Aus der Klinik für Anästhesiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

Die Bedeutung des PKA-mK_{Ca}-Kanal-Signalweges beim alterungsbedingten Wirkverlust kardioprotektiver Interventionen

-Studie am Rattenherzen *in vivo* und proteinbiochemische Analysen-

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Martin Ströthoff

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer
Zweitgutachterin: Prof. Dr. Dr. rer. nat. Miriam Cortese-Krott

Meinen Eltern und meiner Frau gewidmet.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Originalarbeit:

Heinen A., Ströthoff M., Schmidt A., Stracke N., Behmenburg F., Bauer I., Hollmann M.W., Huhn R., (2014), Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK_{Ca} signaling pathway. *Experimental Gerontology* (56) 99–105

Teile der Studie wurden gefördert durch die Forschungskommission der Medizinischen Fakultät der HHU Düsseldorf (Anschubfinanzierung; „Verlust der Präkonditionierung im Alter: Charakterisierung altersbedingter Veränderungen der Proteinkinase A Regulation“).

Zusammenfassung

Eine pharmakologische Präkonditionierung mit Forskolin, die über eine Steigerung der Adenylatcyclaseaktivität eine Proteinkinase-A (PKA) Aktivierung initiiert, führt bei alten Ratten im Gegensatz zu jungen Tieren zu keiner Kardioprotektion. Demgegenüber führt eine Aktivierung mitochondrialer kalziumabhängiger Kaliumkanäle (mK_{Ca}) mit NS1619 in jungen wie in alten Versuchstieren zu einer Infarktgrößenreduktion. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel dieser Arbeit, den funktionellen Zusammenhang des Signalweges „PKA-mK_{Ca}-Kanal“ genauer aufzuklären und die Frage zu beantworten, ob die Ursache im alterungsbedingten Wirkverlust kardioprotektiver Maßnahmen innerhalb jenes Signalweges zu finden ist.
Die Versuche wurden an einem *in vivo* Myokardinfarktmodell durchgeführt, bei welchem Wistar-Ratten einer 25-minütigen regionalen Myokardischämie mit einer 120-minütigen Reperfusion unterzogen wurden. In einer Dosisfindungsserie wurden die niedrigsten kardioprotektiven Dosen von Forskolin und NS1619 bestimmt. Ein möglicher funktioneller Zusammenhang von PKA und mK_{Ca}-Kanal wurde in einer weiteren Versuchsserie ermittelt, bei welcher der Effekt einer pharmakologischen Inhibition des mK_{Ca}-Kanals mit Iberiotoxin auf die Forskolin-induzierte Kardioprotektion untersucht wurde. Des Weiteren wurde eine mögliche Altersabhängigkeit einer Kardioprotektion von Forskolin und NS1619 sowie eine Altersabhängigkeit des Effekts von Forskolin auf die PKA-Aktivität untersucht (22-24 Monate alte Wistar-Ratten). Hierzu wurden cAMP-Spiegel mittels ELISA sowie der Phosphorylierungsgrad von Phospholamban als Marker der PKA-Aktivität nach Forskolinapplikation mittels Western-Blot im Myokardgewebe bestimmt.
Durch Präkonditionierung mit NS1619 (10 µg/kg/min; NS10) und Forskolin (30 µg/kg, For30) wurde bei den jungen Tieren eine signifikante Infarktgrößenreduktion erreicht (Kon: 64±7 %, NS10: 41±11 %, For30: 34± 6 %, $p<0,05$, dargestellt als Mittelwert±Standardabweichung). Eine gleichzeitige Gabe von Iberiotoxin (6 µg/kg/min; Ibtx) hob die Forskolin-induzierte Präkonditionierung vollständig auf (For30+Ibtx: 63±12 % vs Kon: 67±8 %, $p>0,05$). Bei den alten Tieren führte eine Präkonditionierung mit NS1619 (10 µg/kg/min und 30 µg/kg/min) ebenfalls zu einer effektiven Infarktreduktion (Kon: 56±6 %, NS10: 35±8 %, NS30: 37±7 %, $p<0,05$). Forskolin (30 µg/kg und 100 µg/kg) konnte jedoch keine Kardioprotektion im alten Myokard auslösen, auch nicht mit höherer Dosierung (For30: 51±10 %, For100: 50±11 % vs Kon). Die cAMP-Spiegel waren bei jungen wie alten Tieren ähnlich (jung: 4,3±0,4 pmol/mg Protein, alt: 3,4±0,5 pmol/mg Protein) und stiegen nach Forskolinstimulation gleichermaßen an (For30 jung: 5,3±0,8 pmol/mg, For30 alt: 5,1±1,2 pmol/mg vs Kon, $p<0,05$). Phosphoryliertes Phospholamban, als Maß für die PKA-Aktivität war basal (jung: 1,1±0,4, alt: 0,9±0,5) und durch Forskolin gesteigert in jungen und alten Tieren auf vergleichbarem Niveau (For30 jung: 2,4±0,7, For30 alt: 2,4±1,3 vs Kon, $p<0,05$).
Die Ergebnisse zeigen, dass eine direkte mK_{Ca}-Kanalaktivierung eine Kardioprotektion in jungen wie alten Tieren auslösen kann. Demgegenüber reduziert eine Aktivierung der PKA, welche dem mK_{Ca}-Kanal innerhalb der Signaltransduktion vorangeschaltet zu sein scheint, lediglich bei den jungen Tieren die Infarktgröße. Die molekularbiologischen Analysen deuten jedoch daraufhin, dass kein altersabhängiger Unterschied in der Funktion und Regulation der PKA herrscht. Dieser im Alter zunehmende Wirkverlust scheint zwar innerhalb des Signalweges zu liegen, jedoch muss dieser proximal des mK_{Ca}-Kanals und distal der PKA lokalisiert sein. Aufgrund einer bestehenden Interaktion von Connexin43 und der PKA und einer vermuteten Verbindung zu mitochondrialen Kaliumkanälen und deren Einfluss auf den Kaliumeinstrom, könnte Connexin43 einen vielversprechenden Signalschritt darstellen. Zudem gibt es Hinweise auf eine altersabhängige Abnahme des mitochondrialen Connexin43-Gehaltes und einen Einfluss von Cx43 auf Mechanismen der Präkonditionierung. Daher wurde die vorliegende Untersuchung dahingehend ergänzt und es konnte eine Abnahme der mitochondrialen Cx43-Proteinexpression im Herz von alten Versuchstieren nachgewiesen werden. Die funktionelle Bedeutung ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Abstract

In contrast to young hearts, a phamacological preconditioning with the protein kinase A (PKA) activator forskolin is lost in the aged heart. However, activation of mitochondrial Ca^{2+}-sensitive potassium (mK_{ca}) channels with NS1619 initiated cardioprotection also in the aged heart and these channels act as a possible PKA downstream target. Thus, the aim of this study was to investigate the functional connection of PKA and mK_{Ca} channels and whether the age-dependent loss of cardioprotection is caused by differences in PKA regulation and signalling pathways of PKA and mK_{Ca} channels.

We used an *in vivo* rat model with regional myocardial ischemia and treated young (2-4 months) and aged (22-24 months) Wistar rats with PKA activator forskolin, K_{Ca} channel activator NS1619 and/or K_{Ca} channel blocker iberiotoxin for 10 min before ischemia. All animals underwent 25 minutes regional ischemia followed by 120 minutes reperfusion. At the end of the protocol the hearts were excised for infarct size measurement using TTC-staining. First we performed a dose-response study of NS1619 and forskolin in young animals to determine the lowest protective dose. Next, to investigate whether the mK_{Ca} channel is critically involved in forskolin- and PKA-induced cardioprotection and a downstream target of PKA, young animals received the lowest protective dose of forskolin in the presence or absence of the K_{Ca} channel blocker iberiotoxin. Based on the result obtained in the dose-response study in young animals we tested the age-dependent effects of forskolin and NS1619 in the aged heart and measured the infarct size. To assess the activation of PKA by forskolin in young and aged hearts, we determined the myocardial cAMP levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and analysed the expression of myocardial phosporylated phospholamban as a marker of PKA activity after stimulation with forskolin.

NS1619 (10 µg/kg/min; NS10) and forskolin (30 µg/kg, For30) initiated cardioprotection in young rat hearts (infarct size: NS10: 41±11 %, For30: 34± 6 %, $p<0,05$ vs. Kon: 64±7%). In the presence of iberiotoxin (6 µg/kg/min; Ibtx) the forskolin-induced effect was completely abrogated (For30+Ibtx: 63±12 % vs Kon: 67±8%, $p>0,05$). In the aged rat heart NS1619 (10µg/kg/min and 30µg/kg/min) reduced infarct size similar to young hearts (Kon: 56±6%, NS10: 35±8%, NS30: 37±7%, $p<0,05$). Although forskolin (30µg/kg and 100 µg/kg) had no effect on infarct size in aged hearts (For30: 51±10%, For100: 50±11% vs Kon), forskolin (30µg/kg) increased both cAMP levels and PKA activity in aged hearts to the same extent as in young hearts.

These data show that a direct activation of mK_{Ca} channels by NS1619 initiates a cardioprotection in young and aged rat hearts. In contrast to young hearts, a PKA activation upstream of mK_{Ca} by forskolin shows no infarct size reduction in aged hearts. However the results of cAMP levels and PKA activity suggest that age-related differences in PKA activity and regulation are not the underlying reason for the age-related loss of forskolin-induced cardioprotection. The underlying mechanism appears to be within this signaling pathway, most likely localized between PKA and mK_{Ca} channels, so that mK_{Ca} channels are not directly regulated by PKA. This possible step could be Connexin 43 (Cx43), because Cx43 is linked with PKA and mK_{Ca}. Furthermore, evidence exists that Cx43 is involved in preconditioning mechanisms and the myocardial content of Cx43 decreases with increasing age. We measured a reduced Cx43 expression level in the mitochondrial fraction in cardiac tissue of aged rats, suggesting that this could provide a mechanism of age-related loss of cardioprotection.

Abkürzungen

AC	Adenylatcyclase
ADM	Adrenomedullin
ANT	Adeninnucleotid-Translokase
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cx43	Connexin43
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
Gap-19	Peptid, selektiver *gap junction* Blocker
Gap-27	Peptid, selektiver *gap junction* Blocker
HRP	*horseradish peroxidase* / Meerrettichperoxidase
IFM	interfibrilläre Mitochondrien
i.p.	intraperitoneal
IPC	*ischemic preconditioning* / ischämische Präkonditionierung
IR	Ischämie / Reperfusion
i.v.	intravenös
kDa	kiloDalton
KHK	koronare Herzkrankheit
mA	Milliampere
mK_{ATP}-Kanal	mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal
mK_{Ca}-Kanal	mitochondrialer kalziumabhängiger Kaliumkanal
mPTP	*mitochondrial permeability transition pore* / mitochondriale Permeabilitätspore
NaCl	Natriumchlorid
NS1619	1,3-dihydro-1-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]-5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazol-2-one

PDE-III Phosphodiesterase-III

PiC *inorganic phosphate carrier* / mitochondrialer Phosphat-Transporter

PKA Proteinkinase A

PLB Phospholamban

PVDF Polyvinylidendifluorid

ROS *reactive oxygen species* / Reaktive Sauerstoffspezies

SDS *Sodium-Dodecysulfat*

SSM subsarkolemmale Mitochondrien

TBS-T *Tris-buffered saline with Tween20*

TIM *translocase of the inner membrane*

TTC 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

VDAC *voltage-dependent anion channel* / spannungsabhängiger Anionenkanal

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Einführung 1

1.2 Pathophysiologie der Myokardischämie und Reperfusion 2

1.3 Kardioprotektion durch Präkonditionierung 4

1.4 Mitochondriale Permeabilitätspore 6

1.5 Signalkaskade mK_{Ca}-Kanal und Proteinkinase A 8

1.6 Alterungsbedingter Wirkverlust kardioprotektiver Interventionen 11

1.7 Ziele der Arbeit 14

2 Material und Methoden 16

2.1 Material 16

2.1.1 Chemikalien 16

2.1.2 Lösungen 16

2.1.3 Antikörper 19

2.2 Methoden 20

2.2.1 *In vivo* Versuche 20

2.2.2 Proteinbiochemische Analysen 28

2.2.3 Mitochondrienisolierung und Nachweis der Cx43-Proteinexpression 35

2.3 Statistische Auswertung 36

3 Ergebnisse 38

3.1 Hämodynamische Messdaten 38

3.2 Dosisfindung für Forskolin und NS1619 40

3.3 Zusammenhang des mK_{Ca}-Kanals und der PKA-Aktivierung 43

3.4 Untersuchung der Kardioprotektion des alten Herzen 45

3.4.1 Infarktgrößenbestimmung am alten Herzen 45

3.4.2 Proteinbiochemische Untersuchung 46

3.5 Semiquantitative Bestimmung von Cx43 50

4 Diskussion 52

5 Literaturverzeichnis 66

6 Abbildungsverzeichnis 79

7 Tabellenverzeichnis 79

1 Einleitung

1.1 Einführung

Laut Gesundheitsbericht des Statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2015 ist die mittlere Lebenserwartung bei Geburt in Deutschland seit Aufzeichnungsbeginn im Jahr 1871 kontinuierlich gestiegen [1]. Die Lebenserwartung hat sich alle zehn Jahre um durchschnittlich drei Jahre erhöht, so dass man im Jahr 2060 mit einer Lebenserwartung von über 89 Jahren bei Frauen und 85 Jahren bei Männern rechnen kann [1]. Diese gesteigerte Lebenszeit und eine seit 30 Jahren gesunkene Geburtenzahl führen zu einer veränderten Altersstruktur der Gesellschaft [2]. Heute nimmt die Gruppe der 40- bis 50-jährigen den Hauptanteil der Bevölkerung ein, wohingegen es im Jahr 2060 die 70- bis 75-jährigen sein werden [2].

Einhergehend mit dieser veränderten Altersverteilung kommt es zu einer gesteigerten Inzidenz und Prävalenz chronischer Krankheiten. Hierzu zählt unter anderem die koronare Herzkrankheit (KHK), welche der bedeutendste Risikofaktor des akuten Myokardinfarktes ist [3-5]. Zusammen mit der Herzinsuffizienz sind der akute Myokardinfarkt und die chronisch ischämische Herzerkrankung die häufigsten Todesursachen in Deutschland bei den über 65-Jährigen [2]. Dies bestätigen auch Zahlen aus dem Jahr 2013, wonach 39,7% der Sterbefälle auf Krankheiten des Kreislaufsystems zurückzuführen waren und die koronare Herzkrankheit mit 13,3% bei den Frauen und 15,6% bei den Männern die häufigste Todesursache darstellte [1].

In der Altersgruppe ab 65 Jahren ist annähernd jeder vierte Sterbefall auf eine Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems zurückzuführen [2]. Diesen Erkrankungen kommt zudem eine enorme volkswirtschaftliche Bedeutung zu, da diese laut Statistischem Bundesamt 21 % aller Krankheitskosten in der Altersgruppe ab 65 Jahren im Jahr 2008 verursachten [2] und damit den größten Kostenfaktor einnehmen [1]. Laut Bundesamt wird annähernd jeder siebte Euro im Gesundheitswesen für Herz-Kreislauferkrankungen ausgegeben [1].

Auf Grund dieser epidemiologischen Bevölkerungsentwicklung ist zudem mit einer Zunahme großer operativer Eingriffe bei Patienten mit zahlreichen Vorerkrankungen zu rechnen. Im Rahmen solcher Eingriffe zählen myokardiale Ischämien zu den

bedeutendsten Risikofaktoren für eine erhöhte Morbidität und Mortalität [6, 7]. Diese Ischämien treten vor allem bei vorbestehender koronarer Herzerkrankung auf, deren Erkrankungshäufigkeit im Alter stark zunimmt und bei den über 65-Jährigen einen Anteil von 19,1 % bei den Frauen und 28,3 % bei den Männern besitzt [8].

Zusammenfassend lässt sich vor diesem Hintergrund sagen, dass in einer alternden Gesellschaft die gesteigerte Inzidenz des akuten Myokardinfarktes, dessen Morbidität und Mortalität zudem im höheren Lebensalter erhöht ist, eine enorme Herausforderung an das Gesundheitssystem darstellt. Somit kommt der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien zur Minimierung der Folgeerscheinungen des akuten Myokardinfarktes eine große Bedeutung zu.

1.2 Pathophysiologie der Myokardischämie und Reperfusion

Während einer akuten Ischämie kommt es im betroffenen Myokardareal zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf. Eine eventuell bestehende koronare Herzkrankheit mit reduzierter oder bereits ausgeschöpfter Koronarreserve verschlechtert diese Situation zusätzlich, da eine Steigerung des Sauerstoffangebotes nicht oder nur in unzureichendem Umfang möglich ist [9].

Während der Ischämiephase müssen die Kardiomyozyten ihren Energiebedarf mit Hilfe einer ATP-Bereitstellung durch anaerobe Glykolyse decken [10]. Über diesen Mechanismus können vorübergehend energieabhängige zelluläre Prozesse aufrechterhalten werden. Verarmt die Zelle bei einer längerdauernden Ischämie zunehmend an intrazellulären Energieträgern, kommt es zu gravierenden Veränderungen, wie Störungen im Elektrolythaushalt, der Ansammlung von Endprodukten des anaeroben Stoffwechsels und Änderungen des Membranpotenzials. Anorganisches Phosphat [11], als auch Laktat sammeln sich an [10] und der pH-Wert fällt [11, 12]. Des Weiteren zeigen sich ischämietypische Veränderungen der ST-Strecke im EKG und es kann zu Einschränkungen der kardialen Pumpfunktion sowie zu Arrhythmien kommen [9]. Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), die Aktivierung von Proteasen und Lipasen, sowie die Entstehung eines intrazellulären Ödems führen zu Schäden an verschiedenen

Zellorganellen und am Sarkolemm [10]. Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Entstehung des kardialen Ischämieschadens ist eine übermäßige Ca^{2+}-Überladung der Zelle [13]. Aufgrund des zellulären Energiemangels wird die sarkolemmale Na^{+}/K^{+}-ATPase gehemmt [14]. Der hieraus resultierende Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration führt zu einer entgegengesetzten Aktivierung des Na^{+}/Ca^{2+}-Austauschers, wodurch es zu einem übermäßigen Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle kommt [14-16]. Diese Ca^{2+}-Überladung führt zu einer Gefährdung der Zelle, da sie den kontraktilen Apparat sowie Proteasen und Lipasen aktivieren kann [15]. Auf Grund der Azidose sind diese Prozesse während der Ischämiephase, im Sinne eines Schutzes, noch verlangsamt [15, 17].

Bei Wiedereröffnen der verschlossenen Koronararterie führt die Reperfusion des Myokards zu einem weiteren Gewebeschaden, dem Reperfusionsschaden [18, 19]. Hierbei verursacht die plötzliche Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung eine weitere Bildung von ROS [20]. Zusammen mit dem angereicherten Kalzium und der schnellen Normalisierung des pH-Werts wird ein Milieu geschaffen, in dem sich Mikroporen in der mitochondrialen Membran (*mitochondrial permeability transition pore*, mPTP) öffnen [20-22]. Während der Ischämie hat der niedrige pH diese Öffnung noch verhindert [23]. Die Folgen dieser mPTP-Öffnung sind ein Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials [24, 25], eine Unterbrechung der mitochondrialen ATP-Synthese [25], eine Schwellung der Mitochondrien [24, 25], sowie eine mögliche Einleitung von Apoptosevorgängen durch Freisetzung von Cytochrom C [20, 23]. Letztendlich verursachen diese Prozesse einen Zelluntergang und die mPTP scheint die zentrale Rolle im Ablauf des Reperfusionsschadens zu spielen [23]. Eine Nekrose wird zudem auch während der Reperfusion durch eine Hyperkontraktur mit konsekutiven Einrissen im Sarkolemm ausgelöst [15]. Ursächlich für die kardiomyozytäre Hyperkontraktur scheint eine übermäßige Ca^{2+}-getriggerte Aktivierung des kontraktilen Apparates im reperfundierten Myokard zu sein [15, 26], als auch ein zu lang andauernder niedriger ATP-Spiegel während der Reperfusion, der zur sogenannten Hyperkontraktur vom Rigor-Typ führt [19]. Ein ATP-Mangel kann durch eine Schädigung der Mitochondrien bereits während der Ischämie verursacht werden oder durch Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transition-Poren, die eine oxidative Phosphorylierung verhindern [15]. Zum einen führt die mechanische Kraft zur Schädigung von Nachbarzellen und damit zur weiteren Ausbreitung der

Gewebeschädigung, zum anderen sind die Zellen über *Gap junctions* an den Glanzstreifen elektrochemisch gekoppelt, so dass auch in anderen Zellen Kontrakturen ausgelöst werden können [15]. Es entstehen somit durch die Reperfusion Kontraktionsbandnekrosen entlang dieser zellulären Ausbreitung, erkennbar durch Aneinanderreihung toter Kardiomyozyten [15, 27].

Somit sorgt sowohl die Ischämie als auch die nachfolgende Reperfusion für einen Verlust von funktionsfähigen Kardiomyozyten. Doch es existiert ein endogener Schutzmechanismus, der durch Präkonditionierung zu einem Schutz gegen den Ischämie-Reperfusionsschaden (IR-Schaden) im Myokard führt und somit eine verminderte Anzahl an Kardiomyozyten in diesen Phasen untergeht.

1.3 Kardioprotektion durch Präkonditionierung

Im Jahre 1986 berichteten Murry et al., dass kurze Episoden nicht-letaler Myokardischämien die Toleranz des Myokards gegenüber einer folgenden, länger anhaltenden Ischämie steigern [28]. Die Autoren konnten an narkotisierten Hunden zeigen, dass die Herzen, welche vier Zyklen kurzer myokardialer IR-Phasen unterzogen wurden, ein reduziertes Infarktausmaß nach einer nachfolgenden längeren Ischämiephase aufwiesen als die Tiere der Kontrollgruppe, welche nur der längeren Myokardischämie unterzogen wurden. Hierbei sank der prozentuale Anteil des Infarktes am Risikogebiet, d.h. des Ischämie unterzogenen Areals, von durchschnittlich 29,4 % auf 7,3 % [28]. Dieses Phänomen wurde als ischämische Präkonditionierung (IPC) bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass die IPC, neben einer Reduktion der Infarktausdehnung auch zu einer Verringerung des postischämischen zellulären Schadens führt, sowohl auf funktioneller als auch auf struktureller Ebene [29].

Mittlerweile wurden die kardioprotektiven Effekte der IPC bei vielen anderen Spezies beschrieben und bestätigt [29-31]. Untersuchungen von Yellon et al. wiesen bereits im Jahr 1993 darauf hin, dass eine ischämische Präkonditionierung und Kardioprotektion im menschlichen Myokard in der koronaren Bypasschirurgie messbar ist [30]. Auch in einer Arbeit von Abete et al. konnte ein signifikanter Rückgang in den Surrogatparametern Tod, Herzinsuffizienz und Schock bei den Patienten mit Myokardinfarkt beobachtet werden, die eine prodromale *Angina pectoris*-Symptomatik

in den letzten 48 Stunden vor dem Infarktereignis aufwiesen [32]. Seither haben sich viele Arbeiten mit dem Einfluss einer *Angina pectoris* als mögliche Präkonditionierung vor einem Myokardinfarkt beschäftigt [33] und es scheinen verschiedene Faktoren für das klinische Outcome nach Infarktereignis eine Rolle zu spielen. So könnten vorangegangene *Angina pectoris*-Episoden für die Bildung von kollateralen Koronargefäßen wichtig sein [34] und so eine besser erhaltene linksventrikuläre Auswurffraktion nach Infarkt bedingen [35]. Muller et al. stellten 1990 fest, dass Patienten mit vorangegangen *Angina pectoris*-Beschwerden bei einem Myokardinfarktereignis weniger Re-Verschlüsse nach Thrombolyse und eine geringe Reduzierung der Mortalität aufweisen [36]. Ob die reduzierte Mortalität allerdings durch die gesteigerte Bildung von Kollateralgefäßen hervorgerufen wird, wird kontrovers diskutiert [37, 38]. So kommen auch andere Gründe wie die antianginöse Medikation oder Unterschiede im angeborenen Fibrinolysesystem für die verbesserte Myokardfunktion in Frage [36]. Denkbar ist eben auch eine präkonditionierende Wirkung der vorangehenden *Angina pectoris*-Symptomatik [36] im Sinne einer ischämischen Präkonditionierung, wie es auch von anderen Autoren gesehen wird [34, 39, 40]. Letztendlich ist nicht geklärt, welche der genannten Faktoren zu welchem Ausmaß zur Funktionsverbesserung des linken Ventrikels nach Myokardinfarkt beitragen.

Neben einem ischämischen Stimulus ist es ebenfalls möglich, die Signaltransduktion der Kardioprotektion durch Pharmaka zu aktivieren. Eine pharmakologische Präkonditionierung ist unter anderem für volatile Anästhetika wie Isofluran [31], Sevofluran [41] und Desfluran [42], aber auch für Xenon [43] und Helium [44, 45] beschrieben worden. Dazu kommen verschiedene Pharmaka, die einzelne Komponenten einer potentiell kardioprotektiven Signalkaskade aktivieren und dadurch eine Infarktgrößenreduktion auslösen können [46]. Die genauen Signalwege, welche einer Kardioprotektion durch Präkonditionierung zu Grunde liegen, sind allerdings bisher nicht vollständig verstanden. Der Hauptmechanismus für den Zelltod nach Ischämie mit Reperfusion scheint die Öffnung der bereits beschriebenen mPTP zu sein [47]. Eine Regulation der mitochondrialen Funktion scheint zu einer verzögerten Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore (mPTP) zu führen und dadurch die Entstehung eines Zellunterganges zu verzögern [47]. Dies bestätigt auch die Erkenntnis, dass

Cyclosporin A kardioprotektiv wirkt [48], indem es die Öffnung der mPTP verhindert [49].

Aufgrund dieser scheinbaren Schlüsselposition und Bedeutung der mPTP im Rahmen von IR-Ereignissen und Kardioprotektion wird diese mitochondriale Pore näher beschrieben.

1.4 Mitochondriale Permeabilitätspore

Die innere Mitochondrienmembran enthält unter anderem die Komplexe der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung, sowie verschiedene Transportsysteme [50]. Unter physiologischen Bedingungen ist die innere Mitochondrienmembran außer für ausgewählte Metaboliten und Ionen undurchlässig [23]. Dadurch kann das mitochondriale Membranpotenzial, welches überwiegend durch einen H^+-Gradienten bedingt wird und die treibende Kraft der ATP-Synthese darstellt, aufrechterhalten werden. Eine Veränderung der Membrandurchlässigkeit hätte erhebliche Folgen für die zelluläre Homöostase, da die Energiebereitstellung für essenzielle zelluläre Prozesse zusammenbrechen würde. Die mPTP stellt eine unspezifische Membranpore dar, deren Öffnung die Barriere für Protonen löst, die oxidative Phosphorylierung entkoppelt [25] und die Rolle der Mitochondrien sich somit von der ATP-Bereitstellung zum Vermittler des Zelltodes verändert [51].

