

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

Das Expressionsmuster der MicroRNA-1 und -21  
und des Tumorsuppressorgens *Programmed Cell Death 4*  
bei der anästhetischen Präkonditionierung mit Isofluran.  
- Molekularbiologische Untersuchung im Myokard der Ratte im Rahmen einer  
*in vivo*-Studie zum kardioprotektiven Effekt von Isofluran und  
den zugrunde liegenden Mechanismen -

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Julia Klara Niestegge  
2019

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

gez:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Hug Aubin

„Hätte man von Anbeginn der Welt alles dasjenige,  
was nützlich und heilsam ist,  
nur deßwegen unterlassen wollen,  
weil solches damahls, da es zuerst erfunden worden,  
noch neu und nicht im Gebrauch gewesen,  
wie viele Sachen würden denen Menschen fehlen,  
deren Nutze niemahls genug kan gepriesen werden.“

Dorothea Christiane Erxleben, 1742

## Zusammenfassung

Das Auftreten eines Myokardinfarktes (MI) während und nach einer Operation (perioperativer MI = PMI) gilt als häufigste perioperative vaskuläre Komplikation bei nicht-kardialen Eingriffen und ist mit einer hohen Mortalität assoziiert. Neben der durch die Ischämie hervorgerufenen Myokardnekrose im Rahmen eines (perioperativen) MIs kann eine Reperfusion paradoxerweise weitere Schäden am Herzen zur Folge haben, die in ihrer Gesamtheit als Ischämie-Reperfusion (I/R) -Schaden bezeichnet werden. Eine wirksame Methode zum Schutz des Myokards vor I/R-Schäden stellt die anästhetische Präkonditionierung (APC) dar. Verglichen mit der ischämischen Präkonditionierung (IPC) gilt sie als ähnlich effektive und zugleich risikoärmere kardioprotektive Intervention. Neben den Erkenntnissen zu MicroRNA (miR) -Expressionsveränderungen unter dem Einfluss von IPC und Hypoxie ist die Rolle der miRs bei der APC bislang noch wenig erforscht. Die Bedeutung des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1alpha (HIF-1 $\alpha$ ) für die APC und für definierte miRs lässt jedoch auf einen funktionellen Zusammenhang untereinander schließen. Daher war ein Ziel der Studie, den Effekt einer APC mit Isofluran auf die Expression der miR-1, -21 und das miR-21-Zielgen *Programmed Cell Death 4* (PDCD4) unter Berücksichtigung einer an der miR-Regulation potentiellen Beteiligung von HIF-1 $\alpha$  bzw. seinen Zielgenen im Myokard der Ratte zu untersuchen, um daraus Rückschlüsse auf molekulare Prinzipien der APC ziehen zu können. Ferner wurde das Nicht-Risikogebiet des Herzgewebes dahingehend untersucht, ob es im Rahmen einer APC und nachfolgenden I/R zu einem *remote* (fernen)-Effekt kommt, der Einfluss auf die Expression der untersuchten Faktoren nimmt.

Männliche Wistar-Ratten wurden randomisiert einer Sham-Behandlung, einer 30-minütigen Isofluranbehandlung, einer 25-minütigen Ischämie mit nachfolgender 120-minütiger Reperfusion oder einer Isofluranbehandlung mit anschließender I/R unterzogen (n = 6 pro Gruppe). Nach einer Versuchsdauer von 185 Minuten erfolgte die Herzentnahme. Die Expression der miR-1 und -21 sowie die der HIF-1 $\alpha$ -Zielgene Hämooxygenase (HO)-1 und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) wurde mit quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR) analysiert. Die Untersuchung der Expression des miR-21-Zielgens PDCD4 erfolgte mittels Western Blot Analyse. Statistik: t-Test, p < 0,05.

Eine 30-minütige Isofluranbehandlung mit anschließender 155-minütiger Erholungsphase führte zu einer signifikanten Zunahme des miR-21-Expressionslevels (172 %  $\pm$  56 %; p < 0,05) verglichen mit Sham und rief keine Veränderung im Expressionslevel der miR-1 hervor. Die Isofluranexposition resultierte in einem Anstieg der HO-1- (131 %  $\pm$  76 %; n. s.) und der VEGF-mRNA-Expression (143 %  $\pm$  22 %, p < 0,005) im Vergleich zu Sham. Das Expressionslevel des PDCD4-Proteins wurde durch Isofluran nicht verändert. Isofluranbehandlung mit nachfolgender I/R hatte im Nicht-Risikogebiet der linken Koronararterie keinen signifikanten Effekt auf die Expression der miRs und der HIF-1 $\alpha$ -Zielgene.

Wesentliches Ergebnis der Studie ist, dass Isofluran zu einer Induktion der als *hypoxia-regulated microRNA* (HRM) identifizierten miR-21 im Rattenmyokard führt. Die signifikante VEGF-Expressionssteigerung könnte dabei indirekt auf eine Beteiligung von HIF-1 $\alpha$  an der miR-21-Induktion hindeuten. Unter dem Einfluss von Isofluran mit nachfolgender I/R waren im präkonditionierten, jedoch nicht direkt der I/R ausgesetzten Herzgewebe keine Effekte von Isofluran nachweisbar. Dies könnte darauf hinweisen, dass es durch I/R möglicherweise zu einem *remote*-Effekt im Nicht-Risikogebiet kommt, der zu einer Nivellierung der zuvor gezeigten Expressionsveränderungen führt. Zur genauen Entschlüsselung myokardprotektiver APC-Mechanismen sind weitere Untersuchungen notwendig, um die APC mittels volatiler Anästhetika gezielt in der klinischen Praxis einsetzen und um somit die mit dem Auftreten von PMIs und I/R-Schäden assoziierte Morbidität und Mortalität reduzieren zu können.

## Summary

The occurrence of myocardial infarction (MI) during and after surgery (perioperative MI = PMI) is the most common perioperative vascular complication in noncardiac surgery and is associated with high mortality. In addition to ischemia-induced myocardial necrosis as part of a (perioperative) MI, reperfusion can paradoxically result in further damage to the heart, collectively referred to as ischemia-reperfusion (I/R) injury. An effective method of protecting the myocardium from I/R injury is called anesthetic preconditioning (APC). Compared to ischemic preconditioning (IPC), it is considered to be a similarly effective while at the same time a not as risky cardioprotective intervention. In addition to the findings on changes in microRNA (miR) expression under the influence of IPC and hypoxia, the role of miRs in APC is still poorly understood. However, the importance of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) for APC and defined miRs suggests a functional relationship between them. Therefore, one of the aims of the study was to investigate the effect of APC with isoflurane on the expression of miR-1, -21 and miR-21 target gene Programmed Cell Death 4 (PDCD4) in rat myocardium, taking into account the potential involvement of HIF-1 $\alpha$  and its target genes in miR regulation, in order to be able to draw conclusions about molecular principles of APC. In addition, the area of cardiac tissue not at risk was examined to determine whether a remote effect occurs in the context of APC and subsequent I/R, which influences the expression of the investigated factors. Male Wistar rats were randomly assigned to four groups (n = 6 each): sham treatment with no intervention, isoflurane treatment for 30 minutes, I/R with 25 minutes of ischemia and 120 minutes of reperfusion, and isoflurane treatment followed by I/R. The hearts were removed 185 minutes after the interventions were initiated. The expression of miR-1 and -21, HIF-1 $\alpha$  target genes heme oxygenase (HO)-1, and vascular endothelial growth factor (VEGF) were then analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The expression of the miR-21 target gene PDCD4 was analyzed by Western blot. Statistics: t-test, p < 0.05.

Isoflurane treatment followed by a 155-minute recovery period resulted in a significant increase in miR-21 expression levels (172 %  $\pm$  56 %, p < 0.05) compared to sham and did not change the expression level of miR-1. Isoflurane exposure led to an upregulation of HO-1 (131 %  $\pm$  76 %, n. s.) and VEGF mRNA expression (143 %  $\pm$  22 %, p < 0.005) compared to sham. The expression level of PDCD4 protein was not altered by isoflurane. Isoflurane treatment with subsequent I/R had no significant effect on the expression of miRs and HIF-1 $\alpha$  target genes in the non-risk area of the left coronary artery.

The principle finding of the study is that isoflurane leads to an induction of miR-21, which belongs to the group of hypoxia-regulated microRNAs (HRMs), in rat myocardium. The significant increase in VEGF expression could indirectly provide an indication of HIF-1 $\alpha$  involvement in miR-21 induction. Under the influence of isoflurane with subsequent I/R, no effects of isoflurane were detectable in heart tissue preconditioned but not directly exposed to I/R. This may indicate that I/R could lead to a remote effect in the area not at risk, resulting in a leveling of the previously shown expression changes. In order to determine further myocardial protective mechanisms of APC, additional studies are needed to target APC in clinical practice using volatile anesthetics, thereby reducing morbidity and mortality associated with the onset of PMIs and I/R injury.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AMI</b>	akuter Myokardinfarkt	<b>HIF-1<math>\beta</math></b>	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1beta
<b>AP-1</b>	Aktivator Protein-1	<b>HO</b>	Hämoxygenase
<b>APC</b>	anästhetische Präkonditionierung	<b>HRE</b>	<i>hypoxia responsive element</i>
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat	<b>HRMs</b>	<i>hypoxia-regulated microRNAs</i>
<b><i>Aqua dest.</i></b>	<i>Aqua destillata</i>	<b>HSP</b>	Hitzeschockprotein
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	<b>I/R</b>	Ischämie/Reperfusion
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin	<b>IPC</b>	ischämische Präkonditionierung
<b>CCD</b>	<i>charge-coupled device</i>	<b>ISO</b>	Isofluran
<b>cDNA</b>	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>CT</b>	<i>cycle threshold</i>	<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat	<b>KHK</b>	koronare Herzkrankheit
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure	<b>MAC</b>	minimale alveoläre Konzentration
<b>dNTPs</b>	Desoxyribonukleosid-triphosphate	<b>MAPK</b>	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<b>DTT</b>	Dithiothreitol	<b>MI</b>	Myokardinfarkt
<b>ECL</b>	<i>enhanced chemoluminescence</i>	<b>miR</b>	MicroRNA
<b>ERK1/2</b>	extrazellulär regulierte Kinase 1/2	<b>mPTP</b>	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-poren
<b>FA</b>	Formaldehyd	<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>FasL</b>	Fas Ligand	<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid	<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1alpha	<b>PDCD4</b>	<i>Programmed Cell Death 4</i>

<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3-Kinase	<b>rRNA</b>	ribosomale RNA
<b>PKC</b>	Proteinkinase C	<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>PMI</b>	perioperativer Myokardinfarkt	<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat
<b>PTEN</b>	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>	<b>SDS-PAGE</b>	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid	<b>snRNA</b>	<i>small nuclear RNA</i>
<b>qRT-PCR</b>	quantitative <i>Real-Time</i> PCR	<b>TBS-T</b>	<i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
<b>RIPC</b>	<i>Remote Ischemic Preconditioning</i>	<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure	<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>ROS</b>	reaktive Sauerstoffspezies	<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 PERIOPERATIVER MYOKARDINFARKT.....	2
1.2 ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN.....	3
1.3 KARDIOPROTEKTION DURCH PRÄKONDITIONIERUNG.....	5
1.3.1 Ischämische Präkonditionierung.....	6
1.3.2 Anästhetische Präkonditionierung.....	7
1.4 MICRORNAS.....	9
1.4.1 MicroRNA-1.....	10
1.4.2 MicroRNA-21.....	11
1.5 <i>PROGRAMMED CELL DEATH 4</i> .....	12
1.6 HYPOXIE-INDUZIERBARER FAKTOR-1ALPHA.....	13
1.7 ZIELGENE DES HYPOXIE-INDUZIERBAREN FAKTORS-1ALPHA.....	16
1.7.1 Hämoxxygenase-1.....	16
1.7.2 <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> .....	18
1.8 ZIEL DER ARBEIT.....	20
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>22</b>
2.1 BEZUGSQUELENNACHWEIS.....	22
2.1.1 Chemikalien.....	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.3 Geräte.....	23
2.1.4 Software.....	24
2.1.5 Substanzen für Reverse Transkription und quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	25
2.1.6 Proteinstandard.....	25
2.1.7 Antikörper.....	26
2.2 PUFFER UND LÖSUNGEN.....	26
2.2.1 RNA-Isolierung.....	26
2.2.2 Proteinisolierung.....	27
2.2.3 Western Blot.....	27
2.3 TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN.....	30
2.3.1 Chirurgische Präparation.....	30
2.3.2 Versuchsprotokoll für molekularbiologische Untersuchungen.....	31
2.4 BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AUF RNA-EBENE.....	33
2.4.1 RNA-Isolierung mit Trizol®.....	33
2.4.2 Reverse Transkription für quantitative <i>Real-Time</i> PCR (MicroRNA).....	34

2.4.3	Reverse Transkription für quantitative <i>Real-Time</i> PCR (Genexpression).....	35
2.4.4	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR .....	37
2.5	BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AUF PROTEINEBENE.....	42
2.5.1	Proteinisolierung.....	42
2.5.2	Proteinbestimmung nach Lowry .....	42
2.5.3	Western Blot Analyse .....	44
2.6	STATISTISCHE ANALYSE.....	50
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>51</b>
3.1	CHARAKTERISIERUNG DER MICRORNA-EXPRESSION .....	51
3.1.1	Effekt von Isofluran auf die Expression der MicroRNA-1.....	51
3.1.2	Effekt von Isofluran auf die Expression der MicroRNA-21.....	54
3.2	CHARAKTERISIERUNG DER GENEXPRESSION.....	56
3.2.1	Effekt von Isofluran auf die Expression der Hämoxxygenase-1 .....	57
3.2.2	Effekt von Isofluran auf die Expression des <i>Vascular Endothelial Growth Factors</i> .....	59
3.3	EFFEKT VON ISOFLURAN AUF DIE EXPRESSION VON <i>PROGRAMMED CELL DEATH 4</i> .....	61
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>63</b>
4.1	DISKUSSION DER METHODIK .....	64
4.1.1	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR zur Charakterisierung der RNA-Expression .....	64
4.1.2	Western Blot zur Charakterisierung der Proteinexpression.....	65
4.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....	67
4.2.1	Expressionsmuster der MicroRNA-1 und -21 bei der anästhetischen Präkonditionierung mit Isofluran.....	68
4.2.2	Expressionsmuster der Hämoxxygenase-1 und des <i>Vascular Endothelial Growth Factors</i> als Zielgene des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1alpha bei der anästhetischen Präkonditionierung mit Isofluran.....	73
4.2.3	Expressionsmuster des MicroRNA-21-Zielgens <i>Programmed Cell Death 4</i> bei der anästhetischen Präkonditionierung mit Isofluran.....	78
4.3	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK.....	81
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>83</b>
<b>6.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>108</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Mechanismen und Mediatoren des Reperfusionsschadens .....	5
<b>Abb. 2:</b> Schematische Darstellung der Regulation des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1alpha unter Normoxie und Hypoxie.....	16
<b>Abb. 3:</b> Schematische Darstellung der an der anästhetischen Präkonditionierung mit Isofluran potentiell beteiligten Faktoren und ihre mögliche Regulation .....	21
<b>Abb. 4:</b> Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls für RNA- und Proteinanalysen.....	32
<b>Abb. 5:</b> Exemplarische Darstellung eines RNA-Intaktheitsgels.....	34
<b>Abb. 6:</b> Berechnung der relativen Expression (Ratio) mithilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode.....	38
<b>Abb. 7:</b> Exemplarische Darstellung einer Standardreihe für die Proteinbestimmung nach Lowry.....	44
<b>Abb. 8:</b> Lambert-Beer'sches Gesetz zur Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon\lambda$ .....	44
<b>Abb. 9:</b> Vereinfachte Darstellung der <i>enhanced chemoluminescence</i> -Reaktion.....	48
<b>Abb. 10:</b> Expression der MicroRNA-1 in scheinoperierten Tieren und nach Isoflurangabe.....	52
<b>Abb. 11:</b> Expression der MicroRNA-1 nach Ischämie/Reperfusion und nach Isoflurangabe mit nachfolgender Ischämie/Reperfusion .....	53
<b>Abb. 12:</b> Expression der MicroRNA-21 in scheinoperierten Tieren und nach Isoflurangabe.....	54
<b>Abb. 13:</b> Expression der MicroRNA-21 nach Ischämie/Reperfusion und nach Isoflurangabe mit nachfolgender Ischämie/Reperfusion .....	55
<b>Abb. 14:</b> Expression der Hämoxxygenase-1 in scheinoperierten Tieren und nach Isoflurangabe.....	57
<b>Abb. 15:</b> Expression der Hämoxxygenase-1 nach Ischämie/Reperfusion und nach Isoflurangabe mit nachfolgender Ischämie/Reperfusion .....	58
<b>Abb. 16:</b> Expression des <i>Vascular Endothelial Growth Factors</i> in scheinoperierten Tieren und nach Isoflurangabe .....	59
<b>Abb. 17:</b> Expression des <i>Vascular Endothelial Growth Factors</i> nach Ischämie/Reperfusion und nach Isoflurangabe mit nachfolgender Ischämie/Reperfusion .....	60
<b>Abb. 18:</b> Repräsentativer Western Blot für <i>Programmed Cell Death 4</i> und das Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.....	61

**Abb. 19:** Expression von *Programmed Cell Death 4* in scheinoperierten Tieren und nach Isoflurangabe..... 62

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Verzeichnis der verwendeten primären und sekundären Antikörper.....	26
<b>Tabelle 2:</b>	Mastermix des <i>TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kits</i> für Reverse Transkription .....	35
<b>Tabelle 3:</b>	Temperaturprogramm für Reverse Transkription (MicroRNA) .....	35
<b>Tabelle 4:</b>	Komponenten des <i>High Capacity RNA-to-cDNA™ Master Mix</i> .....	36
<b>Tabelle 5:</b>	Reaktionsmix für Reverse Transkription.....	36
<b>Tabelle 6:</b>	Temperaturprogramm für Reverse Transkription (Genexpression, Gruppen SHAM und ISO).....	36
<b>Tabelle 7:</b>	Mastermix des <i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits</i> für Reverse Transkription .....	37
<b>Tabelle 8:</b>	Temperaturprogramm für Reverse Transkription (Genexpression, Gruppen I/R und ISO + I/R) .....	37
<b>Tabelle 9:</b>	Verdünnung der cDNA mit RNase-freiem Wasser (MicroRNA).....	39
<b>Tabelle 10:</b>	Reaktionsmix für quantitative <i>Real-Time</i> PCR (MicroRNA).....	39
<b>Tabelle 11:</b>	Übersicht über die verwendeten <i>TaqMan® MicroRNA Assays 20X</i> .....	39
<b>Tabelle 12:</b>	Verdünnung der cDNA mit RNase-freiem Wasser (Genexpression) .....	40
<b>Tabelle 13:</b>	Reaktionsmix für quantitative <i>Real-Time</i> PCR (Genexpression) .....	40
<b>Tabelle 14:</b>	Übersicht über die verwendeten <i>TaqMan® Gene Expression Assays 20X</i> .....	40
<b>Tabelle 15:</b>	Programm für quantitative <i>Real-Time</i> PCR im 7300 <i>Real-Time</i> PCR <i>Cycler</i> (MicroRNA).....	41
<b>Tabelle 16:</b>	Programm für quantitative <i>Real-Time</i> PCR im 7300 <i>Real-Time</i> PCR <i>Cycler</i> (Genexpression) .....	41
<b>Tabelle 17:</b>	Standardreihe für Proteinbestimmung nach Lowry .....	43
<b>Tabelle 18:</b>	Zusammensetzung eines 10%igen Trenn- und eines 6%igen Sammelgels.....	46

# 1. Einleitung

Die globale Verteilung der häufigsten Todesursachen ist sehr stark vom Entwicklungsgrad der Länder abhängig. Während in Entwicklungsländern vor allem Infektionskrankheiten, wie z. B. Infektionen der Atemwege und Diarrhoe sowie HIV/AIDS, Tuberkulose und Malaria zu den Haupttodesursachen zählen, versterben die Menschen in den Industrienationen vorrangig an chronischen Krankheiten, beispielsweise an kardiovaskulären Erkrankungen, Demenz, Krebs, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung oder Diabetes. Trotz dieses Verteilungsgradienten von bestimmten Krankheiten in armen und reichen Ländern führen Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems weltweit und deutschlandweit gesehen am häufigsten zum Tod (1).

Den aktuellsten Daten des Statistischen Bundesamtes (Destatis) zufolge bestand die Haupttodesursache im Jahr 2015 nach der Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD) in einer Erkrankung des Kreislaufsystems. Ihr Anteil an den insgesamt 925200 Verstorbenen betrug 38,5 %. Eine weitere Differenzierung der Kreislauserkrankungen zeigt, dass 13,9 % der Betroffenen an einer ischämischen Herzkrankheit und, dieser Erkrankungsgruppe zugeordnet, 8,2 % an einer chronischen ischämischen Herzkrankheit (Synonym: Koronare Herzkrankheit = KHK) sowie 5,3 % an einem akuten Myokardinfarkt (AMI) verstarben. In Relation zu den insgesamt im Jahr 2015 Verstorbenen stellen demnach die KHK und der AMI die beiden häufigsten Todesursachen dar (2).

Die dominierende Position der KHK in der Todesursachenstatistik macht die Relevanz der Erkrankung und eine ihrer potentiell tödlichen Folgen, den Myokardinfarkt (MI), in der Medizin und in der Forschung deutlich. Einen besonderen Stellenwert im operativen *Setting* nimmt der so genannte perioperative Myokardinfarkt (PMI) ein. Er tritt als häufigste perioperative vaskuläre Komplikation bei nicht-kardialen Eingriffen auf und ist mit einer schlechten Überlebensprognose assoziiert (3-5). Aus diesem Grund stellt das Aufdecken und Verstehen kardioprotektiver Mechanismen einen essentiellen Forschungszweig dar, mit dem übergeordneten Ziel, durch die Entwicklung protektiv wirksamer Methoden die postoperative Morbidität und Mortalität zu reduzieren.

In den nächsten Abschnitten werden daher relevante klinische Aspekte und die konkreten Untersuchungsfaktoren, die Gegenstand der Dissertation sind, erläutert.

## 1.1 Perioperativer Myokardinfarkt

Bei einem MI kommt es, meist durch die Ruptur einer arteriosklerotisch bedingten Plaque, zu einer hochgradigen Stenose bzw. zu einem thrombotischen Verschluss einer Herzkranzarterie. Die daraus resultierende Sauerstoffminderversorgung des Herzmuskelgewebes führt schließlich zu einer ischämischen Myokardnekrose (6).

Nach der 3. allgemeinen Definition des MIs, die auf dem Konsens eines internationalen Expertenkomitees beruht, gibt es verschiedene Kriterien, die zur Diagnosestellung eines AMIs herangezogen werden. Darunter fällt der Anstieg herzspezifischer Biomarker (bevorzugterweise Troponin) in Kombination mit mindestens einem weiteren der folgenden Kriterien: Klinische Symptomatik, die auf eine Myokardischämie hindeutet, ischämieassoziierte EKG-Veränderungen (z. B. ST-Streckenhebungen), Auffälligkeiten in der bildgebenden Diagnostik (z. B. Bewegungsarmut des Myokards) sowie Nachweis eines intrakoronaren Thrombus mittels Angiographie oder Autopsie (3).

Im Gegensatz dazu stellt das Diagnostizieren eines PMIs oftmals eine große Herausforderung dar (7), wenn es sich an den oben genannten Kriterien des Expertenkonsenses orientiert, denn häufig fehlen ischämische Symptome (4), und richtungweisende EKG-Auffälligkeiten sind nur vorübergehend detektierbar (8). Anders als bei dem bevorzugt zu bestimmenden Troponin können die Creatinkinase-MB (CK-MB) -Isoenzyme durch einen gleichzeitig bestehenden Untergang von Skelettmuskelzellen an Sensitivität und Spezifität verlieren (9), sodass sie für die Diagnose nicht mehr wegweisend sein können. Die erschwerte Diagnosestellung und die daraus oftmals resultierende therapeutische Handlungsunfähigkeit stellen somit denkbare Gründe für die mit dem PMI assoziierte schlechte Überlebensprognose dar.

In der 2011 publizierte Kohortenstudie von Devereaux *et al.* (4) betrug die 30-Tages-Mortalität nach nicht-kardialer Operation bei Patienten mit PMI 11,6 %. Im Vergleich dazu lag die Mortalität bei den Patienten ohne zuvor erlittenen PMI bei 2,2 %. Hinzu kommt, dass über 65 % der Patienten, die einen PMI erfuhren, dabei keine ischämischen Symptome äußerten. Unabhängig vom Vorliegen oder Fehlen einer ischämischen Beschwerdesymptomatik fiel die Mortalität in der Gruppe mit PMI jedoch ähnlich hoch aus. Die über 5-fach erhöhte Mortalität bei den Patienten mit PMI macht deutlich, dass das Auftreten eines PMIs das postoperative Outcome der Patienten maßgeblich beeinflusst. Neben der Bedeutung regelmäßiger postoperativer Troponinkontrollen zur Identifizierung von Risikopatienten bzw. zur frühzeitigen Detektion von PMIs (4, 5, 10) könnte die Erforschung kardioprotektiver Mechanismen somit dazu verhelfen, das Auftreten dieser Komplikation zu reduzieren oder gar zu verhindern.

Neben der initialen Myokardischämie, die einen AMI bzw. PMI hervorruft, kann es paradoxerweise durch die Reperfusion des Myokards zu weiteren Schäden am Herzen kommen. Im Hinblick auf die von beiden Ereignissen ausgehende Gewebeschädigung wurde der Begriff Ischämie-Reperfusion (I/R) -Schaden geprägt. Die Pathophysiologie des myokardialen I/R-Schadens wird im Folgenden beschrieben.

## 1.2 Ischämie-Reperfusionsschaden

Das Ausmaß des Schadens nach einer Myokardischämie ist abhängig von der Dauer der Sauerstoffminderversorgung, denn bei einem rasch reperfundierten Gewebe ist der ischämische Schaden der Kardiomyozyten reversibel. Als klinische Beispiele, bei denen kurzzeitige ischämische Sequenzen auftreten, ohne dass es zum Zelltod kommt, sind die *Angina pectoris*, Koronarspasmen und die Ballonangioplastie anzuführen (11, 12).

Auf der biochemischen Ebene kommt es während der ischämischen Periode zu einer verminderten mitochondrialen Produktion von Adenosintriphosphat (ATP). Des Weiteren führt die anaerobe Glykolyse über eine Laktatakkumulation zu einer Reduktion des intrazellulären pH-Wertes. Diese Prozesse bedingen unter anderem eine herabgesetzte Funktionsfähigkeit der Natrium-Kalium-ATPase ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ) sowie eine gesteigerte Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers, sodass es zu einem vermehrten  $\text{Na}^+$ -Einstrom in die Zelle kommt. Die erhöhte intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration führt zu einer Richtungsumkehr der von dem  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher transportierten Ionen. Infolgedessen werden nun drei  $\text{Na}^+$ -Ionen nach außen und im Gegenzug ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion nach innen transportiert, was mit einem massiven Anstieg der cytosolischen und mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verbunden ist (13, 14).

Mit zunehmender Dauer und Intensität der myokardialen Ischämie kann es zu einer Schädigung der Kardiomyozyten kommen (15). Zwar wird dem minderversorgten Gewebe durch eine Reperfusion wieder Sauerstoff zugeführt, allerdings tritt paradoxerweise eine Kardiomyozytendysfunktion ein, welche als Reperfusionsschaden bezeichnet wird (15, 16).

Im klinischen Bereich kann die Reperfusion nach einer Ischämie beispielsweise durch eine Thrombolyse bei AMI, durch eine Angioplastie oder in Form des wiederhergestellten Blutflusses nach einer Kardioplegie erfolgen (15). Als zellschädigende Abläufe werden bei der Reperfusion auf biochemischer Ebene unter anderem Veränderungen des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts, mikrovaskuläre und endotheliale Dysfunktion, Aktivierung von Neutrophilen, Thrombozyten und Komplementfaktoren diskutiert (15). Des Weiteren werden während der Reperfusion reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt, die zur Öffnung von mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-poren (mPTP) führen und zusammen mit den zellulären

Veränderungen in der ischämischen Phase mitunter eine Ursache für Zelltod durch Nekrose oder Apoptose infolge von I/R darstellen (17).

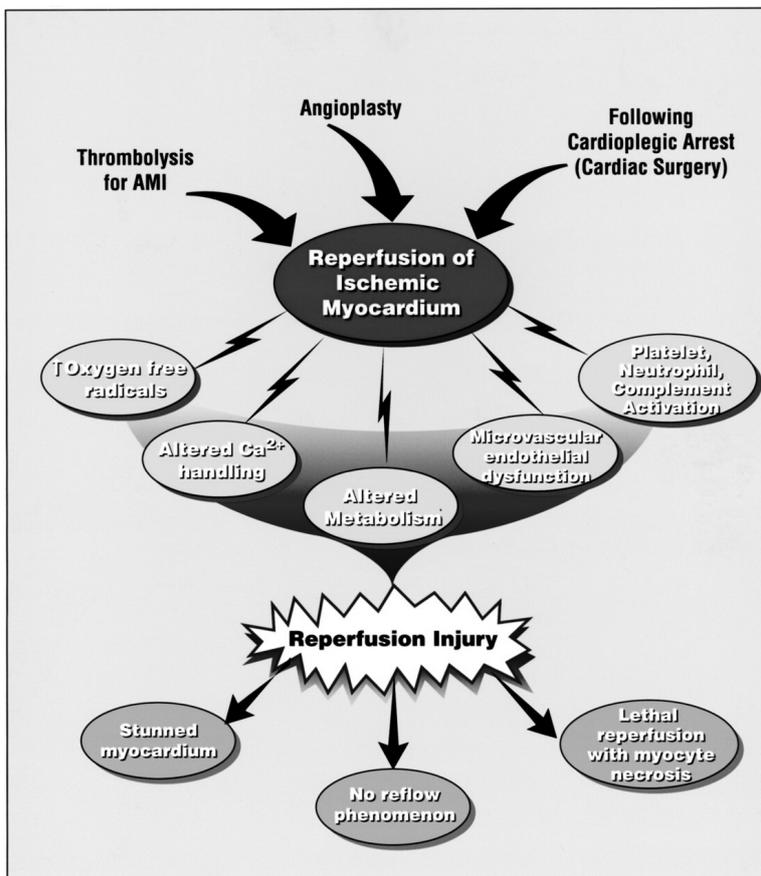
Der Reperfusionsschaden kann sich je nach Schweregrad der Ischämie und des daraus resultierenden Gewebeschadens in verschiedenen Erscheinungsbildern äußern. Diese reichen von Arrhythmien, myokardialem *Stunning* über mikrovaskuläre und endotheliale Schäden bis hin zu irreversiblen Zellschäden (15, 18).

Unter dem von Heyndrickx *et al.* im Jahr 1975 (19) geprägten Phänomen des *stunned* Myokardiums versteht man eine „anhaltende postischämische Dysfunktion vitalen Gewebes durch Reperfusion“ (11, 20). Gekennzeichnet durch diese reversible Kontraktionsstörung beschreibt das *Stunning* demnach den langsamen Prozess der Erholung und der Wiedererlangung der Funktionsfähigkeit des Myokards nach der Ischämie (11, 20). Die Regenerationszeit des Herzmuskelgewebes ist dabei mitunter von der Intensität der Ischämie und dem adäquaten Eintreten der arteriellen Reperfusion abhängig (11, 21).

Neben dem myokardialen *Stunning* kann der Reperfusionsschaden auch die mikrovaskuläre Ebene betreffen (22, 23) und sich als so genanntes „*no-reflow*“-Phänomen (24) manifestieren. Dieses basiert auf einer mikrovaskulären Dysfunktion, bei der es durch die Reperfusion zu Endothelzellschäden kommt. Die daraus resultierende Vasokonstriktion, Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung etc. kann eine Einschränkung der Durchblutung im Rahmen der Reperfusion verursachen (15).

Nach sehr schweren Myokardischämien kann sich der Reperfusionsschaden letztlich in Form von Nekrosen zeigen, die histopathologisch als Kontraktionsbandnekrosen bezeichnet werden. Bei dieser Form der Nekrose kommt es durch den reperfusionsbedingten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu hochfrequenten Kontraktionen der Myofibrillen und dadurch zum Einreißen des Sarkolemm. Der entstehende Schaden ist irreversibel und damit die schwerste Folge eines I/R-Ereignisses (15, 25). Die aus klinischer Perspektive am I/R-Schaden beteiligten Vorgänge sind in Abbildung 1 dargestellt.

Die genannten Manifestationsarten des I/R-Schadens zeigen die Bedeutsamkeit der Untersuchung protektiver Mechanismen auf, die das Herz vor einem solchen Schaden schützen können. Ein Beispiel für einen protektiven Mechanismus stellt dabei die Präkonditionierung dar, die im Folgenden erläutert wird.



**Abb. 1: Mechanismen und Mediatoren des Reperfusionsschadens.**

Im klinischen Bereich kann die Reperfusion nach einer schweren Myokardischämie unter anderem durch eine Thrombolyse bei akutem Myokardinfarkt (AMI), durch eine Angioplastie oder nach einer Kardioplegie wiederhergestellt werden. Über verschiedene Mediatoren und Prozesse, beispielsweise Freisetzung von ROS, Veränderungen des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts, Veränderungen des Myokardstoffwechsels, mikrovaskuläre und endotheliale Dysfunktion, Aktivierung von Neutrophilen, Thrombozyten und Komplementfaktoren, entsteht folglich ein Reperfusionsschaden. Dieser kann sich dabei unter anderem in Form des myokardialen *Stunnings*, mikrovaskulären Schäden oder einer Zellnekrose zeigen. Grafik übernommen von Verma *et al.* (15).

### 1.3 Kardioprotektion durch Präkonditionierung

Unter dem Begriff Präkonditionierung versteht man allgemein eine durch einen Stimulus oder eine Folge von Stimuli hervorgerufene Aktivierung endogener Mechanismen, die für eine bestimmte Zeit die Toleranz eines Gewebes gegen die Folgen einer nachfolgenden längeren I/R erhöhen.

Myokardiale Präkonditionierungseffekte können durch zahlreiche Stimuli erzielt werden, z. B. durch kurze Ischämie mit Reperfusion (ischämische Präkonditionierung = IPC) (26), Fernpräkonditionierung (*Remote Ischemic Preconditioning* = RIPC) (27, 28), Katecholamine (29), Dehnung des Myokards (30), Morphin (31), Edelgase, wie z. B. Helium (32) und das

anästhetisch wirksame Xenon (33, 34) sowie volatile Anästhetika (anästhetische Präkonditionierung = APC), beispielsweise Isofluran (35, 36), Halothan (35), Desfluran (37) und Sevofluran (37).

