffversorgung sowie vom inflammatorischen Umfeld der Kardiomyozyten.
- 3) NETs sind nicht in der Lage, die Proliferationsrate von HL-1 Kardiomyozyten zu beeinflussen.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Destatis. Todesursachen in Deutschland. 2015. Fachserie 12 Reihe 4, 2017.
- 2 Lacey B, Herrington WG, Preiss D, Lewington S, Armitage J. The Role of Emerging Risk Factors in Cardiovascular Outcomes. *Curr Atheroscler Rep* 2017; **19**: 535. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0661-2>.
- 3 Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; **407**: 233–41. <https://doi.org/10.1038/35025203>.
- 4 Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996; **74**: 86–107.
- 5 Braunwald E. Myocardial reperfusion, limitation of infarct size, reduction of left ventricular dysfunction, and improved survival. Should the paradigm be expanded? *Circulation* 1989; **79**: 441–44. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.79.2.441>.
- 6 Ibanez B, James S, Agewall S, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2018; **39**: 119–77. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx393>.
- 7 Vandervelde S, van Amerongen MJ, Tio RA, Petersen AH, van Luyn MJA, Harmsen MC. Increased inflammatory response and neovascularization in reperfused vs. non-reperfused murine myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol* 2006; **15**: 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2005.10.006>.
- 8 Widimsky P, Wijns W, Fajadet J, et al. Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction in Europe. Description of the current situation in 30 countries. *Eur Heart J* 2010; **31**: 943–57. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp492>.
- 9 Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, Olivetti G. Myocardial response to infarction in the rat. Morphometric measurement of infarct size and myocyte cellular hypertrophy. *Am J Pathol* 1985; **118**: 484–92.
- 10 White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation* 1987; **76**: 44–51.
- 11 Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol* 2015; **5**: 1841–75. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150006>.
- 12 Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res* 2008; **58**: 88–111. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.06.007>.
- 13 Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselingh S. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am J Pathol* 1995; **146**: 419–28.

- 14 Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, et al. Cardiac Myocytes Produce Interleukin-6 in Culture and in Viable Border Zone of Reperfused Infarctions. *Circulation* 1999; **99**: 546–51. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.4.546>.
- 15 Frantz S, Nahrendorf M. Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 2014; **102**: 240–48. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu025>.
- 16 Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1995; **27**: 1281–92.
- 17 Duffin R, Leitch AE, Fox S, Haslett C, Rossi AG. Targeting granulocyte apoptosis. Mechanisms, models, and therapies. *Immunol Rev* 2010; **236**: 28–40. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00922.x>.
- 18 Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol* 2014; **11**: 255–65. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.28>.
- 19 Ruiz-Villalba A, Simón AM, Pogontke C, et al. Interacting resident epicardium-derived fibroblasts and recruited bone marrow cells form myocardial infarction scar. *J Am Coll Cardiol* 2015; **65**: 2057–66. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.03.520>.
- 20 Turner NA, Porter KE. Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2013; **6**: 5. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-6-5>.
- 21 Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation* 1993; **87**: 755–63.
- 22 Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 2013; **229**: 176–85. <https://doi.org/10.1002/path.4133>.
- 23 Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, et al. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am J Pathol* 2008; **173**: 57–67. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070974>.
- 24 Suzuki K, Murtuza B, Smolenski RT, et al. Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist provides cardioprotection against ischemia-reperfusion injury associated with reduction in apoptosis. *Circulation* 2001; **104**: I308-I3.
- 25 Hwang MW, Matsumori A, Furukawa Y, et al. Neutralization of interleukin-1beta in the acute phase of myocardial infarction promotes the progression of left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2001; **38**: 1546–53.
- 26 Maekawa N, Wada H, Kanda T, et al. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol* 2002; **39**: 1229–35.
- 27 Sun M, Dawood F, Wen W-H, et al. Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2004; **110**: 3221–28. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000147233.10318.23>.

