

Aus dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der
Universität zu Lübeck

Kommissarischer Direktor: Herr Prof. Dr. med. W. Solbach

**Die Beteiligung der MAP-Kinasen p38, p42/p44 und
JNK 1/2 an der heterotopen Präkonditionierung:
Ein Vergleich zur ischämischen Präkonditionierung**

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

- Aus der medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von
Annegret Naumann
aus Leipzig

Lübeck 2010

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	7
1.1 Formen der Präkonditionierung des Herzens vor einer myokardialen Ischämie.....	7
1.2 Mechanismen der Ischämischen Präkonditionierung.....	8
1.2.1 Auslösende Faktoren.....	8
1.2.2. Mediatoren der Ischämischen Präkonditionierung.....	9
1.2.3 Endeffektoren der Ischämischen Präkonditionierung.....	12
1.3 Mechanismen der heterotopen im Vergleich zur ischämischen Präkonditionierung: Gemeinsamkeiten und Unterschiede.....	13
1.4 Fragestellung.....	16
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Versuchsabläufe.....	17
2.2 Infarktgrößenbestimmung.....	18
2.2.1 Versuchstiere.....	18
2.2.2 Präparation der Versuchstiere.....	19
2.2.3 Entnahme des Herzens und Erfassung der Infarktareale.....	21
2.3 Analyse der MAP-Kinasen	22
2.3.1 Probenaufbereitung.....	22
2.3.2 Proteinbestimmung nach LOWRY.....	23
2.3.3 Proteinanalyse mittels Westernblot.....	23
2.4 Statistik.....	24
2.5 Geräte und Materialien.....	26
2.6 Substanzen und Lösungen.....	27
3 Ergebnisse.....	31
3.1 Hämodynamik.....	31
3.2 Reduktion der Infarktgröße durch eine ischämische bzw. heterotope Präkonditionierung.....	34
3.3 Einfluss der MAP-Kinase-Inhibitoren SB203580, PD98059 und SP600125 auf die Infarktgröße.....	36
3.4 Analyse der MAP-Kinasen Aktivierung nach heterotoper Präkonditionierung im Jejunum und im Myokard.....	37
3.5 Analyse der MAP-Kinasen Aktivierung nach ischämischer Präkonditionierung im Myokard.....	41

<u>4 Diskussion.....</u>	<u>43</u>
<u>4.1 Bedeutung der p38, p42/44 und JNK1/2 MAP-Kinasen für die intrazelluläre Signaltransduktion im Myokard und Jejunum nach ischämischer und heterotoper Präkonditionierung.....</u>	<u>43</u>
<u>4.1.1 Die Rolle der p38 MAP-Kinase</u>	<u>44</u>
<u>4.1.1 Bedeutung der p42 und p44 MAP-Kinasen.....</u>	<u>46</u>
<u>4.1.2 JNK 1 und 2.....</u>	<u>47</u>
<u>4.2 Einfluss der MAP-Kinasen nach heterotoper Präkonditionierung auf das Myokard.</u>	<u>48</u>
<u>4.3 Einfluss der MAP-Kinase-Inhibitoren.....</u>	<u>50</u>
<u>5 Zusammenfassung.....</u>	<u>53</u>
<u>6 Literaturverzeichnis.....</u>	<u>55</u>
<u>7 Danksagung.....</u>	<u>66</u>
<u>8 Lebenslauf.....</u>	<u>67</u>

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. A. Dendorfer

2. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. F. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.März 2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 29.März 2011

Abkürzungsverzeichnis

AAR	„Area at risk“ (Ischämiegebiet)
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMK	Big MAP-Kinase
BSA	bovines Serumalbumin
CCD	„charged coupled device“
CGRP	Calcitonin gene related peptide
DAG	Diacylglycerol
ERK	extrazellulär signal-regulierte Proteinkinasen
HF	Herzfrequenz
IG	absolute Infarktgröße
ISG	Ischämiegebiet
IP	Ischämische Präkonditionierung
JNK	c-Jun NH ₂ -terminale Proteinkinasen
KAO	Koronararterienokklusion
LAD	„left anterior descending artery“ (= anterior deszendierender Ast der linken Koronararterie)
LVG	Größe des linken Ventrikels
MAD	mittlerer arterieller Blutdruck
MAO	Mesenterialarterienokklusion
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
MKK	MAP-Kinase Kinase
mPTP	“Permability Transition Pore”
NaCl	Natriumchloridlösung
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglykol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinyliden Difluorid
RP	Remote Preconditioning (heterotope Präkonditionierung)
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
TK	Tyrosinkinase
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCL	Tris-(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Formen der Präkonditionierung des Herzens vor einer myokardialen Ischämie