Der genaue molekulare Aufbau der mPTP ist trotz intensiver Forschung nicht vollständig gesichert. Es wurden verschiedene Proteine postuliert, die eine entscheidende Komponente der mPTP sein könnten oder deren Regulation beeinflussen. Zunächst schien eine mögliche Komponente die Adenin-Nukleotid-Translokase (ADP/ATP-Translokase, ANT) zu sein, bis die Daten von Kokoszka et al. für die ANT nur einen modulierenden Einfluss auf die Öffnung der mPTP zeigen konnten [52]. Auch der spannungsabhängige Anionenkanal (VDAC) wurde als Komponente an der äußeren Mitochondrienmembran beschrieben [53], unter der Vorstellung der Interaktion mit der ANT an der inneren Mitochondrienmembran [54]. Baines et al. zeigten jedoch, dass auch in VDAC-defizienten Mäusen eine unveränderte mPTP-Öffnung möglich ist [55]. Somit scheint auch VDAC keine essenzielle Kompenente der mPTP zu sein. Dies wurde mittlerweile auch für den mitochondrialen Phosphat-Transporter (PiC) gezeigt,

der auch lediglich einen modulierenden Einfluss auf die mPTP besitzt [56]. Im Gegensatz dazu ist Cyclophilin-D in den Mitochondrien eine wichtige regulatorische Komponente der mPTP [57, 58] und neueste Erkenntnisse zeigen, dass die c-Untereinheit der F_0-ATP-Synthase zum einen die entscheidende Poren-Komponente der mPTP bildet [59], als auch für die Ca^{2+}-induzierte mPTP-Öffnung erforderlich ist [60]. Diese molekulare Identität muss jedoch noch in weiteren Studien untersucht und bestätigt werden.

Eine Öffnung der mPTP wird durch zelluläre Bedingungen getriggert, welche insbesondere in der frühen Reperfusionsphase nach einer myokardialen Ischämie vorkommen. Hierzu zählen eine mitochondriale Ca^{2+}-Überladung [61], oxidativer Stress [21], ATP-Mangel [61], erhöhte Phosphat-Konzentration [21] und ansteigender pH-Wert [20]. Bei einer Öffnung der mPTP können kleine gelöste Moleküle ungehindert die innere Membran überwinden und die Zelle kann den ATP-Spiegel nicht aufrecht erhalten [25]. Letztendlich bestimmen das Ausmaß und die Dauer der mPTP-Öffnung die zellulären Folgen [23, 24]. Bei einer kurzen mPTP-Öffnung ist es möglich, dass sich die Zelle erholt und der entstandene Schaden reversibel ist [23]. Demgegenüber führen länger andauernde oder ausgeprägte mPTP-Öffnungen zu einem nekrotischen oder apoptotischen Zelluntergang. So kann es bei einer mPTP-Öffnung zu einem osmotischen Gradienten über der Mitochondrienmembran mit einer daraus resultierenden Schwellung der Mitochondrien kommen [23]. Die Entfaltung der Christae der inneren Membran erlaubt den Mitochondrien sich zu vergrößern ohne einzureißen. Die äußere Membran jedoch kann auf Grund der Schwellung leicht zerreißen und proapoptotische Faktoren wie Cytochrom C werden aus dem Intermembranraum freigesetzt [23]. Caspasen werden aktiviert und es findet eine proteolytische Spaltung wichtiger Proteine statt, die unter anderem für das Zytoskelett, die Plasmamembran und den Zellkern verantwortlich sind [23, 62, 63]. Sollte sich nun die mPTP ausreichend zur Cytochom C-Freisetzung öffnen, aber darauf erneut wieder schließen, so dass die ATP-Bereitstellung wieder hergestellt werden kann, geht die Zelle in die Apoptose [23], da diese im Gegensatz zur Nekrose ATP benötigt [62, 63]. Bleibt die mPTP-Öffnung hingegen bestehen und die ATP-Bereitstellung ist nicht ausreichend, geht die Zelle nekrotisch unter [23]. Im Rahmen eines Myokardinfarktes kommt es sowohl zu nekrotischem als auch apoptotischem Zelluntergang, wobei im

Zentrum des Infarktes Zellen eher nekrotisch untergehen, wohingegen im Randgebiet des Infarktes dem apoptotischen Zelluntergang eine größere Bedeutung zukommt [23].

Die mPTP übernimmt eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Funktion und dadurch im Zellzyklus. Im Folgenden soll erläutert werden, welche Bedeutung diese Pore in der Signalkaskade der Präkonditionierung einnehmen kann.

1.5 Signalkaskade mK_{Ca}-Kanal und Proteinkinase A

Es konnte gezeigt werden, dass eine Regulation der mitochondrialen Funktion durch eine Aktivierung von Kaliumkanälen in der inneren Mitochondrienmembran einen Zellschaden vermindern kann und eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion der Präkonditionierung einnimmt [64-66]. Vor allem ATP-abhängige Kaliumkanäle (mK_{ATP}) werden als wichtige Vermittler beim Schutz gegen Apoptose und Nekrose nach Ischämie beschrieben [67, 68]. Eine Öffnung von Kaliumkanälen führt zu einem erhöhten Einstrom von Kalium in die Mitochondrienmatrix mit der Folge einer Beeinflussung des mitochondrialen Matrixvolumens sowie der Atmungskettenaktivität, worin entscheidende Schritte in der Signalkaskade der Präkonditionierung gesehen werden [22]. Neben diesen ATP-abhängigen Kanälen wiesen Xu et al. erstmals eine weitere Klasse kardialer, mitochondrialer Kaliumkanäle nach, die kalziumabhängigen Kaliumkanäle (mK_{Ca}) [69]. Die Autoren demonstrierten die kardioprotektive Potenz der mK_{Ca}-Kanäle durch Verwendung des K_{Ca}-Kanalaktivators NS1619, welcher eine Infarktgrößenreduktion initiierte [69].

Eine pharmakologische Öffnung der mPTP mit Atractylosid hebt eine Kardioprotektion durch NS1619-induzierte mK_{Ca}-Kanalöffnung auf [65]. Dies deutet auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen der Öffnung mitochondrialer Kaliumkanäle und der mPTP hin. Cyclosporin A blockiert die mPTP-Öffnung und wirkt dadurch kardioprotektiv [70]. Cao et al. konnten in diesem Kontext zeigen, dass eine Vorbehandlung mit Paxillin, einem K_{Ca}-Kanal-Blocker, die kardioprotektive Wirkung von Cyclosporin A nicht aufhebt [65]. Dies deutet daraufhin, dass der mK_{Ca}-Kanal proximal der mPTP in der Signalkaskade liegen muss [65]. Bisher ist nur unvollständig verstanden, über welche Mechanismen eine mK_{Ca}-Kanalöffnung zu einer reduzierten mPTP-Öffnung und somit zu einem reduzierten Zelluntergang führt. Heinen et al.

zeigten in isolierten Mitochondrien, dass eine Öffnung von mK_{Ca}-Kanälen über eine Steigerung des mitochondrialen O_2-Verbrauchs zu einer gesteigerten mitochondrialen ROS-Freisetzung führt, worin ein Triggersignal protektiver Signalschritte gesehen wird [71]. Es wird angenommen, dass über dieses mitochondriale ROS-Triggersignal eine Signalkaskade angestoßen wird, welche letztendlich zu einer reduzierten zellulären Ca^{2+}-Überladung und einer Reduktion der massivem ROS-Freisetzung während der späten Ischämie- und frühen Reperfusionsphase führt [71]. Über diesen Mechanismus würde eine mK_{Ca}-Kanalaktivierung, welche im Rahmen von Konditionierungsinterventionen initiiert wurde, zu einer reduzierten Öffnung der mPTP und somit zu einer Reduktion des Infarktschadens führen [71]. Denn sowohl die Regulation des mitochondrialen Ca^{2+}-Gehaltes, als auch das Ausmaß der ROS-Produktion sorgen dafür, dass die mPTP geschlossen bleibt und beide Parameter scheinen durch den mK_{Ca}-Kanal beeinflussbar [72].

Allerdings sind die genauen Mechanismen, über welchen mK_{Ca}-Kanäle im Rahmen von Präkonditionierungsinterventionen aktiviert werden, ebenfalls nicht vollständig geklärt. Es existieren Ergebnisse, die zeigen, dass eine gesteigerte mK_{Ca}-Kanalöffnung durch eine pharmakologische Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) initiiert werden kann, was auf eine potentielle Bedeutung der PKA als proximaler Aktivator des mK_{Ca}-Kanals hindeutet [66, 73].

Die PKA ist vor allem an der Regulation des Energiestoffwechsels, aber auch an der Kontrolle von Ionenkanälen, intrazellulärer Transporte oder der Immunantwort beteiligt [74], also an einer Vielzahl unterschiedlichster zellulärer Prozesse. Erstmals wurde sie von Walsh et. al. 1968 aufgereinigt und als ein wichtiger Regulator identifiziert [75]. Die PKA ist ein Zielprotein des *second messengers* cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) [74]. Dieser *second messenger* wird durch die Adenylatcyclase (AC) gebildet, welche wiederum durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren reguliert wird [76].

Es gibt Hinweise, dass der PKA eine kardioprotektive Bedeutung zukommt. So wies z.B. die Arbeitsgruppe um Sanada kardioprotektive Effekte eines Phosphodiesterase III (PDE-III)-Hemmers und eines cAMP-Analogons, d.h. allesamt Substanzen, welche die PKA zu aktivieren vermögen, nach [77]. Des Weiteren beschreibt Lochner et. al., dass eine ischämische Präkonditionierung zu einem Anstieg des zellulären cAMP-Spiegels

führt, was auf eine Bedeutung der PKA im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung hindeuten könnte [78]. Dies bestätigen auch Tong et al., indem sie einen kardioprotektiven Effekt durch Aktivierung G-Protein-gekoppelter β-Adrenorezeptoren feststellen, der bei einer Blockade der PKA ausbleibt [79].

Der molekulare Aufbau mitochondrialer K_{Ca}-Kanäle wurde zuletzt zunehmend aufgeklärt. K_{Ca}-Kanäle bestehen aus vier alpha-Untereinheiten, die die Kanalpore bilden und durch das Kcnma1-Gen codiert werden [80]. Dieses weist 27 Exons auf, die durch alternatives Splicen Funktion und Verteilung beeinflussen [80]. Weitere beta-Untereinheiten nehmen eine regulatorische Funktion ein und sind gewebespezifisch [72, 81-84]. Diese besitzen jeweils mögliche Phosphorylierungsstellen für die PKA [83]. Singh et al. konnten zeigen, dass K_{Ca}-Kanäle der Kardiomyozyten eine Splice-Variante am C-Terminus aufweisen und damit eine Lokalisierung an den Mitochondrien verknüpft ist [81]. Zudem sind zusätzliche Proteine identifiziert worden, die als gamma-Untereinheiten bezeichnet werden und ebenfalls die Funktion des Kanals beeinflussen [80, 85]. Es konnten bisher keine K_{Ca}-Kanäle am Sarkolemm der Kardiomyoyzten nachgewiesen werden, sondern ausschließlich mitochondriale K_{Ca}-Kanäle [80, 81].

Einen funktionellen Zusammenhang von mK_{Ca} und PKA zeigen die Daten, die Sato et al. vortragen [66]. Die mK_{Ca}-Aktivität wurde anhand einer Flavoprotein-Oxidation gemessen, die durch NS1619 initiiert wurde. Diese Oxidation konnte in gleichem Maße sowohl durch das zellpermeable cAMP-Analogon 8Br-cAMP, als auch durch den PKA-Aktivator Forskolin gesteigert werden [66]. In ähnlicher Weise zeigt sich ebenfalls der funktionelle Zusammenhang darin, dass ein kardioprotektiver Effekt durch Adrenomedullin (ADM) via cAMP als *second messenger* durch Paxillin (K_{Ca}-Kanal-Blocker) und KT5720 (PKA-Inhibitor) aufgehoben wird [73].

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass eine Präkonditionierung über die PKA zu einer Öffnung von mK_{Ca}-Kanälen führt (s. Abb. 1). Diese mK_{Ca}-Kanalöffnung bedingt über eine Regulation der mitochondrialen Funktion eine reduzierte Öffnung der mPTP und somit eine Reduktion des myokardialen Zellschadens. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass dieser Signalweg einem alterungsbedingten Wirkverlust unterlegen ist, der im nächsten Abschnitt genauer erläutert wird.

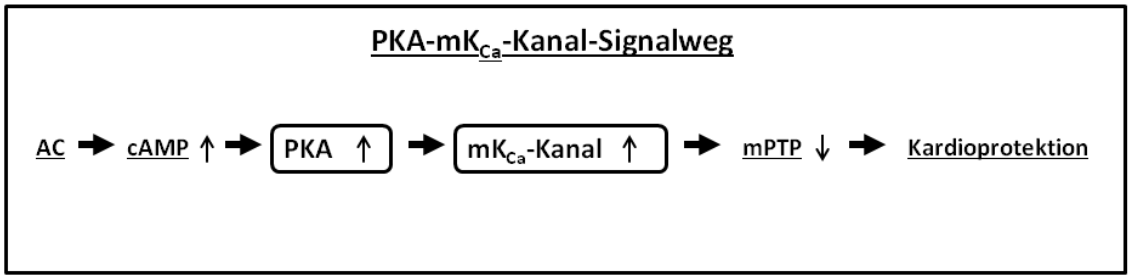

Abb. 1: PKA-mK$_{Ca}$-Kanal-Signalweg

Dargestellt ist der mögliche Signaltransduktionsweg einer Kardioprotektion. AC=Adenylatcyclase, cAMP=cyclisches Adenosinmonophosphat, PKA=Proteinkinase A, mK$_{Ca}$-Kanal=mitochondrialer Kalzium-abhängiger Kaliumkanal, mPTP=mitochondriale Permeabilitätspore

Adenylatcyclase (AC) erzeugt cAMP aus ATP. cAMP aktiviert die PKA. PKA-Aktivierung führt zu einer vermehrten Öffnung von mK$_{Ca}$-Kanälen, die wiederum die Öffnungswahrscheinlichkeit von mPTP verringern, wodurch letztendlich eine Kardioprotektion ausgelöst wird.

1.6 Alterungsbedingter Wirkverlust kardioprotektiver Interventionen

Vor dem Hintergrund der demographischen Entwicklung kommt der Behandlung von Patienten, die immer älter werden, ein Reihe von Komorbiditäten und somit auch ein erhöhtes Risiko für ischämische Ereignisse aufweisen, eine immer größere Bedeutung zu. Dabei ist nicht nur die Prävalenz, sondern auch die Mortalität ischämischer kardiovaskulärer Erkrankungen im steigenden Alter erhöht [86]. Ein Grund könnte darin liegen, dass der protektive Effekt einer Präkonditionierung im alten Herzen reduziert ist [86-88] und somit die Widerstandskraft des Herzens auf schädigende Ereignisse wie Ischämie und Reperfusion erniedrigt ist [87]. Kardiomyozyten und auch der Mechanismus der Präkonditionierung sind neben den Altersveränderungen mutmaßlich verschiedenen Einflussfaktoren ausgesetzt. Darunter fallen unter anderem das Geschlecht [89], Komorbidität, wie beispielsweise Diabetes mellitus [66, 90], oder auch eingenommene Medikamente [91], die einen Einfluss auf kardiomyozytäre Funktionen oder Signalwege haben könnten.

Gealterte Kardiomyozyten besitzen eine erniedrigte Toleranz gegenüber Ischämie- [92] und Reperfusionschäden [93]. Zudem ist das Ausmaß des protektiven Effektes einer

ischämischen Präkonditionierung im höheren Lebensalter reduziert bzw. aufgehoben [94]. Somit besitzen ältere Patienten, die eigentlich den größten Nutzen einer Kardioprotektion hätten, geringere Möglichkeiten eines endogenen Schutzes. Nicht nur im Tiermodell [92, 95], sondern auch im Rahmen klinischer Studien [96] konnte dieser Wirkverlust kardioprotektiver Maßnahmen festgestellt werden. Lee et al. zeigten im Rahmen der koronaren Angiographie, dass bei Patienten, die älter als 65 Jahre waren, im Gegensatz zu Patienten unter 55 Jahren, die kardioprotektive Wirkung ischämischer Präkonditionierung aufgehoben ist [96]. Als Surrogatendpunkte dienten ST-Hebungen im EKG und Laktat-Messungen. Lediglich eine Steigerung des präkonditionierenden Reizes zeigte hier eine mögliche Kardioprotektion und deutet darauf hin, dass möglicherweise die Reizschwelle zur Auslösung einer Protektion im älteren Herzen erhöht ist [96]. Im Laufe der Zeit konnte bei verschiedenen klinischen Studien dieser Wirkverlust der Präkonditionierung beobachtet werden. Sei es im Rahmen koronarer Bypass-Operationen [97] oder auch bei der Feststellung, dass eine prodromale *Angina pectoris* im Alter nicht in dem Maße protektiv wirkt, wie es bei jüngeren Patienten messbar ist [32].

Obwohl der altersbedingte Verlust der protektiven Potenz kardioprotektiver Interventionen vielfach beschrieben ist, sind die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen nicht vollkommen aufgeklärt. Eine mögliche Ursache des alterungsabhängigen Wirkverlustes einer Kardioprotektion könnte im mK_{Ca}-Kanal sowie im vorgeschalteten Signalweg zu sehen sein. So konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass eine Präkonditionierung mittels Helium in jungen Ratten (2-4 Monate) zu einer mK_{Ca}-Kanal-vermittelten Infarktgrößenreduktion führte, wohingegen bei alten Ratten (20-24 Monate) keine protektive Wirkung nachweisbar war [45]. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Helium in den jungen Tieren eine geringgradige Entkopplung des mitochondrialen O_2-Verbrauches und oxidativer Phosphorylierung induziert, in alten Tieren aber keinen Effekt auf die mitochondriale Funktion hat [45]. Hieraus zogen wir den Schluss, dass der alterungsbedingte Wirkverlust durch Veränderungen in der Aktivierung des mK_{Ca}-Kanals oder dessen proximalem Signalweg begründet sein könnte. Ein möglicher proximaler Aktivator des mK_{Ca}-Kanals ist die PKA [66, 73]. Im Jahr 2012 zeigten Huhn et. al., dass die PKA im Rahmen der Signaltransduktionskaskade der Helium-induzierten Präkonditionierung von zentraler Bedeutung ist [98]. So ließ sich die Helium-induzierte und auch die

Forskolin-induzierte Infarktgrößenreduktion durch eine PKA-Inhibition mit dem Pharmakon H-89 vollständig aufheben [98]. Zusammen mit den Daten von Sato et. al., dass eine NS1619-induzierte mK_{Ca}-Kanal-Aktivität durch Forskolin (indirekter PKA-Aktivator) noch weiter gesteigert werden kann [66], lässt dies auf einen möglichen Zusammenhang von PKA und mK_{Ca}-Kanal schließen. In der Arbeit von Huhn et. al. hatte interessanterweise Forskolin im Gegensatz zu jungen Tieren in alten Tieren keinen Einfluss auf die Infarktgröße [98]. Des Weiteren steigerte Forskolin in jungen und alten Tieren den cAMP-Spiegel zwar gleichermaßen, im Gegensatz zu den jungen Tieren war in den alten Tieren jedoch keine begleitende Steigerung der PKA-Aktivität nachweisbar [98]. NS1619, als mK_{Ca}-Kanal-Agonist, konnte hingegen bei den jungen und alten Tieren einen kardioprotektiven Effekt auslösen [98].

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Ursache des Wirkverlustes einer Präkonditionierung in einer alterungsbedingten Veränderung der PKA-Regulation zu sehen sein könnte. Diese Annahme wird dadurch untermauert, dass eine direkte Aktivierung des mK_{Ca}-Kanals mittels NS1619, welcher im möglichen Signalweg der PKA nachgeschaltet ist, in jungen wie in alten Versuchstieren eine äquivalente Infarktgrößenreduktion auslöst [98].

Die bisherigen Erkenntnisse können folgendermaßen zusammengefasst werden:

- Die Präkonditionierung ist einem altersabhängigen Wirkverlust unterlegen, der möglicherweise in dem Signalweg der mK_{Ca}-Kanal-Aktivierung zu finden ist [45].
- Der protektive Effekt einer Präkonditionierung wird vermutlich über eine PKA-regulierte mK_{Ca}-Kanalaktivierung vermittelt [42, 66, 98].
- Eine Aktivierung der PKA mit Forskolin zeigt einen altersabhängigen Wirkverlust der Kardioprotektion [98].
- Eine direkte pharmakologische mK_{Ca}-Kanalaktivierung mit NS1619 führt bei jungen wie bei alten Versuchstieren zu einer ähnlichen, signifikanten Infarktgrößenreduktion [98].

1.7 Ziele der Arbeit

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die folgenden Fragen zu beantworten:

(1) Unterliegen die protektiven Effekte von Forskolin und NS1619 einer Dosisabhängigkeit?

(2) Wird der kardioprotektive Effekt einer PKA-Aktivierung über eine mK_{Ca}-Kanalöffnung vermittelt?

(3) Unterliegt die Regulation der PKA alterungsbedingten Veränderungen und ist damit ein Wirkverlust kardioprotektiver Effekte im steigenden Alter zu erklären?

(4) Im Verlauf der Untersuchung hat sich die weitergehende Fragestellung ergeben, ob ein alterungsbedingter Wirkverlust durch den Einfluss von Connexin43 im PKA-mK_{Ca}-Kanal-Signalweg zu erklären wäre?

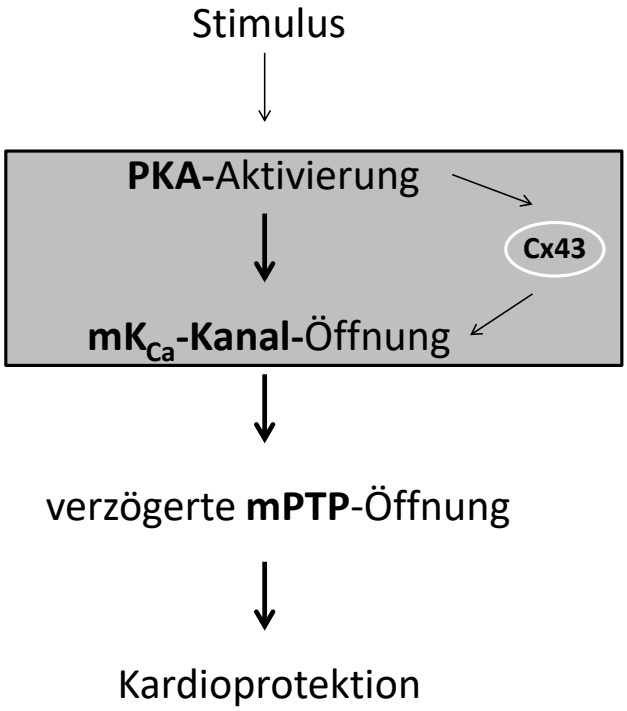

Abb. 2: Möglicher Signaltransduktionsweg der Kardioprotektion

Der grau hinterlegte Abschnitt soll den Bereich andeuten, der möglicherweise für den altersabhängigen Wirkverlust kardioprotektiver Maßnahmen verantwortlich sein kann. PKA=Proteinkinase A, mK$_{Ca}$-Kanal=mitochondrialer kalziumabhängiger Kaliumkanal, Cx43=Connexin43, mPTP=mitochondriale Permeabilitätspore

Diese Fragen sollten mit Hilfe einer *in vivo* Studie am Rattenherz untersucht werden. Zunächst sollte eine Dosisfindungsstudie zur Ermittlung der niedrigsten protektiven Dosis von Forskolin und NS1619 durchgeführt werden. Eine Blockade des mK$_{Ca}$-Kanals durch Iberiotoxin sollte aufklären, ob der kardioprotektive Effekt einer PKA-Aktivierung über den mK$_{Ca}$-Kanal vermittelt wird. Mit Hilfe der ermittelten Dosen sollte die Kardioprotektion im alten Herzen *in vivo* untersucht werden und ein altersbedingter Wirkverlust innerhalb des Signalweges durch proteinbiochemische Analysen genauer aufgeschlüsselt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Merck Eurolab GmbH, (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Abcam plc. (Cambridge, Vereinigtes Königreich), Carl Roth GmbH/Co.KG (Karlsruhe) und der Apotheke des Universitätsklinikums Düsseldorf erworben, wenn es nicht anders angegeben wurde.

Pentobarbital (16 g/100 ml; Merial GmbH, Hallbergmoos)

NS1619 (Abcam plc., Cambridge, Vereinigtes Königreich)

Forskolin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

Iberiotoxin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

Das verwendete cAMP-ELISA-Kit stammte von der Firma Enzo Life Science (Lörrach, ADI-900-067).

2.1.2 Lösungen

- Färbelösung Evansblue

  1 g Evansblue + 5 g Dextran + NaCl 0,9 % ad 500 ml Aqua dest.

- TTC-Färbelösung

  200 ml NaCl 0,9 % + 2,42 g Trishydroxymethylaminomethan (Tris-Puffer) + 1,5 g Triphenyltetrazoliumhydroclorid (TTC)

- Lysepuffer für Ganzzellextraktion

  10 mM Sigma 7-9 pH 8 + 1 mM Na-EDTA + 400 mM NaCl + 10 % Glycerol + 0,5 % NP40

40 µl/ml Complete, 1 mM Na-Orthovanadat und 1 mM DTT werden vor Gebrauch frisch zugegeben

- Lowry-Lösung

  Reagenz A (100 Teile): 10 g Na_2CO_3 in 500 ml 0,1 mol NaOH

  Reagenz B (1 Teil): 2 g Kalium-Natrium-Tartrat ad 100 ml Aqua dest.

  Reagenz C (1 Teil): 1 g $CuSO_4$ x 5 H_2O ad 100 ml Aqua dest.

- Folin-Lösung

  1:1 Folin-Phenolreagenz + Aqua dest.

- Trenngel für SDS-PAGE (10%)

  6,6 ml Polyacrylamid 30 % + 8,2 ml Aqua dest. + 5 ml 1,5 M Sigma 7-9 pH 8,8 + 200 µl SDS 10 % + 20 µl Temed + 100 µl APS 10 %

- Sammelgel für SDS-PAGE (6%)

  2,55 ml Polyacrylamid 30 % + 10,5 ml Aqua dest. + 1,5 ml 1,25 M Sigma 7-9 pH 6,8 + 150 µl SDS 10 % + 30 µl Temed + 150 µl APS 10 %

- Loading-Puffer

  7 ml Aqua dest. + 1 ml 500 mM Tris-HCl pH 6,8 + 2 ml Glycerol + 1 g SDS + 30 mg Bromphenolblau

- Running-Puffer (10x)

  30 g Sigma 7-9 + 144 g Glycin + 10 g SDS + 1000 ml Aqua dest.