### 1.3.1 Ischämische Präkonditionierung

Die IPC, *per definitionem* kurze repetitive Ischämien gefolgt von Reperfusionsphasen, wurde erstmalig von Murry *et al.* (26) im Jahre 1986 beschrieben. Sie konnten in *in vivo*-Experimenten an Hunden zeigen, dass der Wechsel von vier 5-minütigen Okklusions- und 5-minütigen Reperfusionsphasen gefolgt von einer 40-minütigen Ischämie und einer 4-tägigen Nachbeobachtungsphase die Infarktgröße im Vergleich zu den nicht präkonditionierten Tieren auf 25 % reduzierte.

In einer vorangegangenen Studie derselben Arbeitsgruppe (38) wurde die Auswirkung einer IPC auf zwei Vorgänge untersucht, die im Rahmen eines I/R-Schadens von Bedeutung sind. Dazu zählen der infolge einer Ischämie entstehende ATP-Mangel sowie das mögliche Auftreten einer Nekrose. Als Ergebnis dieser Untersuchung ging hervor, dass die ATP-Depletion nach vier 10-minütigen Okklusionen zum einen geringer ausfiel als nach einer durchgängigen 40-minütigen Ischämie und sich zum anderen keine Nekrose entwickelte. Diese Ergebnisse ließen die Schlussfolgerung zu, dass schädigende Effekte, die bei lang anhaltenden Ischämien beobachtet worden waren, sich also nach vorgeschalteten kurzen I/R-Phasen (IPC) in geringerem Ausmaß zeigten und somit durch IPC eine Kardioprotektion erzielt werden konnte. Neben dem Aspekt der ATP-Depletion, die in Folge einer IPC deutlich geringer war als nach einer lang anhaltenden Ischämie, wurde auch das Auswaschen potentiell schädlicher Metaboliten wie Laktat, Wasserstoffionen und Ammoniak während der einzelnen Reperfusionsphasen, das somit einer Akkumulation entgegenwirkte, als möglicher Mechanismus, der am protektiven Effekt einer IPC beteiligt sein könnte, identifiziert (26).

In vielen Studien wurden im Verlauf Untersuchungen zum potentiellen molekularen Mechanismus der IPC durchgeführt. Darin wurde gezeigt, dass das Öffnen von ATP-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen eine zentrale Rolle spielt, untermauert durch das Ergebnis, dass durch selektive K<sup>+</sup>-Kanal-Antagonisten, wie z. B. das orale Antidiabetikum Glibenclamid (39-41) oder 5-hydroxydecanoate (5-HD) (42, 43), die Präkonditionierungseffekte aufgehoben werden konnten. Als weiteres Element im möglichen Reaktionsweg der IPC wurden Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptoren (44-46) identifiziert, die über einen G-Protein-gekoppelten Mechanismus zur Aktivierung der K<sup>+</sup>-Kanal-Öffnung führten (47).

Neuere Ergebnisse lassen auf einen zweiphasigen IPC-Signalweg schließen, deren Inhalte jedoch nicht gänzlich gesichert sind (48). In der ersten Phase, die während des Präkonditionierungsstimulus abläuft, kommt es über einen G-Protein-gekoppelten Mechanismus zur Aktivierung von Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt und Mitgliedern der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) wie der MEK1/2 und der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK1/2). In den Mitochondrien resultiert dies in einer Freisetzung von ROS, was eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und eine Öffnung ATP-abhängiger K<sup>+</sup>-Kanäle zur Folge hat. In der zweiten Phase, der Reperfusionphase, kommt es über eine rasche Bildung von ROS zur Aktivierung der PKC mit anschließender Phosphorylierung von PI3K/Akt sowie MEK1/2 und ERK1/2. Dadurch werden ATP-abhängige K<sup>+</sup>-Kanäle aktiviert und mPTP geschlossen (49, 50). Neben dieser als *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK)-Signalweg bezeichneten Kaskade, bei dem die PKC vermutlich über PI3K/Akt und ERK1/2 aktiviert wird, gibt es auch Hinweise, dass Adenosin über Adenosin A<sub>1</sub>/A<sub>3</sub>-Rezeptoren eine Aktivierung der PKC bewirkt (51, 52).

### **1.3.2 Anästhetische Präkonditionierung**

Im Jahr 1988 legten Warltier *et al.* (35) den Grundstein für die APC, wobei der Terminus erst 1997 durch Cason *et al.* (36) geprägt wurde.

Warltier und Mitarbeiter untersuchten in einer *in vivo*-Studie an Hunden den Einfluss der Gabe der volatilen Anästhetika Isofluran und Halothan mit nachfolgender I/R auf das Myokard. Nach der Untersuchung systemischer und koronararterieller hämodynamischer Parameter sowie der Ventrikelfunktion wurde gezeigt, dass die Wiederherstellung der kardialen Funktion nach Ischämieperioden durch Anästhetika, wie z. B. Isofluran, gesteigert werden konnte (35). Cason *et al.* konnten im Jahr 1997 an *in vivo*-Experimenten an Kaninchen belegen, dass die Gabe von Isofluran mit anschließender Unterbrechung der Isofluranzufuhr (sog. *memory*- oder Auswaschphase) vor einer I/R-Phase zu einer Reduktion der Infarktgröße führte verglichen mit den nicht behandelten Kontrolltieren (36).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten darauf hin, dass durch eine APC kardioprotektive Effekte erzielt werden können, deren Mechanismus bis heute allerdings nicht gänzlich aufgedeckt ist. In dem von Swyers *et al.* (53) erstellten Übersichtsartikel werden verschiedene Hypothesen zur Erklärung dafür potentiell verantwortlicher Mechanismen zusammenfassend dargestellt. Eine Überlegung besteht darin beispielsweise in der kardiosuppressiven Wirkung volatiler Anästhetika, über die die APC-induzierbare Kardioprotektion möglicherweise vermittelt wird (54, 55). Die von den Anästhetika

ausgehende Kardiosuppression wird dabei über eine Reduktion des myokardialen Sauerstoffbedarfs erzielt, die über eine Senkung des mittleren arteriellen Drucks, der Inotropie sowie einer Dilatation der Koronargefäße erfolgt (56). Dennoch scheint es neben diesem Zusammenhang noch weitere Mechanismen zu geben, die für die protektive Wirkung volatiler Anästhetika mitverantwortlich sind und Ähnlichkeiten zum besser erforschten potentiellen Mechanismus der IPC darstellen.

Eine Parallele zum molekularen Mechanismus der IPC besteht in der Beteiligung ATP-abhängiger  $K^+$ -Kanäle, auf die volatile Anästhetika Einfluss nehmen. Beispielsweise wird die Dilatation der Koronargefäße über einen  $K^+$ -Kanal-abhängigen Mechanismus vermittelt (57, 58). Die Bedeutung ATP-abhängiger  $K^+$ -Kanäle wurde in einer anderen Studie daran gezeigt, dass die Gabe des Antidiabetikums Glibenclamid vor der Isofluran- (59) bzw. Sevofluranexposition (60) zu einer Aufhebung von Präkonditionierungseffekten führte.

Obwohl ausreichende Hinweise für die Beteiligung dieser Kanäle am molekularen Mechanismus vorhanden sind (61-65), ist die genaue Wirkung volatiler Anästhetika an den Kanälen nicht vollständig aufgeklärt. Da keine direkte Bindung der Anästhetika an die ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanäle erfolgt, wurde diskutiert, ob die Wirkung möglicherweise über die PKC vermittelt wird. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass die Gabe eines PKC-Inhibitors nachfolgend protektive Effekte aufhebt (66). Neben der durch die PKC vermittelten Aktivierung ATP-abhängiger  $K^+$ -Kanäle wurden auch verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren identifiziert, die durch volatile Anästhetika beeinflusst werden. Zu diesen Rezeptoren zählen  $G_i$ -Proteine (67), der Adenosin- $A_1$ -Rezeptor (68) und  $\delta_1$ -Opioid-Rezeptoren (69). In ihrer Funktion als Trigger der APC kommt auch den ROS eine Bedeutung im protektiven Mechanismus zu, was an einer Aufhebung der Präkonditionierungseffekte durch Radikalfänger sichtbar wurde (70). Ferner ging aus Untersuchungen zum Präkonditionierungsmechanismus mit Isofluran hervor, dass die auch im Signalweg der IPC involvierte Mitogen-aktivierte Proteinkinase ERK1/2 als Trigger der APC agiert (71). Nicht zuletzt wurde auch der PI3K/Akt-Signalweg als potentieller Bestandteil des APC-Mechanismus identifiziert, über den eine Myokardprotektion vor I/R-Schäden vermittelt werden konnte (72).

Eine weitere wichtige Rolle bei der Präkonditionierung spielen so genannte MicroRNAs (miRs), die in den letzten Jahren unter anderem im Zusammenhang mit Herzerkrankungen und der Kardioprotektion untersucht wurden. In vielen Studien wurde dabei auf Veränderungen von miR-Expressionsleveln in Abhängigkeit von IPC und Hypoxie fokussiert. Über einen möglichen Zusammenhang zwischen miRs und der APC liegen derzeit noch wenige

Informationen vor, jedoch könnten hierbei ähnliche molekulare Mechanismen relevant sein wie bei der IPC. In den folgenden Kapiteln werden daher miRs und weitere wichtige Faktoren erläutert, die bei der Untersuchung des molekularen Mechanismus der APC eine Rolle spielen könnten.

## 1.4 MicroRNAs

Bei den miRs handelt sich *per definitionem* um nicht kodierende, einzelsträngige RNAs mit einer Länge von ca. 22 Nukleotiden, die durch Bindung an die 3'-untranslatierte Region ihrer Ziel-mRNA eine posttranskriptionale, negative Genregulation ausüben (73, 74).

Nach Bentwich *et al.* (75) wird die Zahl der miR-Gene im menschlichen Genom auf über 1.000 geschätzt. Des Weiteren regulieren miRs etwa 30 % der Gene in einer Zelle (76) und sind an zahlreichen zellulären Prozessen, wie z. B. Apoptose (77-79), Zelldifferenzierung (80-82) und Kardiogenese (83-85), beteiligt.

Aufgrund ihrer funktionellen Bedeutsamkeit wurden in den letzten Jahren bis heute Expressionsmuster verschiedener miRs unter diversen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen untersucht. Ein Untersuchungsschwerpunkt stellt dabei die Beteiligung von miRs an kardioprotektiven Mechanismen, wie der IPC, zum Schutz vor I/R-Schäden dar.

Trotz einer Vielzahl von miRs, die in den Studien analysiert wurden, fällt ein besonderes Augenmerk auf die miR-1 und die miR-21, da sie vielversprechende Expressionsmuster im Zusammenhang mit der IPC aufweisen. In einer Studie von Yin *et al.* (86) führte die Behandlung isolierter Mäuseherzen mit IPC-Stimuli (2 Zyklen à 30 Sekunden Ischämie mit je 90 Sekunden Reperfusion) vor einer 30-minütigen Ischämie und 60-minütigen Reperfusionsphase zu einer Infarktgrößenreduktion sowie zu einer signifikanten Hochregulation der miR-1 und miR-21. Nach Injektion der hochregulierten miRs in das linke Ventrikelmyokard und einer 48-stündigen Wartesequenz erfolgten eine Koronarokklusion von 30 Minuten und anschließend eine 24-stündige Reperfusion *in vivo*. Es zeigte sich, dass die Injektion der zuvor hochregulierten miRs eine signifikante Reduktion der Infarktgröße zur Folge hatte. Dies könnte darauf hindeuten, dass miR-1 und miR-21 am Schutzmechanismus vor I/R-Schäden beteiligt sind.

### 1.4.1 MicroRNA-1

Die miR-1 wird beim Menschen vorrangig im Herzen exprimiert (87) und nimmt einen Anteil von 40 % an den Gesamt-miRs im murinen Herzen ein (88). Aufgrund ihrer herzspezifischen und skelettmuskelspezifischen Expression wurden bereits diverse Untersuchungen im Hinblick auf physiologische (Herzentwicklung) und pathologische kardiale Prozesse (Herzerkrankungen) durchgeführt, aus denen eine Beteiligung der miR-1 hervorging (89, 90). Durch die Beeinflussung der Synthese antiapoptotischer Zielproteine, wie dem Hitzeschockprotein (HSP) 60 (91) und dem *B-cell lymphoma 2* (92), gilt sie als wichtiger Regulator von Apoptosevorgängen, wodurch das Ausmaß kardialer I/R-Schäden verändert werden kann. Über die Regulierung verschiedener Zielgene, die im Zusammenhang mit Arrhythmien von Bedeutung sind, tritt sie ebenfalls bei einem pathologischen Prozess in Erscheinung (93).

Auch bei dem Erkrankungsbild der kardialen Hypertrophie wurde eine Beteiligung der miR-1 nachgewiesen. Dabei konnte sowohl *in vitro* (94) als auch *in vivo* (95) eine Korrelation zwischen reduziertem miR-1-Expressionslevel und einer Größenzunahme des Herzens gezeigt werden.

In *in vivo*-Untersuchungen zur Auswirkung von I/R auf die miR-1-Expression wurden je nach Versuchsprotokoll und Messzeitpunkten gegensätzliche Expressionsveränderungen beobachtet. Eine 30-minütige Ischämiephase gefolgt von einer 24-stündigen Reperfusion führte beispielsweise in Rattenkardiomyozyten zu einer Hochregulation der miR-1 (92). Im Gegensatz dazu wurde die miR-1 nach einer Sequenz von 60 Minuten Ischämie und 180 Minuten Reperfusion herunterreguliert, wobei es sich bei dem Untersuchungsmaterial ebenfalls um Rattenkardiomyozyten handelte (96).

Eine Bedeutung der miR-1 für die IPC ergab sich aus der bereits erwähnten Studie von Yin *et al.* (86), bei der es nach Injektion IPC-stimulierter und heraufregulierter miRs (unter anderem der miR-1) zu einer Reduktion der Infarktgröße kam, nachdem die Herzen einem I/R-Ereignis ausgesetzt wurden. Daneben unterliegt die Expression der miR-1 auch dem Stimulus der Fernpräkonditionierung, die als *Remote Ischemic Preconditioning* (RIPC) bezeichnet wird. Brandenburger *et al.* (27) konnten in einem *in vivo*-Modell in der Ratte zeigen, dass 4 Zyklen einer jeweiligen 5-minütigen bilateralen Okklusion und Reperfusion der Hinterläufe ohne nachfolgende I/R zu einer Herabregulation des miR-1-Expressionslevels im Herzen führten. Die Durchführung von RIPC vor einer I/R (35 Minuten kardiale Ischämie und 120 Minuten Reperfusion) resultierte ebenfalls in einem reduzierten miR-1-Expressionslevel. Aus dem divergierenden Expressionsmuster der miR-1 wird insgesamt deutlich, dass sie einerseits eine

Rolle in pathologischen kardialen Prozessen, wie z. B. bei I/R-Schäden, Arrhythmien und kardialer Hypertrophie spielt, und ihr andererseits eine mögliche Funktion im Erzielen kardioprotektiver Effekte zukommt. Inwiefern die miR-1 an der APC des Myokards beteiligt ist und einer Regulation durch Isofluran unterliegt, ist bis jetzt ungeklärt.

#### 1.4.2 MicroRNA-21

Die miR-21 ist ein wichtiger Regulator in einer Vielzahl kardialer Prozesse (97). Dabei ist sie sowohl in kardioprotektive Mechanismen als auch in herzschädigende Ereignisse involviert. Bei kardialer Hypertrophie ist sie eine der am stärksten exprimierten miRs (98-101). Thum *et al.* (102) beobachteten, dass das in Fibroblasten erhöhte miR-21-Expressionslevel über die Inhibierung des Zielgens *sprouty homolog 1* die Aktivität der ERK1/2 steigert. Infolgedessen kommt es zu einer Induktion von Wachstumsfaktoren und einem verbesserten Überleben der Fibroblasten. Die an diesem Mechanismus beteiligte miR-21 hat demnach einen Einfluss auf die Ausbildung einer kardialen Fibrose und Hypertrophie.

In ihrer kardioprotektiven Funktion ist die miR-21 an zentralen antiapoptotischen Effekten beteiligt. Diese werden über die Inhibierung diverser miR-21-Zielgene, wie *Fas Ligand* (FasL) (103), *Phosphatase and Tensin homolog* (PTEN) (103) und *Programmed Cell Death 4* (PDCD4) (s. Kapitel 1.5) (104), erzielt.

Das Verhindern apoptotischer Ereignisse ist auch ein wesentliches Ziel der IPC. Die miR-21 wirkt dabei möglicherweise als Schlüsselement in einem komplexen Mechanismus mit:

Unter IPC kommt es zu einer Aktivierung des Akt-Signalwegs (49). Zum einen führt Akt über eine Herabregulation der miR-199a-5p zu einer vermehrten Expression des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1alpha (HIF-1 $\alpha$ ) (105), der die Expression potentiell kardioprotektiver Zielgene, z. B. Hämoxxygenase (HO)-1 und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), zur Folge hat. Zum anderen induziert Akt eine Hochregulation der miR-21 (103), welche die Inhibition proapoptotischer Zielgene (s. o.) bewirkt. Letztlich induziert eine IPC auch selbst eine Hochregulation der miR-21 (86, 106).

Zur Untersuchung kardioprotektiver Eigenschaften der miR-21 analysierten Dong *et al.* (107) ihr Expressionsmuster in einem *in vivo*-Modell des AMI bei der Ratte. Es stellte sich heraus, dass das miR-21-Expressionslevel 6 bzw. 24 Stunden nach dem AMI in den Infarktgebieten deutlich erniedrigt, in den Grenzgebieten jedoch erhöht war. Die Durchführung einer IPC (4 Zyklen à 5 Minuten Ischämie mit je 5 Minuten Reperfusion) 6 Stunden vor dem AMI inhibierte die Herabregulation der miR-21 in den Infarktgebieten. Nach Überexpression der miR-21 mittels eines viralen Konstruktes und Transfer in die Rattenherzen konnte zudem eine

Reduktion der Infarktgröße konstatiert werden. Sowohl Dong (107) als auch van Rooij (108) *et al.* schlossen in die Untersuchung zum Expressionsverhalten diverser miRs bei/nach MI auch das Nicht-Infarktgebiet mit ein. Beide Gruppen konnten – trotz deutlichem zeitlichen Unterschied des Untersuchungszeitpunktes - zeigen, dass es 6/24 Stunden (Dong) bzw. 3/14 Tage (van Rooij) nach dem MI zu einem Anstieg des miR-21-Expressionslevels im Nicht-Infarktgebiet verglichen mit den Sham-Tieren kam.

In der 2015 erschienenen Studie von Olson *et al.* (109) wurde die kardiale Expression der miR-21 erstmalig unter dem Einfluss einer APC mit Isofluran untersucht. Hierbei konnte zum einen eine Infarktgrößenreduktion infolge der Isofluranexposition nachgewiesen werden, zum anderen kam es zur einer Expressionssteigerung der miR-21 sowohl unter *in vitro*- als auch unter *in vivo*-Bedingungen. Dieses Ergebnis deutet somit darauf hin, dass der miR-21 neben ihrer Beteiligung am Mechanismus der IPC auch eine Bedeutung im Regulationsweg der APC zukommt, was in Untersuchungen wie der vorliegenden weiter erforscht werden sollte.

## **1.5 Programmed Cell Death 4**

Das Tumorsuppressorgen PDCD4 ist ein wichtiges Zielgen der miR-21, die über eine Bindung an die 3'-UTR-Region der PDCD4-messenger RNA (mRNA) regulatorisch in Apoptosevorgänge eingreift. PDCD4 ist daher vor allem in der Karzinogenese von Bedeutung. Studien haben in humanen Krebszelllinien, die Brust- und kolorektale Karzinome sowie Gliome umfassen, eine Regulation des PDCD4 durch die miR-21 nachgewiesen. In 6 humanen Karzinomen, die Lunge, Gehirn, Niere, Brust, Kolon und Pankreas betreffen, konnte eine verminderte Expression des PDCD4 durch die dort hochregulierte miR-21 gezeigt werden (110). Dieser Mechanismus im Sinne eines miR-21-induzierten Verlusts der proapoptotischen PDCD4-Wirkung führt demnach zu einer Begünstigung des Krebszellwachstums und einer Förderung der Krebsentwicklung (111).

Neben der Bedeutsamkeit für Apoptosevorgänge in Tumoren wurde PDCD4 auch in kardioprotektiven Zusammenhängen im Wirkkomplex mit der miR-21 untersucht. Dong *et al.* (107) untersuchten, ob PDCD4 an apoptotischen Vorgängen in Kardiomyozyten beteiligt ist und es bei der Kardioprotektion im Zusammenhang mit der miR-21 eine Rolle spielt. Dazu wurde durch die Transfektion eines viralen Konstruktes in Kardiomyozyten eine Überexpression von PDCD4 erzeugt und die Zellen anschließend einer Hypoxie mit Reoxygenierung ausgesetzt, um einen zellulären ischämischen Schaden zu induzieren. Es zeigte sich, dass sich unter den PDCD4-überexprimierenden Kardiomyozyten eine höhere Anzahl apoptotischer Zellen befand als unter den Kontrollen. Damit wurde die Beteiligung von

PDCD4 am Untergang kardialer Zellen verifiziert. Des Weiteren konnte in miR-21-inhibierten Kardiomyozyten eine erhöhte PDCD4-Expression und umgekehrt in miR-21-exprimierenden Zellen eine verminderte Expression nachgewiesen werden. Dadurch bestätigte sich, dass PDCD4 in Abhängigkeit von der miR-21 reguliert wird. Um einen weiteren Baustein in der Signalkette „miR-21/PDCD4“ und ihre Bedeutung für apoptotische Vorgänge aufzudecken, wurde das Aktivator Protein-1 (AP-1) in Abhängigkeit von der PDCD4-Expression und der miR-21 untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass eine durch einen miR-21-Inhibitor gesteigerte PDCD4-Expression zu einer Inhibition der AP-1-Aktivität führte. Analog dazu resultierte eine miR-21-vermittelte Reduktion von PDCD4 in einer gesteigerten Aktivität des AP-1. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass AP-1 an der Signalkette der miR-21 und PDCD4 beteiligt ist. Unter Berücksichtigung der Studie von Cheng *et al.* (106) lässt sich festhalten, dass die Expression der miR-21 dem Stimulus der IPC unterliegt und eine Hochregulation ihres Expressionslevels in Verbindung zum protektiven Effekt der Infarktgrößenreduktion steht. Des Weiteren stellt PDCD4 als miR-21-Zielgen einen wichtigen Bestandteil dieses kardioprotektiven Mechanismus dar, da durch seine Hemmung die Apoptose kardialer Zellen vermindert wird.

In einer anderen Studie zur Kardioprotektion wurde die Frage untersucht, welchen Einfluss das ausgewählte ROS Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) auf die Expression der miR-21 in Kardiomyozyten hat (104). Es ist nachgewiesen, dass höhere Konzentrationen von ROS Zellschäden induzieren und bei kardialer Hypertrophie, Herzinsuffizienz, MIs und I/R-Schäden beteiligt sind (112-114). Cheng *et al.* (104) untersuchten die Rolle der miR-21 bei ROS-induzierten Zellschäden an Kardiomyozyten und konnten mit ihren Ergebnissen bestätigen, dass PDCD4 durch die miR-21 reguliert wird. Es zeigte sich, dass die miR-21 vor  $H_2O_2$ -induzierten Zellschäden schützt, indem sie über ihr Zielgen PDCD4 und AP-1 antiapoptotisch wirksam wird. In der bereits erwähnten Studie von Olson *et al.* (109) wurde ergänzend zur Expression der miR-21 auch die Auswirkung einer APC auf die PDCD4-Expression untersucht. Dabei liefert die Untersuchung erste Hinweise dafür, dass Isofluran-induzierte kardioprotektive Effekte über einen miR-21/PDCD4-abhängigen Mechanismus vermittelt werden können.

## **1.6 Hypoxie-induzierbarer Faktor-1alpha**

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  ist ein bedeutsamer Regulator zahlreicher zellulärer Prozesse wie Angiogenese, Erythropoese und Zellproliferation (115-117). Eine weitere Funktion, die im Zusammenhang mit der Kardioprotektion von Interesse ist, besteht in der Induktion kardioprotektiver Gene. Im folgenden Abschnitt werden daher relevante HIF-1 $\alpha$ -

Regulationsmechanismen erläutert, deren Darstellung dem Übersichtsartikel von Tekin *et al.* (118) entstammen.

Die Ursprünge in der Entdeckung des Transkriptionsfaktors HIF-1 gehen auf das von Semenza *et al.* (119) im Jahr 1991 entdeckte *hypoxia responsive element* (HRE) im Erythropoetin-Gen zurück, an welches HIF-1 unter hypoxischen Bedingungen bindet (120, 121).

HIF-1 besteht aus zwei Untereinheiten, der Sauerstoff (O<sub>2</sub>)-sensitiven  $\alpha$ -Untereinheit, die in Abhängigkeit vom zellulären Sauerstoffgehalt exprimiert wird, und der konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit, die auch als *arylhydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) bezeichnet wird (121). In Abbildung 2 ist die Regulation von HIF-1 $\alpha$  unter Normoxie und Hypoxie schematisch dargestellt. Unter normoxischen Bedingungen in der Zelle wird die  $\alpha$ -Untereinheit nach Hydroxylierung und Ubiquitinierung im 26S-Proteasom degradiert. An diesem Vorgang sind unter anderem Prolylhydroxylasen (PHD) und das von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein (pVHL) beteiligt (122-126).

Herrschen in der Zelle hypoxische Bedingungen, wird die  $\alpha$ -Untereinheit stabilisiert und bildet im Zellkern mit der  $\beta$ -Untereinheit ein Heterodimer (121, 124). Durch die Bildung des  $\alpha$ - $\beta$ -Heterodimers entsteht ein aktiver HIF-1-Transkriptionskomplex, der die Genexpression HIF-1 $\alpha$ -abhängiger Zielgene induzieren kann (121).

Die hypoxische Regulation von HIF-1 $\alpha$  mit der Bildung eines aktiven HIF-1-Transkriptionskomplexes und der Induktion HIF-1 $\alpha$ -abhängiger Zielgene stellt eine wichtige Eigenschaft des Transkriptionsfaktors dar. HO-1 und VEGF als exemplarisch ausgewählte Zielgene werden im Hinblick auf ihre potentiell kardioprotektiven Eigenschaften im nächsten Kapitel (1.7) erläutert. Verschiedene Studien haben die Auswirkung von einigen nicht-hypoxischen Stimuli auf die HIF-1 $\alpha$ -Aktivität untersucht, die auch im Bereich der Präkonditionierung relevant sind. Cai *et al.* (127) gingen der Frage nach, ob der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  am Mechanismus der IPC beteiligt ist. Dabei zeigte sich, dass IPC-behandelte, HIF-1 $\alpha$ -defiziente Mäuseherzen keinen Schutz vor einem I/R-Schaden aufwiesen. In den HIF-1 $\alpha$ -exprimierenden Wildtypmäuseherzen kam es dagegen zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße nach IPC.

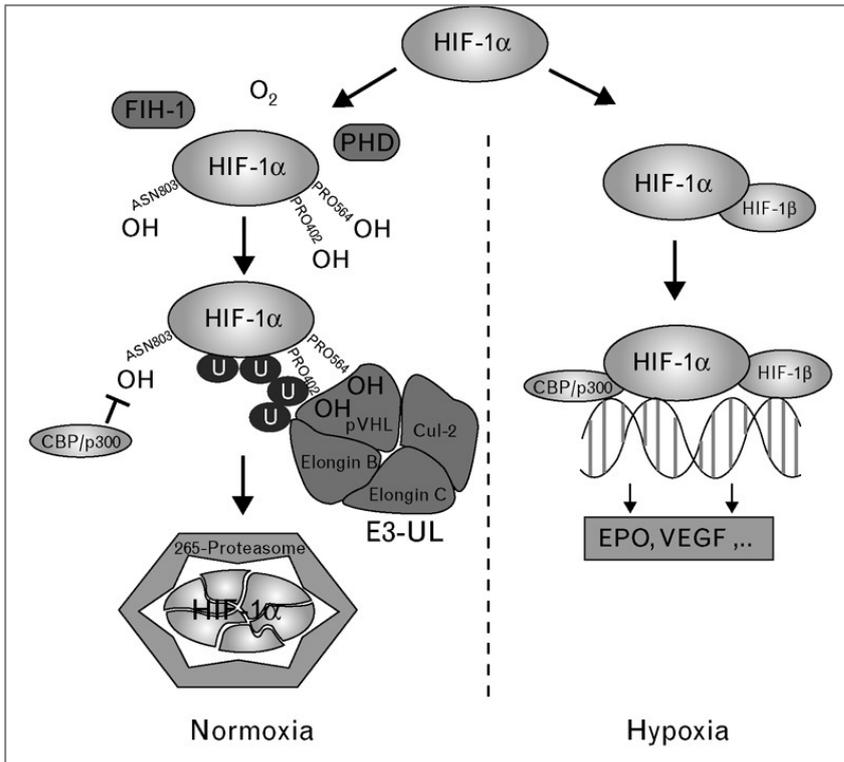
Auch im Bereich der APC deuten Ergebnisse auf eine Beteiligung von HIF-1 $\alpha$  am kardioprotektiven Mechanismus hin. Wang *et al.* (71) legten in einer *in vivo*-Studie an Ratten dar, dass es nach einer 30-minütigen Isofluranexposition zu einem signifikanten Anstieg der HIF-1 $\alpha$ -Expression sowie seines Zielgens VEGF kam. Ferner ging aus den Experimenten zur Infarktgröße hervor, dass eine 30-minütige Isofluranbehandlung mit nachfolgender 15-minütiger Auswaschphase des Anästhetikums und anschließender Ischämie- (30 Minuten) und

Reperusionsphase (120 Minuten) zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße im Vergleich zu den nicht behandelten Tieren führte. Für die Untersuchung des APC-Signalwegs wurde in der Studie die Rolle der Mitogen-aktivierten Proteinkinase ERK1/2 fokussiert, die auch im Mechanismus der IPC beteiligt zu sein scheint. Durch die Gabe des ERK1/2-Inhibitors PD 098059 wurden sowohl die Isofluran-induzierte Hochregulation der Proteinlevel der phospho-ERK1/2, HIF-1 $\alpha$  und VEGF als auch die Infarktgrößenreduktion aufgehoben. Die Ergebnisse deuten dabei darauf hin, dass die durch Isofluran erzielte Kardioprotektion durch die ERK1/2 getriggert wird und mit einer Hochregulation von HIF-1 $\alpha$  und VEGF einhergeht. Neben den Hinweisen auf eine ERK1/2-gesteuerte Hochregulation des HIF-1 $\alpha$  nach APC weisen Studienergebnisse auch auf einen in der HIF-1 $\alpha$ -Expressionssteigerung involvierten PI3K/Akt-Signalweg hin (128). Da die PI3K-Aktivität wiederum durch Anästhetika gesteigert werden kann, könnte der PI3K/Akt-Signalweg alternativ zur ERK1/2 am Mechanismus der HIF-1 $\alpha$ -vermittelten APC beteiligt sein (129, 130).

Wie im Kapitel 1.4 (MicroRNAs) erläutert wurde, sind miRs im kardioprotektiven Mechanismus der Präkonditionierung involviert. Dabei wurden auch Untersuchungen zu Veränderungen von miR-Expressionsleveln in Abhängigkeit von Hypoxie durchgeführt, wodurch sich eine Verbindung zu HIF-1 $\alpha$  herstellen lässt. Kulshreshtha *et al.* (131) identifizierten in einer Studie an Tumorzelllinien (Colon- und Brustkrebszellen) eine Gruppe von miRs, die Hypoxie-abhängig exprimiert und daher als *hypoxia-regulated microRNAs* (HRMs) bezeichnet werden. In diese Gruppe fällt auch die miR-21. Es konnte dabei in bestimmten Promotorregionen der HRMs eine verstärkte Anreicherung der zuvor sequenzierten HIF-Bindungsstellen nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde anhand ausgewählter miRs (miR-24, miR-26, miR-181, miR-210) gezeigt, dass HIF an die Promotorregionen der miRs binden kann.

Daneben besteht auch ein umgekehrter Zusammenhang im Sinne einer miR-abhängigen Regulation von HIF-1 $\alpha$ . Rane *et al.* (132) beobachteten, dass die in Kardiomyozyten unter Hypoxie herunterregulierte miR-199a eine Hochregulation ihres Zielgens HIF-1 $\alpha$  bedingt. Das Resultat ermöglichte damit die Demaskierung dieser miR als ein wichtiger Regulator von HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie.

Die Ergebnisse der genannten Untersuchungen machen die Relevanz von HIF-1 $\alpha$  für kardioprotektive Mechanismen, wie sie durch IPC und APC erzielt werden können, deutlich. Inwiefern miRs und die HIF-1 $\alpha$ -Zielgene HO-1 und VEGF bei der Isofluran-induzierten Präkonditionierung zusammenwirken und an einem potentiell kardioprotektiven Effekt beteiligt sind, wurde bislang noch nicht untersucht.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Regulation des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1alpha unter Normoxie und Hypoxie.**

Unter Normoxie wird die  $\alpha$ -Untereinheit des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 (HIF-1 $\alpha$ ) durch Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD) hydroxyliert. Über die Hydroxylreste (OH) bindet das von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein (pVHL), welches neben Elongin B, Elongin C und Cullin-2 (Cul-2) Bestandteil der E3 Ubiquitin-Protein Ligase (E3-UL) ist. Durch Bindung der E3-UL kommt es zur Ubiquitinierung der  $\alpha$ -Untereinheit und zur Degradation im 26S-Proteasom.

Unter Hypoxie wandert die  $\alpha$ -Untereinheit in den Zellkern und bildet mit der  $\beta$ -Untereinheit (HIF-1 $\beta$ ) sowie verschiedenen Coaktivatoren, wie CBP (CREB (cAMP response element-binding) Protein)/p300, einen aktiven HIF-1-Transkriptionskomplex, der die Expression verschiedener Gene, wie zum Beispiel Erythropoetin (EPO) und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), induzieren kann. Grafik übernommen von Hieber *et al.* (130).

## 1.7 Zielgene des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1alpha

### 1.7.1 Hämoxygenase-1

Die von Tenhunen *et al.* (133, 134) erstmalig beschriebene HO-1 ist eine von drei Isoformen, die den oxidativen Abbau von Häm zu Biliverdin, Kohlenstoffmonoxid und Eisen katalysiert. Die Expression der HO-2 und der HO-3 erfolgt vor allem konstitutiv (135, 136). Auch die HO-1 wird konstitutiv gebildet und zwar in Zellen, die beispielsweise alte oder defekte Erythrozyten, wie in der Milz (137) oder in den ortsständigen Makrophagen der Leber

(Kupffer-Zellen) (138), abbauen. Daneben unterliegt die Expression der auch als HSP 32 (139) bezeichneten HO-1 jedoch zahlreichen Stimuli, unter anderem oxidativem Stress (140). Da oxidative Prozesse am I/R-Schaden beteiligt sind (141-143), ist die HO-1 gerade unter dem Aspekt ihrer potentiell kardioprotektiven Eigenschaften von Interesse. Diverse Studien haben bereits antioxidative (144, 145), antiapoptotische (146, 147) und antiinflammatorische (148, 149) Eigenschaften der HO-1 und ihrer Reaktionsprodukte aufgedeckt.