- 28 Engel D, Peshock R, Armstrong RC, Sivasubramanian N, Mann DL. Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; **287**: H1303-11. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00053.2004>.
- 29 Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, et al. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; **97**: 5456–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.070036297>.
- 30 Monden Y, Kubota T, Tsutsumi T, et al. Soluble TNF receptors prevent apoptosis in infiltrating cells and promote ventricular rupture and remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2007; **73**: 794–805. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.12.016>.
- 31 Yamauchi-Takahara K, Ihara Y, Ogata A, Yoshizaki K, Azuma J, Kishimoto T. Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. *Circulation* 1995; **91**: 1520–24.
- 32 Fredj S, Bescond J, Louault C, Delwail A, Lecron J-C, Potreau D. Role of interleukin-6 in cardiomyocyte/cardiac fibroblast interactions during myocyte hypertrophy and fibroblast proliferation. *J Cell Physiol* 2005; **204**: 428–36. <https://doi.org/10.1002/jcp.20307>.
- 33 Ikeda U, Ohkawa F, Seino Y, et al. Serum interleukin 6 levels become elevated in acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1992; **24**: 579–84.
- 34 Huang M, Du Yang, Xiang M, Wang J. Role of interleukin-6 in regulation of immune responses to remodeling after myocardial infarction. *Heart Fail Rev* 2015; **20**: 25–38. <https://doi.org/10.1007/s10741-014-9431-1>.
- 35 Yu X, Kennedy RH, Liu SJ. JAK2/STAT3, Not ERK1/2, Mediates Interleukin-6-induced Activation of Inducible Nitric-oxide Synthase and Decrease in Contractility of Adult Ventricular Myocytes. *J. Biol. Chem.* 2003; **278**: 16304–09. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212321200>.
- 36 Hilfiker-Kleiner D, Shukla P, Klein G, et al. Continuous glycoprotein-130-mediated signal transducer and activator of transcription-3 activation promotes inflammation, left ventricular rupture, and adverse outcome in subacute myocardial infarction. *Circulation* 2010; **122**: 145–55. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.933127>.
- 37 Kobara M, Noda K, Kitamura M, et al. Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res* 2010; **87**: 424–30. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq078>.
- 38 Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Fuchs M, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury. *Circ Res* 2004; **95**: 187–95. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000134921.50377.61>.

- 39 Fuchs M, Hilfiker A, Kaminski K, et al. Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction. *FASEB J* 2003; **17**: 2118–20. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0331fje>.
- 40 Tokmakova M, Solomon SD. Inhibiting the renin-angiotensin system in myocardial infarction and heart failure. Lessons from SAVE, VALIANT and CHARM, and other clinical trials. *Curr Opin Cardiol* 2006; **21**: 268–72. <https://doi.org/10.1097/01.hco.0000231394.79609.24>.
- 41 Christia P, Frangogiannis NG. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 2013; **43**: 986–95. <https://doi.org/10.1111/eci.12118>.
- 42 Barletta KE, Ley K, Mehrad B. Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; **32**: 856–64. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.226845>.
- 43 Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 519–31. <https://doi.org/10.1038/nri3024>.
- 44 Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992; **80**: 2012–20.
- 45 Yan X, Anzai A, Katsumata Y, et al. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2013; **62**: 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.04.023>.
- 46 Kim D, Haynes CL. Neutrophil chemotaxis within a competing gradient of chemoattractants. *Anal Chem* 2012; **84**: 6070–78. <https://doi.org/10.1021/ac3009548>.
- 47 Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010; **33**: 657–70. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>.
- 48 Youker K, Smith CW, Anderson DC, et al. Neutrophil adherence to isolated adult cardiac myocytes. Induction by cardiac lymph collected during ischemia and reperfusion. *J Clin Invest* 1992; **89**: 602–09. <https://doi.org/10.1172/JCI115626>.