- Transfer-Puffer (1x)

  1,453 g Sigma 7-9 + 7,206 g Glycin + 1000 ml Aqua dest.

- Coomassie-Färbelösung

  750 mg Coomassie Blue + 25 ml Eisessig + 112,5 ml Ethanol + 112,5 ml Aqua dest.

- TBS-T (pH 8)

  6 g Sigma 7-9 + 22,2 g NaCl + 2 ml Tween20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)

- 5 % bzw. 1 % Magermilchlösung (5% bzw. 1 % Blotto)

  50 g bzw. 10 g Magermilchpulver + 1000 ml TBS-T

- Mitochondrien Puffer (pH 7,4) modifiziert nach [99, 100]

  250 mM Sucrose + 10 mM HEPES + 1 mM EGTA + 5 mM Na-F +
  1 mM Na-orthovanadat (Na_3VO_4)

- Mitochondrien Lyse Puffer (pH 7,4) modifiziert nach [101]

  50 mM Tris-HCl + 150 mM NaCl + 1 mM EDTA-Na + 1 % (v/v) NP-40 +
  0,5 % (w/v) Na-deoxycholate + 0,1 % (w/v) SDS + 1 mM Na-orthovanadat (Na_3VO_4) + 5 mM Na-F

- Bromphenolblau / 3,3′,5,5′-Tetrabrom-phenolsulfonphthalein (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

- bovines Serumalbumin / BSA-Standardreihe für Lowry (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)

- Mercaptoethanol (Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm)

- 30 %-Percoll Lösung (GE Healthcare Life Science, Chalfont St. Giles, Buckhinghamshire/Großbritannien)

- Western Blotting Luminol Reagenz (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas/USA)

- Proteinmarker Page Ruler Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts/USA)

2.1.3 Antikörper

Folgende Antikörper wurden laut Angaben des Herstellers in einer 1 %igen Magermilchlösung (Blotto 1 %) bzw. 5 %igen BSA/TBS-T-Lösung verdünnt.

- Anti-phospho-Phospholamban (Ser16) rabbit polyklonal, Millipore
    - 1 : 5000 BSA 5 %/TBS-T

- Anti-Connexin 43 rabbit polykonal, Abcam
    - 1 : 8 000 Blotto 1 %

- Anti-Tim23 mouse monoklonal, BD Transduction
    - 1 : 5000 Blotto 1 %
- Anti-Na-K-ATPase mouse monoklonal, Abcam
    - 1 : 5 000 Blotto 1 %

- Anti-Actin rabbit polyklonal, Sigma
    - 1 : 10 000 Blotto 1 %

- Anti-rabbit IgG, Jackson/Dianova
    - 1 : 10 000 Blotto 1 %

- Anti-mouse IgG, Jackson/Dianova
    - 1 : 10 000 Blotto 1 %

2.2 Methoden

2.2.1 *In vivo* Versuche

Die durchgeführten Tierversuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz genehmigt und erfolgten in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und den geltenden Bestimmungen. Es wurden sowohl junge (2-4 Monate) als auch alte (22-24 Monate) männliche Wistar-Ratten aus der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben des Universitätsklinikums Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. M. Sager) verwendet (*in vivo* Versuche: Aktenzeichen 84-02.04.2011.A392; Herzentnahme zur Isolierung der Mitochondrien: Projektnummer O 37/10).

Die im Folgenden beschriebenen *in vivo* Versuche, darunter die Präparation und Durchführung des Infarktmodells, wurden von Mitarbeitern der Klinik für Anästhesiologie durchgeführt [102].

Präparation der Versuchstiere

Das verwendete *in vivo* Modell zur regionalen Myokardischämie ist in der Klinik für Anästhesiologie etabliert und wurde bereits mehrfach angewendet [45, 102-104]. Hierbei wurden die Versuchstiere mittels Pentobarbital narkotisiert (initial 100 mg/kg KG i.p. und kontinuierliche Infusion 40 mg/kg KG/h), orotracheal intubiert und im gesamten laufenden Versuch maschinell beatmet. Eine Lagerung der Versuchstiere auf einer Wärmeplatte sorgte für eine konstante Körpertemperatur von 38° Celsius.

Nach Präparation der *Arteria carotis* sowie der *Vena jugularis* wurden in beide Gefäße Katheter eingebracht. Über den *Arteria carotis*-Katheter wurde der arterielle Blutdruck gemessen, der *Vena jugularis*-Katheter diente der Medikamentenapplikation.

Mittels linkslateraler Thorakotomie im 4. Interkostalraum und anschließender Perikardiotomie, wurde die linke Koronararterie aufgesucht und eine Fadenschlinge mittels atraumatischer Nadel und 5-0 Prolene Naht um diese gelegt. Dies dient dazu, eine Koronarokklusion kontrolliert einzuleiten und zu steuern. Nach der chirurgischen Präparation unterliefen alle Tiere eine 20-minütige Stabilisierungsphase. Während des gesamten Versuchsablaufes wurden kontinuierlich Herzfrequenz und arterieller Blutdruck gemessen.

Myokardinfarktmodell

Zur Induktion des Myokardinfarktes wurde eine regionale Myokardischämie durch Zuziehen der gelegten Fadenschlinge initiiert, wobei eine epikardiale Zyanose sowie eine regionale Akinesie der Ventrikelwand als Zeichen einer suffizienten Ischämie gewertet wurden. Nach einer 25-minütigen Ischämiephase wurde die Fadenschlinge wieder geöffnet, wodurch eine 120-minütige Reperfusionsphase eingeleitet wurde. Eine erfolgreiche Reperfusion zeigte sich anhand einer reaktiven Hyperämie des zuvor zyanotischen Areals sowie einer wiedereinsetzenden Kontraktion.

Kardioprotektive Dosisfindung für Foskolin und NS1619

Zur Untersuchung, ob die kardioprotektiven Effekte von Forskolin bzw. NS1619 einer Dosisabhängigkeit unterliegen, wurden zwei Versuchsreihen an jungen Ratten durchgeführt (s. Abb. 3) [102].

Eine Kontrollgruppe und vier bzw. fünf Behandlungsgruppen mit aufsteigenden Dosierungen der jeweiligen Substanz wurden gebildet und randomisiert je sechs Tiere zugeteilt. Forskolin wurde in den Konzentrationen 10, 30, 100, 300 µg/kg als Bolus und NS1619 in den Konzentrationen 0,3, 1, 3, 10, 30 µg/kg/min, gelöst in NaCl 0,9 %, intravenös (i.v.) injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich NaCl 0,9 % i.v.. Diese Behandlungen wurden laut Versuchsprotokoll 10 Minuten vor der bereits oben beschriebenen Ischämie durchgeführt. Nach der geplanten Reperfusionsphase wurden die Herzen den narkotisierten Tieren für die weitere Analyse entnommen.

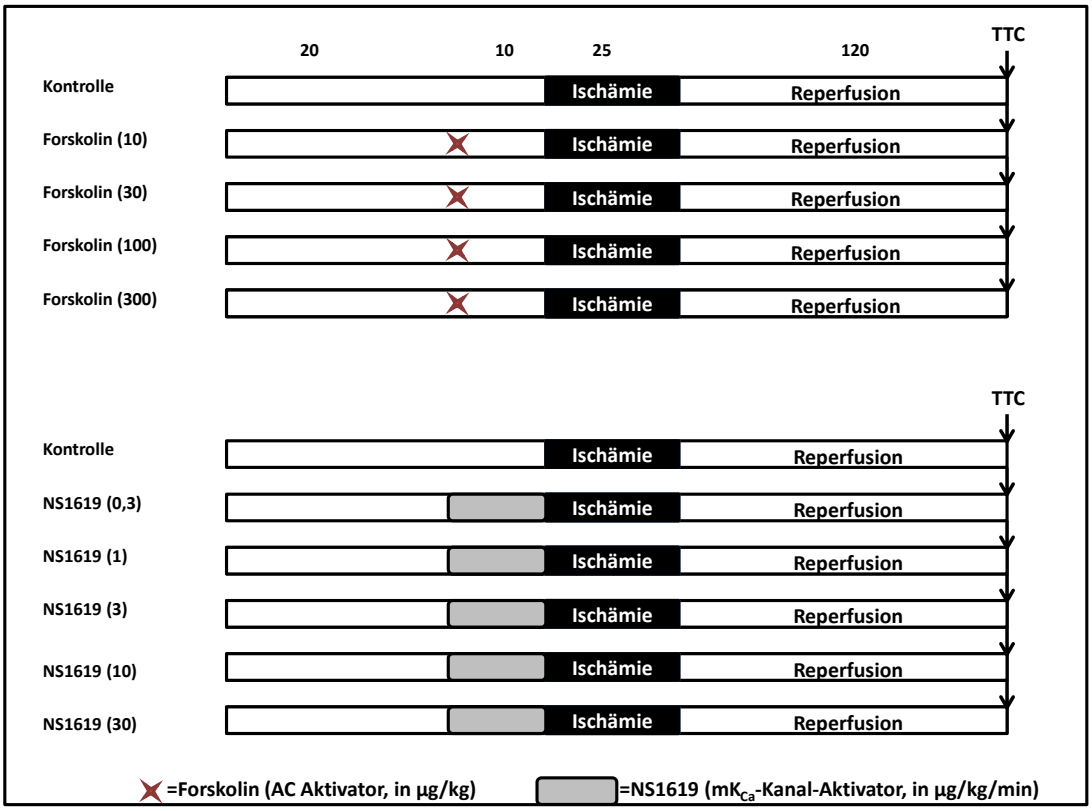

Abb. 3: Versuchsprotokoll zur Untersuchung der Dosisabhängigkeit von Forskolin und NS1619 in jungen Wistar-Ratten

Die Abbildung zeigt den Versuchsablauf für die Dosisfindung. Zeitangaben in Minuten. 20 Minuten Stabilisierungsphase, Präkonditonierung mit Forskolin (als Bolus 10 Minuten vor der Ischämie) und NS1619 (über 10 Minuten bis Beginn der Ischämie) mit den angegeben Konzentrationen in Klammern. Nach Abschluss der 120 Minuten Reperfusion wurden die Herzen entnommen und mit Evans-Blau und TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) gefärbt. Je Gruppe n=6 junge Tiere (2-4 Monate) [102]

Zusammenhang des mK_{Ca}-Kanals und der PKA-Aktivierung

Um einen funktionellen Zusammenhang in der Signaltransduktionskette zwischen PKA-Aktivierung durch Forskolin und einer mK_{Ca}-Kanalöffnung zu untersuchen, wurde eine weitere Versuchsreihe mit vier Gruppen und je sechs jungen Wistar-Ratten (2-4 Monate) durchgeführt (s. Abb. 4) [102]:

- Kontrollgruppe
- Forskolin-Behandlung (30µg/kg)
- Forskolin- (30µg/kg) und Iberiotoxin-Behandlung (6 µg/kg/min)
- Iberiotoxin-Behandlung (6 µg/kg/min)

Iberiotoxin blockiert den mitochondrialen kalziumabhängigen Kaliumkanal (mK_{Ca}-Kanal). Forskolin dient in diesem Zusammenhang der PKA-Aktivierung über eine Stimulation der Adenylatcyclase. Somit wird in dieser Zusammenstellung der Signaltransduktionsweg von der PKA-Aktivierung über den mK_{Ca}-Kanal zur Kardioprotektion untersucht.

Forskolin wurde in der Konzentration von 30 µg/kg infundiert, basierend auf der vorherigen Dosisfindung. Die verwendete Iberiotoxin Dosis (6µg/kg/min) wurde aus vorherigen Studien entnommen, die am gleichen Tiermodell im Forschungslabor der Klinik ermittelt wurden und in denen eine Aufhebung protektiver Effekte durch mK_{Ca}-Kanal Blockade gezeigt werden konnte [45]. Beide Substanzen wurden 10 Minuten vor der Ischämiephase gegeben. Nach der 25-minütigen Koronarokklusion folgte die 120-minütige Reperfusion. Zum Abschluss wurde das Herz entnommen und der TTC-Färbung zugeführt.

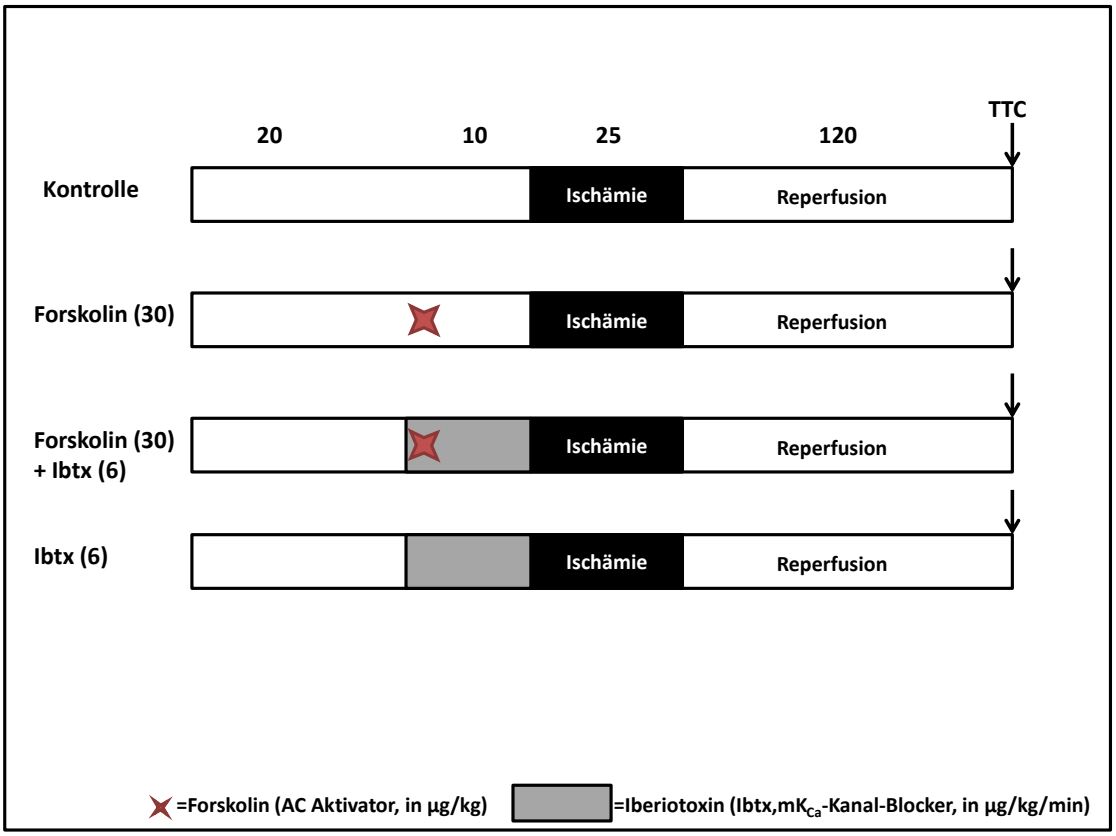

Abb. 4: Zusammenhang PKA-Aktivierung und mK$_{Ca}$-Kanal

Dargestellt ist der Versuchsaufbau mit Gruppeneinteilung und entsprechender Behandlung der Tiere, um einen funktionellen Zusammenhang von PKA-Aktivierung und mK$_{Ca}$-Kanal zu untersuchen. Zeitangaben in Minuten. 20 Minuten Stabilisierungsphase, es folgt 10 Minuten Behandlungsdauer mit Forskolin (30 µg/kg) und Iberiotoxin (6 µg/kg/min). Nach der 120-minütigen Reperfusionsphase Entnahme der Herzen und Färbung mit Evans-Blau und TTC. Je Gruppe n=6, junge Tiere (2-4 Monate) [102]

Untersuchung der Kardioprotektion des alten Herzens

Zur Untersuchung der Kardioprotektionsfähigkeit im alten Rattenherz diente die medikamentöse Präkonditionierung mit dem Adenylatcyclaseaktivator Forskolin und dem mK$_{Ca}$-Kanal-Aktivator NS1619. Je sechs Tiere wurden randomisiert den fünf Gruppen zugeteilt und im Folgenden die Infarktgrößen verglichen (s. Abb. 5) [102].

Für beide Substanzen wurden Konzentrationen gewählt, die in der Studie zur Dosisabhängigkeit in jungen Tieren eine kardioprotektive Wirkung erzielen konnten. Hier wurden die niedrigste protektive und die nächsthöhere Dosis gewählt. Forskolin wurde in den Konzentrationen 30 µg/kg und 100 µg/kg verabreicht. Für NS1619

wurden 10 µg/kg/min und 30 µg/kg/min gewählt. Eine 10-minütige Wirkdauer wurde abgewartet, bevor die Koronarokklusion über 25 Minuten gestartet wurde. Nach der 120-minütigen Reperfusion folgte die Herzentnahme zur Quantifizierung der Infarktgröße.

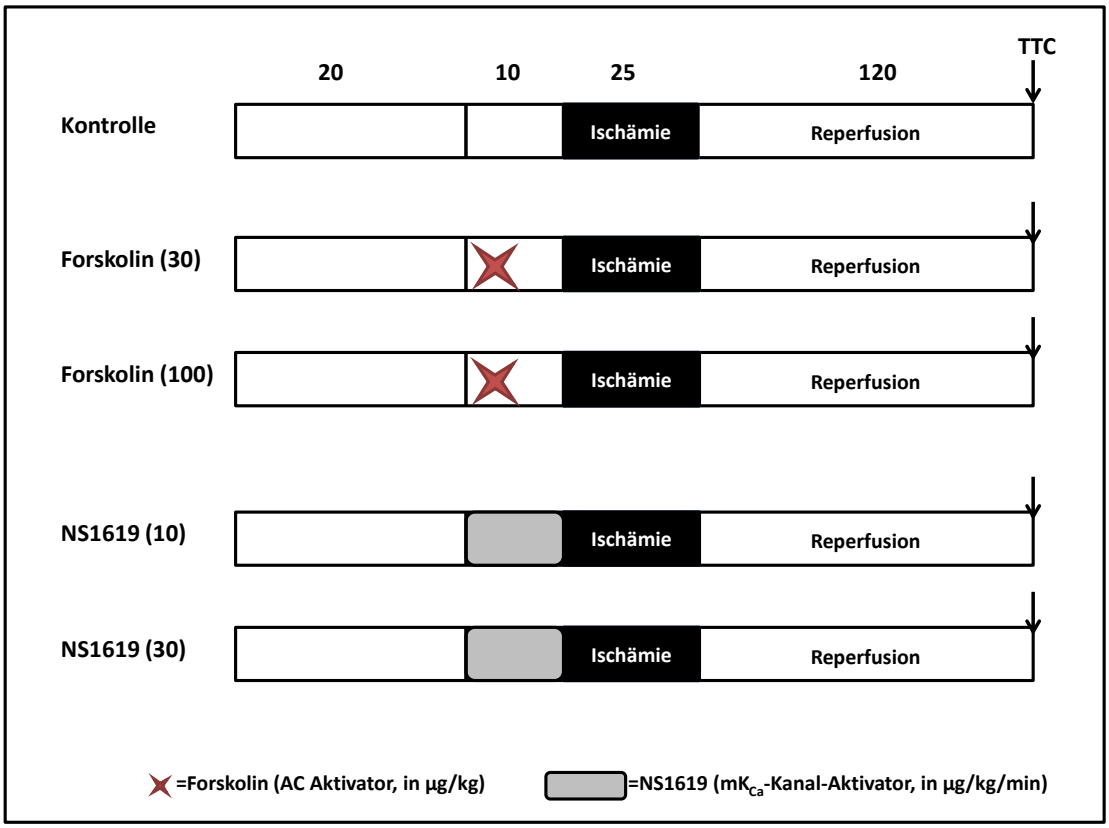

Abb. 5: Kardioprotektion im alten Herzen

Studienaufbau für die Untersuchung der Kardioprotektionsfähigkeit im alten Herzen. Zeitangaben sind in Minuten angegeben. 20 Minuten Stabilisierungsphase, Forskolin und NS1619 in den angegebenen Konzentrationen 10 Minuten vor Koronarokklusion verabreicht. 25 Minuten Ischämiephase, gefolgt von 120 Minuten Reperfusion und Herzentnahme zur Infarktgrößenbestimmung. Je Gruppe n=6, alte Tiere (22-24 Monate) [102]

Infarktgrößenbestimmung

Folgend auf die oben beschriebenen Versuchsprotokolle, wurden die Herzen in tiefer Narkose entnommen, um mithilfe der TTC-Färbetechnik die Infarktgrößen zu bestimmen [102].

Hierzu wurden die zügig entnommenen Herzen an einer modifizierten Langendorff-Apparatur an der Aortenwurzel aufgehängt. Mit Hilfe einer Knopfkanüle konnte so das Myokard retrograd perfundiert werden. Hierbei war sowohl darauf zu achten, dass dies ohne jeglichen Lufteinschluss geschah, als auch darauf, dass zunächst durch Spülung mit isotonischer Kochsalzlösung die Koronararterien blutleer waren. Denn nur so konnte eine Thrombenbildung verhindert und eine homogene Färbung gewährleistet werden.

Zur Identifizierung des zuvor ischämischen Gebietes (*area at risk*), wurde nach erneutem Verschluss der angelegten Fadenschlinge, das Herz mit 0,2 %iger Evans-Blau-Farbstofflösung für 10 Minuten perfundiert. Nach erneuter Spülung mit isotonischer Kochsalzlösung demaskierte sich das ischämisch-reperfundierte Gewebe als nun ungefärbtes Gebiet. Für die weiteren Arbeitsschritte wurde das Herz zunächst bei -80 °C tiefgefroren und in diesem Zustand in 1-2 mm dicke Scheiben quer zur Herzlängsachse geschnitten.

Zum Nachweis von vitalem Gewebe und zur Abgrenzung von nekrotisch veränderten Arealen, wurde die Farbreaktion des Redox-Farbstoffes 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) genutzt. TTC ist ein Protonenakzeptor und wird in vitalem Gewebe z.B. von Dehydrogenasen der Atmungskette zum lipophilen und lichtempfindlichen Formazan reduziert. Formazan erscheint rot und weist damit auf intaktes und stoffwechselaktives Gewebe hin. Nekrotische und damit stoffwechselinaktive Gebiete bleiben farblos.

Die zuvor geschnittenen Gewebescheiben wurden lichtgeschützt in 0,75 % TTC-Lösung bei 37 ° Celsius für 15 Minuten inkubiert und daraufhin in 4 % Formalin-Lösung über 24 Stunden bei Raumtemperatur fixiert.

Zur Auswertung diente eine computergestützte planimetrische Bestimmung mit der SigmaScan Pro 5® Software (SPSS Science Software, Chicago, IL). Dazu wurden die einzelnen Scheiben eingescannt und das Risiko- und Infarktgebiet ermittelt. Das

Infarktgebiet erscheint dabei wie erwähnt farblos, das übrige ischämische Risikogebiet ohne Infarzierung rot. Beide Areal ergeben die *area at risk* (= das Gebiet, das der Ischämie ausgesetzt war). Das restliche Myokard erscheint bläulich (s. Abb. 6). Die angegebenen Infarktgrößen berechnen sich als prozentualer Anteil des Infarktgebietes am Risikogebiet unter Einbeziehung des Trockengewichtes.

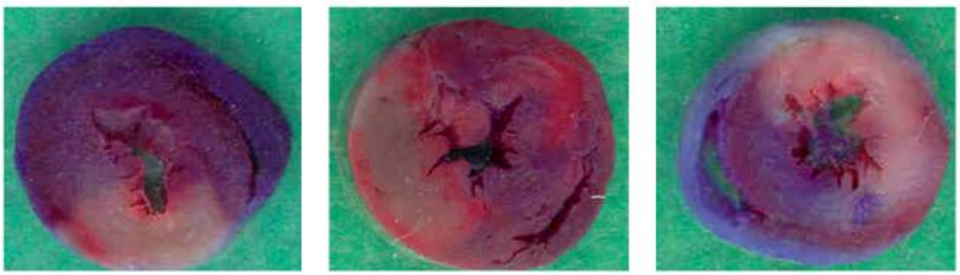

Abb. 6: Beispiel Infarktgrößenbestimmung durch TTC-Färbung

Foto zeigt beispielhaft die geschnittenen Gewebescheiben, die durch planimetrische Bestimmung mit Hilfe der SigmaScan Pro 5® Software (SPSS Science Software, Chicago, IL) ausgewertet wurden. Infarktgebiet bleibt farblos, übriges ischämisches Risikogebiet ohne Infarzierung (*area at risk* ohne Infarktgebiet) durch Formazan rot eingefärbt und übriges Myokard stellt sich blau dar [102].

2.2.2 Proteinbiochemische Analysen

Die proteinbiochemischen Analysen dienten der Bestimmung der PKA-Aktivität in jungen wie auch in alten Rattenherzen unmittelbar nach Stimulierung der Adenylatcyclase durch Forskolin (30 µg/kg). Es wurden vier Gruppen mit jeweils 8-9 Tieren gebildet [102].