Wie bereits erwähnt, kann die Induktion der HO-1-Expression durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöst werden, wie z. B. durch Hypoxie (150-152), IPC (146) und pharmakologische Präkonditionierung (146). Isofluran gilt ebenfalls als ein Induktor der HO-1, was von Hoetzel und Schmidt *et al.* (153-155) an der Rattenleber experimentell belegt wurde. Auf der Grundlage dieser Erkenntnis konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit Isofluran die HO-1-Expression in der Leber induzieren und dadurch ein protektiver Effekt vor einem hepatischen I/R-Schaden erzielt werden kann (156). Neben der Leber stellt auch das Herz ein für die Forschung relevantes Organ dar, welches im Hinblick auf das HO-1-Expressionsmuster und seine Regulation untersucht wurde.

So zeigten Jancsó *et al.* (146) in einer *in vitro*-Studie an isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten, dass durch ischämische sowie pharmakologische Präkonditionierung die HO-1-Expression induziert werden kann. Anhand ihrer Ergebnisse schlussfolgerten sie, dass der Anstieg des HO-1-Expressionslevels mit einer Reduktion der Apoptoserate und des Zelltodes nach I/R einhergeht. Eine Inhibition der HO-1-Enzymaktivität oder der HO-1-Proteinexpression resultierte dagegen in einer Aufhebung der zuvor erzielten Effekte. Dies lässt darauf schließen, dass durch ischämische und pharmakologische Präkonditionierung protektive Effekte vor I/R-Schäden auf zellulärer Ebene erzielt werden können, was Jancsó *et al.* zufolge mit einer Induktion der HO-1-Expression assoziiert zu sein scheint. Neben den genannten Stimuli konnte auch I/R als HO-1-induzierender Faktor in verschiedenen Organen nachgewiesen werden (157-159). Dass HO-1-Expressionsveränderungen zudem infolge eines MIs auftreten, zeigten Lakkisto *et al.* (160) in einer *in vivo*-Studie an der Ratte. Zusätzlich zum Perinfarktgebiet wurde darin auch das *remote*-Gebiet untersucht, in dem sich 1 Woche nach stattgehabtem MI eine Expressionssteigerung verglichen mit den Sham-Tieren nachweisen ließ (160).

Lee *et al.* (150) identifizierten in einer Studie zum Einfluss von Hypoxie auf die HO-1-Expression im murinen HO-1-Gen ein HRE, über das HIF-1 unter Hypoxie zu einer Aktivierung des HO-1-Gens führt. Damit wurde ein regulatorischer Zusammenhang zwischen HIF-1 und HO-1 unter Hypoxie nachgewiesen, wonach die HO-1 als Zielgen von HIF-1

fungiert, und daher in der vorliegenden Arbeit unter dem Aspekt ihrer Bedeutung für die potentielle Isofluran-induzierte miR-Regulation untersucht wurde.

### **1.7.2 *Vascular Endothelial Growth Factor***

Der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF/VEGF A) ist ein homodimeres Glykoprotein, welches aus zwei identischen 23 Kilodalton (kDa) großen Untereinheiten besteht (161-163) und ein wichtiger Regulator in den Prozessen der Gefäßbildung ist.

Neben VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und dem *Placenta growth factor* (PGF) ist er eines von sechs im Menschen vorkommenden VEGF-Proteinen (164). Durch alternatives Spleißen gehen verschiedene Isoformen aus dem VEGF-Gen hervor, die je nach Anzahl der Aminosäuren die Länge des Proteins bestimmen (165, 166). Im humanen Organismus sind die Isoformen mit 121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren beschrieben, von denen VEGF<sub>165</sub> die am häufigsten vorkommende Form darstellt (165). Die drei bislang nachgewiesenen murinen Isoformen sind mit einer Länge von 120, 164 und 188 Aminosäuren je 1 Aminosäure kürzer als die humanen Formen. Von ihnen ist VEGF<sub>188</sub> die im murinen Myokard dominierende Isoform (167).

Die Entdeckung des VEGFs geht auf verschiedene Untersuchungen aus den 1980er Jahren zurück. Senger *et al.* (168) identifizierten im Zellkulturmedium bzw. der Aszitesflüssigkeit des *guinea pig line 10 hepatocarcinomas* ein 34 bis 42 kDa großes Protein, welches die mikrovaskuläre Permeabilität steigerte und zu einer erhöhten Aszitesansammlung führte. Das Protein wurde daher als *vascular permeability factor* bezeichnet. Eine andere Arbeitsgruppe entdeckte im Zellkulturmedium einer hypophysären Zelllinie einen für vaskuläre Endothelzellen spezifischen Wachstumsfaktor, der als Vasculotropin benannt wurde (169). Gleichzeitig bezeichneten Ferrara *et Henzel* (162) und Leung *et al.* (170) den Wachstumsfaktor, den sie im Zellkulturmedium boviner hypophysärer Zellen nachwiesen, als *Vascular Endothelial Growth Factor*.

VEGF nimmt aufgrund seiner spezifisch mitogenen Wirkung auf vaskuläre Endothelzellen eine bedeutende Stellung in der Regulation der Gefäßbildung ein (164, 171). So kommt es durch VEGF zu einer erhöhten Migration von Endothelzellen und einem gesteigerten Abbau von extrazellulärer Matrix, was die Gefäßbildung fördert (172). Ferner ist er durch seine mitogenen, chemotaktischen und permeabilitätssteigernden Eigenschaften entscheidend für die Wundheilung (173). Nicht zuletzt sichert er das Überleben von Endothelzellen, in dem er die Bildung antiapoptischer Proteine in diesen fördert (174).

Einen wichtigen Induktor für die VEGF-Expression stellt die zelluläre O<sub>2</sub>-Konzentration dar. Forsythe *et al.* (175) konnten in einer Studie einen regulatorischen Zusammenhang zwischen HIF-1 und VEGF in Abhängigkeit von Hypoxie zeigen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Transkription von VEGF in hypoxischen Zellen durch HIF-1 über das HRE des VEGF-Gens aktiviert wird. Damit konnte VEGF als HIF-1-Zielgen und damit als wichtiges Element zellulärer Anpassungsprozesse gegenüber hypoxischen Bedingungen identifiziert werden. Neben der Hypoxie wurde auch I/R als ein die VEGF-Expression beeinflussender Faktor beschrieben, was in unterschiedlichen Organsystemen sowohl in Form einer VEGF-Induktion als auch -Repression nachgewiesen werden konnte (158, 176, 177). Dass VEGF durch IPC induziert werden kann, ging aus der Studie von Kawata *et al.* (178) hervor, die Untersuchungen an einem *in vivo*-Infarktmodell der Ratte durchführten. Hier zeigte sich im Infarktgebiet der IPC-Gruppe (3 Zyklen à 3 Minuten Ischämie und 5 Minuten Reperfusion) ein gesteigertes VEGF-mRNA-Expressionslevel, welches 3 Stunden nach dem MI seinen Maximalwert aufwies und bis zu 12 Stunden deutlich signifikant erhöht nachweisbar war im Vergleich zur Gruppe ohne IPC. Hervorzuheben ist, dass in der Gruppe ohne IPC, die also nur den Infarkt durchlief, sowie in der Gruppe mit IPC, auch das Nicht-Infarktgebiet untersucht wurde, welches in beiden Gruppen keine VEGF-Expressionsveränderung verglichen mit Sham aufwies. Im Gegensatz dazu wurde in anderen Studien zum Expressionsverhalten von VEGF nach MI eine Steigerung seiner Expression in den nicht ischämischen Myokardarealen dokumentiert (128, 179). Nicht zuletzt konnten Wang *et al.* (71) in einer Untersuchung zur Kardioprotektion Hinweise dafür liefern, dass die VEGF-Expression durch eine APC induziert werden kann. Demnach führte Isofluran in Rattenherzen zu einer Hochregulation des Proteinlevels von HIF-1 $\alpha$  und dessen Zielgen VEGF. Zusätzlich wies das Ergebnis auf eine Beteiligung dieser Expressionsveränderungen an der dort gezeigten APC-induzierten Infarktgrößenreduktion hin.

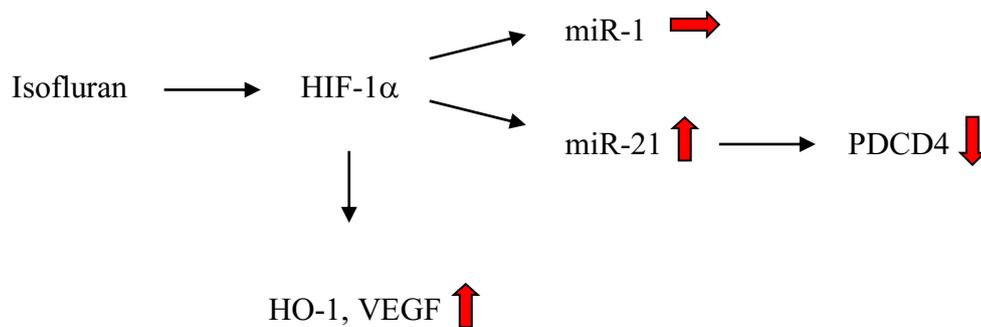
## 1.8 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Studie baut auf Ergebnisse auf, die im Rahmen eines Dissertationsprojektes der Tiermedizinerin Swantje Klemm-Mayer in der Klinik für Anästhesiologie erzielt wurden. Sie konnte in einer *in vivo*-Studie zeigen, dass eine APC mit Isofluran zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße im Myokard der Ratte führt. Auf dem Hintergrund dieses Ergebnisses ergab sich als Ziel der Arbeit, die Auswirkung einer APC mit Isofluran auf Ebene der Expression im Herzgewebe der Ratte näher zu charakterisieren, um daraus Rückschlüsse auf mögliche Regulationsmechanismen der APC ziehen zu können.

Gegenstand der Untersuchung waren die miR-1 und -21, die auf Isofluran-bedingte Expressionsveränderungen untersucht wurden. Ferner wurden für die Verifizierung einer potentiellen Beteiligung des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  an einer APC-induzierten miR-Regulation die HIF-1 $\alpha$ -Zielgene HO-1 und VEGF im Hinblick auf Veränderungen ihrer Genexpressionslevel analysiert. Einen ergänzenden Untersuchungsaspekt stellte der Einfluss von Isofluran auf die Expression des miR-21-Zielgens PDCD4 dar, um einen möglichen Hinweis auf einen Isofluran-bedingten antiapoptotischen Präkonditionierungseffekt auf Proteinebene zu erlangen.

Des Weiteren wurde nach Durchführung einer I/R innerhalb des Herzgewebes zwischen den Bereichen Risikogebiet und Nicht-Risikogebiet differenziert. Da die Herzgewebeproben, die das Risikogebiet umfassten, aufgrund eines technischen Defekts nicht für die eigentlich geplante Untersuchung zur Verfügung standen, wurden jene Proben mit dem Nicht-Risikogebiet verwendet. Dabei ist zu berücksichtigen, dass durch die I/R im Nicht-Risikogebiet kein unmittelbarer I/R-Schaden ausgelöst wurde. Es war daher von Interesse, das Expressionsverhalten der miRs und der HIF-1 $\alpha$ -Zielgene im Nicht-Risikogebiet unter dem Einfluss von Isofluran mit nachfolgender I/R zu untersuchen. Einen besonderen Stellenwert nahm in diesem Zusammenhang die Untersuchung eines so genannten *remote* (fernen)-Effekts ein, der möglicherweise ausgehend von der I/R potentiell zuvor nachgewiesene Isofluran-induzierte Expressionsveränderungen der miRs und der HIF-1 $\alpha$ -Zielgene beeinflusst.

Die Abbildung 3 zeigt, wie die untersuchten Faktoren unter dem Einfluss von Isofluran zusammenwirken könnten.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der an der anästhetischen Präkonditionierung mit Isofluran potentiell beteiligten Faktoren und ihre mögliche Regulation.**

Isofluran nimmt unter Beteiligung des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1alpha (HIF-1 $\alpha$ ) Einfluss auf die Expression der MicroRNA (miR)-21 und bewirkt keine Regulation der miR-1. Eine Beteiligung von HIF-1 $\alpha$  zeigt sich in Expressionsveränderungen der HIF-1 $\alpha$ -Zielgene Hämoxxygenase (HO)-1 und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Über die miR-21 reguliert Isofluran das miR-21-Zielgen *Programmed Cell Death 4* (PDCD4).

Es war das Ziel der Arbeit, die folgenden Fragen zu beantworten:

1. Führt die inhalative Gabe von Isofluran im Herzgewebe der Ratte zu Veränderungen der Expressionslevel der miR-1 und miR-21?
2. Ist der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  an der Isofluran-induzierten Regulation der miRs beteiligt, die in Form einer Steigerung der HIF-1 $\alpha$ -Zielgene HO-1 und VEGF sichtbar wird?
3. Hat Isofluran einen Einfluss auf die Expression der miRs und der HIF-1 $\alpha$ -Zielgene, wenn im Anschluss an die Isoflurangabe eine I/R erfolgt? Kommt durch I/R möglicherweise ein *remote*-Effekt im Nicht-Risikogebiet des Herzens zustande, der die potentiellen Isofluran-induzierten Expressionsveränderungen der miRs und der HIF-1 $\alpha$ -Zielgene beeinflusst?
4. Führt die inhalative Gabe von Isofluran im Herzgewebe der Ratte zu einer Veränderung der Proteinexpression des miR-21-Zielgens PDCD4?

In Vorbereitung auf die Beantwortung der Fragen erfolgten nach Randomisierung der Versuchstiere in insgesamt 4 Gruppen (SHAM, ISO, I/R, ISO + I/R) zunächst die tierexperimentellen Untersuchungen (Durchführung des *in vivo*-Protokolls, Organentnahme). Mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR) wurden anschließend Expressionsveränderungen der miR-1 und -21 sowie der Gene HO-1 und VEGF erfasst. Die Proteinexpression des miR-21-Zielgens PDCD4 wurde mithilfe der Western Blot Analyse bestimmt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Bezugsquellennachweis

#### 2.1.1 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Fluka, Steinheim
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (3-MOPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Aqua destillata (Aqua dest.)</i>	Braun, Melsungen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Chloroform	VWR, Darmstadt
<i>cOmplete™ (Protease Inhibitor Cocktail Tablets)</i>	Roche, Mannheim
<i>Coomassie Blue</i>	Serva, Heidelberg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
<i>Enhanced chemoluminescence (ECL)-Reagenz</i>	Santa Cruz, Heidelberg
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol (unvergällt, 75 %)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Folins Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd (FA) (37 %)	Merck, Darmstadt
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleissheim
Isopropylalkohol	Apotheke Uni Düsseldorf
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt

Kalium-Natrium-Tartrat-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat-Pentahydrat (CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pentobarbital (Narcoren®)	Merial, Hallbergmoos
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Stickstoff	Linde AG, Düsseldorf
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Tris base	Roth, Karlsruhe
Tris hydrochloride (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizol® <i>Reagent</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Tween	Merck, Darmstadt

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

96-Well Base	Applied Biosystems, Darmstadt
96 Well Multiply® PCR-Platte	Sarstedt, Nümbrecht
Fiber Pad	Bio-Rad, München
Filterpapiere	Whatman, Dassel
Glasplatten	Bio-Rad, München
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Merck Millipore, Darmstadt
Pipetten	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.3 Geräte

Abzug	Vinitrex, Coswig
Agarosegelkammer	Bio-Rad, München
Analysewaage	Sartorius, Göttingen

Autoklav	Heraeus, Hanau
Beatmungsgerät (7025 <i>Rodent Ventilator</i> )	Föhr Medical Instruments, Seeheim
Braunüle	Braun, Melsungen
<i>Charge-coupled device</i> (CCD)-Kamera (CoolSNAP HQ2)	Photometrics, Tuscon (Arizona, USA)
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Heizblock	neoLab, Heidelberg
Magnetrührstab	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Mikrowelle	Panasonic, Wiesbaden
Multi-Detektions-Reader für Mikroplatten (Synergy2)	BioTek, Bad Friedrichshall
PCR-Cycler (7300 <i>Real-Time PCR System</i> )	Applied Biosystems, Darmstadt
pH-Meter	WTW, Weilheim
Potter	IKA, Staufen
Schüttler	IKA, Staufen
Spektrophotometer (NanoDrop® ND-1000)	Thermo Scientific, Waltham (Massachusetts, USA)
Stromquelle	Consort, Turnhout (Belgien)
Thermocycler (C1000™ <i>Thermal Cycler</i> )	Bio-Rad, München
Tischzentrifuge	VWR, Darmstadt
Transferkammer	Bio-Rad, München
Überwachungsmonitor (Cardiicap II)	Datex, Helsinki (Finnland)
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

#### 2.1.4 Software

Gel-Pro® <i>Analyzer</i> (Version 6.0)	Media Cybernetics, Rockville (Maryland, USA)
Gen5™	BioTek, Bad Friedrichshall
Gelscan (Version 6.0)	BioSciTec, Frankfurt a. Main
Microsoft® Excel® 2004 <i>for Mac</i> (Version 11.6.6)	Microsoft Corporation, Redmond (Washington, USA)

SigmaScan® Pro 5

Systat Software, San José  
(Kalifornien, USA)

### **2.1.5 Substanzen für Reverse Transkription und quantitative *Real-Time* PCR**

*High Capacity RNA-to-cDNA™ Master Mix*

Applied Biosystems, Darmstadt

*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*

Applied Biosystems, Darmstadt

*TaqMan® Gene Expression Assay 20X*

Applied Biosystems, Darmstadt

*TaqMan® Gene Expression Master Mix 2X*

Applied Biosystems, Darmstadt

*TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit*

Applied Biosystems, Darmstadt

*TaqMan® MicroRNA Assay 5X*

Applied Biosystems, Darmstadt

*(Reverse Transcription Primer)*

*TaqMan® MicroRNA Assay 20X*

Applied Biosystems, Darmstadt

*TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix*

Applied Biosystems, Darmstadt

*(No AmpErase® UNG)*

### **2.1.6 Proteinstandard**

*Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder*

Thermo Scientific,  
Waltham (Massachusetts, USA)

## 2.1.7 Antikörper

Tabelle 1: Verzeichnis der verwendeten primären und sekundären Antikörper.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-PDCD4	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Anti-GAPDH	Maus	1:40.000	Abcam, Cambridge (UK)
Anti-rabbit-IgG	Esel	1:10.000	Jackson ImmunoResearch, Suffolk (UK)
Anti-mouse-IgG	Schaf	1:10.000	Jackson ImmunoResearch, Suffolk (UK)

## 2.2 Puffer und Lösungen

### 2.2.1 RNA-Isolierung

#### RNA-Intaktheitsgel

10x Formaldehyd (FA) Gelpuffer	200 mM	3-MOPS
	50 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA
	<i>ad</i> 1 l DEPC-Wasser (0,1 %)	
	pH 7,0	
1x FA Gel <i>Running</i> Puffer	100 ml	10x FA Gelpuffer
	20 ml	FA (37 %)
	880 ml	DEPC-Wasser (0,1 %)

10x <i>phosphate buffered saline</i> (PBS) (0,1 M)	80 g	NaCl
	2 g	KCl
	17,8 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O (0,1 M)
	2,4 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	<i>ad 1l Aqua dest.</i>	
	vor Gebrauch 1:10 mit <i>Aqua dest.</i> verdünnen →	
	1x PBS (0,01 M), pH 7,4	

Ethidiumbromidlösung	5 mg/ml in autoklaviertem PBS
----------------------	-------------------------------

<i>Loading</i> Puffer	0,75 ml	Formamid
	0,15 ml	10x FA Gelpuffer
	0,24 ml	FA
	0,1 ml	H <sub>2</sub> O
	0,1 ml	Glycerol
	0,06 ml	Bromphenolblau (1 %)

### 2.2.2 Proteinisolierung

Lysepuffer	20 mM	Tris HCl (pH 7,4)
	150 mM	NaCl
	1 mM	Na-EDTA
	1 mM	EGTA
	1 %	NP40
	2,5 mM	Sodumpyruvat
	2,5 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
	40 µl/ml	<i>cOmplete™</i>

### 2.2.3 Western Blot

1,5 M Tris base	54,51 g	Tris base
	<i>ad 300 ml Aqua dest.</i>	
	pH 8,8	

1,25 M Tris base	15,14 g Tris base <i>ad</i> 100 ml <i>Aqua dest.</i> pH 6,8
Sodiumdodecylsulfat (SDS) 10 %	5g SDS <i>ad</i> 50 ml <i>Aqua dest.</i>
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	1g APS <i>ad</i> 10 ml <i>Aqua dest.</i>
500 mM Tris-HCl	15,8 g Tris-HCl <i>ad</i> 200 ml <i>Aqua dest.</i> pH 6,8
SDS-Stopppuffer	7 ml <i>Aqua dest.</i> 1 ml 500 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2 ml Glycerol 1 g SDS 30 mg Bromphenolblau (0,5 %)
10x <i>Running</i> Puffer	30 g Tris base 144 g Glycin 10 g SDS <i>ad</i> 1 l <i>Aqua dest.</i>
1x Transferpuffer	1,453 g Tris base 7,206 g Glycin <i>ad</i> 1 l <i>Aqua dest.</i>
<i>Coomassie Staining</i>	750 mg <i>Coomassie Blue</i> 25 ml Eisessig 112,5 ml Ethanol 112,5 ml <i>Aqua dest.</i>

*Tris-Buffered Saline and Tween 20*  
(TBS-T)                    6 g            Tris base  
                                  22,2 g        NaCl  
                                  2 ml          Tween  
*ad 2l Aqua dest.*  
pH 8,0

Blotto 5 %                    50 g            Milchpulver  
*ad 1l TBS-T*

Blotto 1 %                    Blotto 5 % 1:5 mit TBS-T verdünnen

## 2.3 Tierexperimentelle Untersuchungen

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden von der Tiermedizinerin Swantje Klemm-Mayer nach Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (AZ 87-51.04.2010.A307) durchgeführt.

In ihren Aufgabenbereich fielen die chirurgische Präparation der Versuchstiere, die Durchführung des Versuchsprotokolls sowie die Infarktgrößenbestimmung. Sie konnte in einer ersten Versuchsserie zeigen, dass eine APC mit Isofluran (30-minütige Gabe von Isofluran gefolgt von einer 10-minütigen Auswaschphase sowie einer anschließenden 25-minütigen Ischämie- und einer 120-minütigen Reperfusionphase) in der Ratte zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße von  $64,7 \% \pm 12,2 \%$  (nicht vorbehandelte Kontrollen) auf  $42,7 \% \pm 15,2 \%$  ( $p = 0,005$ ) als Prozentanteil vom Risikogebiet führt. Auf der Basis dieses Ergebnisses stellte die Untersuchung des Effekts von Isofluran auf die Expression ausgewählter Faktoren die Grundlage für die vorliegende Studie dar.

Die hierbei gewonnenen Herzgewebeproben wurden bei  $-80\text{ °C}$  gelagert. Meine Arbeit bestand in der Aufbereitung des gefrorenen Herzgewebes und der sich anschließenden RNA- und Proteinanalytik. Da die *in vivo*-Untersuchungen die Grundlage für mein Dissertationsprojekt liefern, ist das hierzu verwendete experimentelle Modell zum besseren Verständnis der Studie in der vorliegenden Dissertationsschrift beschrieben.

### 2.3.1 Chirurgische Präparation

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 12 Wochen alte, männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht (KG) zwischen 300 g und 350 g. Nach Narkoseeinleitung mit Pentobarbital (60 mg/kg KG) wurden die Tiere mittels Braunüle orotracheal intubiert, maschinell beatmet und anschließend auf einem Operationstisch fixiert. Die linke *A. carotis communis* wurde für die arterielle Blutabnahme und Druckmessung, die rechte *V. jugularis interna* zur venösen Blutabnahme und Infusionstherapie katheterisiert. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte über die kontinuierliche Infusion des Narkosemittels Pentobarbital. Die Vitalparameter Herzfrequenz, arterieller Blutdruck und Körpertemperatur wurden dauerhaft überwacht und protokolliert.

Zur Freilegung des Herzens fanden eine linksseitige laterale Thorakotomie und Perikardiotomie statt. Ein Hauptast der *A. coronaria sinistra* wurde mit einem Faden versehen und darüber eine Gummischlinge geschoben, wodurch ein Unterbrechen und Wiederherstellen des Blutflusses während der I/R-Phasen ermöglicht wurde.

### 2.3.2 Versuchsprotokoll für molekularbiologische Untersuchungen

An die oben beschriebene Infarktgrößenbestimmung schloss sich eine zweite Versuchsserie an, um mithilfe molekularbiologischer Untersuchungen den Effekt von Isofluran auf die Expression ausgewählter Faktoren auf molekularer Ebene charakterisieren zu können. Dafür wurden gemäß dem Versuchsprotokoll (Abb. 4) je 6 Tiere in eine der 4 Gruppen randomisiert. Für alle Tiere ergab sich eine Versuchsdauer von 185 Minuten, wobei sich die jeweiligen gruppenspezifischen Interventionen voneinander unterschieden.

Die SHAM-Gruppe stellte die scheinoperierte Kontrolle dar. Die Tiere durchliefen eine 20-minütige *Baseline*-Phase, in der verbleibenden Zeit erfolgte keine Behandlung. In der I/R-Gruppe fand nach der *Baseline*-Phase und einer Wartesequenz von 40 Minuten eine 25-minütige Ischämie statt gefolgt von einer 120 Minuten anhaltenden Reperfusionphase.

Den Tieren der ISO-Gruppe wurde nach der *Baseline*-Phase für eine Sequenz von 30 Minuten Isofluran verabreicht. In der ISO + I/R-Gruppe wurden die Tiere nach einer 20-minütigen *Baseline*-Phase zunächst für 30 Minuten mit Isofluran behandelt. An diese Behandlung schlossen sich eine 10-minütige Auswaschphase sowie abschließend eine 25-minütige Ischämie- und eine 120-minütige Reperfusionphase an.

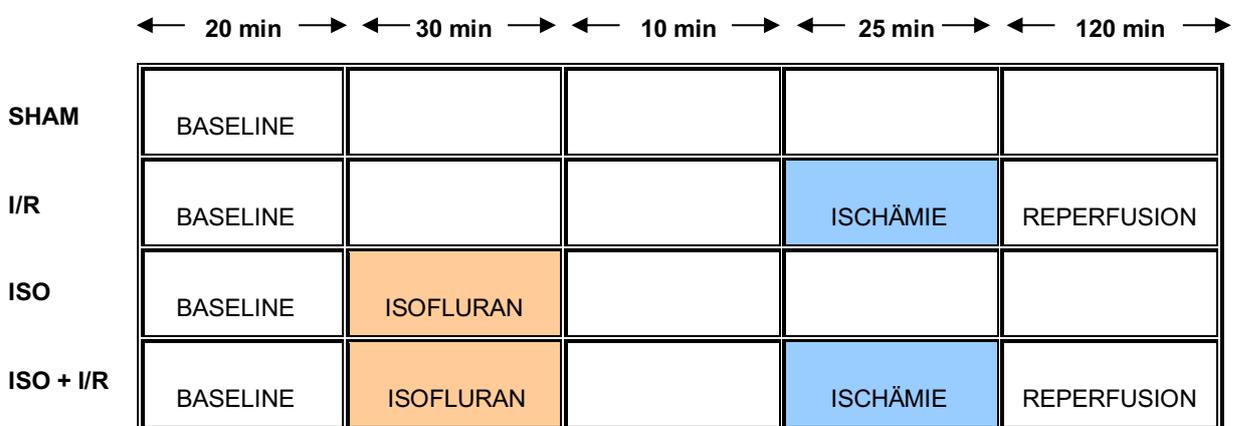
Die Ischämie wurde mittels Koronararterienokklusion eines Hauptastes der *A. coronaria sinistra* erzielt. Um gleiche Versuchsbedingungen zu schaffen, wurde auch bei den Tieren, die keine Koronararterienokklusion erhielten, eine Ligatur um die Koronararterie gelegt. Der MAC-Wert der applizierten Isofluranmenge entsprach 1,5 % (1 MAC Isofluran (1,5 % Isofluran, 40 % Sauerstoff, Rest Druckluft)). Die endexpiratorische Isofluran-Konzentration wurde mithilfe des Überwachungsmonitors Datex Cardiocap II kontrolliert. Nach Beendigung der 30-minütigen Isoflurangabe und der 10-minütigen Auswaschphase sanken die endexpiratorischen Isofluran-Konzentrationen auf den Wert Null. Danach wurde die Koronararterienokklusion in den entsprechenden Gruppen durchgeführt.

Am Ende der Reperfusionphase wurde bei den Versuchstieren der beiden Gruppen I/R und ISO + I/R die Koronararterie erneut verschlossen. Über die *V. jugularis interna* wurde *Evans Blue* (0,2%iges *Evans Blue*: 1 g *Evans Blue* + 5 g Dextran + NaCl 0,9 % ad 500 ml) appliziert, um das Risikogebiet zu markieren. Bei den Tieren der beiden Versuchsgruppen SHAM und ISO wurde ebenfalls *Evans Blue* appliziert, jedoch ohne die Koronararterie zu verschließen.

Nach Versuchsende wurden die Herzen entnommen, nach Risikogebiet und Nicht-Risikogebiet getrennt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde in allen 4 Gruppen der linke Ventrikel und bei den Gruppen I/R und ISO + I/R das Nicht-Risikogebiet des linken Ventrikels

verwendet. Das Nicht-Risikogebiet bezeichnet dabei das Gewebeareal, welches nicht im Versorgungsgebiet der okkludierten Koronararterie (*A. coronaria sinistra*) lag und somit während der I/R weiterhin perfundiert wurde.

Zu Beginn der Dissertation war geplant, das Risikogebiet des linken Ventrikels zu untersuchen, um die tierexperimentell nachgewiesene Infarktgrößenreduktion anhand der ausgewählten Untersuchungsfaktoren auf molekularer Ebene charakterisieren zu können. Da die Herzgewebeprobe mit dem Risikogebiet jedoch aufgrund eines technischen Defekts nicht zur Verfügung standen, wurde das Nicht-Risikogebiet unter Anpassung der Fragestellung untersucht.



**Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls für RNA- und Proteinanalysen.**

Für die Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen wurden je 6 Tiere in eine der 4 Gruppen randomisiert. Alle Tiere durchliefen eine 20-minütige *Baseline*-Phase. In den Gruppen Isofluran (ISO) und ISO + Ischämie/Reperfusion (I/R) schloss sich an die *Baseline*-Phase eine 30-minütige Isofluranbehandlung an. Nach einer 10-minütigen Wartesequenz erfolgten für die I/R- sowie für die ISO + I/R-Gruppe eine 25-minütige Ischämie- und eine 120-minütige Reperfusionsphase. In der ISO-Gruppe fanden neben der Isofluranbehandlung keine weiteren Interventionen statt. Die scheinoperierte (SHAM) Gruppe diente als nichtbehandelte Kontrolle. Nach einer Versuchsdauer von 185 Minuten erfolgte die Herzentnahme.

## **2.4 Biochemische Untersuchungen auf RNA-Ebene**

### **2.4.1 RNA-Isolierung mit Trizol®**

Nach der Durchführung des Versuchsprotokolls und einer Dauer von 185 Minuten wurde das Herzgewebe entnommen und die RNA-Analysen durchgeführt.

Die RNA-Isolierung erfolgte nach der von Chomczynski *et Sacchi* (180) entwickelten *Single-Step*-Methode mithilfe des Trizol® *Reagent* nach den Angaben des Herstellers Invitrogen™. Etwa 50 mg der Gewebeproben ( $n = 6$  pro Gruppe) wurden in flüssigem Stickstoff mechanisch zerkleinert und in 0,5 ml Trizol® homogenisiert.

Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) wurden 0,1 ml Chloroform hinzugefügt. Das Gemisch wurde 15 Sekunden handgeschüttelt und anschließend weitere 2-3 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße für 15 Minuten bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Durch die Zugabe von Chloroform und die Zentrifugation kommt es zu einer Phasentrennung. In der oberen wässrigen Phase befindet sich die RNA, in der Interphase die DNA und in der unteren roten Phenol-Chloroformphase die Proteine. Der in ein neues Reaktionsgefäß überführten wässrigen Phase wurden 0,25 ml Isopropylalkohol zugeführt und das Gemisch gevortext. Daran schloss sich eine 10-minütige Inkubationsphase bei RT an. Danach wurden die Reaktionsgefäße für 30 Minuten bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Isopropylalkohol bewirkt eine Präzipitation der RNA. Der Überstand wurde verworfen. Auf die anschließende Waschphase mit 0,5 ml 75%igem Ethanol folgten Vortexen und 5-minütiges Zentrifugieren bei 7.500 g und 4 °C. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde der Waschvorgang wiederholt.

Daraufhin wurde das RNA-Pellet bei RT getrocknet. Nach vollständiger Flüssigkeitselimination wurden 80 µl RNase-freies Wasser hinzugefügt, die Proben für 10 Minuten auf 60 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die Bestimmung des RNA-Gehalts und der Reinheit erfolgte spektralphotometrisch.

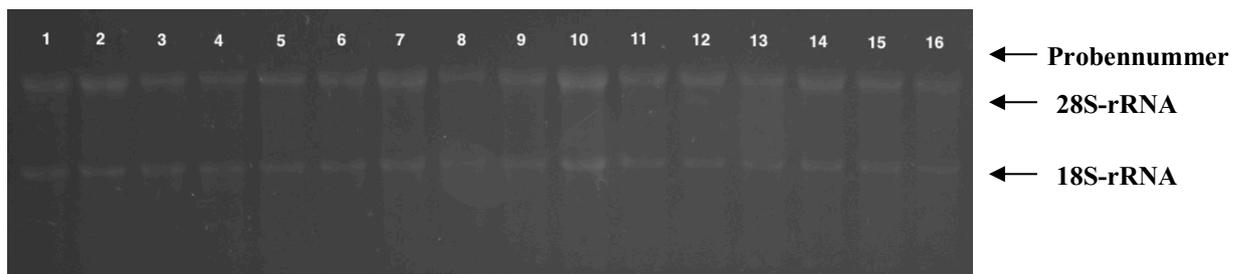
#### **RNA-Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometrie**

Der RNA-Gehalt sowie ihre Reinheit wurden mithilfe des NanoDrop® ND-1000-Spektrophotometers ermittelt. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgt dabei über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Es wurde ein Volumen von 1 µl benötigt. Der RNA-Gehalt der jeweiligen Proben wird in ng/µl angegeben. Durch das Verhältnis der gemessenen Absorption bei 260 nm und bei 280 nm lässt sich eine Aussage über

mögliche Proteinkontaminationen machen. Der Quotient sollte einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 für reine RNA einnehmen.