- 49 Smith CW, Entman ML, Lane CL, et al. Adherence of neutrophils to canine cardiac myocytes in vitro is dependent on intercellular adhesion molecule-1. *J Clin Invest* 1991; **88**: 1216–23. <https://doi.org/10.1172/JCI115424>.
- 50 Kukielka GL, Hawkins HK, Michael L, et al. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium. *J Clin Invest* 1993; **92**: 1504–16. <https://doi.org/10.1172/JCI116729>.
- 51 Entman ML, Youker K, Shoji T, et al. Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence. *J Clin Invest* 1992; **90**: 1335–45. <https://doi.org/10.1172/JCI115999>.

- 52 Metzler B, Mair J, Lercher A, et al. Mouse model of myocardial remodelling after ischemia. Role of intercellular adhesion molecule-1. *Cardiovasc Res* 2001; **49**: 399–407.
- 53 Simpson PJ, Todd RF, Fantone JC, Mickelson JK, Griffin JD, Lucchesi BR. Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J Clin Invest* 1988; **81**: 624–29. <https://doi.org/10.1172/JCI113364>.
- 54 Bratton DL, Henson PM. Neutrophil clearance. When the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol* 2011; **32**: 350–57. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.04.009>.
- 55 Liu X-H, Pan L-L, Deng H-Y, et al. Leonurine (SCM-198) attenuates myocardial fibrotic response via inhibition of NADPH oxidase 4. *Free Radic Biol Med* 2013; **54**: 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.555>.
- 56 Jolly SR, Kane WJ, Hook BG, Abrams GD, Kunkel SL, Lucchesi BR. Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion. Effect of duration of occlusion. *Am Heart J* 1986; **112**: 682–90.
- 57 Avanzas P, Quiles J, López de Sá E, et al. Neutrophil count and infarct size in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2004; **97**: 155–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2003.06.028>.
- 58 Sisley AC, Desai T, Harig JM, Gewertz BL. Neutrophil depletion attenuates human intestinal reperfusion injury. *J Surg Res* 1994; **57**: 192–96. <https://doi.org/10.1006/jsre.1994.1130>.
- 59 Barrett JA, Derian CK, Swillo RS, Woltmann RF, Perrone MH. The role of the neutrophil and formed elements of the blood in an in vitro model of reperfusion injury. *Mediators Inflamm* 1993; **2**: 85–92. <https://doi.org/10.1155/S0962935193000122>.
- 60 Roberts R, DeMello V, Sobel BE. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation* 1976; **53**: I204-6.
- 61 Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; **176**: 231–41. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>.
- 62 Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 2004; **303**: 1532–35. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>.
- 63 Urban CF, Ermert D, Schmid M, et al. Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 2009; **5**: e1000639. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000639>.
- 64 Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 2009; **15**: 1318–21. <https://doi.org/10.1038/nm.2053>.
- 65 Halverson TWR, Wilton M, Poon KKH, Petri B, Lewenza S. DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog* 2015; **11**: e1004593. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004593>.

- 66 Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 2006; **8**: 668–76. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x>.
- 67 Patel S, Kumar S, Jyoti A, et al. Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide* 2010; **22**: 226–34. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.01.001>.
- 68 Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, et al. Cytokines Induced Neutrophil Extracellular Traps Formation. Implication for the Inflammatory Disease Condition. *PLoS ONE* 2012; **7**: e48111. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048111>.
- 69 Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007; **13**: 463–69. <https://doi.org/10.1038/nm1565>.
- 70 Maueröder C, Mahajan A, Paulus S, et al. Ménage-à-Trois. The Ratio of Bicarbonate to CO<sub>2</sub> and the pH Regulate the Capacity of Neutrophils to Form NETs. *Front Immunol* 2016; **7**: 583. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00583>.
- 71 Wong SL, Demers M, Martinod K, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med* 2015; **21**: 815–19. <https://doi.org/10.1038/nm.3887>.