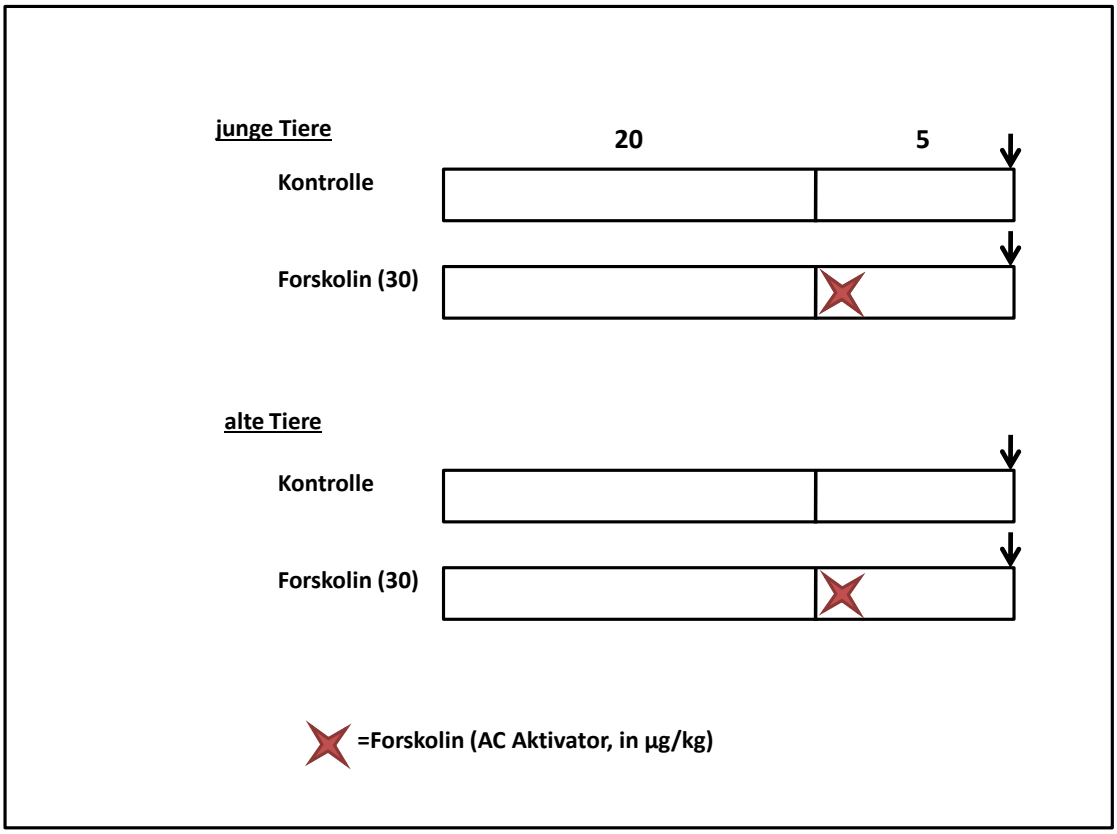

Abb. 7: Proteinbiochemische Analysen

Versuchsablauf der *in vivo* Versuche für die späteren proteinbiochemischen Untersuchungen (ELISA und Western Blot). Nach Narkoseeinleitung 20 Minuten Stabilisierungsphase. Behandlungsgruppe mit Forskolin-Gabe (30 µg/kg). Kontrollgruppe erhielt NaCl 0,9 % in äquivalenter Menge. Der Pfeil deutet die Herzentnahme zum Zeitpunkt 5 Minuten nach Applikation der Substanzen für die weitere proteinbiochemische Analyse an. Je Gruppe n=8-9, sowohl junge (2-4 Monate) als auch alte Tiere (22-24 Monate) [102]

Die narkotisierten und beatmeten Tiere erhielten in der Kontrollgruppe NaCl 0,9 % i.v. und die Behandlungsgruppen Forskolin 30 µg/kg i.v.. Eine 5-minütige Wirkdauer wurde abgewartet, bevor die Herzen in tiefer Narkose für die folgenden Analysen, wie

Western-Blot und ELISA, entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° Celsius bis zur weiteren Aufbereitung tiefgefroren wurden.

Probenaufbereitung

Zur weiteren Aufbereitung wurden etwa 100 mg der tiefgefrorenen Herzen abgewogen und für die weitere Verarbeitung mittels in flüssigem Stickstoff tiefgekühltem Metallplotter pulverisiert und mit 1 ml Lysepuffer homogenisiert.

Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis und einer 5-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 16060 g, wurde der proteinenthaltende Überstand abgetragen und bei -80°C aufbewahrt.

Proteinbestimmung nach Lowry

Da die Proben unterschiedliche Proteinkonzentrationen besitzen und diese für den Western-Blot angeglichen sein müssen, wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt [105].

Zunächst wurden die Proben schonend auf Eis aufgetaut und 1:100 verdünnt, d.h. 5 µl Probe wurden zu 495 µl destilliertem Wasser gegeben. Davon wurden 100 µl mit 500 µl Lowry-Reagenz vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die folgende Zugabe von 50 µl verdünnter Folin-Phenol-Lösung und guter Durchmischung zeigt sich bei 30-minütiger Inkubation unter Raumtemperatur ein Farbumschlag. Diese Farbe entsteht proportional zur Proteinmenge durch die Komplexbildung der Proteine mit der alkalischen Kupferlösung und der nachfolgenden Reduktion des Folin-Phenolreagenz. Mit Hilfe des Plate Readers Synergy 2 (Firma BioTek, Winooski, Vermont/USA) wurde die Extinktion bei 750 nm gemessen. Die Berechnung der gesuchten Proteinkonzentrationen geschah mit Hilfe einer gleichzeitig gemessenen standardisierten Probenreihe (0-200 µg/ml BSA/bovines Serumalbumin). Jede Probe wurde doppelt gemessen und danach mit Lysepuffer auf eine einheitliche Konzentration eingestellt.

cAMP-Spiegel Bestimmung mit ELISA

Als Maß für die Aktivierbarkeit der Proteinkinase A durch die Adenylatcyclase diente die quantitative Bestimmung des cAMP-Spiegels. cAMP gilt als second messenger, der die Proteinkinase A aktiviert. Die Bestimmung wurde mittels eines hoch sensitiven

Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) durchgeführt. Vorgefertigte cAMP-ELISA-Kits wurden nach Angaben des Herstellers Enzo Life Science® benutzt [102].

Der ELISA beruht auf der spezifischen Reaktion zwischen Antigen, hier cAMP, und Antikörper. Bei den verwendeten Kits war bereits der erste Antikörper gegen cAMP auf der 96 Well-Platte aufgetragen.

Zunächst wurde ein Waschpuffer aus 5 ml Konzentrat und 95 ml destilliertem Wasser hergestellt. Für die Standardreihe wurden fünf Reaktionsgefäße mit vorgefertigtem Probenpuffer vorbereitet. In das erste wurden 900 µl und in die restlichen 750 µl des Probenpuffers vorgelegt. Um eine absteigende Konzentration in der Standardreihe zu erreichen, wurden 100 µl cAMP-Konzentrat (2000 pmol/ml) in das erste Reaktionsgefäß mit 900 µl Probenpuffer gemischt. Ausgehend von diesem wurden nun absteigend jeweils 250 µl in das nächstfolgende Reaktionsgefäß verteilt. Somit entstand eine Standardreihe mit den absteigenden Konzentrationen: 200 pmol/ml, 50 pmol/ml, 12,5 pmol/ml, 3,13 pmol/ml, 0,78 pmol/ml und als Nullstandard der Probenpuffer.

Die im Vorhinein auf dieselben Proteinkonzentrationen eingestellten Proben wurden nun ebenfalls mit Probenpuffer 1:10 verdünnt. Je 100 µl der Standardreihe und der zu messenden Proben wurden in die Wellplatte pipettiert. Darauffolgend wurden in jedes Well außer dem Nullstandard 50 µl der gelb-gefärbten Lösung mit polyklonalen anti-cAMP Kaninchen Antikörpern gegeben. Diese Antikörper binden an den in fester Phase gebundenen Antikörper. Da es sich hier um einen kompetitiven Immunoassay handelt, pipettiert man zu dieser Mischung das konkurrierende Antigen. Hierbei handelt es sich um eine blau gefärbte Lösung, die cAMP enthält und mit der alkalischen Phosphatase konjugiert wurde. Die cAMP Moleküle aus der zu messenden Probe und die mit alkalischer Phosphatase konjugierten cAMP Moleküle konkurrieren nun um die Bindungsstelle am entsprechenden Antikörper.

Nach 2-stündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf dem Schüttler, wurde die Platte zunächst dreimal mit Waschpuffer gewaschen, bevor in jedes Well 200 µl farblose chromogene Lösung mit Nitrophosphat pipettiert wurden. Die alkalische Phosphatase ist in der Lage, den Phosphatrest abzuspalten, so dass ein gelber Farbumschlag einsetzt. Nach einer Stunde wurde die Reaktion mit 50 µl Trinatriumphosphatlösung gestoppt. Prinzip des kompetitiven Immunoassay ist, dass je geringer der Farbumschlag ist, desto höher die cAMP Konzentration in der Probe. Die

Extinktion wurde am Plate-Reader bei 405 nm gemessen. Probe und Standardreihe wurden jeweils als Doppelbestimmung gemessen.

Auswertung

Die Auswertung wurde mit Hilfe der mathematischen Funktion der Standardreihe ermittelt. Durch die bekannten Konzentrationen der Standardproben wurde eine Funktionsgleichung erstellt, mit deren Hilfe die gesuchten Konzentrationen in µg/ml aus der Extinktion errechnet wurden.

Western-Blot Analyse

Der Western-Blot diente der Bestimmung der relativen Expressionsveränderung von phosphoPhospholamban (pPLB) nach Stimulierung durch die Stimulierung mit dem Adenylatcyclaseaktivator Forskolin. Phospholamban wird durch eine aktivierte Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert [106] und pPLB dient daher als Marker für die Aktivität der PKA.

Zunächst erfolgte die Auftrennung des Proteingemisches mit Hilfe der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dazu wurden die Proteinproben, die die gleiche Konzentration aufwiesen, 1:2 verdünnt, mit einer Lösung aus *Loading-Buffer* und Mercaptoethanol (10:1). Durch 30-minütiges Erwärmen auf 37 °C werden Sekundär- und Tertiärstrukturen, wie Disulfidbrücken, aufgebrochen. Anionisches SDS (*Sodium-Dodecysulfat*) lagert sich den Proteinen an und bildet einen SDS-Protein-Komplex. Dies führt zu einer negativen Gesamtladung des SDS-Protein-Komplexes, die Eigenladung des Proteins wird dadurch vernachlässigbar. Dadurch ist es möglich, dass die allesamt negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe sich nur anhand ihrer relativen Molekülmasse unterschiedlich schnell durch die Gelmatrix bewegen und auftrennen lassen.

Es wurde ein 10 %iges Polyacrylamid-Trenngel mit einem 6 %igen Sammelgel beschichtet. In diesem eher großporigen Sammelgel mit pH 6,8 konzentrieren sich die Proteine anhand ihrer Größe bis zur Grenze zum Trenngel und ermöglichen so eine verbesserte Auflösung der entstehenden Banden, sie werden fokussiert. Im basischen Trenngel mit pH 8,8 sind die Poren kleiner und wirken als Sieb. Kleine Proteine wandern schneller durch das Gel als große, dementsprechend werden sie anhand ihrer relativen Molekülmassen aufgetrennt.

SDS-Page für die Untersuchung der Expression von phosphoPhospholamban bzw. Connexin43

Die Gele wurden mit Hilfe von Gelkammern der Firma Bio-Rad Laboratories (Hercules, Kalifornien/USA) gegossen. Sie hatten eine Dicke von 1,5 mm und eine senkrechte Lauflänge von 6 cm. Die Elektrophorese wurde mit *Running-Puffer* (1x) und den Kammern der Firma Bio-Rad durchgeführt.

Jeweils 15-20 µl der vorbereiteten denaturierten Proteinproben, als auch ein gleichzeitig mitlaufender Proteinmarker, wurden in die vorhandenen Taschen des Sammelgels aufgetragen. Bei konstanter Spannung von 100 V erfolgte die Auftrennung für ca. 90 Minuten. Das zugeführte Bromphenolblau diente als Kontrolle für die Lauffront.

Proteintransfer auf Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran)

Für die weitere immunologische Verarbeitung wurden die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine vom Trenngel auf eine PVDF Membran (Immobilon P Membran, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts/USA) übertragen. Hierbei wurden Transferkammern der Firma Bio-Rad verwendet, die während des Transfers mit eiskaltem *Transfer-Puffer* gefüllt wurden.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Proteine des Gels auf die PVDF-Membranen transferiert. Für jedes Gel wurden zwei *Fiberpads*, sechs Filterpapiere und eine in Methanol getränkte PVDF-Membran benötigt, die 10 Minuten zusammen mit dem Gel in eiskaltem Transferpuffer eingelegt wurden. Sie wurden nach folgendem Schema in die Transferhalterung überführt:

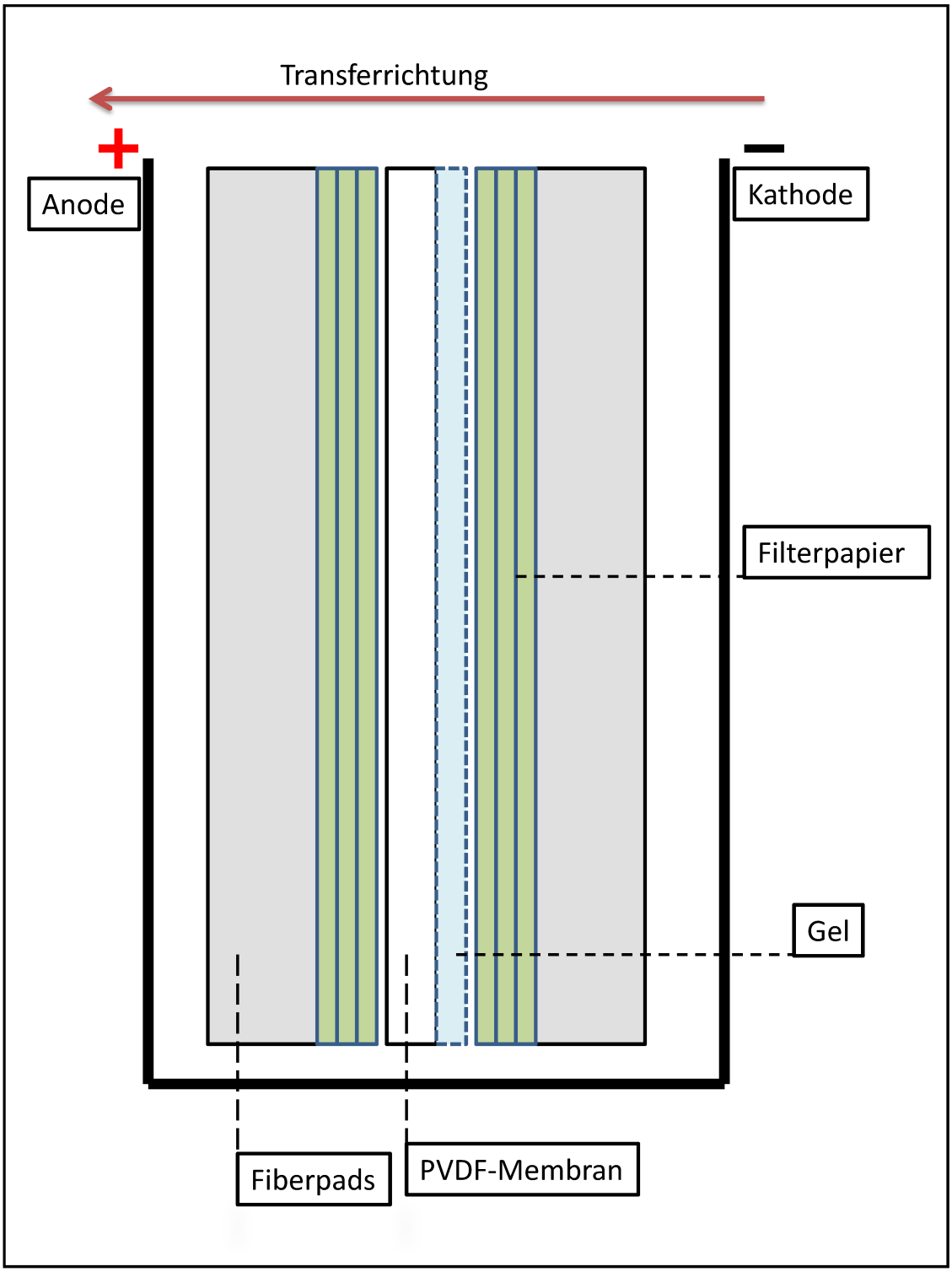

Abb. 8: Aufbau der Transferkammer

Schematische Darstellung des Aufbaus der Transferkammer. Entscheidend ist die Anordnung anhand der Transferrichtung von der Kathode zur Anode.

Hierbei war darauf zu achten, dass die einzelnen Schichten luftblasenfrei übereinander lagen. Das Gel lag zur Kathode und die Membran zur Anode gerichtet. Bei laufender Kühlung und unter Rühren des Puffers wurde der Transfer für 60 Minuten bei konstanter Stromstärke (220 mA) durchgeführt.

Coomassie-Färbung

Um die aufgetragene Proteinmenge und den Ablauf der Elektrophorese zu kontrollieren, wurden die Gele nach Transfer auf die PVDF-Membran mit Coomassie-Lösung gefärbt. Dieser Triphenylmethanfarbstoff lagert sich unspezifisch an basische Seitenketten der Proteine an.

Die Gele wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit der Coomassie-Lösung gefärbt und danach zweimal nach jeweils einer Stunde mit Leitungswasser gewaschen und über Nacht weiter entfärbt. Es zeigte sich bei erfolgreicher Elektrophorese ein gleichmäßig angefärbtes Proteinmuster aller Banden.

Immunoblot

Die Proteine wurden auf den Membranen mit spezifischen Antikörpern identifiziert und die Signale ausgewertet.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran zunächst mit 5 % Magermilchlösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler abgesättigt. Über Nacht wurde die Membran mit dem primären, gegen das gesuchte Protein gerichteten, Antikörper bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Hierfür wurde der Antikörper laut Angaben des Herstellers verdünnt.

Der sekundäre Antikörper, der gegen den primären gerichtet ist, wurde ebenfalls laut Hersteller mit 1 % Magermilchlösung verdünnt. Dieser ist Meerrettichperoxidase gekoppelt (*horseradish peroxidase*, HRP) und kann mittels Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht werden. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten mit den beiden Antikörpern wurde die Membran drei mal zehn Minuten mit kaltem TBS-T Puffer gewaschen.

Dieses Verfahren wurde für die gesuchten Proteine phosphoryliertes Phospholamban bzw. Cx43 mit Hilfe der entsprechenden Antikörper gleichermaßen durchgeführt [102]. Als Anhaltspunkt für das gleichmäßige Auftragen der Gesamtproteinmenge der

einzelnen Proben wurden zudem noch Actin bzw. TIM23 als *housekeeper*-Proteine detektiert.

Detektion

Die Banden wurden mit ECL-Reagenz (Enhanced Chemoluminescence Reagent, Firma Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas/USA) und ablaufender Chemilumineszenz-Reaktion im Dunkelraum durch entsprechende Belichtungszeit sichtbar gemacht, die Lichtemission wurde mit einer Kamera aufgenommen (Cool Snap HQ2, Photometrics, Tucson, Arizona/USA) und digital erfasst (GelPro Analyzer, Version 6, Media Cybernetics, Rockvill, Maryland/USA).

Auswertung

Die Auswertung der Western Blots wurde mit Hilfe des Programms GelScan Version 6.0 der Firma Decon Science Tec (Frankfurt) durchgeführt. Gemessen wurde die mittlere Lichtintensität der entstanden Banden während der Belichtungszeit. Dieser Wert wurde in den Ergebnissen als Quotient aus phosphoryliertem Phospholamban bzw. Cx43 und Actin bzw. Tim23 als *housekeeper*-Protein ausgedrückt [102].

2.2.3 Mitochondrienisolierung und Nachweis der Cx43-Proteinexpression

Im weiteren Verlauf der Untersuchung zeigte sich, dass eine weitere Versuchsreihe zur Isolierung des mitochondrialen Connexin-43 [modifiziert nach 99-101, 107] durchgeführt werden sollte [102]. Denn Connexin-43 könnte einen möglichen Signalschritt in der Kaskade der kardialen Präkonditionierung darstellen, als auch eine Bedeutung im alterungsbedingten Wirkverlust kardioprotektiver Mechanismen haben.

Hierbei wurden die Versuchstiere (sowohl junge als auch alte Ratten, jeweils n=8) mittels Pentobarbital (50 mg/kg KG i.p.) narkotisiert und durch Dekapitation tierschutzgerecht getötet. Das Herz wurde nach der Thoraxeröffnung entnommen und im bereitgestellten Mitochondrien Puffer [modifiziert nach 99, 100] mit einer Schere zerkleinert und gewaschen, bis die Lösung blutfrei war. Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Nach kurzer Homogenisierung in 30 ml Mitochondrien Puffer wurde die Lösung zweimal mit 700 g bzw. 800 g für 10 Minuten zentrifugiert und jeweils der vom

Detritus befreite Überstand weiter verwendet. In einer folgenden dritten Zentrifugation mit 3200 g über 10 Minuten bildete sich das Pellet mit den darin befindlichen Mitochondrien. Zur weiteren Verarbeitung wurde dieses Pellet in Mitochondrien Puffer resuspendiert (S-Fraktion) und auf eine 30 %ige Percoll Lösung geschichtet. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation mit 34000 g bildeten sich zwei Fraktionen (M1- und M2-Fraktion) auf unterschiedlicher Höhe, die einzeln abgetragen wurden und im Mitochondrien Puffer ebenfalls resuspendiert wurden. Durch zwei Zentrifugationsschritte mit 12000 g über 4 Minuten wurden die Fraktionen weiter gereinigt und das entstandene Pellet im Mitochondrien Lyse-Puffer [modifiziert nach 101] eine Stunde bei 4 °C auf dem Rüttler inkubiert, bevor es erneut bei 10000 g über 5 Minuten pelletiert wurde.

Es bildeten sich somit drei Fraktionen: S, M1 und M2. Die Reinheit der Mitochondrien-Fraktionen M1 und M2 und das Fehlen sarkolemnaler Proteine darin, überprüften wir im Western-Blot mittels Na-K-ATPase-Antiköper als Plasmamembran-Marker [102].

Die molekularbiologischen Analysen mittels Proteinbestimmung nach Lowry und Western Blot wurden in gleicher Weise wie bereits im Kapitel 2.2.2 beschrieben durchgeführt. Zur Probenaufbereitung für die Gelelektrophorese wurden die Proben zusammen mit der Lösung aus *Loading-Puffer* und Mercaptoethanol hierbei fünf Minuten auf 95 ° Celsius erhitzt.

2.3 Statistische Auswertung

Die Daten werden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (MW±SD). Die statistische Auswertung wurde mittels Sigma Stat® Version 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA/USA) durchgeführt [102].

Während der *in vivo* Versuchsserien wurden kontinuierlich Herzfrequenz und arterieller Blutdruck gemessen. Unterschiede in den einzelnen Gruppen oder während unterschiedlicher Zeitpunkte innerhalb einer Gruppe wurden durch eine Zweiweg-Varianzanalyse (ANOVA) und einem post-hoc Tukey-Test analysiert.

Die Infarktgrößen und Daten aus Western-Blot (pPLB) bzw. ELISA (cAMP) wurden mittels Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) und post-hoc Tukey-Test analysiert.

Die Analyse der Daten aus dem Western-Blot für mitochondriales Cx43 wurde mittels Student´s t-test durchgeführt.

Bei einem p-Wert <0,05 wurden die Unterschiede als statistisch signifikant beurteilt.

3 Ergebnisse

3.1 Hämodynamische Messdaten

Die hämodynamischen Messdaten der *in vivo* Versuchsserien sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen gab es zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied bei den Messungen von Herzfrequenz und mittlerem aortalem Druck. Die Applikation von Forskolin induzierte einen sehr geringen Blutdruckabfall sowie eine leichte Steigerung der Herzfrequenz (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt war temporär begrenzt. Zu Beginn der regionalen Myokardischämie bestanden keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mehr (s. Tabelle 1) [102].

	Ausgangswert	Ischämie	Reperfusion	
		15	30	120
Dosisfindung Forskolin				
Herzfrequenz [min^{-1}]				
Kontrolle	403 ± 47	398 ± 44	391 ± 36	353 ± 49
Forskolin (10)	400 ± 54	387 ± 61	378 ± 67	351 ± 61
Forskolin (30)	357 ± 59	351 ± 72	347 ± 73	339 ± 59
Forskolin (100)	386 ± 38	400 ± 54	351 ± 49	295 ± 48
Forskolin (300)	398 ± 54	420 ± 41	396 ± 47	357 ± 54
mittlerer aortaler Druck [mmHg]				
Kontrolle	120 ± 12	121 ± 20	116 ± 13	96 ± 13
Forskolin (10)	110 ± 30	109 ± 32	112 ± 30	94 ± 28
Forskolin (30)	105 ± 38	100 ± 32	99 ± 30	95 ± 27
Forskolin (100)	122 ± 31	111 ± 32	96 ± 30	85 ± 25
Forskolin (300)	117 ± 27	95 ± 16	93 ± 23	93 ± 21
Dosisfindung NS1619				
Herzfrequenz [min^{-1}]				
Kontrolle	405 ± 52	407 ± 28	361 ± 34	310 ± 64
NS1619 (0,3)	371 ± 41	355 ± 46	307 ± 33	288 ± 59*
NS1619 (1)	396 ± 48	403 ± 36	364 ± 34	310 ± 37
NS1619 (3)	396 ± 46	393 ± 49	345 ± 59	329 ± 70
NS1619 (10)	417 ± 39	408 ± 51	365 ± 80	335 ± 78*
NS1619 (30)	377 ± 34	314 ± 60	287 ± 67*	300 ± 34
mittlerer aortaler Druck [mmHg]				
Kontrolle	119 ± 13	121 ± 15	103 ± 22	85 ± 39
NS1619 (0,3)	89 ± 15	95 ± 13	77 ± 6	72 ± 21
NS1619 (1)	127 ± 25	138 ± 18	115 ± 25	79 ± 12
NS1619 (3)	115 ± 21	120 ± 14	96 ± 22	86 ± 29
NS1619 (10)	123 ± 20	128 ± 26	104 ± 29	86 ± 26
NS1619 (30)	106 ± 20	98 ± 45	76 ± 30	74 ± 18
Forskolin + Iberiotoxin				
Herzfrequenz [min^{-1}]				
Kontrolle	397 ± 42	397 ± 26	374 ± 28	349 ± 44
Forskolin (30)	414 ± 49	449 ± 30	416 ± 66	388 ± 33
Forskolin (30) + Iberiotoxin	365 ± 17	425 ± 49*	364 ± 37	362 ± 36
Iberiotoxin	400 ± 23	416 ± 20	385 ± 34	374 ± 23
mittlerer aortaler Druck [mmHg]				
Kontrolle	118 ± 25	111 ± 11	100 ± 12	81 ± 33*
Forskolin (30)	110 ± 19	102 ± 14	104 ± 24	91 ± 27
Forskolin (30) + Iberiotoxin	114 ± 18	117 ± 16	108 ± 16	94 ± 12
Iberiotoxin	121 ± 9	113 ± 14	108 ± 20	98 ± 10
Untersuchung altes Herz				
Herzfrequenz [min^{-1}]				
Kontrolle alt	359 ± 26	362 ± 45	366 ± 24	337 ± 12
Forskolin (30) alt	341 ± 60	391 ± 40	349 ± 39	348 ± 17
Forskolin (100) alt	371 ± 57	368 ± 74	385 ± 42	373 ± 31
NS1619 (10) alt	377 ± 38	390 ± 29	377 ± 21	346 ± 42
NS1619 (30) alt	350 ± 50	365 ± 42	359 ± 35	314 ± 65
mittlerer aortaler Druck [mmHg]				
Kontrolle alt	135 ± 20	136 ± 19	128 ± 19	114 ± 11
Forskolin (30) alt	102 ± 24	124 ± 16	110 ± 29	118 ± 4
Forskolin (100) alt	110 ± 44	99 ± 23	112 ± 24	123 ± 21
NS1619 (10) alt	136 ± 20	128 ± 31	114 ± 22	101 ± 22
NS1619 (30) alt	122 ± 26	132 ± 19	123 ± 20	113 ± 16

Tabelle 1: Hämodynamische Messdaten

Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung, Zeitpunkte in Minuten, Forskolin bzw. NS1619 in den angegebenen Konzentrationen [µg/kg bzw. µg/kg/min], Iberiotoxin in der Konzentration 6 µg/kg/min, * $p<0,05$ vs Ausgangswert, n=6 Tiere pro Gruppe [102]

3.2 Dosisfindung für Forskolin und NS1619

Ziel dieser Arbeit war ein Erkenntnisgewinn über die alterungsbedingten Veränderungen einer Kardioprotektion durch PKA-Aktivierung bzw. mK_{Ca}-Kanalaktivierung. In diesem Zusammenhang wurde zunächst eine Dosisfindungsstudie durchgeführt, in welcher die jeweils niedrigste protektive Konzentration von Forskolin und NS1619 bestimmt wurde. Hintergrund dieses Vorgehens war die Überlegung, dass eine Verwendung zu hoher Konzentrationen über Nebenwirkungen zu einem erschwerten Nachweis alterungsabhängiger Veränderungen führen könnte. Auch wäre es möglich, dass eine zu hohe Konzentration einen Sensitivitätsverlust der Aktivatoren zur Folge haben könnte.