### **RNA-Intaktheitsgel**

Zur Überprüfung der Integrität der isolierten RNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Für das Gel wurden zunächst 1,8 g Agarose, 15 ml 10x Formaldehyd (FA) Gelpuffer sowie 135 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser in der Mikrowelle für 3 Minuten aufgeköcht. Nach Hinzugabe von 3 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) und 2,7 ml 37%iges FA wurde die Lösung zum Aushärten in eine Gelkammer gegossen. Zur Probenvorbereitung wurden 2,5 µg RNA in 15 µl Gesamtvolumen mit RNase-freiem Wasser angesetzt. Hinzugegeben wurden 3 µl *Loading* Puffer und die Probe wurde im Thermocycler für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x FA Gel *Running* Puffer gefüllt und die Proben in das Gel überführt. Nach einer Laufzeit von ca. 1 Stunde bei 100 V stellten sich unter UV-Licht zwei Banden dar, die den 28S- und 18S-Untereinheiten ribosomaler RNA (rRNA) entsprechen (Abb. 5).



**Abb. 5: Exemplarische Darstellung eines RNA-Intaktheitsgels.**

Die Überprüfung der Integrität der RNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dabei wurden die 28S- und die 18S-Untereinheit der ribosomalen RNA (rRNA) unter UV-Licht sichtbar.

### **2.4.2 Reverse Transkription für quantitative *Real-Time* PCR (MicroRNA)**

Für die Transkription der einzelsträngigen RNA in die komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase wurde folgendes Protokoll der Reversen Transkription (Tabelle 2) von Applied Biosystems® verwendet:

**Tabelle 2: Mastermix des *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kits* für Reverse Transkription.**

<i>Komponente</i>	<i>Volumen</i>
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) (100 mM)	0,15 µl
<i>MultiScribe™</i> Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1,0 µl
10X <i>Reverse Transcription Buffer</i>	1,5 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,19 µl
Nukleasefreies Wasser	4,16 µl
Gesamt	7,0 µl

Diesem Mastermix wurden 5 µl der verdünnten RNA (2 ng/µl) und 3 µl des entsprechenden *Reverse Transcription* Primers (5-fach konzentriert) hinzugefügt, vorsichtig gemischt und kurz zentrifugiert.

Der Thermocycler wurde gemäß dem Protokoll (Tabelle 3) von Applied Biosystems® wie folgt programmiert:

**Tabelle 3: Temperaturprogramm für Reverse Transkription (MicroRNA).**

<i>Zyklus</i>	<i>Temperatur (°C)</i>	<i>Zeit (min)</i>
1	16	30
2	42	30
3	85	5
4	12	∞

### **2.4.3 Reverse Transkription für quantitative *Real-Time* PCR (Genexpression)**

Die Reverse Transkription zur Analyse der Genexpression erfolgte mithilfe des *High Capacity RNA-to-cDNA™ Master Mix* (Tabelle 4). Dieser wurde verwendet, um den Reaktionsmix

(Tabelle 5) nach den Angaben des Herstellers Applied Biosystems® herzustellen. Die Reaktion lief im Thermocycler nach den Vorgaben des Herstellers ab (Tabelle 6).

**Tabelle 4: Komponenten des *High Capacity RNA-to-cDNA™ Master Mix*.**

Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Rekombinantes RNase-Inhibitor-Protein
Reverse Transkriptase
<i>Random Primer</i>
<i>Oligo(dT)</i> Primer and Stabilisatoren

**Tabelle 5: Reaktionsmix für Reverse Transkription.**

<i>Komponente</i>	<i>Volumen</i>
<i>High Capacity RNA-to-cDNA™ Master Mix</i>	4 µl
1 µg RNA in 16 µl nukleasefreiem Wasser verdünnt	16 µl
Gesamt	20 µl

**Tabelle 6: Temperaturprogramm für Reverse Transkription (Genexpression, Gruppen SHAM und ISO).**

<i>Zyklus</i>	<i>Temperatur (°C)</i>	<i>Zeit (min)</i>
1	25	5
2	42	30
3	85	5
4	12	∞

Da der oben aufgeführte *High Capacity RNA-to-cDNA™ Master Mix* nicht mehr im Handel erhältlich war, wurde in der vorliegenden Studie im Verlauf noch ein weiteres Protokoll zur Reversen Transkription (Tabelle 7) von Applied Biosystems® verwendet.

**Tabelle 7: Mastermix des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* für Reverse Transkription.**

<i>Komponente</i>	<i>Volumen</i>
10X <i>Reverse Transcription Buffer</i>	2,0 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10X <i>Reverse Transcription Random Primer</i>	2,0 µl
<i>MultiScribe™</i> Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1,0 µl
Nukleasefreies Wasser	4,2 µl
Gesamt	10,0 µl

Diesem Mastermix wurden 10 µl der verdünnten RNA (0,1 µg/µl) hinzugefügt, vorsichtig gemischt und kurz zentrifugiert. Die Proben durchliefen das den Vorgaben entsprechende Programm (Tabelle 8) im Thermocycler.

**Tabelle 8: Temperaturprogramm für Reverse Transkription (Genexpression, Gruppen I/R und ISO + I/R)**

<i>Zyklus</i>	<i>Temperatur (°C)</i>	<i>Zeit (min)</i>
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	12	∞

#### **2.4.4 Quantitative *Real-Time* PCR**

Die qRT-PCR ist eine molekularbiologische Methode zur Amplifizierung von Nukleinsäuren, der das Funktionsprinzip der klassischen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zugrunde liegt. Die Vervielfältigung der Nukleinsäuren erfolgt durch die drei repetitiven Schritte Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation gemäß einem vorgegebenen Temperaturprogramm im Thermocycler. Im Unterschied zur klassischen PCR ermöglicht die qRT-PCR durch die Absorption fluoreszierender Signale eines jeden Zyklus die Quantifizierung der PCR-Produkte in Echtzeit. Dabei steigt die Fluoreszenz proportional zur Menge des PCR-Produkts an.

Aufgrund der im Vergleich zur Start- und Plateauphase vorliegenden höchsten Spezifität der Reaktion erfolgt die Quantifizierung in der exponentiellen Phase (181).

Die hier zur Anwendung gekommene Form der Fluoreszenzmessung erfolgte mithilfe einer Hydrolisierungs-sonde (*TaqMan*<sup>TM</sup>-Sonde), die in den DNA-Doppelstrang eingebaut wird. Die Emission der Fluoreszenz geht dabei von dem so genannten Reporter aus, dessen Aktivität jedoch bei intakter Sonde durch den Quencher unterbunden wird. Gelangt die *Taq*-Polymerase mit 5'-3' Exonukleasefähigkeit zur Sonde und spaltet diese, werden Reporter und Quencher voneinander getrennt und es kommt zur Emission des Fluoreszenzfarbstoffs (181, 182).

Für die Berechnung der relativen Expression wurde das Prinzip der relativen Quantifizierung angewendet, bei der parallel zur Ziel-DNA ein externes Referenzgen als interne Kontrolle amplifiziert und quantifiziert wird. Anschließend wird die Expression des Zielgens mit der des Referenzgens korreliert, was als Normierung bezeichnet wird (183, 184). In der vorliegenden Arbeit wurde als interne Kontrolle das Referenzgen U6 *small nuclear* RNA (snRNA) gewählt, zu welchem die Ziel-miRs miR-1 und miR-21 in Relation gebracht wurden. Für die Untersuchung der Expression der Gene HO-1 und VEGF wurde als Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

Zur Ermittlung des relativen Expressionsunterschieds der jeweiligen Probe zwischen der Intervention und der Kontrolle (Ratio) wurde die  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode verwendet (185). Diese beruht auf dem CT (*cycle threshold*) -Wert, welcher der Anzahl von PCR-Zyklen entspricht, in der „die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt“ (181).

Anhand der unten aufgeführten Formel (Abb. 6) und den jeweiligen CT-Werten als Ausgangspunkte lässt sich die Ratio für jede einzelne Probe berechnen:

$$\begin{aligned}\Delta\text{CT} &= \text{CT}_{\text{Zielgen}} - \text{CT}_{\text{Referenzgen}} \\ \Delta\Delta\text{CT} &= \Delta\text{CT}_{\text{Intervention}} - \text{CT}_{\text{Kontrolle}} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}\end{aligned}$$

**Abb. 6: Berechnung der relativen Expression (Ratio) mithilfe der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode.**

Durch Subtraktion des CT-Werts des Referenz- vom CT-Wert des Zielgens lässt sich der  $\Delta\text{CT}$ -Wert berechnen. Der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert ergibt sich als Differenz aus dem  $\Delta\text{CT}$ -Wert der Interventions- und dem  $\Delta\text{CT}$ -Wert der Kontrollgruppe. Zur Bestimmung der Ratio wird der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert in die oben genannte Formel eingesetzt.

CT = *cycle threshold*. Livak *et* Schmittgen (185), Pfaffl (183).

a) Für die Untersuchungen der miR-Expression mittels qRT-PCR wurde die entstandene cDNA entsprechend der Tabelle 9 verdünnt und der Reaktionsmix (Tabelle 10) nach den Herstellerangaben von Applied Biosystems® hergestellt. Die verwendeten *TaqMan® MicroRNA Assays 20X* sind in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 9: Verdünnung der cDNA mit RNase-freiem Wasser (MicroRNA).**

<i>miR</i>	<i>Verdünnung</i>
miR-1	1:50
miR-21	1:20
U6 snRNA	1:50

**Tabelle 10: Reaktionsmix für quantitative *Real-Time* PCR (MicroRNA).**

<i>Komponente</i>	<i>Volumen</i>
<i>TaqMan® MicroRNA Assay 20X</i>	1,0 µl
<i>TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG</i>	10,0 µl
Nukleasefreies Wasser	8,0 µl
Gesamt	19,0 µl

**Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten *TaqMan® MicroRNA Assays 20X*.**

<i>TaqMan® MicroRNA Assay 20X</i>	<i>Identitätsnummer (ID)</i>	<i>Target-Sequenz</i>
rno-miR-1 ( <i>Rattus norvegicus</i> )	002064	UGGAAUGUAAAGAAGUGUGUAU
hsa-miR-21 ( <i>Homo sapiens</i> )	000397	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
U6 snRNA	001973	GUGCUCGCUUCGGCAGCACAUUACU AAAAUUGGAACGAUACAGAGAAGAU UAGCAUGGCCCCUGCGCAAGGAUGAC ACGCAAUUCGUGAAGCGUCCAUAU UUU

b) Für die Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR wurde die entstandene cDNA entsprechend der Tabelle 12 verdünnt. Aufgrund des Wechsels auf ein anderes Reverse Transkriptions-Kit wurden für die Gruppen SHAM und ISO sowie I/R und ISO + I/R unterschiedliche Verdünnungen gewählt:

**Tabelle 12: Verdünnung der cDNA mit RNase-freiem Wasser (Genexpression).**

<i>Gen</i>	<i>Verdünnung</i>	
	<i>Gruppen SHAM und ISO</i>	<i>Gruppen I/R und ISO + I/R</i>
HO-1	1:50	1:25
VEGF	1:50	1:25
GAPDH	1:50	1:25

Anschließend wurde der Reaktionsmix (Tabelle 13) in Anlehnung an das Herstellerprotokoll von Applied Biosystems® hergestellt. Einen Überblick über die verwendeten *TaqMan® Gene Expression Assays 20X* liefert Tabelle 14.

**Tabelle 13: Reaktionsmix für quantitative *Real-Time* PCR (Genexpression).**

<i>Komponente</i>	<i>Volumen</i>
<i>TaqMan® Gene Expression Assay 20X</i>	1,0 µl
<i>TaqMan® Gene Expression Master Mix 2X</i>	10,0 µl
Nukleasefreies Wasser	8,0 µl
Gesamt	19,0 µl

**Tabelle 14: Übersicht über die verwendeten *TaqMan® Gene Expression Assays 20X*.**

<i>TaqMan® Gene Expression Assay 20X</i>	<i>Identitätsnummer (ID)</i>
<i>TaqMan® Gene Expression Assay HO-1</i>	Rn01536933_m1
<i>TaqMan® Gene Expression Assay VEGF</i>	Rn01511601_m1
<i>TaqMan® Gene Expression Assay GAPDH</i>	Rn01462661_g1

Nach den Einzelschritten a) und b) wurde der Mix (19,0 µl) im Doppelwert in die 96 *Well*-Platte pipettiert und mit jeweils 1 µl der verdünnten, vorher gevortexten DNA versetzt (Gesamtvolumen: 20 µl). Als Negativkontrolle diente ein Mix, der anstelle der DNA 1 µl RNase-freies Wasser enthielt.

Nach Versiegelung der Platte und kurzer Zentrifugation erfolgte die Messung im 7300 *Real-Time PCR Cycler* nach dem jeweiligen Protokoll (Tabelle 15 und 16) von Applied Biosystems®.

**Tabelle 15: Programm für quantitative *Real-Time* PCR im 7300 *Real-Time* PCR Cycler (MicroRNA).**

Programmablauf	<i>AmpliTaq Gold</i> ® DNA-Polymerase Enzymaktivierung	qRT-PCR	
	<i>Hold</i>	40 Zyklen	
		Denaturierung	Primeranlagerung, Elongation
Temperatur (°C)	95	95	60
Zeit	10 min	15 sec	1 min

**Tabelle 16: Programm für quantitative *Real-Time* PCR im 7300 *Real-Time* PCR Cycler (Genexpression).**

Programmablauf	Uracil-DNA Glykosylase (UDG) Inkubation	<i>AmpliTaq Gold</i> ® DNA-Polymerase, <i>Ultra Pure</i> (UP) Enzymaktivierung	qRT-PCR	
	<i>Hold</i>	<i>Hold</i>	40 Zyklen	
			Denaturierung	Primeranlagerung, Elongation
Temperatur (°C)	50	95	95	60
Zeit	2 min	10 min	15 sec	1 min

## 2.5 Biochemische Untersuchungen auf Proteinebene

Die Untersuchung des Effekts von Isofluran auf die Expression des miR-21-Zielgens PDCD4 erfolgte proteinbiochemisch in der ISO- und der SHAM-Gruppe. Als Methoden wurden Proteinisolierung, Proteinbestimmung nach Lowry sowie eine Western Blot Analyse durchgeführt.

### 2.5.1 Proteinisolierung

Zur Proteinisolierung wurde ein Protokoll angelehnt an Raphael *et al.* (72) verwendet. Dazu wurden etwa 50 mg Herzgewebe in flüssigem Stickstoff mechanisch zerkleinert und in 0,5 ml Lysepuffer homogenisiert. Das lysierte Gewebe wurde für 15 Minuten bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C eingefroren.

### 2.5.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Quantifizierung der Proteine wurde die Lowry-Methode (186) angewandt, die zwei Schritte beinhaltet:

1. Biuretreaktion, der Bildung eines blau-violetten Komplexes zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung.
2. Reduktion des Folin-Ciocalteu Reagenz: Die dabei resultierende intensive Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Photometrie benutzt.

Folgende Reagenzien und Lösungen wurden angesetzt:

**Reagenz A:** 10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 500 ml 0,1 M NaOH

**Reagenz B:** 2 g KNa-Tartrat *ad* 100 ml *Aqua dest.*

**Reagenz C:** 1 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  *ad* 100 ml *Aqua dest.*

**Lösung 1:** 100 Teile des Reagenz A wurden mit 1 Teil des Reagenz B und 1 Teil des Reagenz C miteinander vermischt. Pro Probe wurden 500  $\mu\text{l}$  der Lösung 1 benötigt.

**Lösung 2:** Das Folin's Reagenz wurde mit *Aqua dest.* im Verhältnis 1:1 verdünnt. Pro Probe wurden 50  $\mu\text{l}$  der Lösung 2 verwendet.

Für die Standardreihe wurden 200 µg/ml bovines Serumalbumin (BSA) benötigt und folgender Ansatz (Tabelle 17) pipettiert:

**Tabelle 17: Standardreihe für Proteinbestimmung nach Lowry.**

<i>BSA (µg/ml)</i>	<i>Zusammensetzung</i>
0	500,0 µl Wasser
12,5	31,2 µl BSA + 468,7 µl Wasser
25	62,5 µl BSA + 437,5 µl Wasser
50	125 µl BSA + 375,0 µl Wasser
100	250 µl BSA + 250,0 µl Wasser
150	375 µl BSA + 125,0 µl Wasser
200	500 µl BSA

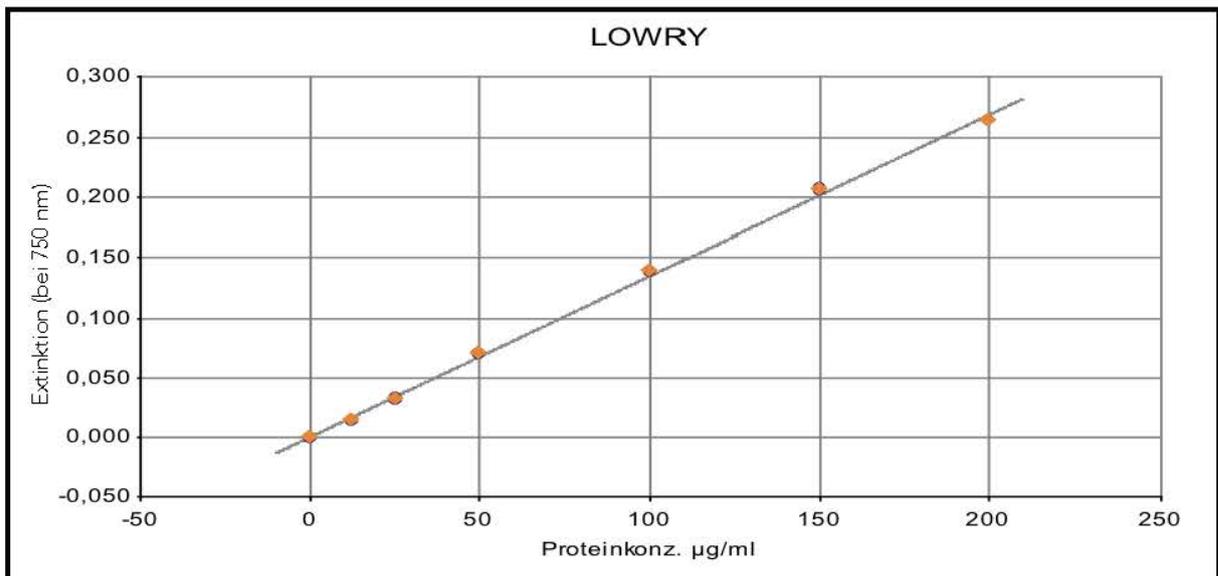
Alle zu messenden Proben wurden 1:100 mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

Zu 100 µl der Standards bzw. der verdünnten Proben wurden 500 µl der Lösung 1 pipettiert, das Gemisch gevortext und 10 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden 50 µl der Lösung 2 hinzugegeben, gevortext und für 30 Minuten bei RT inkubiert.

In die 96 *Well*-Platte wurden jeweils im Doppelwert zuerst 200 µl der Standards und anschließend 200 µl der Proben im Doppelwert pipettiert und die Extinktion der Blaufärbung bei einer Wellenlänge von 750 nm im Multi-Detektions-*Reader* für Mikroplatten (Synergy2) gemessen.

Die Abbildung 7 zeigt exemplarisch eine grafische Darstellung einer Standardreihe, die für die Proteinbestimmung nach Lowry benötigt wird. Die Extinktion (y-Achse) wird für die jeweilige, bereits bekannte Proteinkonzentration in µg/ml (x-Achse) bestimmt und in Form einer grafischen Funktion dargestellt. Mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Abb. 8) wird der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon\lambda$  als Steigung der Geraden berechnet.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe der Software Gen5™.



**Abb. 7: Exemplarische Darstellung einer Standardreihe für die Proteinbestimmung nach Lowry.**

Mithilfe der Extinktion bekannter Proteinkonzentrationen und des anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechneten molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon\lambda$  lassen sich unbekannte Proteinkonzentrationen bestimmen.

Nach Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon\lambda$  und Einsetzen der bekannten Variablen in das Lambert-Beer'sche Gesetz lassen sich unbekannte Proteinkonzentrationen (c) bestimmen.

$$E\lambda = \epsilon\lambda * c * d$$

**Abb. 8: Lambert-Beer'sches Gesetz zur Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon\lambda$ .**

$E\lambda$  = Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda$ ;  $\epsilon\lambda$  = molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$ ; c = Konzentration; d = Schichtdicke.

### 2.5.3 Western Blot Analyse

Der Nachweis spezifischer Proteine erfolgte mittels Western Blot Analyse. Mithilfe dieses proteinbiochemischen Verfahrens wird durch Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) das zuvor aufbereitete Proteingemisch in einzelne Proteinbanden aufgetrennt. Die SDS-PAGE erfolgte nach dem diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970), bei dem ein Trenn- und ein Sammelgel unterschiedlicher Pufferzusammensetzung und damit Gelstruktur hergestellt werden. Das Sammelgel, das der Probenkonzentration dient, überdeckt das feinporige Trenngel, welches die Proteinauftrennung

ermöglicht. Bevor die Proben in das Polyacrylamidgel pipettiert werden, erfolgt eine Vorbehandlung mit einem Gemisch aus 2-Mercaptoethanol und SDS-Stopppuffer. 2-Mercaptoethanol führt in Proteinen durch Reduktion zur Spaltung der Disulfidbrücken. Das anionische Detergens SDS bewirkt eine Denaturierung der Proteine und Maskierung der Eigenladung. Somit sind alle Proteine negativ geladen und werden anhand ihrer relativen Größe im Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Nach der Gelelektrophorese erfolgt die Übertragung der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran. Durch das Anlegen einer Spannung wandern die Proteine aus dem Gel in die Membran.

Vor dem Identifizieren der Proteine werden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Danach erfolgt die Behandlung mit dem primären Antikörper, der spezifisch an die gesuchten Proteine bindet. Nach einigen Waschschritten wird ein sekundärer Antikörper hinzugeben, der gegen die F<sub>c</sub>-Region des primären Antikörpers gerichtet ist und mit dieser eine Bindung eingeht.

Die Sichtbarmachung erfolgte in diesem Protokoll durch die Hinzugabe des Enzyms Meerrettichperoxidase, welche durch Bindung an den Sekundärantikörper eine Chemolumineszenzreaktion katalysiert, die anschließend detektiert werden kann. Somit lassen sich die gesuchten Proteine nachweisen.

Im Folgenden werden die Einzelschritte der Western Blot Analyse aufgeführt:

### **Herstellung eines Polyacrylamidgels**

Es wurden ein 10%iges Trenngel und ein 6%iges Sammelgel (Tabelle 18) mit einer Dicke von 1,5 mm und einer Lauflänge von ca. 6 cm hergestellt. Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf zwei Gele.

**Tabelle 18: Zusammensetzung eines 10%igen Trenn- und eines 6%igen Sammelgels.**

<i>Komponente</i>	<i>Trenngel (10 %)</i>	<i>Sammelgel (6 %)</i>
Rotiphorese® 30 %	6,6 ml	2,55 ml
<i>Aqua dest.</i>	8,2 ml	10,5 ml
1,5 M Tris base (pH 8,8)	5,0 ml	-
1,25 M Tris base (pH 6,8)	-	1,5 ml
SDS 10 %	200 µl	150 µl
TEMED	20 µl	30 µl
APS 10 %	100 µl	150 µl

### **Probenvorbereitung**

Zur Probenvorbereitung wurde 2-Mercaptoethanol 1:10 mit dem SDS-Stoppuffer vermengt und das Gemisch im Verhältnis 1:1 zur Probe hinzugegeben. Das Proben/Puffer-Gemisch wurde anschließend für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt.

### **Gelelektrophorese**

Die zwischen zwei Glasplatten gegossenen Gele wurden in eine Halterung eingespannt (jeweils zwei Gele pro Halterung) und in die Elektrophoresekammer eingesetzt.

Diese wurde mit *Running* Puffer befüllt, sodass die Halterung von *Running* Puffer überdeckt wurde. Nach dem Entfernen der Gelkämme (à 10 Probentaschen) aus den Gelen wurden dem Proteingehalt entsprechende Mengen des kurz zuvor erhitzten Proben/Puffer-Gemischs in die Geltaschen pipettiert. Der Proteingehalt lag bei 50 µg. In die erste Tasche wurden 5 µl des Größenstandards (*Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder*) pipettiert.

Die Laufzeit des Gels betrug bei 100 V ca. 85 Minuten. Nach der Gelelektrophorese wurden die Glasplatten vorsichtig voneinander gelöst, das Sammelgel vom Trenngel separiert und verworfen und das Trenngel bis zum Proteintransfer in Transferpuffer gelegt.

### **Proteintransfer**

Für die Immobilisierung der Proteinbanden auf einer PVDF-Membran und die anschließende Sichtbarmachung der gesuchten Proteine erfolgte ein Proteintransfer.

Dazu wurden in der Endphase der Gelelektrophorese 2 *Fiber Pads* und 6 Filterpapiere (je für

ein Gel) für 5 Minuten in kalten Transferpuffer eingelegt.

Gemäß der Größe des Gels wurde die PVDF-Membran auf eine Größe von 5,5 cm x 8,2 cm zugeschnitten und für 5 Minuten in Methanol gegeben. Die Transfervorrichtung wurde ebenfalls in kalten Transferpuffer gelegt.

Das Gel-Membran-Filter-Sandwich wurde wie folgt zusammengefügt: *Fiber Pad*, 3 Filterpapiere, Gel, PVDF-Membran, 3 Filterpapiere, *Fiber Pad*. Bei jeder Lage wurden Luftblasen vorsichtig ausgestrichen und die Transfervorrichtung anschließend geschlossen.

Nach Einbau der Transfervorrichtung in die mit Transferpuffer gefüllte und einem Kühlelement sowie einem Magnetrührstab ausgestattete Kammer erfolgte der Proteintransfer bei 220 mA für 1 Stunde. Im Anschluss wurde das Gel-Membran-Filter-Sandwich zerlegt und die Membran für mind. 2 Stunden in 50 ml 5%iges Blotto überführt, um alle unbesetzten Bindungsstellen auf der Membran zu maskieren. Dieser Vorgang fand auf dem Schüttler und bei RT statt.

### **Coomassie-Färbung**

Zur Färbung der aufgetrennten Proteine wurde das Gel für 30 Minuten mit *Coomassie Staining-Lösung* bedeckt. Die Substanz bindet an die basischen Seitenketten der Aminosäuren und führt somit zur Sichtbarmachung der Banden. Damit lässt sich überprüfen, ob die Gelelektrophorese erfolgreich abgelaufen ist.

Nach der Einfärbezeit wurde das Gel für 1 Stunde mit Leitungswasser entfärbt. Anschließend wurde die Entfärbelösung noch einmal erneuert und über Nacht ruhen gelassen. Am nächsten Tag ließen sich die angefärbten Proteine als Zeichen einer erfolgreich abgelaufenen Gelelektrophorese visuell begutachten.

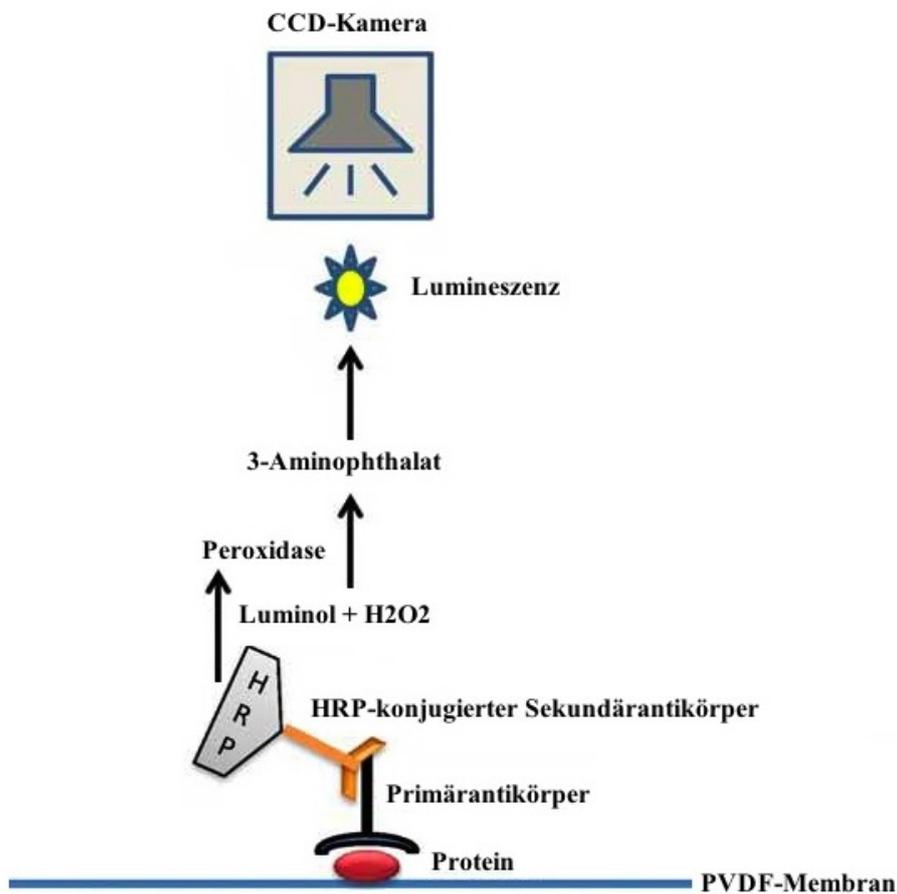
### **Immunfärbung der Membranen**

Der Anti-PDCD4-Antikörper wurde 1:1.000 in 1%igem Blotto verdünnt und vorsichtig auf die Membran gegeben. Die Einwirkphase erfolgte bei 4 °C auf dem Schüttler über Nacht.

Am nächsten Tag wurden drei 10-minütige Waschschrte mit eiskaltem *Tris-Buffered Saline and Tween 20* (TBS-T) (Erneuerung nach jeweils 10 Minuten) durchgeführt. Anschließend wurde der Anti-*rabbit*-Sekundärantikörper in 20 ml 1%igem Blotto 1:10.000 verdünnt und auf die Membran gegeben. Nach einer Einwirkphase von 2 Stunden bei RT auf dem Schüttler erfolgten abschließend drei 10-minütige Waschschrte mit TBS-T. Für den Nachweis des Referenzgens GAPDH wurde der Anti-GAPDH-Antikörper 1:40.000 in 1%igem Blotto verdünnt und die Membran nach entsprechender Einwirk- und Waschphase mit dem 1:10.000 verdünnten Anti-*mouse*-Sekundärantikörper behandelt.

## Detektion

Die Detektion der Banden erfolgte mithilfe des *enhanced chemoluminescence* (ECL)-Reagenz. Dieses besteht aus zwei Lösungen, die vor Gebrauch zu gleichen Anteilen gemischt wurden. Die Membranen wurden in 2 ml ECL-Reagenz für 1 Minute geschwenkt. Die mit dem Sekundärantikörper konjugierte Meerrettichperoxidase katalysiert mithilfe von  $H_2O_2$  die Oxidation von dem im ECL-Reagenz enthaltenen Luminol zu 3-Aminophthalat (Abb. 9). Die dabei entstehende Lumineszenz wurde mithilfe des *charge-coupled device* (CCD)-Kamerasystems von Photometrics® detektiert und die Banden mit der Software Gel-Pro® Analyzer (Version 6.0) erfasst. Die Detektionszeit zum Nachweis von PDCD4 betrug etwa 10 Minuten, die für GAPDH etwa 30 Sekunden.



**Abb. 9: Vereinfachte Darstellung der *enhanced chemoluminescence*-Reaktion.**

Die mit dem Sekundärantikörper konjugierte Meerrettichperoxidase (HRP = *horseradish peroxidase*) katalysiert mithilfe von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) die Oxidation von Luminol zu 3-Aminophthalat. Die dabei freigesetzte Lumineszenz kann mit einer *charge-coupled device* (CCD) -Kamera detektiert werden.

PVDF = Polyvinylidenfluorid. Grafik angelehnt an MacPhee (188).

### **Auswertung der Western Blots**

Die densitometrische Auswertung der Western Blots erfolgte mit der Software Gelscan (Version 6.0). Anschließend wurden aus den Banden der Kontrollgruppe und den Banden der Interventionsgruppe, jeweils in Bezug zu dem für beide Gruppen geltenden Referenzgen GAPDH, die Mittelwerte berechnet. Schließlich wurde der Mittelwert der Kontrollgruppe auf 100 % gesetzt, um so die relativen Veränderungen im Proteinexpressionslevel der Interventionsgruppe zu bestimmen.

## 2.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse und der Western Blot Analyse erfolgte mit dem Programm Microsoft® Excel® 2004 *for Mac* (Version 11.6.6). Der Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppe (SHAM bzw. I/R) wurde zur Berechnung relativer Expressionsunterschiede gleich 100 % gesetzt. Mittelwertsunterschiede zwischen den untersuchten Gruppen wurden mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben inferenzstatistisch abgesichert. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit  $p < 0,05$  angesehen. Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben und im Säulendiagramm grafisch dargestellt.

### **3. Ergebnisse**

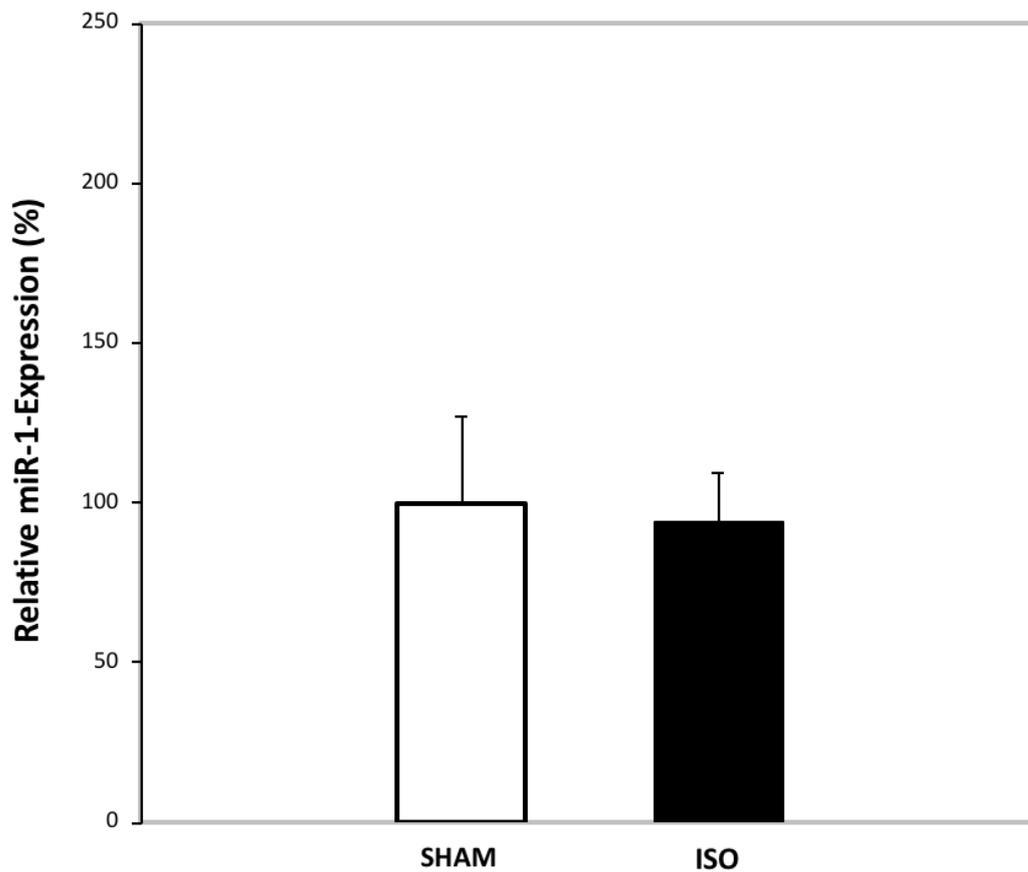
Den im folgenden Kapitel präsentierten Ergebnissen liegt das Resultat einer in der Klinik für Anästhesiologie erstellten Studie zugrunde, welche von der Tiermedizinerin Swantje Klemm-Mayer durchgeführt worden war. Sie konnte in ihrer Arbeit zeigen, dass eine APC mit Isofluran (30-minütige Gabe von Isofluran gefolgt von einer 10-minütigen Auswaschphase) die Infarktgröße nach 25-minütiger Ischämie- und 120-minütiger Reperfusionphase von  $64,7 \% \pm 12,2 \%$  (nicht vorbehandelte Kontrollen) auf  $42,7 \% \pm 15,2 \%$  ( $p = 0,005$ ) im Myokard der Ratte reduzierte. Die Infarktgrößen sind als Prozentanteil vom Risikogebiet angegeben.