- 72 Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep* 2014; **8**: 883–96. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.044>.
- 73 Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2010; **191**: 677–91. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>.
- 74 Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation. Implications for innate immunity. *Blood* 2011; **117**: 953–59. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-290171>.
- 75 Neeli I, Khan SN, Radic M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol* 2008; **180**: 1895–902.
- 76 Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* 2010; **207**: 1853–62. <https://doi.org/10.1084/jem.20100239>.
- 77 Wang Y, Li M, Stadler S, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol* 2009; **184**: 205–13. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806072>.

- 78 Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res* 2011; **21**: 290–304. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.150>.
- 79 Kenny EF, Herzig A, Krüger R, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife* 2017; **6**. <https://doi.org/10.7554/eLife.24437>.
- 80 Pilsczek FH, Salina D, Poon KKH, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 2010; **185**: 7413–25. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000675>.
- 81 Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med* 2017; **23**: 279–87. <https://doi.org/10.1038/nm.4294>.
- 82 Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L, García-Orozco A, Alvarado-Navarro A, Fafutis-Morris M. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation. An Overview. *Front Immunol* 2017; **8**: 81. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00081>.
- 83 Yousefi S, Mihalache C, Kozłowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* 2009; **16**: 1438–44. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.96>.
- 84 Yousefi S, Simon D, Simon H-U. Eosinophil extracellular DNA traps. Molecular mechanisms and potential roles in disease. *Curr Opin Immunol* 2012; **24**: 736–39. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.08.010>.
- 85 Yang Z, Wei Z, Hermosilla C, et al. Caprine Monocytes Release Extracellular Traps against *Neospora caninum* In Vitro. *Front Immunol* 2017; **8**: 2016. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.02016>.
- 86 Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol* 2014; **15**: 1017–25. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>.
- 87 Meng W, Paunel-Görgülü A, Flohé S, et al. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Crit Care* 2012; **16**: R137. <https://doi.org/10.1186/cc11442>.
- 88 Czaikoski PG, Mota JM, Nascimento DC, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. *PLoS ONE* 2016; **11**: e0148142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148142>.
- 89 Biermann MHC, Podolska MJ, Knopf J, et al. Oxidative Burst-Dependent NETosis Is Implicated in the Resolution of Necrosis-Associated Sterile Inflammation. *Front Immunol* 2016; **7**: 557. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00557>.
- 90 Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in

- preeclampsia. *Hum Immunol* 2005; **66**: 1146–54. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2005.11.003>.
- 91 Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009; **15**: 623–25. <https://doi.org/10.1038/nm.1959>.
- 92 Lögters T, Paunel-Görgülü A, Zilkens C, et al. Diagnostic accuracy of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs) for septic arthritis. *J Orthop Res* 2009; **27**: 1401–07. <https://doi.org/10.1002/jor.20911>.
- 93 Marcos V, Zhou Z, Yildirim AO, et al. CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat Med* 2010; **16**: 1018–23. <https://doi.org/10.1038/nm.2209>.
- 94 Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest* 2013. <https://doi.org/10.1172/JCI67484>.
- 95 Muñoz LE, Janko C, Schulze C, et al. Autoimmunity and chronic inflammation - two clearance-related steps in the etiopathogenesis of SLE. *Autoimmun Rev* 2010; **10**: 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.08.015>.
- 96 Toussaint M, Jackson DJ, Swieboda D, et al. Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation. *Nat Med* 2017; **23**: 681–91. <https://doi.org/10.1038/nm.4332>.
- 97 Boer OJ de, Li X, Teeling P, et al. Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2013; **109**: 290–97. <https://doi.org/10.1160/TH12-06-0425>.
- 98 Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; **32**: 1777–83. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.242859>.
- 99 Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 15880–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005743107>.
- 100 Brühl M-L von, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 2012; **209**: 819–35. <https://doi.org/10.1084/jem.20112322>.