Dosisfindung Forskolin

In dieser Versuchsreihe wurde eine Kontrollgruppe gebildet, welche mit den Forskolin-Behandlungsgruppen verglichen wurde. Diesen Gruppen wurden unterschiedlich hohe Konzentrationen Forskolin verabreicht.

Eine Präkonditionierung mit dem Adenylatcyclaseaktivator Forskolin zeigte eine Infarktgrößenreduktion in jungen Ratten ab einer verabreichten Konzentration von 30 µg/kg. Die Infarktgröße nach 25 Minuten regionaler Ischämie mit 120 Minuten Reperfusion betrug bei den Rattenherzen in der Kontrollgruppe ohne Präkonditionierung 64±7 % des Risikogebietes (Mittelwert±Standardabweichung). In der Gruppe, die eine Präkonditionierung mit Forskolin in einer Konzentration von 10 µg/kg erfahren hatten, zeigte sich keine Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe (63±7 %). Erst ab einer Forskolin-Konzentration von 30 µg/kg lag die Infarktgröße mit 34±6 % signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Durch die Steigerung der Forskolin-Konzentration konnte die Infarktgrößenreduktion jedoch nicht weiter gesteigert werden. So betrugen die Infarktgrößen bei den nächst höher gewählten Konzentrationen 100 µg/kg und 300 µg/kg 37±3 % bzw. 36±8 % ($p<0,05$ vs. Kontrolle) (s. Abb. 9) [102].

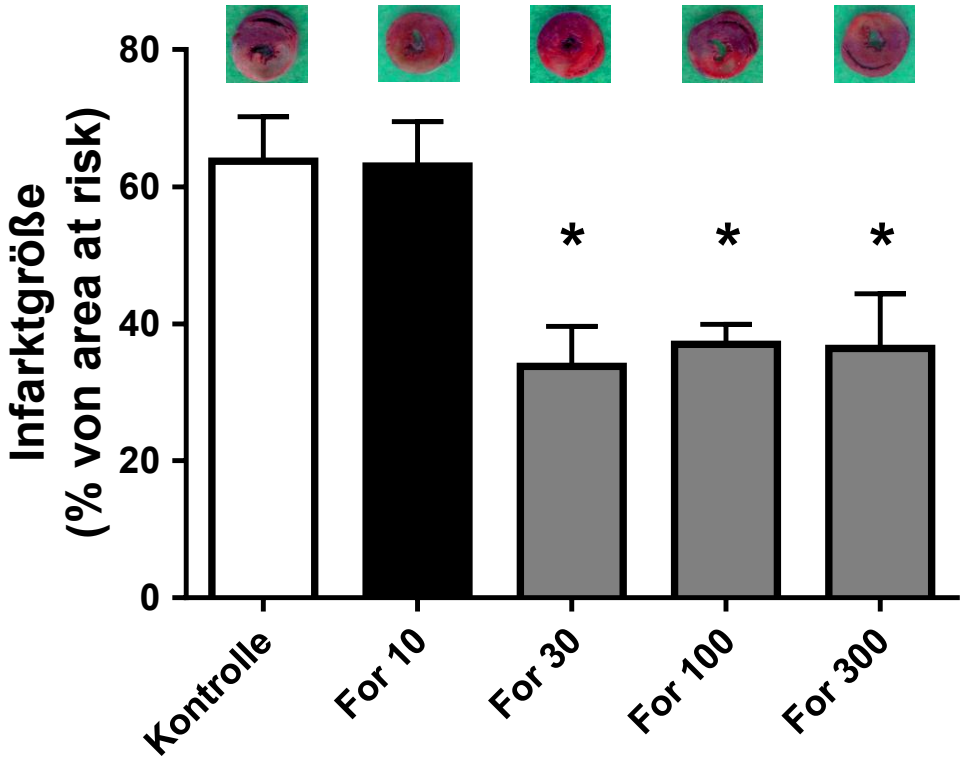

Abb. 9: Dosisfindung Forskolin junge Ratten

Das Histogramm zeigt den kardioprotektiven Effekt von Forskolin (For) anhand der prozentualen Infarktgröße im Verhältnis zum Risikogebiet (*area at risk*). Forskolin (For) wurde in den Konzentrationen 10, 30, 100 und 300 µg/kg verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9 % NaCl-Lösung i.v. in äquivalenter Menge. Daten sind dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung, * $p<0,05$ vs Kontrollgruppe, n=6 Tiere pro Gruppe [102]

Dosisfindung NS1619

Durch die zweite Versuchsreihe im Rahmen der Dosisfindungsstudie sollte die niedrigste protektive Dosis des mK_{Ca}-Kanal-Agonisten NS1619 ermittelt werden. In der Kontrollgruppe zeigte sich nach 25-minütiger Ischämiephase mit 120-minütiger Reperfusion eine Infarktgröße von 64±9 % des Risikogebietes. In den Gruppen mit den verabreichten Konzentrationen von 0,3, 1 und 3 µg/kg/min ergab sich keine Reduktion der Infarktgröße (0,3 µg/kg/min: 62±16%, 1 µg/kg/min: 65±13% und 3 µg/kg/min: 67±9%). Eine Präkonditionierung mit NS1619 in der Konzentration 10 µg/kg/min bzw.

30 µg/kg/min zeigte eine signifikante Reduzierung der Infarktgröße auf 41±11% bzw. 40±14% des Risikogebietes (p<0,05 vs. Kontrolle) (s. Abb. 10) [102].

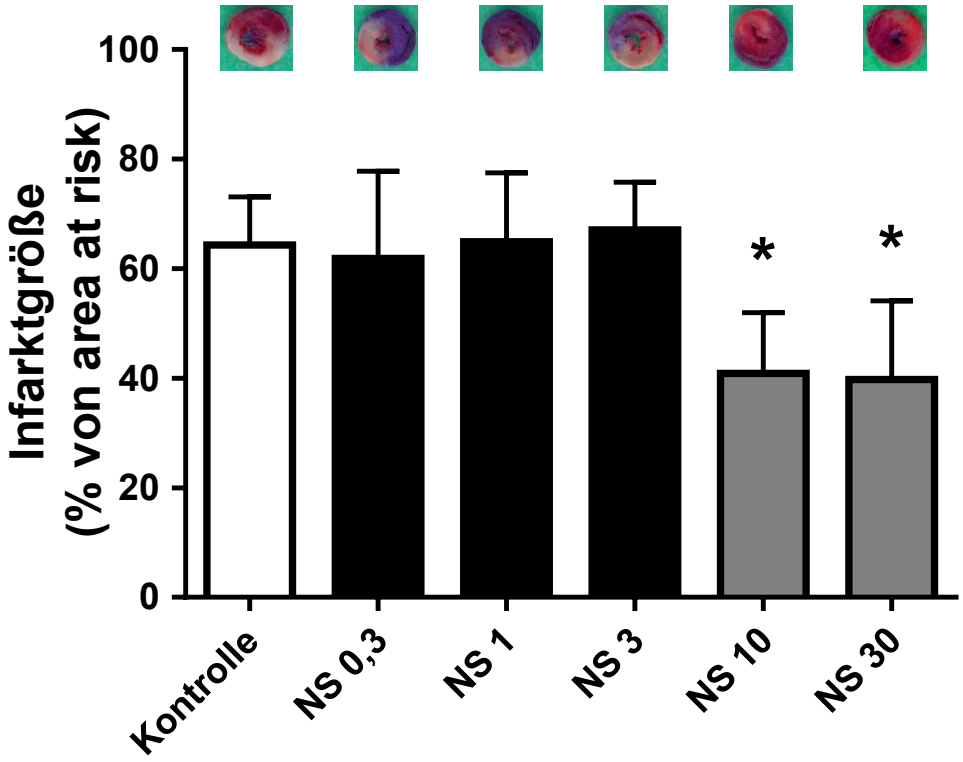

Abb. 10: Dosisfindung NS1619 junge Ratten

Histogramm zeigt den kardioprotektiven Effekt von NS1619 (NS) anhand der prozentualen Infarktgröße im Verhältnis zum Risikogebiet (*area at risk*). NS1619 (NS) wurde in den Dosen 0,3, 1, 3, 10 und 30 µg/kg/min verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9 % NaCl-Lösung i.v. in äquivalenter Menge. Daten sind dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung, * p<0,05 vs Kontrollgruppe, n=6 Tiere pro Gruppe [102]

Aus diesen *in vivo* Versuchen folgt, dass eine Infarktgrößenreduktion mittels Präkonditionierung durch Forskolin und NS1619 im jungen Rattenherz möglich ist. Für Forskolin zeigt sich eine minimal nötige Konzentration von 30 µg/kg und für NS1619 10 µg/kg/min. Die ermittelten Dosen wurden in den weiteren Versuchsreihen zur Präkonditionierung verwendet.

3.3 Zusammenhang des mK_{Ca}-Kanals und der PKA-Aktivierung

Diese weitere *in vivo* Versuchsreihe untersuchte, inwieweit eine durch Forskolin induzierte Präkonditionierung und Infarktgrößenreduktion durch eine Blockierung des mK_{Ca}-Kanals durch Iberiotoxin aufgehoben werden kann. Oder anders formuliert, ob eine Kardioprotektion durch PKA-Aktivierung über eine mK_{Ca}-Kanalöffnung vermittelt wird.

Es wurde die oben beschriebene niedrigste protektive Konzentration von Forskolin (30 µg/kg) verwendet. Iberiotoxin diente in diesem Fall als mK_{Ca}-Kanal-Blocker. In der Kontrollgruppe ohne Intervention war eine Infarktgröße von 67±8 % des Risikogebietes messbar. Eine Behandlung mit 30 µg/kg Forskolin führte zu einer Reduktion der Infarktgröße auf 41±4 % des Risikogebietes. Eine zusätzliche Gabe von 6 µg/kg/min Iberiotoxin zeigte eine Aufhebung dieser beobachteten Reduktion auf das Niveau der Kontrollgruppe (63±12 %). Zudem legen die Infarktgrößenmessungen bei alleiniger Iberiotoxingabe dar, dass die Substanz alleine keine Wirkung auf die Infarktgröße erzielt (64±11 %) (s. Abb. 11) [102].

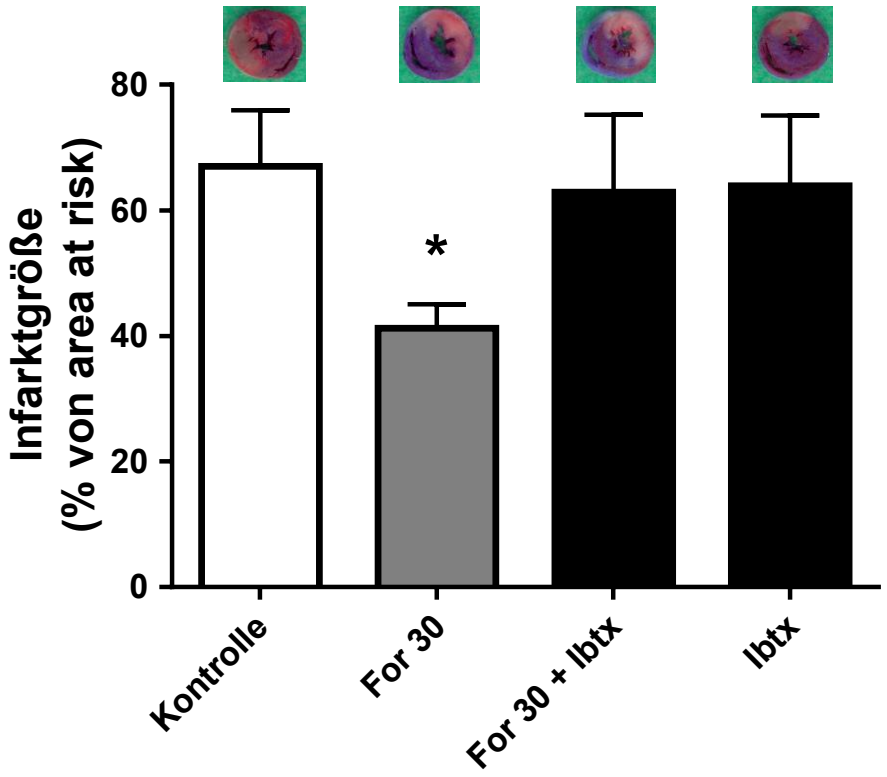

Abb. 11: Einfluss der PKA auf die Forskolin-induzierte Kardioprotektion

Das Histogramm zeigt die Infarktgrößen als prozentualer Anteil am Ischämiegebiet (*area at risk*) bei jungen Tieren. Forskolin (For) wurde in der Dosis 30 µg/kg verabreicht. Iberiotoxin (Ibtx) ist ein mK_{Ca}-Kanal-Blocker (6 µg/kg/min). Daten sind dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung, * $p<0,05$ vs Kontrollgruppe, n=6 pro Gruppe [102]

Eine Präkonditionierung durch Aktivierung der Adenylatcyclase mittels Forskolin (30 µg/kg), die über die Proteinkinase A vermittelt wird, kann durch zusätzliche Gabe des K_{Ca}-Kanal-Blockers Iberiotoxin vollständig aufgehoben werden.

3.4 Untersuchung der Kardioprotektion des alten Herzen

Ziel der Arbeit ist die Untersuchung altersbedingter Veränderungen im Signalweg der Proteinkinase-A-Aktivierung durch die Adenylatcyclase über den mK_{Ca}-Kanal und einem damit verbundenem Verlust kardioprotektiver Mechanismen. Daher wurde im Folgenden eine Präkonditionierung mit Forskolin und NS1619 im alten Herzen durchgeführt. Eine Kontrollgruppe wurde sowohl mit Forskolin behandelten Tieren, als auch mit der NS1619 behandelten Gruppe verglichen. In der Untersuchungsreihe mit Forskolin wurde sowohl die ermittelte Konzentration von 30 µg/kg als auch die nächst höhere Dosis verwendet (100 µg/kg). Die Überlegung war, einen möglichen alterungsbedingten Sensitivitätsverlust der Agentien auszuschließen. In gleicher Weise wurde in der NS1619 Gruppe verfahren. Sowohl die niedrigste Dosis, die bei den jungen Tieren protektiv war (10 µg/kg/min), als auch die nächsthöhere Dosis (30 µg/kg/min) wurden verwendet [102].

3.4.1 Infarktgrößenbestimmung am alten Herzen

Bei den alten Rattenherzen zeigte sich in der Kontrollgruppe mit TTC-Färbung eine Infarktgröße von 56±6 % des Risikogebietes. Eine Behandlung mit sowohl 30 µg/kg als auch 100 µg/kg Forskolin präsentierte keine Infarktgrößenreduktion (51±10 % bzw. 50±11 %). Beide Konzentrationen von NS1619, 10 µg/kg/min und 30 µg/kg/min, führten zu einer signifikanten Senkung der Infarktgröße auf 35±8 % bzw. 37±7 % des Risikogebietes (s. Abb. 12) [102].

Eine Aktivierung der Adenylatcyclase durch Forskolin zeigte keine bedeutsame Infarktgrößenreduktion im alten Herzen. Dies ließ sich sowohl für die im jungen Herzen wirksame Konzentration von 30 µg/kg, als auch für 100 µg/kg feststellen. Eine direkte Aktivierung des mK_{Ca}-Kanals durch NS1619 führte auch im alten Herzen zu einer relevanten Reduktion der Infarktgröße [102].

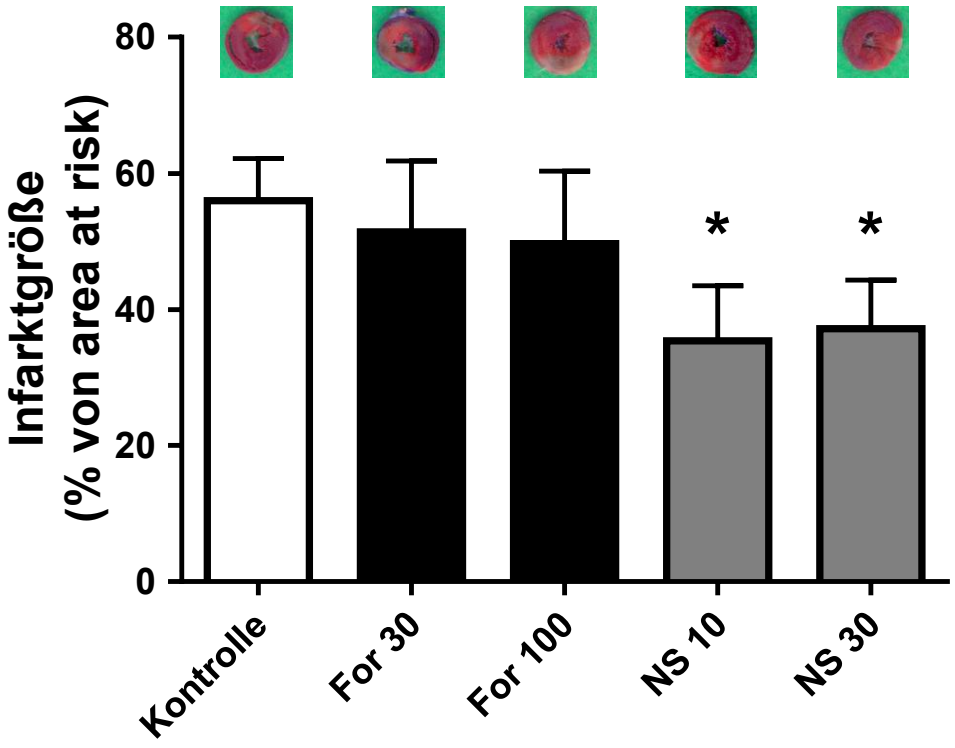

Abb. 12: Kardioprotektion im alten Herzen

Das Histogramm zeigt die Kardioprotektion im alten Herzen anhand der Infarktgrößen als prozentualer Anteil am Ischämiegebiet (*area at risk*). Forskolin (For) wurde in den Dosen 30 bzw 100 µg/kg verabreicht. NS1619 (NS) in den Dosen 10 bzw. 30 µg/kg/min. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9 % NaCl-Lösung in äquivalenter Menge. Daten sind dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung, * $p<0,05$ vs Kontrollgruppe, n=6 pro Gruppe [102]

3.4.2 Proteinbiochemische Untersuchung

Für die genauere Untersuchung, ob die Regulation der PKA alterungsabhängigen Veränderungen unterliegt, sollte mittels proteinbiochemischer Methoden zum einen der cAMP-Spiegel zum anderen die PKA-Aktivität ermittelt werden. Auch hier wurde eine Forskolin Konzentration von 30 µg/kg für die PKA-Aktivierung verwendet [102].

cAMP-Spiegel Bestimmung durch ELISA

Die Messung der cAMP-Konzentrationen erfolgte mittels ELISA. Verglichen wurde die cAMP-Konzentration der Kontrollgruppe mit der Forskolin-behandelten Gruppe. Dies wurde sowohl mit jungen, wie auch alten Tieren durchgeführt.

Es zeigte sich, dass Forskolin bei jungen und alten Versuchstieren zu einer Steigerung des myokardialen cAMP-Spiegels führt. In den jungen Rattenherzen war in der Kontrollgruppe eine cAMP-Konzentration von 4,3±0,4 pmol/mg Protein messbar. Diese wurde durch Forskolingabe (30 µg/kg) auf 5,3±0,8 pmol/mg gesteigert ($p<0,05$ vs Kontrolle). Bei den alten Herzen zeigte sich ein Wert von 3,4±0,5 pmol/mg Protein in der Kontrolle, der durch Forskolin (30 µg/kg) auf 5,1±1,2 pmol/mg ebenfalls relevant gesteigert wurde ($p<0,05$) (s. Abb. 13) [102].

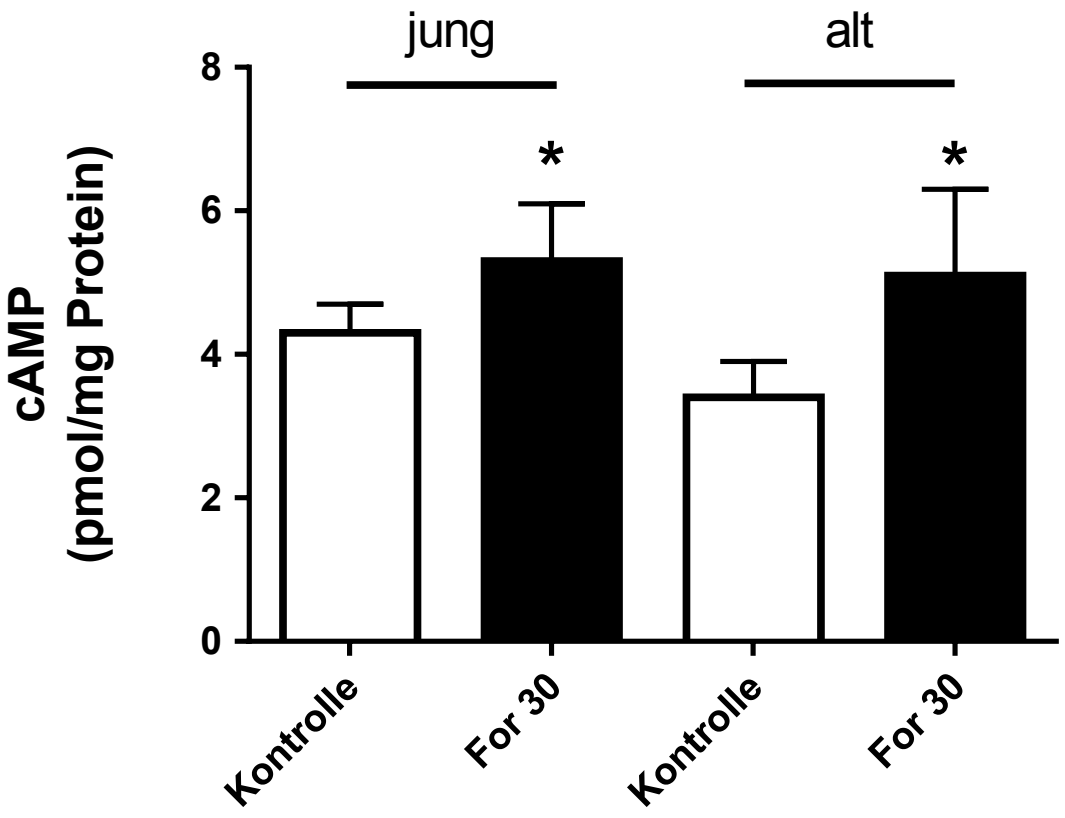

Abb. 13: Effekt von Forskolin auf den cAMP-Spiegel

Daten zeigen das ELISA Ergebnis der quantitativen cAMP Bestimmung in pmol/mg Protein. Vor der Analyse wurden die Tiere *in vivo* mit 30 µg/kg Forskolin (For) behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9 % NaCl-Lösung in äquivalenter Menge. Daten sind dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung, * $p<0,05$ vs Kontrollgruppe, n=8-9 pro Gruppe [102]

Im alten Myokard liegen leicht reduzierte basale cAMP-Spiegel gegenüber dem jungen Myokard vor. Die Aktivität der Adenylatcyclase kann im alten Myokard jedoch in gleichem Maße wie im jungen Myokard gesteigert werden. Es kommt sowohl bei jungen als auch alten Tieren nach Stimulation der Adenylatcyclase durch Forskolin zu vergleichbaren Anstiegen des cAMP-Spiegels [102].

Messung der Phospholamban-phosphorylierung

Zur Klärung der Frage, ob eine alterungsabhängige Veränderung der PKA-Aktivität vorliegt, sollte mittels Western-Blot die PKA-Aktivität in jungen und alten Rattenherzen anhand der Phosphorylierung von Phospholamban als Zielprotein der PKA bestimmt werden. Bestimmt wurde das Verhältnis von phosphoryliertem Phospholamban zu Actin (pPLB/Actin). Auch hier diente sowohl der Vergleich der Kontrollgruppe mit der Forskolin-behandelten Gruppe (30 µg/kg), als auch ein Vergleich von jungen mit alten Rattenherzen.

Die Ergebnisse zeigen, dass in den jungen und alten Herzen gleichermaßen eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung von Phospholamban stattfindet. Sowohl bei den jungen Tieren stieg der Wert von 1,1±0,4 auf 2,4±0,7 [pPLB/Actin] durch Forskolin-Gabe, als auch bei den alten Tieren ließ sich die relevante Steigerung von 0,9±0,5 auf 2,4±1,3 [pPLB/Actin] feststellen ($p<0,05$) (s. Abb. 14) [102].

