

Aus der Klinik für Anästhesiologie,
Universitätsklinikum Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Tarnow, FRCA

**Molekulare Mechanismen der Xenon Präkonditionierung:
Rolle der PKC α , PKC δ und Verknüpfung mit dem
Zytoskelett über die MAPKAPK-2**

- Studie am Rattenherzen in-vivo -

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nicole M. Wirthle

2007

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. Dr. B. Nürnberg
Dekan

Referent: Priv.- Doz. Dr. B. Preckel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. K. Schulze-Osthoff

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

AOR = area of risk (Infarkt-gefährdetes Gebiet)

APS = Ammoniumpersulfat

ATP = Adenosintriphosphat

AVI = average light intensity

BSA = bovines Serumalbumin

CapZIP = F-actin capping protein-interacting-protein

DAG = Diacylglycerol

DMSO = Dimethylsulfoxid

DTT = Dithiothreitol

ECL = enhanced chemiluminescence

ERK = extracellular-signal-regulated-kinase

HRP = horseradish peroxidase

HSP = heat shock protein

IC₅₀ = Konzentration des Inhibitors bei der 50% der Enzymaktivität gehemmt werden

IS = infarct size (Infarktgröße)

Iso-PC = Isofluran Präkonditionierung

KHK = koronare Herzkrankheit

LIM Kinase = lin-11, Isl-1, mec-3 regulierte Kinase

LSP = leucocyte-specific-protein

MAC = minimale alveoläre Konzentration

MAPK = mitogen-activated-protein-kinase

MAPKAPK-2 = mitogen-activated-protein-kinase-activated-protein-kinase-2

MKK/MKKK = MAP kinase kinase/ MAP kinase kinase kinase

Nogo = neurite outgrowth inhibitor protein

p38MAPK = p38 mitogen-activated-protein-kinase

p42/p44MAPK = p42/p44 mitogen-activated-protein-kinase

PAA = Polyacrylamid

PBS = phosphate buffered saline

PC = preconditioning (Präkonditionierung)

PCR = polymerase chain reaction

PKA / PKC / PKG = Protein Kinase A / Protein Kinase C / Protein Kinase G

PS = Phosphatidylserin

PVDF = Polyvinylidenfluorid

Rot = Rottlerin

SAP/JNK = stress-activated-protein-kinase/c-jun-NH₂-terminal-kinase

SDS-PAGE = Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese

Tris = Trihydroxymethylaminomethan

TTC = Triphenyltetrazoliumhydrochlorid

WIP = Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein

Xe-PC = Xenon Präkonditionierung

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Myokardischämie und -infarkt	1
1.1.1 Perioperative Myokardischämien	1
1.1.2 Pathophysiologie	2
1.2 Kardioprotektion	3
1.2.1 Ischämische Präkonditionierung	3
1.2.2 Pharmakologische Präkonditionierung	4
1.2.3 Klinische Studien	4
1.3 Xenon	5
1.3.1 Xenon als Anästhetikum	5
1.3.2 Xenon Präkonditionierung	6
1.4 Literaturübersicht zu den molekularen Mechanismen	7
1.4.1 Protein Kinase C	7
1.4.2 Die Protein Kinase C in der Präkonditionierung	8
1.4.3 p38MAPK - MAPKAPK-2 - Signalweg	10
1.4.4 p38MAPK - MAPKAPK-2 - Signalweg in der Präkonditionierung	11
1.4.5 HSP 27 und Regulation des Zytoskelett	12
1.5 Fragestellung	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Standardchemikalien	15
2.1.2 Lösungen	15
2.1.3 Antikörper	18
2.2 Methoden	19
2.2.1 In-vivo Versuche	19
a. Präparation der Versuchstiere	19
b. Xenon Präkonditionierung und Infarktprotokoll	20
c. Infarktgrößenbestimmung	21
d. Herzentnahme zur molekularbiologischen Untersuchung	24
2.2.2 Proteinbiochemie	26
a. Probenaufarbeitung	26
b. Lowry Proteinbestimmung	26
c. Western Blot	27
d. Detektion der Western Blots	32
e. Auswertung der Western Blots	32
f. Massenspektrometrie	33
g. Immunfluoreszenzuntersuchung	33
h. Co-Immunpräzipitation	34
2.2.3 Statistische Auswertung	35

	Seite
3. Ergebnisse	36
3.1 In-vivo Versuche	36
3.1.1 Gruppengröße	36
3.1.2 Messdaten während des Experiments	36
3.1.3 Infarktgrößenbestimmung	38
3.2 Proteinbiochemie	40
3.2.1 Gruppengrößen	40
3.2.2 PKC δ Phosphorylierung im Zeitverlauf/Translokation	40
3.2.3 Regulation der PKC α Phosphorylierung im Zeitverlauf	42
3.2.4 Regulation der MAPKAPK-2 Phosphorylierung	44
3.2.5 Immunfluoreszenzuntersuchung der Actin/HSP 27 Co-Lokalisation	46
3.2.6 Co-Immunpräzipitation von Actin und HSP 27	48
4. Diskussion	50
4.1 Rolle der PKC in der Xenon Präkonditionierung	51
4.2 Rolle der MAPKAPK-2 in der Xenon Präkonditionierung	53
4.3 Rolle von HSP 27 und Zytoskelett in der Xenon Präkonditionierung	54
4.4 Methodenkritik	56
4.5 Ausblick	59
5. Literaturverzeichnis	61
Anhang:	
Danksagung	72
Lebenslauf	73
Zusammenfassung	74

1. Einleitung

Der Myokardinfarkt stellt eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt dar. Perioperative kardiale Komplikationen sind daher seit langem eines der vordringlichen Probleme für den Anästhesisten. Dabei kommt den perioperativen Myokardischämien besondere Bedeutung zu. Meist klinisch stumm verlaufend, sind sie Ursachen für Morbidität und Mortalität nach chirurgischen Eingriffen. Nicht nur im Rahmen von herzchirurgischen Operationen spielt daher die Verhinderung perioperativer Myokardischämien und deren Folgen eine große Rolle für das Langzeitergebnis der Patienten.

1.1 Myokardischämie und -infarkt

1.1.1 Perioperative Myokardischämien

Der wichtigste Risikofaktor für kardiale Komplikationen ist die koronare Herzkrankheit (KHK), an der laut nationaler Leitlinie "koronare Herzkrankheit" fünf bis acht Prozent der deutschen Bevölkerung leiden. Jedes Jahr werden rund eine Million operative Eingriffe bei Patienten mit einer Erkrankung der Koronararterien durchgeführt. Diese Patienten haben einen deutlich erhöhtes Risiko während und in den ersten Tagen nach einer Operation Komplikationen des Herz- und Kreislaufsystems zu erleiden.

In einer Untersuchung an koronaren Risikopatienten nach nicht-herzchirurgischen Eingriffen lag die Gesamtinzidenz perioperativer Myokardinfarkte bei 5,6%, davon verliefen 17% tödlich [1]. Patienten, die bereits einen Myokardinfarkt erlitten hatten, zeigten in dieser Untersuchung eine deutlich erhöhte perioperative Re-Infarktrate verglichen mit Patienten ohne vorausgegangenen Infarkt.

Mangano und Mitarbeiter analysierten die Inzidenz perioperativer Myokardischämien bei koronaren Risikopatienten durch kontinuierliches Holter-Monitoring und fanden bei 18% aller Patienten postoperative kardiale Komplikationen. Alleinige unabhängige Determinante für postoperative ischämische Komplikationen in dieser Untersuchung war das Auftreten intraoperativer Myokardischämien. Unmittelbar postoperativ aufgetretene Myokardischämien erhöhten die Wahrscheinlichkeit für kurzfristig nachfolgende ischämische Komplikationen wie instabile Angina pectoris, Myokardinfarkt oder akuter Herztod um mehr als das neunfache [2]. Perioperative Myokardischä-

mien traten in bis zu 40% aller koronaren Risikopatienten bei nicht-herzchirurgischen operativen Eingriffen auf und erhöhten die Rate postoperativer kardialer Komplikationen jeglicher Art sogar auf das 20-fache [3]. Auch in anderen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass länger dauernde intraoperative Myokardischämien postoperativen koronaren Komplikationen häufig vorausgehen und einer der wichtigsten Prädiktoren für postoperative kardiale Komplikationen sind, ihre Relevanz für die Langzeitprognose von Morbidität und Mortalität wurde in klinischen Untersuchungen bestätigt [4, 5].

1.1.2 Pathophysiologie von Myokardischämie und Myokardinfarkt

Während einer akuten Myokardischämie tritt in einem begrenzten Teil der Herzmuskulatur ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf auf. Das myokardiale Sauerstoffangebot hängt vom Sauerstoffgehalt des Blutes und dem koronaren Perfusionsdruck, aber auch von Koronarstenosen, einem möglichen Kollateralfloss und intravasaler Thrombenbildung ab. Der myokardiale Sauerstoffbedarf ist abhängig von der Herzfrequenz und der Wandspannung, die wesentlich durch Vor- und Nachlast bestimmt wird. Ist das Sauerstoffangebot in einem Versorgungsbezirk kleiner als der Sauerstoffbedarf, kommt es zu einer Unterversorgung des Myokards in diesem Bereich. Meist ist die intraoperative Myokardischämie sowohl Folge einer Reduktion des Sauerstoffangebots als auch einer Steigerung des Sauerstoffbedarfs. Durch die Ischämie wird das Angebot an Sauerstoff und Stoffwechselfsubstraten verringert sowie zusätzlich die Abgabe von Ionen und Stoffwechselmetaboliten erschwert. Durch die reduzierte anaerobe Energieproduktion verarmen myokardiale Energiespeicher wie Adenosintriphosphat (ATP) oder Kreatinphosphat, die ATP-abhängigen Ionenpumpen werden so in ihrer Funktion gestört. Es resultiert eine gravierende Änderung intrazellulärer Ionenkonzentrationen und des Membranpotentials. Schließlich führt dies zu Schäden an Zellmembranen, Zytoskelett und Zellorganellen durch Zellschwellung, Radikalentstehung sowie intrazelluläre Proteasen- und Lipasenaktivierung [6, 7]. Die Folge ist eine vorübergehende ("stunning") oder auch eine bleibende Schädigung (Nekrose, Infarkt) des Myokards. Der Verlust von funktionfähigem Myokard resultiert in verschlechterter ventrikulärer Pumpfunktion, was sowohl

die Lebensqualität durch eine verminderte Leistungsfähigkeit als auch die Lebenserwartung deutlich beeinträchtigt [8].

1.2 Kardioprotektion

Kardioprotektion bezeichnet die Prävention von Ischämie-Reperfusionsschäden am Herzen, die sich mit Zelltod, Arrhythmien und myokardialer Dysfunktion manifestieren. Die Verhinderung dieser Folgen ist seit langem Ziel vieler wissenschaftlicher Untersuchungen, da das Myokard in einer Vielzahl von klinischen Situationen einer Ischämie ausgesetzt sein kann [9, 10]. Sowohl bei herzchirurgischen Eingriffen, als auch während kardiologischer Interventionen kommt einer Beeinflussung des Ischämie-Reperfusionsschadens am Herzen eine große Bedeutung zu. Zusätzlich können während der gesamten perioperativen Phase nichtherzchirurgischer Eingriffe Episoden von Ischämie-Reperfusion am Herzen auftreten.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Kardioprotektion durch Präkonditionierung, daher soll diese Art des Myokardschutzes im Folgenden zunächst näher erläutert werden.

1.2.1 Ischämische Präkonditionierung

Das Phänomen der Präkonditionierung wurde erstmals 1986 von Murry und Kollegen beschrieben. Sie hatten herausgefunden, dass kurze subletale Ischämien das Herz vor den Folgeschäden einer längeren, darauf folgenden Ischämie schützen können. Bei ihrer Untersuchung wurden Hundeherzen kurzen regionalen Ischämien unterzogen. Aus der nachfolgenden Indexischämie folgte eine deutlich reduzierte Infarktgröße im Vergleich mit der Kontrollgruppe [11]. Diese ischämische Präkonditionierung wurde seither in einer Vielzahl von Spezies und Organen nachgewiesen [12-17]. Die myokardiale Präkonditionierung konnte sowohl an einzelnen Zellen, als auch an isolierten Myokardpräparaten und perfundierten Herzen gezeigt werden [18, 19]. In weiteren Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass diese vorübergehende Anpassungsreaktion des Myokards mit einer Verringerung Reperfusion-induzierter Ar-

rhythmien und verbesserter Erholung der postischämischen Kontraktionsfähigkeit assoziiert ist [20, 21].

1.2.2 Pharmakologische Präkonditionierung

Auch die Applikation einer Reihe sehr unterschiedlicher pharmakologischer Stoffe kann einen präkonditionierenden Effekt auslösen. Diese Form der Myokardprotektion wird pharmakologische Präkonditionierung genannt. Besonders halogenierte Fluorkohlenstoffe, welche als Anästhetika verwendet werden, sind in der Lage, die Effekte der ischämische Präkonditionierung nachzuahmen [22, 23]. Man spricht hierbei dann von Anästhetika-induzierter Präkonditionierung. Schon 1976 berichteten Bland und Kollegen von einem Halothan induzierten Schutz während einer Myokardischämie bei Hunden [24]. Die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung konnte seither in verschiedenen Tierspezies sowie an humanen Kardiomyozyten nachgewiesen werden [25, 26]. Vorteilhafte Effekte auf die myokardiale Erholung nach einer Ischämie zeigten sich dabei für Desfluran, Sevofluran, Isofluran und Halothan [27-29].

1.2.3 Klinische Studien

Klinische Studien zu herz- und koronarchirurgischen Eingriffen stützen die These, dass volatile Anästhetika auch im klinischen Einsatz ihre kardioprotektiven Effekte, gemessen sowohl an biochemischen als auch an funktionellen Parametern, ausüben können [30]. In einer retrospektiven Auswertung nach Umstellung des Anästhesieregimes bei herzchirurgischen Eingriffen zeigten sich kardioprotektive Vorteile einer inhalativen Anästhesie mit Sevofluran gegenüber einer intravenösen Anästhesie mit Midazolam und Sufentanil [31]. Julier und Kollegen konnten in einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten multizentrischen Studie zeigen, dass Präkonditionierung mit Sevofluran bei Patienten nach Koronarbypass die Konzentration biochemischer Marker der myokardialen Dysfunktion reduzierte [32]. Sollte sich weiter bestätigen, dass bestimmte Anästhetika am Herzen protektive Effekte ausüben, könnte der Einsatz ausgewählter Anästhetika gerade für Risikopatienten eine Reduktion von Ischämieschäden und eine Verminderung myokardialer Dysfunktion bedeuten. Für Patienten

mit KHK wäre eine Möglichkeit gegeben, die Myokardperfusion und -funktion sowohl bei und nach herzchirurgischen als auch bei nicht-herzchirurgischen Eingriffen zu verbessern.

1.3 Xenon

1.3.1 Xenon als Anästhetikum

Xenon ist das einzige Edelgas mit anästhetischen Eigenschaften im normobaren Bereich. Vor über 50 Jahren wurde es erstmals in der klinischen Anästhesie verwendet [33]. Seither haben mehrere hundert Patienten erfolgreiche Anästhesien mit Xenon erhalten. Die Sicherheit und Effektivität als Anästhetikum ist zwar unbestritten, vor allem aber die hohen Kosten verhindern derzeit eine weite Verbreitung in der klinischen Anwendung. Dieses Hindernis könnte möglicherweise in der Zukunft durch technologische Fortschritte in Applikation und Recycling abgebaut werden, so dass weit weniger Gas für eine Anästhesie verbraucht würde.

In den letzten zehn Jahren regte sich zudem neuerlich Interesse an der Verwendung von Xenon als Anästhetikum, da verschiedene Vorteile einer Xenon Anästhesie gegenüber herkömmlichen Inhalationsanästhetika nachgewiesen worden waren. Dazu gehören:

- Ein pharmakokinetischer Vorteil durch einen extrem niedrigen Blut/Gas-Verteilungskoeffizienten (0,115), der eine schnelle Ein- und Ausleitung der Narkose ermöglicht („fast tracking“) [34-36],
- eine starke Analgesie [37, 38] und
- eine geringe kardiovaskuläre Beeinträchtigung durch minimale hämodynamische und kardiovaskuläre Nebenwirkungen [39-41].

Im Vergleich mit den halogenierten Fluorkohlenstoffen, wie z.B. Isofluran, die stärkere hämodynamische Effekte ausüben als Xenon [42, 43], könnte das Edelgas daher ein vorteilhaftes Anästhetikum besonders für kardiale Risikopatienten sein. Denn obwohl Xenon als Edelgas chemisch inert ist, mehrten sich die Hinweise, dass es kardioprotektive Veränderungen induzieren kann. Diese biologischen Nebeneffekte des Edelgases könnten zusätzlichen Nutzen in der klinischen Anwendung bringen.

1.3.2 Xenon Präkonditionierung

Wenige Studien haben sich bisher mit dem präkonditionierenden Effekt des anästhetischen Gases Xenon beschäftigt. Es gibt zwei Studien, die die durch Xenon ausgelösten Effekte auf zellulärer Ebene untersuchen [44, 45], bei diesen handelt es sich in beiden Fällen um in-vitro Modelle. Zu den kardiovaskulären Effekten von Xenon unter pathophysiologischen Bedingungen in-vivo, wie z.B. einer regionalen Ischämie, gibt es bisher wenige Daten. In den bisher durchgeführten experimentellen Untersuchungen zeigte sich, dass Xenon starke kardioprotektive Effekte ausübt. Eine der ersten Untersuchungen dieser Art wies nach, dass die inhalative Gabe von 70% Xenon während der Reperfusionsphase die resultierende Infarktgröße deutlich reduzieren kann [46]. In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine kontinuierliche Xenon Applikation eine verbesserte Erholung des Myokards nach kurzer regionaler Ischämie bewirkt [47].

Weiter konnte kürzlich in einer in-vivo Studie am Rattenherzen der präkonditionierende Effekt von Xenon nachgewiesen werden. Repetitive Xenon Inhalation vor einer Myokardischämie (Xenon Präkonditionierung) verringerte die resultierende Infarktgröße signifikant [48].

1.4 Literaturübersicht zu den molekularen Mechanismen

An den molekularen Mechanismen der Präkonditionierung sind intrazelluläre Signalwege beteiligt, deren wichtigstes Zielmolekül der ATP-abhängige Kalium-Kanal zu sein scheint [23, 49]. An der sarkolemmalen und mitochondrialen Membran der Kardiomyozyten gelegen, öffnet er sich als Reaktion auf kleine Änderungen der intrazellulären ATP-Konzentration, die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen während der Ischämie und die Stimulation von Adenosinrezeptoren [30, 50]. Auf diesem Weg werden verschiedene Kinasekaskaden aktiviert, darunter auch Isoformen der Protein Kinase C (PKC) und die mitogen-activated-protein-kinases (MAPKs) [48, 51].

1.4.1 Protein Kinase C

Die Protein Kinase C ist eine Familie von Serin-Threonin-Kinasen, welche eine wichtige Schlüsselrolle in der zellulären Signaltransduktion besitzt. Die Regulation der verschiedenen Isoformen der PKC erfolgt hauptsächlich über eine Translokation der Kinase zu verschiedenen Zellkompartimenten (Plasmamembran, Nukleus, Zytoskelett) sowie eine Phosphorylierung, welche zu ihrer Aktivierung führt [52].

Es sind bisher 11 Isoformen in drei funktionell und strukturell verschiedenen Subgruppen bekannt: Die Gruppe der „conventional“ PKC (PKC α , β_1 , β_2 , γ) ist Ca^{2+} -abhängig und wird durch Bindung an Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidylserin (PS) aktiviert. Die „novel“ PKC (PKC δ , ϵ , η und θ) sind Ca^{2+} unabhängig, werden aber durch DAG und PS aktiviert und „atypical“ PKC (PKC ζ und ι/λ), welche Ca^{2+} und DAG unabhängig sind, werden nur durch PS aktiviert [53].

Die Verteilung der verschiedenen Isoformen ist Alters-, Gewebs- und auch Spezies-abhängig. Immuntechnische und PCR-basierte Verfahren wiesen verschiedene PKC Isoformen auch im Rattenherzen nach [54]. Hier werden hauptsächlich PKC α , δ , ϵ und ζ exprimiert. Das Vorkommen weiterer Isoformen, wie β und η , im Rattenherzen wird kontrovers diskutiert [55-57]. Der Gehalt an PKC im Rattenherzen verändert sich zusätzlich im Laufe der Entwicklung. Im fetalen Herzen ist die Konzentration der verschiedenen PKC Isoformen am höchsten, dann jedoch sinken die Konzentrationen der Isoformen α und δ stetig ab, wohingegen die Isoform ϵ weiterhin auf hohem Ni-

veau exprimiert wird [58]. Auch in humanen Kardiomyozyten konnten die PKC Isoformen α , β , δ und ϵ nachgewiesen werden [59].

Die biologischen Funktionen der PKC Familie sind umfangreich. Ihre verschiedenen Isoformen sind an so unterschiedlichen Prozessen wie Zellproliferation und Differenzierung, Genexpression, neoplastischer Transformation, Apoptose, Vermittlung von Immunreaktionen oder Modulation von Transportvorgängen [60-64] beteiligt.

Die PKC übt gerade auch in Herz- und Gefäßmuskelzellen wichtige Regulationsfunktionen aus. Ihre Aktivierung induziert eine Vielzahl kardiovaskulärer Effekte, wie z.B. Veränderungen der Gefäßpermeabilität, Induktion von Zellmigration und Wachstum, Produktion von extrazellulärer Matrix sowie Expression verschiedener Zytokine [53, 65]. Veränderungen in der Aktivität und Verteilung der verschiedenen PKC Isoformen im Myokard spielen sowohl für den Ischämie-Reperfusionsschaden am Herzen, als auch für die Entwicklung von Kardiomyopathien oder Veränderungen am Herzen von Diabetikern eine Rolle [59, 66-68].

1.4.2 Die Protein Kinase C in der Präkonditionierung

Die Aktivierung der Protein Kinase C gilt als ein wichtiger Schritt im molekularen Mechanismus sowohl bei der ischämischen als auch bei der pharmakologischen Präkonditionierung. Schon kurz nach dem Stimulus sinkt die Gesamtaktivität der PKC im Zytosol der Zelle ab, während sie in anderen Zellkompartimenten rasch ansteigt [69]. Die verschiedenen Isoformen der PKC zeigen große Unterschiede in ihrer Aktivität, subzellulären Verteilung und auch Substratspezifität. Intensiv untersucht wird daher zur Zeit, welche der PKC Isoformen in welcher Weise an der Vermittlung der Kardioprotektion mitwirken. Das größte Interesse gilt dabei den „novel“ Isoformen δ und ϵ , aber auch der Isoform α .

Im Rahmen von Ischämie und Reperfusion konnten für die PKC Isoformen ϵ und δ vollkommen gegensätzliche Effekte gezeigt werden. Die Aktivierung der PKC δ konnte den myokardialen Schaden durch eine Ischämie verschlimmern, die Aktivierung der PKC ϵ dagegen wirkte kardioprotektiv. Dies wurde sowohl in vitro an isolierten Myozyten und Herzen als auch in vivo gezeigt [70]. Des Weiteren wurde durch die Inhibition der PKC δ während der Reperusionsphase nach einer Ischämie sowohl in vitro als auch in vivo eine Kardioprotektion erzielt [71, 72].