- 101 Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**: 34–45. <https://doi.org/10.1038/nri3345>.
- 102 Massberg S, Grahl L, Bruehl M-L von, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 2010; **16**: 887–96. <https://doi.org/10.1038/nm.2184>.

- 103 Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* 2012; **10**: 136–44. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x>.
- 104 Mangold A, Alias S, Scherz T, et al. Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size. *Circ Res* 2015; **116**: 1182–92. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.304944>.
- 105 Thålin C, Demers M, Blomgren B, et al. NETosis promotes cancer-associated arterial microthrombosis presenting as ischemic stroke with troponin elevation. *Thromb Res* 2016; **139**: 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.01.009>.
- 106 Abrams ST, Zhang N, Manson J, et al. Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; **187**: 160–69. <https://doi.org/10.1164/rccm.201206-1037OC>.
- 107 Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al. Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death. A Predominant Role of Histones. *PLoS ONE* 2012; **7**: e32366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032366>.
- 108 Carmona-Rivera C, Zhao W, Yalavarthi S, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Ann Rheum Dis* 2015; **74**: 1417–24. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204837>.
- 109 Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett* 2010; **584**: 3193–97. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.006>.
- 110 Schreiber A, Rousselle A, Becker JU, Mässenhausen A von, Linkermann A, Kettritz R. Necroptosis controls NET generation and mediates complement activation, endothelial damage, and autoimmune vasculitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; **114**: E9618-E9625. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708247114>.
- 111 Nauseef WM, Kubes P. Pondering neutrophil extracellular traps with healthy skepticism. *Cell Microbiol* 2016; **18**: 1349–57. <https://doi.org/10.1111/cmi.12652>.
- 112 Chang CP-Y, Chia R-H, Wu T-L, Tsao K-C, Sun C-F, Wu JT. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clinica Chimica Acta* 2003; **327**: 95–101. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(02\)00337-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00337-6).
- 113 Cui M, Fan M, Jing R, et al. Cell-Free circulating DNA. A new biomarker for the acute coronary syndrome. *Cardiology* 2013; **124**: 76–84. <https://doi.org/10.1159/000345855>.
- 114 Helseth R, Solheim S, Arnesen H, Seljeflot I, Opstad TB. The Time Course of Markers of Neutrophil Extracellular Traps in Patients Undergoing Revascularisation for Acute

- Myocardial Infarction or Stable Angina Pectoris. *Mediators Inflamm* 2016; **2016**: 2182358. <https://doi.org/10.1155/2016/2182358>.
- 115 Kawai Y, Yoshida M, Arakawa K, et al. Diagnostic use of serum deoxyribonuclease I activity as a novel early-phase marker in acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; **109**: 2398–400. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000129232.61483.43>.
- 116 Kuribara J, Tada H, Kawai Y, et al. Levels of serum deoxyribonuclease I activity on admission in patients with acute myocardial infarction can be useful in predicting left ventricular enlargement due to remodeling. *J Cardiol* 2009; **53**: 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2008.10.013>.
- 117 Berends ETM, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, Köckritz-Blickwede M von. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun* 2010; **2**: 576–86. <https://doi.org/10.1159/000319909>.
- 118 Li GH, Shi Y, Chen Y, et al. Gelsolin regulates cardiac remodeling after myocardial infarction through DNase I-mediated apoptosis. *Circ Res* 2009; **104**: 896–904. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.172882>.
- 119 Savchenko AS, Borissoff JI, Martinod K, et al. VWF-mediated leukocyte recruitment with chromatin decondensation by PAD4 increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood* 2014; **123**: 141–48. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-514992>.
- 120 Ge L, Zhou X, Ji W-J, et al. Neutrophil extracellular traps in ischemia-reperfusion injury-induced myocardial no-reflow. Therapeutic potential of DNase-based reperfusion strategy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; **308**: H500-9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00381.2014>.