#### **3.1 Charakterisierung der MicroRNA-Expression**

Die Unterschiede in den Expressionsleveln der miR-1 und miR-21 wurden mittels qRT-PCR ermittelt. Um die Auswirkung einer alleinigen Isoflurangabe auf die Expression der miR-1 und miR-21 zu untersuchen, wurden die Gruppen ISO und SHAM miteinander verglichen (Abb. 10 und 12). Der Vergleich der Gruppe ISO + I/R, in der die Tiere neben der Isofluranbehandlung nachfolgend einer I/R unterzogen wurden, mit der als Kontrolle fungierenden Gruppe I/R diente dazu, den Einfluss von Isofluran auf die Expression der miR-1 und -21 unter Berücksichtigung eines möglicherweise durch die I/R hervorgerufenen *remote*-Effekts im Nicht-Risikogebiet zu untersuchen (Abb. 11 und 13).

##### **3.1.1 Effekt von Isofluran auf die Expression der MicroRNA-1**

Eine 30-minütige Behandlung mit Isofluran (Gruppe ISO) hatte keine signifikante Auswirkung auf das miR-1-Expressionslevel ( $94 \% \pm 16 \%$ ) im Vergleich zu SHAM ( $100 \% \pm 27 \%$ ), (Abb. 10).

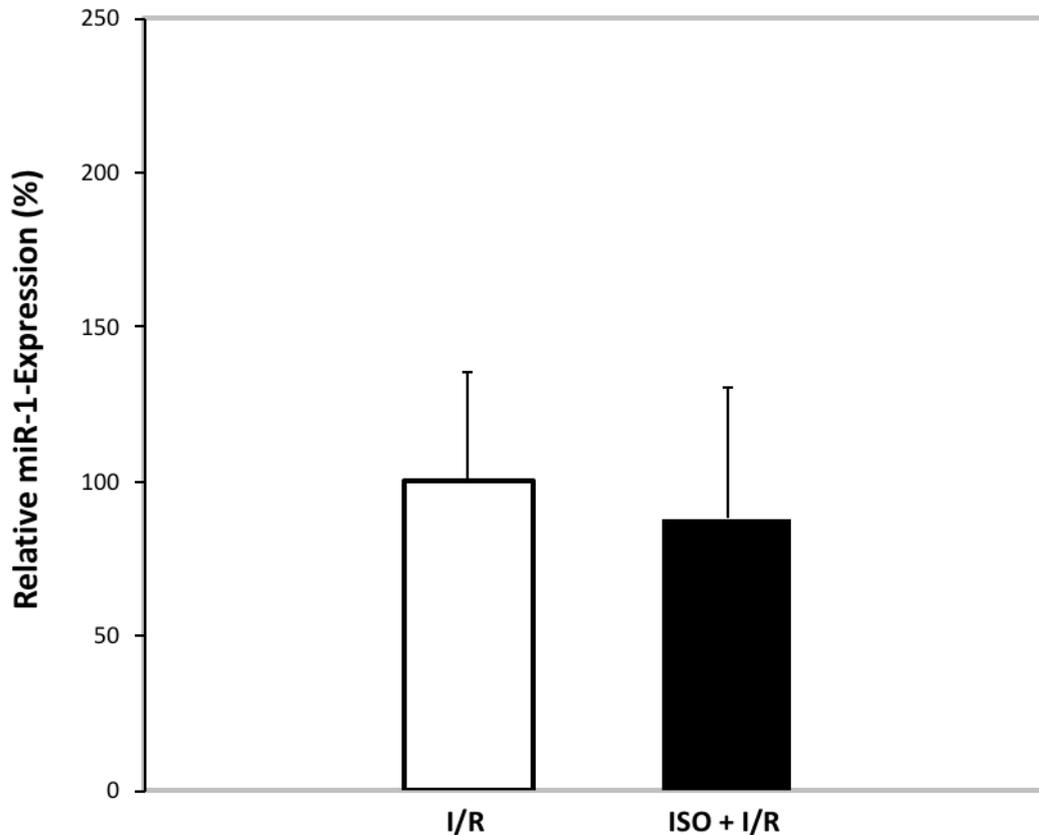


**Abb. 10: Expression der MicroRNA-1 in scheinoperierten Tieren und nach Isoflurangabe.**

Die Expression der MicroRNA (miR)-1 wurde in der scheinoperierten (SHAM) Gruppe und der Isofluran (ISO)-Gruppe untersucht. Die Dauer der Isofluranbehandlung betrug 30 Minuten. Nach einer Versuchszeit von 185 Minuten erfolgten die Herzgewebeentnahme sowie anschließend die RNA-Isolierung und die Umschreibung der RNA in cDNA. Diese diente der Amplifizierung der miR-1 und des Referenzgens U6 *small nuclear* RNA (snRNA) mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR). Die Quantifizierung der Expression erfolgte mithilfe der *Delta-Delta-CT*-Methode.

Das Säulendiagramm stellt jeweils die Mittelwerte der miR-1-Expression (%)  $\pm$  Standardabweichung für die Gruppen SHAM und ISO dar. Die Werte für die miR-1-Expression wurden als interne Kontrolle in Relation zum Referenzgen U6 snRNA gebracht. Eine 30-minütige Isofluranbehandlung hatte keine signifikante Auswirkung auf die Expression der miR-1 (94 %  $\pm$  16 %) verglichen mit SHAM (100 %  $\pm$  27 %).  $n = 6$ , t-Test,  $p = 0,64$ .

Folgten auf die 30-minütige Isofluranbehandlung eine 25-minütige Ischämie- und eine 120-minütige Reperfusionphase (Gruppe ISO + I/R), zeigte sich keine signifikante Veränderung des miR-1-Expressionslevels ( $88 \% \pm 42 \%$ ) verglichen mit I/R ( $100 \% \pm 35 \%$ ), (Abb. 11).



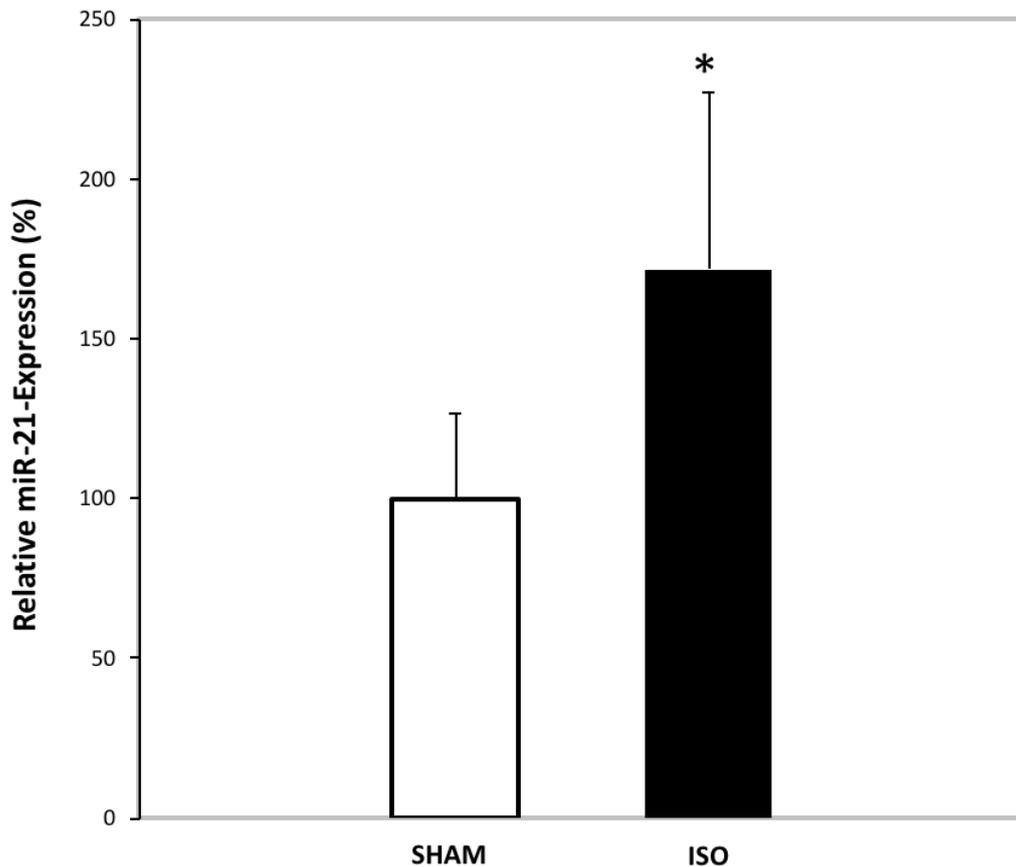
**Abb. 11: Expression der MicroRNA-1 nach Ischämie/Reperfusion und nach Isoflurangabe mit nachfolgender Ischämie/Reperfusion.**

Die Expression der MicroRNA (miR)-1 wurde in den Gruppen Ischämie/Reperfusion (I/R) und Isofluran + Ischämie/Reperfusion (ISO + I/R) untersucht. Die Dauer der Isofluranbehandlung betrug 30 Minuten. Beide Gruppen durchliefen eine 25-minütige Ischämie- und eine 120-minütige Reperfusionphase. Nach einer Versuchszeit von 185 Minuten erfolgten die Herzgewebeentnahme sowie anschließend die RNA-Isolierung und die Umschreibung der RNA in cDNA. Diese diente der Amplifizierung der miR-1 und des Referenzgens U6 *small nuclear RNA* (snRNA) mittels quantitativer *Real-Time PCR* (qRT-PCR). Die Quantifizierung der Expression erfolgte mithilfe der *Delta-Delta-CT*-Methode.

Das Säulendiagramm stellt jeweils die Mittelwerte der miR-1-Expression (%)  $\pm$  Standardabweichung für die Gruppen I/R und ISO + I/R dar. Die Werte für die miR-1-Expression wurden als interne Kontrolle in Relation zum Referenzgen U6 snRNA gebracht. Eine 30-minütige Isofluranbehandlung mit nachfolgender 25-minütiger Ischämie- und 120-minütiger Reperfusionphase hatte keine signifikante Auswirkung auf die Expression der miR-1 ( $88 \% \pm 42 \%$ ) verglichen mit I/R ( $100 \% \pm 35 \%$ ).  $n = 6$ , t-Test,  $p = 0,60$ .

### 3.1.2 Effekt von Isofluran auf die Expression der MicroRNA-21

Nach einer 30-minütigen Isofluranbehandlung (Gruppe ISO) kam es zu einem signifikanten ( $p < 0,05$ ) Anstieg im miR-21-Expressionslevel ( $172 \% \pm 56 \%$ ) gegenüber SHAM ( $100 \% \pm 27 \%$ ), (Abb. 12).

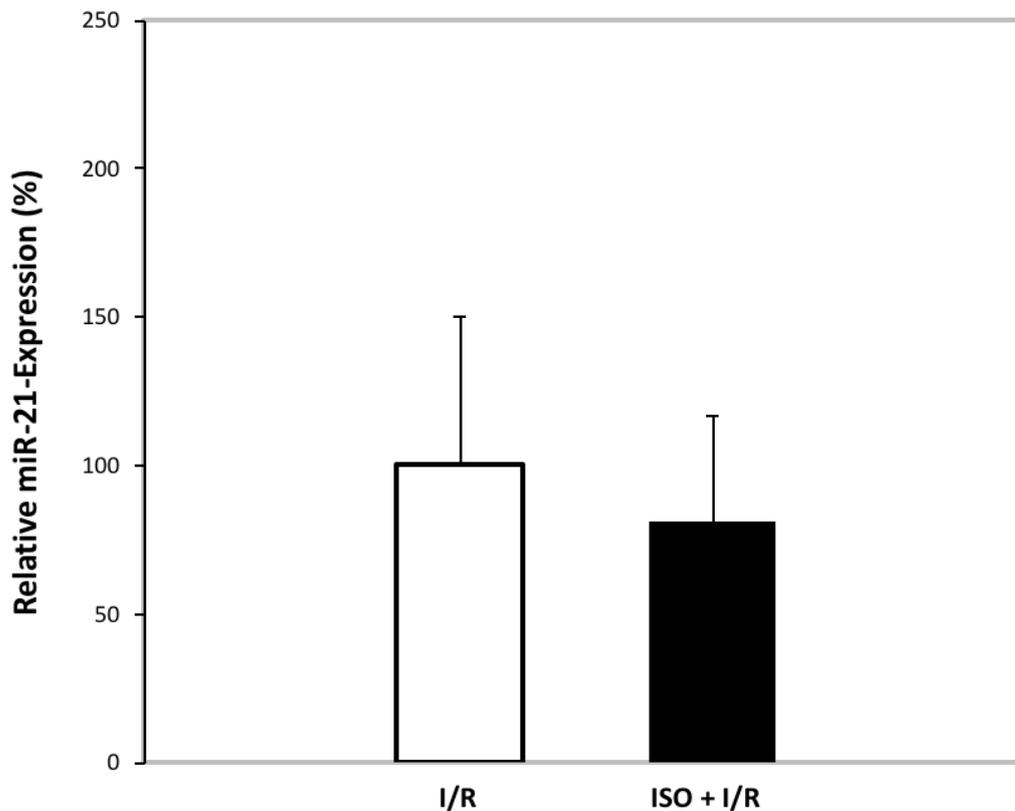


**Abb. 12: Expression der MicroRNA-21 in scheinoperierten Tieren und nach Isoflurangabe.**

Die Expression der MicroRNA (miR)-21 wurde in der scheinoperierten (SHAM) Gruppe und der Isofluran (ISO)-Gruppe untersucht. Die Dauer der Isofluranbehandlung betrug 30 Minuten. Nach einer Versuchszeit von 185 Minuten erfolgten die Herzgewebeentnahme sowie anschließend die RNA-Isolierung und die Umschreibung der RNA in cDNA. Diese diente der Amplifizierung der miR-21 und des Referenzgens U6 *small nuclear* RNA (snRNA) mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR). Die Quantifizierung der Expression erfolgte mithilfe der *Delta-Delta*-CT-Methode.

Das Säulendiagramm stellt jeweils die Mittelwerte der miR-21-Expression (%)  $\pm$  Standardabweichung für die Gruppen SHAM und ISO dar. Die Werte für die miR-21-Expression wurden als interne Kontrolle in Relation zum Referenzgen U6 snRNA gebracht. Nach einer 30-minütigen Isofluranbehandlung kam es zu einem signifikanten Anstieg des miR-21-Expressionslevels ( $172 \% \pm 56 \%$ ) verglichen mit SHAM ( $100 \% \pm 27 \%$ ).  $n = 6$ ; \* $p < 0,05$  verglichen mit SHAM.

In der Gruppe der mit Isofluran behandelten Tiere und einer anschließend durchgeführten 25-minütigen Ischämie- und einer 120-minütigen Reperfusionphase (Gruppe ISO + I/R) ergab sich kein signifikanter Unterschied für die miR-21-Expression ( $81 \% \pm 35 \%$ ) im Vergleich zu I/R ( $100 \% \pm 50 \%$ ), (Abb. 13).



**Abb. 13: Expression der MicroRNA-21 nach Ischämie/Reperfusion und nach Isoflurangabe mit nachfolgender Ischämie/Reperfusion.**

Die Expression der MicroRNA (miR)-21 wurde in den Gruppen Ischämie/Reperfusion (I/R) und Isofluran + Ischämie/Reperfusion (ISO + I/R) untersucht. Die Dauer der Isofluranbehandlung betrug 30 Minuten. Beide Gruppen durchliefen eine 25-minütige Ischämie- und eine 120-minütige Reperfusionphase. Nach einer Versuchszeit von 185 Minuten erfolgten die Herzgewebeentnahme sowie anschließend die RNA-Isolierung und die Umschreibung der RNA in cDNA. Diese diente der Amplifizierung der miR-21 und des Referenzgens U6 *small nuclear RNA* (snRNA) mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR). Die Quantifizierung der Expression erfolgte mithilfe der *Delta-Delta-CT*-Methode.

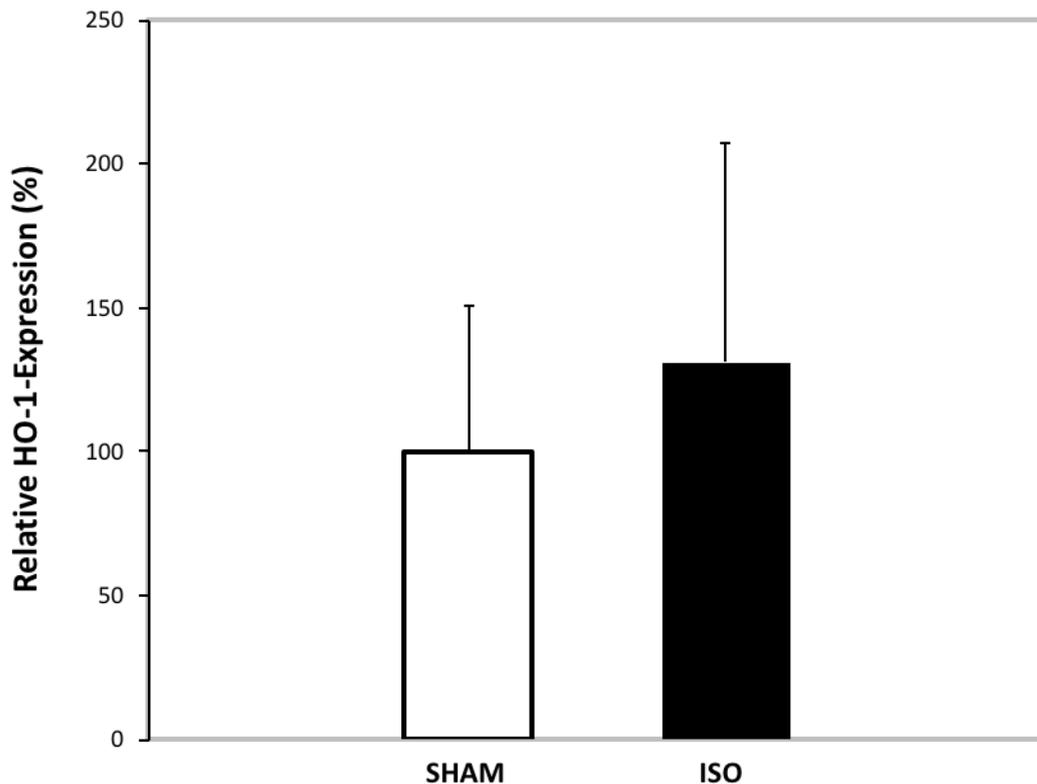
Das Säulendiagramm stellt jeweils die Mittelwerte der miR-21-Expression (%)  $\pm$  Standardabweichung für die Gruppen I/R und ISO + I/R dar. Die Werte für die miR-21-Expression wurden als interne Kontrolle in Relation zum Referenzgen U6 snRNA gebracht. Eine 30-minütige Isofluranbehandlung mit nachfolgender 25-minütiger Ischämie- und 120-minütiger Reperfusionphase hatte keine signifikante Auswirkung auf die Expression der miR-21 ( $81 \% \pm 35 \%$ ) verglichen mit I/R ( $100 \% \pm 50 \%$ ).  $n = 6$ , t-Test,  $p = 0,46$ .

### **3.2 Charakterisierung der Genexpression**

Die Unterschiede in den Expressionsleveln der HIF-1 $\alpha$ -Zielgene HO-1 und VEGF wurden mittels qRT-PCR ermittelt. Um die Auswirkung einer alleinigen Isoflurangabe auf die Expression der HO-1 und des VEGFs zu untersuchen, wurden die Gruppen ISO und SHAM miteinander verglichen (Abb. 14 und 16). Der Vergleich der Gruppe ISO + I/R, in der die Tiere neben der Isofluranbehandlung nachfolgend einer I/R unterzogen wurden, mit der als Kontrolle fungierenden Gruppe I/R diente dazu, den Einfluss von Isofluran auf die Expression der Gene HO-1 und VEGF unter Berücksichtigung eines möglicherweise durch die I/R hervorgerufenen *remote*-Effekts im Nicht-Risikogebiet zu untersuchen (Abb. 15 und 17).

### 3.2.1 Effekt von Isofluran auf die Expression der Hämoxigenase-1

Eine Isofluranexposition von 30 Minuten (Gruppe ISO) resultierte in keiner signifikanten Veränderung des HO-1-Expressionslevels ( $131 \% \pm 76 \%$ ) gemessen an SHAM ( $100 \% \pm 51 \%$ ), (Abb. 14).

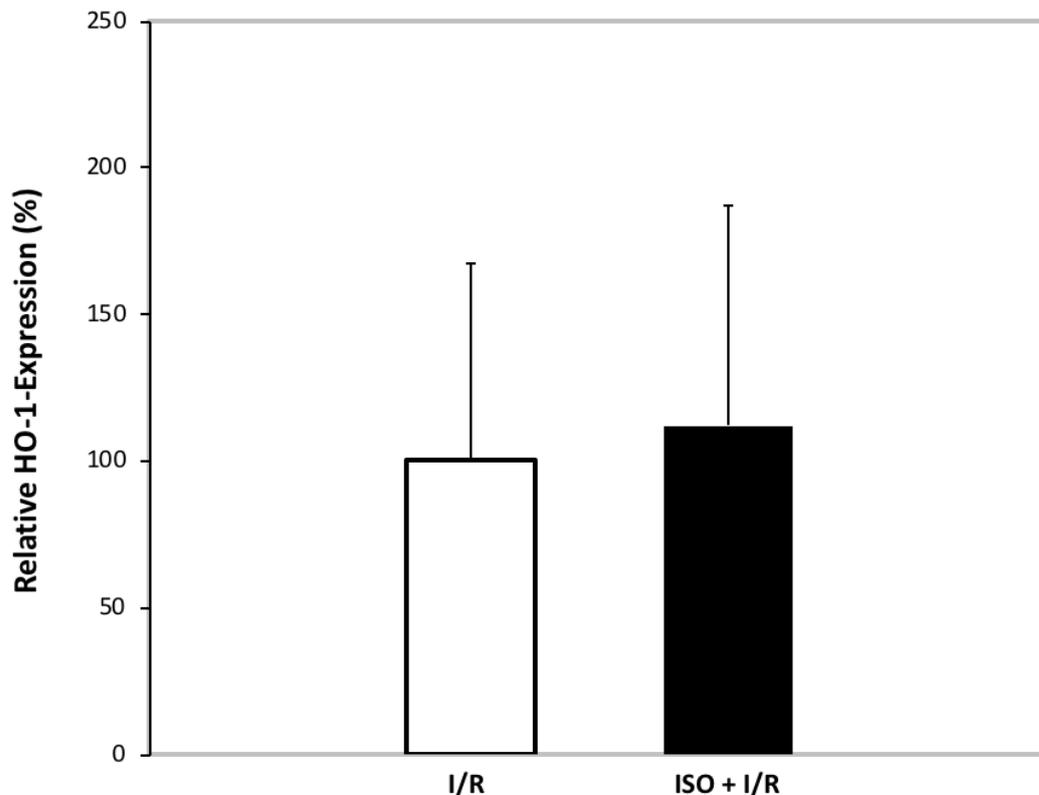


**Abb. 14: Expression der Hämoxigenase-1 in scheinoperierten Tieren und nach Isoflurangabe.**

Die Expression der Hämoxigenase (HO)-1 wurde in der scheinoperierten (SHAM) Gruppe und der Isofluran (ISO)-Gruppe untersucht. Die Dauer der Isofluranbehandlung betrug 30 Minuten. Nach einer Versuchszeit von 185 Minuten erfolgten die Herzgewebeentnahme sowie anschließend die RNA-Isolierung und die Umschreibung der RNA in cDNA. Diese diente der Amplifizierung der HO-1 und des Referenzgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR). Die Quantifizierung der Expression erfolgte mithilfe der *Delta-Delta-CT*-Methode.

Das Säulendiagramm stellt jeweils die Mittelwerte der HO-1-Expression (%)  $\pm$  Standardabweichung für die Gruppen SHAM und ISO dar. Die Werte für die HO-1-Expression wurden als interne Kontrolle in Relation zum Referenzgen GAPDH gebracht. Eine 30-minütige Isofluranbehandlung hatte keine signifikante Auswirkung auf die Expression der HO-1 ( $131 \% \pm 76 \%$ ) verglichen mit SHAM ( $100 \% \pm 51 \%$ ).  $n = 6$ , t-Test,  $p = 0,43$ .

Wurde Isofluran vor einer 25-minütigen Ischämie- und einer 120-minütigen Reperfusionphase verabreicht (Gruppe ISO + I/R), kam es zu keiner signifikanten Abweichung der HO-1-Expression ( $112 \% \pm 75 \%$ ) verglichen mit I/R ( $100 \% \pm 67 \%$ ), (Abb. 15).



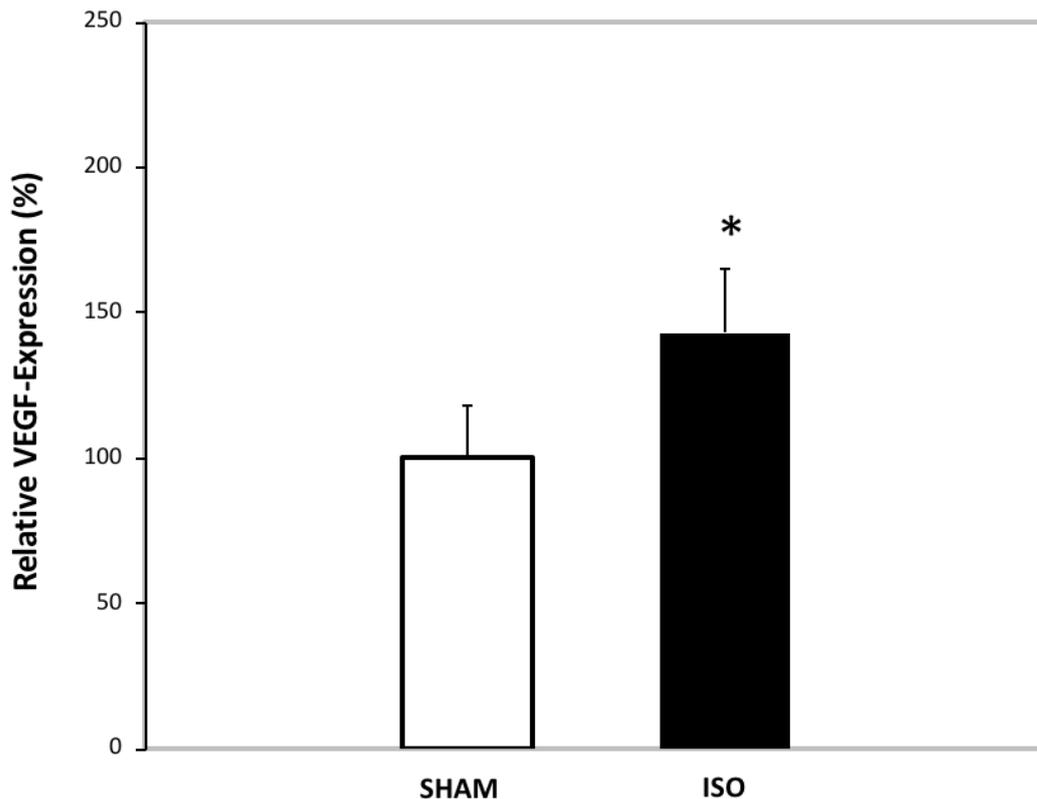
**Abb. 15: Expression der Hämoxygenase-1 nach Ischämie/Reperfusion und nach Isoflurangabe mit nachfolgender Ischämie/Reperfusion.**

Die Expression der Hämoxygenase (HO)-1 wurde in den Gruppen Ischämie (I/R) und Isofluran + Ischämie/Reperfusion (ISO + I/R) untersucht. Die Dauer der Isofluranbehandlung betrug 30 Minuten. Beide Gruppen durchliefen eine 25-minütige Ischämie- und eine 120-minütige Reperfusionphase. Nach einer Versuchszeit von 185 Minuten erfolgten die Herzgewebeentnahme sowie anschließend die RNA-Isolierung und die Umschreibung der RNA in cDNA. Diese diente der Amplifizierung der HO-1 und des Referenzgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR). Die Quantifizierung der Expression erfolgte mithilfe der *Delta-Delta*-CT-Methode.

Das Säulendiagramm stellt jeweils die Mittelwerte der HO-1-Expression (%)  $\pm$  Standardabweichung für die Gruppen I/R und ISO + I/R dar. Die Werte für die HO-1-Expression wurden als interne Kontrolle in Relation zum Referenzgen GAPDH gebracht. Eine 30-minütige Isofluranbehandlung mit nachfolgender 25-minütiger Ischämie- und 120-minütiger Reperfusionphase hatte keine signifikante Auswirkung auf die Expression der HO-1 ( $112 \% \pm 75 \%$ ) verglichen mit I/R ( $100 \% \pm 67 \%$ ).  $n = 6$ , t-Test,  $p = 0,78$ .

### 3.2.2 Effekt von Isofluran auf die Expression des *Vascular Endothelial Growth Factors*

Eine 30-minütige Isofluranbehandlung (Gruppe ISO) resultierte in einer signifikanten ( $p < 0,005$ ) Steigerung des VEGF-Expressionslevels ( $143 \% \pm 22 \%$ ) im Vergleich zu SHAM ( $100 \% \pm 18 \%$ ), (Abb. 16).

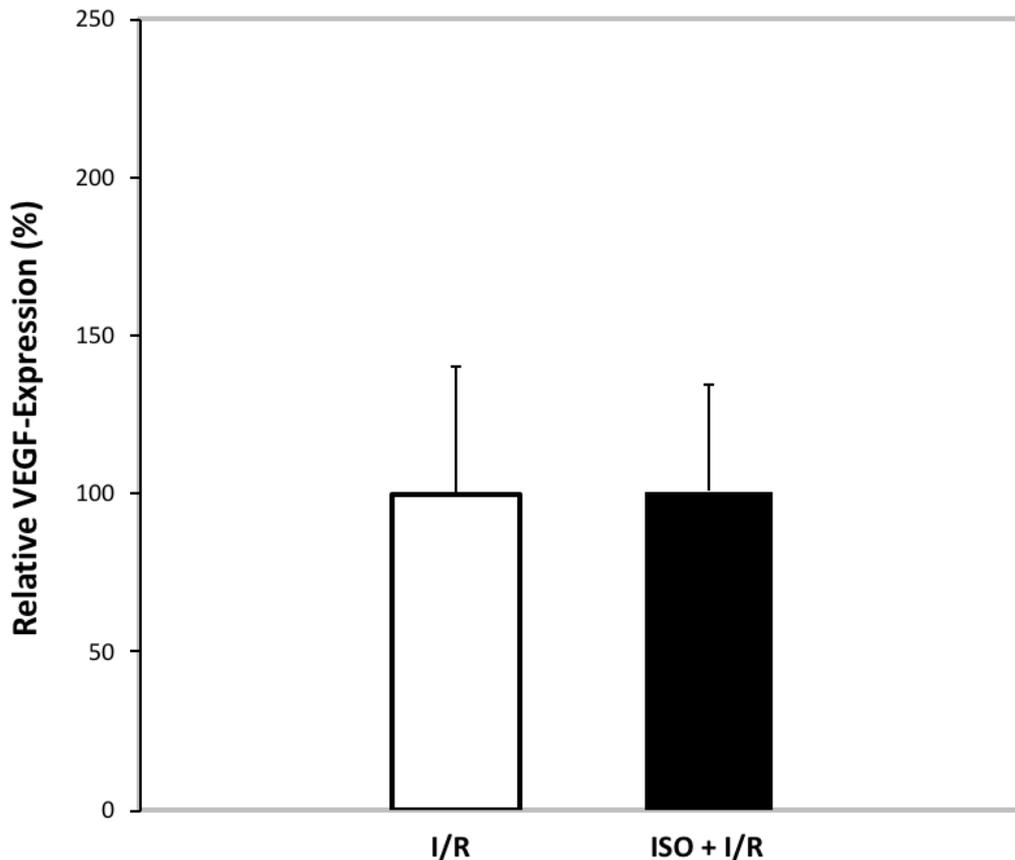


**Abb. 16: Expression des *Vascular Endothelial Growth Factors* in scheinoperierten Tieren und nach Isoflurangabe.**

Die Expression des *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF) wurde in der scheinoperierten (SHAM) Gruppe und der Isofluran (ISO)-Gruppe untersucht. Die Dauer der Isofluranbehandlung betrug 30 Minuten. Nach einer Versuchszeit von 185 Minuten erfolgten die Herzgewebeentnahme sowie anschließend die RNA-Isolierung und die Umschreibung der RNA in cDNA. Diese diente der Amplifizierung des VEGFs und des Referenzgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR). Die Quantifizierung der Expression erfolgte mithilfe der *Delta-Delta-CT*-Methode.

Das Säulendiagramm stellt jeweils die Mittelwerte der VEGF-Expression (%)  $\pm$  Standardabweichung für die Gruppen SHAM und ISO dar. Die Werte für die VEGF-Expression wurden als interne Kontrolle in Relation zum Referenzgen GAPDH gebracht. Nach einer 30-minütigen Isofluranbehandlung kam es zu einem signifikanten Anstieg des VEGF-Expressionslevels ( $143 \% \pm 22 \%$ ) verglichen mit SHAM ( $100 \% \pm 18 \%$ ).  $n = 6$ ; \* $p < 0,005$  verglichen mit SHAM.

In der Gruppe mit Isofluranbehandlung und einer anschließenden 25-minütigen Ischämie- und einer 120-minütigen Reperfusionphase (Gruppe ISO + I/R) zeigte sich keine signifikante Veränderung der VEGF-Expression ( $101 \% \pm 34 \%$ ) gegenüber I/R ( $100 \% \pm 40 \%$ ), (Abb. 17).