In der Literatur gibt es bisher viele solcher Hinweise für eine Beteiligung von PKC Isoformen an der Signalkaskade der Präkonditionierung. Hierbei ist die kardioprotektive Rolle der PKC ϵ bereits gut belegt [67, 73]. Bezüglich der Isoformen α und δ existieren dagegen unterschiedliche Ergebnisse.

Wang und Kollegen konnten nachweisen, dass eine Translokation der PKC δ zu den Mitochondrien mit den kardioprotektiven Effekten der ischämischen Präkonditionierung korreliert [74]. Immunhistochemische Untersuchungen von isolierten Rattenherzen zeigten nach ischämischer Präkonditionierung eine Translokation der PKC α und δ vom Zytosol zur Membran [75, 76]. Wohingegen an Rattenkardiomyozyten nach ischämischer Präkonditionierung keine Translokation der PKC α und δ nachzuweisen war [77].

Ischämische Präkonditionierung von transgenen PKC δ knock-out Mäusen vergrößerte in einer anderen Untersuchung den Myokardschaden nach einer Indexischämie. Durch die Präkonditionierung konnte bei diesen kein Schutz mehr erzielt werden [78]. Auch dieses Ergebnis stützt die These einer Beteiligung der PKC δ an dem Signalweg der ischämischen Präkonditionierung.

Dagegen berichtet Fryer aus Versuchen mit dem PKC δ Inhibitor Rottlerin von einer Beteiligung der PKC δ an der pharmakologischen, hier opioid-induziert, nicht jedoch an der ischämischen Präkonditionierung [79, 80]. In einer Untersuchung an menschlichen Herzohrpräparaten konnte zudem gezeigt werden, dass nach ischämischer Präkonditionierung eine vermehrte Phosphorylierung von PKC α und ϵ zu beobachten ist. PKC α und ϵ Inhibitoren konnten den Schutz durch ischämische Präkonditionierung aufheben, PKC δ Hemmung durch Rottlerin jedoch nicht [81].

Die Rolle der PKC α und δ in der ischämischen Präkonditionierung ist daher bislang nicht endgültig geklärt.

Ischämische und Anästhetika-induzierte Präkonditionierung scheinen grundlegende Schritte des Signalweges gemeinsam zu haben. So sind die Isoformen der PKC, v.a. die PKC ϵ , auch wichtige Signaltransduktoren der Präkonditionierung des Herzens durch volatile Anästhetika [82]. In einer Untersuchung an isolierten Rattenherzen konnten Uecker und Kollegen eine Translokation der PKC δ und ϵ sowohl nach ischämischer als auch nach Isofluran Präkonditionierung nachweisen. Die PKC δ zeigte hierbei eine Phosphorylierung und mitochondriale Translokation nach anästhetischer Präkonditionierung, welche durch Rottlerin aufgehoben werden konnte

[83]. Dies konnte in weiteren Studien auch für andere Anästhetika, wie z.B. Sevofluran und Isofluran, bestätigt werden [84, 85]. Auch für die Xenon Präkonditionierung konnte bereits eine Aktivierung der PKC ϵ gezeigt werden [48].

Mögliche Kandidaten als Mediatoren für die Xenon Präkonditionierung sind daher neben der bereits untersuchten PKC ϵ sowohl die Isoform α als auch die PKC Isoform δ , deren Beteiligung in dieser Arbeit überprüft werden soll.

1.4.3 p38MAPK - MAPKAPK-2 - Signalweg

Proteinphosphorylierung ist einer der Schlüsselmechanismen der Signaltransduktion in der Genexpression, Zellproliferation und der Apoptose, wie z.B. in der MAP Kinase Kaskade. MAP Kinasen werden nach Threonin und Tyrosin Phosphorylierung durch MAP Kinase Kinasen (MKK) aktiviert, welche wiederum durch MAP Kinase Kinase Kinasen (MKKK) in einer Kinase Kaskade aktiviert werden [86]. Drei verschiedene MAP Kinasen mit unterschiedlichen Signalwegen wurden im Säugetierherz beschrieben: die extracellular-signal-regulated-kinase (ERK) oder p42/p44-mitogen-activated-protein-kinase (p42/p44MAPK), die stress-activated-protein-kinase oder c-jun-NH₂-terminal-kinase (SAPK/JNK) und die p38-mitogen-activated-protein-kinase (p38MAPK) [87]. In einer Untersuchung an isolierten Herzen konnte gezeigt werden, dass die p38MAPK durch globale Ischämie aktiviert wird, die SAPK/JNK durch Ischämie-Reperfusion, während für die ERK keine Aktivierung durch Ischämie oder Reperfusion zu messen war [88].

Die mitogen-activated-protein-kinase-activated-protein-kinase-2 (MAPKAPK-2) wird nach mitogenen Stimuli via MAP Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert. Sie wurde im Skelettmuskel des Kaninchens entdeckt [89]. Besonders stark exprimiert wird sie außerdem auch im Myokard [90]. 1992 wurden von Stokoe und Kollegen als ihre mögliche Hauptsubstrate die kleinen Heat Shock Proteine, das Nager HSP 25 und das menschliche HSP 27, gefunden [91]. In einer Untersuchung von Rouse und Mitarbeitern wurde die Regulation der MAPKAPK-2 in vivo studiert. Sie fanden keine Aktivierung der MAPKAPK-2 nach p42/44 MAPK Stimulation mit Wachstumsfaktoren. Es zeigte sich dagegen eine Aktivierung der MAPKAPK-2, nicht jedoch der p42/44 MAPK, durch chemischen Stress und Hitzeschock. Daraufhin wurde von ihnen erstmals der Stress-induzierte Signalweg der p38 MAPK beschrieben [92]. Später konnte

gezeigt werden, dass die Aktivierung der MAPKAPK-2 in vivo nur über direkte Phosphorylierung durch die p38 MAPK erfolgt [93]. Nach dieser Aktivierung findet dann ein Koexport von MAPKAPK-2 und p38 MAPK vom Kern zum Zytoplasma statt [94].

Nach ihrer Aktivierung vermittelt die MAPKAPK-2 verschiedene p38 MAPK abhängige Signalkaskaden. Neben der Transduktion von proinflammatorischen Prozessen und der Zytokinexpression ist die MAPKAPK-2 v.a. in die Regulation der Actin Dynamik eingebunden [95-97]. Neben dem HSP 27 sind hierzu weitere Substrate der MAPKAPK-2 bekannt, wie z.B. die LIM Kinase, eine Serin Protein Kinase, die an der Polymerisation von Actin und dem Umbau von Mikrotubuli beteiligt ist [98, 99]. Auch das Leukozyten spezifische Protein 1 (LSP1), das CapZ interagierende Protein (CapZIP), der Neuriten Wachstums Inhibitor Nogo-B und diverse andere Proteine (z.B. WIP) konnten als Substrate der MAPKAPK-2 identifiziert werden [100-103].

1.4.4 p38 MAPK-MAPKAPK-2 -Signalweg in der Präkonditionierung

Die Aktivierung der PKC durch Präkonditionierung beeinflusst andere Downstream-Signalwege wie z.B. die Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK) Kaskade. Es konnte gezeigt werden, dass die PKC ϵ bei der Kardioprotektion mit den MAPK interagiert [73]. Hierbei ist v.a. die p38 MAPK unterhalb der PKC an der Präkonditionierung des Herzens beteiligt [104]. Dies konnte kürzlich auch für die Xenon Präkonditionierung am Rattenmyokard nachgewiesen werden [48].

Hinweise für eine mögliche Beteiligung der MAPKAPK-2 an der myokardialen Signaltransduktion erbrachte eine Studie von Zu und Mitarbeitern: Eine Northern Blot Analyse unterschiedlicher menschlicher Gewebe zeigte eine hohe Expression und Aktivierung der MAPKAPK-2 in Kardiomyozyten. Durch einen in vitro Kinase Assay an Kardiomyoblasten ergab sich schließlich eine schnelle Aktivierung der MAPKAPK-2 durch Stress Stimulation (Hitze, oxidativer Stress) und Phorbol ester [90]. Untersuchungen an isolierten Rattenherzen durch Maulik und Kollegen zeigten weiter, dass durch Ischämie und Reperfusion die Aktivierung der p38MAPK-MAPKAPK-2 Kaskade stimuliert wird [105, 106] Ergänzend berichteten Nakano und Mitarbeiter in einer Studie an perfundierten Kaninchenherzen über eine starke Aktivierung der MAPKAPK-2 nach ischämischer Präkonditionierung [107].

Zusammengenommen sprechen die bisherigen Daten für den folgenden Signaltransduktionsweg der frühen Stressreaktion im Myokard: extrazelluläre Stimuli wie Hitzeschock, oxidativer Stress oder Ischämie-Reperfusion induzieren eine schnelle Aktivierung der p38MAPK Kaskade durch MKK3 und MKK6. Über eine Aktivierung der p38 MAPK und anschließend der MAPKAPK-2 kommt es zu einer Phosphorylierung des HSP27 und anderer Substrate (z.B. LIM Kinase) im Myokard.

Ob die Beteiligung der MAPKAPK-2 auch für den Signalweg einer Präkonditionierung mit Xenon zutrifft ist bisher nicht untersucht worden und soll Teil dieser Arbeit sein.

1.4.5 HSP 27 und Regulation des Zytoskeletts

In Versuchen mit Colchicin an Kaninchen konnte gezeigt werden, dass ein intaktes Zytoskelett eine wichtige Voraussetzung für eine funktionierende Isofluran-induzierte Präkonditionierung ist [108]. Für den Schutz und die Stabilisierung der Struktur der Actin Filamente bei Zellstress sind hauptsächlich kleine Heat Shock Proteine wie das 27 kDa schwere HSP 27 verantwortlich [109] Hierzu erfolgt bei Zellstress die Aktivierung von HSP 27 mittels Phosphorylierung durch die p38 MAPK [110]. Daraus resultiert eine verbesserte Stabilität des Zytoskeletts durch F-Actin Polymerisation [111].

Das Actin Zytoskelett spielt eine herausragende Rolle für Zellmorphologie und Stabilität. Der Umbau der Actinfilamente macht Prozesse wie Zellmotilität und -migration, Membrantransport, Phagozytose und Wachstum möglich. Neben HSP 27 sind eine Reihe weiterer Mediatoren in die Regulation der Zytoskelett Dynamik eingebunden. Dazu gehören z.B. die LIM-Kinase, die Ras GTPase und die kleinen GTPasen der Rho-Familie (Rho, Rac, und Cdc42) [112, 113]. Ihre Bedeutung für die Präkonditionierung ist bisher unklar und soll nicht Teil dieser Arbeit sein.

Die Aktivierung des HSP 27 konnte sowohl für globale als auch für regionale Ischämie an verschiedenen Tiermodellen, darunter auch an der Ratte, gezeigt werden [114]. Da längere Ischämie zu einer Zerstörung des Zytoskeletts führt [7], könnte die Aktivierung des HSP 27 über die p38 MAPK und die MAPKAPK-2 durch eine Stabilisierung des Zytoskeletts, als möglichem Endeffektor, am Schutz der Zelle vor einem Ischämie-Reperfusions-Schaden beteiligt sein.

Für die ischämische Präkonditionierung konnte bereits eine Translokation des HSP 27 zum Zytoskelett nachgewiesen gezeigt werden [115]. Für den Mechanismus einer Präkonditionierung des Rattenmyokards mit Xenon konnte die Phosphorylierung und Aktivierung der p38 MAPK nachgewiesen werden [48]. Daher scheint eine nachfolgende Aktivierung und Translokation des HSP 27 über die MAPKAPK-2 auch hier möglich. Diese mögliche Verknüpfung mit dem Zytoskelett soll in dieser Arbeit untersucht werden.

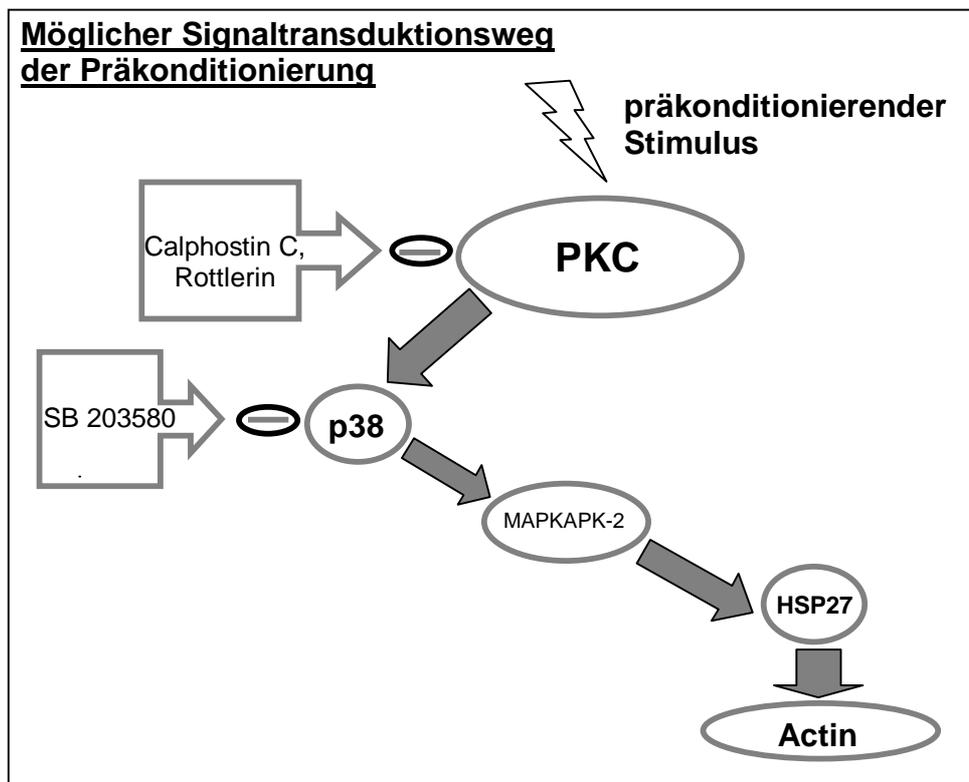


Abbildung 1 – Signaltransduktion in der Präkonditionierung

Das Schema zeigt einen möglichen Signaltransduktionsweg der Präkonditionierung. Durch den präkonditionierenden Stimulus wird eine Signalkaskade aktiviert, u.a. kommt es dabei zur Aktivierung der Protein Kinase C (PKC), die durch die Inhibitoren Calphostin C bzw. Rottlerin gehemmt werden kann. Nachfolgend kommt es zur Aktivierung der p38 MAPK (p38), deren Aktivierung durch SB 203580 gehemmt wird. Unterhalb der p38 MAPK werden möglicherweise die MAPKAPK-2 und das HSP 27 aktiviert, welches auf das Actin Zytoskelett Einfluss nimmt.

1.5 Fragestellung

Bisher gibt es erste wegweisende Ergebnisse zu den molekularen Mechanismen der Xenon Präkonditionierung. Eine Vielzahl von weiteren möglicherweise involvierten Mediatoren und der genaue Signalweg bleiben jedoch noch unklar. Auch ist die Frage nach dem möglichen Endeffektor der Xenon Präkonditionierung ungeklärt.

Die vorliegende Arbeit soll der weiteren Aufklärung der Signalwege, die an der Xenon Präkonditionierung im Herzen in-vivo beteiligt sind, dienen.

Es ergaben sich daher folgende Fragestellungen:

1. Gibt es eine funktionelle Beteiligung der PKC Isoform δ bei der Kardioprotektion durch Xenon?
2. Wird die PKC δ bei der Xenon Präkonditionierung durch Phosphorylierung aktiviert?
3. Induziert die Xenon Präkonditionierung des Herzens eine zeitabhängige Aktivierung der PKC Isoform α ?
4. Wird durch die Xenon Präkonditionierung die MAPKAPK-2 aktiviert?
5. Hat die Xenon Präkonditionierung Einfluss auf die Verknüpfung von HSP 27 und Actin Zytoskelett?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Standardchemikalien

Xenon wurde von Messer Griessheim GmbH, Krefeld, Isofluran von Baxter, München, destilliertes Wasser aus der Apotheke der Universität Düsseldorf bezogen. Polyacrylamid (30% PAA) wurde bei Roth, Karlsruhe, bestellt. Die übrigen verwendeten Laborchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in Reagenzienqualität von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen oder Merck Eurolab GmbH, Darmstadt erworben.

2.1.2 Lösungen

Zusammensetzungen der verwendeten Standardlösungen und Puffer:

α -Chloralose 75 mg α -Chloralose + 112,5 mg Borax + 7,5 ml NaCl 0,9%

Evansblue-Färbelösung 1 g Evansblue + 5 g Dextran + NaCl 0,9% ad 500 ml

TTC Färbelösung

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

Tris HCL

500 mM Tris HCL, pH 7,4: 15,8 g Tris HCl + Aqua dest. ad 200 ml, pH 7,4 einstellen
500 mM Tris HCL, pH 6,8: 15,8 g Tris HCl + Aqua dest. ad 200 ml, pH 6,8 einstellen

Tris Base

1,5 M Tris Base, pH 8,8: 54,51 g Sigma 7-9 + Aqua dest. ad 300 ml, pH 8,8
1,25 M Tris Base, pH 6,8: 15,14 g Sigma 7-9 + Aqua dest. ad 100 ml, pH 6,8

Lysepuffer für die Probenaufarbeitung

5 mM Sigma 7-9, 50 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 , 2 mM EGTA,
2 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, 2 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 2 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin,
0,77 mg/ml DTT, 10 mM Okadaic Acid

Lowry Reagenz (frisch angesetzt):

100 Teile Na_2C_3 in 500 ml 0,1 mol NaOH + 1 Teil 2% Kalium-Natrium-Tartrat
+ 1 Teil 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Lösungen für die Gele der SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

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

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

Pufferlösungen für Elektrophorese und Elektrotransfer

Laufpuffer 3 g Sigma 7-9 + 14,4 g Glycin + 1 g SDS + Aqua dest. ad 1 l

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

Transferpuffer 6 g Sigma 7-9 + 28,8 g Glycin + 400 ml Methanol
+ 1600 ml Aqua dest.

Lösungen für die Coomassie Färbung

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

Zum Abtrennen unlöslicher Farbstoffanteile muss die Lösung vor
Gebrauch filtriert werden.

Entfärbelösung 100 ml Eisessig + 333,3 ml Ethanol + Aqua dest. ad 1 l

Lösungen für den Immunoblot

Waschpuffer (TPBS) 10 Tabletten PBS (phosphate buffered saline)
+ 2 ml Tween 20 + 2000 ml Aqua dest., pH 8,0 einstellen

5% Blocklösung 50 g dried skimmed milk + 5 Tabletten PBS
+ 1 ml Tween 20 + 1000 ml Aqua dest.

1% Blocklösung 5% Blocklösung 1:5 mit TPBS verdünnen

BSA 5% 50 g BSA (bovines Serumalbumin) + 1000 ml TPBS

Lösungen für die Immunfluoreszenzfärbung**Zamboni Reagenz**

4% Paraformaldehyd und 15% gesättigte Pikrinsäure
in 0,1 M PB (phosphate buffered) Puffer.

Herstellung Zamboni Reagenz:

PB Puffer: a) 28,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 800 ml Aqua dest.

b) 8,3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in 300 ml Aqua dest.

a) und b) separat lösen und mit b) in a) auf pH 7,4 einstellen.

PBS+ 1l PBS (phosphate buffered saline) + 0,1 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ + 0,1 g CaCl_2

2.1.3 Antikörper

Die Antikörper wurden nach Angaben des Herstellers entweder in einer fünfprozentigen BSA Lösung oder in einer einprozentigen Blocklösung verdünnt.

1. Antikörper und eingesetzte Verdünnung

Hersteller

Anti-phospho PKC α (Ser657), 1:1000	Upstate, Lake Placid, NY, USA
Anti-PKC α , clone M4, 1:2000	Upstate, Lake Placid, NY, USA
Anti-phospho PKC δ (Thr 505), 1:2000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-PKC δ , 1:10000	Upstate, Lake Placid, NY, USA
Anti-PKC δ (mouse monoclonal), 1:1000	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-phospho MAPKAPK-2 (Thr 334), 1:1000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-MAPKAPK-2, 1:10000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Actin, 1:5000	Sigma, Taufkirchen
Anti-HSP 25, 1:10000	Stressgen, Victoria, Kanada

2. Antikörper und eingesetzte Verdünnung

Hersteller

Anti-mouse IgG, 1:10000	Dianova, Hamburg
Anti-rabbit IgG (H+L), 1:10000	Dianova, Hamburg
Anti-Biotin, HRP-linked Antibody, 1:10000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Strep-Tactin HRP-Conjugate, 1:10000	BioRad, München

Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

Hersteller

Rhodamin Phalloidin	Molecular Probes, Göttingen
Anti-phospho HSP 27 (Ser15)	Dianova, Hamburg
goat-anti-rabbit Alexa fluor 488	Molecular Probes, Göttingen

2.2 Methoden

2.2.1 In-vivo Versuche

Die vorliegende Studie wurde nach Zustimmung durch die Tierschutzkommission und Genehmigung durch den Regierungspräsidenten Düsseldorf durchgeführt.

Für die Versuche wurden männliche Wistar Ratten (200 bis 250 g) aus der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf bezogen.

a. Präparation der Versuchstiere

Nach der Einleitung der Narkose durch eine intraperitoneale Injektion von S-Ketamin (150 mg/kg, Ketanest, Pfizer, Karlsruhe), erfolgte die endotracheale Intubation (Tubus mit 2 mm Ø), der Anschluss an ein Kleintierbeatmungsgerät (7025 Rodent Ventilator, Föhr Medical Instruments, Seeheim) und Ventilation mit 25% O₂ in Luft. Die Beatmungsfrequenz betrug 60/min bei einem Tidalvolumen von 2 ml und einem PEEP von 2-3 cm H₂O. Die Versuchstiere wurden unter ständiger Kontrolle der Körperkerntemperatur mittels eines intraperitonealen Temperaturmessfühlers (GHT 1160, Greisinger electronic, Regenstauf) zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur (38°C) auf Wärmeplatten gelegt. Die Muskelrelaxation erfolgte durch einmalige Pancuronium Applikation (0,8 mg). Für die kontinuierliche Anästhesie wurde eine Infusion mit alpha-Chloralose (25 mg/kg/h) über die rechte Vena jugularis interna angeschlossen. Der arterielle Druck und die Herzfrequenz wurden während der gesamten Versuchszeit in der linken Arteria carotis communis gemessen und aufgezeichnet (PowerLab/8SP und Chart for Windows Software, AD Instruments, Castle Hill, Australia).

Nach einer lateralen Thorakotomie im vierten Interkostalraum links und Perikardiotomie wurde der Hauptast der linken Koronararterie mit einer 5-0 Prolene Naht mit atraumatischer Nadel (Ethicon, Johnson&Johnson, Norderstedt) umstochen. Die beiden Enden des Fadens wurden durch ein Plastikröhrchen (1 mm innerer Ø) gezogen und zunächst locker mit einer Klemme darin fixiert. Durch Zug an den Fäden dieses Okkluders konnte die Koronararterie später verschlossen werden (s. Abb. 2). Nach der chirurgischen Präparation des Herzens erfolgte zunächst eine 30 Minuten andauernde Adaptationsphase.