- 121 Vogel B, Shinagawa H, Hofmann U, Ertl G, Frantz S. Acute DNase1 treatment improves left ventricular remodeling after myocardial infarction by disruption of free chromatin. *Basic Res Cardiol* 2015; **110**: 15. <https://doi.org/10.1007/s00395-015-0472-y>.
- 122 Liu Z, Yue S, Chen X, Kubin T, Braun T. Regulation of cardiomyocyte polyploidy and multinucleation by CyclinG1. *Circ Res* 2010; **106**: 1498–506. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.211888>.
- 123 Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, et al. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J Pathol* 2014; **233**: 294–307. <https://doi.org/10.1002/path.4359>.
- 124 Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 2015; **349**: 316–20. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8064>.
- 125 Pashevin DO, Nagibin VS, Tumanovska LV, Moibenko AA, Dosenko VE. Proteasome Inhibition Diminishes the Formation of Neutrophil Extracellular Traps and Prevents the Death of Cardiomyocytes in Coculture with Activated Neutrophils during Anoxia-Reoxygenation. *Pathobiology* 2015; **82**: 290–98. <https://doi.org/10.1159/000440982>.

- 126 Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, et al. HL-1 cells. A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; **95**: 2979–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2979>.
- 127 Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 2006; **1**: 1458–61. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>.
- 128 Joshi MB, Lad A, Bharath Prasad AS, Balakrishnan A, Ramachandra L, Satyamoorthy K. High glucose modulates IL-6 mediated immune homeostasis through impeding neutrophil extracellular trap formation. *FEBS Lett* 2013; **587**: 2241–46. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.053>.
- 129 Ma R, Li T, Cao M, et al. Extracellular DNA traps released by acute promyelocytic leukemia cells through autophagy. *Cell Death Dis* 2016; **7**: e2283. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.186>.
- 130 van Avondt K, Hartl D. Mechanisms and disease relevance of neutrophil extracellular trap formation. *Eur J Clin Invest* 2018; **48 Suppl 2**: e12919. <https://doi.org/10.1111/eci.12919>.
- 131 Braian C, Hoge V, Stendahl O. Mycobacterium tuberculosis- induced neutrophil extracellular traps activate human macrophages. *J Innate Immun* 2013; **5**: 591–602. <https://doi.org/10.1159/000348676>.
- 132 Hudock KM, Collins MS, Imbrogno M, et al. Neutrophil extracellular traps activate IL-8 and IL-1 expression in human bronchial epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2020. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00144.2019>.
- 133 Eghbalzadeh K, Georgi L, Louis T, et al. Compromised Anti-inflammatory Action of Neutrophil Extracellular Traps in PAD4-Deficient Mice Contributes to Aggravated Acute Inflammation After Myocardial Infarction. *Front Immunol* 2019; **10**: 2313. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02313>.
- 134 Guimarães-Costa AB, Rochael NC, Oliveira F, Echevarria-Lima J, Saraiva EM. Neutrophil Extracellular Traps Reprogram IL-4/GM-CSF-Induced Monocyte Differentiation to Anti-inflammatory Macrophages. *Front Immunol* 2017; **8**: 523. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00523>.
- 135 Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix. When is enough enough? *Circulation* 2003; **108**: 1395–403. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000085658.98621.49>.
- 136 Monge C, Beraud N, Tepp K, et al. Comparative analysis of the bioenergetics of adult cardiomyocytes and nonbeating HL-1 cells. Respiratory chain activities, glycolytic enzyme profiles, and metabolic fluxes. *Can J Physiol Pharmacol* 2009; **87**: 318–26. <https://doi.org/10.1139/Y09-018>.

- 137 Kumar SV, Kulkarni OP, Mulay SR, et al. Neutrophil Extracellular Trap-Related Extracellular Histones Cause Vascular Necrosis in Severe GN. *JASN* 2015; **26**: 2399–413. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014070673>.