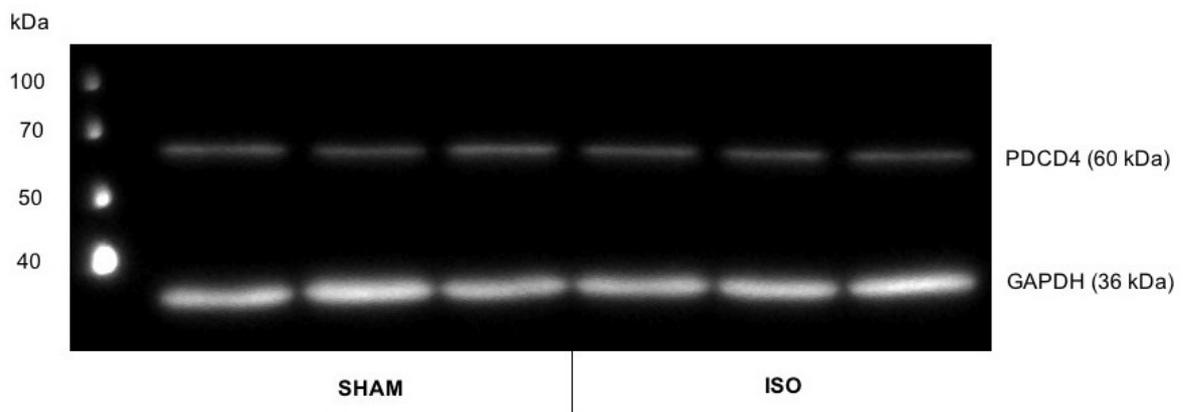
**Abb. 17: Expression des *Vascular Endothelial Growth Factors* nach Ischämie/Reperfusion und nach Isoflurangabe mit nachfolgender Ischämie/Reperfusion.**

Die Expression des *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF) wurde in den Gruppen Ischämie/Reperfusion (I/R) und Isofluran + Ischämie/Reperfusion (ISO + I/R) untersucht. Die Dauer der Isofluranbehandlung betrug 30 Minuten. Beide Gruppen durchliefen eine 25-minütige Ischämie- und eine 120-minütige Reperfusionphase. Nach einer Versuchszeit von 185 Minuten erfolgten die Herzgewebeentnahme sowie anschließend die RNA-Isolierung und die Umschreibung der RNA in cDNA. Diese diente der Amplifizierung des VEGFs und des Referenzgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR). Die Quantifizierung der Expression erfolgte mithilfe der *Delta-Delta*-CT-Methode.

Das Säulendiagramm stellt jeweils die Mittelwerte der VEGF-Expression (%)  $\pm$  Standardabweichung für die Gruppen I/R und ISO + I/R dar. Die Werte für die VEGF-Expression wurden als interne Kontrolle in Relation zum Referenzgen GAPDH gebracht. Eine 30-minütige Isofluranbehandlung mit nachfolgender 25-minütiger Ischämie- und 120-minütiger Reperfusionphase hatte keine signifikante Auswirkung auf die VEGF-Expression ( $101 \% \pm 34 \%$ ) verglichen mit I/R ( $100 \% \pm 40 \%$ ).  $n = 6$ , t-Test,  $p = 0,97$ .

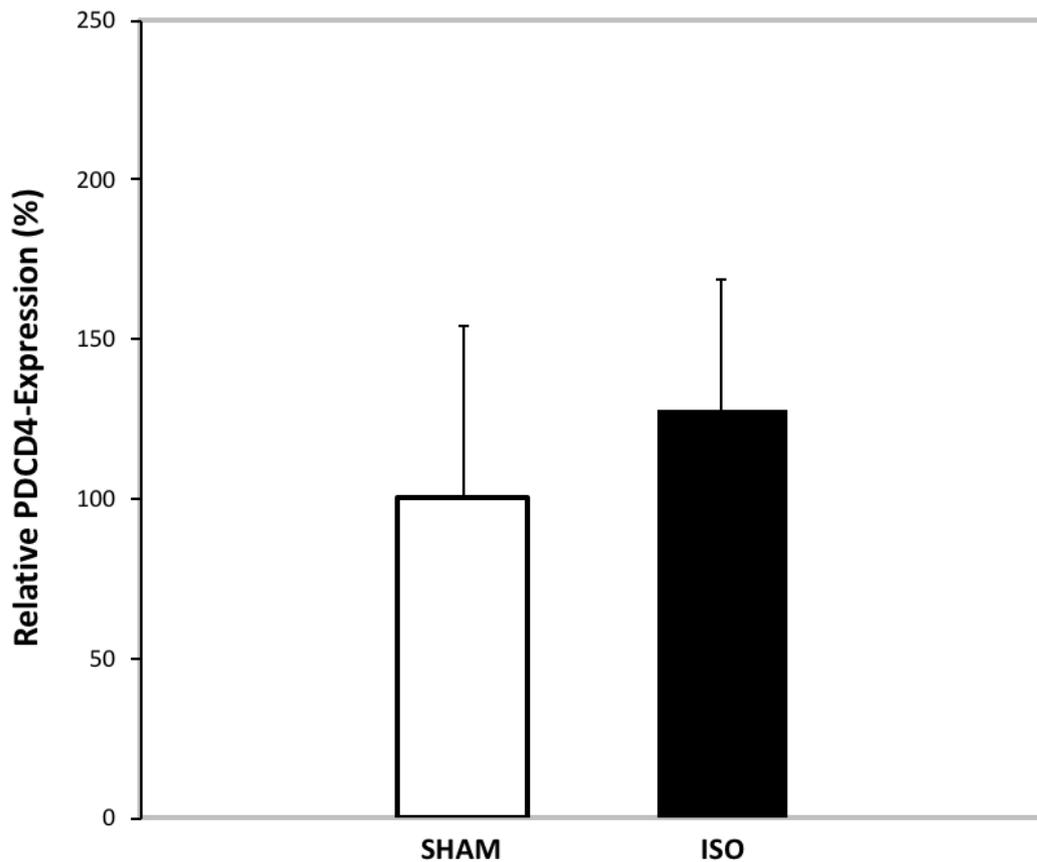
### 3.3 Effekt von Isofluran auf die Expression von *Programmed Cell Death 4*

Die Auswirkung von Isofluran auf die Expression des miR-21-Zielgens PDCD4 wurde in den Gruppen ISO und SHAM anhand des durch Proteinisolierung gewonnenen Probenmaterials mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Darstellung eines repräsentativen Western Blots findet sich in Abbildung 18, die grafische Auswertung der PDCD4-Expression zeigt Abbildung 19. Nach einer 30-minütigen Isofluranbehandlung konnte keine signifikante Veränderung der PDCD4-Expression ( $128 \% \pm 41 \%$ ) verglichen mit SHAM ( $100 \% \pm 54 \%$ ) beobachtet werden (Abb. 20).



**Abb. 18: Repräsentativer Western Blot für *Programmed Cell Death 4* und das Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.**

Die Expression von *Programmed Cell Death 4* (PDCD4) wurde in der scheinoperierten (SHAM) Gruppe und der Isofluran (ISO)-Gruppe untersucht. Die Dauer der Isofluranbehandlung betrug 30 Minuten. Nach einer Versuchszeit von 185 Minuten erfolgten die Herzgewebeentnahme und anschließend die Proteinisolierung. Im Anschluss wurde die Western Blot Analyse durchgeführt und daran anknüpfend die densitometrische Auswertung des Zielgens PDCD4 und des Referenzgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot für PDCD4 und GAPDH der SHAM- und der ISO-Gruppe. kDa = Kilodalton.



**Abb. 19: Expression von *Programmed Cell Death 4* in scheinoperierten Tieren und nach Isoflurangabe.**

Das Säulendiagramm stellt jeweils die Mittelwerte der Expression von Programmed Cell Death 4 (PDCD4) (%)  $\pm$  Standardabweichung für die scheinoperierte (SHAM) und die Isofluran (ISO)-Gruppe dar. Die Werte für die PDCD4-Expression wurden auf das Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert und die Expression in der Kontrollgruppe gleich 100 % gesetzt. Eine 30-minütige Isofluranbehandlung hatte keine signifikante Auswirkung auf die PDCD4-Expression (128 %  $\pm$  41 %) verglichen mit SHAM (100 %  $\pm$  54 %).  $n = 6$ , t-Test,  $p = 0,34$ .

## 4. Diskussion

Die Grundlage dieser experimentellen Arbeit stellte die durch eine APC mit Isofluran hervorgerufene signifikante Infarktgrößenreduktion im Myokard der Ratte dar. Welcher genaue molekulare Mechanismus sich hinter der APC verbirgt und für den protektiven Effekt von Isofluran verantwortlich ist, ist bis heute nicht gänzlich aufgeklärt. Daher war es das Ziel dieser Studie, potentiell beteiligte Faktoren, die bereits zum Verständnis anderer myokardialer Präkonditionierungseffekte, wie der IPC, beigetragen haben, im Zusammenhang mit der APC mit Isofluran näher zu analysieren. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung des Expressionsverhaltens der miR-1 und miR-21 sowie HIF-1 $\alpha$  bzw. seinen Zielgenen HO-1 und VEGF unter dem Einfluss von Isofluran, um Hinweise auf eine mögliche Beteiligung dieser Faktoren an der APC zu erlangen. Die Analyse des miR-21-Zielgens PDCD4 diente zur Charakterisierung eines auf Proteinebene potentiell sichtbaren antiapoptotischen Effekts im Rahmen der APC. Der letzte Untersuchungsaspekt bezog sich auf die Fragestellung, welchen Einfluss Isofluran im Zusammenhang mit einer I/R auf die Expression der untersuchten Faktoren hat und ob durch I/R möglicherweise ein *remote*-Effekt entsteht, der sich auf die gegebenenfalls zuvor nachgewiesenen Isofluran-induzierten Expressionsveränderungen auswirkt.

Die zu Beginn der Arbeit formulierten Fragen lassen sich wie folgt beantworten:

1. Eine 30-minütige, inhalative Isofluranexposition führt im Herzgewebe der Ratte zu einer signifikanten Expressionssteigerung der miR-21, während keine Veränderung im miR-1-Expressionslevel auftritt.
2. Die signifikante Steigerung des HIF-1 $\alpha$ -Zielgens VEGF nach Isoflurangabe könnte darauf hindeuten, dass der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  an der Isofluran-induzierten Regulation der miR-21 beteiligt ist.
3. In der Kombination aus Isofluranbehandlung und nachfolgender I/R sind die nach alleiniger Isoflurangabe nachgewiesenen Expressionsveränderungen der miR-21 und des HIF-1 $\alpha$ -Zielgens VEGF im Nicht-Risikogebiet des Herzgewebes nicht sichtbar. Dies könnte möglicherweise auf einen *remote*-Effekt, der durch die I/R zustande gekommen sein könnte, zurückgeführt werden.
4. Die inhalative Gabe von Isofluran hat keine Auswirkung auf die Proteinexpression des miR-21-Zielgens PDCD4.

## 4.1 Diskussion der Methodik

### 4.1.1 Quantitative *Real-Time* PCR zur Charakterisierung der RNA-Expression

Die molekularbiologischen Untersuchungen der Expressionsunterschiede der Gene HO-1 und VEGF sowie der miR-1 und miR-21 erfolgten mithilfe der qRT-PCR.

Bis heute hat sich die qRT-PCR als Methode der ersten Wahl zur Quantifizierung von mRNA herausgestellt (189). Nicht zuletzt spielt sie daher für die Untersuchung von Genexpressionsunterschieden eine entscheidende Rolle. Neben dem Anwendungsgebiet der Genexpression gilt die qRT-PCR auch als Goldstandard für die Detektion von miR-Expressionsunterschieden, denn diese Form der Quantifizierung der nur aus wenigen Nukleotiden bestehenden miRs ist durch eine hohe Sensitivität und Spezifität gekennzeichnet (190, 191). Nach intensiver Forschung und der Verbesserung von PCR-Techniken ermöglicht die qRT-PCR durch Fluoreszenzmessungen in der exponentiellen Phase eines jeden PCR-Zyklus eine Quantifizierung in Echtzeit (181).

Andere PCR-Techniken erlauben dagegen nur eine Quantifizierung der mRNA über eine Endpunktanalyse. Für die Detektion von Expressionsunterschieden müssen die PCR-Produkte dafür anschließend auf ein Ethidiumbromidgel aufgetragen werden (192). Higuchi *et al.* (193) entwickelten 1993 die erste Form der qRT-PCR, bei der sie sich die fluoreszierende Eigenschaft von Ethidiumbromid zu Nutze machten. Durch den Einbau der Substanz in die DNA-Doppelstränge und Bestrahlung dieser mit UV-Licht lassen sich die PCR-Produkte anhand der zyklussimultan gemessenen Fluoreszenz kameragesteuert quantifizieren. Auch wenn diese PCR-Techniken noch nicht die Exaktheit in der Quantifizierung von Genmaterial erreichen wie heutige qRT-PCR-Methoden, leisteten sie einen wertvollen Beitrag zur Weiterentwicklung der PCR.

Alternative Untersuchungsmethoden für die RNA-Analysen wären in dieser Studie die konventionelle PCR und der Northern Blot gewesen. Die Anwendung der qRT-PCR beruht auf folgenden Vorteilen, die das Erzielen qualitativ hochwertiger Ergebnisse möglich machen: Die qRT-PCR liefert exakte Ergebnisse durch die gleichzeitig ablaufende Vervielfältigung und Messung der cDNA in der exponentiellen Phase jedes PCR-Zyklus. Des Weiteren sind nach Fertigstellung der qRT-PCR keine weiteren Schritte für die Ergebnisanalyse notwendig, bei denen es zu einer Verunreinigung der PCR-Produkte kommen könnte. Geringste CT-Wert-Unterschiede innerhalb von amplifizierten Probenklonen und kleinste Standardabweichungen zeugen für einen hohen Grad an Reproduzierbarkeit (194). Die qRT-PCR gilt als die sensitivste Methode in der Analyse von mRNA, insbesondere wenn nur geringe Mengen an Gewebematerial für die RNA-Extraktion zur Verfügung stehen (189). Durch die Verwendung

von *TaqMan*<sup>TM</sup>-Sonden wird eine hohe Spezifität erreicht, da die Fluoreszenzfreisetzung eine spezifische Bindung von Sonde und Primer an die Zielgen-cDNA voraussetzt (182, 195). Zu beachten ist, dass die Anwendung der qRT-PCR einer präzisen und kontaminationsfreien Handhabung bedarf, da aufgrund der hohen Sensitivität sonst die Gefahr von falschen Ergebnissen besteht (195).

Die Auswertung der durch die qRT-PCR ermittelten Expressionsunterschiede erfolgte in der vorliegenden Studie anhand der relativen Quantifizierung. Bei dem als Normierung bezeichneten Vorgang wird die Genexpression des Zielgens in Relation eines ausgewählten Referenzgens gebracht (183, 184). Dieses sollte ubiquitär sowie in konstanten Mengen synthetisiert und seine Expression dabei nicht durch experimentelle Interventionen beeinflusst werden. Das Ziel der Normierung besteht in der Reduktion qRT-PCR-bedingter Fehler, die aus Abweichungen innerhalb des Probenausgangsmaterials resultieren können (189).

Für die Untersuchungen der Zielgene HO-1 und VEGF im Herzgewebe der Ratte wurde das Referenzgen GAPDH ausgewählt. Es stellt eines der häufigsten verwendeten Referenzgene bei der Analyse von Genexpressionsunterschieden dar (189, 196). In einigen Studien zur Eignung von GAPDH als interne Kontrolle wies das Referenzgen eine inkonstante Expression auf (197, 198). Zu den Faktoren, die sich auf ihre Expression auswirken können, gehören z. B. Hypoxie, oxidativer Stress und die Beeinflussung durch den Zellzyklus (189). Trotz dieser möglichen Einflussfaktoren auf die GAPDH-Expression ging GAPDH in verschiedenen PCR-Analysen im Rahmen von Präkonditionierungsversuchen als geeignetes Referenzgen hervor (152, 199). Auch in dieser Arbeit wies GAPDH keine interventionsbedingten Veränderungen in ihrem Expressionslevel auf. Für die Normierung der miR-1- und miR-21-Expression wurde das Referenzgen U6 verwendet, da es sich in Studien zum Einfluss von Präkonditionierungseffekten bzw. Ischämie auf die Expression ausgewählter miRs stabil zeigte (106, 200). U6 gehört zur Gruppe der snRNA und erwies sich in den vorliegenden Untersuchungen ebenfalls als geeignete interne Kontrolle.

Es wird deutlich, dass die Wahl eines geeigneten Referenzgens ein entscheidendes Kriterium darstellt, denn es bestimmt maßgeblich die Qualität und Aussagekraft der qRT-PCR-Ergebnisse.

#### **4.1.2 Western Blot zur Charakterisierung der Proteinexpression**

Die Untersuchung der PDCD4-Expression wurde mittels Western Blot Analyse durchgeführt, eine führende Methode zur Detektion und (semi-) quantitativen Analyse von Proteinen. Das Verfahren beruht auf der Auftrennung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel und dem

Transfer auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran mit anschließender Immunodetektion. Während Towbin *et al.* (201) das Polyacrylamidgel mit Harnstoff versetzten, verwendete Burnette (202) die von Laemmli (187) beschriebene SDS-PAGE zur Separation von Proteinen. Diese bereits 1970 entwickelte Methode der Gelelektrophorese trug dabei wesentlich zur Etablierung des Western Blots bei.

Ein wesentlicher Schritt beim Western Blot ist der Transfer der aufgetrennten Proteine vom Gel auf die Membran. Dieser wird insbesondere von der Beschaffenheit des Gels, der Wahl der Membran und der Molekülmasse der Proteine bestimmt (203). Nitrocellulosemembranen gelten beispielsweise bei dem Transfer kleiner Proteine als ungeeignet, denn die Fixierung der Proteine an die Membran gelingt meist nur unvollständig (204). PVDF-Membranen besitzen dagegen eine hohe Bindungskapazität und chemische Stabilität (203) und wurden in dieser Arbeit verwendet. Der Western Blot ist durch eine hohe Spezifität gekennzeichnet, welche auf der spezifischen Antigen-Antikörper-Komplexbildung beruht (205). Durch die Auswertung des Blottingergebnisses mittels ECL-Detektion wird dazu ein hoher Grad an Sensitivität erreicht (206). Bei dieser Methode kommt es durch die Oxidation von Luminol durch die mit dem Sekundärantikörper konjugierte Meerrettichperoxidase zu einer Lichtreaktion, die bandenspezifisch erfasst wird und eine densitometrische Auswertung der Proteinbanden ermöglicht.

Für die Vergleichbarkeit der Proteinexpression innerhalb der verwendeten Proben wird auch beim Western Blot das Prinzip der Normierung angewendet. Dabei wird die Expression des Zielproteins in Relation zu einem Referenzprotein, beispielsweise GAPDH,  $\beta$ -Actin oder  $\beta$ -Tubulin, gebracht. Diese Vorgehensweise dient der Minimierung von Abweichungen innerhalb der Proben, die z. B. durch unterschiedliche Ausgangsmengen oder durch Ungleichheiten in der Transfereffizienz zustande kommen können (207). Wie bereits erwähnt wurde, wird der Nutzen von Referenzgenen aufgrund der Beeinflussung ihrer Expression durch verschiedene Faktoren teilweise kritisch bewertet. Daher stellt sich die Frage, ob die Expression von Referenzproteinen in gleichem Maß physiologischen und pathologischen Faktoren unterliegt wie die der Referenzgene. Auch wenn diese Fragestellung bis jetzt weniger im Mittelpunkt der Forschung stand als der Einfluss auf Referenzgene, geht aus Studien hervor, dass die Expression der Referenzproteine unter anderem zwischen Gewebetypen und Zelllinien (207) sowie in Abhängigkeit von der experimentellen Intervention (208) Unterschiede aufweisen kann.

Im Rahmen von Untersuchungen zur Auswirkung von Präkonditionierungseffekten auf die Expression des miR-21-Zielgens PDCD4 zeigte sich GAPDH in Western Blot Analysen unverändert in ihrer Expression (106, 107, 209). Daher erschien es auch in der vorliegenden

Arbeit von Vorteil, GAPDH als Referenzprotein zu verwenden. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, veränderte sich die GAPDH-Expression im Rattenherzgewebe unter den durchgeführten Interventionen nicht und konnte somit zur semiquantitativen Auswertung herangezogen werden. Das mögliche Auftreten instabiler Proteinexpressionen macht jedoch deutlich, dass bei der Auswahl eines Referenzproteins der jeweilige Gewebe- bzw. Zelltyp und die experimentelle Intervention miteinbezogen und in vergleichender Literaturrecherche auf Erfahrungen zur Verwendung von Referenzproteinen geachtet werden sollte.

Neben der Untersuchung der PDCD4-Expression mittels Western Blot Analyse war auch der proteinbiochemische Nachweis von HIF-1 $\alpha$  Teil dieser Arbeit, um ihn als potentiellen Bestandteil des APC-Mechanismus identifizieren zu können. Es ist bekannt, dass HIF-1 $\alpha$  unter normoxischen Bedingungen im 26S-Proteasom degradiert wird, während es unter Hypoxie zu einer Stabilisierung des Transkriptionsfaktors kommt (118, 130). Aufgrund dieses physiologischen Verhaltens ist es daher oftmals schwierig, HIF-1 $\alpha$  unter Laborbedingungen nachzuweisen, zumal er auch noch nach der Entnahme von z. B. Hypoxie-behandelten Gewebeproben abgebaut werden kann. Mithilfe der Behandlung von Cobaltchlorid *in vitro*, welches eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  bewirkt (210), wurde zwar in dieser von mir verwendeten Positivkontrolle ein Signal sichtbar, jedoch ließ sich HIF-1 $\alpha$  in den Herzgewebeproben nicht nachweisen. Aus diesem Grund erfolgte die Untersuchung einer HIF-1 $\alpha$ -Induktion unter dem Einfluss von Isofluran indirekt über den Nachweis der Induktion seiner Zielgene HO-1 und VEGF, wie bereits für die Hypoxie-induzierte späte Präkonditionierung von unserer Arbeitsgruppe beschrieben (152).

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die der Arbeit zugrunde liegende Infarktgrößenreduktion im *in vivo*-Modell der Ratte zeigt, dass eine APC mit Isofluran vor der Durchführung einer I/R-Sequenz kardioprotektive Effekte erzielen kann. Dieses Resultat bestätigt damit die Ergebnisse vorangegangener *in vivo*-Studien zur Isofluran-induzierten Infarktgrößenreduktion (36, 61, 71, 72). Aufgrund der erschwerten Integration der IPC in die Praxis (53, 211) stellt die APC eine im Vergleich zur IPC risikoärmere, jedoch ähnlich effektive Methode zur Prävention (perioperativer) MIs dar. Studienergebnissen zufolge sind an der APC Signalwege beteiligt, die auch beim Mechanismus der IPC eine Rolle spielen (53, 55, 212, 213). Dazu zählen unter anderem ATP-abhängige K<sup>+</sup>-Kanäle (59), PKC (66), PI3K/Akt (72) sowie ERK1/2 (71). ERK1/2 agieren als Trigger im kardioprotektiven Regulationsmechanismus der APC mit Isofluran und stimulieren gleichzeitig

die Synthese des HIF-1 $\alpha$ -Proteins (71). HIF-1 $\alpha$  ist dabei nicht nur bei der APC von Bedeutung, sondern darüber hinaus bei der Regulation von HRMs, zu denen auch die hier untersuchte miR-21 gehört (131). Sowohl für die miR-21 (106, 107) als auch für die miR-1 (86, 209) konnte in Studien zur Infarktgrößenreduktion eine IPC-abhängige Regulation nachgewiesen werden. Für die APC blieb die Beteiligung dieser miRs bislang wenig erforscht.

Vor dem Hintergrund der Kardioprotektion und den genannten Ergebnissen ist ein regulatorischer Zusammenhang zwischen APC, HIF-1 $\alpha$  bzw. seinen Zielgenen und HRMs denkbar. Für die Untersuchung des möglichen Zusammenwirkens der Untersuchungsfaktoren unter dem Einfluss von Isofluran wurden tierexperimentelle und molekularbiologische Versuche durchgeführt. Der zunächst im Rahmen der Gesamtstudie durchgeführte tierexperimentelle Teil diente dem Nachweis eines durch die APC mit Isofluran induzierten kardioprotektiven Effekts, welcher anhand einer signifikanten Infarktgrößenreduktion verifiziert wurde. Zur Untersuchung des protektiven Effekts im Sinne einer Infarktgrößenreduzierung wurde dabei das von Wang *et al.* (71) entwickelte Versuchsprotokoll in modifizierter Form verwendet.

Im in der vorliegenden Studie durchgeführten molekularbiologischen Teil wurden ausgewählte Faktoren untersucht, die aus Studien zur Präkonditionierung als kardioprotektiv wirksam hervorgingen und denen daher eine potentielle Funktion bei der APC zukommen könnte. Die dabei gewonnenen Ergebnisse werden im Folgenden im Hinblick auf ihre Bedeutung für die APC kritisch diskutiert.

#### **4.2.1 Expressionsmuster der MicroRNA-1 und -21 bei der anästhetischen Präkonditionierung mit Isofluran**

Eine 30-minütige APC mit Isofluran führte im Herzgewebe der Ratte zu einer signifikanten Expressionssteigerung der miR-21 um 72 % verglichen mit der Kontrollgruppe. Das Expressionslevel der miR-1 blieb unter der durchgeführten Intervention unverändert.

Die Ergebnisse der vorliegenden *in vivo*-Studie zu den Expressionsveränderungen der miR-21 unter dem Einfluss von Isofluran deuten darauf hin, dass miRs nicht nur IPC (86, 106, 107, 209, 214)- und Hypoxie (103, 131, 215)-abhängig reguliert werden, sondern auch dem Einfluss einer APC unterliegen können. Diese Schlussfolgerung geht aus dem hier gezeigten signifikant erhöhten Expressionslevel der miR-21 nach Isofluranexposition hervor. Damit wird auch das nach Abschluss der vorliegenden Studie publizierte Ergebnis von Olson *et al.* (109) bestätigt, die ebenfalls ein gesteigertes miR-21-Expressionslevel nach Isoflurangabe in einem ähnlichen

*in vivo*-Modell sowie in einem *in vitro*-Modell der Ratte nachweisen konnten. In beiden Studien wurde Isofluran für eine Dauer von 30 Minuten appliziert. Im Unterschied zueinander lag das Intervall zwischen Abschluss der Isoflurangabe und Materialentnahme bei der Olson-Studie bei 15 Minuten, in der vorliegenden Arbeit bei 155 Minuten. Während Olson *et al.* molekularbiologische Analysen an Kardiomyozyten durchführten, die sie aus den *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen gewinnen konnten, wurde in dieser Arbeit Herzgewebe verwendet. Trotz der Unterschiede im Versuchsmodell wurde in beiden Studien mit qRT-PCR eine signifikante Expressionssteigerung der miR-21 gezeigt, was darauf schließen lässt, dass Isofluran eine im Herzen nachweisbare Veränderung im miR-21-Expressionslevel innerhalb eines kurzen Zeitraums (bereits 15 Minuten nach Isoflurangabe) sowie über einen längeren Zeitraum hinweg (vorliegende Studie) induzieren kann.

Neben Hinweisen auf eine Isofluran-abhängige Regulation der miR-21 lässt sich aus dem unterschiedlichen Expressionsverhalten der untersuchten miRs auf ein weiteres Bindeglied im Regulationsweg der APC schließen. Eine entscheidende Rolle spielen dabei HRMs. Diese umfassen eine Gruppe von insgesamt 27 miRs, bei denen eine Expressionssteigerung nach Hypoxiestimuli, teilweise HIF-1 $\alpha$ -abhängig, in Krebszelllinien beobachtet wurde (131). Da es sich bei der miR-21 um eine HRM handelt und ihr Expressionslevel nach Isofluranbehandlung hochreguliert wurde, wäre es daher denkbar, dass HIF-1 $\alpha$  an der Isofluran-abhängigen Regulation der miR-21 mitwirken könnte. Die ebenfalls untersuchte miR-1, die nicht der Gruppe der HRMs zugeordnet wird, wies in der vorliegenden Untersuchung im Gegensatz zur miR-21 keine signifikante Expressionsveränderung nach Isofluranexposition auf. Bei gemeinsamer Betrachtung könnten die Ergebnisse der durch Isoflurangabe signifikant hochregulierten miR-21 und der in ihrer Expression nicht beeinflussten miR-1 somit darauf hindeuten, dass HIF-1 $\alpha$  an einer APC-abhängigen Regulation der miR-21 beteiligt sein könnte.

Neben der miR-1 und miR-21 wurden im Rahmen der gesamten Studie auch Expressionsveränderungen der miR-210, als Teil eines weiteren Dissertationsprojektes, unter dem Einfluss von Isofluran untersucht. MiR-210 gilt ebenfalls als kardioprotektive miR, der bei experimentell induziertem MI der Maus eine angiogenesefördernde und antiapoptotische Wirkung nachgewiesen wurde (215). Obwohl sie, wie die miR-21, auch als HRM identifiziert wurde (131), blieb ihre Expression nach Isoflurangabe unverändert. Da die Expressionslevel der miR-210 bislang vor allem unter dem Einfluss der Präkonditionierungsstimuli IPC und Hypoxie und *in vitro*-Versuchen beschrieben wurden (214, 215) und es keine Daten zu ihrem Expressionsverhalten nach APC unter *in vivo*-Bedingungen gibt, sind daher weitere

Untersuchungen notwendig, um die exakte Rolle von HRMs im Kontext der APC zu entschlüsseln.

Eine Präkonditionierung mit Isofluran, auf die im Anschluss eine I/R folgte, rief im Nicht-Risikogebiet der linken Koronararterie keine signifikante Veränderung in den Expressionsleveln der miR-1 und -21 hervor.

Ursprünglich war bei der Planung der Dissertation vorgesehen, das Risikogebiet des Herzgewebes zu untersuchen, um den tierexperimentell nachgewiesenen kardioprotektiven Effekt von Isofluran auf molekularer Ebene charakterisieren zu können. Aufgrund eines technischen Defekts standen die Proben mit dem Risikogebiet nicht für diese Untersuchung zur Verfügung. Dies stellt eine Limitierung der Studie dar. Um dennoch die Auswirkung von Isofluran auf die Expression der miR-1 und -21 unter Berücksichtigung einer nachfolgenden I/R zu analysieren, wurde stattdessen eine Untersuchung des Nicht-Risikogebiets durchgeführt, in der kein unmittelbarer I/R-Schaden ausgelöst wurde.

Bei Betrachtung des hier erzielten Ergebnisses stellt sich die Frage, warum der zuvor beobachtete Isofluran-bedingte Effekt auf die Expression der miR-21 in den Tieren, die einer Isofluranbehandlung gefolgt von einer I/R unterzogen wurden im Vergleich mit I/R alleine, im Nicht-Risikogebiet nicht nachweisbar war. Hierbei ist zu beachten, dass das Gewebe der Gruppe ISO + I/R zum Zeitpunkt der Präkonditionierung eine identische Behandlung mit Isofluran erhalten hatte wie das der Gruppe ISO, da es zu diesem Zeitpunkt noch keiner I/R unterzogen war und somit noch nicht in Risikogebiet und Nicht-Risikogebiet unterschieden werden konnte. Dass der Effekt von Isofluran auf die miR-21-Expression in der Gruppe ISO + I/R nicht nachweisbar war, könnte darauf hinweisen, dass von I/R ein Effekt ausgeht, der Einfluss auf die miR-Expression im untersuchten Nicht-Risikogebiet nimmt. Dieser Effekt ist als *remote*-Effekt zu bezeichnen, der möglicherweise ausgehend von einer I/R „aus der Ferne“ die Expression der miR-21 im Nicht-Risikogebiet beeinflusst und zu einer Expressionssteigerung der miR-21 führt, die die Steigerung durch Isofluran maskiert. Erstmals nachgewiesen wurde ein *remote*-Effekt im Kontext einer Präkonditionierung und zwar in der im Jahr 1993 von Przyklenk *et al.* veröffentlichten *in vivo*-Studie am Hundeherzen (216). Sie konnten zeigen, dass mehrere kurze regionale I/R-Sequenzen in einem Gefäßbett entfernt gelegenes Herzgewebe vor dem Schaden einer länger anhaltenden I/R schützen. Im Unterschied zu der Studie von Przyklenk *et al.* wurde in der vorliegenden Arbeit keine RIPC durchgeführt, sondern eine I/R mit vorangehender Präkonditionierung mit Isofluran. Das Phänomen des

„*remote*“-Effekts, wenn auch im Kontext einer RIPPC entstanden, soll dennoch ein wichtiger Aspekt bei der Diskussion der hier erzielten Studienergebnisse sein.

Um den Zusammenhang zwischen I/R und der Expression der miR-21 besser verstehen zu können, wäre es interessant, zu wissen, inwiefern sich eine alleinige I/R in diesem Versuchsmodell auf ihre Expression im Nicht-Risikogebiet auswirkt. Dass die miR-21 allgemein dem Stimulus I/R unterliegt, wurde bereits in verschiedenen *in vivo*-Studien am Herzen von Nagetieren nachgewiesen, deren Ergebnisse jedoch kontrovers sind (92, 217). In der Studie von Tang *et al.* (92) kam es beispielsweise im *in vivo*-Modell der Ratte nach 30-minütiger Ischämie- und 24-stündiger Reperfusionsphase zu einer Herabregulation des miR-21-Expressionslevels. Die gleiche I/R-Zeit führte im *in vivo*-Modell der Maus hingegen zu einer Expressionssteigerung der miR-21 (217). Zwar zeigt sich in den beiden Studien eine Beeinflussung der miR-21-Expression durch I/R, eine Untersuchung des Nicht-Risikogebiets lässt sich jedoch nicht ableiten. Anders als bei den genannten Arbeiten, die sich mit dem Einflussfaktor I/R beschäftigten, untersuchten Dong (107) und van Rooij (108) *et al.* in *in vivo*-Studien zum Expressionsverhalten diverser miRs bei/nach MI neben dem Infarktgebiet bzw. der *border area* explizit auch das Nicht-Infarktgebiet/*remote*-Gebiet. Hierbei zeigte sich in beiden Studien, dass es verglichen mit den Tieren ohne Infarkt zum Zeitpunkt einer frühen und einer späten Phase nach dem MI zu einem Anstieg des miR-21-Expressionslevels im Nicht-Infarktgebiet kam, was möglicherweise auf einen durch den MI bedingten *remote*-Effekt zurückgeführt werden könnte. Das Ergebnis stützt folglich auch die oben genannte Theorie, dass es in der vorliegenden Studie durch die I/R zu einer Steigerung der miR-21-Expression gekommen sein könnte und man daher keinen Unterschied zwischen den Gruppen I/R und ISO + I/R sieht. Letztendlich lässt sich die Frage, ob die Expression der miR-21 in der vorliegenden Studie dem Einfluss einer I/R unterliegt, von der ein *remote*-Effekt ausgehen könnte, jedoch anhand der bisherigen Daten nicht beantworten, da der Vergleich der Gruppen I/R und SHAM nicht durchgeführt werden konnte.