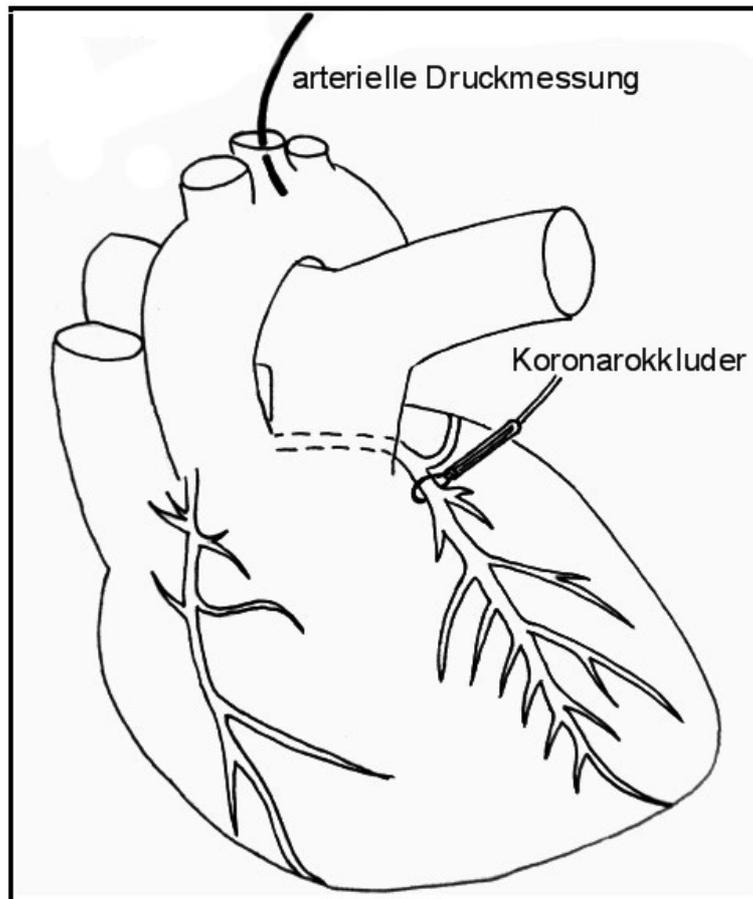


Abbildung 2 – Präparation der Herzen

b. Xenon Präkonditionierung und Infarktprotokoll

Die Xenon Präkonditionierung (Xe-PC) wurde durch dreimal fünf Minuten Beatmung mit 0,4 MAC Xenon (70% Xenon, 25% Sauerstoff, 5% Stickstoff) erreicht. Zwischen den Präkonditionierungsschritten wurde jeweils für fünf Minuten wieder mit 25% O₂ in Luft ventiliert. Nach der dritten Präkonditionierungsphase schloss sich eine Auswaschzeit von zehn Minuten Dauer an. Die Ratten der Kontrollgruppen blieben 45 Minuten lang unbehandelt und wurden die gesamte Zeit mit zwei Litern O₂-Gemisch pro Minute ventiliert. Zusätzlich wurde den Versuchstieren zehn Minuten vor der Präkonditionierung 0,3 mg/kg des PKC δ Inhibitors Rottlerin (Calbiochem, Bad Soden), je nach Körpergewicht in ca. 1 ml DMSO (Dimethylsulfoxide) gelöst, appliziert. Tiere der Kontrollgruppe erhielten 1 ml DMSO ohne Rottlerin.

Es wurden vier Gruppen mit je zehn Ratten gebildet. Die erste Gruppe, die Kontrollgruppe ohne Präkonditionierung (Kontrolle), blieb 45 Minuten unbehandelt. Die übrigen drei Gruppen erhielten als Behandlung entweder nach vorbeschriebenem Protokoll eine Xenon Präkonditionierung (Xe-PC), Xenon Präkonditionierung plus Rottlerin (Xe-PC+Rot) oder Rottlerin allein ohne Präkonditionierung (Rot).

Im Anschluss an das Präkonditionierungsprotokoll wurde eine Koronarokklusion von 25 Minuten Dauer durch Zuziehen des Okkluders erzeugt. Es zeigte sich eine deutliche zyanotische Verfärbung des abhängigen Myokardanteils. Nach Entfernung des Okkluders und 120 Minuten Reperfusion wurde der Thorax durch eine mediane Sternotomie eröffnet, das Herz von den großen Gefäßen getrennt und für eine Minute in physiologischer Kochsalzlösung entblutet (s. Abbildung 3).

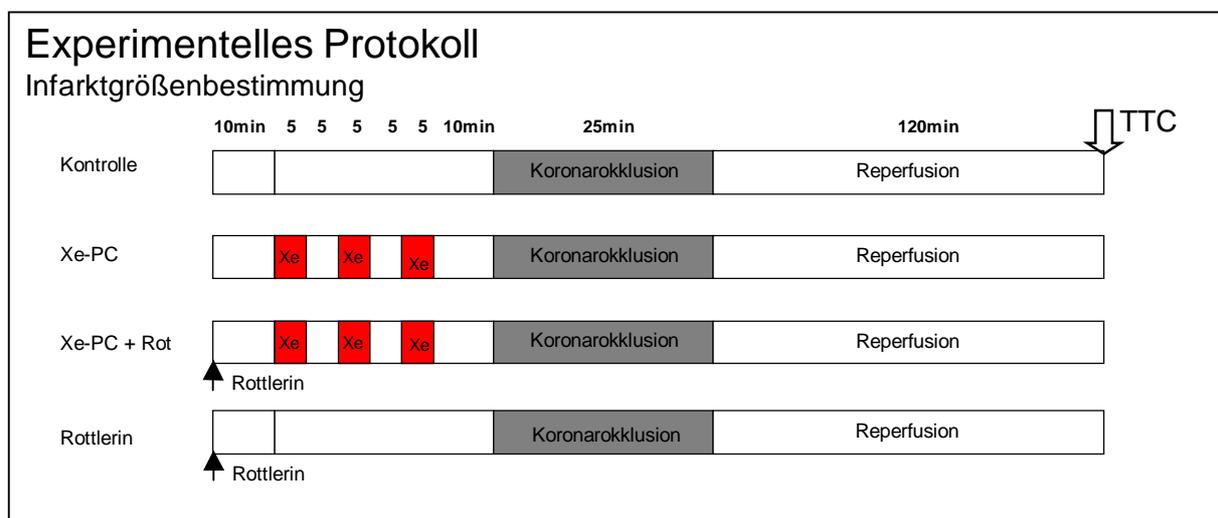


Abbildung 3 - Infarktprotokoll

Die Abbildung zeigt den Versuchsaufbau für die Experimente zur Infarktgrößenbestimmung. Xe-PC = Xenon Präkonditionierung, Xe-PC + Rot = Xenon Präkonditionierung plus Rottlerin Gabe (0,3 mg/kg), Xe = fünfminütige Xenon Inhalation (0,4 MAC). Nach Abschluss der 120 Minuten Reperfusion wurden die Herzen entnommen und mit Evansblue und TTC gefärbt.

c. Infarktgrößenbestimmung

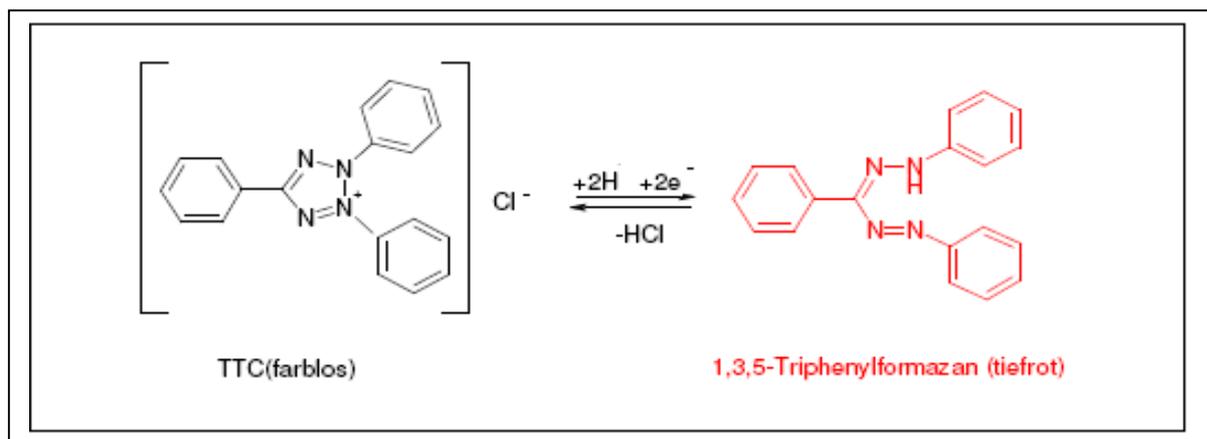
Die Infarktgrößenbestimmung erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurde durch eine Evansblue-Färbung das von der verschlossenen Koronararterie versorgte Risikogebiet (Area of Risk, AOR) bestimmt. In einem zweiten Schritt wurde dann durch eine TTC-Färbung im ischämischen Gebiet die Größe der Nekrose bestimmt. Diese Doppelfärbung ermöglichte eine Aussage über das Ausmaß der Schädigung in Relation zum Versorgungsgebiet der verschlossenen Koronararterie.

Evansblue-Färbung

Dazu wurde das Herz über die Aortenwurzel an eine modifizierte Langendorff-Apparatur angeschlossen. Der Faden des Okkluders wurde verknotet, um die Koronararterie erneut zu verschließen. Dann wurde die Evansblue-Farblösung über die Aorta in die verbliebenen offenen Koronararterien infundiert. Zum Auswaschen überschüssiger Färbelösung in den Gefäßen wurde im Anschluss noch einmal mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Herzen bei -80°C in einer 2 ml Spritze mit abgeschnittener Spitze eingefroren.

TTC-Färbung

Das Prinzip der TTC-Färbung beruht auf folgender Reaktion: Dehydrogenasen und mitochondriale Enzyme in vitalem Gewebe wandeln die farblose TTC-Lösung in den roten Farbstoff Formazan um. So kann vitales von nekrotischem Gewebe unterschieden werden. Nach dieser Färbung erscheint im Risikogebiet vitales Gewebe rot, nekrotisches Gewebe weiß.



Die Färbelösung wurde bei 37°C auf einen physiologischen pH von 7,4 eingestellt. Die eingefrorenen Herzen wurden durch millimeterweises Herausschieben aus der Spritze quer zur Herzachse in gleichmäßige Scheiben (Schichtdicke 1 mm) geschnitten. Die einzelnen Scheiben wurden in Färbeschälchen (12-well-plates) überführt. Pro Herzscheibe wurden $500\ \mu\text{l}$ TTC-Färbelösung (37°C) hinzugegeben und die Scheiben zehn Minuten darin bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Scheiben in 4% Formalin fixiert.

Auswertung

Zur Auswertung wurden die Herzscheiben eingescannt (CanonScan FB620P, Canon, Krefeld) und das Risikogebiet und die Infarktgröße mittels EDV-gestützter Planimetrie durch Sigma Scan Pro5 Software (SPSS Science Software; Chicago, IL, USA) berechnet. Die ermittelten Werte wurden anhand des Trockengewichtes der entsprechenden Herzscheibe korrigiert. Dazu wurden nach 24-stündigem Trocknen bei 45°C alle Scheiben gewogen (Analysenwaage LA230 S, Sartorius, Göttingen). Die Infarktgrößen wurden als Prozent des Risikogebiets ausgedrückt.

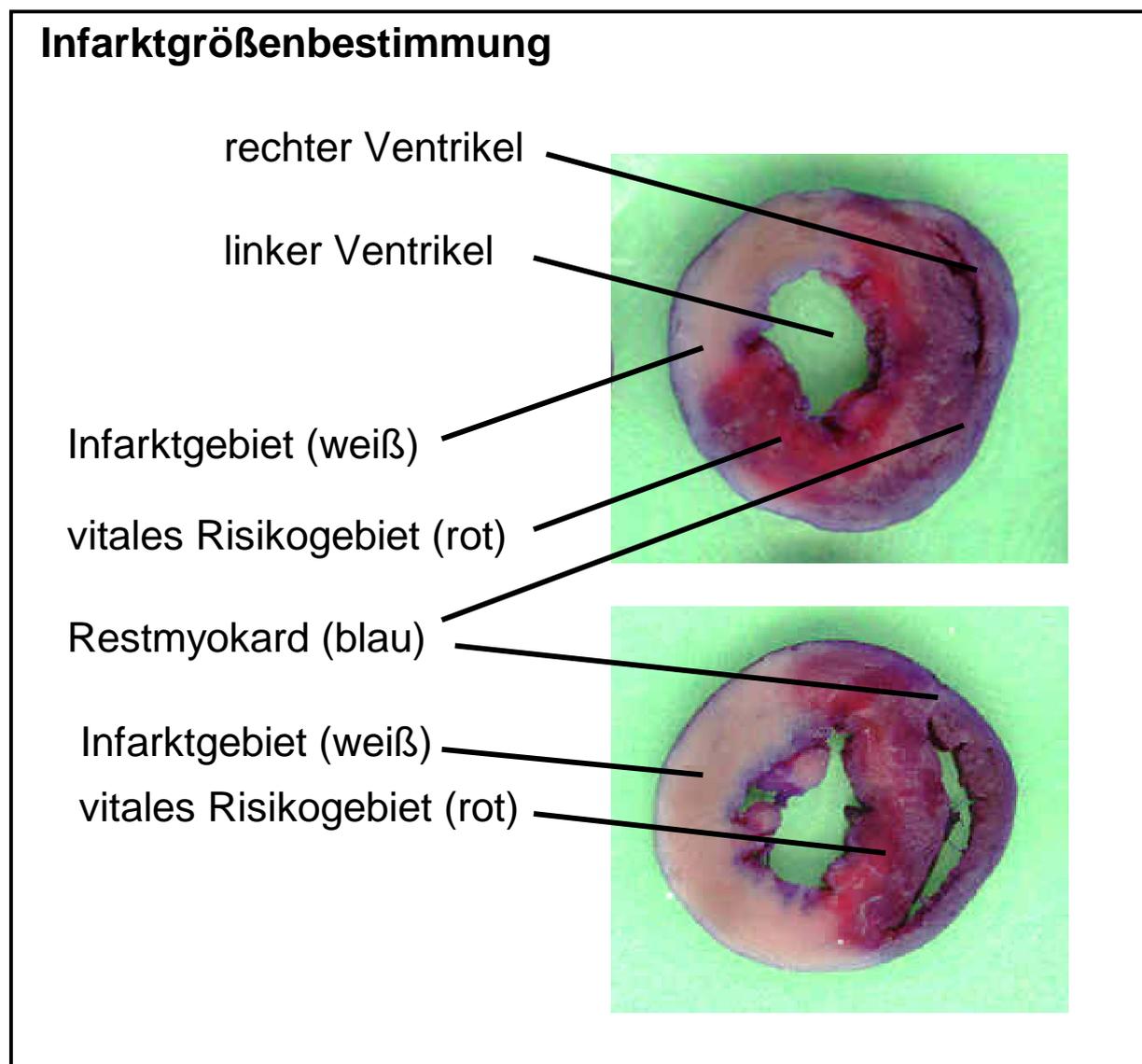


Abbildung 5 – Färbung der Herzscheiben zur Infarktgrößenbestimmung

Nach der Färbung der Herzscheiben wurden die Infarktgröße (weiß) und das Risikogebiet (weißes Infarktgebiet + rotes vitalen Risikogebiet) mittels Planimetrie bestimmt und unter Einbeziehung des Trockengewichtes der Herzscheiben die Infarktgrößen als Prozent des Risikogebietes berechnet.

d. Herzentnahme zur molekularbiologischen Untersuchung

Für die molekularbiologische Untersuchung der Proteine im Herzen wurden in nachfolgenden Versuchen weitere Herzen vor, während und direkt nach dem oben beschriebenen Präkonditionierungsprotokoll entnommen.

Untersuchung der Phosphorylierung der PKC α und δ

Für die Western Blot Untersuchung mittels phospho-spezifischer PKC α und PKC δ Antikörper wurden die Herzen zu fünf verschiedenen Zeitpunkten während des Präkonditionierungsprotokolls entnommen. Es wurden insgesamt 15 Herzen, pro Zeitpunkt drei Herzen, entnommen und untersucht.

Für die Kontrollgruppe ohne Xenon Präkonditionierung (Xenon 0) wurden die Herzen vor Beginn der Xenon Präkonditionierung entnommen. Für die weiteren Gruppen wurden die Herzen nach 15 Minuten und einmaliger Gabe von Xenon (Xenon 15), nach 25 Minuten und zweimaliger Gabe von Xenon (Xenon 25), nach 35 Minuten und dreimaliger Gabe von Xenon (Xenon 35) und nach 45 Minuten am Ende der Auswaschphase von 10 Minuten (Xenon 45) zur Untersuchung entnommen (s. Abbildung 6, S. 20).

Untersuchung der Phosphorylierung der MAPKAPK-2

Für die Western Blot Untersuchung mittels eines phospho-spezifischen MAPKAPK-2 Antikörpers wurden neun Gruppen mit je sechs Ratten gebildet. Die Versuchstiere erhielten entweder nach dem oben beschriebenen Protokoll dreimal fünf Minuten 0,4 MAC Xenon (Xe-PC) bzw. Isofluran (Iso-PC) zum Vergleich oder blieben für 45 Minuten unbehandelt (Kontrolle). Zusätzlich wurde in sechs weiteren Gruppen zu einer der vorgenannten Behandlungen entweder der PKC Inhibitor Calphostin C (CC, 0,1 mg/kg), der p38 MAPK Inhibitor SB203580 (SB, 1 mg/kg) (beide Sigma, Taufkirchen) oder NaCl 0,9% (1 ml) appliziert (s. Abbildung 6, S.20).

Untersuchung der Co-Lokalisation von Actin und HSP 27

Zur Untersuchung der Co-Lokalisation von Actin und HSP 27 mittels Immunfluoreszenz und Co-Immunpräzipitation wurden Herzen aus der Xe-PC Gruppe, der Iso-PC Gruppe und der Kontrollgruppe verwendet, die keine zusätzlichen Inhibitoren erhalten hatten.

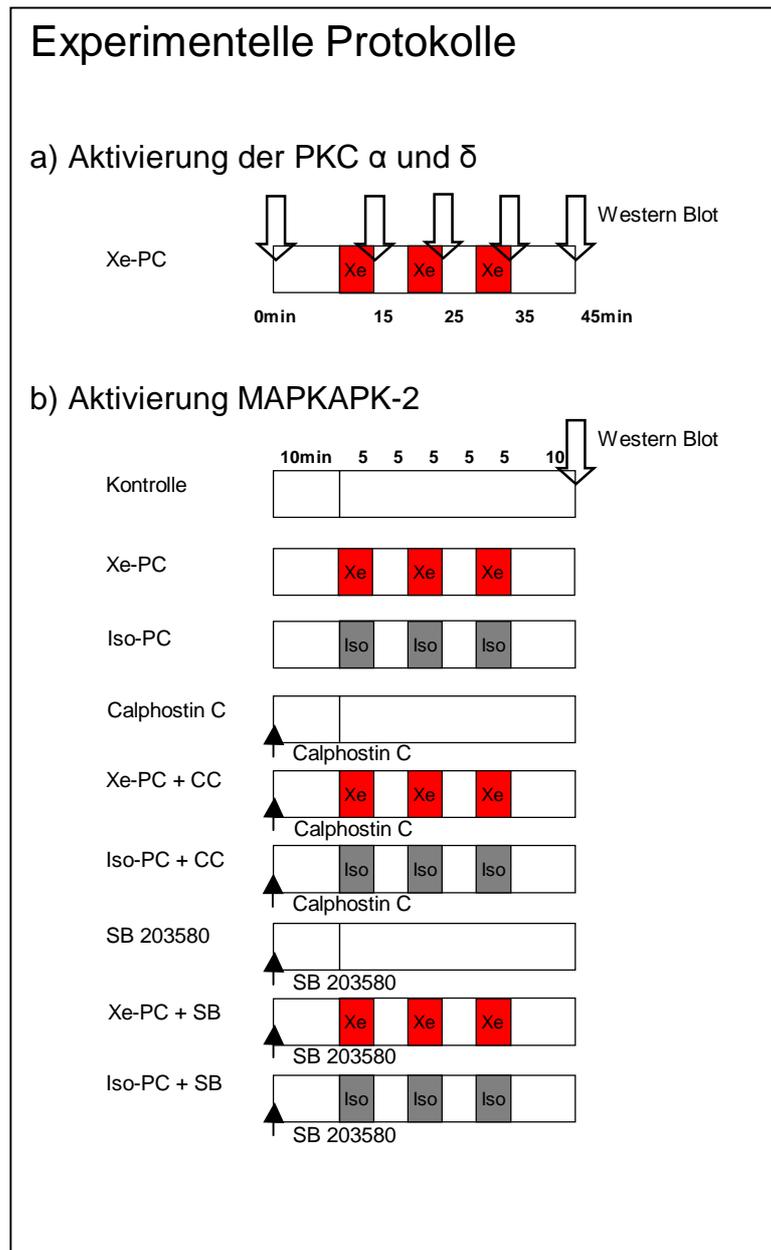


Abbildung 6 – Protokoll für die molekularbiologische Untersuchung

Die Abbildung zeigt das Protokoll für die Experimente zur molekularbiologischen Untersuchung der Herzen. Xe-PC = Xenon Präkonditionierung, Iso-PC = Isofluran Präkonditionierung, Xe-PC + CC = Xenon Präkonditionierung plus Calphostin C Gabe (0,1 mg/kg), Iso-PC + CC = Isofluran Präkonditionierung plus Calphostin C Gabe (0,1 mg/kg), Xe-PC + SB = Xenon Präkonditionierung plus SB 203580 Gabe (1 mg/kg), Iso-PC + SB = Isofluran Präkonditionierung plus SB 203580 Gabe (1 mg/kg), Xe = 5 minütige Xenon Inhalation (0,4 MAC), Iso = 5 minütige Isofluran Inhalation (0,4 MAC). Zu den durch Pfeile (\downarrow) markierten Zeitpunkten wurden die Herzen entnommen und für die Western Blot Analyse aufbereitet.

2.2.2 Proteinbiochemie

a. Probenaufarbeitung

Zur Aufarbeitung des Herzgewebes wurde eine Herzhälfte zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann in einem Metall Potter (Dick, Deizisau) mit zwei Hüben pulverisiert, in 4,5 ml Lysepuffer gegeben und im Eisbad für fünf Minuten unter Schütteln homogenisiert (Homogenisator, IKA, Staufen).