- 138 Song H-P, Zhang L, Dang Y-M, Yan H, Chu Z-G, Huang Y-S. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway protects cardiomyocytes from ischaemic and hypoxic apoptosis via mitochondrial function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; **37**: 598–604. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2010.05355.x>.
- 139 Mullonkal CJ, Toledo-Pereyra LH. Akt in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg* 2007; **20**: 195–203. <https://doi.org/10.1080/08941930701366471>.
- 140 Zhou P, Qian L, Kozopas KM, Craig RW. Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood* 1997; **89**: 630–43.
- 141 Guo L, Eldridge S, Furniss M, Mussio J, Davis M. Role of Mcl-1 in regulation of cell death in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2018; **360**: 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.09.041>.
- 142 Kolaczowska E, Jenne CN, Surewaard BGJ, et al. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat Commun* 2015; **6**: 6673. <https://doi.org/10.1038/ncomms7673>.
- 143 Nakazawa D, Kumar SV, Marschner J, et al. Histones and Neutrophil Extracellular Traps Enhance Tubular Necrosis and Remote Organ Injury in Ischemic AKI. *J Am Soc Nephrol* 2017; **28**: 1753–68. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016080925>.
- 144 Myzak MC, Carr AC. Myeloperoxidase-dependent caspase-3 activation and apoptosis in HL-60 cells. Protection by the antioxidants ascorbate and (dihydro)lipoic acid. *Redox Rep* 2002; **7**: 47–53. <https://doi.org/10.1179/135100002125000181>.
- 145 Hofbauer TM, Mangold A, Scherz T, et al. Neutrophil extracellular traps and fibrocytes in ST-segment elevation myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2019; **114**: 33. <https://doi.org/10.1007/s00395-019-0740-3>.
- 146 Cutler MJ, Jeyaraj D, Rosenbaum DS. Cardiac electrical remodeling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 2011; **32**: 174–80. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.001>.
- 147 Li X, Heinzl FR, Boengler K, Schulz R, Heusch G. Role of connexin 43 in ischemic preconditioning does not involve intercellular communication through gap junctions. *J Mol Cell Cardiol* 2004; **36**: 161–63. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2003.10.019>.
- 148 D'Amico MA, Ghinassi B, Izzicupo P, Di Ruscio A, Di Baldassarre A. IL-6 Activates PI3K and PKC $\zeta$  Signaling and Determines Cardiac Differentiation in Rat Embryonic H9c2 Cells. *J Cell Physiol* 2016; **231**: 576–86. <https://doi.org/10.1002/jcp.25101>.

- 149 Severino A, Narducci ML, Pedicino D, et al. Reversible atrial gap junction remodeling during hypoxia/reoxygenation and ischemia: a possible arrhythmogenic substrate for atrial fibrillation. *Gen Physiol Biophys* 2012; **31**: 439–48. [https://doi.org/10.4149/gpb\\_2012\\_047](https://doi.org/10.4149/gpb_2012_047).
- 150 Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009; **324**: 98–102. <https://doi.org/10.1126/science.1164680>.
- 151 Wei L, Zhou Q, Tian H, Su Y, Fu G, Sun T. Integrin  $\beta$ 3 promotes cardiomyocyte proliferation and attenuates hypoxia-induced apoptosis via regulating the PTEN/Akt/mTOR and ERK1/2 pathways. *Int J Biol Sci* 2020; **16**: 644–54. <https://doi.org/10.7150/ijbs.39414>.
- 152 Miller-Ocuin JL, Liang X, Boone BA, et al. DNA released from neutrophil extracellular traps (NETs) activates pancreatic stellate cells and enhances pancreatic tumor growth. *Oncoimmunology* 2019; **8**: e1605822. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1605822>.
- 153 Zhang L-M, Chen J-H. Progression of NETs Correlating with Tumor-Related Diseases. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; **16**: 7431–34. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.17.7431>.