Um das hier erzielte Ergebnis eines unveränderten miR-21-Expressionslevels nach Isoflurangabe und I/R zu erläutern, wäre es daher zum einen interessant, die Gruppen I/R und SHAM einander gegenüberzustellen. Hieraus könnte hervorgehen, ob beispielsweise durch eine alleinige I/R ein *remote*-Effekt entsteht, der durch Isofluran nicht mehr weiter beeinflusst wird bzw. der durch Isofluran hervorgerufene Effekt weniger deutlich wird. Zum anderen könnte der Vergleich der Gruppen ISO + I/R vs. ISO zeigen, ob ein von I/R ausgehender *remote*-Effekt mit der Isofluran-induzierten Expressionssteigerung interferiert und der Effekt durch Isofluran infolgedessen relativiert wird.

Es zeigt sich, dass weitere Untersuchungen notwendig sind, um das Expressionsmuster der miR-21 unter dem Einfluss von Isofluran und eines möglichen I/R-bedingten *remote*-Effekts im Nicht-Risikogebiet näher zu charakterisieren.

Zum Einfluss von I/R auf die Expression der miR-1 liegen in der Literatur unterschiedliche Untersuchungsergebnisse vor. Kam es z. B. nach einer 30-minütigen Ischämie- und einer 24-stündigen Reperfusionphase in Rattenkardiomyozyten zu einer Hochregulation der miR-1 (92), führte eine Sequenz von 60 Minuten Ischämie und 3 Stunden Reperfusion in Rattenkardiomyozyten zu einer Reduktion des miR-1-Expressionslevels (96). Während aus beiden Arbeiten nicht eindeutig hervorgeht, welches Herzgewebeareal verwendet wurde, führten Brandenburger *et al.* (27) neben dem Risikogebiet auch Untersuchungen am Nicht-Risikogebiet durch. Sie konnten in einem *in vivo*-Modell der Ratte nach einer 35-minütigen Ischämie- und einer 6-stündigen Reperfusionphase eine Zunahme des miR-1-Expressionslevels im Nicht-Risikogebiet nachweisen. Bei gleicher Ischämiezeit und einer 2-stündigen Reperfusionzeit kam es im Risikogebiet hingegen zu einer miR-1-Suppression. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine I/R nicht nur im direkten Versorgungsgebiet (Risikogebiet) der okkludierten Koronararterie Einfluss auf die Expression der miR-1 nimmt, sondern auch *remote* im Nicht-Risikogebiet wirken kann. Die Variabilität im miR-1-Expressionsmuster könnte zudem möglicherweise in den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten begründet sein. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass das Expressionslevel der miR-1 nach einer Ischämie von 35 bis 60 Minuten und einer Reperfusionphase von 2 bis 3 Stunden (27, 96) zunächst erniedrigt ist und sich nach einer 6- bis 24-stündigen Reperfusion (27, 92) hochreguliert darstellt. Dies könnte bedeuten, dass das Expressionsverhalten der miR-1 unter I/R durch den jeweiligen Untersuchungszeitpunkt (mit)beeinflusst wird und ihre Expression somit einer dynamischen Regulation unterliegen könnte. Inwiefern die Expression der miR-1 in der vorliegenden Arbeit durch eine alleinige I/R (25-minütige Ischämie und 2-stündige Reperfusion) bzw. einen von der I/R ausgehenden *remote*-Effekt beeinflusst wird, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt offen. An den in dieser Studie erzielten Ergebnissen der miR-1-Expression wird jedoch deutlich, dass es weder nach Isofluranexposition und nachfolgender I/R noch nach alleiniger Isoflurangabe zu einer Expressionsveränderung der miR-1 kam. Dies könnte darauf hinweisen, dass die nicht zu den HRMs zugehörige miR-1 weder dem Einfluss einer APC mit Isofluran noch dem Einfluss eines möglichen *remote*-Effekts durch I/R unterliegt.

Zusammenfassend geht aus der Studie hervor, dass eine APC mit Isofluran mit einer Expressionssteigerung der miR-21 vergesellschaftet ist. Das unveränderte Expressionslevel der miR-1 deutet darauf hin, dass sie keiner Regulation durch Isofluran unterliegt. Dies stützt die Hypothese, dass HRMs, wie die miR-21, an der APC beteiligt sein könnten. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die exakte Bedeutung der HRMs für einen möglichen Regulationsweg der APC zu erfassen.

Unter dem Einfluss einer Isofluranbehandlung mit nachfolgender I/R wurde kein signifikanter Effekt von Isofluran auf die Expression der miR-1 und -21 im Nicht-Risikogebiet der linken Koronararterie sichtbar. In Bezug auf die miR-1, die nicht zu den HRMs gehört, deutet das Ergebnis daraufhin, dass diese keinem I/R-bedingten *remote*-Effekt unterliegt. Hinsichtlich des fehlenden Effekts von Isofluran auf die Expression der miR-21 nach Isofluranbehandlung und anschließender I/R sind weitere Untersuchungen nötig, um die Bedeutung eines potentiell von der I/R ausgehenden *remote*-Effekts für die miR-Expression im Kontext einer APC zu ergründen.

#### **4.2.2 Expressionsmuster der Hämoxigenase-1 und des *Vascular Endothelial Growth Factors* als Zielgene des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1alpha bei der anästhetischen Präkonditionierung mit Isofluran**

Der Effekt einer 30-minütigen APC mit Isofluran zeigte sich im Myokardgewebe der Ratte in einem 43%igen signifikanten Anstieg der VEGF-mRNA-Expression sowie einer 31%igen nicht signifikanten Zunahme des HO-1-mRNA-Expressionslevels.

Die Hypothese, dass HIF-1 $\alpha$  eine Funktion im potentiellen Mechanismus der APC mit Isofluran einnehmen könnte, wurde aufgrund seiner nachgewiesenen Beteiligung in zwei unabhängig voneinander untersuchten Zusammenhängen aufgestellt. Ein Ergebnis bezieht sich dabei auf den direkten Einfluss von Isofluran auf die HIF-1 $\alpha$ -Expression, welcher im Rahmen einer *in vivo*-Studie zur APC untersucht wurde (71). Darin konnte im Herzgewebe der Ratte gezeigt werden, dass Isofluran eine Steigerung des HIF-1 $\alpha$ -Proteinlevels induziert, was vermuten lässt, dass der Transkriptionsfaktor in der APC involviert sein könnte. Das andere Resultat nimmt Bezug auf die Identifikation von 27 miRs, darunter die miR-21, die unter Hypoxie und teilweise über einen HIF-1 $\alpha$ -abhängigen Mechanismus exprimiert werden (131). Auf eine mögliche Einflussnahme von Isofluran auf die Expression von HRMs deutet das in der vorliegenden Studie erzielte Ergebnis einer Isofluran-induzierten signifikanten Expressionssteigerung der miR-21 hin. HIF-1 $\alpha$  könnte damit eine Schlüsselrolle in der

Regulation Isofluran-bedingter miR-Expressionsveränderungen einnehmen. Da der proteinbiochemische Nachweis von HIF-1 $\alpha$  erschwert war, erfolgte die Untersuchung einer potentiellen Beteiligung von HIF-1 $\alpha$  an der APC anhand der Expression seiner Zielgene (130, 152). Aufgrund ihrer kardioprotektiven Eigenschaften (218-221) und der bereits vorhandenen Hinweise zum Einfluss von Isofluran auf ihre Expression (71, 154, 156, 199, 222) wurden dazu die Gene HO-1 und VEGF ausgewählt.

Die Ergebnisse der Untersuchung zur Auswirkung einer APC auf die Expression der HIF-1 $\alpha$ -Zielgene deuten darauf hin, dass Isofluran eine Expressionssteigerung beider untersuchter Gene hervorruft. Auch wenn die Expressionssteigerung der HO-1 schwächer ausgeprägt ist als die von VEGF, ist ein tendenzieller Anstieg ihrer Expression erkennbar, der jedoch möglicherweise aufgrund einer großen Standardabweichung nicht das Signifikanzniveau erreicht. Dennoch könnten die Isofluran-induzierten Expressionsveränderungen, vor allem des VEGFs, darauf schließen lassen, dass an der APC möglicherweise ein HIF-1 $\alpha$ -abhängiger Mechanismus beteiligt ist, der bei der Regulation der HRMs eine wichtige Rolle spielen könnte.

Wang *et al.* (71) konnten in einer *in vivo*-Untersuchung an der Ratte ebenfalls zeigen, dass eine APC mit Isofluran eine Steigerung des VEGF-Expressionslevels im Myokard zur Folge hat. In Bezug auf das Versuchsprotokoll und das Tiermodell, den MAC-Wert der applizierten Isofluranmenge und den Untersuchungszeitpunkt des Herzgewebes sind beide Studien nahezu identisch. Anders als in dieser Studie untersuchten Wang und Mitarbeiter jedoch die Expression des Wachstumsfaktors auf Protein- und nicht auf mRNA-Ebene. Die Ergebnisse der beiden Studien legen nahe, dass die Regulation der VEGF-Genexpression auf mRNA-Ebene stattfindet. In Ähnlichkeit zu diesem Ergebnis, das in einer *in vivo*-Untersuchung erzielt wurde, konnte auch im *in vitro*-Versuch an Rattenkardiomyozyten ein Isofluran-induzierter Anstieg der VEGF-Expression proteinbiochemisch nachgewiesen werden (222).

Die Auswirkung einer APC auf die myokardiale Expression der HO-1-mRNA im *in vivo*-Modell der Ratte stellt in dieser Form einen bislang nicht untersuchten Zusammenhang dar. Das hier erzielte Ergebnis einer moderaten Genexpressionssteigerung deutet darauf hin, dass die Expression der HO-1 dem Stimulus einer APC unterliegt. Möglicherweise war der gewählte Untersuchungszeitpunkt jedoch noch zu früh, um das Signifikanzniveau zu erreichen. Verschiedene Studien haben die Expression der HO-1 im Kontext mit anderen Organsystemen und Studiendesigns (*in vivo*, *in vitro*) untersucht. Hoetzel *et al.* (154) konnten beispielsweise in ihrer *in vivo*-Studie an der Ratte eine Isofluran-bedingte Induktion der HO-1-Expression in der Leber nachweisen. Die darin gezeigte Expressionssteigerung war nach einer

Isofluranexposition von 4 bis 6 Stunden sowohl im mRNA- als auch im Proteinlevel der HO-1 sichtbar. Beim Vergleich dieser mit der vorliegenden Studie wird deutlich, dass die Dauer der Isoflurangabe von bis zu 6 Stunden deutlich länger war als in der vorliegenden Arbeit, in der Isofluran für 30 Minuten verabreicht wurde. Ferner wählten Hoetzel *et al.* ein insgesamt größeres Intervall zwischen dem Beginn der Isofluranexposition und der Gewebeentnahme (6 Stunden vs. 185 Minuten), was möglicherweise auch Einfluss auf die Expression der HO-1 nimmt. Neben den hervorgehobenen protokollspezifischen Unterschieden könnten auch organspezifische Unterschiede in der Reaktion auf eine APC eine Rolle spielen. Der Aspekt organspezifischer Unterschiede könnte auch auf ein *in vitro*-Experiment zur Auswirkung einer APC auf die HO-1-Expression in hippokampalen Neuronen neugeborener Ratten zutreffen. Dabei wurde beobachtet, dass es nach Isofluranexposition zu einer Steigerung des mRNA- und Proteinlevels der HO-1 kam (199).

Aufgrund des in der vorliegenden Arbeit nicht signifikanten HO-1-Expressionsanstiegs infolge einer Isofluranbehandlung sind weitere Untersuchungen zum Einfluss einer APC auf die HO-1-Expression erforderlich, um neben dem HIF-1 $\alpha$ -Zielgen VEGF weitere Hinweise für die Beteiligung von HIF-1 $\alpha$  an der APC zu erhalten.

Im Rahmen einer Isoflurangabe mit nachfolgender I/R hatte die Vorbehandlung mit Isofluran im Nicht-Risikogebiet der linken Koronararterie keine signifikante Auswirkung auf die mRNA-Expression der HIF-1 $\alpha$ -Zielgene HO-1 und VEGF.

Während nach alleiniger Isofluranbehandlung eine moderate, nicht signifikante Steigerung des HO-1-mRNA-Expressionslevels feststellbar war, ließ sich nach Isoflurangabe und anschließender I/R im Nicht-Risikogebiet ebenfalls keine signifikante Veränderung ihrer Expression nachweisen. Dass I/R zu den HO-1-induzierenden Stimuli gehört, konnten Braun *et al.* (157) in einer *in vivo*-Studie mit induzierter warmer I/R der Leber an der Ratte zeigen. In der Niere konnte ebenfalls in einem *in vivo*-Modell bei der Ratte eine deutliche Induktion der HO-1-mRNA-Expression nach I/R beobachtet werden (158). Neben den Organsystemen Leber und Niere wurde auch im Herzen eine HO-1-Expressionssteigerung infolge I/R nachgewiesen. Dabei wurden isolierte Rattenherzen einer 5- oder 20-minütigen Ischämie und einer 15- bis 60-minütigen Reperfusion unterzogen. Es konnte beobachtet werden, dass es in Relation zur steigenden Reperfusionszeit zu einer Expressionssteigerung der HO-1-mRNA kam (159). Anders als in den genannten Studien zogen Lakkisto *et al.* (160) auch das *remote*-Gebiet in ihre Untersuchung zum Expressionsmuster der HO-1 nach MI mit ein. Hierbei ließ sich 1 Woche nach Durchführung eines MIs ein diskreter, signifikanter Anstieg des HO-1-mRNA-

Expressionslevels im Vergleich zu den Sham-Tieren feststellen. Wie bereits im vorherigen Kapitel zu den Expressionsveränderungen der miRs erläutert wurde, hatte das Gewebe der Gruppe ISO + I/R zum Zeitpunkt der Präkonditionierung eine identische Isofluranbehandlung erhalten wie das Gewebe der Gruppe ISO. Erst nach der Präkonditionierung erfolgte mit Durchführung einer I/R die Differenzierung in Risikogebiet und Nicht-Risikogebiet. Während nach alleiniger Isoflurangabe noch eine moderate (nicht signifikante) HO-1-Expressionssteigerung um 31 % nachweisbar war, blieb ihre Expression nach Isoflurangabe und nachfolgender I/R im Nicht-Risikogebiet deutlich darunter zurück. Dies könnte darauf hindeuten, dass durch I/R ein *remote*-Effekt zustande gekommen sein könnte, der sich auf die Expression der HO-1 im untersuchten Nicht-Risikogebiet auswirkt. Um die Bedeutung dieses Einflussfaktors besser beurteilen zu können, wäre es interessant, zu wissen, welche Auswirkung eine alleinige I/R im Vergleich zu Sham auf die Expression der HO-1 im Nicht-Risikogebiet haben könnte. Inwiefern von I/R ein *remote*-Effekt ausgeht, der nicht weiter durch Isofluran beeinflusst wird bzw. der durch Isofluran hervorgerufene Effekt durch den *remote*-Effekt weniger deutlich wird, könnte somit aus der Untersuchung der Gruppen I/R und SHAM hervorgehen. Eine alternative Erklärung für das im Versuch mit Isoflurangabe in Kombination mit I/R erzielte Ergebnis beinhaltet folgenden Aspekt: Neben I/R gilt auch Isofluran als Induktor der HO-1-Expression, was *in vivo* an der Rattenleber belegt wurde (153-155). Auch im Herzen fungiert Isofluran als Induktor, was sich in der vorliegenden Studie in einem moderaten, wenn auch nicht signifikanten Anstieg des HO-1-Expressionslevels im Vergleich zu Sham zeigte. Bei dem Vergleich der Gruppen ISO + I/R und ISO könnte möglicherweise hervorgehen, ob ein durch die I/R zustande gekommener *remote*-Effekt mit der Isofluran-induzierten Expressionssteigerung interferiert und es daher zu einer Relativierung des Effekts kommt.

Aus den offenen Fragen geht hervor, dass weitere Untersuchungen nötig sind, um zusätzliche Kenntnisse über das Expressionsverhalten der HO-1 unter dem Einfluss von Isofluran und eines von I/R potentiell ausgehenden *remote*-Effekts im Nicht-Risikogebiet zu gewinnen.

Während es nach Isofluranexposition zu einem signifikanten Anstieg im VEGF-Expressionslevel verglichen mit Sham kam, zeigte sich im Versuch mit Isoflurangabe und nachfolgender I/R im Nicht-Risikogebiet des untersuchten Herzgewebes keine Veränderung seiner Expression. Dieses Ergebnis wirft erneut die Frage auf, warum der zuvor beobachtete Isofluran-bedingte Effekt auf die VEGF-Expression in den Tieren, die einer Isofluranbehandlung gefolgt von einer I/R unterzogen wurden im Vergleich mit I/R alleine, im Nicht-Risikogebiet nicht nachweisbar war. Auch hier ist zu berücksichtigen, dass das Gewebe

der untersuchten Gruppe ISO + I/R in gleicher Weise präkonditioniert worden war wie das der Gruppe ISO und eine Unterscheidung zwischen Risikogebiet und Nicht-Risikogebiet erst nach Abschluss der I/R erfolgte. Der fehlende Effekt von Isofluran auf die VEGF-Expression lässt sich möglicherweise durch einen potentiell durch die I/R hervorgerufenen *remote*-Effekt erklären, der die VEGF-Expression nach bereits erfolgter Präkonditionierung mit Isofluran beeinflusst haben könnte.

Studienergebnissen zufolge kann sich eine alleinige I/R sowohl in Form einer Steigerung als auch einer Reduktion des VEGF-Expressionslevels zeigen. Im *in vivo*-Modell der Ratte kam es beispielsweise durch einen I/R-Stimulus (45 Minuten Ischämie und 1 bis 35 Tage Postischämie) zu einer Inhibition des VEGF-Proteins und der -mRNA in der Niere (158). Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Rattenleber nach 30-minütiger Ischämie- und 30-minütiger Reperfusionphase *in vivo* ein Anstieg der VEGF-mRNA-Expression (176), was auf organabhängige oder protokollspezifische Unterschiede im VEGF-Expressionsverhalten in Bezug auf I/R schließen lassen könnte. In *ex vivo*-entnommenen Schweineherzen resultierte eine 2-stündige Ischämie- gefolgt von einer 4-stündigen Reperfusionphase ebenfalls in einem Anstieg der VEGF-Expression, was sowohl im Protein- als auch im mRNA-Expressionslevel nachweisbar war (177). Während in den genannten Studien entweder keine Differenzierung in Risikogebiet und Nicht-Risikogebiet erfolgte, da das gesamte Organ einer Ischämie ausgesetzt wurde (158, 176) oder das Infarktgebiet (177) verwendet wurde, zogen Kim *et al.* (128) explizit auch die nicht ischämischen Myokardanteile in ihre *in vivo*-Untersuchung zum Expressionsverhalten von VEGF nach MI in der Ratte mit ein. Dabei zeigte sich, dass es im nicht ischämischen Myokard 12 Stunden nach dem MI zu einer Expressionssteigerung des VEGF-Proteins sowie der -mRNA kam. Zuvor beschrieben auch Li *et al.* (179) in der Ratte ein erhöhtes VEGF-mRNA-Expressionslevel, das für 3 Tage nach dem MI bestand und bis zum 7. Tag nahezu auf sein Ausgangsniveau abgefallen war. Zur Beantwortung der Frage, ob eine alleinige I/R in der vorliegenden Arbeit zu einer Induktion der VEGF-Expression im Nicht-Risikogebiet führt, wäre daher die Untersuchung der Gruppen I/R und SHAM notwendig.

Weiterhin ist bekannt, dass Isofluran sowohl zu einer Zunahme des VEGF-Protein (71)- als auch des -mRNA-Levels (vorliegende Studie) führen kann. Aus der Untersuchung der Gruppen ISO + I/R gegenüber ISO könnte somit hervorgehen, ob ein durch I/R zustande gekommener *remote*-Effekt mit der Isofluran-induzierten Expressionssteigerung des VEGFs interferiert und sich möglicherweise dadurch der fehlende Effekt von Isofluran erklärt. Es wird auch hier deutlich, dass ergänzende Untersuchungen notwendig sind, um die Rolle von VEGF im Rahmen einer APC und nachfolgenden I/R mit Beachtung eines potentiell I/R-bedingten *remote*-Effekts im Nicht-Risikogebiet zu ermitteln.

Neben den Hinweisen für eine Beteiligung von HIF-1 $\alpha$  bzw. seinem Zielgen VEGF an der APC mit Isofluran ist eine wesentliche Frage, über welchen Signalweg es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors kommt. Im Rahmen der gesamten Studie wurden als Teil eines weiteren Dissertationsprojekts Western Blot Analysen für ERK und Akt durchgeführt. ERK ist ein Teil des Ras/MEK/MAPK- und Akt ein Bestandteil des PI3K/Akt-Signalwegs. Für beide Signalwege konnten bereits Anhaltspunkte für eine Beteiligung an der HIF-1 $\alpha$ -Regulation (71, 128) sowie im Zusammenhang mit der APC mit Isofluran (71, 72, 129) gewonnen werden. Entgegen der Vermutungen zeigten sich weder für ERK noch für Akt signifikante Veränderungen im Proteinlevel ihrer phosphorylierten Formen (pERK, pAkt) zwischen den mit Isofluran behandelten Tieren und der Kontrollgruppe. Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen erforderlich, um ihre genaue Bedeutung für die Isofluran-induzierte Regulation von HIF-1 $\alpha$  zu bestätigen.

Zusammenfassend zeigt die Studie, dass eine APC mit Isofluran mit einer Induktion von HIF-1 $\alpha$ -Zielgenen assoziiert ist, was im Expressionslevel der VEGF-mRNA signifikant sichtbar wird. Diese Expressionsveränderungen weisen auf eine Bedeutung von HIF-1 $\alpha$  an einer APC mit Isofluran hin. Unter Berücksichtigung des signifikanten Expressionsanstiegs der miR-21 unterstützt das Ergebnis des hochregulierten VEGF-Expressionslevels die Hypothese, dass HIF-1 $\alpha$  an der Isofluran-induzierten Regulation von HRMs beteiligt sein könnte. Nach Isoflurangabe und anschließender I/R zeigte sich kein signifikanter Effekt auf die Expression der beiden HIF-1 $\alpha$ -Zielgene im Nicht-Risikogebiet der linken Koronararterie. Inwiefern dieses Ergebnis durch einen von der I/R ausgehenden *remote*-Effekt bedingt sein könnte, muss weiter eruiert werden. Ergänzende Untersuchungen könnten dahingehend zielführend sein, die Rolle von VEGF und HO-1, und somit indirekt die von HIF-1 $\alpha$ , unter dem Einfluss eines möglichen *remote*-Effekts im Rahmen einer APC zu demaskieren.

#### **4.2.3 Expressionsmuster des MicroRNA-21-Zielgens *Programmed Cell Death 4* bei der anästhetischen Präkonditionierung mit Isofluran**

In der proteinbiochemischen Untersuchung des Tumorsuppressorgens PDCD4 war keine Expressionsveränderung nach 30-minütiger Isofluranexposition im Rattenmyokard nachweisbar.

PDCD4 stellt neben FasL und PTEN (103) eine wichtige Zielstruktur der miR-21 dar, über dessen Inhibition antiapoptotische Effekte erzielt werden können. Die Bedeutung der miR-21-vermittelten Regulation des antiapoptotischen Zielgens PDCD4 für die Kardioprotektion konnte bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (104, 106, 107, 109). Obwohl in der vorliegenden Arbeit ein Isofluran-bedingter Präkonditionierungseffekt in Form einer Expressionssteigerung der miR-21 sichtbar wurde, konnte keine signifikante Veränderung im Proteinlevel ihres Zielgens PDCD4 festgestellt werden. Dass es zwischen der miR-21 und PDCD4 zu einer Interaktion kommen kann, wird am Beispiel der Studien von Cheng (106) und Dong (107) *et al.*, die der gleichen Arbeitsgruppe angehören, deutlich. In *in vitro*-Untersuchungen an aus Rattenherzen isolierten Kardiomyozyten konnten sie zeigen, dass die PDCD4-Expression in miR-21-inhibierten Zellen signifikant erhöht und sie umgekehrt in miR-21-exprimierenden Zellen erniedrigt war. Diesen regulatorischen Zusammenhang zwischen der Expression der miR-21 und PDCD4 wiesen auch Olson *et al.* (109) in einer Studie zum Präkonditionierungsmechanismus mit Isofluran nach. So konnten sie an isolierten Rattenkardiomyozyten eine Reduktion im Protein- sowie mRNA-Level von PDCD4 nach Isofluranexposition *in vitro* beobachten, die sich invers zur nachgewiesenen miR-21-Expressionssteigerung verhielt. Entgegen der in der Literatur beschriebenen Suppression der PDCD4-Expression, die über eine Isofluran-induzierte Hochregulation der miR-21 erfolgt, ließ sich in der vorliegenden Arbeit ein moderater, wenn auch nicht signifikanter Anstieg des PDCD4-Expressionslevels beobachten. Beim Vergleich der Olson-Studie mit der vorliegenden geht hervor, dass die Dauer der Isofluranbehandlung in beiden Studien 30 Minuten betrug, an die sich jeweils eine Auswaschphase anschloss. Auch erfolgte die Untersuchung der PDCD4-Expression bei beiden proteinbiochemisch mittels Western Blot Analyse. In folgenden Merkmalen unterscheiden sich die Studien voneinander: Olson und Mitarbeiter wählten zwischen beendeter Isofluranexposition und Materialentnahme ein deutlich kürzeres Intervall (15 Minuten vs. 155 Minuten). Die molekularbiologischen Analysen erfolgten dort *in vitro* an isolierten Kardiomyozyten und nicht *in vivo* an Herzgewebe. Zwar gibt es bis auf die Olson-Studie keine, die dem Untersuchungsaspekt der vorliegenden Arbeit so nah kommt, dennoch wird deutlich, dass sich wesentliche Punkte wie z. B. das Versuchsmodell und das Untersuchungsmaterial unterscheiden, was sich möglicherweise auch auf die PDCD4-Expression auswirken könnte. Zudem zeigt sich bei Betrachtung des von Olson *et al.* erzielten Ergebnisses der miR-21, dass Isofluran zum Untersuchungszeitpunkt, das heißt 15 Minuten nach seiner Gabe, zu einer 2,5-fachen Hochregulierung der miR-21 im Vergleich zur Sham-Gruppe geführt hat. Verglichen mit der vorliegenden Arbeit wird somit deutlich, dass es in der Olson-Studie infolge der Isofluranexposition nach einer wesentlich kürzeren Auswaschphase

(15 Minuten vs. 155 Minuten) zu einer deutlich stärkeren Induktion der miR-21 (2,5-fach vs. 1,7-fach) gekommen ist. Die offensichtlichen Intensitätsunterschiede in der Induktion könnten darauf hindeuten, dass die Isofluran-induzierte Expressionssteigerung der miR-21 in der vorliegenden Studie nicht ausreichend stark ist, um einen PDCD4-supprimierenden Effekt auf Proteinebene detektieren zu können. Eine weitere Erklärung könnte darin liegen, dass die Expression der miR-21 und die PDCD4-Expression in dieser Arbeit zum gleichen Zeitpunkt untersucht wurden: Es wäre denkbar, dass die beobachtete Hochregulierung der miR-21 nachfolgend zu einer Herabregulierung von PDCD4 führt, was möglicherweise anhand der Untersuchung seiner Proteinexpression zu einem späteren Zeitpunkt verifiziert werden könnte. Letztlich kann man auch nicht ausschließen, dass in dem in dieser Studie durchgeführten Versuchsmodell keine Interaktion zwischen der miR-21 und PDCD4 stattfindet. Die Hypothesen machen deutlich, dass weitere Untersuchungen nötig sind, um die in Abhängigkeit der miR-21 regulierbare PDCD4-Expression unter dem Einfluss einer APC mit Isofluran im *in vivo*-Modell genau zu charakterisieren.

Zusammenfassend deutet die Studie darauf hin, dass das miR-21-Zielgen PDCD4 zu dem vorgegebenen Untersuchungszeitpunkt nicht einer Isofluran-induzierten Regulation unterliegt. Auf dem Hintergrund des signifikanten Expressionsanstiegs der miR-21 wäre jedoch vorstellbar, dass dieser nachfolgend zur einer Reduktion des PDCD4-Expressionslevels führt, was sich in der Untersuchung eines späteren Zeitpunkts als der der miR-21 zeigen könnte. Neben der Hypothese, dass der an der miR-21 sichtbar gewordene Effekt von Isofluran nicht ausreichend genug ist, um eine Herabregulation von PDCD4 auf Proteinebene erfassen zu können, wäre es auch möglich, dass im vorliegenden Versuchsmodell keine Isofluran-abhängige Interaktion zwischen der miR-21 und PDCD4 erfolgt.

### 4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse der Studie ermöglichen die Identifizierung des volatilen Anästhetikums Isofluran als Induktor der Expression der miR-21 und deuten erstmalig auf eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  an dieser Expressionssteigerung hin. Der beschriebene Zusammenhang beruht auf der Isofluran-induzierten Hochregulation des Expressionslevels der den HRMs zugeordneten miR-21 und des HIF-1 $\alpha$ -Zielgens VEGF. Anhand der Ergebnisse lässt sich somit möglicherweise auf eine weitere der bislang nachgewiesenen Parallelen zwischen den an der IPC und der APC mit Isofluran potentiell beteiligten Faktoren schließen. Neben ATP-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen, PKC, PI3K/Akt und ERK1/2, die in beiden Signalwegen von Bedeutung zu sein scheinen, könnte die Regulation der miR-21 und des VEGFs sowohl ischämischen als auch - wie hier gezeigt - anästhetischen Präkonditionierungsstimuli unterliegen.

Interessanterweise traten die unter reiner Isoflurangabe beobachteten Veränderungen der miR-21 und des VEGFs nicht auf, wenn eine APC mit Isofluran einer I/R voranging. Hierbei handelte es sich jedoch nicht um eine Untersuchung des Risikogebiets/Infarktgebiets, sodass auch keine Aussage über ein mögliches molekularbiologisches Korrelat der tierexperimentell nachgewiesenen Isofluran-induzierten Infarktgrößenreduktion getroffen werden kann. Durch die Untersuchung des Nicht-Risikogebiets der linken Koronararterie unter den Bedingungen einer infarktauslösenden I/R rückt vielmehr die Bedeutung eines möglichen *remote*-Effekts, der durch die I/R zustande gekommen sein könnte, in den Vordergrund. Dieser „aus der Ferne“, potentiell auf das Nicht-Risikogebiet wirkende Effekt ist deshalb zu berücksichtigen, da beide präkonditionierten Gruppen (unabhängig von der Durchführung einer I/R) in gleicher Form Isofluran erhielten, sich die Isofluran-induzierten, signifikanten Effekte auf die miR-21 und VEGF jedoch im Versuch mit Isofluranexposition und anschließender I/R nicht nachweisen ließen. Weitere Untersuchungen könnten dahingehend aufschlussreich sein, ob Wechselwirkungen bzw. Interferenzen zwischen dem potentiell I/R-bedingten *remote*-Effekt und den nach alleiniger Isoflurangabe beobachteten Expressionsveränderungen eine mögliche Erklärung für das nach Isofluranexposition und nachfolgender I/R gewonnene Ergebnis darstellen.

Neben dem weiter bestehenden Ziel, den für die APC verantwortlichen und an der tierexperimentell nachgewiesenen Infarktgrößenreduktion sichtbar gewordenen kardioprotektiven Wirkmechanismus aufzudecken, scheint die hier gezeigte Interaktion zwischen HIF-1 $\alpha$  bzw. VEGF und der Expression der miR-21 an der APC beteiligt zu sein.

Somit leistet die Studie einen Erkenntnisgewinn für das Verständnis molekularer Funktionsprinzipien der APC mit Isofluran.

Die klinische Bedeutung bei der Entschlüsselung anästhetischer Präkonditionierungsmechanismen liegt in dem Erzielen kardioprotektiver Effekte durch pharmakologisch nutzbare Zielstrukturen. Das Verständnis dieser Mechanismen und damit die bewusste Anwendung der myokardprotektiven APC könnten in der Zukunft mit einer Senkung von Morbidität und Mortalität des Patienten einhergehen. Somit ließe sich möglicherweise das Auftreten eines PMIs, der als häufigste perioperative vaskuläre Komplikation bei nicht-kardialen Operationen beschrieben wird, durch die Präkonditionierung des Myokards mit dem im klinischen Alltag erprobten und weit verbreiteten volatilen Anästhetikum Isofluran reduzieren. Von der Isofluran-induzierbaren Myokardprotektion könnten dabei vor allem Patienten, die aufgrund einer KHK oder eines bereits stattgehabten MIs kardial vorbelastet und daher einem höheren Operationsrisiko ausgesetzt sind, profitieren. Bei Eingriffen, die mit einer Myokardischämie und einer nachfolgenden Reperfusion einhergehen, wie beispielsweise bei der Angioplastie, Kardioplegie oder der Thrombolyse nach AMI, könnte zudem ein Schutz vor I/R-Schäden erzielt werden. Neben dem therapeutischen Nutzen, der sich aus einer APC und somit der Induktion endogener kardioprotektiver Mechanismen ergibt, ist die Aufdeckung ihrer Funktionsmechanismen auch dahingehend von Interesse, Pharmaka zu identifizieren, die zu einer Blockade des protektiven Effekts führen. Mit diesen Kenntnissen ließe sich die Gabe der Medikamente vermeiden, die den Schutzmechanismus schmälern würden.

Die Erfassung weiterer Details, die zur Aufschlüsselung der für die Kardioprotektion verantwortlichen APC-Mechanismen beitragen, könnte zukünftig dabei helfen, diese Form der Myokardprotektion in den Klinikalltag zu integrieren und damit das Auftreten von I/R-Schäden zu reduzieren. Auf der Grundlage der in dieser Studie erzielten Ergebnisse sollte daher die Rolle der HRMs und der HIF-1 $\alpha$ -Zielgene unter dem Einfluss von Isofluran weiter untersucht werden. Neben der Verifizierung eines potentiellen *remote*-Effekts ausgehend von der I/R, der Einfluss auf die nachweisbaren Isofluran-induzierten Expressionsveränderungen im Nicht-Risikogebiet nimmt, steht im Vordergrund, die tierexperimentell nachgewiesene Isofluran-assoziierte Infarktgrößenreduktion auch auf molekularbiologischer Ebene zu charakterisieren. Ziel hierbei ist es, die Bedeutung der HRMs und ihre HIF-1 $\alpha$ -abhängige Expression für einen an der APC-induzierten Myokardprotektion beteiligten Funktionsweg zu demaskieren.