Zur getrennten Untersuchung von Zytosol, Membran und Kernfraktion wurden mittels differentieller Zentrifugation drei Zellfraktionen gewonnen. Dazu wurde das Homogenisat zunächst bei 1000 g, 4°C, zehn Minuten zentrifugiert. In diesem Schritt sedimentierte die Kern- und Membranfraktion. Der Überstand wurde zur Reinigung weiter zentrifugiert bei 16000 g, 4°C, 15 Minuten. Der letzte Überstand enthielt die Zytosolfraction und wurde bis zur Untersuchung aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Zur Auftrennung der Kern- und Membranfraktion wurde das Pellet aus dem ersten Zentrifugationsschritt mit Lysepuffer, dem 1% Triton hinzugefügt wurde, versetzt, gut gemischt und für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 15 Minuten mit 16000 g bei 4°C enthielt der Überstand die Membranfraktion. Das Pellet wurde erneut mit Triton-Lysepuffer resuspendiert, die gewonnenen Fraktionen aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

In den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurde, wenn nicht anders angegeben, die zytosolische Fraktion der gewonnenen Proben untersucht.

b. Lowry Proteinbestimmung

Zur Bestimmung und Angleichung der in den einzelnen Fraktionen und verschiedenen Proben enthaltenen Proteinmenge wurde in Anlehnung an die Methode nach Lowry [116] eine Proteinbestimmung durchgeführt.

5 µl der Probenlösung wurden mit 495 µl destilliertem Wasser 1:100 verdünnt. Von der verdünnten Probe wurden 100 µl mit 500 µl Lowry Reagenz versetzt und das Gemisch 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1:1 mit Aqua dest. frisch verdünntem 50 µl Folin-Chiocalteus-Phenolreagenz (Sigma, Taufkirchen) wurde erneut gut gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es zeigt sich eine Farbkomblexbildung proportional zu der enthaltenen Proteinmenge. Der

Farbumschlag wird hervorgerufen durch eine Reaktion der Proteine mit der alkalischen Kupferlösung und die folgende Reduktion des Folin-Chiocalteus-Phenolreagenz durch den Protein-Kupfer-Komplex. Mit einem Plate Reader wurde die Extinktion bei 740 nm (μ Quant, BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA) gemessen. Die Berechnung der Konzentration wurde mit der KC4 Software durch Bezugnahme auf eine jeweils parallel vermessene Eichreihe (0-100 μ g/ml BSA) durchgeführt. Jede Proteinbestimmung wurde als Doppelbestimmung angesetzt. Nach der Proteinbestimmung wurden die Proben mit Lysepuffer auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt.

c. Western Blot

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für einen immunologischen Nachweis der zu untersuchenden Proteine erfolgte zunächst die Auftrennung des Proteingemisches aus dem Rattenmyokard mittels einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese. Angewendet wurde eine Methode modifiziert nach Laemmli [117].

In der vertikalen Elektrophorese werden die Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Proteinoligomere werden dabei durch die Spaltung der Disulfidbrücken mit 2- β -Mercaptoethanol in ihre Monomere zerlegt. Die Eigenladung dieser Monomere wird dann durch SDS (Sodium-Dodecylsulfat) überdeckt und ermöglicht so die größenabhängige Auftrennung im elektrischen Feld. SDS lagert sich dabei entlang der Aminosäurekette der Proteine an und bildet einen SDS-Protein-Komplex, dessen Oberfläche nach außen gerichtete negative Sulfatgruppen aufweist. Somit wird die Eigenladung des Proteins im Vergleich zur negativen Gesamtladung des SDS-Protein-Komplexes vernachlässigbar. Die Laufgeschwindigkeit im Gel ist somit umgekehrt proportional zum Molekulargewicht der Proteinmonomere.

Ein 10% Polyacrylamidgel wurde für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine mit einem 6% Sammelgel überschichtet. Im großporigen Sammelgel mit niedrigerem pH konzentrieren sich die Proteinmonomere entsprechend ihrer Größe, so dass sie in etwa den gleichen Startpunkt für die Wanderung im elektrischen Feld haben. Dies erhöht die Schärfe der entstehenden Banden.

SDS-PAGE für die Untersuchung der MAPKAPK-2 und der Co-Immunpräzipitation

Zur Untersuchung der MAPKAPK-2 und für die Co-Immunpräzipitation wurde die kleine Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN 3 cell, BioRad verwendet. Die Gele hatten eine Dicke von 1,5 mm und eine Lauflänge von 6 cm. Die Proben wurden zu gleichen Teilen mit Loading Buffer gemischt und vor dem Auftragen auf das Gel fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Es wurden jeweils 15 µl Proben/Puffer-Gemisch aufgetragen. In der ersten Tasche links wurde jeweils ein Proteinstandardgemisch (Biotinylated Marker Protein, Cell Signaling, Beverly, MA USA) aufgetragen, welches als Größenstandard bei der Auswertung diente. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke von 50 mA für 90 Minuten. Nachdem das Bromphenolblau des zweifach SDS Loading Buffers das Gel durchwandert hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt, das Gel zwischen den Platten entfernt, in Transferpuffer äquilibriert und die aufgetrennten Proteine im Nassblot-Verfahren auf die PVDF-Membran übertragen.

SDS-PAGE für die Untersuchung der PKC α und δ

Zur Untersuchung der PKC Isoform α und δ wurde die Gelelektrophorese in der großen Elektrophoresekammer Protean II xi Cell, BioRad durchgeführt. Die Gele hatten eine Dicke von 1,5 mm und eine Lauflänge von 13 cm. Die längere Laufstrecke war erforderlich, da die hier untersuchten PKC Isoformen mit einer Größe von ca. 80 kDa bei kürzerer Laufstrecke aufgrund unspezifischer Banden nicht eindeutig zu quantifizieren waren. Die Proben wurden zu gleichen Teilen mit Loading Buffer gemischt und vor dem Auftragen auf das Gel fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Es wurden jeweils 60 µl Proben/Puffer-Gemisch aufgetragen. In der ersten Tasche links wurde jeweils ein Proteinstandardgemisch (Precision Plus Protein, BioRad) aufgetragen, welches als Größenstandard bei der Auswertung diente. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke von 100 mA bei maximal 400 V für ca. drei Stunden unter Wasserkühlung und ständiger Durchmischung des Laufpuffers mittels Magnetrührer. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde ein Elektrotransfer angeschlossen.

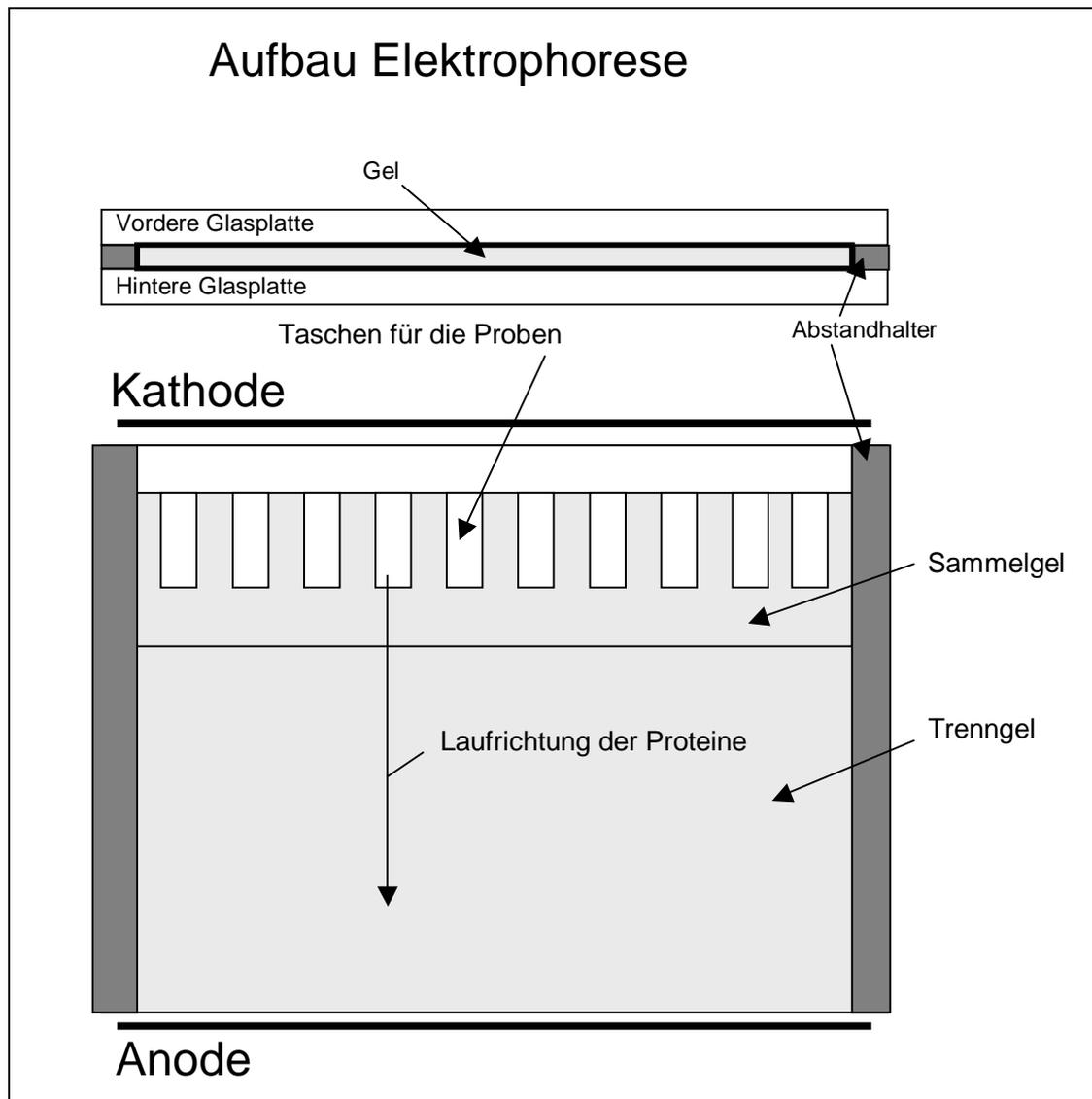


Abbildung 7 – Aufbau Elektrophorese

Elektrotransfer

Da die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im Gel nicht für eine immunologische Untersuchung zugänglich sind, wurden sie durch Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P Transfer Membran, Milipore, Billerica, USA) übertragen, dort sind sie dann für eine nachfolgende Immunodetektion immobilisiert.

Für die Untersuchung der MAPKAPK-2 und der Co-Immunpräzipitation wurde die Transferkammer Mini-Trans-Blot der Firma BioRad benutzt. Für die Untersuchung der PKC δ und α wurde die Transferkammer Trans Blot der Firma BioRad benutzt. Das verwendete Verfahren ist die Nass-Blot-Technik.

Für den Transfer wurden pro Gel zwei Fiberpads und sechs Filterpapiere sowie die zugeschnittene, in Methanol getränkte Membran für mindestens zehn Minuten in kaltem Transferpuffer eingelegt. Nach der SDS-PAGE wurden die Gele von den Glasplatten gelöst und das Sammelgel abgetrennt. Zur Äquilibration wurden sie in Transferpuffer überführt. Auf die Kathodenseite der Gelkassette wurden ein puffergetränktes Fiberpad und drei puffergetränkte Filterpapiere blasenfrei übereinander platziert. Darauf wurde das Gel gelegt, welches luftblasenfrei mit der Membran bedeckt wurde. Darüber wurden wieder ein puffergetränktes Fiberpad und drei puffergetränkte Filterpapiere blasenfrei platziert. Die Halterung wurde geschlossen und die Gelkassette in die Transferkammer eingesetzt.

Für die Untersuchung der MAPKAPK-2 und der Co-Immünpräzipitation wurde die kleine Transferkammer mit 450 ml kaltem Transferpuffer gefüllt, ein Rührfisch dazugegeben und ein Kühlelement eingesetzt (Biolce Cooling Unit, BioRad). Der Elektrottransfer wurde für eine Stunden bei konstanter Stromstärke von 180 mA durchgeführt. Für die Untersuchung der PKC α und δ wurde die große Transferkammer mit 2,5 l kaltem Transferpuffer gefüllt, ein Rührfisch eingelegt und die Kammer an eine Wasserkühlung angeschlossen. Der Elektrottransfer wurde für vier Stunden bei konstanter Stromstärke von 320 mA durchgeführt.

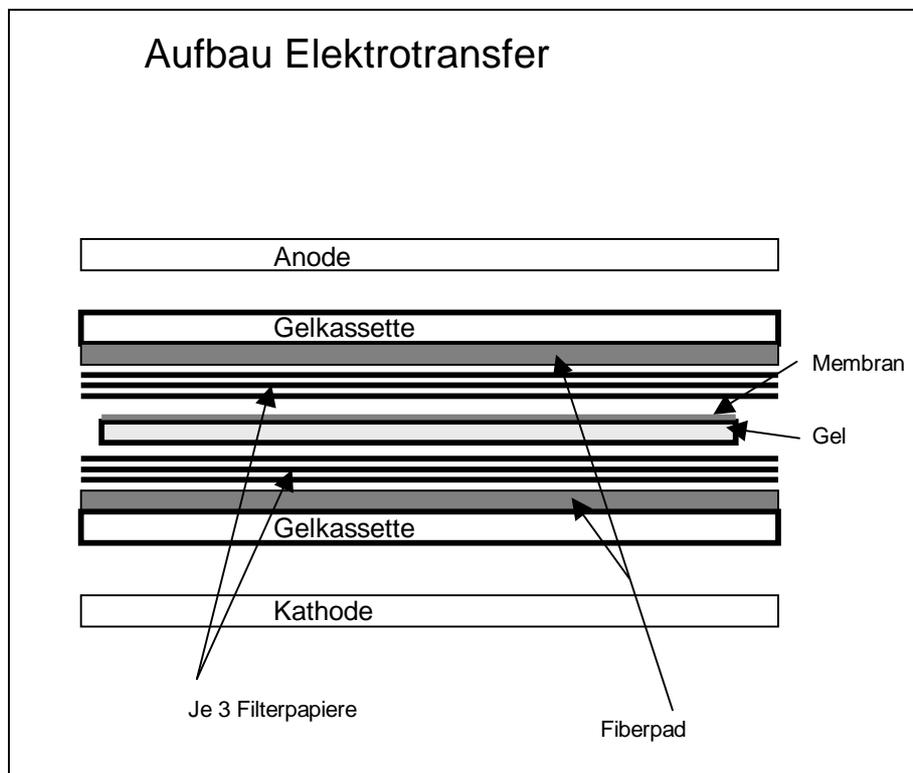


Abbildung 8 – Aufbau Elektrotransfer

Coomassie Färbung

Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen und der Elektrophorese wurden die Gele nach dem Elektrotransfer mit Coomassie Blue gefärbt. Dieser Farbstoff koppelt sich an spezifische Aminosäuren der Proteine und erlaubt somit nach Entfärbung des Gels die Visualisierung der Proteinbanden.

Dazu wurden nach dem Elektrotransfer die Gelkassetten geöffnet und die Gele für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter vorsichtigem Schütteln in ein Färbebad gelegt. Zur Eliminierung unspezifischer Anfärbungen wurde das Gel danach zweimal für eine Stunde in Entfärbelösung und danach über Nacht in Wasser entfärbt. Dadurch zeigte sich eine deutliche Kontrastierung der Proteinbanden.

Immunoblot

Zur Untersuchung der Membranen auf die verschiedenen Proteine wurde ein Immunoblot mit spezifischen Antikörpern durchgeführt.

Dazu wurden die Membranen im Anschluss an den Elektrotransfer für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln in einer Trockenmilchlösung (5% Blocking Lösung) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper über Nacht bei 4°C unter ständigem Schütteln. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde ein zweiter gegen den primären Antikörper gerichteter HRP (horseradish-peroxidase)-gekoppelter Antikörper eingesetzt, der mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden konnte. Dazu wurden die Membranen zunächst drei mal fünf Minuten in kaltem Waschpuffer (TPBS) gewaschen und dann für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem passenden zweiten Antikörper inkubiert. Dem zweiten Antikörper wurde jeweils der spezifische Antikörper für die Detektion der Markerproteine zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die Membranen wieder drei mal fünf Minuten in kaltem Waschpuffer (TPBS) gewaschen.

Für die Untersuchung der Aktivierung durch Phosphorylierung wurde zunächst ein phospho-spezifischer Antikörper eingesetzt und derselbe Blot dann in einer Gegenprobe auf die Gesamtmenge des gesuchten Protein untersucht. Aus diesen beiden Ergebnissen wurde dann der Quotient als Maß für die Aktivierung gebildet.

d. Detektion der Western Blots

Um die Banden detektieren zu können, wurde die Chemilumineszenz durch ECL-Reagenz (Santa Cruz, Santa Cruz, USA) sichtbar gemacht und mit Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, Amersham) detektiert.

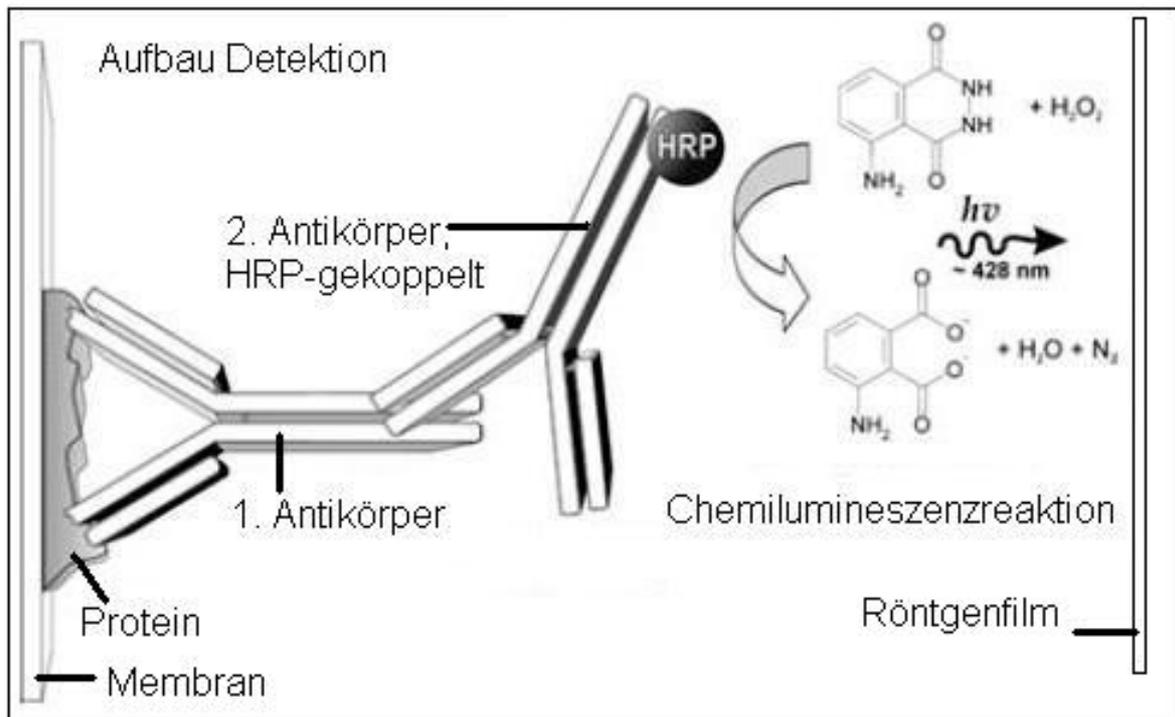


Abbildung 9 – Aufbau Detektion

Das Schema zeigt wie das gesuchte Protein auf der Membran durch den spezifischen 1. Antikörper gebunden wird. Der 2. Antikörper richtet sich gegen den 1. Antikörper und ist an die Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelt, die nach Zugabe von Luminol und Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol katalysiert, bei der Licht der Wellenlänge 428nm ausgesendet wird.

Modifiziert nach: Artikel „Peroxidase“ in: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 25. März 2006, 09:03 UTC. URL: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Peroxidase&oldid=14998831>

e. Auswertung der Western Blots

Die Auswertung der Blots erfolgte durch computerunterstützte Quantifizierung mit einer Kodak Image Station (Eastman Kodak Comp., Rochester, NY, USA). Die Ergebnisse wurden als Quotient aus der mittleren Lichtintensität der Banden der phosphorylierten Form des gesuchten Proteins und der Gesamtmenge des gesuchten Proteins bzw. des Actin als Standard ausgedrückt. Die mittlere Lichtintensität in der Kontrollgruppe wurde zur Veranschaulichung der Darstellung gleich eins gesetzt.

f. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde im BMFZ Düsseldorf durchgeführt. Dazu wurden die Proben verdaut, entsalzen und gemessen. Die Identität des unbekanntes Proteins wurde anhand des Fragmentierungsmusters mittels einer Wahrscheinlichkeitsbasierten Datenbanksuche unter Inanspruchnahme der Mascot-Suchmaschine und der NCBI Datenbank bestimmt

g. Immunfluoreszenzuntersuchung

Zum Nachweis der Co-Lokalisation von Actin und HSP 27 wurde eine Immunfluoreszenzfärbung als Doppelfärbung von Actin und phosphoryliertem HSP 27 vorgenommen. Es wurden 0,5 µm Kryoschnitte der Rattenherzen mit einem Kryo-Microtom (Leica, Wetzlar) erstellt und auf Objektträgern (Superfrost, Medite Medizintechnik, Burgdorf) weiterbehandelt.

Die luftgetrockneten Schnitte wurden mit Zamboni Reagenz zehn Minuten fixiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS+ für zwei Stunden mit 10% goat serum (Sigma, Taufkirchen) geblockt. Nach erneutem Waschen mit PBS+ wurden die Gewebeschnitte 30 Minuten bei 4°C mit Rhodamin Phalloidin (Molecular Probes, Göttingen) 1:40 verdünnt in einer Feuchtkammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut mit PBS+ gewaschen und lichtgeschützt weiterbehandelt. Zunächst erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit Anti-pHSP 27 (Dianova, Hamburg) 1:100 verdünnt in PBS, dann nach erneutem Waschen mit PBS+ eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit goat-anti-rabbit Alexa fluor 488 (Molecular Probes, Göttingen) 1:200 verdünnt in PBS. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden eingebettet und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica-DML, Wetzlar) aufgenommen. Die verwendeten Wellenlängen sind:

für Rhodamin Phalloidin: Anregung: 554 nm, Emission: 573 nm,

für Alexa Fluor: Anregung: 497 nm, Emission: 519 nm.

Der Vergrößerungsfaktor betrug 630.

h. Co-Immunpräzipitation

Für die Co-Immunpräzipitation von Actin und HSP 27 wurden die aufgearbeiteten Proben der partikulären Fraktion nach Proteinbestimmung mittels der Methode nach Lowry [84] zunächst einer Immunpräzipitation von Actin unterzogen. Später wurde dann im Western Blot untersucht, ob zusammen mit Actin auch HSP 27 präzipitiert wurde.

Immunpräzipitation ist eine Methode mit der ein gesuchtes Protein aus einer Proteinmischung gefällt werden kann. Dabei verwendet man einen spezifischen Antikörper und eine Matrix, die diesen Antikörper bindet. Als Matrix wird Protein-A- oder Protein-G-Agarose verwendet. Das Matrix-gebundene Protein kann dann durch Zentrifugation separiert werden. Dazu wurde ein Protein G Immunoprecipitation Kit (Sigma, Taufkirchen) verwendet. Die Proben (je 200 µl mit 1 mg/ml Proteinkonzentration) wurden nach zugehörigem Protokoll über Nacht mit Anti-Actin (Sigma, Taufkirchen) und Immunpräzipitationspuffer (IP-Puffer enthält EGTA, NaF, Na₃VO₄ und frisch zugegebenen Protease Inhibitor Mix (Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin)) in speziellen Säulen unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Dann wurde die vorbereiteten Protein-G-Agarose Kügelchen hinzugefügt und erneut über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Säule wurde 15-30 Sekunden bei 12000 g zentrifugiert und die Kügelchen mehrfach mit IP-Puffer gewaschen. Das verbleibende Pellet wurde mit IP-Puffer resuspendiert. Nach fünf Minuten erhitzen bei 95°C konnten die Kügelchen mit dem gebundenen Protein aus der Säule heraus zentrifugiert (12000 g für zwei Minuten) und für einen Western Blot verwendet werden.