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören seit Jahrzehnten zu den führenden Erkrankungs- und Todesursachen in den westlichen Industrienationen. Die koronare Herzkrankheit, der akute Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz stellten nach Angaben des Statistischen Bundesamtes in Deutschland im Jahr 2008 die häufigsten Todesursachen bei Frauen und Männern dar (Statistisches Bundesamt, 2008). Daher besteht ein großes Interesse, die zugrundeliegende Pathophysiologie dieser Erkrankungen möglichst detailliert zu verstehen, um nicht nur vorhandene Therapieschemata zu optimieren, sondern mehr noch frühzeitig präventive Maßnahmen ergreifen zu können. Ein derzeit viel beobachteter Ansatzpunkt besteht darin, das Herz bereits frühzeitig vor einer Ischämie zu schützen, die, auch wenn sie nicht unbedingt letal ist, dennoch irreversible Schäden im Myokard hinterläßt.

Schon vor 20 Jahren wurde von Murry und Kollegen erstmals der Mechanismus einer endogenen Kardioprotektion entdeckt: die ischämische Präkonditionierung (IP). Die Arbeitsgruppe beschrieb in einer 1986 veröffentlichten Studie erstmals ein Verfahren, mit dem die Toleranz des Herzens gegenüber gravierenden Ischämien erhöht und der Ischämie-Reperfusionsschaden am Herzen verringert werden konnte (Murry et al., 1986). Dies wurde erreicht, indem das Myokard durch Okklusion einer Koronararterie mit wiederholten kurzen Episoden von Ischämien und Reperfusionen präkonditioniert wurde. Bei einem sich daran anschließenden, länger andauernden ischämischen Insult war die infarzierte Fläche signifikant kleiner als bei einem Infarkt ohne vorausgegangene Präkonditionierung. In weiteren Studien wurde gezeigt, dass sich die protektive Wirkung dieser klassischen ischämischen Präkonditionierung nicht nur auf eine Verringerung der Infarktgröße beschränkte, die Präkonditionierung führte zudem zu einer Reduktion der postischämischen kontraktile Dysfunktion und einer verbesserten funktionalen Rekonvaleszenz sowie zu einer Abnahme ventrikulärer Arrhythmien in der Reperusionsphase (Cave, 1992; Volvosek et al., 1992; Osada et al., 1991; Lujan, Dicarolo 2009). Die positiven Effekte ließen sich in einer Vielzahl bislang untersuchter Spezies wie beispielsweise Hund, Maus, Schwein oder Kaninchen reproduzieren, und lassen sich mehr noch offenbar auch auf das menschliche Myokard übertragen (Hausenloy et al., 2007; Loukogeorgakis et al., 2007).

Bemerkenswert ist die Entdeckung, dass nicht nur das Myokard im Stromgebiet der Koronararterie, welche zum Zweck der Präkonditionierung okkludiert wurde, geschützt werden kann, sondern auch außerhalb des Stromgebiets gelegene Areale des Herzens (Przyklenk et al., 1993). Dieses Phänomen wurde daher als heterotope Präkonditionierung beziehungsweise als „Remote Preconditioning“ (RP) bezeichnet.

Der Begriff der heterotopen Präkonditionierung wird mittlerweile auch für eine andere Variante der Präkonditionierung gebraucht, bei der das Myokard durch kurzzeitige Ischämien mit anschließender Reperfusion in anderen Organsystemen ebenso effektiv präkonditioniert werden kann. Erstmals beschrieben wurde diese Art der Präkonditionierung 1993 von McClanahan et al. sowie etwas später, 1996, von Gho und Kollegen, die eine Kardioprotektion durch Ischämien in der Niere beziehungsweise im Dünndarm hervorrufen konnten.

Wie bei der ischämischen Präkonditionierung beschränkte sich der kardioprotektive Effekt auch bei der heterotopen Präkonditionierung nicht alleine auf die Infarktgrößenreduktion, sondern es ließen sich ebenfalls weitere positive Einflüsse auf das Myokard wie beispielsweise ein antiarrhythmischer Effekt nachweisen (Oxman et al., 1997).