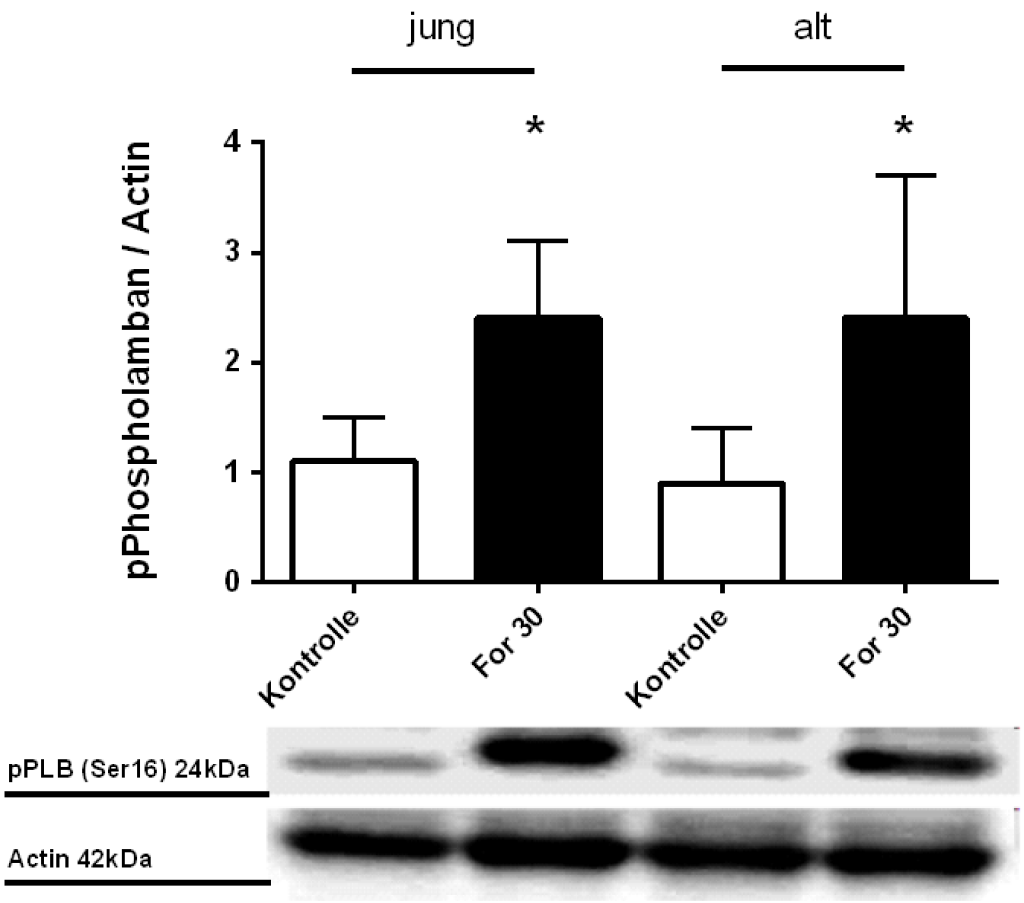

Abb. 14: Effekt von Forskolin auf die PKA-Aktivität

Das Histogramm zeigt den Effekt von Forskolin (For) auf die Phospholamban-Phosphorylierung als Marker für die PKA-Aktivität. Die jungen und alten Wistar-Ratten wurden vor der proteinbiochemischen Untersuchung *in vivo* mit 30 µg/kg Forskolin (For 30) behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9 % NaCl-Lösung in äquivalenter Menge. Daten zeigen das Verhältnis von phosphoryliertem Phospholamban (pPhospholamban, pPLB) zu Actin. Mittelwert und Standardabweichung, * $p<0,05$ vs Kontrollgruppe, n=8-9 pro Gruppe [102]

Repräsentativer Western-Blot dargestellt mit den Banden des phosphorylierten Phospholambans (pPLB, Ser16) und des Actins [102].

Das Ausmaß der Phosphorylierung von Phospholamban als Maß für die Aktivität der PKA zeigt keine relevanten Unterschiede im Vergleich der jungen und alten Tiere.

3.5 Semiquantitative Bestimmung von Cx43

Die Reinheit der gewonnenen Fraktionen S, M1 und M2 wurde im Western-Blot durch den Antikörper Anti-Na-K-ATPase als Marker für Proteine der Plasmamembran überprüft. In der Fraktion M2 konnte keine Na-K-ATPase detektiert werden, was auf eine reine mitochondriale Fraktion ohne Plasmamembranproteine hindeutet. In den Fraktionen S und M1 ließ sich hingegen die Na-K-ATPase nachweisen (s. Abb. 15) [102]. Somit wurden die folgenden Messungen ausschließlich mit der M2-Fraktion durchgeführt.

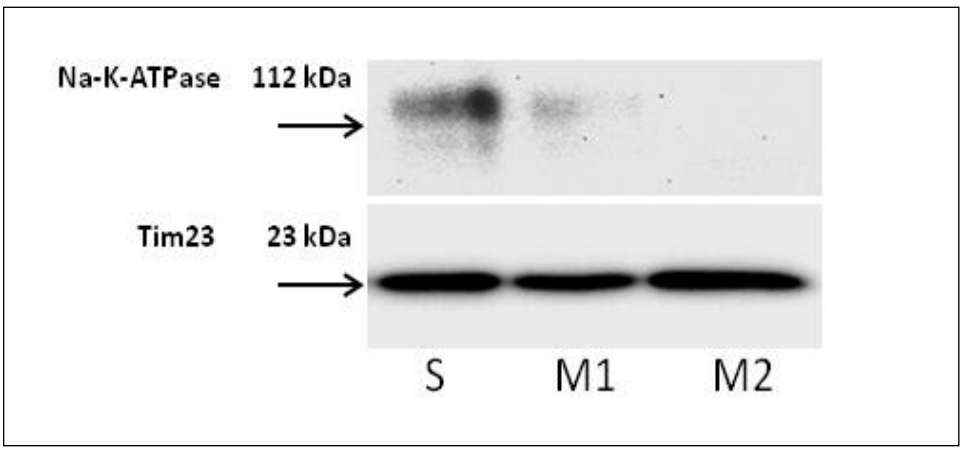

Abb. 15: Reinheit der mitochondrialen Fraktion

Repräsentativer Western-Blot, dargestellt mit den Banden für Na-K-ATPase und Tim23 in den einzelnen Fraktionen der Mitochondrien-Isolierung. Die Bande für die Na-K-ATPase dient als Marker für Plasmamembranproteine, Tim23 als Marker für mitochondriale Proteine.

Mithilfe des Western-Blots wurde eine semiquantitative Analyse von mitochondrialem Cx43 in jungen und alten Rattenherzen durchgeführt. Bestimmt wurde das Verhältnis Cx43 zu Tim23 als mitochondriales Markerprotein. Die gewonnenen Daten zeigen eine signifikante ($p<0,05$) Verminderung des Cx43 Gehaltes in den alten Herzen im Vergleich zu den jungen Herzen. Der ermittelte Wert von Cx43 fiel von 7,51±2,65 [Cx43/Tim23] bei den jungen auf 5,31±0,94 [Cx43/Tim23] bei den alten Tieren (s. Abb. 16) [102].

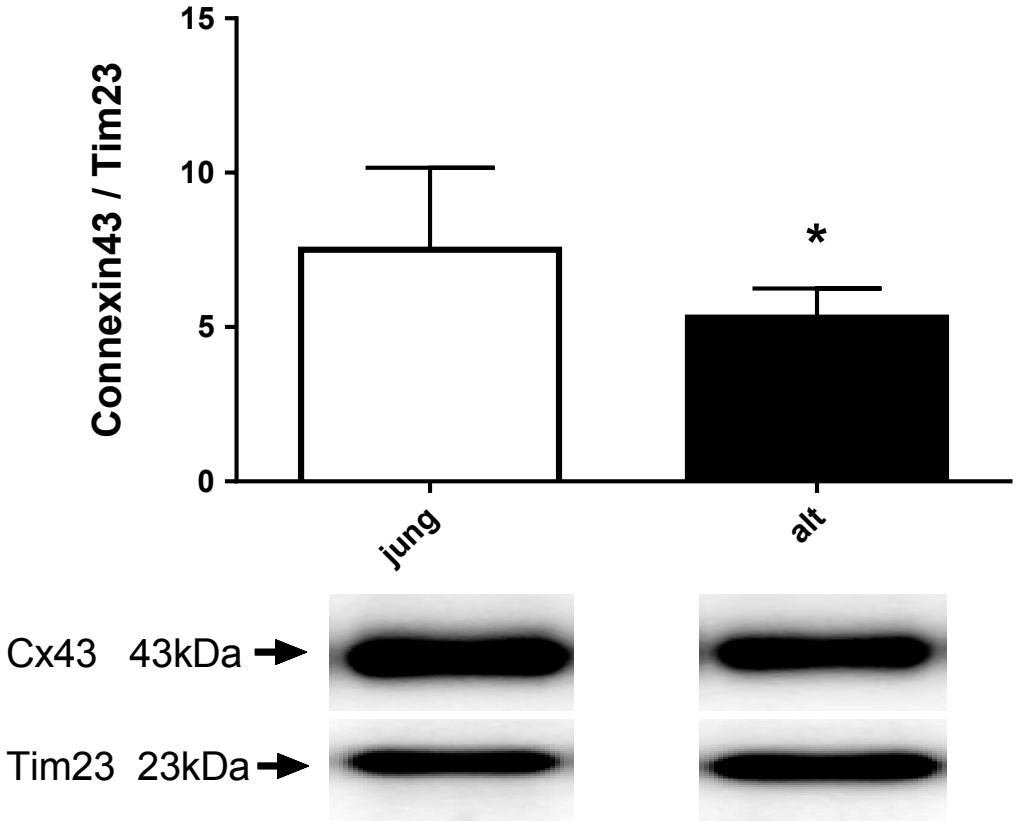

Abb. 16: Semiquantitative Bestimmung von Cx43

Das Histogramm zeigt die semiquantitative Analyse von Connexin43 (Cx43) in jungen und alten Rattenherzen. Die Daten zeigen das Verhältnis von Cx43 und Tim23. Mittelwerte und entsprechende Standardabweichung. * $p<0,05$ vs junge Tiere, n=8 pro Gruppe [102].

Repräsentativer Western-Blot dargestellt mit den Banden von Cx43 und Tim23 [102].

4 Diskussion

Bei der Kardioprotektion im Sinne einer Präkonditionierung handelt es sich um ein Phänomen, bei welchem das Ausmaß eines Myokardinfarktes durch vorangehende Phasen nicht letaler Ischämien vor dem Infarktereignis reduziert wird [28]. Da der protektive Effekt einer Präkonditionierung mit steigendem Lebensalter vermindert zu sein scheint [86, 95, 96], könnte hierin ein Grund für die steigende Morbidität und Mortalität des Myokardinfarktes im Alter zu finden sein [108, 109].

Es war zunächst das Ziel dieser Arbeit, eine Dosisfindungsstudie für NS1619 und Forskolin im jungen Rattenmyokard durchzuführen, um eine möglichst niedrige protektive Dosis zu finden, die wir auch in den darauffolgenden *in vivo* Versuchen verwendet haben. Forskolin diente als indirekter PKA-Aktivator und NS1619 als mK_{Ca}-Kanal Aktivator. Weiterhin sollte der funktionelle Zusammenhang in der Signalkette von PKA-Aktivierung und mK_{Ca}-Kanal geklärt werden. Dies wurde durch die Aufhebung des präkonditionierenden Effektes von Forskolin durch gleichzeitige Gabe von Iberiotoxin gezeigt. Wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war jedoch die Untersuchung eines altersabhängigen Wirkverlustes kardioprotektiver Mechanismen im postulierten Signalweg PKA-mK_{Ca}-Kanal. Es konnte gezeigt werden, dass eine im jungen Rattenmyokard protektiv wirkende Forskolindosis, im alten Myokard keine schützende Wirkung erzielt. NS1619, als mK_{Ca}-Kanal-Aktivator, konnte sowohl im jungen wie alten Rattenherz eine Präkonditionierung initiieren. Anhand des postulierten Signalweges, ausgehend von der PKA über den mK_{Ca}-Kanal, könnte die altersabhängige Veränderung somit proximal des mK_{Ca}-Kanals liegen und in einer Regulations- und Funktionsänderung der PKA begründet sein. Die proteinbiochemischen Untersuchungen zeigen jedoch keinen altersabhängigen Unterschied in der Aktivität der PKA. Ein altersabhängiger Wirkverlust in dieser Signalkette liegt scheinbar abwärts der PKA und proximal des mK_{Ca}-Kanals. Ein möglicher Zwischenschritt könnte über Connexin43 ablaufen [102].

Diskussion der Dosisfindungsstudie

Die Beeinflussung mitochondrialer Kaliumkanäle scheint ein entscheidender Schritt in der Signalkaskade der Präkonditionierung zu sein [65, 110] und sorgt für erhöhte Toleranz des Myokards gegenüber IR-Schäden [69]. Einer dieser Kanäle scheint der

kalziumabhängie Kaliumkanal an der inneren Mitochondrienmembran (mK_{Ca}) zu sein [69, 110]. NS1619 *(1,3-Dihydro-1-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]-5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazol-2-one)* gilt als K_{Ca}-Kanalaktivator und bewirkt eine pharmakologische Präkonditionierung [65, 69]. Bei Cao et al. führte eine Behandlung des isolierten Rattenherzes mit NS1619 zu einer Infarktgrößenreduktion und eine pharmakologische Blockade dieser K_{Ca}-Kanäle durch Paxillin zu einer Aufhebung des protektiven Effektes einer ischämischen bzw. pharmakologischen Präkonditionierung [65]. In einer vorherigen Arbeit in unserer Klinik konnte gezeigt werden, dass NS1619 nicht nur im jungen, sondern auch alten Rattenherz kardioprotektiv wirkt [98]. Dabei wurde die Infarktgrößenreduktion allerdings nur mit einer einzelnen Dosierung von NS1619 (11 µg/kg/min) untersucht und nachgewiesen. Vor dem Hintergrund, dass der protektive Effekt im alten Myokard in dieser Arbeit eventuell nur durch Verwendung dieser möglicherweise sehr hohen Dosis ausgelöst wurde, sollte in dieser Arbeit in einer Dosisfindungsstudie die niedrigste protektive Dosis von NS1619 ermittelt werden. Somit sollten mögliche Nebenwirkungen, unspezifische Wirkungen und ein Sensitivitätsverlust der Aktivatoren minimiert werden. Als niedrigste protektive Dosis von NS1619 wurden hier 10 µg/kg/min in den jungen Versuchstieren ermittelt [102]. Höhere Dosierungen führten nicht zu einer Steigerung der kardioprotektiven Potenz. Auf Grundlage dieses Ergebnisses wurde NS1619 in einer Dosis von 10µg/kg/min in den folgenden Versuchsserien eingesetzt, in welchen die protektiven Signalmechanismen untersucht werden sollten. Wir bestätigen damit die vorherigen Arbeiten zum protektiven Effekt von NS1619 und konnten in einem breiter untersuchten Dosisbereich die niedrigste protektive Dosis nachweisen[102].

NS1619 ist das am meisten genutzte Agens zur Untersuchung der Effekte des mK_{Ca}-Kanals. Und dies, obwohl es bisher nur geringe Evidenz dafür gibt, dass diese Substanz ein spezifischer Aktivator des K_{Ca}-Kanals ist [111, 112]. Auch Xu et al. konnten lediglich einen erhöhten mitochondrialen K^+-Einstrom messen [69]. Ob diese erhöhte Permeabilität spezifisch für K^+-Ionen ist, konnte mit deren Methode nicht nachgewiesen werden [69, 112]. Zudem ist mittlerweile bekannt, dass NS1619 eine Vielzahl von mitochondrialen Nebeneffekten auslöst, darunter eine Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette und Bildung von ROS, die ebenfalls eine Rolle in der Kardioprotektion spielen [71, 112-114]. Somit kann auch in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden,

dass NS1619 auch durch diese Nebeneffekte und nicht alleine durch mK_{Ca}-Kanal-Aktivierung kardioprotektiv wirkt.

Über welchen Mechanismus eine mK_{Ca}-Kanalöffnung zu einer verzögerten mPTP-Öffnung, dem scheinbaren Schlüsselpunkt der Kardioprotektion, führt und damit die Infarktausdehnung abnimmt, ist bisher nur unvollständig verstanden. Dass eine mögliche Verbindung des mK_{Ca}-Kanals und der mPTP im Rahmen der Präkonditionierung besteht, zeigen die Daten von Cao et al. [65]. In dessen Arbeit hebt die pharmakologische Öffnung der mPTP mit Atractylosid die kardioprotektiven Effekte von NS1619 auf und eine Infarktgrößenreduktion durch Hemmung der mPTP-Öffnung mit CyclosporinA wird nicht durch den K_{Ca}-Kanal Inhibitor Paxillin beeinflusst, so dass dies darauf hindeutet, dass der K_{Ca}-Kanal proximal der mPTP liegt [65]. Der Mechanismus aber, über den diese Verbindung abläuft, bleibt allerdings ungeklärt. Messungen von Heinen et. al. deuten auf eine Steigerung des mitochondrialen O_2-Verbrauches bei mK_{Ca}-Kanalöffnung hin. Dieser wiederum führt zu einer gesteigerten ROS-Freisetzung, die als Triggersignal protektiver Signalschritte angesehen wird [71]. Diese Signalschritte stoßen wiederum eine Kaskade an, die letztendlich die Ca^{2+}-Überladung und eine massive ROS-Freisetzung während der späten Ischämie- und frühen Reperfusionsphase reduziert [115]. Dies wäre ein möglicher Mechanismus, über den eine mK_{Ca}-Kanalaktivierung zu einer reduzierten Öffnung der mPTP und damit zur Kardioprotektion führen könnte [71]. In Betracht ziehen muss man allerdings auch eine Studie von Wojtovich et al., die den kardioprotektiven Effekt von NS1619 in K_{Ca}-Kanal-defizienten Mäusen untersucht haben. Darin zeigt sich, dass im isolierten Herzen K_{Ca}-Kanäle für eine Kardioprotektion mit NS1619 benötigt werden. An isolierten Kardiomyozyten scheint NS1619 jedoch K_{Ca}-Kanal unabhängig einen protektiven Effekt zu besitzen, eventuell durch bereits angesprochene Nebeneffekte. Die Autoren schließen daraus, dass der protektive Effekt von NS1619 am intakten Herzen K_{Ca}-Kanal abhängig geschieht, aber eben nicht zellautonom, sondern eventuell durch Einfluss von kardialen neuronalen Zellen [116], die auch K_{Ca}-Kanäle besitzen [117]. Dieser Einfluss auf den protektiven Effekt von NS1619 könnte auch in unserem Studienmodell eine Rolle spielen. Zudem muss erwähnt werden, dass bisher K_{Ca}-Kanäle in Kardiomyozyten ausschließlich an den Mitochondrien und nicht an der Plasmamembran nachgewiesen wurden [80, 81]. Dies

legt nahe, dass bei Aktivierung durch NS1619 und Blockade durch Iberiotoxin dieser Kanäle eine Beeinflussung der mitochondrialen Funktion vorliegt.

Forskolin aus der Gruppe der Diterpene wurde ursprünglich aus dem Harfenstrauch *Coleus forskohlii* extrahiert [118]. Es ist ein nicht selektiver Aktivator aller Isoformen der Adenylatcyclase, bis auf zwei Isoformen, die hauptsächlich in der Hyophyse bzw. Testikeln vorkommen [119]. Durch hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen bindet Forskolin an eine Bindungstasche der Adenylatcyclase und dadurch wird die Reaktion von ATP zu cAMP katalysiert, welches wiederum die PKA aktiviert [120]. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob die kardioprotektiven Effekte von Forskolin dosisabhängig sind und welche niedrigste Dosis von Forskolin für eine Reduktion der Infarktausdehnung nötig ist. Bisher existierten lediglich Daten von Huhn et al., die einen protektiven Effekt von Forskolin in den Konzentrationen von 300 µg/kg und 1000 µg/kg untersuchten und nachweisen konnten [98]. In dieser aktuellen Dosisfindungsserie zeigte sich, dass eine minimale Konzentration von 30 µg/kg einen kardioprotektiven Effekt besitzt. Eine niedrigere Dosierung (10 µg/kg) zeigte keinen protektiven Effekt und einer Steigerung der Konzentration (100 bzw. 300 µg/kg) folgte keine weitere Steigerung der Infarktgrößenreduktion [102].

Huhn et al. zeigten, dass Forskolin als direkter Adenylatcyclaseaktivator einen kardioprotektiven Effekt auslöst und dass dieser Effekt durch den PKA-Inhibitor H-89 aufgehoben wird [98]. Die PKA ist ein proximaler Regulator des mK_{Ca}-Kanals [66, 73] und die PKA wird wiederum durch den *second messenger* cAMP reguliert [74]. PKA [79, 121] und cAMP [78] scheinen entscheidende Schritte im Ablauf einer Kardioprotektion zu sein. Somit ist ein möglicher Signaltransduktionsweg von cAMP und PKA über den mK_{Ca}-Kanal [122] und einer damit verbunden verzögerten Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore (mPTP) möglich.

Untersuchung des funktionellen Zusammenhangs zwischen PKA und mK_{Ca}-Kanal

Eine Reihe von Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen deutet auf eine Bedeutung des PKA-mK_{Ca}-Kanal-Signalwegs im Ablauf einer Kardioprotektion hin [66, 73, 98, 122]. Dies wird auch durch zwei vorherige Arbeiten von Heinen et. al. und Huhn et. al. aus unserer Arbeitsgruppe unterstrichen, in denen der kardioprotektive Effekt von Helium durch den K_{Ca}-Kanal-Antagonist Iberiotoxin [45] und durch den PKA-Inhibitor H-89

[98] aufgehoben wird. Dies verdeutlicht den möglichen Einfluss des mK_{Ca}-Kanals und der PKA im Rahmen kardioprotektiver Interventionen. Jedoch fehlt bisher der direkte Nachweis, dass ein kardioprotektiver Effekt einer PKA-Aktivierung über eine mK_{Ca}-Kanalöffnung vermittelt wird. Es konnte bisher lediglich gezeigt werden, dass ein kardioprotektiver Effekt durch eine indirekte PKA-Aktivierung mittels Forskolin mit einem PKA-Inhibitor H-89 aufgehoben wird [98] und dass eine NS1619-induzierte mK_{Ca}-Kanal-Aktivierung durch Forskolin noch weiter gesteigert werden kann [66].

Iberiotoxin, ursprünglich aus dem Gift des roten indischen Skorpions isoliert, ist ein Peptid aus 37 Aminosäuren [123], welches mit hoher Affinität an den K_{Ca}-Kanal bindet und dessen Öffnungswahrscheinlichkeit und Dauer der Öffnung hemmt [124]. Es ist mittlerweile bekannt, dass es Iberiotoxin-resistente Kaliumkanäle gibt, die allerdings bisher nur in neuronalen Zellen gefunden werden konnten [125]. In der vorliegenden Arbeit zeigen wir, dass Iberiotoxin in der Lage ist, eine kardioprotektive Wirkung von Forskolin (indirekte PKA-Aktivierung) aufzuheben. Die Infarktgrößen bei gleichzeitiger Gabe von Forskolin und Iberiotoxin sind auf dem gleichen Niveau wie die der Kontrollgruppen. Forskolin vermag die Infarktgröße signifikant zu senken, wobei die alleinige Gabe von Iberiotoxin keinen Einfluss auf die Ausbreitung des Infarktgebietes zu haben scheint. Somit kann hiermit der Nachweis erbracht werden, dass eine PKA-Aktivierung mit dem Adenylatcyclaseaktivator Forskolin einen kardioprotektiven Effekt über den mK_{Ca}-Kanal vermittelt [102]. Zusammen mit den Hinweisen aus anderen genannten Arbeiten und eigenen Daten unterstützt dies die Überlegung, dass der Signalweg PKA-mK_{Ca}-Kanal eine entscheidende Kaskade in der Vermittlung kardioprotektiver Interventionen darstellt.

Kardioprotektion und Alter

Die Medizin wird aufgrund der demographischen Entwicklung immer häufiger Patienten behandeln, die aufgrund des hohen Alters und zahlreicher Komorbiditäten einer steigenden Gefahr einer ischämischen Herzerkrankung ausgesetzt sind. Neben Komorbiditäten, welche die Inzidenz myokardialer Ischämien steigern, unterliegen Kardiomyozyten altersabhängigen Veränderungen, die scheinbar einen Verlust kardioprotektiver Mechanismen zur Folge haben [87]. Ein Kernaspekt der vorliegenden Arbeit besteht in der Untersuchung, inwieweit eine Kardioprotektion durch Präkonditionierung über den PKA-mK_{Ca}-Kanal-Signalweg einer solchen

altersbedingten Veränderung ausgesetzt ist. Daher wurde der protektive Effekt, der in jungen Tieren ermittelten Konzentrationen in alten Versuchstieren gemessen und ein altersbedingter Verlust der Kardioprotektion durch eine altersbedingte Veränderung innerhalb des PKA-mK_{Ca}-Kanal-Singalweges untersucht.

Wie bereits beschrieben stellten sowohl Heinen et. al. und Huhn et. al. die Bedeutung des mK_{Ca}-Kanals [45] und der PKA [98] als wichtige Schritte in der Vermittlung kardioprotektiver Effekte heraus. Die erhobenen Daten zeigten, dass in den alten Rattenherzen (22-24 Monate) kein kardioprotektiver Effekt im Sinne einer Infarktgrößenreduktion messbar war [45]. Dies ließ die Autoren vermuten, dass die altersabhängigen Veränderungen am mK_{Ca}-Kanal oder der vorgeschalteten Signalkaskade begründet sein könnten [45]. Huhn et al. zeigten, dass eine direkte Aktivierung des mK_{Ca}-Kanals mittels NS1619 (11 µg/kg/min) in den alten Rattenherzen (22-24 Monate) eine ähnliche Infarktgrößenreduktion auslöst wie in jungen Rattenherzen [98]. Eine indirekte Aktivierung der PKA durch Forskolin (300 µg/kg) zeigte in alten Rattenherzen im Gegensatz zu jungen Herzen keinen kardioprotektiven Effekt [98]. Lediglich eine vielfach erhöhte Forskolin-Dosierung (1000 µg/kg) initiierte eine Kardioprotektion [98]. Dies könnte auf einen erhöhten Reizschwellenwert im Alter zurückzuführen sein, so dass bei stärkerem präkonditionerendem Stimulus doch eine Protektion im alten Herzen erreicht werden kann [87, 96]. Bei den Daten von Huhn et al. könnte die ausgelöste Kardioprotektion im alten Herzen durch NS1619 ebenfalls durch eine zu hohe Dosierung bei erhöhtem Schwellenwert ausgelöst worden sein. Um dies bei der vorliegenden Arbeit auszuschließen, führten wir, wie bereits erwähnt, die vorangegangene Dosisfindungsstudie durch. Die Ergebnisse von Huhn et al. zeigten also, dass eine direkte Aktivierung des mK_{Ca}-Kanals auch im Alter eine Kardioprotektion vermittelt, wohingegen eine indirekte Aktivierung der PKA keinen protektiven Effekt im Alter auslöst [98].

In unserer Serie zur Untersuchung der Wirkung kardioprotektiver Interventionen bei den alten Rattenherzen zeigte sich eine signifikante Infarktgrößenreduktion bei direkter Stimulierung des mK_{Ca}-Kanals mit NS1619 in den Konzentrationen, die wir in der Dosisfindungsstudie ermittelt haben und bei den jungen Tieren ebenfalls eine Kardioprotektion auslösen (als niedrigste wirksame Dosis 10 bzw. als nächsthöhere 30 µg/kg/min). Die Gabe des Adenylatcyclaseaktivators Forskolin in Dosierungen (30 bzw. 100 µg/kg), die bei den jungen Tieren eine Reduktion des Infarktes verursachen,

zeigte jedoch keinen protektiven Effekt bei den alten Tieren [102]. Dies untermauert das Ergebnis aus der o.g. Studie von Huhn et al., in der auch die nächsthöhere Dosis von 300 µg/kg keinen protektiven Effekt zeigte.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ursache des altersbedingten Protektionsverlustes in der Signalkaskade proximal des mK_{Ca}-Kanals liegt, möglicherweise bei einer veränderten Funktion und/oder Aktivität der PKA oder aber auch in der Regulierung oder Aktivität der Adenylatcyclase, sowie dessen *second messenger* cAMP. Denn eine Aktivierung der Signalkette auf Höhe des mK_{Ca}-Kanals löst bei jungen und alten Versuchstieren eine Kardioprotektion aus.