Im Anschluss erfolgten SDS-PAGE und Immunoblot wie oben beschrieben zur Untersuchung auf Actin und HSP 27.

2.2.3 Statistische Auswertung

Für die Untersuchung des Einflusses der PKC δ Blockade auf die Infarktgrößen und Untersuchung der Phosphorylierung der PKC α :

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels des Student's t-Test mit Welch Modifikation gefolgt von der Bonferroni-Korrektur für den Mehrfachvergleich (Graph Pad Prism Version 3.0) analysiert. Wenn $p < 0.05$ wurden die Unterschiede als statistisch signifikant definiert.

Für die Untersuchung der Phosphorylierung der MAPKAPK-2 und der Co-Immunpräzipitation:

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des One way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für den Mehrfachvergleich (Graph Pad Prism Version 3.0) analysiert. Wenn $p < 0.05$ wurden die Unterschiede als statistisch signifikant definiert.

3. Ergebnisse

3.1 In-vivo Versuche

3.1.1 Gruppengröße

Für die Infarktgrößenbestimmung wurden insgesamt 40 Ratten instrumentiert und mit bzw. ohne Vorbehandlung durch Präkonditionierung und/oder Rottlerin Applikation einer regionalen Myokardischämie unterzogen. Dabei entfielen auf jede der vier Gruppen (Kontrolle, Xenon Präkonditionierung, Xenon Präkonditionierung plus Rottlerin und Rottlerin allein) zehn Versuchstiere.

3.1.2 Messdaten während des Experiments

Die Aufzeichnung des arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz während der Experimente zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen (s. Abb. 10). Die Körpertemperatur lag bei allen Versuchstieren im Verlauf des Experiments konstant bei $38^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

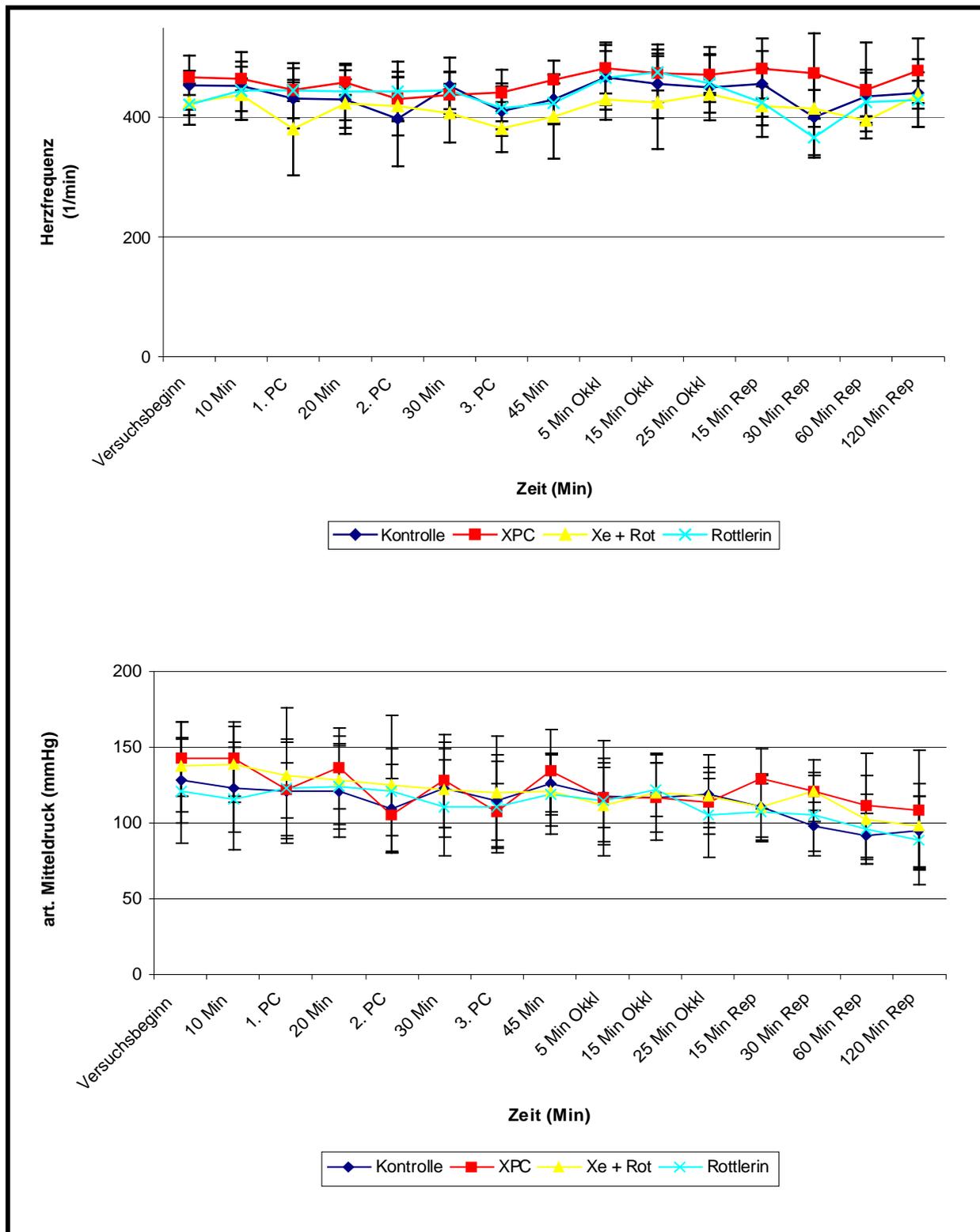


Abbildung 10 – Hämodynamik

Die Abbildung zeigt die Herzfrequenz (oberes Diagramm) und den arteriellen Mitteldruck in der A. carotis com. (unteres Diagramm) für die vier verschiedenen Versuchsgruppen im Verlauf des Experiments (Daten sind Mittelwert \pm Standardabweichung). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

PC = Präkonditionierung, Okkl = Koronarokklusion, Rep = Reperfusion

XPC = Xenon Präkonditionierung, Xe + Rot = Xenon Präkonditionierung + Rottlerin

3.1.3 Infarktgrößenbestimmung

Die PKC gilt als ein Schlüsselenzym in der Vermittlung der Kardioprotektion durch Präkonditionierung. Mittels des in-vivo Rattenmodells einer regionalen Myokardischämie sollte die funktionelle Rolle der PKC δ in der Xenon Präkonditionierung des Herzens untersucht werden. Dazu wurden die resultierenden Infarktgrößen nach Xenon Präkonditionierung mit und ohne PKC δ Hemmung durch Rottlerin gemessen und verglichen.

Die Bestimmung der Infarktgröße mittels TTC-Färbung ergab eine signifikante Reduktion der Infarktgröße durch die Xenon Präkonditionierung (s. Abb. 11). Die Infarktgröße nach 25 Minuten regionaler Ischämie betrug bei den Herzen der Kontrollgruppe ohne Präkonditionierung $50 \pm 15\%$ des Risikogebietes (Mittelwert \pm Standardabweichung). Die Infarktgröße bei den Tieren mit Xenon Präkonditionierung lag mit $30 \pm 10\%$ des Risikogebietes signifikant niedriger ($p < 0.05$ vs. Kontrolle).

Rottlerin, der Inhibitor der PKC δ , konnte diesen kardioprotektiven Effekt der Xenon Präkonditionierung nicht aufheben. Die Infarktgrößenbestimmung nach 25 Minuten regionaler Ischämie ergab bei den Herzen mit Rottlerin und Xenon Präkonditionierung eine Infarktgröße von $33 \pm 12\%$ des Risikogebietes ($p > 0.05$ vs. Xenon Präkonditionierung). Die Applikation des Inhibitors Rottlerin allein ohne Präkonditionierung hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße. Die Messung ergab für die Infarktgröße in der Versuchsgruppe mit Rottlerin allein $50 \pm 10\%$ des Risikogebietes ($p > 0.05$ vs. Kontrolle), siehe Abbildung 11.

Durch die in-vivo Versuche konnte gezeigt werden: PKC δ Hemmung mittels Rottlerin Applikation blockiert **nicht** die durch Xenon Präkonditionierung induzierte Infarktgrößen Reduktion am Rattenherzen.

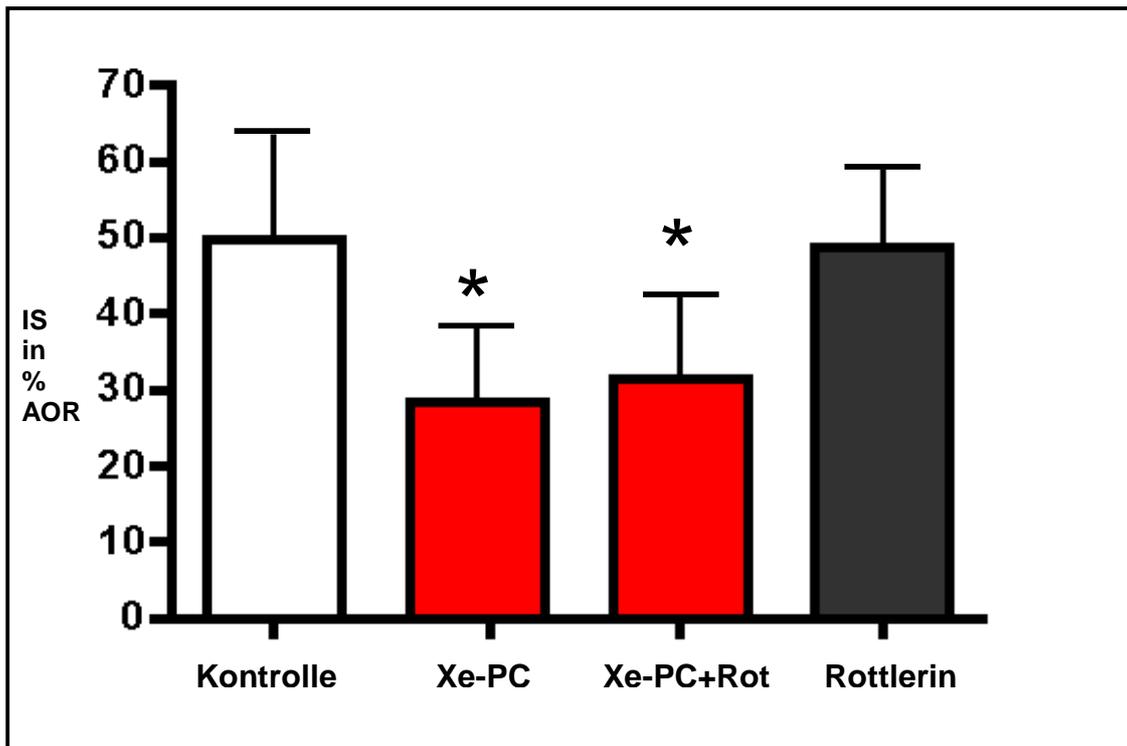


Abbildung 11 – Infarktgrößen nach Xenon Präkonditionierung

Das Histogramm zeigt die Ergebnisse der Infarktgrößenbestimmung von Kontrollgruppe (Kontrolle), Xenon Präkonditionierung (Xe-PC), Xenon Präkonditionierung plus Rottlerin (Xe-PC+Rot) und Rottlerin allein (Rottlerin), jede Gruppe n=10. Die Infarktgrößen sind in Prozent des Risikogebietes (IS in % AOR) ausgedrückt (Mittelwert±Standardabweichung).

* p<0.05 vs. Kontrollgruppe.

3.2 Proteinbiochemie

3.2.1 Gruppengrößen

Für die Western Blot Untersuchungen wurden insgesamt 69 Ratten instrumentiert und die Herzen nach Ablauf der verschiedenen Behandlungen entnommen.

Für die Untersuchung mittels phospho-spezifischer PKC α und δ Antikörper wurden die Herzen zu verschiedenen Zeitpunkten während des Präkonditionierungsprotokolls entnommen. Dabei entfielen auf jede der fünf Versuchsgruppen (Kontrolle, Xenon 15, Xenon 25, Xenon 35 und Xenon 45) drei Versuchstiere.

Für die Analyse mittels eines phospho-spezifischen MAPKAPK-2 Antikörpers wurden neun Gruppen (Kontrolle, Xenon Präkonditionierung, Isofluran Präkonditionierung, Xenon Präkonditionierung plus Calphostin C, Isofluran Präkonditionierung plus Calphostin C, Xenon Präkonditionierung plus SB 203580, Isofluran Präkonditionierung plus SB 203580, Calphostin C allein und SB 203580 allein) mit je sechs Versuchstieren gebildet. Neben dem Edelgas Xenon wurde hier auch das volatile Standardanästhetikum Isofluran zum Vergleich untersucht.

3.2.2 PKC δ Phosphorylierung im Zeitverlauf/Translokation

Eine wichtige Isoform der PKC ist die PKC δ , deren Rolle in der Präkonditionierung bisher nicht vollkommen geklärt ist. Mittels Herzentnahme vor, während und nach Xenon Präkonditionierung und anschließender Western Blot Analyse mit phospho-spezifischen PKC δ Antikörpern sollte dieser Frage nachgegangen werden.

Diese Untersuchung der Phosphorylierung und Translokation der PKC δ im Zeitverlauf konnte jedoch leider nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Trotz mehrfachen Änderungen des experimentellen Protokolls des Western Blots gelang es nicht, die PKC δ Bande (78kDa) so eindeutig darzustellen, dass eine sichere Quantifizierung möglich war. Eine unspezifische Bande - hervorgerufen durch eine unspezifische Bindung des zweiten Antikörpers an ein Protein ähnlicher Größe wie die gesuchte PKC δ - verhinderte die Detektion des gesuchten Proteins. Die beiden Banden ließen sich trotz Wechsel des Antikörpers von polyklonal zu monoklonal, Veränderung des PAA-Anteils in den Gelen oder Verlängerung der Laufstrecke im Western Blot durch Verwendung längerer Laufzeiten bzw. größerer Apparaturen nicht weit genug von-

einander trennen. Das Protein in der störenden unspezifischen Bande konnte in weiterführenden Experimenten durch eine Untersuchung im Massenspektrometer mit einer Sequenzabdeckung von 14,1 % und einem Score von 51 als Serumalbumin aus *Rattus norvegicus* (66 kDa) bestimmt werden. Versuche, mit einem kommerziellen „Albumin Removal Kit“ (Calbiochem, Bad Soden) das Albumin durch Säulenfiltration aus der zu untersuchenden Probe zu entfernen, gelangen nicht. Die Albumin Bande war weiterhin detektierbar, die vorhandenen Proteine wurden jedoch alle in ihrer Konzentration erniedrigt, so dass sie insgesamt deutlich schwächer zur Darstellung kamen.

Die Rolle der PKC δ in der Xenon Präkonditionierung konnte daher in dieser Arbeit nicht im Western Blot beschrieben werden.

3.2.3 Regulation der PKC α Phosphorylierung im Zeitverlauf

Eine weitere wichtige Isoform der PKC ist die PKC α , deren Bedeutung für die Präkonditionierung bislang nicht hinreichend geklärt ist. Daher sollte eine mögliche Aktivierung der PKC α nach Xenon Präkonditionierung mittels Herzentnahme zu vier verschiedenen Zeitpunkten innerhalb des Präkonditionierungsprotokolls und anschließendem Western Blot untersucht werden.

In der Western Blot Analyse der zytosolischen Fraktion konnte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine signifikante Aktivierung der PKC Isoform α nachgewiesen werden. Die Veränderungen in der Phosphorylierung der PKC α wurden als Verhältnis der Intensitäten der Banden der phosphorylierten PKC α (pPKC α , Abbildung 12, oberer Western Blot) und der gesamten PKC α (PKC α , Abbildung 12, unterer Western Blot) ausgedrückt. Die mittlere Lichtintensität (average light intensity, AVI) der Kontrollgruppe wurde zur Veranschaulichung der Darstellung gleich eins gesetzt. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe (7.5 ± 1.0 AVI, Mittelwert \pm Standardabweichung) zeigte sich für keinen der vier untersuchten Zeitpunkte während bzw. nach Xenon Präkonditionierung eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung (Xenon 15: 8.5 ± 2.0 AVI, Xenon 25: 9.5 ± 2.5 AVI, Xenon 35: 9.5 ± 2.0 AVI und Xenon 45: 9.0 ± 1.0 AVI, alle nicht signifikant vs. Kontrolle) (siehe Abbildung 12).

Dieses Ergebnis spricht gegen eine Beteiligung der PKC α an der Signalkaskade, die zur Kardioprotektion durch die Xenon Präkonditionierung führt.

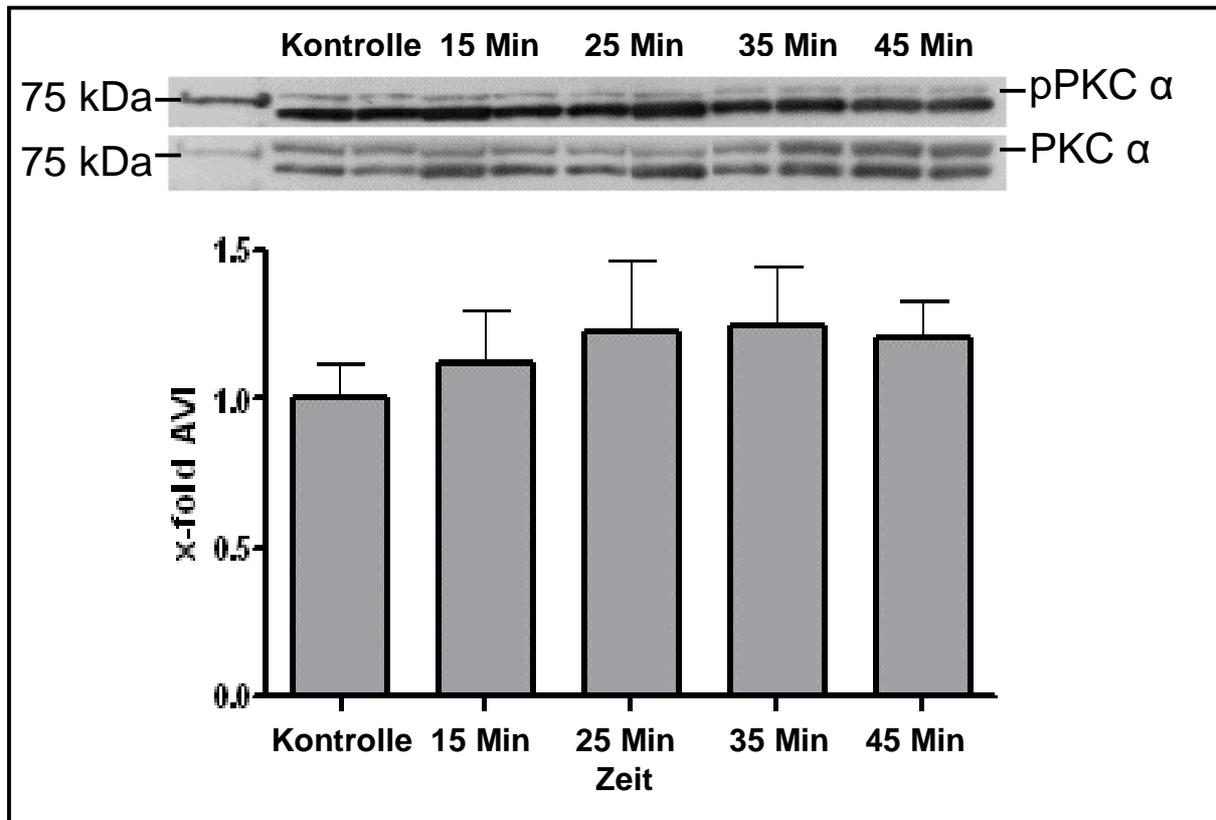


Abbildung 12 - Phosphorylierung der PKC α während Xenon Präkonditionierung

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot der zytosolischen Fraktion der zu den unterschiedlichen Zeitpunkten während des Präkonditionierungsprotokolls entnommenen Herzen, je $n=3$. Pro Zeitpunkt wurden zwei Proben aufgetragen. Die obere Tafel zeigt die phosphorylierte Form der PKC α (pPKC α), die untere Tafel die Gesamtmenge PKC α (PKC α). Das Histogramm zeigt die Ergebnisse der Densitometrie als x-fache mittlere Lichtintensität (average light intensity, AVI). Die Daten sind als Verhältnis der Intensitäten der Banden der phosphorylierten PKC α (pPKC α) und der gesamten PKC α (PKC α) ausgedrückt (Mittelwert \pm Standardabweichung).

3.2.4 Regulation der MAPKAPK-2 Phosphorylierung

Unterhalb der PKC ist das wichtigste Bindeglied zwischen der p38 MAPK und dem Zytoskelett die MAPKAPK-2. Die Phosphorylierung der MAPKAPK-2 in der zytosolischen Fraktion nach Xenon bzw. Isofluran Präkonditionierung wurde im Western Blot untersucht.

Die Veränderungen in der Phosphorylierung der MAPKAPK-2 wurden als Verhältnis der Intensitäten der Banden der phosphorylierten MAPKAPK-2 (pMAPKAPK-2, Abbildung 13, oberer Western Blot) und der gesamten MAPKAPK-2 (MAPKAPK-2, Abbildung 13, unterer Western Blot) ausgedrückt. Die mittlere Lichtintensität (average light intensity, AVI) der Kontrollgruppe wurde auch hier zur Veranschaulichung der Darstellung gleich eins gesetzt.

Es zeigte sich sowohl nach Xenon als auch nach Isofluran Präkonditionierung eine signifikant gegenüber den unbehandelten Kontrollen erhöhte Phosphorylierung der MAPKAPK-2 (Xenon: 1.6 ± 0.1 AVI, Isofluran: 1.5 ± 0.1 AVI vs. 1.0 ± 0.1 AVI in Kontrollen, $p < 0.05$, Mittelwert \pm Standardfehler). Die Hemmung der PKC und p38 MAPK durch Calphostin C bzw. SB203580 hob diesen Effekt der verstärkten Phosphorylierung auf (Xe-PC+CC: 0.9 ± 0.1 AVI, Iso-PC+CC: 0.9 ± 0.1 AVI, Xe-PC+SB: 1.1 ± 0.1 AVI, Iso-PC+SB: 1.1 ± 0.1 AVI, $p < 0.05$ vs. Xenon bzw. Isofluran). Die Inhibitoren allein hatten keinen Effekt auf die MAPKAPK-2 Phosphorylierung (Calphostin C: 1.1 ± 0.1 und SB203580: 1.2 ± 0.1 , beide $p > 0.05$ vs. Kontrolle). Vergleiche hierzu Abbildung 13. Das Ergebnis dieser Untersuchung spricht dafür, dass die MAPKAPK-2 an der Signalkaskade, die zur Kardioprotektion durch die Xenon Präkonditionierung führt, beteiligt ist und unterhalb der beiden Enzyme PKC und p38 MAPK lokalisiert ist.