1.2 Mechanismen der Ischämischen Präkonditionierung

Das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung ist seit der Erstentdeckung 1986 nach wie vor Gegenstand zahlreicher experimenteller und klinischer Studien. Dementsprechend sind mittlerweile multiple Faktoren identifiziert worden, die an der Signaltransduktion der Präkonditionierung beteiligt sind und die in auslösende Faktoren (Trigger), Mediatoren und Endeffektoren eingeteilt werden.

1.2.1 Auslösende Faktoren

Zu den Triggern der ischämischen Präkonditionierung werden zum einen physiologische und chemische Umwelteinflüsse wie beispielsweise Hypothermie, Hypoxie oder Überdehnung und zum anderen endogene oder exogen zugeführte Substanzen gezählt, die über rezeptorvermittelte oder rezeptorunabhängige Mechanismen ihre Wirkung entfalten. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Adenosin, endogene Katecholamine, Bradykinin und Opioide durch spezifische Aktivierung ihrer entsprechenden Rezeptoren das Herz durch Präkonditionierung wirksam schützen (Liu et al., 1991; Schultz et al., 1995; Wall et al., 1995).

Zudem sind weitere endogene Substanzen wie Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid (NO) und Kalzium an der Präkonditionierung des Herzens beteiligt, wobei deren Wirkung rezeptorunabhängig zustande zu kommen scheint (Baines et al., 1997).

Neurohumorale Substanzen wie Norepinephrin, Endothelin und Angiotension führen nur zu einer Protektion, wenn sie exogen zugeführt werden, da eine suffiziente endogene Ausschüttung dieser Faktoren physiologischerweise nicht in ausreichender Menge stattfindet (Tsuchida et al., 1994; Liu et al., 1995; Wang et al., 1996).

1.2.2. Mediatoren der Ischämischen Präkonditionierung

Es wurde für viele Proteinkinasen beschrieben, dass sie an der Signaltransduktion der ischämischen Präkonditionierung beteiligt sind. Zu erwähnen sind hier in erster Linie die Proteinkinase C, die mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen), die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI3K) und Akt, auch als Proteinkinase B bezeichnet.

Proteinkinasen sind essenzielle Regulatoren zahlreicher biologischer Prozesse in der Zelle. Speziell in Kardiomyozyten gehört zu den Funktionen der Proteinkinasen die Regulation der Kontraktion, des Metabolismus, der Genexpression und des Wachstums. Fast alle Proteinkinasen werden durch eine Veränderung ihres Phosphorylierungsstatus, das heißt durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung, aktiviert beziehungsweise inaktiviert. Im Folgenden soll auf die wichtigsten Proteinkinasen genauer eingegangen werden.

Proteinkinase C (PKC)

Vor allem für die Familie der Proteinkinasen C (PKC) konnte gezeigt werden, dass sie eine Schlüsselrolle für die Mediation zellulärer Schutzmechanismen der Kardiomyozyten spielt. Bei den PKC handelt es sich um Seronin-/ Threonin-Kinasen. Von der PKC sind bislang 12 Isoformen bekannt. Die Isoformen der PKC werden in drei Gruppen eingeteilt: der „conventional“ (PKC α , β I, β II, γ), „novel“ (δ , ϵ , η , θ) und „atypical“ (λ , ζ) PKC (Armstrong 2003).

Die Aktivierung der PKC während der ischämischen Präkonditionierung beruht auf einer Freisetzung von Diacylglycerol (DAG) aus der Zellmembran nach Stimulierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren und ist an eine Verschiebung der PKC von der zytosolischen in die partikuläre Fraktion gebunden. Offenbar ist in erster Linie die Translokation der PKC Isoform ϵ für die kardioprotektive Wirkung verantwortlich (Ping et al., 1997; Wolfrum et al. 2001), während der Aktivierung der ϕ Form eine eher schädliche Wirkung zugeschrieben wird.

Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen)

Die MAP-Kinasen werden in drei Untergruppen eingeteilt: die extrazellulär signal-regulierten Proteinkinasen (ERK 1 und 2 oder entsprechend ihrem Molekulargewicht auch als p42/44 bezeichnet), die c-Jun NH₂-terminalen oder stressaktivierten Proteinkinasen (JNK 1 und 2 oder p46/54) und die p38-Familie. Kürzlich wurde zudem die Big MAP Kinase (BMK) entdeckt, deren Funktion jedoch insbesondere bei der Präkonditionierung noch völlig unbekannt ist.