Daher wurde untersucht, ob im steigenden Alter eine Reduzierung des cAMP-Spiegels als Zeichen einer veränderten Adenylatcyclase-Aktivität vorliegt. Mittels ELISA wurden die basalen, als auch die durch Forskolin gesteigerten cAMP-Spiegel gemessen. Im jungen Myokard ist eine cAMP-Konzentration von 4,3±0,4 pmol/mg und in den alten Herzen von 3,4±0,5 pmol/mg messbar [102]. Lediglich diese nicht signifikante geringe Reduzierung ist im alten Myokard messbar, wobei jedoch bekannt ist, dass im Alter eine um etwa 20-30 % reduzierte enzymatische Aktivität der Adenylatcyclase vorliegt [126]. Nach der Applikation des Adenylatcyclaseaktivators Forskolin steigen im jungen wie im alten Herzen die cAMP-Spiegel gleichwertig an, wobei es keinen Unterschied zwischen jungen und alten Herzen gibt [102]. Somit scheinen keine altersbedingten Veränderungen der Adenylatcyclase im Myokard vorzuliegen und die Aktivität der Adenylatcyclase kann in gleichem Maße im jungen wie alten Myokard gesteigert werden. Dies deckt sich im Wesentlichen auch mit den Daten, die von Huhn et al. erhoben wurden [98]. Ein altersbedingter Wirkverlust kardioprotektiver Mechanismen lässt sich somit nicht auf der Ebene der Adenylatcyclase erklären.

Zur weiteren Klärung, ob eine altersbedingte Veränderung der PKA-Aktivität vorliegt, wurde diese in jungen und alten Rattenherzen anhand der Phosphorylierung von Phospholamban als Zielprotein der PKA [127] untersucht. Es zeigte sich, dass im jungen und alten Rattenmyokard ein ähnlicher basaler Phosphorylierungsgrad von Phospholamban vorliegt. Durch Forskolin stimuliert ist eine Steigerung der Phospholamban-Phosphorylierung messbar, die in jungen und alten Versuchstieren ebenfalls ähnlich ist. Somit begleitet eine Steigerung der cAMP-Spiegel durch Forskolin auch eine Steigerung der PKA-Aktivität und zwar ohne messbaren Einfluss des Alters

[102]. Dies ist insofern eine neue Erkenntnis, da Huhn et al. 2012 feststellten, dass im alten Herzen ein durch Forskolin gesteigerter cAMP-Spiegel nicht von einer gesteigerten PKA-Aktivität im alten Myokard begleitet wird, was diese Arbeitsgruppe als einen alterungsbedingten Unterschied in der PKA-Regulation interpretierten [98]. Allerdings wurde in dieser Studie eine Forskolin-Dosierung von 300 µg/kg eingesetzt. Diese Dosierung ist um den Faktor 10 höher als die Dosierung der vorliegenden Arbeit. Somit könnte der Hinweis auf alterungsbedingte Unterschiede durch Verwendung dieser „supra-pharmakologischen" Dosierung hervorgerufen sein. Diesen Umstand wollten wir mit der aktuellen Studie verhindern, indem wir durch den strukturellen Ansatz zunächst eine Dosisfindungsstudie durchführten. Insgesamt deuten unsere neuen Daten darauf hin, dass die Regulation der PKA keiner alterungsbedingten Veränderung unterliegt und somit auch nicht die Ursache des altersbedingten Verlustes der Kardioprotektion darstellen kann.

Diese neuen Erkenntnisse machen eine weitere Überlegung erforderlich, inwieweit ein altersabhängiger Wirkverlust im Signalweg der PKA und des mK_{Ca}-Kanals bedingt sein könnte. Es scheint also, dass eine Veränderung im Alter abwärts der PKA und proximal des mK_{Ca}-Kanals lokalisiert ist und dass möglicherweise der mK_{Ca}-Kanal nicht direkt durch die PKA sondern über einen oder mehrere Zwischenschritte reguliert wird. Ein möglicher Kandidat für die Interaktion zwischen PKA und mK_{Ca}-Kanal könnte Connexin43 sein. Die Gründe für diese Annahme werden im Folgenden genauer erläutert.

Connexin 43

Connexone werden Kanäle genannt, die aus Connexinen aufgebaut sind und für die Zell-Zell-Kommunikation eine entscheidende Rolle spielen [128], so auch im Herzen für eine abgestimmte Kontraktion des Myokards [99] und in der Signalvermittlung kardioprotektiver Mechanismen [99, 129].

Connexin43 (Cx43) ist das vorherrschende Connexin im Ventrikel [130]. Dabei ist es vor allem am Sarkolemm lokalisiert, wo sechs Connexine ein Connexon (*hemichannel*) bilden [129, 131]. Zwei dieser Connexone benachbarter Zellen bilden eine Pore, die für eine elektrische Kopplung der Zellen verantwortlich ist [129, 131]. Gruppierungen solcher Poren erzeugen *Gap junctions* [129]. Regulierung erfahren die Hemichannel dabei unter anderem durch eine Phosphorylierung von Cx43 [130-132]. Neben

Phosphatasen und verschiedenen Kinasen (PKC, PKG oder MAPK), besitzt auch die PKA mögliche Phosphorylierungsstellen am Cx43 [130, 133, 134], wie an Serin 364 am C-Terminus [135].

Der Phosphorylierungsgrad von Cx43 scheint bei der Ischämie eine wichtige Rolle zu spielen. Unter physiologischen Bedingungen ist Cx43 hauptsächlich phosphoryliert [130] und bleibt dies auch in der Anfangsphase einer Ischämie [136]. Jedoch scheint eine zunehmende Ischämiedauer mit einer weiteren Dephsosphorylierung verbunden zu sein [136, 137], die einerseits eine Öffnung Cx43-bildender Hemichannel [138, 139], andererseits eine Translokation von Cx43 nach intrazellulär zur Folge hat [137]. Die Öffnung von Hemichannels bewirkt einen Zellschaden [140], indem sie zum osmotischen Ungleichgewicht während einer Ischämie und Reperfusion beiträgt [138, 139] und ein Verlust der Volumenregulation geht dabei mit einem irreversiblen Ischämieschaden einher [141].

Ein Präkonditionierung sorgt für eine verringerte Dephosphorylierung von Cx43 [136, 142] und möglicherweise geringere Wahrscheinlichkeit für die dadurch beschriebenen Folgen für die Zelle. Auch die Translokation von Cx43 vom Sarkolemm zum Zytosol während der Ischämie ist durch Präkonditionierung erheblich reduziert [142]. Dies deutet auf eine Beteiligung von Cx43 in präkonditionierenden Mechanismen hin und folgerichtig zeigen Versuche mit Cx43-defizienten Mäusen, dass im Gegensatz zu Wildtypen, keine ischämische Präkonditionierung möglich ist [143, 144]. Allerdings scheinen dabei weniger die Gap junctions oder eine Zellkommunikation eine Rolle zu spielen, denn auch bei isolierten Kardiomyozyten aus Cx43-defizienten Mäusen sind keine kardioprotektiven Effekte nach simulierter Ischämie und Reperfusion zu beobachten [145]. Auch die Gabe von Diazoxid, ein Agens welches durch Einfluss auf den mK_{ATP}-Kanal und die ROS-Bildung präkonditionierend wirkt [146], zeigte in Cx43-defizienten Kardiomyozyten ein Defizit an reaktiven Sauerstoffspezies und einen Verlust der Protektion [147].

Übereinstimmend werden die Mitochondrien als entscheidende Vermittler in der Kardioprotektion gesehen [22, 141]. Cx43 ist in kardialen Mitochondrien vorhanden [107, 148-150] und dessen Gehalt kann durch ischämische Präkonditionierung gesteigert werden [107]. Ähnlich wie Cx43 am Sarkolemm, ist auch das mitochondriale Cx43 vor und nach ischämischer Präkonditionierung phosphoryliert und nach

langanhaltender Ischämie ebenfalls vollständig dephosphoryliert [107]. Somit reagiert das mitochondriale Cx43 ähnlich auf eine Ischämie und Präkonditionierung wie es bereits bei sarkolemmalen Cx43 nachgewiesen werden konnte [136, 142].

Somit existieren Hinweise, dass Cx43 ein wichtiger Baustein in der Vermittlung kardioprotektiver Mechanismen ist. Die genaue Rolle aber, die Cx43 dabei einnimmt, bleibt bisher ungeklärt. Es gibt jedoch Hinweise, die einen Einfluss von Cx43 in den PKA-mK_{Ca}-Kanal vermuten lassen. Es gibt eine Verbindung des mitochondrialen Kaliumeinstromes und Cx43 in Kardiomyozyten [150, 151]. Denn mitochondriales Cx43 trägt zu einem mitochondrialem Kaliumeinstrom bei [150] und sowohl in Cx43-defizienten Mäusen als auch durch Blockade von mitochondrialem Cx43 mittels GAP19 zeigte sich ein Rückgang in der Geschwindigkeit des Kalium-Einstroms [151]. Da diese Versuchsserien auch in Anwesenheit von Glibenclamid, einem K_{ATP}-Kanal-Blocker [152], durchgeführt wurden, kann nicht von einem Effekt von Cx43 auf den mK_{ATP}-Kanal ausgegangen werden [151]. Entweder bilden sich vermeintliche Cx43-basierte Hemichannel oder Cx43 besitzt Einfluss auf bereits vorhandene Kaliumkanäle, wie den mK_{Ca}-Kanal [151]. Damit wäre eine mögliche Verbindung des mK_{Ca}-Kanals und Cx43 gegeben. Zusammen mit der Erkenntnis, dass Cx43 ein Zielprotein der PKA ist [130, 133], lässt sich die Hypothese formulieren, dass ein kardioprotektiver Effekt von der PKA über Cx43 auf den mK_{Ca}-Kanal vermittelt wird.

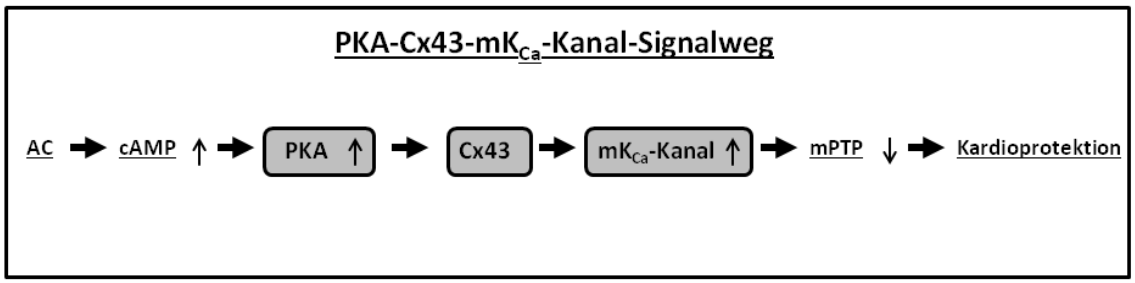

Abb. 17: PKA-Cx43-mK_{Ca}-Kanal-Signalweg

Dargestellt ist der mögliche Signaltransduktionsweg einer Kardioprotektion. AC=Adenylatcyclase, cAMP=cyclisches Adenosinmonophosphat, PKA=Proteinkinase A, Cx43=Connexin43, mK_{Ca}-Kanal=mitochondrialer Kalzium-abhängiger Kaliumkanal, mPTP=mitochondriale Permeabilitätspore [102]

Neben vielen anderen Proteinen und Signalmolekülen, existiert auch für Cx43 ein altersabhängiger Einfluss [86]. In den Ventrikeln von Hamstern [153] und dem Sinusknoten von Schweinen [154] ist ein reduzierter Gehalt von Cx43 im Alter messbar. Beim Menschen zeigt eine Studie, dass eine Verminderung von Cx43 mit einer Herzinsuffizienz assoziiert ist, die vermehrt zu Arrhythmien und kontraktiler Dysfunktion führt [155] und in solch einem Myokard scheint eine ischämische Präkonditionierung und Kardioprotektion aufgehoben [156]. Boengler et al. führen einen Verlust kardioprotektiver Maßnahmen bei alten Mäusen (>13 Monaten) auf den verringerten Gehalt von Cx43 sowohl am Sarkolemm als auch in Mitochondrien zurück [157]. Somit könnte auch eine alterungsbedingte Reduktion des Cx43-Gehaltes am Wirkverlust kardioprotektiver Mechnismen im Alter mitverantwortlich sein. Dabei scheint jedoch der Gehalt an mitochondrialem Cx43 der entscheidende Punkt zu sein, weniger als das Cx43, das an der Bildung von Gap junctions beteiligt ist [157]. Denn in den Experimenten, in denen beispielsweise nur das mitochondriale Cx43 reduziert war, konnte ein Verlust der Kardioprotektion beobachtet werden [148, 157]. Bisher hat sich gezeigt, dass lediglich subsarkolemmale Mitochondrien (SSM) Cx43 enthalten, interfibrilläre Mitochondrien (IFM) scheinen kein Cx43 zu enthalten [158]. Im Alter scheint jedoch lediglich die metabolische Funktion von IFM beeinträchtigt zu sein [93, 159]. Dies führt zu einer scheinbar widersprüchlichen Situation. Jedoch könnten die SSM vor allem wegen des vorhandenen Cx43 beim altersabhängigen Verlust der Kardioprotektion eine größere Rolle spielen, als die allgemeineren metabolischen Veränderungen der IFM im steigenden Alter [160]. Eventuell könnte auch die Kommunikation beider Populationen bei der Kardioprotektion im Alter beeinträchtigt sein [160].

Unsere Ergebnisse unterstreichen die Feststellung, dass eine Reduzierung des Cx43-Gehaltes im alten Herz der Ratten messbar ist. In der isolierten Mitochondrien-Fraktion (Fraktion M2) zeigte sich eine Reduzierung des Cx43-Gehaltes im alten Rattenmyokard [102]. Obwohl in der untersuchten Mitochondrienfraktion M2 keine nicht-mitochondrialen Proteine nachweisbar waren, ist nicht sicher auszuschließen, dass eine geringe Kontamination mit nicht-mitochondrialen Proteinen vorlag und daher könnte der geringere Gehalt zu einem Teil auch durch einen verminderten zellulären Cx43-Gehalt bedingt sein. Zudem konnte durch unsere Methode keine Trennung von IFM uns SSM erfolgen, so dass wir eine Mischpopulation ausgewertet haben.

Es lassen sich folgende Eigenschaften von Cx43 festhalten, die es als attraktiven Kandidaten erscheinen lassen, einen Einfluss auf den alterungsbedingten Wirkverlust kardioprotektiver Mechanismen in der Signalkette von PKA und mK_{Ca}-Kanal zu haben. Zunächst ist Cx43 das vorherrschende Connexin im Ventrikel [130] und ist neben der Bildung an Gap junctions auch an Signalwegen beteiligt [161]. Es ist neben der Existenz am Sarkolemm auch an der inneren Membran [107, 148-150] von subsarkolemmalen Mitochondrien [158] nachweisbar. Dort ist eine Beteiligung von Cx43 an der Regulierung des mitochondrialen Kaliumeinstroms festgestellt worden [151]. Cx43 besitzt Phosphorylierungstellen für die PKA [133, 135] und eine verminderte Dephosphorylierung während einer Ischämie ist verknüpft mit einer ischämischen Präkonditionierung [136, 142], während eine zunehmende Dephosporylierung mit Öffnung von Hemichannels [136, 138] und zunehmendem Zellschaden verbunden ist [140]. Des Weiteren ist Cx43 für eine Kardioprotektion notwendig [143] und ist nach ischämischer Präkonditionierung verstärkt vorhanden [107]. Dagegen ist im Alter jedoch ein verminderter Gehalt sowohl am Sarkolemm als auch an den Mitochondrien feststellbar [102, 156, 157]. Zusammenfassend deutet dies auf eine mögliche Interaktion von PKA, Cx43 und mK_{Ca}-Kanal im Rahmen einer Präkonditionierung hin. Allerdings muss sowohl die mechanistische Verbindung als auch eine mögliche Bedeutung von Cx43 als Ursache des alterungsbedingten Wirkverlustes kardioprotektiver Untersuchungen in zukünftigen Studien genauer untersucht werden. In unserer Arbeitsgruppe konnte zuletzt gezeigt werden, dass beim isolierten Rattenherz an einer Langendorff-Anlage durch eine Cx43-Inhibition mittels Gap-27 bzw. Heptanol keine Forskolin-induzierte Kardioprotektion auslösbar ist [102]. Dies deutet ebenfalls auf eine entscheidende Bedeutung von Cx43 im PKA-mK_{Ca}-Kanal Signalweg hin [102].

Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit konnte mehrere Fragen beantworten. Durch den strukturellen Ansatz ist zunächst geklärt worden, welche niedrigste Dosis für die pharmakologische Präkonditionierung *in vivo* mittels NS1619 und Forskolin in den jungen Ratten nötig ist und dass dadurch eine signifikante Infarktgrößenreduzierung in den jungen Tieren auszulösen ist. Durch die Verabreichung von Forskolin und Iberiotoxin ist gezeigt worden, dass die Signalkaskade ausgelöst durch PKA-Aktivierung über den mK_{Ca}-Kanal abläuft. Iberiotoxin konnte die Forskolin-induzierte Infarktgrößenreduktion

aufheben. Die Versuchsreihen zum altersabhängigen Wirkverlust demonstrieren, dass eine in den jungen Ratten wirksame Dosis Forskolin in den alten Ratten keine Protektion hervorruft. NS1619 hingegen führt auch bei alten Tieren mit gleicher Dosierung wie bei jungen Versuchstieren zu einer Infarktgrößenreduktion. Darauffolgende Untersuchungen einer somit altersabhängigen Regulations- und Funktionsänderung der PKA zeigen, dass es keinen Altersunterschied in der basalen PKA-Aktivität gibt. Weiterhin zeigt eine Forskolin-Behandlung keine Unterschiede in der Steigerung der PKA-Aktivität im Vergleich der jungen mit alten Tieren, mit denen ein altersabhängiger Wirkverlust zu erklären wäre. Dies lässt den Schluss zu, dass in der Signalkaskade von mK_{Ca}-Kanal und PKA ein oder mehrere weitere Signalschritte liegen müssen, die einem altersabhängigen Wirkverlust unterlegen sind. Dabei scheint Connexin43 ein vielversprechender möglicher Kandidat zu sein.

Zukünftige Untersuchungen sollten den funktionellen Zusammenhang von Connexin43 im Signalweg PKA-mK_{Ca}-Kanal und dessen Einfluss auf den alterungsbedingten Wirkverlust kardioprotektiver Mechanismen genauer aufklären.

Methodenkritik

Für die Untersuchung der kardioprotektiven Effekte von Forskolin und NS1619 nutzten wir in dieser Studie ein *open-chest in vivo* Modell. Dies sollte realitätsnahe Bedingungen schaffen und schließt auch Reaktionen des Organismus mit ein, wie variable Hämodynamik und humorale Einflussfaktoren, die in einem *in vitro* Modell nicht möglich wären. Allerdings bedingt dies auch eine Vielzahl an Einflussfaktoren, die allerdings durch die standardisierten Bedingungen während des Experiments minimiert wurden. Durch Verschluss der linken Koronararterie wurde bei allen Versuchstieren einen Myokardinfarkt ausgelöst. Von entscheidender Bedeutung für die Ausbreitung und Ausbildung des Infarktes sind die Dauer der Ischämie, die Temperatur und die kollaterale Blutversorgung. Alle Versuchstiere wurden einer 25-minütigen Ischämie unterzogen, da erfahrungsgemäß diese Dauer für eine irreversible Nekrose in den Kardiomyozyten ausreicht. Um starke Temperaturschwankungen zu vermeiden und somit die Infarktgrößen zu verändern, wurde eine konstante Temperatur der Tiere von 38°C mittels Wärmeplatte aufrecht erhalten. Zudem ist das Infarktmodell mit Ligatur der linken Koronararterie verständlicherweise abhängig vom Operateur und dessen Erfahrung, da die erfolgreiche Ligatur durch Hypokinesie und regionaler Zyanose

beurteilt wird. Die vorliegenden *in vivo* Versuche wurden von zwei Mitarbeitern der Klinik durchgeführt, die mit diesem Infarktmodell sehr vertraut und erfahren sind. Die entstehenden Infarktgrößen sind abhängig durch die Anlage der Ligatur und der unterschiedlichen Gefäßanlagen und anatomischen Normvarianten der Versuchstiere. Als Qualitätskriterium zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Auswertung der *area at risk* zwischen den einzelnen Tieren. Zudem besitzen kleine Nagetiere nur einen geringen bis gar keinen kollateralen Blutkreislauf [162], so dass es in unserer Untersuchung sehr unwahrscheinlich zu einer Beeinflussung der Infarktgrößen durch den kollateralen Blutkreislauf kam. Wir wählten Pentobarbital zur Narkoseeinleitung und –führung, da es keine pharmakologische Präkonditionierung induziert und nur einen geringen Einfluss auf die Hämodynamik besitzt. Es gibt allerdings den Hinweis, dass Pentobarbital den mK_{ATP}-Kanal inhibiert [163]. Daher können wir nicht ausschließen, dass die Pentobarbitalgabe auch in unserer Studie einen Einfluss auf die Messungen hat. Allerdings wurden alle Tiere identisch behandelt.

Die planimetrische Bestimmung der Infarktgrößen nach TTC-Färbung beinhaltet zwar eine methodische Ungenauigkeit, ist allerdings eine anerkannte und zuverlässige Methode zur Infarktgrößenmessung [164] und ist auch in unserer Klinik gut etabliert. Bei der Analyse war ich für die Gruppenzugehörigkeit der Tiere verblindet. Die Analyse wurde von einem zweiten Untersucher, der ebenfalls verblindet war, durchgeführt, und bestätigte das von mir erhobene Ergebnis. Für diese Färbemethode wird eine entsprechende Zeit benötigt, um Reduktionsäquivalente ausreichend aus dem infarzierten Gewebe auszuwaschen. In unserer Arbeitsgruppe hat sich eine Reperfusionszeit von 120 Minuten etabliert [45, 98].

5 Literaturverzeichnis

[1] Robert Koch Institut (Hrsg): *Gesundheit im Alter. Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. 2015, Berlin. DOI 10.17886/rkipubl-2015-003

[2] Statistisches Bundesamt (Hrsg): *Gesundheit im Alter*. Januar 2012, Wiesbaden. URL:https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Gesundheitszustand/GesundheitimAlter0120006109004.pdf?_blob=publicationFile (Stand 01.05.2017)

[3] Lakatta EG: *Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises: Part I: Aging Arteries: A "Set Up" for Vascular Disease.* Circulation 2003; 107(1): 139-146

[4] Lakatta EG: *Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises: Part II: The Aging Heart in Health: Links to Heart Disease.* Circulation 2003; 107(2): 346-354

[5] Lakatta EG: *Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises: Part III: Cellular and Molecular Clues to Heart and Arterial Aging*. Circulation 2003; 107(3): 490-497

[6] Mangano DT: *Perioperative Cardiac Morbidity.* Anesthesiology 1990; 72: 153-184

[7] Bottiger BW, Martin E: *[Prevention of perioperative myocardial ischemia--an update].* Anaesthesist 2000; 49(3): 174-86

[8] Robert-Koch-Institut, Abteilung für Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung (Hrsg): *Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2009"*, in *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. 2011, Berlin. ISBN 978-3-89606-206-2

[9] Renz-Polter H, Krautzig S: *Basislehrbuch Innere Medizin*. München: Elsevier; 2008; 4. Auflage: 29-196

[10] Jennings RB, Reimer KA: *The cell biology of acute myocardial ischemia.* Annu Rev Med 1991; 42: 225-46

[11] Schrader J: *Mechanisms of ischemic injury in the heart.* Basic Res Cardiol 1985; 80(Suppl 2): 135-139

[12] Damm M, Hubler A, Heller AR: *[Cardioprotection].* Anaesthesist 2011; 60(11): 1065-80

[13] Miyata H, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS: *Relation of mitochondrial and cytosolic free calcium to cardiac myocyte recovery after exposure to anoxia.* Circ Res 1992; 71(3): 605-13

[14] Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I: *The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning.* Biochim Biophys Acta 2007; 1767(8): 1007-31

[15] Piper HM, Kasseckert SA, Schluter KD, Abdallah Y: *[Pathophysiology of myocardial reperfusion injury].* Dtsch Med Wochenschr 2008; 133(12): 586-90

[16] Ladilov Y, Haffner S, Balser-Schafer C, Maxeiner H, et al.: *Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of Na^+/Ca^{2+} exchanger.* Am J Physiol 1999; 276(6 Pt 2): 1868-76

[17] Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM: *Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na^+/H^+ exchange.* Am J Physiol 1995; 268(4 Pt 2): 1531-9

[18] Matsumura K, Jeremy RW, Schaper J, Becker LC: *Progression of Myocardial Necrosis During Reperfusion of Ischemic Myocardium.* Circulation 1998; 97(8): 795-804

[19] Piper HM, Abdallah Y, Schafer C: *The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection.* Cardiovasc Res 2004; 61(3): 365-71

[20] Kharbanda RK: *Cardiac conditioning: a review of evolving strategies to reduce ischaemia-reperfusion injury.* Heart 2010; 96(15): 1179-86

[21] Griffiths EJ, Halestrap AP: *Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion.* Biochem J 1995; 307(Pt1): 93-8

[22] Murphy E, Steenbergen C: *Preconditioning: the mitochondrial connection.* Annu Rev Physiol 2007; 69: 51-67

[23] Halestrap AP: *Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection.* Cardiovascular Research 2004; 61(3): 372-385

[24] Javadov S, Karmazyn M: *Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening as an Endpoint to Initiate Cell Death and as a Putative Target for Cardioprotection.* Cell Physiol Biochem 2007; 20: 01-22

[25] Halestrap AP: *What is the mitochondrial permeability transition pore?* J Mol Cell Cardiol 2009; 46(6): 821-31

[26] Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balser C, et al.: *Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture.* Circulation 1997; 96(12): 4372-9

[27] Garcia-Dorado D, Theroux P, Desco M, Solares J, et al.: *Cell-to-cell interaction: a mechanism to explain wave-front progression of myocardial necrosis.* Am J Physiol 1989; 256(5 Pt2): 1266-73

[28] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.* Circulation 1986; 74(5): 1124-1136

[29] Moolman JA, Genade S, Winterbach R, Harper IS, et al.: *Preconditioning with a single short episode of global ischemia in the isolated working rat heart: effect on structure, mechanical function, and energy metabolism for various durations of sustained global ischemia.* Cardiovasc Drugs Ther 1995; 9(1): 103-15

[30] Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB: *Preconditioning the human myocardium.* Lancet 1993; 342(8866): 276-7