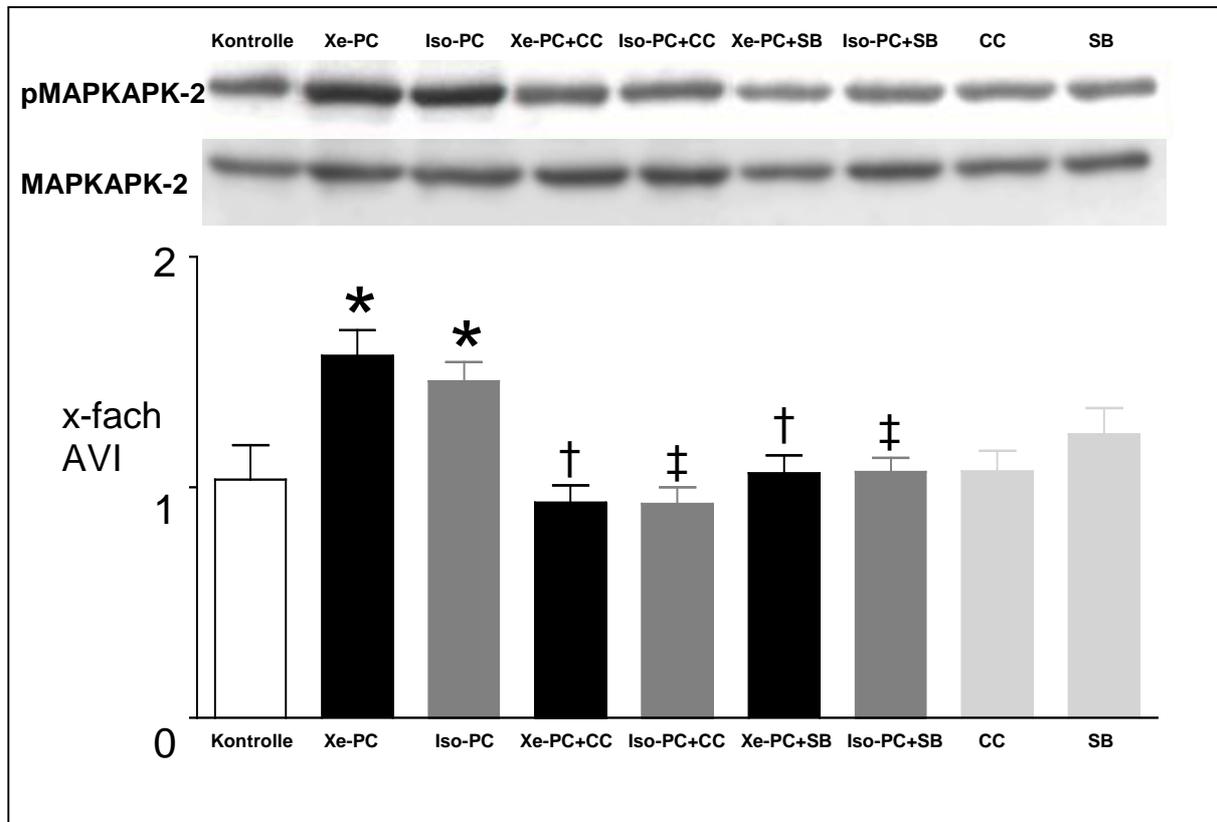


Abbildung 13 – Phosphorylierung der MAPKAPK-2

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot der zytosolischen Fraktion der Kontrollen, Xenon- (Xe-PC) bzw. Isofluran-präkonditionierten Herzen (Iso-PC) mit und ohne zusätzliche Gabe von Calphostin C (CC) bzw. SB 203580 (SB), je n=6. Die obere Tafel zeigt die phosphorylierte Form der MAPKAPK-2 (pMAPKAPK-2), die untere Tafel die Gesamtmenge MAPKAPK-2 (MAPKAPK-2). Das Histogramm zeigt die Ergebnisse der Densitometrie als x-fache mittlere Lichtintensität (average light intensity, AVI). Die Daten sind als Verhältnis der Intensitäten der Banden der phosphorylierten MAPKAPK-2 (pMAPKAPK-2) und der gesamten MAPKAPK-2 (MAPKAPK-2) ausgedrückt (Mittelwert \pm Standardfehler).

* p<0.05 vs. Kontrolle, † p<0.05 vs. Xe-PC, ‡ p<0.05 vs. Iso-PC.

3.2.5 Immunfluoreszenzuntersuchung der Actin/HSP 27 Co-Lokalisation

Ein wichtiges Substrat der MAPKAPK-2 ist das HSP 27. Es sollte nun untersucht werden, ob es als Folge der vermehrten Phosphorylierung der MAPKAPK-2 nach Xenon Präkonditionierung zu einer Translokation des HSP 27 zum Zytoskelett kommt. Die Immunfluoreszenzfärbung von F-Actin mit Rhodamin Phalloidin zeigte eine verstärkte Polymerisation der Actinfilamente in Xenon- bzw. Isofluran-präkonditionierten Herzen (Abbildung 14, oberste Zeile mittleres und rechtes Bild).

Um zu untersuchen, ob die Xenon-induzierte Verstärkung der Actin-Polymerisation mit einer Co-Lokalisation von Actinfilamenten und HSP 27 assoziiert ist, wurde eine Doppelfärbung von F-Actin und phosphoryliertem HSP 27 durchgeführt. Sowohl Xenon als auch Isofluran Präkonditionierung führten zu einer Zunahme an phosphoryliertem HSP 27 (grüne Fluoreszenz) in denselben Regionen der Kardiomyozyten, wo sich auch die Actin-Polymerisation (rote Fluoreszenz) nachweisen ließ. Die Überlagerung der beiden Fluoreszenzfärbungen (Abbildung 14, untere Zeile, gelbe Fluoreszenz) zeigte, dass phosphoryliertes HSP 27 und F-Actinfilamente in allen Schnitten co-lokalisiert sind, jedoch deutlicher in den Xenon- bzw. Isofluran-präkonditionierten Herzen als in den Kontrollherzen. Vergleiche hierzu Abbildung 14.

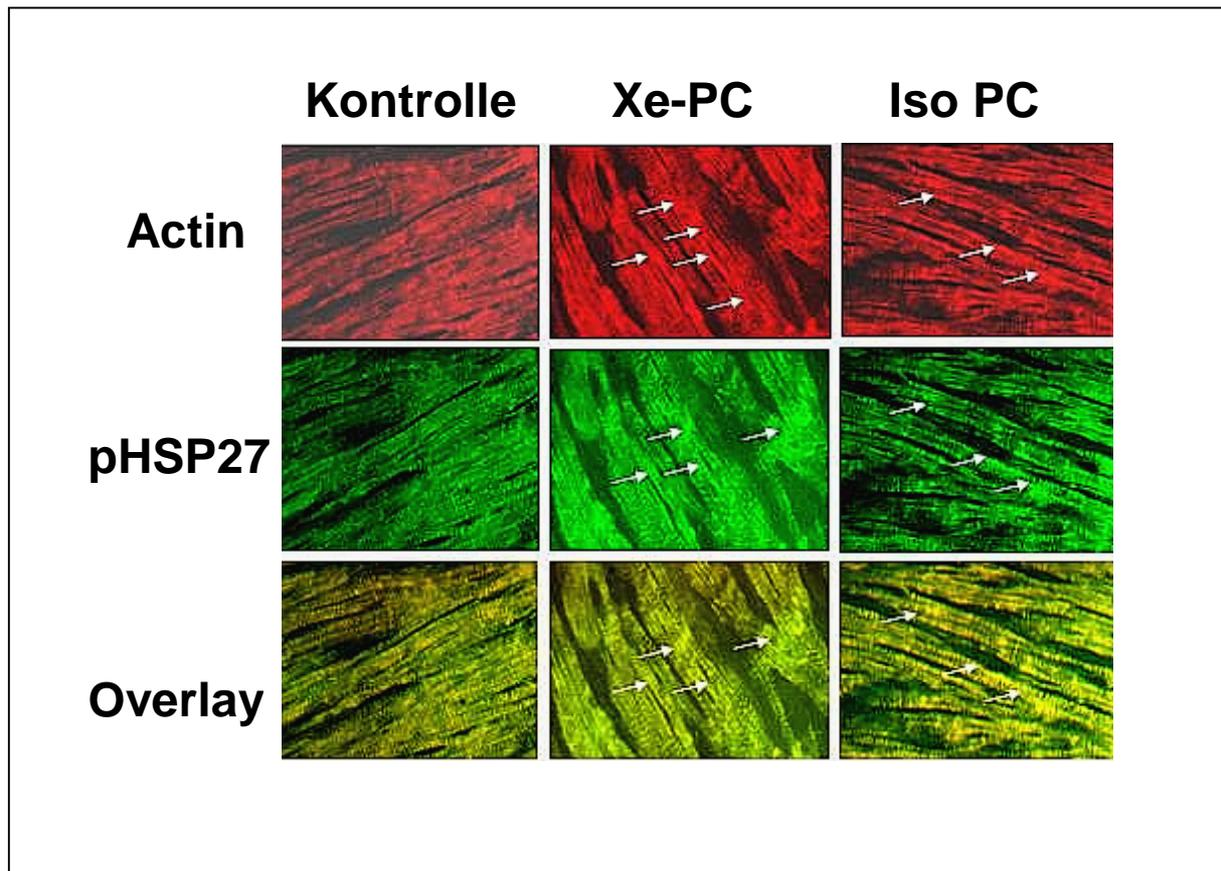


Abbildung 14 – F-Actin Polymerisation und Co-Lokalisation mit HSP 27

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung an repräsentativen Kryoschnitten von Kontrollherzen (linke Spalte), Xenon-präkonditionierten (Xe-PC, mittlere Spalte) und Isofluran-präkonditionierten (Iso-PC, rechte Spalte) Herzen nach einer Doppelfärbung von F-Actin (Actin, obere Zeile) und phosphoryliertem HSP 27 (pHSP27, mittlere Zeile). Die Überlagerung der beiden Fluoreszenzfärbungen (Overlay, untere Zeile, gelbe Fluoreszenz) zeigt, dass phosphoryliertes HSP 27 und F-Actinfilamente in allen Schnitten co-lokalisiert sind, jedoch deutlicher in den Xenon- bzw. Isofluran-präkonditionierten Herzen als in den Kontrollherzen.

3.2.6 Co-Immunpräzipitation von Actin und HSP 27

Das Ergebnis der Immunfluoreszenzuntersuchung sollte durch eine Western Blot Analyse nach Co-Immunpräzipitation von Actin und HSP 27 bestätigt werden.

Mit dieser Methode können mittels eines spezifischen Antikörpers Proteine, die miteinander in Protein-Protein-Interaktion stehen, gemeinsam aus einem Zelllysate präzipitiert werden.

Der Western Blot nach Co-Immunpräzipitation zeigte deutlich, dass nach Xenon bzw. Isofluran Präkonditionierung mehr phosphoryliertes HSP 27 im Actin-Präzipitat nachweisbar ist. Die Densitometrie bestätigte dieses Ergebnis: Das Verhältnis von phosphoryliertem HSP 27 zu Actin ist nach Xenon bzw. Isofluran Präkonditionierung signifikant größer als in den Kontrollherzen (3.22 ± 0.2 AVI in den Kontrollen vs. 5.7 ± 0.9 AVI nach Xenon Präkonditionierung bzw. 5.4 ± 0.4 AVI nach Isofluran Präkonditionierung, beide $p < 0.05$). Vergleiche hierzu Abbildung 15.

Dieses Resultat bestätigt die Annahme einer Verknüpfung des HSP 27 mit dem Actin Zytoskelett nach der Xenon Präkonditionierung.

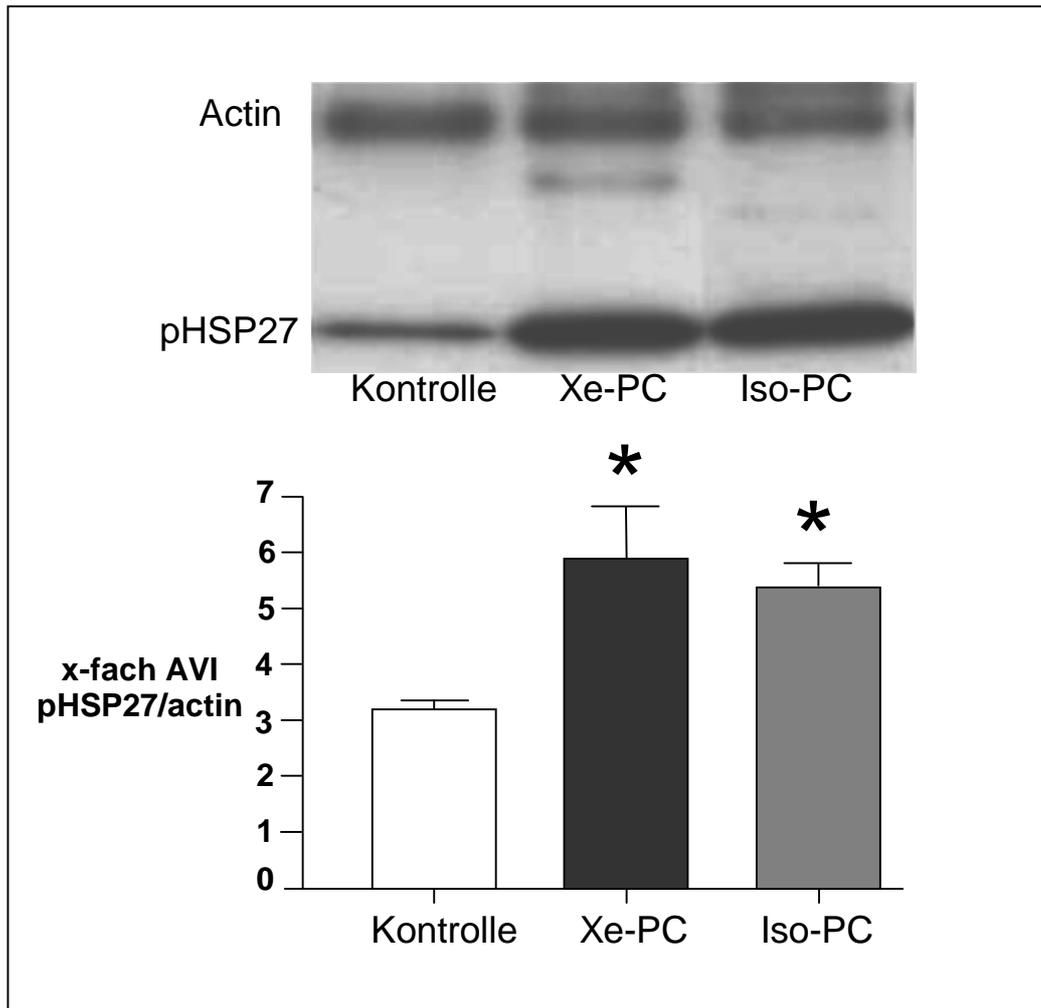


Abbildung 15 – Co-Immunpräzipitation von Actin und HSP 27

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot von immunpräzipitiertem Actin (obere Reihe) und phosphoryliertem HSP 27 (pHSP27, untere Reihe) aus Kontrollherzen, Xenon- (Xe-PC) und Isofluran-präkonditionierten Herzen (Iso-PC), je n=6. Die Western Blots wurden nach Actin Immunpräzipitation mit Protein-G-Agarose auf Actin und phosphoryliertes HSP 27 (pHSP27) untersucht. Das Histogramm zeigt die Ergebnisse der Densitometrie als x-fache mittlere Lichtintensität (average light intensity, AVI). Die Daten sind als Verhältnis der Intensitäten der Banden von Actin und des phosphorylierten HSP 27 (pHSP27) ausgedrückt (Mittelwert±Standardfehler).

* p<0.05 vs. Kontrolle.

4. Diskussion

Xenon hat nur einen Anteil von 0.0875 ppm an unserer Atmosphäre. Aufgrund dieses seltenen Vorkommens und der Tatsache, dass dieses Gas als Naturelement nicht synthetisierbar ist, wird es zu den Edelgasen gezählt. Es mehren sich jedoch Hinweise aus experimentellen Studien, dass Xenon, obwohl es chemisch inert ist, biologische Effekte und physiologische Veränderungen bewirken kann. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass kontinuierliche Xenon Applikation eine verbesserte Erholung des Myokards nach kurzer regionaler Ischämie bewirkt [47]. Außerdem induzierte Xenon eine Infarktgrößenreduktion am Herzen, wenn es nach einer Myokardischämie in der frühen Reperfusionphase appliziert wurde [46]. Diese biologischen Nebeneffekte des Edelgases könnten eine klinisch nutzbare Organprotektion vermitteln.

Während Narkosen mit Xenon werden kaum hämodynamische oder kardiovaskuläre Nebenwirkungen beobachtet [37, 41] und dieses Gas könnte daher besonders für kardiale Risikopatienten mit erhöhter Gefahr für intraoperative Myokardischämien oder stark eingeschränkter linksventrikulärer Funktion eine vorteilhafte therapeutische Option sein.

In einer Studie an Rattenherzen in-vivo konnte der kardioprotektive Effekt einer repetitiven Xenon Inhalation vor einer Myokardischämie gezeigt werden [48]. Dies entspricht der Definition einer Xenon-induzierten Präkonditionierung. Bei Untersuchungen zur Aufklärung des zugrunde liegenden molekularen Mechanismus konnte durch pharmakologische Hemmung der PKC ϵ und der p38 MAPK die funktionelle Rolle dieser Kinasen in der Xenon Präkonditionierung belegt, und ihre kausale Beziehung zu den kardioprotektiven Effekten nachgewiesen werden. Hierbei agiert die PKC ϵ oberhalb der p38 MAPK in der Signalkaskade [48]. Der weitere Signaltransduktionsweg und der mögliche Endeffektor der Xenon Präkonditionierung sind bisher nicht endgültig geklärt.

Die p38 MAPK kann im Herzen durch unterschiedliche Stimuli kurzfristig aktiviert werden [118-120]. Vor allem während myokardialer Ischämie und Reperfusion spielt ihre Aktivierung eine wesentliche Rolle [121]. Unterhalb der p38 MAPK nehmen die MAPKAPK-2 und das HSP 27 eine Schlüsselrolle in der Reorganisation des Zytoskeletts ein. Auf die Phosphorylierung der p38 MAPK folgt die Aktivierung des MAPKAPK-2/HSP 27 Signalweges, dies führt in-vitro schließlich zur Translokation des HSP 27 zum Zytoskelett der Zelle [122]. Da eine längere Ischämie unter anderem zu

einer Zerstörung des Zytoskeletts führt [7] könnte bei der Xenon Präkonditionierung die Aktivierung des HSP 27 über die p38 MAPK und die MAPKAPK-2 durch eine Stabilisierung des Zytoskeletts am Schutz der Zelle vor einer Ischämie beteiligt sein. Für die ischämische Präkonditionierung des Herzens wurde bereits eine solche Beteiligung der MAPKAPK-2 und des HSP 27 beschrieben [123].

Anknüpfend an diese bisherigen Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle weiterer Isoformen der PKC (PKC α und δ) sowie der Substrate des p38 MAPK Signalweges (MAPKAPK-2, HSP 27 und Zytoskelett) bei der Xenon Präkonditionierung untersucht.

4.1 Rolle der PKC in der Xenon Präkonditionierung

Bekannt ist, dass während der Präkonditionierung durch die Öffnung mitochondrialer ATP-abhängiger Kalium-Kanäle die Freisetzung von Radikalen eingeleitet wird [124], wodurch es zu einer nachfolgenden Aktivierung unterschiedlicher Kinasen, unter anderem der Protein Kinase C, kommt [51].

In der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem die Rolle der PKC α untersucht. Dabei konnte nach Xenon Präkonditionierung keine signifikant vermehrte Phosphorylierung der PKC α im Zeitverlauf nachgewiesen werden, so dass eine Beteiligung der PKC α am molekularen Mechanismus der Kardioprotektion durch Xenon unwahrscheinlich erscheint. Im Gegensatz dazu wurde für die ischämische Präkonditionierung in einer in-vitro Untersuchung von Hassouna et al. eine vermehrte Phosphorylierung der PKC Isoformen α und vor allem ϵ beschrieben [81]. Eine Hemmung dieser Isoformen mit GO-6976 bzw. V1-2 Peptid blockierte den Schutzeffekt der Präkonditionierung. Durch Experimente mit Diazoxid, einem Kalium-Kanal-Öffner, konnte abgeleitet werden, dass die PKC ϵ oberhalb und die PKC α unterhalb der Kalium-Kanäle in der Signalkaskade agieren könnten [81]. Die Möglichkeit, dass die hier vorliegenden Ergebnisse einen anderen Zeitpunkt abbilden als jene in der Untersuchung von Hassouna, so dass zu den hier untersuchten Zeitpunkten die PKC α Aktivierung noch nicht bzw. nicht mehr nachweisbar ist, sollte durch die Untersuchung von 5 verschiedenen Zeitpunkten ausgeschlossen sein. Die zitierte Studie unterscheidet sich jedoch von der vorliegenden Arbeit sowohl in den Protokollen der Präkonditionierung (einmal fünf Minuten ischämische Präkonditionierung gegenüber dreimal fünf Minu-

ten anästhetische Präkonditionierung), in der verwendeten Spezies (menschliches Vorhofgewebe gegenüber Rattenmyokard) als auch in den Besonderheiten der in-vitro gegenüber der in-vivo Situation. Die ischämische Präkonditionierung weicht möglicherweise sogar in einigen Transduktionsschritten von der anästhetischen Präkonditionierung ab. Unterschiede in den Effekten der ischämischen gegenüber der pharmakologischen Präkonditionierung in Bezug auf die Aktivierung von PKC Isoformen haben auch Tsouka et al. beschrieben [77].

Die Beteiligung der PKC δ an der Signalkaskade der Xenon Präkonditionierung wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Hemmung durch Rottlerin untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die PKC δ wahrscheinlich keine entscheidende Rolle in der Xenon Präkonditionierung spielt. Auch nach PKC δ Inhibition durch Rottlerin konnte die Xenon Präkonditionierung ihre kardioprotektiven Effekte ausüben. Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der PKC δ bestätigen Daten aus anderen Untersuchungen zum Mechanismus der Präkonditionierung. Fryer et al. berichten aus ähnlichen in-vivo Versuchen mit dem PKC δ Inhibitor Rottlerin von einer Beteiligung der PKC δ an der pharmakologischen, opioid-induzierten Präkonditionierung, nicht jedoch an der ischämischen Präkonditionierung [79,80]. PKC δ Hemmung durch Rottlerin, untersucht in drei verschiedenen Konzentrationen, konnte den Schutz durch ischämische Präkonditionierung in einer in-vitro Untersuchung an menschlichem Vorhofgewebe ebenfalls nicht aufheben [81]. Auch in einer Studie an isolierten Meerschweinchenherzen mit dem synthetischen Peptid PP101, welches die PKC δ Translokation hemmt, wurde nach Inhibition der PKC δ die anästhetische Präkonditionierung durch Sevofluran nicht beeinträchtigt [125]. Im Gegensatz dazu blockierte die Rottlerin Applikation im isolierten Rattenherzen die Isofluran-induzierte Präkonditionierung und, dies allerdings erst in höherer Konzentration, auch die ischämische Präkonditionierung [83]. Auch in einer in-vivo Untersuchung der anästhetischen Präkonditionierung mit Isofluran konnten die kardioprotektiven Effekte durch Rottlerin aufgehoben werden [126]. Hier liegen möglicherweise Unterschiede in den Effekten der einzelnen Formen der Präkonditionierung zugrunde, die noch weiter untersucht werden müssen.