## 5. Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. Media centre: The top 10 causes of death. Fact sheet. Updated January **2017**. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (Bearbeitungsstand: 08. Mai 2017, 09.17 UTC).
2. Statistisches Bundesamt (Destatis): Todesursachen in Deutschland 2015. Fachserie12/Reihe 4, Gesundheit. Wiesbaden **2017**.
3. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD; Writing Group on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction: Third universal definition of myocardial infarction. *Glob Heart*. **2012**; 7(4):275-295.
4. Devereaux PJ, Xavier D, Pogue J, Guyatt G, Sigamani A, Garutti I, Leslie K, Rao-Melacini P, Chrolavicius S, Yang H, Macdonald C, Avezum A, Lanthier L, Hu W, Yusuf S; POISE (PeriOperative ISchemic Evaluation) Investigators: Characteristics and short-term prognosis of perioperative myocardial infarction in patients undergoing noncardiac surgery: a cohort study. *Ann Intern Med*. **2011**; 154(8):523-528.
5. The Vascular Events in Noncardiac Surgery Patients Cohort Evaluation (VISION) Study Investigators: Association between postoperative troponin levels and 30-day mortality among patients undergoing noncardiac surgery. *JAMA*. **2012**; 307(21):2295-2304.
6. Herold G et al: *Innere Medizin*. Verlag Gerd Herold. **2013**; S. 252-253.
7. Landesberg G, Beattie WS, Mosseri M, Jaffe AS, Alpert JS: Perioperative myocardial infarction. *Circulation*. **2009**; 119(22):2936-2944.
8. Landesberg G, Mosseri M, Zahger D, Wolf Y, Perouansky M, Anner H, Drenger B, Hasin Y, Berlatzky Y, Weissman C: Myocardial infarction after vascular surgery: the role of prolonged stress-induced, ST depression-type ischemia. *J Am Coll Cardiol*. **2001**; 37(7):1839-1845.

9. Adams JE 3<sup>rd</sup>, Sicard GA, Allen BT, Bridwell KH, Lenke LG, Dávila-Román VG, Bodor GS, Ladenson JH, Jaffe AS: Diagnosis of perioperative myocardial infarction with measurement of cardiac troponin I. *N Engl J Med.* **1994**; 330(10):670-674.
10. Van Waes JA, Nathoe HM, de Graaff JC, Kemperman H, de Borst GJ, Peelen LM, van Klei WA; Cardiac Health After Surgery (CHASE) Investigators: Myocardial injury after noncardiac surgery and its association with short-term mortality. *Circulation.* **2013**; 127(23):2264-2271.
11. Kloner RA, Jennings RB: Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation.* **2001**; 104(24):2981-2989.
12. Kloner RA, Jennings RB: Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation.* **2001**; 104(25):3158-3167.
13. Dhalla NS, Duhamel TA: The paradoxes of reperfusion in the ischemic heart. *Heart Metab.* **2007**; 37:31-34.
14. Piper HM: The calcium paradox revisited: an artefact of great heuristic value. *Cardiovasc Res.* **2000**; 45(1):123-127.
15. Verma S, Fedak PW, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, Li RK, Dhillon B, Yau TM: Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation.* **2002**; 105(20):2332-2336.
16. Park JL, Lucchesi BR: Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* **1999**; 68(5):1905-1912.
17. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA: Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* **2004**; 61(3):372-385.
18. Yellon DM, Baxter GF: Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality? *Heart.* **2000**; 83(4):381-387.

19. Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF: Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest.* **1975**; 56(4):978-985.
20. Braunwald E, Kloner RA: The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation.* **1982**; 66(6):1146-1149.
21. Kloner RA, Ellis SG, Lange R, Braunwald E: Studies of experimental coronary artery reperfusion. Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. *Circulation.* **1983**; 68(2 Pt 2):I8-15.
22. Prasad A, Gersh BJ: Management of microvascular dysfunction and reperfusion injury. *Heart.* **2005**; 91(12):1530-1532.
23. Prasad A, Stone GW, Holmes DR, Gersh B: Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the “dark side” of reperfusion. *Circulation.* **2009**; 120(21):2105-2112.
24. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB: The “no-reflow” phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest.* **1974**; 54(6):1496-1508.
25. Ganote CE: Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol.* **1983**; 15(2):67-73.
26. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* **1986**; 74(5):1124-1136.
27. Brandenburger T, Grievink H, Heinen N, Barthel F, Huhn R, Stachuletz F, Kohns M, Pannen B, Bauer I: Effects of remote ischemic preconditioning and myocardial ischemia on microRNA-1 expression in the rat heart in vivo. *Shock.* **2014**; 42(3):234-238.
28. Brandenburger T, Huhn R, Galas A, Pannen BH, Keitel V, Barthel F, Bauer I, Heinen A: Remote ischemic preconditioning preserves Connexin 43 phosphorylation in the rat heart in vivo. *J Transl Med.* **2014**; 12:228.

29. Bankwala Z, Hale SL, Kloner RA: Alpha-adrenoceptor stimulation with exogenous norepinephrine or release of endogenous catecholamines mimics ischemic preconditioning. *Circulation*. **1994**; 90(2):1023-1028.
30. Ovize M, Kloner RA, Przyklenk K: Stretch preconditions canine myocardium. *Am J Physiol*. **1994**; 266(1 Pt 2):H137-146.
31. Frässdorf J, Huhn R, Niersmann C, Weber NC, Schlack W, Preckel B, Hollmann MW: Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial K(Ca) channels. *Can J Anaesth*. **2010**; 57(8):767-773.
32. Huhn R, Heinen A, Weber NC, Hieber S, Hollmann MW, Schlack W, Preckel B: Helium-induced late preconditioning in the rat heart in vivo. *Br J Anaesth*. **2009**; 102(5):614-619.
33. Preckel B, Müllenheim J, Moloschavij A, Thämer V, Schlack W: Xenon administration during early reperfusion reduces infarct size after regional ischemia in the rabbit heart in vivo. *Anesth Analg*. **2000**; 91(6):1327-1332.
34. Weber NC, Stursberg J, Wirthle NM, Toma O, Schlack W, Preckel B: Xenon preconditioning differently regulates p44/42 MAPK (ERK 1/2) and p46/54 MAPK (JNK 1/2 and 3) in vivo. *Br J Anaesth*. **2006**; 97(3):298-306.
35. Warltier DC, al-Wathiqui MH, Kampine JP, Schmeling WT: Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane. *Anesthesiology*. **1988**; 69(4):552-565.
36. 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):1182-1190.
37. De Hert SG, Cromheecke S, ten Broecke PW, Mertens E, De Blier IG, Stockman BA, Rodrigus IE, Van der Linden PJ: Effects of propofol, desflurane, and sevoflurane on recovery of myocardial function after coronary surgery in elderly high-risk patients. *Anesthesiology*. **2003**; 99(2):314-323.

38. Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML, Jennings RB: Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol.* **1986**; 251(6 Pt 2):H1306-1315.
39. Gross GJ, Auchampach JA: Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res.* **1992**; 70(2):223-233.
40. Toombs CF, Moore TL, Shebuski RJ: Limitation of infarct size in the rabbit by ischaemic preconditioning is reversible with glibenclamide. *Cardiovasc Res.* **1993**; 27(4):617-622.
41. Qian YZ, Levasseur JE, Yoshida K, Kukreja RC: KATP channels in rat heart: blockade of ischemic and acetylcholine-mediated preconditioning by glibenclamide. *Am J Physiol.* **1996**; 271(1 Pt 2):H23-28.
42. Schultz JE, Qian YZ, Gross GJ, Kukreja RC: The ischemia-selective KATP channel antagonist, 5-hydroxydecanoate, blocks ischemic preconditioning in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* **1997**; 29(3):1055-1060.
43. Fryer RM, Eells JT, Hsu AK, Henry MM, Gross GJ: Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2000**; 278(1):H305-312.
44. Auchampach JA, Gross GJ: Adenosine A1 receptors, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol.* **1993**; 264(5 Pt 2):H1327-1336.
45. Liang BT: Direct preconditioning of cardiac ventricular myocytes via adenosine A1 receptor and KATP channel. *Am J Physiol.* **1996**; 271(5 Pt 2):H1769-1777.
46. Sato T, Sasaki N, O'Rourke B, Marbán E: Adenosine primes the opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels: a key step in ischemic preconditioning? *Circulation.* **2000**; 102(7):800-805.

47. Kirsch GE, Codina J, Birnbaumer L, Brown AM: Coupling of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels to A<sub>1</sub> receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.* **1990**; 259(3 Pt 2):H820-826.
48. Simkhovich BZ, Przyklenk K, Kloner RA: Role of protein kinase C in ischemic “conditioning”: from first evidence to current perspectives. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* **2013**; 18(6):525-532.
49. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM: Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2005**; 288(2):H971-976.
50. Hausenloy DJ, Yellon DM: New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res.* **2004**; 61(3):448-460.
51. Downey JM, Davis AM, Cohen MV: Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev.* **2007**; 12(3-4):181-188.
52. Cohen MV, Downey JM: Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection. *Basic Res Cardiol.* **2008**; 103(3):203-215.
53. Swyers T, Redford D, Larson DF: Volatile anesthetic-induced preconditioning. *Perfusion.* **2014**; 29(1):10-15.
54. Bland JH, Lowenstein E: Halothane-induced decrease in experimental myocardial ischemia in the non-failing canine heart. *Anesthesiology.* **1976**; 45(3):287-293.
55. Tanaka K, Ludwig LM, Kersten JR, Pagel PS, Wartier DC: Mechanisms of cardioprotection by volatile anesthetics. *Anesthesiology.* **2004**; 100(3):707-721.
56. Bernard JM, Wouters PF, Doursout MF, Florence B, Chelly JE, Merin RG: Effects of sevoflurane and isoflurane on cardiac and coronary dynamics in chronically instrumented dogs. *Anesthesiology.* **1990**; 72(4):659-662.

57. Cason BA, Shubayev I, Hickey RF: Blockade of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels eliminates isoflurane-induced coronary artery vasodilation. *Anesthesiology*. **1994**; 81(5):1245-1255.
58. Larach DR, Schuler HG: Potassium channel blockade and halothane vasodilation in conducting and resistance coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. **1993**; 267(1):72-81.
59. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC: Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology*. **1997**; 87(2):361-370.
60. Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC: Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology*. **1999**; 91(5):1437-1446.
61. Ismaeil MS, Tkachenko I, Gamperl AK, Hickey RF, Cason BA: Mechanisms of isoflurane-induced myocardial preconditioning in rabbits. *Anesthesiology*. **1999**; 90(3):812-821.
62. Piriou V, Chiari P, Knezynski S, Bastien O, Loufoua J, Lehot JJ, Foëx P, Annat G, Ovize M: Prevention of isoflurane-induced preconditioning by 5-hydroxydecanoate and gadolinium: possible involvement of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium and stretch-activated channels. *Anesthesiology*. **2000**; 93(3):756-764.
63. Toller WG, Gross ER, Kersten JR, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC: Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-dependent potassium channels: mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology*. **2000**; 92(6):1731-1739.
64. Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, Scharbatke H, Preckel B, Schlack W: The influence of mitochondrial KATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo. *Anesth Analg*. **2005**; 101(5):1252-1260.
65. Miura T, Imaizumi U, Furuya M, Shirahama J, Arisaka H, Yoshida KI: Effects of ischemic and sevoflurane-induced preconditioning on myocardial infarction and arrhythmias in rabbits in vivo. *J Anesth Clin Res*. **2013**; 4:361. doi:10.4172/2155-6148.1000361.

66. Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Schaub MC: Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K(ATP) channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology*. **2002**; 97(1):4-14.
67. Toller WG, Kersten JR, Gross ER, Pagel PS, Warltier DC: Isoflurane preconditions myocardium against infarction via activation of inhibitory guanine nucleotide binding proteins. *Anesthesiology*. **2000**; 92(5):1400-1407.
68. Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, Downey JM: Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology*. **1997**; 86(3):699-709.
69. Ludwig LM, Patel HH, Gross GJ, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC: Morphine enhances pharmacological preconditioning by isoflurane: role of mitochondrial K(ATP) channels and opioid receptors. *Anesthesiology*. **2003**; 98(3):705-711.
70. Novalija E, Varadarajan SG, Camara AK, An J, Chen Q, Riess ML, Hogg N, Stowe DF: Anesthetic preconditioning: triggering role of reactive oxygen and nitrogen species in isolated hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2002**; 283(1):H44-52.
71. Wang C, Weihrauch D, Schwabe DA, Bienengraeber M, Warltier DC, Kersten JR, Pratt PF Jr, Pagel PS: Extracellular signal-regulated kinases trigger isoflurane preconditioning concomitant with upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in rats. *Anesth Analg*. **2006**; 103(2):281-288.
72. Raphael J, Rivo J, Gozal Y: Isoflurane-induced myocardial preconditioning is dependent on phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signalling. *Br J Anaesth*. **2005**; 95(6):756-763.
73. Ambros V: MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*. **2003**; 113(6):673-676.
74. Pasquinelli AE, Hunter S, Bracht J: MicroRNAs: a developing story. *Curr Opin Genet Dev*. **2005**; 15(2):200-205.

75. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z: Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet.* **2005**; 37(7):766-770.
76. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP: Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* **2005**; 120(1):15-20.
77. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS: MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* **2005**; 65(14):6029-6033.
78. Chio CC, Lin JW, Cheng HA, Chiu WT, Wang YH, Wang JJ, Hsing CH, Chen RM: MicroRNA-210 targets antiapoptotic Bcl-2 expression and mediates hypoxia-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *Arch Toxicol.* **2013**; 87(3):459-468.
79. Palma CA, Al Sheikha D, Lim TK, Bryant A, Vu TT, Jayaswal V, Ma DD: MicroRNA-155 as an inducer of apoptosis and cell differentiation in Acute Myeloid Leukaemia. *Mol Cancer.* **2014**; 13:79.
80. Kwon C, Han Z, Olson EN, Srivastava D: MicroRNA1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005**; 102(52):18986-18991.
81. Li Z, Margariti A, Wu Y, Yang F, Hu J, Zhang L, Chen T: MicroRNA-199a induces differentiation of induced pluripotent stem cells into endothelial cells by targeting sirtuin 1. *Mol Med Rep.* **2015**; 12(3):3711-3717.
82. Liu Y, Huang X, Timani KA, Broxmeyer HE, He JJ: MicroRNA-124 Targets Tip110 Expression and Regulates Hematopoiesis. *Stem Cells Dev.* **2015**; 24(17):2009-2017.
83. Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ, Srivastava D: Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell.* **2007**; 129(2):303-317.

84. Lu TY, Lin B, Li Y, Arora A, Han L, Cui C, Coronello C, Sheng Y, Benos PV, Yang L: Overexpression of microRNA-1 promotes cardiomyocyte commitment from human cardiovascular progenitors via suppressing WNT and FGF signaling pathways. *J Mol Cell Cardiol.* **2013**; 63:146-154.
85. Izarra A, Moscoso I, Cañón S, Carreiro C, Fondevila D, Martín-Caballero J, Blanca V, Valiente I, Díez-Juan A, Bernad A: miRNA-1 and miRNA-133a are involved in early commitment of pluripotent stem cells and demonstrate antagonistic roles in the regulation of cardiac differentiation. *J Tissue Eng Regen Med.* **2017**; 11(3):787-799.
86. Yin C, Salloum FN, Kukreja RC: A novel role of microRNA in late preconditioning: upregulation of endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 70. *Circ Res.* **2009**; 104(5):572-575.
87. Lee RC, Ambros V: An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* **2001**; 294(5543):862-864.
88. Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, Gupta S, Bauer M, Medvid R, Reinhardt F, Liao R, Krieger M, Jaenisch R, Lodish HF, Blüthgen R: Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res.* **2009**; 105(6):585-594.
89. Kukreja RC, Yin C, Salloum FN: MicroRNAs: new players in cardiac injury and protection. *Mol Pharmacol.* **2011**; 80(4):558-564.
90. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ: The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.* **2006**; 38(2):228-233.
91. Pan Z, Sun X, Ren J, Li X, Gao X, Lu C, Zhang Y, Sun H, Wang Y, Wang H, Wang J, Xie L, Lu Y, Yang B: miR-1 exacerbates cardiac ischemia-reperfusion injury in mouse models. *PLoS One.* **2012**; 7(11):e50515.
92. Tang Y, Zheng J, Sun Y, Wu Z, Liu Z, Huang G: MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2. *Int Heart J.* **2009**; 50(3):377-387.

93. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen G, Wang Z: The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med.* **2007**; 13(4):486-491.
94. Elia L, Contu R, Quintavalle M, Varrone F, Chimenti C, Russo MA, Cimino V, De Marinis L, Frustaci A, Catalucci D, Condorelli G: Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. *Circulation.* **2009**; 120(23):2377-2385.
95. Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Høydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW 2nd, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G: MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.* **2007**; 13(5):613-618.
96. He B, Xiao J, Ren AJ, Zhang YF, Zhang H, Chen M, Xie B, Gao XG, Wang YW: Role of miR-1 and miR-133a in myocardial ischemic postconditioning. *J Biomed Sci.* **2011**; 18:22.
97. Han M, Toli J, Abdellatif M: MicroRNAs in the cardiovascular system. *Curr Opin Cardiol.* **2011**; 26(3):181-189.
98. Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M: MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res.* **2007**; 100(3):416-424.
99. Van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN: A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2006**; 103(48):18255-18260.
100. Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB, Zhang C: MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol.* **2007**; 170(6):1831-1840.

101. Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, Thomson JM, Chen JF, Newman M, Rojas M, Hammond SM, Wang DZ: Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* **2007**; 42(6):1137-1141.
102. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliensky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S: MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature.* **2008**; 456(7224):980-984.
103. Sayed D, He M, Hong C, Gao S, Rane S, Yang Z, Abdellatif M: MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand. *J Biol Chem.* **2010**; 285(26):20281-20290.
104. Cheng Y, Liu X, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C: MicroRNA-21 protects against the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J Mol Cell Cardiol.* **2009**; 47(1):5-14.
105. Rane S, He M, Sayed D, Yan L, Vatner D, Abdellatif M: An antagonism between the AKT and beta-adrenergic signaling pathways mediated through their reciprocal effects on miR-199a-5p. *Cell Signal.* **2010**; 22(7):1054-1062.
106. Cheng Y, Zhu P, Yang J, Liu X, Dong S, Wang X, Chun B, Zhuang J, Zhang C: Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4. *Cardiovasc Res.* **2010**; 87(3):431-439.
107. Dong S, Cheng Y, Yang J, Li J, Liu X, Wang X, Wang D, Krall TJ, Delphin ES, Zhang C: MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. *J Biol Chem.* **2009**; 284(43):29514-29525.
108. Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN: Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2008**; 105(35):13027-13032.

109. Olson JM, Yan Y, Bai X, Ge ZD, Liang M, Kriegel AJ, Twaroski DM, Bosnjak ZJ: Up-regulation of microRNA-21 mediates isoflurane-induced protection of cardiomyocytes. *Anesthesiology*. **2015**; 122(4):795-805.
110. Krichevsky AM, Gabriely G: miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med*. **2009**; 13(1):39-53.
111. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH: Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem*. **2008**; 283(2):1026-1033.
112. Lefer DJ, Granger DN: Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med*. **2000**; 109(4):315-323.
113. Seddon M, Looi YH, Shah AM: Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart*. **2007**; 93(8):903-907.
114. Berg K, Jynge P, Bjerve K, Skarra S, Basu S, Wiseth R: Oxidative stress and inflammatory response during and following coronary interventions for acute myocardial infarction. *Free Radic Res*. **2005**; 39(6):629-636.
115. Maxwell PH, Ratcliffe PJ: Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. **2002**; 13(1):29-37.
116. Semenza GL, Shimoda LA, Prabhakar NR: Regulation of gene expression by HIF-1. *Novartis Found Symp*. **2006**; 272:2-8.
117. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshet E: Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. **1998**; 394(6692):485-490.
118. Tekin D, Dursun AD, Xi L: Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection. *Acta Pharmacol Sin*. **2010**; 31(9):1085-1094.

119. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE: Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1991**; 88(13):5680-5684.
120. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1995**; 92(12):5510-5514.
121. Wang GL, Semenza GL: Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* **1995**; 270(3):1230-1237.
122. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ: Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* **2001**; 292(5516):468-472.
123. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr: HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science.* **2001**; 292(5516):464-468.
124. Salceda S, Caro J: Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem.* **1997**; 272(36):22642-22647.
125. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L: Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.* **2000**; 19(16):4298-4309.
126. Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH: Hypoxia inducible factor- $\alpha$  binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem.* **2000**; 275(33):25733-25741.

127. Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, Fox-Talbot K, Wang L, Wei C, Trush MA, Semenza GL: Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha. *Cardiovasc Res.* **2008**; 77(3):463-470.
128. Kim CH, Cho YS, Chun YS, Park JW, Kim MS: Early expression of myocardial HIF-1alpha in response to mechanical stresses: regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Circ Res.* **2002**; 90(2):E25-33.
129. Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS, Krolikowski JG, Kersten JR, Warltier DC: Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. *Anesthesiology.* **2005**; 102(1):102-109.
130. Hieber S, Huhn R, Hollmann MW, Weber NC, Preckel B: Hypoxia-inducible factor 1 and related gene products in anaesthetic-induced preconditioning. *Eur J Anaesthesiol.* **2009**; 26(3):201-206.
131. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, Davuluri R, Liu CG, Croce CM, Negrini M, Calin GA, Ivan M: A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol.* **2007**; 27(5):1859-1867.
132. Rane S, He M, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF, Abdellatif M: Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ Res.* **2009**; 104(7):879-886.
133. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R: The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1968**; 61(2):748-755.
134. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R: Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem.* **1969**; 244(23):6388-6394.
135. Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK: Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem.* **1986**; 261(1):411-419.

136. McCoubrey WK Jr, Huang TJ, Maines MD: Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem.* **1997**; 247(2):725-732.
137. Maines MD: The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **1997**; 37:517-554.
138. Bauer I, Wanner GA, Rensing H, Alte C, Miescher EA, Wolf B, Pannen BH, Clemens MG, Bauer M: Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver. *Hepatology.* **1998**; 27(3):829-838.
139. Shibahara S, Müller RM, Taguchi H: Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem.* **1987**; 262(27):12889-12892.
140. Bauer M, Bauer I: Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* **2002**; 4(5):749-758.
141. McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* **1985**; 312(3):159-163.
142. Hammond B, Hess ML: The oxygen free radical system: potential mediator of myocardial injury. *J Am Coll Cardiol.* **1985**; 6(1):215-220.
143. Werns SW, Shea MJ, Lucchesi BR: Free radicals and myocardial injury: pharmacologic implications. *Circulation.* **1986**; 74(1):1-5.
144. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN: Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* **1987**; 235(4792):1043-1046.
145. Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM: Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem.* **1992**; 267(25):18148-18153.

146. Jancsó G, Cserepes B, Gasz B, Benkó L, Borsiczky B, Ferenc A, Kürthy M, Rácz B, Lantos J, Gál J, Arató E, Sínayc L, Wéber G, Róth E: Expression and protective role of heme oxygenase-1 in delayed myocardial preconditioning. *Ann N Y Acad Sci.* **2007**; 1095:251-261.
147. Vulapalli SR, Chen Z, Chua BH, Wang T, Liang CS: Cardiosselective overexpression of HO-1 prevents I/R-induced cardiac dysfunction and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2002**; 283(2):H688-694.
148. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM: Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med.* **2000**; 6(4):422-428.
149. Otterbein LE: Carbon monoxide: innovative anti-inflammatory properties of an age-old gas molecule. *Antioxid Redox Signal.* **2002**; 4(2):309-319.
150. Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM: Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem.* **1997**; 272(9):5375-5381.
151. Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Calabrese V, Clark JE, Green CJ: Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols. *J Biol Chem.* **2000**; 275(18):13613-13620.
152. Berger MM, Huhn R, Oei GT, Heinen A, Winzer A, Bauer I, Preckel B, Weber NC, Schlack W, Hollmann MW: Hypoxia induces late preconditioning in the rat heart in vivo. *Anesthesiology.* **2010**; 113(6):1351-1360.
153. Hoetzel A, Geiger S, Loop T, Welle A, Schmidt R, Humar M, Pahl HL, Geiger KK, Pannen BH: Differential effects of volatile anesthetics on hepatic heme oxygenase-1 expression in the rat. *Anesthesiology.* **2002**; 97(5):1318-1321.
154. Hoetzel A, Leitz D, Schmidt R, Tritschler E, Bauer I, Loop T, Humar M, Geiger KK, Pannen BH: Mechanism of hepatic heme oxygenase-1 induction by isoflurane. *Anesthesiology.* **2006**; 104(1):101-109.

155. Schmidt R, Hoetzel A, Baechle T, Loop T, Humar M, Bauer M, Pahl HL, Geiger KK, Pannen BH: Isoflurane pretreatment lowers portal venous resistance by increasing hepatic heme oxygenase activity in the rat liver in vivo. *J Hepatol.* **2004**; 41(5):706-713.
156. Schmidt R, Tritschler E, Hoetzel A, Loop T, Humar M, Halverscheid L, Geiger KK, Pannen BH: Heme oxygenase-1 induction by the clinically used anesthetic isoflurane protects rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Ann Surg.* **2007**; 245(6):931-942.
157. Braun S, Plitzko G, Bicknell L, van Caster P, Schulz J, Barthuber C, Preckel B, Pannen BH, Bauer I: Pretreatment with helium does not attenuate liver injury after warm ischemia-reperfusion. *Shock.* **2014**; 41(5):413-419.
158. Basile DP, Fredrich K, Chelladurai B, Leonard EC, Parrish AR: Renal ischemia reperfusion inhibits VEGF expression and induces ADAMTS-1, a novel VEGF inhibitor. *Am J Physiol Renal Physiol.* **2008**; 294(4):F928-936.
159. Maulik N, Sharma HS, Das DK: Induction of the haem oxygenase gene expression during the reperfusion of ischemic rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* **1996**; 28(6):1261-1270.
160. Lakkisto P, Palojoki E, Bäcklund T, Saraste A, Tikkanen I, Voipio-Pulkki LM, Pulkki K: Expression of heme oxygenase-1 in response to myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol.* **2002**; 34(10):1357-1365.
161. Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J: Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1989**; 86(19):7311-7315.
162. Ferrara N, Henzel WJ: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **1989**; 161(2):851-858.
163. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J: Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest.* **1989**; 84(5):1470-1478.

164. Veikkola T, Alitalo K: VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol.* **1999**; 9(3):211-220.
165. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW: The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* **1991**; 5(12):1806-1814.
166. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* **1991**; 266(18):11947-11954.
167. Ladoux A, Frelin C: Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. *Biochem Biophys Res Commun.* **1993**; 195(2):1005-1010.
168. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* **1983**; 219(4587):983-985.
169. Plouët J, Schilling J, Gospodarowicz D: Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.* **1989**; 8(12):3801-3806.
170. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* **1989**; 246(4935):1306-1309.
171. Ferrara N, Davis-Smyth T: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* **1997**; 18(1):4-25.
172. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* **1995**; 146(5):1029-1039.

173. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H: The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res.* **2009**; 153(2):347-358.
174. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* **1998**; 273(21):13313-13316.
175. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* **1996**; 16(9):4604-4613.
176. Knudsen AR, Kannerup AS, Grønbaek H, Andersen KJ, Funch-Jensen P, Frystyk J, Flyvbjerg A, Mortensen FV: Effects of ischemic pre- and postconditioning on HIF-1 $\alpha$ , VEGF and TGF- $\beta$  expression after warm ischemia and reperfusion in the rat liver. *Comp Hepatol.* **2011**; 10(1):3.
177. Infanger M, Faramarzi S, Grosse J, Kurth E, Ulbrich C, Bauer J, Wehland M, Kreutz R, Kossmehl P, Paul M, Grimm D: Expression of vascular endothelial growth factor and receptor tyrosine kinases in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Pathol.* **2007**; 16(5):291-299.
178. Kawata H, Yoshida K, Kawamoto A, Kurioka H, Takase E, Sasaki Y, Hatanaka K, Kobayashi M, Ueyama T, Hashimoto T, Dohi K: Ischemic preconditioning upregulates vascular endothelial growth factor mRNA expression and neovascularization via nuclear translocation of protein kinase C epsilon in the rat ischemic myocardium. *Circ Res.* **2001**; 88(7):696-704.
179. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M: VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol.* **1996**; 270(5 Pt 2):H1803-1811.
180. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **1987**; 162(1):156-159.

181. Holzapfel B, Wickert L: Methoden und Anwendungsgebiete – Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biol. Unserer Zeit.* **2007**; 37(2):120-126.
182. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* **1995**; 4(6):357-362.
183. Pfaffl MW: Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum.* **2004**; 10(1):92-95.
184. Bustin SA: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* **2002**; 29(1):23-39.
185. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* **2001**; 25(4):402-408.
186. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **1951**; 193(1):265-275.
187. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **1970**; 227(5259):680-685.
188. MacPhee DJ: Methodological considerations for improving Western blot analysis. *J Pharmacol Toxicol Methods.* **2010**; 61(2):171-177.
189. Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* **2000**; 25(2):169-193.
190. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ: Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2005**; 33(20):e179.
191. Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, Sarkar A, Yang L, Elton TS, Chen C: Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods.* **2008**; 44(1):31-38.

192. Wang AM, Doyle MV, Mark DF: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1989**; 86(24):9717-9721.
193. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. **1993**; 11(9):1026-1030.
194. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. *Genome Res*. **1996**; 6(10):986-994.
195. Böhm-Hofstätter H, Tschernutter M, Kunert R: Comparison of hybridization methods and real-time PCR: their value in animal cell line characterization. *Appl Microbiol Biotechnol*. **2010**; 87(2):419-425.
196. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E: Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*. **1999**; 75(2-3):291-295.
197. Schmittgen TD, Zakrajsek BA: Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods*. **2000**; 46(1-2):69-81.
198. Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström ML: Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol*. **2004**; 59(6):566-573.
199. Li Q, Zhu Y, Jiang H, Xu H, Liu H: Up-regulation of heme oxygenase-1 by isoflurane preconditioning during tolerance against neuronal injury induced by oxygen glucose deprivation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. **2008**; 40(9):803-810.
200. Shan ZX, Lin QX, Fu YH, Deng CY, Zhou ZL, Zhu JN, Liu XY, Zhang YY, Li Y, Lin SG, Yu XY: Upregulated expression of miR-1/miR-206 in a rat model of myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. **2009**; 381(4):597-601.

201. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1979**; 76(9):4350-4354.
202. Burnette WN: "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* **1981**; 112(2):195-203.
203. Kurien BT, Scofield RH: Western blotting. *Methods.* **2006**; 38(4):283-293.
204. Too CK, Murphy PR, Croll RP: Western blotting of formaldehyde-fixed neuropeptides as small as 400 daltons on gelatin-coated nitrocellulose paper. *Anal Biochem.* **1994**; 219(2):341-348.
205. Egger D, Bienz K: Protein (western) blotting. *Mol Biotechnol.* **1994**; 1(3):289-305.
206. Durrant I: Light-based detection of biomolecules. *Nature.* **1990**; 346(6281):297-298.
207. Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ, Banks RE: Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics.* **2005**; 5(2):566-571.
208. Liu NK, Xu XM: beta-tubulin is a more suitable internal control than beta-actin in western blot analysis of spinal cord tissues after traumatic injury. *J Neurotrauma.* **2006**; 23(12):1794-1801.
209. Duan X, Ji B, Wang X, Liu J, Zheng Z, Long C, Tang Y, Hu S: Expression of microRNA-1 and microRNA-21 in different protocols of ischemic conditioning in an isolated rat heart model. *Cardiology.* **2012**; 122(1):36-43.
210. Vengellur A, LaPres JJ: The role of hypoxia inducible factor 1alpha in cobalt chloride induced cell death in mouse embryonic fibroblasts. *Toxicol Sci.* **2004**; 82(2):638-646.

211. Belhomme D, Peynet J, Louzy M, Launay JM, Kitakaze M, Menasché P: Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery. *Circulation*. **1999**; 100(19 Suppl):II340-344.
212. Riess ML, Stowe DF, Warltier DC: Cardiac pharmacological preconditioning with volatile anesthetics: from bench to bedside? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2004**; 286(5):H1603-1607.
213. Bienengraeber MW, Weihrauch D, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC: Cardioprotection by volatile anesthetics. *Vascul Pharmacol*. **2005**; 42(5-6):243-252.
214. Kim HW, Haider HK, Jiang S, Ashraf M: Ischemic preconditioning augments survival of stem cells via miR-210 expression by targeting caspase-8-associated protein 2. *J Biol Chem*. **2009**; 284(48):33161-33168.
215. Hu S, Huang M, Li Z, Jia F, Ghosh Z, Lijkwan MA, Fasanaro P, Sun N, Wang X, Martelli F, Robbins RC, Wu JC: MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation*. **2010**; 122(11 Suppl):S124-131.
216. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P: Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. **1993**; 87(3):893-899.
217. Ren XP, Wu J, Wang X, Sartor MA, Qian J, Jones K, Nicolaou P, Pritchard TJ, Fan GC: MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation* **2009**; 119(17):2357-2366.
218. Wang G, Hamid T, Keith RJ, Zhou G, Partridge CR, Xiang X, Kingery JR, Lewis RK, Li Q, Rokosh DG, Ford R, Spinale FG, Riggs DW, Srivastava S, Bhatnagar A, Bolli R, Prabhu SD: Cardioprotective and antiapoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart. *Circulation*. **2010**; 121(17):1912-1925.

219. Yet SF, Tian R, Layne MD, Wang ZY, Maemura K, Solovyeva M, Ith B, Melo LG, Zhang L, Ingwall JS, Dzau VJ, Lee ME, Perrella MA: Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res.* **2001**; 89(2):168-173.
220. Messadi E, Aloui Z, Belaidi E, Vincent MP, Couture-Lepetit E, Waeckel L, Decorps J, Bouby N, Gasmi A, Karoui H, Ovize M, Alhenc-Gelas F, Richer C: Cardioprotective effect of VEGF and venom VEGF-like protein in acute myocardial ischemia in mice: effect on mitochondrial function. *J Cardiovasc Pharmacol.* **2014**; 63(3):274-281.
221. Luo Z, Diaco M, Murohara T, Ferrara N, Isner JM, Symes JF: Vascular endothelial growth factor attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* **1997**; 64(4):993-998.
222. Liu ZG, Xia ZY, Chen XD, Luo T: Isoflurane induces expression of vascular endothelial growth factor through activating protein kinase C in myocardial cells. *Chin J Traumatol.* **2010**; 13(5):284-288.

## 6. Danksagung

Auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit wurde ich von wichtigen Menschen begleitet, ohne die ich dieses Ziel nicht erreicht hätte. Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen, Direktor der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, für die Ermöglichung der Promotion unter seiner Klinikleitung und die damit verbundene Finanzierung der experimentellen Studie.

Meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer, Laborleiterin der Experimentellen Anästhesiologie, für die Überlassung des Themas, das Heranführen an experimentelle Forschung und wissenschaftliche Denkweise sowie die immerwährende Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Hilbert Grievink, PhD, ehemaliger wissenschaftlicher Mitarbeiter der Experimentellen Anästhesiologie, für die qualifizierte Betreuung bei methodischen und inhaltlichen Fragestellungen, die ich zu jeder Zeit von nah und fern erhielt.

Frau Claudia Dohle, Frau Yvonne Grüber und Frau Antje Nebert für ihre aufgebrauchte Zeit sowie ihr fachliches Engagement.

Frau Swantje Klemm-Mayer für die Durchführung der *in vivo*-Experimente, die die Grundlage dieser Arbeit darstellen, sowie ihre zuverlässige und kooperative Hilfe bei tiermedizinischen Fragen.

Meiner Schwester für Ihren Zuspruch und für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Meinem Freund, Christopher Preetz, für Ermutigung, Rückhalt, den Glauben an mich und für seine Liebe.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und ihrer bedingungslosen Unterstützung und Förderung während meines gesamten Lebensweges. Ihnen widme ich diese Arbeit.