[31] Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF: *Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits.* Anesthesiology 1997; 87(5): 1182-90

[32] Abete P, Ferrara N, Cacciatore F, Madrid A, et al.: *Angina-induced protection against myocardial infarction in adult and elderly patients: a loss of preconditioning mechanism in the aging heart?* J Am Coll Cardiol 1997; 30(4): 947-54

[33] Rezkalla SH, Kloner RA: *Ischemic preconditioning and preinfarction angina in the clinical arena.* Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2004; 1(2): 96-102

[34] Fujita M, Sasayama S, Ohno A, Nakajima H, et al.: *Importance of angina for development of collateral circulation.* Br Heart J 1987; 57(2): 139-43

[35] Cortina A, Ambrose JA, Prieto-Granada J, Moris C, et al.: *Left ventricular function after myocardial infarction: clinical and angiographic correlations.* J Am Coll Cardiol 1985; 5(3): 619-24

[36] Muller DW, Topol EJ, Califf RM, Sigmon KN, et al.: *Relationship between antecedent angina pectoris and short-term prognosis after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction (TAMI) Study Group.* Am Heart J 1990; 119(2 Pt 1): 224-31

[37] Kloner RA, Shook T, Przyklenk K, Davis VG, et al.: *Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning?* Circulation 1995; 91(1): 37-45

[38] Matsuda Y, Ogawa H, Moritani K, Matsuda M, et al.: *Effects of the presence or absence of preceding angina pectoris on left ventricular function after acute myocardial infarction.* Am Heart J 1984; 108(4 Pt 1): 955-8

[39] Cribier A, Korsatz L, Koning R, Rath P, et al.: *Improved myocardial ischemic response and enhanced collateral circulation with long repetitive coronary occlusion during angioplasty: a prospective study.* J Am Coll Cardiol 1992; 20(3): 578-86

[40] Ottani F, Galvani M, Ferrini D, Sorbello F, et al.: *Prodromal angina limits infarct size. A role for ischemic preconditioning.* Circulation 1995; 91(2): 291-7

[41] Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, Scharbatke H, et al.: *The influence of mitochondrial K_{ATP}-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo.* Anesth Analg 2005; 101(5): 1252-60

[42] Redel A, Lange M, Jazbutyte V, Lotz C, et al.: *Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K^+ channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning.* Anesth Analg 2008; 106(2): 384-91

[43] Weber NC, Toma O, Wolter JI, Obal D, et al.: *The noble gas xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC-epsilon and p38 MAPK.* Br J Pharmacol 2005; 144(1): 123-32

[44] Pagel PS, Krolikowski JG, Shim YH, Venkatapuram S, et al.: *Noble gases without anesthetic properties protect myocardium against infarction by activating prosurvival signaling kinases and inhibiting mitochondrial permeability transition in vivo.* Anesth Analg 2007; 105(3): 562-9

[45] Heinen A, Huhn R, Smeele KM, Zuurbier CJ, et al.: *Helium-induced preconditioning in young and old rat heart: impact of mitochondrial Ca^{2+}-sensitive potassium channel activation.* Anesthesiology 2008; 109(5): 830-6

[46] Shintani Y, Node K, Asanuma H, Sanada S, et al.: *Opening of Ca^{2+}-activated K^+ channels is involved in ischemic preconditioning in canine hearts.* J Mol Cell Cardiol 2004; 37(6): 1213-8

[47] Murphy E, Steenbergen C: *What makes the mitochondria a killer? Can we condition them to be less destructive?* Biochim Biophys Acta 2011; 1813(7): 1302-8

[48] Griffiths EJ, Halestrap AP: *Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts.* J Mol Cell Cardiol 1993; 25(12): 1461-9

[49] Halestrap AP, Connern CP, Griffiths EJ, Kerr PM: *Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury.* Mol Cell Biochem 1997; 174(1-2): 167-72

[50] Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: *Biochemie & Pathobiochemie*. Würzburg: Springer Medizin Verlag; 2007: 203-204

[51] Halestrap AP: *A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection.* Biochem Soc Trans 2010; 38(4): 841-60

[52] Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, et al.: *The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore.* Nature 2004; 427(6973): 461-5

[53] Szabo I, Zoratti M: *The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore.* FEBS Lett 1993; 330(2): 201-5

[54] Crompton M, Virji S, Doyle V, Johnson N, et al.: *The mitochondrial permeability transition pore.* Biochem Soc Symp 1999; 66: 167-79

[55] Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, et al.: *Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death.* Nat Cell Biol 2007; 9(5): 550-5

[56] Kwong JQ, Davis J, Baines CP, Sargent MA, et al.: *Genetic deletion of the mitochondrial phosphate carrier desensitizes the mitochondrial permeability transition pore and causes cardiomyopathy.* Cell Death Differ 2014; 21(8): 1209-17

[57] Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, et al.: *Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death.* Nature 2005; 434(7033): 658-62

[58] Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, et al.: *Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D.* J Biol Chem 2005; 280(19): 18558-61

[59] Alavian KN, Beutner G, Lazrove E, Sacchetti S, et al.: *An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F_1F_O ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore.* Proc Natl Acad Sci USA 2014; 111(29): 10580-5

[60] Bonora M, Bononi A, De Marchi E, Giorgi C, et al.: *Role of the c subunit of the F_O ATP synthase in mitochondrial permeability transition.* Cell Cycle 2013; 12(4): 674-83

[61] Halestrap AP: *Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die.* Biochem Soc Trans 2006; 34(Pt 2): 232-7

[62] Martinou JC, Green DR: *Breaking the mitochondrial barrier.* Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2(1): 63-7

[63] Zimmermann KC, Green DR: *How cells die: apoptosis pathways.* J Allergy Clin Immunol 2001; 108(4 Suppl): S99-103

[64] Loubani M, Fowler A, Standen NB, Galinanes M: *The effect of gliclazide and glibenclamide on preconditioning of the human myocardium.* Eur J Pharmacol 2005; 515(1-3): 142-9

[65] Cao CM, Xia Q, Gao Q, Chen M, et al.: *Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning.* J Pharmacol Exp Ther 2005; 312(2): 644-50

[66] Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H: *Mitochondrial Ca^{2+}-activated K^+ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A.* Circulation 2005; 111(2): 198-203

[67] Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, et al.: *Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels. Possible mechanism of cardioprotection.* Circ Res 1997; 81(6): 1072-82

[68] Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E: *Mitochondrial ATP-Dependent Potassium Channels : Novel Effectors of Cardioprotection?* Circulation 1998; 97(24): 2463-2469

[69] Xu W, Liu Y, Wang S, McDonald T, et al.: *Cytoprotective role of Ca^{2+}- activated K^+ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane.* Science 2002; 298(5595): 1029-33

[70] Hausenloy DJ, Boston-Griffiths EA, Yellon DM: *Cyclosporin A and cardioprotection: from investigative tool to therapeutic agent.* Br J Pharmacol 2012; 165(5): 1235-45

[71] Heinen A, Camara AK, Aldakkak M, Rhodes SS, et al.: *Mitochondrial Ca^{2+}-induced K^+ influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential.* Am J Physiol Cell Physiol 2007; 292(1): 148-56

[72] Balderas E, Zhang J, Stefani E, Toro L: *Mitochondrial BK_{Ca} channel.* Front Physiol 2015; 6: 104

[73] Nishida H, Sato T, Miyazaki M, Nakaya H: *Infarct size limitation by adrenomedullin: protein kinase A but not PI3-kinase is linked to mitochondrial K_{Ca} channels.* Cardiovasc Res 2008; 77(2): 398-405

[74] Tasken K, Aandahl EM: *Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A.* Physiol Rev 2004; 84(1): 137-67

[75] Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG: *An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle.* J Biol Chem 1968; 243(13): 3763-5

[76] Zaccolo M: *Phosphodiesterases and compartmentalized cAMP signalling in the heart.* Eur J Cell Biol 2006; 85(7): 693-7

[77] Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, Asanuma H, et al.: *Cardioprotective Effect Afforded by Transient Exposure to Phosphodiesterase III Inhibitors: The Role of Protein Kinase A and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase.* Circulation 2001; 104(6): 705-710

[78] Lochner A, Genade S, Tromp E, Podzuweit T, et al.: *Ischemic Preconditioning and the Adrenergic Signal Transduction Pathway.* Circulation 1999; 100(9): 958-966

[79] Tong H, Bernstein D, Murphy E, Steenbergen C: *The role of beta-adrenergic receptor signaling in cardioprotection.* FASEB J 2005; 19(8): 983-5

[80] Clements RT, Terentyev D, Sellke FW: *Ca^{2+}-activated K^{+} channels as therapeutic targets for myocardial and vascular protection.* Circ J 2015; 79(3): 455-62

[81] Singh H, Lu R, Bopassa JC, Meredith AL, et al.: *MitoBK_{Ca} is encoded by the Kcnma1 gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location.* Proc Natl Acad Sci U S A 2013; 110(26): 10836-41

[82] Nara M, Dhulipala PD, Wang YX, Kotlikoff MI: *Reconstitution of beta-adrenergic modulation of large conductance, calcium-activated potassium (maxi-K) channels in Xenopus oocytes. Identification of the camp-dependent protein kinase phosphorylation site.* J Biol Chem 1998; 273(24): 14920-4

[83] Toro L, Wallner M, Meera P, Tanaka Y: *Maxi-K_{Ca}, a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily.* News Physiol Sci 1998; 13: 112-117

[84] Schubert R, Nelson MT: *Protein kinases: tuners of the BK_{Ca} channel in smooth muscle.* Trends Pharmacol Sci 2001; 22(10): 505-12

[85] Zhang J, Yan J: *Regulation of BK channels by auxiliary gamma subunits.* Front Physiol 2014; 5: 401

[86] Boengler K, Schulz R, Heusch G: *Loss of cardioprotection with ageing.* Cardiovasc Res 2009; 83(2): 247-61

[87] Juhaszova M, Rabuel C, Zorov DB, Lakatta EG, et al.: *Protection in the aged heart: preventing the heart-break of old age?* Cardiovasc Res 2005; 66(2): 233-44

[88] Jahangir A, Sagar S, Terzic A: *Aging and cardioprotection.* J Appl Physiol (1985) 2007; 103(6): 2120-8

[89] Murphy E, Steenbergen C: *Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury.* Cardiovasc Res 2007; 75(3): 478-86

[90] Kersten JR, Toller WG, Gross ER, Pagel PS, et al.: *Diabetes abolishes ischemic preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000; 278(4): 1218-24

[91] Shim YH, Kersten JR: *Preconditioning, anesthetics, and perioperative medication.* Best Pract Res Clin Anaesthesiol 2008; 22(1): 151-65

[92] Tani M, Suganuma Y, Hasegawa H, Shinmura K, et al.: *Decrease in ischemic tolerance with aging in isolated perfused Fischer 344 rat hearts: relation to increases in intracellular Na+ after ischemia.* J Mol Cell Cardiol 1997; 29(11): 3081-9

[93] Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, et al.: *Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure.* J Mol Cell Cardiol 2001; 33(6): 1065-89

[94] Bartling B, Friedrich I, Silber R-E, Simm A: *Ischemic preconditioning is not cardioprotective in senescent human myocardium.* The Annals of Thoracic Surgery 2003; 76(1): 105-111

[95] Abete P, Ferrara N, Cioppa A, Ferrara P, et al.: *Preconditioning does not prevent postischemic dysfunction in aging heart.* J Am Coll Cardiol 1996; 27(7): 1777-86

[96] Lee TM: *Loss of Preconditioning by Attenuated Activation of Myocardial ATP-Sensitive Potassium Channels in Elderly Patients Undergoing Coronary Angioplasty.* Circulation 2002; 105(3): 334-340

[97] Wu ZK, Pehkonen E, Laurikka J, Kaukinen L, et al.: *The protective effects of preconditioning decline in aged patients undergoing coronary artery bypass grafting.* J Thorac Cardiovasc Surg 2001; 122(5): 972-8

[98] Huhn R, Weber NC, Preckel B, Schlack W, et al.: *Age-related loss of cardiac preconditioning: impact of protein kinase A.* Exp Gerontol 2012; 47(1): 116-21

[99] Stahlhofen S: *Lokalisierung, Orientierung und Funktion von Connexin 43 in Kardiomyozyten-Mitochondrien* [Dissertation]. Fakultät für Biologie und Geografie, Universität Duisburg-Essen, 2010

[100] Holmuhamedov EL, Jovanovic S, Dzeja PP, Jovanovic A, et al.: *Mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels modulate cardiac mitochondrial function.* Am J Physiol 1998; 275(5 Pt 2): 1567-76

[101] Singh H, Lu R, Rodriguez PF, Wu Y, et al.: *Visualization and quantification of cardiac mitochondrial protein clusters with STED microscopy.* Mitochondrion 2012; 12(2): 230-6

[102] Heinen A, Strothoff M, Schmidt A, Stracke N, et al.: *Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK_{Ca} signaling pathway.* Exp Gerontol 2014; 56: 99-105

[103] Huhn R, Heinen A, Hollmann MW, Schlack W, et al.: *Cyclosporine A administered during reperfusion fails to restore cardioprotection in prediabetic Zucker obese rats in vivo.* Nutr Metab Cardiovasc Dis 2010; 20(10): 706-12

[104] Huhn R, Heinen A, Weber NC, Hollmann MW, et al.: *Hyperglycaemia blocks sevoflurane-induced postconditioning in the rat heart in vivo: cardioprotection can be restored by blocking the mitochondrial permeability transition pore.* Br J Anaesth 2008; 100(4): 465-71

[105] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J Biol Chem 1951; 193(1): 265-75

[106] MacLennan DH, Kranias EG: *Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility.* Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4(7): 566-77

[107] Boengler K, Dodoni G, Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, et al.: *Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning.* Cardiovasc Res 2005; 67(2): 234-44

[108] Devlin W, Cragg D, Jacks M, Friedman H, et al.: *Comparison of outcome in patients with acute myocardial infarction aged > 75 years with that in younger patients.* Am J Cardiol 1995; 75(8): 573-6

[109] Maggioni AP, Maseri A, Fresco C, Franzosi MG, et al.: *Age-related increase in mortality among patients with first myocardial infarctions treated with thrombolysis. The Investigators of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI-2).* N Engl J Med 1993; 329(20): 1442-8

[110] O'Rourke B: *Mitochondrial ion channels.* Annu Rev Physiol 2007; 69: 19-49

[111] Wu SN: *Large-conductance Ca^{2+}- activated K^+ channels:physiological role and pharmacology.* Curr Med Chem 2003; 10(8): 649-61

[112] Cancherini DV, Queliconi BB, Kowaltowski AJ: *Pharmacological and physiological stimuli do not promote Ca^{2+}-sensitive K^+ channel activity in isolated heart mitochondria.* Cardiovasc Res 2007; 73(4): 720-8

[113] Heinen A, Aldakkak M, Stowe DF, Rhodes SS, et al.: *Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca^{2+}-sensitive K^+ channels.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007; 293(3): 1400-7

[114] Aldakkak M, Stowe DF, Cheng Q, Kwok WM, et al.: *Mitochondrial matrix K^+ flux independent of large-conductance Ca^{2+}-activated K^+ channel opening.* Am J Physiol Cell Physiol 2010; 298(3): 530-41

[115] Stowe DF, Aldakkak M, Camara AK, Riess ML, et al.: *Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca^{2+}-sensitive K^+ channel opening requires superoxide radical generation.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006; 290(1): 434-40

[116] Wojtovich AP, Nadtochiy SM, Urciuoli WR, Smith CO, et al.: *A non-cardiomyocyte autonomous mechanism of cardioprotection involving the SLO1 BK channel.* PeerJ 2013; 1: 48

[117] Franciolini F, Hogg R, Catacuzzeno L, Petris A, et al.: *Large-conductance calcium-activated potassium channels in neonatal rat intracardiac ganglion neurons.* Pflugers Arch 2001; 441(5): 629-38

[118] Seamon KB, Daly JW: *Forskolin: its biological and chemical properties.* Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res 1986; 20: 1-150

[119] Hanoune J, Defer N: *Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms.* Annu Rev Pharmacol Toxicol 2001; 41: 145-74

[120] Tang WJ, Hurley JH: *Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases.* Mol Pharmacol 1998; 54(2): 231-40

[121] Sanada S, Asanuma H, Tsukamoto O, Minamino T, et al.: *Protein kinase A as another mediator of ischemic preconditioning independent of protein kinase C.* Circulation 2004; 110(1): 51-7

[122] Fukasawa M, Nishida H, Sato T, Miyazaki M, et al.: *6-[4-(1-Cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)butoxy]-3,4-dihydro-2-(1H)quinolinone (cilostazol), a phosphodiesterase type 3 inhibitor, reduces infarct size via activation of mitochondrial Ca^{2+}-activated K^{+} channels in rabbit hearts.* J Pharmacol Exp Ther 2008; 326(1): 100-4

[123] Ferrat G, Bernard C, Fremont V, Mullmann TJ, et al.: *Structural basis for alpha-K toxin specificity for K^{+} channels revealed through the solution 1H NMR structures of two noxiustoxin-iberiotoxin chimeras.* Biochemistry 2001; 40(37): 10998-1006

[124] Candia S, Garcia ML, Latorre R: *Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca^{2+}-activated K^{+} channel.* Biophys J 1992; 63(2): 583-90

[125] Wang B, Jaffe DB, Brenner R: *Current understanding of iberiotoxin-resistant BK channels in the nervous system.* Front Physiol 2014; 5: 382

[126] O'Connor SW, Scarpace PJ, Abrass IB: *Age-associated decrease of adenylate cyclase activity in rat myocardium.* Mech Ageing Dev 1981; 16(1): 91-5

[127] Tada M, Kirchberger MA, Katz AM: *Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase.* J Biol Chem 1975; 250(7): 2640-7

[128] Solan JL, Lampe PD: *Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly.* Biochim Biophys Acta 2005; 1711(2): 154-63

[129] Boengler K, Schulz R, Heusch G: *Connexin 43 signalling and cardioprotection.* Heart 2006; 92(12): 1724-7

[130] van Veen AA, van Rijen HV, Opthof T: *Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties.* Cardiovasc Res 2001; 51(2): 217-29

[131] Saez JC, Retamal MA, Basilio D, Bukauskas FF, et al.: *Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms.* Biochim Biophys Acta 2005; 1711(2): 215-24

[132] Lau AF, Hatch-Pigott V, Crow DS: *Evidence that heart connexin43 is a phosphoprotein.* J Mol Cell Cardiol 1991; 23(6): 659-63

[133] Shah MM, Martinez AM, Fletcher WH: *The connexin43 gap junction protein is phosphorylated by protein kinase A and protein kinase C: in vivo and in vitro studies.* Mol Cell Biochem 2002; 238(1-2): 57-68

[134] Schulz R, Boengler K, Totzeck A, Luo Y, et al.: *Connexin 43 in ischemic pre- and postconditioning.* Heart Fail Rev 2007; 12(3-4): 261-6

[135] TenBroek EM, Lampe PD, Solan JL, Reynhout JK, et al.: *Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP.* J Cell Biol 2001; 155(7): 1307-18

[136] Schulz R, Gres P, Skyschally A, Duschin A, et al.: *Ischemic preconditioning preserves connexin 43 phosphorylation during sustained ischemia in pig hearts in vivo.* FASEB J 2003; 17(10): 1355-7

[137] Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, Laing JG, et al.: *Dephosphorylation and Intracellular Redistribution of Ventricular Connexin43 During Electrical Uncoupling Induced by Ischemia.* Circulation Research 2000; 87(8): 656-662

[138] John SA, Kondo R, Wang SY, Goldhaber JI, et al.: *Connexin-43 Hemichannels Opened by Metabolic Inhibition.* Journal of Biological Chemistry 1999; 274(1): 236-240

[139] Li F, Sugishita K, Su Z, Ueda I, et al.: *Activation of connexin-43 hemichannels can elevate [Ca^{2+}]i and [Na^{+}]i in rabbit ventricular myocytes during metabolic inhibition.* J Mol Cell Cardiol 2001; 33(12): 2145-55

[140] Shintani-Ishida K, Uemura K, Yoshida K: *Hemichannels in cardiomyocytes open transiently during ischemia and contribute to reperfusion injury following brief ischemia.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007; 293(3): 1714-20

[141] Schulz R, Cohen MV, Behrends M, Downey JM, et al.: *Signal transduction of ischemic preconditioning.* Cardiovasc Res 2001; 52(2): 181-98

[142] Jain SK, Schuessler RB, Saffitz JE: *Mechanisms of delayed electrical uncoupling induced by ischemic preconditioning.* Circ Res 2003; 92(10): 1138-44

[143] Schwanke U, Konietzka I, Duschin A, Li X, et al.: *No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 283(4): 1740-2

[144] Schwanke U, Li X, Schulz R, Heusch G: *No ischemic preconditioning in heterozygous connexin 43-deficient mice--a further in vivo study.* Basic Res Cardiol 2003; 98(3): 181-2

[145] Li X, Heinzel FR, Boengler K, Schulz R, et al.: *Role of connexin 43 in ischemic preconditioning does not involve intercellular communication through gap junctions.* J Mol Cell Cardiol 2004; 36(1): 161-3

[146] Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, et al.: *Opening of Mitochondrial K_{ATP} Channels Triggers the Preconditioned State by Generating Free Radicals.* Circulation Research 2000; 87(6): 460-466

[147] Heinzel FR, Luo Y, Li X, Boengler K, et al.: *Impairment of diazoxide-induced formation of reactive oxygen species and loss of cardioprotection in connexin 43 deficient mice.* Circ Res 2005; 97(6): 583-6

[148] Rodriguez-Sinovas A, Boengler K, Cabestrero A, Gres P, et al.: *Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection.* Circ Res 2006; 99(1): 93-101

[149] Goubaeva F, Mikami M, Giardina S, Ding B, et al.: *Cardiac mitochondrial connexin 43 regulates apoptosis.* Biochem Biophys Res Commun 2007; 352(1): 97-103

[150] Miro-Casas E, Ruiz-Meana M, Agullo E, Stahlhofen S, et al.: *Connexin43 in cardiomyocyte mitochondria contributes to mitochondrial potassium uptake.* Cardiovasc Res 2009; 83(4): 747-56

[151] Boengler K, Ungefug E, Heusch G, Leybaert L, et al.: *Connexin 43 impacts on mitochondrial potassium uptake.* Front Pharmacol 2013; 4: 73

[152] Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, et al.: *Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K^+ channel from rat liver and beef heart mitochondria.* J Biol Chem 1992; 267(36): 26062-9

[153] Chen M, Jones DL: *Age- and myopathy-dependent changes in connexins of normal and cardiomyopathic Syrian hamster ventricular myocardium.* Can J Physiol Pharmacol 2000; 78(8): 669-78

[154] Jones SA, Lancaster MK, Boyett MR: *Ageing-related changes of connexins and conduction within the sinoatrial node.* J Physiol 2004; 560(Pt 2): 429-37

[155] Dupont E, Matsushita T, Kaba RA, Vozzi C, et al.: *Altered connexin expression in human congestive heart failure.* J Mol Cell Cardiol 2001; 33(2): 359-71

[156] Ghosh S, Standen NB, Galinianes M: *Failure to precondition pathological human myocardium.* J Am Coll Cardiol 2001; 37(3): 711-8

[157] Boengler K, Konietzka I, Buechert A, Heinen Y, et al.: *Loss of ischemic preconditioning's cardioprotection in aged mouse hearts is associated with reduced gap junctional and mitochondrial levels of connexin 43.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007; 292(4): 1764-9

[158] Boengler K, Stahlhofen S, van de Sand A, Gres P, et al.: *Presence of connexin 43 in subsarcolemmal, but not in interfibrillar cardiomyocyte mitochondria.* Basic Res Cardiol 2009; 104(2): 141-7

[159] Lesnefsky EJ, He D, Moghaddas S, Hoppel CL: *Reversal of mitochondrial defects before ischemia protects the aged heart.* FASEB J 2006; 20(9): 1543-5

[160] Wojtovich AP, Nadtochiy SM, Brookes PS, Nehrke K: *Ischemic preconditioning: the role of mitochondria and aging*. Exp Gerontol 2012; 47(1): 1-7

[161] Plotkin LI, Bellido T: *Bisphosphonate-induced, hemichannel-mediated, anti-apoptosis through the Src/ERK pathway: a gap junction-independent action of connexin43.* Cell Commun Adhes 2001; 8(4-6): 377-82

[162] Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM: *Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction.* Cardiovasc Res 1987; 21(10): 737-46

[163] Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, et al.: *Differential effects of anesthetics on mitochondrial K_{ATP} channel activity and cardiomyocyte protection.* Anesthesiology 2002; 97(1): 15-23

[164] Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando U, et al.: *Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique.* Am Heart J 1981; 101(5): 593-600

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: PKA-mK_{Ca}-Kanal-Signalweg 11

Abb. 2: Möglicher Signaltransduktionsweg der Kardioprotektion 15

Abb. 3: Versuchsprotokoll zur Untersuchung der Dosisabhängigkeit von Forskolin und NS1619 in jungen Wistar-Ratten 22

Abb. 4: Zusammenhang PKA-Aktivierung und mK_{Ca}-Kanal 24

Abb. 5: Kardioprotektion im alten Herzen 25

Abb. 6: Beispiel Infarktgrößenbestimmung durch TTC-Färbung 27

Abb. 7: Proteinbiochemische Analysen 28

Abb. 8: Aufbau der Transferkammer 33

Abb. 9: Dosisfindung Forskolin junge Ratten 41

Abb. 10: Dosisfindung NS1619 junge Ratten 42

Abb. 11: Einfluss der PKA auf die Forskolin-induzierte Kardioprotektion 44

Abb. 12: Kardioprotektion im alten Herzen 46

Abb. 13: Effekt von Forskolin auf den cAMP-Spiegel 47

Abb. 14: Effekt von Forskolin auf die PKA-Aktivität 49

Abb. 15: Reinheit der mitochondrialen Fraktion 50

Abb. 16: Semiquantitative Bestimmung von Cx43 51

Abb. 17: PKA-Cx43-mK_{Ca}-Kanal-Signalweg 61

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hämodynamische Messdaten 39

Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Professorin Dr. Inge Bauer und Privatdozent Dr. Dr. Ragnar Huhn für die freundliche Überlassung des Themas und hervorragende und freundliche Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit herzlichst bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Benedikt Pannen für die Möglichkeit in seiner Klinik experimentell zu forschen.

Mein außerordentlicher und herzlichster Dank gilt meinem Betreuer Herrn Privatdozent Dr. Dr. André Heinen. Zum einen für die Überlassung des Themas, aber auch weil er mich jederzeit mit seinem außerordentlichem Engagement unterstützt und mit seiner Freude für die Forschung begeistert hat. Vielen Dank für die stets freundliche und vor allem konstruktive Zusammenarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Claudia Dohle und Frau Yvonne Grüber bedanken, die mir im Labor jeden Tag eine große Hilfe waren und mich im Laboralltag unterstützt haben.