Versuche mit synthetischen Aktivator- und Inhibitorpeptiden von PKC Isoformen haben gezeigt, dass eine Hemmung der PKC δ in-vitro und in-vivo kardioprotektiv wirken kann [70, 71, 72]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine signifikante

Infarktgrößenreduktion durch alleinige Rottlerinapplikation nachgewiesen werden. Während der Inhibitor hier vor der Präkonditionierung appliziert wurde, wurde die kardioprotektive Wirkung bei Applikation in der Reperfusionsphase nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte die Aktivierung der PKC δ nach Xenon Präkonditionierung durch Phosphorylierung und Translokation leider nicht ausreichend untersucht werden. In der Literatur finden sich jedoch einige Studien zu anderen Formen der Präkonditionierung, in denen dies gelungen scheint. In einer Untersuchung an isolierten Rattenherzen zeigte sich eine Translokation von PKC δ und ϵ zum Nukleus sowohl nach ischämischer als auch nach Isofluran Präkonditionierung. Es erfolgte eine PKC δ Phosphorylierung und mitochondriale Translokation nach ischämischer und anästhetischer Präkonditionierung mit Isofluran, welche durch Rottlerin aufgehoben werden konnte [83]. Die Translokation der PKC δ nach ischämischer, Isofluran oder Sevofluran Präkonditionierung konnte in anderen Arbeiten in-vivo und in-vitro bestätigt werden [32, 75, 76, 84, 85]. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese einer protektiven Wirkung der PKC δ bei der Präkonditionierung, während in der hier vorliegenden und anderen Arbeiten mit Rottlerin ihre kausale Beteiligung nicht nachgewiesen werden konnte. Zusammengenommen sind die Daten über die Beteiligung der PKC δ bei der Präkonditionierung sehr inhomogen, hier müssen weitergehende Untersuchungen zeigen, ob die Aktivierung der PKC δ möglicherweise ein Epiphänomen ist und ob ihre Rolle in den verschiedenen Formen der Präkonditionierung unterschiedlich ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine Isoform-spezifische Aktivierung der PKC durch die Xenon Präkonditionierung. Während die Phosphorylierung der PKC ϵ ein wichtiger Schritt in der Signaltransduktionskette zu sein scheint [48], spielen die Isoformen α und δ , wie in dieser Arbeit gezeigt, keine oder nur eine untergeordnete Rolle für Ausübung der kardioprotektiven Effekte.

4.2 Rolle der MAPKAPK-2 in der Xenon Präkonditionierung

Es konnte bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass in der Signalkette der Xenon Präkonditionierung unterhalb der PKC eine Aktivierung der p38 MAPK induziert wird [48]. Diese Stress-induzierte p38 MAPK Kaskade führt in-vitro zu einer Phosphorylierung der MAPKAPK-2, deren Hauptsubstrat das HSP 27 ist [92].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg auch für die Xenon Präkonditionierung zutrifft. Sowohl nach Xenon Präkonditionierung als auch nach Isofluran Präkonditionierung findet eine Aktivierung der MAPKAPK-2, gemessen an ihrer Phosphorylierung, statt. Diese Aktivierung befindet sich in der Signaltransduktionskette unterhalb der PKC und der p38 MAPK, dies konnte in weiteren Versuchen durch eine Inhibition dieser beiden Proteine gezeigt werden. Sowohl nach PKC Hemmung durch Calphostin C als auch nach p38 MAPK Inhibition zeigte sich keine Aktivierung der MAPKAPK-2 mehr. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit einer Untersuchung an isolierten Kaninchenherzen, die zeigte, dass es nach ischämischer Präkonditionierung zu einer starken Aktivierung der MAPKAPK-2 kommt [107]. Auch an isolierten Rattenherzen konnte nachgewiesen werden, dass durch Ischämie-Reperfusion die p38 MAPK - MAPKAPK-2 Kaskade stimuliert wird [105, 106].

In der vorliegenden Arbeit wurde die MAPKAPK-2 Phosphorylierung zu einem definierten Zeitpunkt 45 Minuten nach Beginn des Präkonditionierungsprotokolls untersucht. Aussagen über das Ausmaß der Phosphorylierung zu anderen Zeitpunkten und über die Phosphorylierungskinetik können nicht gemacht werden. Vermutlich handelt es sich auch hier um eine zeitabhängige Phosphorylierung, wie für andere Kinasen, wie z.B. die extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1 und 2, bereits gut beschrieben [127]. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit, die den grundlegenden Signalweg beschreibt, jedoch nicht weiter untersucht.

4.3 Rolle von HSP 27 und Zytoskelett in der Xenon Präkonditionierung

Ohne intaktes Zytoskelett scheint die Myokardprotektion durch Präkonditionierung ihre Wirkung nicht entfalten zu können, dies zeigte eine Untersuchung von Ismaeil und Mitarbeitern [108]. Kleine HSP wie HSP 27 sind nach Untersuchungen von Liang und Mounier hauptsächlich für den Schutz und die Stabilisierung der Struktur der Actin Filamente des Zytoskeletts bei Zellstress verantwortlich [109]. Eine Überexpression von HSP 27 schützt die Zelle auch vor Ischämie-Reperfusion-induzierten Schäden, dies konnte in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte gezeigt werden [128]. Ischämie-Reperfusion selbst führt auch zu einer gesteigerten HSP 27 Aktivierung. Dies konnte sowohl für globale als auch regionale Ischämie an verschiedenen Tiermodellen, darunter auch an der Ratte, gezeigt werden [114]. Eine Aktivierung des

HSP 27 führt nachfolgend zu einer Actin Polymerisation, welche die Toleranz des Zytoskeletts gegen Stress erhöht [111]. An dieser Stress-induzierten Aktivierung des HSP 27 ist der bereits erläuterte MAPK Signalweg über die p38 MAPK und die MAPKAPK-2 maßgeblich beteiligt [129].

Die Phosphorylierung des HSP 27 nach Xenon Präkonditionierung ist bereits in einer Arbeit gezeigt worden [Ergebnisse in 137], daher wurde in dieser Arbeit auf die erneute Untersuchung und Darstellung verzichtet.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte durch Immunfluoreszenzuntersuchungen eine verstärkte Polymerisation der Actinfilamente in Xenon- bzw. Isofluran-präkonditionierten Herzen gezeigt werden. In weiteren Untersuchungen zur Klärung der Verknüpfung des HSP27 mit den Actinfilamenten konnte nachgewiesen werden, dass nach Xenon bzw. Isofluran Präkonditionierung eine Translokation des HSP 27 zum Actin-Zytoskelett erfolgt. Dieses Ergebnis konnte durch eine Co-Immunpräzipitation bestätigt werden. Nach Xenon bzw. Isofluran Präkonditionierung bilden Actin und HSP 27 einen gemeinsamen Komplex, durch den das Zytoskelett stabilisiert werden kann. Nach anästhetischer Präkonditionierung scheint eine Translokation des HSP 27 zum Zytoskelett zu erfolgen, welche die Actin Polymerisation und damit die Stabilität des Zytoskeletts fördert. Dieses Resultat bestätigen auch Ergebnisse aus einer Untersuchung von Eaton und Mitarbeitern. Hier konnte für den Mechanismus der ischämischen Präkonditionierung ebenfalls eine Translokation des HSP 27 zum Zytoskelett nachgewiesen werden [115].

Aktiviertes HSP 27 scheint also das Zytoskelett durch eine Actin Stabilisierung schützen zu können. Vermutlich bereiten die Veränderungen am Zytoskelett die Kardiomyozyten darauf vor, adäquat auf den nachfolgenden Zellstress reagieren zu können. Diese Verknüpfung des Präkonditionierungsmechanismus mit dem Zytoskelett über eine Aktivierung des HSP 27 stellt einen entscheidenden Schritt in der Myokardprotektion durch Xenon Präkonditionierung dar.

4.4 Methodenkritik - Einschränkungen der Untersuchung

Es wurde eine repetitive Präkonditionierung mit Xenon bzw. Isofluran verwendet, um einen optimalen kardioprotektiven Effekt zu erzielen. In der Literatur gibt es deutliche Hinweise darauf, dass eine repetitive gegenüber einer einmaligen Gabe eine effektivere Präkonditionierung bewirkt [130, 131]. Mit diesem Protokoll wurde in einer früheren Studie eine Infarktgrößenreduktion um 23-Prozentpunkte im Vergleich mit den Kontrollen erreicht [48]. Auch in der vorliegenden Arbeit ergab sich eine starke Infarktgrößenreduktion nach Xenon Präkonditionierung um 20-Prozentpunkte.

Zur Definition der Präkonditionierung gehört, dass der kardioprotektive Stimulus während der Ischämie nicht mehr vorhanden sein darf. Aufgrund des niedrigen Blut-Gas-Verteilungskoeffizienten zeigt Xenon eine schnelle An- und Abflutung im Gewebe. Die rasche Elimination wurde in den durchgeführten Versuchen zusätzlich durch einen hohen Frischgasfluss während der Auswaschzeiten sichergestellt. Eine Messung des Anästhetikums im Myokard selbst war jedoch nicht möglich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen stark daraufhin, dass der dargestellte Signalweg mit dem Zytoskelett als einem möglichen Endeffektor für die kardioprotektiven Effekte einer anästhetischen Präkonditionierung verantwortlich ist. Um diesen Signalweg endgültig belegen zu können müssten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden. Nur eine funktionelle Hemmung der untersuchten Proteine in-vivo während der Präkonditionierung (pharmakologische Blockade oder knock-out Tiere) und anschließende Bestimmung der resultierenden Infarktgröße würde die Ergebnisse sicher beweisen. Für die MAPKAPK-2 und das HSP 27 existieren nach unserem Wissen jedoch keine Hemmstoffe für eine sichere in-vivo Nutzung, die Blocker wurden bisher nur in in-vitro Situationen getestet. Deshalb ist es zur Zeit nicht möglich, die betreffenden Proteine zu hemmen, um funktionelle Parameter zu bestimmen.

Aus der Tatsache, dass die Hemmung der p38 MAPK, dem wichtigsten Aktivator der MAPKAPK-2 und des HSP 27, in einer vollständigen Aufhebung der kardioprotektiven Wirkung resultierte, kann man jedoch schlussfolgern, dass diese Signalkaskade an der Xenon Präkonditionierung wesentlich beteiligt ist.

Für die verwendeten Hemmstoffe der PKC und der p38 MAPK gilt folgende Einschränkung: Ihre Spezifität ist stark von der verwendeten Konzentration abhängig. Zum Beispiel hemmt Calphostin C die PKC mit einer IC_{50} von 50nM. Andere Kinasen wie die PKA, die p60 und die PKG werden erst in höheren Konzentrationen gehemmt. Der p38 MAPK Inhibitor SB 203580 hemmt andere Kinasen erst, wenn Konzentrationen von über 10 μ M verwendet werden [132]. Die beiden Inhibitoren wurden in den durchgeführten Versuchen daher in Anlehnung an andere in-vivo Studien [79, 133] in einer besonders niedrigen Dosierung (Calphostin C 0,1 mg/kg entsprechend 12 μ M und SB 203580 1 mg/kg entsprechend 2,4 mM), appliziert als Bolus, eingesetzt. Der PKC δ Inhibitor Rottlerin wurde ebenfalls in einer niedrigen Dosierung von 0,3 mg/kg verwendet, dies entspricht den in der Literatur zur PKC δ Hemmung in-vivo verwendeten Konzentrationen [80, 126].

In der hier vorliegenden Arbeit wurde nur eine äquivalente Konzentration von 0.4 MAC Xenon bzw. Isofluran verwendet, so dass die Ergebnisse auf diese Konzentration beschränkt bleiben müssen. Ziel dieser Arbeit war dabei jedoch nicht, konzentrationsabhängige Unterschiede aufzuzeigen, sondern die kardioprotektive Wirkung darzustellen und deren Mechanismus zu untersuchen.

Bei der Durchführung der Experimente zu der vorliegenden Arbeit tauchten Schwierigkeiten bei der Untersuchung der PKC δ im Western Blot auf. Die PKC δ Bande wurde durch Albumin überlagert. Dieses Problem ließ sich auch nicht durch Wechsel des Antikörpers oder vorangehende Entfernung des störenden Albumins lösen. Eine vorhergehende Immunpräzipitation der PKC δ könnte diese Überlagerung möglicherweise verhindern. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt, sollte aber in zukünftigen Studien in Betracht gezogen werden.

Über Probleme bei der Immunoblot-Untersuchung der PKC δ berichteten kürzlich auch Rybin und Steinberg [134]. Sie haben festgestellt, dass ein kommerziell erhältlicher PKC δ Antikörper, der unter anderem auch in dieser Arbeit verwendet wurde, bisher nicht bekannte Defizite bei der Detektion der phosphorylierten PKC δ aufweist. Obwohl der untersuchte Antikörper die PKC δ unabhängig von ihrem Phosphorylierungsstatus erkennen sollte, fiel in Experimenten mit PMA-behandelten Zellen auf, dass der genannte Antikörper stimulierte PKC δ nicht detektieren kann. Diese Probleme bei der Detektion der PKC δ lassen Rybin und Steinberg in ihrer Arbeit schluss-

folgern, dass Ergebnisse aus Studien, die die Aktivierung der PKC δ durch Phosphorylierung und Translokation untersucht haben, eventuell überdacht werden müssen. Diesen Hinweisen muss weiter nachgegangen werden.

Natürlich gelten die hier gezeigten Ergebnisse zunächst nur für das verwendete experimentelle Tiermodell. Eine Übertragung auf den Menschen steht noch aus. Kardioprotektion durch Präkonditionierung kann durch verschiedene pathologische Veränderungen, wie Hypercholesterinämie, Atherosklerose oder Diabetes, vermindert werden [135, 136]. Die vorliegende Arbeit wurde an gesunden Versuchstieren durchgeführt. Gerade kardiale Risikopatienten weisen jedoch multiple pathologische Veränderung ihres Herz- und Kreislaufsystems auf und sind häufig multimorbid. Eine Übertragung in die klinische Anwendung ist daher nicht ohne weiteres möglich. Dennoch könnte das Verständnis der molekularen Mechanismen der Xenon Präkonditionierung helfen, das Wissen über Xenon als vorteilhaftes anästhetisches Gas für kardiale Risikopatienten zu erweitern.

4.5 Ausblick

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde das Zytoskelett der Kardiomyozyten erstmals als ein möglicher Endeffektor der Protektion durch Xenon Präkonditionierung identifiziert. Diese Ergebnisse erweitern das Verständnis der Signaltransduktionswege der Präkonditionierung. Deren genaue Kenntnis ist wichtig, um diesen starken endogenen Schutzmechanismus des Myokards gezielt therapeutisch auslösen oder verstärken zu können und nicht durch ungeeignete Pharmaka zu blockieren. Bei koronarkranken Patienten könnte so zum Beispiel vor einer Operation mit geplanter Myokardischämie in der Herzchirurgie durch die Wahl eines geeigneten Anästhetikums eine Myokardprotektion induziert werden. Kardiale Risikopatienten könnten so von einem optimalen Schutz vor den Folgen einer intraoperativen Myokardischämie bei zugleich geringen hämodynamische Nebenwirkungen der Xenon Anästhesie profitieren.

Ziel weiterer Studien ist es, diese Möglichkeiten der gezielten Organprotektion durch Xenon weiter zu überprüfen und den zugrundeliegenden Mechanismus zu verstehen. Dazu wird die Beteiligung von Kalium-Kanälen und weiterer Mediatoren an der Xenon Präkonditionierung analysiert. Untersucht wird zur Zeit auch, wie sich Begleiterkrankungen wie Diabetes und der Alterungsprozess auf eine Präkonditionierung auswirken. Ein weiterer Schwerpunkt der Forschung in diesem Themenkreis liegt derzeit auf den Möglichkeiten der späten Präkonditionierung durch Xenon.



5. Literaturverzeichnis

- [1] Badner NH, Knill RL, Brown JE, et al., Myocardial infarction and cardiac mortality after major vascular surgery. *Anesthesiology* 1998, 88, 572-578
- [2] Mangano DT, Browner WS, Hollenberg M, et al., Association of perioperative myocardial ischemia with cardiac morbidity and mortality in men undergoing noncardiac surgery. *N Engl J Med* 1990, 323, 1781-1788
- [3] Mangano DT, Hollenberg M, Fegert G, et al., Perioperative myocardial ischemia in patients undergoing noncardiac surgery: Incidence and severity during the 4 day perioperative period. The Study of Perioperative Ischemia (SPI) Research Group. *J Am Coll Cardiol* 1991, 17, 843-850
- [4] Landesberg G, Luria M, Cotev S, et al., Importance of long duration postoperative ST-segment depression in cardiac morbidity after vascular surgery. *Lancet* 1993, 341, 715-719
- [5] Fleischer L, Nelson A, Rosenbaum S, Postoperative myocardial ischemia: etiology of cardiac morbidity or manifestation of underlying disease? *J Clin Anesth* 1995, 7, 79-102
- [6] Jennings RB, Reimer KA, The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 1991, 42, 225-246
- [7] Ganote C, Armstrong S, Ischaemia and the myocyte cytoskeleton: review and speculation. *Cardiovasc Res* 1993, 27, 1387-1403
- [8] Boersma E, Mercado N, Poldermanns D, et al., Acute myocardial infarction. *Lancet* 2003, 361, 847-858
- [9] Warltier DC, Pagel PS, Kersten JR, Approaches to the prevention of perioperative myocardial ischemia. *Anesthesiology* 2000, 92, 253-259.
- [10] Bolli R, Becker L, Gross G, et al., Myocardial Protection at a Crossroads. *Circ Res* 2004, 95, 125-134
- [11] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA, Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986, 74, 1124-1136
- [12] Osborne DL, Aw TY, Cepinkas G, et al., Development of ischemia/reperfusion tolerance in the rat small intestine. An epithelium-independent event. *J Clin Invest* 1994, 94, 1910-1918
- [13] Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, et al., Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors and ATP-sensitive K-channels in cerebral ischemic preconditioning. *PNAS* 1995, 92, 4666-4670
- [14] Peralta C, Closa D, Xaus C, et al., Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 1998, 28, 768-773

- [15] Przyklenk K, Kloner RA, Ischemic preconditioning: exploring the paradox. *Prog Cardiovasc Dis* 1998, 40, 517-547
- [16] Li G, Chen S, Lu G, et al., Cardiac ischemic preconditioning improves lung preservation in valve replacement operations. *Ann Thorac Surg* 2001, 71, 631-635
- [17] Torras J, Herrero-Fresneda I, Lloberas N, et al., Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation. *Kidney Int* 2002, 61, 2218-2227
- [18] Marber MS, Ischemic preconditioning in isolated cells. *Circ Res* 2000, 86, 926-931
- [19] Walker DM, Walker JM, Pugsley WB, et al., Preconditioning in isolated superfused human muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1995, 27, 1349-1357
- [20] Tosaki A, Cordis GA, Szerdahelyi P, et al., Effects of preconditioning on reperfusion arrhythmias, myocardial functions, formation of free radicals, and ion shifts in isolated ischemic/reperfused rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994, 23, 365-373
- [21] Moolman JA, Genade S, Winterbach R, et al., Preconditioning with a single short episode of global ischemia in the isolated working rat heart: effect on structure, mechanical function, and energy metabolism for various durations of sustained global ischemia. *Cardiovasc Drugs Ther* 1995, 9, 103-115
- [22] Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, et al., Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology* 1997, 87, 1182-1190
- [23] Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, et al., Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K-ATP-Channels via multiple signaling pathways, *Anesthesiology* 2002, 97, 4-14
- [24] Bland JH, Lowenstein E, Halothane-induced decrease in experimental myocardial ischemia in the non-failing canine heart. *Anesthesiology* 1976, 45, 287-293
- [25] Novalija E, Fujita S, Kampine JP, et al., Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated hearts. *Anesthesiology* 1999, 91, 701-712
- [26] Roscoe AK, Christensen JD, Lynch C 3rd, et al., Isoflurane, but not halothane, induces protection of human myocardium via adenosine A1 receptors and adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Anesthesiology* 2000, 92, 1692-1701
- [27] Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, et al. Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology* 1999, 91, 1437-1446
- [28] Piruoi V, Chiari P, Lhuillier F, et al., Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium. *Br J Anaesth* 2002, 89, 486-491

- [29] Mullenheim J, Ebel D, Bauer M, et al., Sevoflurane confers additional cardioprotection after ischemic late preconditioning in rabbits. *Anesthesiology* 2003, 99, 624-631
- [30] DeHert SG, Turani F, Mathur S, et al., Cardioprotection with Volatile Anesthetics: Mechanisms and Clinical Implications. *Anesth Analg* 2005, 100, 1584 –1593
- [31] Van der Linden PJ, Daper A, Trenchant A, et al., Cardioprotective effects of volatile anaesthetics in cardiac surgery. *Anesthesiology* 2003, 99, 516 –517.
- [32] Julier K, daSilva R, Garcia C, et al., Preconditioning by Sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery. *Anesthesiology* 2003, 98, 1315-1327
- [33] Cullen SC, Gross EG, The anaesthetic properties of xenon in animals and human beings. *Science* 1951, 113, 580-582
- [34] Goto T, Saito H, Shinkai M, et al., Xenon provides faster emergence from anesthesia than does nitrous oxide-sevoflurane or nitrous oxide-isoflurane. *Anesthesiology* 1997, 86, 1273-1278
- [35] Goto T, Suwa K, Uezono S, et al., The blood-gas partition coefficient of xenon may be lower than generally accepted. *Br J Anaesth* 1998, 80, 255-256
- [36] Nakata Y, Goto T, Morita S, Comparison of inhalational inductions with Xenon and Sevofluran. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997, 41, 1157-1161
- [37] Lachmann B, Armbruster S, Schairer W, et al., Safety and efficacy of xenon in routine use as an inhalational anesthetic. *Lancet* 1990, 335, 1413-1415
- [38] Nakata Y, Goto T, Saito H, et al.; Plasma concentrations of fentanyl with xenon to block somatic and hemodynamic responses to surgical incision. *Anesthesiology* 2000, 92, 1043-1048
- [39] Boomsma F, Rupreht J, Man in 't Veld AJ, et al., Haemodynamic and neurohumoral effects of xenon anaesthesia. *Anaesthesia* 1990, 45, 273-278
- [40] Schmidt M, Marx T, Kotzerke J, et al., Cerebral and regional organ perfusion in pigs during xenon anesthesia. *Anaesthesia* 2001, 56, 1154-1159
- [41] Preckel B, Schlack W, Heibel T, et al., Xenon produces minimal haemodynamic effects in rabbits with chronically compromised left ventricular function. *Br J Anaesth* 2002, 88, 264-269
- [42] Preckel B, Ebel D, Mullenheim J, et al., The direct myocardial effects of xenon in the dog heart in vivo. *Anesth Analg* 2002, 94, 545-551
- [43] Rossaint R, Reyle-Hahn M, Schulte am Esch J, et al., Multicenter randomized comparison of the efficacy and safety of xenon and isoflurane in patients undergoing elective surgery. *Anesthesiology* 2003, 98, 6-13

- [44] Stowe DF, Rehmert GC, Kwok WM, et al., Xenon does not alter cardiac function or major cation currents in isolated guinea pig hearts or myocytes. *Anesthesiology* 2000, 92, 516-522
- [45] Fassl J, Halaszovich CR, Huneke R, et al., Effects of inhalational anesthetics on L-type Ca currents in human atrial cardiomyocytes during beta-adrenergic stimulation. *Anesthesiology* 2003, 99, 90-96
- [46] Preckel B, Mullenheim J, Moloschavij A, et al., Xenon administration during early reperfusion reduces infarct size after regional ischemia in the rabbit heart in vivo. *Anesth Analg* 2000, 91, 1327-1332
- [47] Grosse Hartlage MA, Berendes E, van Aken H, et al., Xenon improves recovery from myocardial stunning in chronically instrumented dogs. *Anesth Analg* 2004, 99, 655-664
- [48] Weber NC, Toma O, Wolter JI, et al.; The noble gas Xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC epsilon and p38MAPK. *Br J Pharmacol* 2005, 144, 123-132
- [49] Gross GJ, Auchampach JA, Role of ATP dependent potassium channels in myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* 1992, 26, 1011–1016.
- [50] Zaugg M, Lucchinetti E, Uecker M, et al., Anaesthetic and cardiac preconditioning. Part I. *Br J Anaesth* 2003, 91, 551-556
- [51] Gopalakrishna R, Anderson WB, Ca- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc Nat Acad Sci USA* 1989, 86, 6758-6762
- [52] Shirai Y, Saito N, Activation mechanisms of protein kinase c: maturation, catalytic activation, and targeting. *J Biochem* 2002, 132, 663-668
- [53] Naruse K, King GL, Protein Kinase C and Myocardial Biology and Function. *Circulation* 2000, 86, 1104-1106
- [54] Kosaka Y, Ogita K, Ase K, et al., The heterogeneity of Protein kinase C in various rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1988, 151, 973-981
- [55] Mochly-Rosen D, Henrich CJ, Cheever L, et al., A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation. *Cell Regul* 1990, 1, 693-706
- [56] Disatnik MH, Buraggi G, Mochly-Rosen D, Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp Cell Res* 1994, 210, 287-297
- [57] Puceat M, Hilal-Dandan R, Strulovici B, et al., Differential regulation of protein kinase C isoforms in isolated neonatal and adult rat cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1994, 269, 16938-16944
- [58] Rybin VO, Steinberg SF, Protein kinase C isoform expression in the developing rat heart. *Circ Res* 1994, 74, 299-309

- [59] Bowling N, Walsh RA, Song G, et al., Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation* 1999, 99, 384-391
- [60] Westermann P, Knoblich M, Maier O, et al., Protein kinase C bound to the Golgi apparatus supports the formation of constitutive transport vesicles. *Biochem J* 1996, 320, 651-658
- [61] Spitaler M, Cantrell DA, Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol* 2004, 5, 785-790
- [62] Koivunen J, Aaltonen V, Peltonen J, Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Lett* 2006, 235, 1-10
- [63] Martelli AM, Evangelisti C, Nyakern M, et al., Nuclear protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1761, 542-551
- [64] Perletti G, Terrian DM, Distinctive roles for novel protein kinase C isoenzymes. *Curr Pharm Des* 2006, 12, 3117-3133
- [65] Lynch JJ, Ferro TJ, Blumenstock FA, et al., Increased endothelial albumin permeability mediated by protein kinase C activation. *J Clin Invest* 1990, 85, 1991-1998
- [66] Koya D, King GL, Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998, 47, 859-866
- [67] Dorn GW, Souroujon MC, Liron T, et al., Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes ϵ protein kinase C translocation. *PNAS* 1999, 96, 12798-12803
- [68] Strasser RH, Simonis G, Schon SP, et al., Two distinct mechanisms mediate a differential regulation of protein kinase C isozymes in acute and prolonged myocardial ischaemia. *Circ Res* 1999, 85, 77-87
- [69] Strasser RH, Braun-Dullaeus R, Walendzik H, et al., Alpha-1-receptor-independent activation of protein kinase C in acute myocardial ischemia. *Circ Res* 1992, 70, 1304-1312
- [70] Chen L, Hahn H, Wu G, et al., Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of δ PKC and ϵ PKC. *PNAS* 2001, 98, 11114-11119
- [71] Inagaki K, Hahn HS, Dorn GW, et al., Additive protection of the ischemic heart ex vivo by combined treatment with δ -PKC inhibitor and ϵ -PKC Activator. *Circulation* 2003, 108, 869-875
- [72] Inagaki K, Chen L, Ikeno F, et al., Inhibition of δ -PKC protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation* 2003, 108, 2304-2307

- [73] Baines CP, Zhang J, Wang GW, et al., Mitochondrial PKC epsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKC epsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKC epsilon-induced cardioprotection. *Circ Res* 2002, 90, 390-397
- [74] Wang Y, Ashraf M, Role of protein kinase C in mitochondrial K-ATP-channel mediated protection against Ca^{2+} overload injury in rat myocardium. *Circ Res* 1999, 84, 1156-1165
- [75] Mitchell MB, Meng X, Ao L, et al., Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ Res* 1995, 76, 73–81
- [76] Kawamura S, Yoshida K, Miura T, et al., Ischemic preconditioning translocates PKC- δ and ϵ , which mediate functional protection in isolated rat heart. *Am J Physiol* 1998, 275, H2266–H2271
- [77] Tsouka V, Markou T, Lazou A, Differential Effect of Ischemic and Pharmacological Preconditioning on PKC Isoform Translocation in Adult Rat Cardiac Myocytes. *Cell Physiol Biochem* 2002, 12, 315-324
- [78] Mayr M, Metzler B, Chung YL, et al., Ischemic preconditioning exaggerates cardiac damage in PKC- δ null mice. *Am J Physiol* 2004, 287, H946-H956
- [79] Fryer RM, Wang J, Hsu AK, et al., Essential activation of PKC- δ in opioid-initiated cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, 280, H1346-H1353
- [80] Fryer RM, Hsu AK, Wang J, et al., PKC-delta inhibition does not block preconditioning-induced preservation in mitochondrial ATP synthesis and infarct size reduction in rats. *Basic Res Cardiol* 2002, 97, 47-54
- [81] Hassouna A, Matata BM, Galinanes M, PKC- ϵ is upstream and PKC- α is downstream of mitoK-ATP channels in the signal transduction pathway of ischemic preconditioning of human myocardium. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, 287, C1418-C1425
- [82] Rebecchi MJ, Pentylala SN, Anaesthetic actions on other targets: protein kinase C and guanine nucleotide-binding proteins. *Br J Anaesth* 2002, 89, 62-78
- [83] Uecker M, daSilva R, Grampp T, et al, Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* 2003, 99, 138-147
- [84] Aizawa K, Turner LA, Weihrauch D, et al., Protein Kinase C ϵ primes the cardiac sarcolemmal adenosine triphosphat-sensitive potassium channel to modulation by isoflurane. *Anesthesiology* 2004, 101, 381-189
- [85] Bouwman RA, Musters RJ, van Beek-Harmsen BJ, et al., Reactive oxygen species precede protein kinase C- δ activation independent of ATP-sensitive mitochondrial channel opening in sevoflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 2004, 100, 506-514

- [86] Seger R, Krebs EG, The MAPK signalling cascade. *FASEB J* 1995, 9, 726-735
- [87] Cano E, Mahadevan LC, Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *TIBS* 1995, 20, 117-122
- [88] Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, et al., Stimulation of stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. *Circ Res* 1996, 79, 162-173
- [89] Stokoe D, Campbell DG, Nakielny S, et al., MAPKAPK-2 : a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein-kinase. *EMBO J* 1992, 11, 3985-3994
- [90] Zu YL, Ai Y, Gilchrist A, et al., High expression and activation of MAPKAPK-2 in cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 1997, 29, 2159-2186
- [91] Stokoe D, Engel K, Campbell DG, et al., Identification of MAPKAPK-2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Letters* 1992, 313, 307-313
- [92] Rouse J, Cohen P, Trigon S, et al., A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAPK-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 1994, 78, 1027-1037
- [93] Ben-Levy R, Leighton IA, Doza YN, et al., Identification of novel phosphorylation sites required for activation of MAPKAP kinase-2. *EMBO J* 1995, 14, 5920-5930
- [94] Kotlyarov A, Gaestel M, Is MK2 the key for understanding post transcriptional regulation of gene expression? *Biochem Soc Transact* 2002, 30, 959-963
- [95] Rousseau S, Houle F, Landry J, et al., p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 1997, 15, 2169-2177.
- [96] Kotlyarov A, Neininger A, Schubert C, et al., MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF- α biosynthesis. *Nature Cell Biol* 1999, 1, 94-97
- [97] Kotlyarov A, Yannoni Y, Fritz S, et al., Distinct cellular functions of MK2. *Mol Cell Biol* 2002, 22, 4827-4835
- [98] Bernard O, LIM kinases, regulators of actin dynamics. *IJBCB* 2006, doi:10.1016/j.biocel.2006.11.011
- [99] Kobayashi M, Nishita M, Mishima T, et al., MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration. *EMBO* 2006, 25, 713-726
- [100] Huang CK, Zhan L, Ai Y et al., LSP1 is the major substrate for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils. *J Biol Chem* 1997, 272, 17-1

- [101] Eyers CE., McNeill H, Knebel A., et al., The phosphorylation of CapZ-interacting protein (CapZIP) by stress-activated protein kinases triggers its dissociation from CapZ. *Biochem J* 2005, 389, 127–135
- [102] Rousseau S, Peggie M, Campbell DG, et al., Nogo-B is a new physiological substrate for MAPKAP-K2. *Biochem J* 2005, 391, 433–440
- [103] Antón IM, Jones GE, WIP: A multifunctional protein involved in actin cytoskeleton regulation. *Eur J Cell Biol* 2006, 85, 295-304
- [104] Ping P, Murphy E, Role of p38 mitogen-activated protein-kinases in preconditioning: a detrimental factor or a protective kinase? *Circ Res* 2000, 86, 921-922
- [105] Maulik N, Watanabe M, Zu YL, et al., Ischemic preconditioning triggers activation of MAP kinases and MAPKAPK-2 in rat hearts. *FEBS Letters* 1996, 396, 233-237
- [106] Maulik N, Yoshida T, Zu YL, et al., Ischemic preconditioning triggers tyrosine kinase signaling: a potential role for MAPKAPK-2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998, 275, H1857-H1864
- [107] Nakano A, Baines CP, Kim SO, et al., Ischemic preconditioning activates MAPKAPK-2 in the isolated rabbit heart. *Circ Res* 2000, 86, 144-151
- [108] Ismaeil MS, Tkachenko I, Hickey RF, et al., Colchicine inhibits isoflurane-induced preconditioning. *Anesthesiology* 1999, 91, 1816-1822
- [109] Mounier N, Arrigo AP, Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones* 2002, 7, 167-176
- [110] Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, et al., Regulation of actin filament dynamics by p38 MAP kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci* 1997, 110, 357-386
- [111] Huot J, Houle F, Spitz DR, et al., HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin filament fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res* 1996, 56, 273-279
- [112] Khurana T, Khurana B, Noegel AA, LIM proteins: association with the actin cytoskeleton. *Protoplasma* 2002, 219, 1-12
- [113] Hall A, Nobes CD, Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Phil Trans R Soc Lond B* 2000, 355, 965-970
- [114] Snoeckx LH, Corenlussen RN, van Nieuwenhoven FA, et al., Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* 2001, 81, 1461-1497
- [115] Eaton P, Awad WI, Miller JI, et al., Ischemic preconditioning: a potential role for constitutive low molecular weight stress protein translocation and phosphorylation? *J Mol Cell Cardiol* 2000, 32, 961-971.

- [116] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al., Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193, 265-270
- [117] Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680-685
- [118] Clerk A, Michael A, Sugden PH, Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochem J* 1998, 333, 581-589
- [119] Haq SE, Clerk A, Sugden PH, Activation of mitogen-activated protein kinases (p38-MAPKs, SAPKs/JNKs and ERKs) by adenosine in the perfused rat heart. *FEBS Letters* 1998, 434, 305-308
- [120] Magne S, Couchie D, Pecker F, et al., Beta(2)-adrenergic receptor agonists increase intracellular free Ca(2+) concentration cycling in ventricular cardiomyocytes through p38 and p42/44 MAPK-mediated cytosolic Phospholipase A(2) activation. *J Biol Chem* 2001, 276, 39539-39548
- [121] Abe J, Baines CP, Berk BC, Role of mitogen-activated protein kinases in ischemia and reperfusion injury: the good and the bad. *Circ Res* 2000, 86, 607-609
- [122] Gaestel M, Schroder W, Benndorf R, et al., Identification of the phosphorylation sites of the murine small heat shock protein hsp25. *J Biol Chem* 1991, 266, 14721-14724
- [123] Sakamoto K, Urushidani T, Nagao T, Translocation of HSP27 to sarcomere induced by ischemic preconditioning in isolated rat hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 269, 137-142
- [124] McPherson BC, Yao Z, Signal transduction of opioid-induced cardioprotection in ischemia-reperfusion. *Anesthesiology* 2001, 94, 1082-1088
- [125] Novalija E, Kevin LG, Camara AK, et al., Reactive oxygen species precede the ϵ isoform of protein kinase C in the anesthetic preconditioning signaling cascade. *Anesthesiology* 2003, 99, 421-428
- [126] Ludwig LM, Weihrauch D, Kersten JR, et al., Protein kinase C translocation and Scr protein tyrosine kinase activation mediate isoflurane-induced preconditioning in vivo. *Anesthesiology* 2004, 100, 532-539
- [127] Toma O, Weber NC, Wolter JI, et al., Desflurane preconditioning induces time-dependent activation of protein kinase C ϵ and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in the rat heart in vivo. *Anesthesiology* 2004, 101, 1372-1380
- [128] Martin JL, Mestril R, Hilal-Dandan R, et al., Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation* 1997, 96, 4343-4348

- [129] Engel K, Schultz H, Martin F, et al., Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 by mutation of phosphorylation sites and an A-helix motif. *J Biol Chem* 1995, 270, 27213-27221
- [130] Sandhu R, Diaz RJ, Mao GD, et al., Ischemic preconditioning: differences in protection and susceptibility to blockade with single-cycle versus multicycle transient ischemia. *Circulation* 1997, 96, 984-995
- [131] Riess ML, Kevin LG, Camara AK, et al., Dual exposure to sevoflurane improves anesthetic preconditioning in intact hearts. *Anesthesiology* 2004, 100, 569-574
- [132] Davies SP, Reddy H, Caivano M, et al., Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 2000, 351, 95-105
- [133] Li Y, Kloner RA, Does protein kinase C play a role in ischemic preconditioning in rat hearts? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1995, 268, H426-H431
- [134] Rybin VO, Steinberg SF, Immunoblotting PKC-delta: a cautionary note from the bench. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006, 290, C750-756
- [135] Ferdinandy P, Szilvassy Z, Baxter GF, Adaptation to myocardial stress in disease states: is preconditioning a healthy heart phenomenon? *Trends Pharmacol Sci* 1998, 19, 223-229
- [136] Ferdinandy P, Myocardial ischaemia/reperfusion injury and preconditioning: effects of hypercholesterolaemia/hyperlipidaemia. *Br J Pharmacol* 2003, 138, 283-285
- [137] Weber NC, Toma O, Wolter JI, et al., Mechanisms of xenon- and isoflurane-induced preconditioning - a potential link to the cytoskeleton via the MAPKAPK-2/HSP27 pathway. *Br J Pharmacol* 2005, 146, 445-55

Während der Erstellung dieser Arbeit entstanden folgende Originalarbeiten:

Weber NC, Toma O, Wolter JI, Wirthle NM, Schlack W, Preckel B
Mechanisms of xenon- and isoflurane-induced preconditioning - a potential link to the cytoskeleton via the MAPKAPK-2/HSP27 pathway
Br J Pharmacol 2005, 146, 445-55

Weber NC, Stursberg J, Wirthle NM, Toma O, Schlack W, Preckel B
Xenon preconditioning differently regulates p44/42 MAPK (ERK1/2) and p46/54 MAPK (JNK 1/2 and 3) in vivo
Br J Anaesthesia 2006, 97, 298-306

Poster/Abstracts

Wirthle NM, Weber NC, Wolter JI, Toma O, Schlack W, Preckel B
Xenon Präkonditionierung induziert eine Isoform-spezifische Aktivierung der Protein Kinase C im Rattenmyokard
HAI 2005, Berlin

Wirthle NM, Weber NC, Wolter JI, Toma O, Schlack W, Preckel B
Das Heat-Shock-Protein 27 (HSP27) und die Mitogen-Aktivierte-Proteinkinase-Aktivierte-Proteinkinase-2 (MAPKAPK-2) sind an der Xenon induzierten Präkonditionierung des Rattenmyokards beteiligt
DAC 2005, München

Weber NC, Toma O, Wolter JI, Wirthle NM, Schlack W, Preckel B
Xenon Induced Pharmacological Preconditioning Involves The MAPKAPK-2/HSP27 Pathway Downstream of PKC and P38 MAPK
-A Potential Link To The Cytoskeleton Of The Cardiomyocyte-
DGPT Meeting 2005, Mainz

Weber NC, Toma O, Wolter JI, Wirthle NM, Schlack W, Preckel B
Xenon Preconditioning Induces Phosphorylation of Small Heat Shock Protein 27 Downstream of Protein Kinase C and p38 Mitogen Activated Protein Kinase in the Rat Heart
ASA Meeting 2004, New Orleans

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Schlack und Herrn Priv. Doz. Dr. med. Preckel für die freundliche Überlassung des Themas und für die hervorragende Betreuung und kritische Begleitung während der Durchführung der Studie.

Besonders danke ich auch Frau Dr. rer. nat. Nina Weber für ihre ununterbrochene Bereitschaft zur Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und der Erstellung der Dissertation.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. Jan Frässdorf und Herrn Dr. med. Octavian Toma für die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der in-vivo Experimente, Frau Dipl.-Biol. Nadine Dyballa für die Durchführung der Massenspektrometrie sowie Frau Jessica Wolter und Herrn Jörg Stursberg stellvertretend für alle Mitdoktoranden für die exzellente Zusammenarbeit im Labor.

Außerdem danke ich allen, die mir außerhalb der Klinik bei der Erstellung dieser Arbeit zur Seite gestanden und mir dies ermöglicht haben.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Nicole Maria Wirthle
Adresse	Krahkampweg 55, 40221 Düsseldorf
Geburtsort	Düsseldorf
Geburtsdatum	01. März 1981
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1987-1991	Matthias-Claudius-Grundschule Kaarst
1991-2000	Albert-Einstein-Gymnasium Kaarst
Juni 2000	Abitur

Studium

ab Oktober 2000	Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
September 2002	Ärztliche Vorprüfung
September 2003	1. Staatsexamen
September 2005	2. Staatsexamen
ab Oktober 2005	Praktisches Jahr mit Wahlfach Anästhesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
November 2006	3. Staatsexamen und Approbation als Ärztin

Düsseldorf, im November 2006

Zusammenfassung

Molekulare Mechanismen der Xenon Präkonditionierung: Rolle der PKC α , PKC δ und Verknüpfung mit dem Zytoskelett über die MAPKAPK-2 **Vorgelegt von: Nicole M. Wirthle**

Für volatile Anästhetika ist bekannt, dass sie einen präkonditionierenden Effekt auf das Myokard haben. Auch das Edelgas Xenon induziert diese Form der Kardioprotektion, dies konnte am Rattenherzen in-vivo gezeigt werden. Xenon-induzierte Präkonditionierung wird über die PKC und die p38 MAPK vermittelt. Möglicherweise beteiligte Isoformen der PKC sind - neben der PKC ϵ - die PKC α und δ . Unterhalb der PKC kann die p38 MAPK über die MAPKAPK-2 und das HSP 27 mit dem Zytoskelett interagieren. Ziel dieser Arbeit war die weitere Erforschung des molekularen Mechanismus der Xenon Präkonditionierung im Rattenmyokard. Dazu wurde zunächst mittels Infarktgrößenbestimmung nach regionaler Ischämie und Western Blot Analyse untersucht, ob die PKC Isoformen α und δ an der Xenon Präkonditionierung beteiligt sind. Außerdem wurde im Western Blot und mittels Immunfluoreszenzfärbung überprüft, ob Xenon die Aktivierung der MAPKAPK-2 und eine Verknüpfung des HSP 27 mit dem Zytoskelett auslösen kann. Neben Xenon wurde zum Vergleich bei diesen Experimenten auch das volatile Standardanästhetikum Isofluran untersucht.

Durch Xenon Präkonditionierung (3x5 Minuten, 0.4 MAC) wurde die Infarktgröße signifikant reduziert (Kontrolle: $50 \pm 15\%$, Xe-PC: $30 \pm 10\%$, $p < 0.05$), die Applikation des PKC delta Inhibitors Rottlerin konnte diesen Schutz nicht aufheben (Xe-PC+Rottlerin: $33 \pm 12\%$, $p < 0.05$ vs. Kontrolle). Im Western Blot der PKC α konnte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine signifikante Aktivierung nachgewiesen werden. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigte sich für die vier verschiedenen Zeitpunkte während und nach der Präkonditionierung keine signifikante Steigerung der Phosphorylierung der PKC α . Xenon induzierte jedoch die Phosphorylierung der MAPKAPK-2 (Xenon: 1.6 ± 0.1 AVI, Isofluran: 1.5 ± 0.1 AVI, Kontrolle: 1.0 ± 0.1 AVI, $p < 0.05$). Die Inhibitoren der PKC und der p38 MAPK hoben diesen Effekt auf. Die Immunfluoreszenzuntersuchung nach Xenon Präkonditionierung ergab eine Co-Lokalisation von phosphoryliertem HSP 27 und F-Actin. Diese Komplexbildung von HSP 27 und Actin konnte im Western Blot nach Co-Immunpräzipitation bestätigt werden.

Wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist also, dass im molekularen Mechanismus der Xenon Präkonditionierung des Herzens unterhalb der PKC und der p38 MAPK die MAPKAPK-2 durch Phosphorylierung aktiviert wird und zusammen mit dem HSP 27, welches nach Xenon Präkonditionierung mit F-Actin co-lokalisiert ist, eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Zytoskeletts einnimmt. Die untersuchten Isoformen der PKC (α und δ) scheinen an der Xenon Präkonditionierung nicht beteiligt zu sein. Durch die Xenon Präkonditionierung wird demnach eine Isoform spezifische Aktivierung der PKC induziert. In der vorliegenden Arbeit konnten damit zum ersten Mal weitere Teile der Signaltransduktionskette aufgedeckt und ein Hinweis auf einen möglichen Endeffektor der Xenon Präkonditionierung gegeben werden.

Düsseldorf, November 2006