Die Signaltransduktionswege der MAP-Kinasen verlaufen über drei Ebenen – eine MAPK Kinase Kinase (MKK), die eine MAPK Kinase aktiviert, welche wiederum letztlich die MAP-Kinase aktiviert. Diese Aktivierung erfolgt durch eine duale Phosphorylierung an einem Threonin (Thr)- und einem Tyrosin(Tyr)-Rest. Die MAP-Kinasen selbst wiederum aktivieren ebenfalls durch Phosphorylierung verschiedene Substrate, darunter auch eine große Anzahl von Zellkernproteinen wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren.

Die p42/44 MAP-Kinasen werden in erster Linie von Wachstumsfaktoren aktiviert. Ihre Aktivierung spielt vor allem eine Rolle bei der Zellteilung sowie bei der Proliferation und Differenzierung der Zelle.

Im Gegensatz dazu werden die JNK 1/2 und die p38 MAP-Kinasen vor allem durch Stressstimulatoren aktiviert. Solche Stimuli sind beispielsweise bakterielle Lipopolysaccharide oder Zytokine wie Interleukine und der Tumornekrosefaktor (TNF). Auch hier führt die Aktivierung zu einer veränderten Transkription, Translation und Aktivierung von Faktoren, die für das Überleben der Zelle und bei Entzündungsprozessen involviert sind.

Für alle drei Unterfamilien, ERK, JNK und p38, wurde eine Aktivierung während der ischämischen Präkonditionierung nachgewiesen (Kim et al., 1999; Nakano et al., 2000; Behrends et al., 2000). Am besten untersucht ist die p38 MAP-Kinase. Dennoch wird ihre Bedeutung noch sehr kontrovers diskutiert, da in den zahlreichen Studien durchaus kontroverse Ergebnisse erzielt wurden. Es besteht jedoch weitestgehend Konsens, dass die p38 MAP-Kinase während einer globalen Ischämie durch Phosphorylierung des Threoninrestes an der Aminosäure 180 und des Tyrosinrestes an der Aminosäure 182 aktiviert wird. (Bogoyevitch et al., 1996; Shimizu et al., 1998; Behrends et al., 2000; Sanada et al., 2001). Weitergehende Experimente mit dem spezifischen p38 MAP-Kinase-Inhibitor SB203580 lieferten ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse: In einigen Untersuchungen wurde eine vollständige Aufhebung der kardioprotektiven Wirkung nach vorausgegangener Gabe von SB203580 beobachtet und damit eine indirekte Beteiligung

von p38 MAP-Kinase nachgewiesen. Andere Studien zeigten, dass sich nicht nur die postischämische Funktionalität der Kardiomyozyten nach Verabreichung von SB203580 verbesserte, sondern die Kardiomyozyten auch vor dem Zelltod bewahrt wurden (Saurin et al., 1999; Schneider et al., 1999; Barancik et al., 2000). Endgültige Klarheit über die Bedeutung der p38 MAP-Kinase in der Präkonditionierung konnte bis heute noch nicht erlangt werden.

Auch für die MAP-Kinasen p42/44 wurde eine Aktivierung im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung beschrieben. Die Aktivierung von p42/44 MAP-Kinasen erfolgt durch die MKK MEK 1/2, die p 42/44 MAP-Kinasen am Threoninrest 202 und am Tyrosinrest 204 phosphoryliert. Eine Ischämie des Myokards alleine führt dabei einigen Untersuchungen zufolge nicht zu einer Aktivierung, sondern erst eine Reperfusion resultierte in erhöhten Werten des phosphorylierten Anteils der p42/44 MAP-Kinasen (Barancik et al., 1997; Mizukami und Yoshida, 1997; Behrends et al., 2000; Yue et al., 2000). Die Aktivierung im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung und die damit verbundene schützende Wirkung vor einer funktionellen Schädigung des Myokards durch eine länger dauernde Ischämie wird zusätzlich durch mehrere Studien mit dem MEK 1 Inhibitor PD98059 unterstrichen. Nach Gabe von PD98059 wurde dementsprechend eine Aufhebung des kardioprotektiven Effekts im isolierten Rattenherz (Hausenloy et al., 2005) sowie im Kaninchen (Ping et al., 1999), in der Ratte (Fryer et al., 2001) und im Schwein (Strohm et al., 2000) *in vivo* beschrieben. Wie im Fall der p38 MAP-Kinase wurden aber auch hier widersprüchliche Ergebnisse gefunden, da in einigen Studien wiederum kein Einfluss von PD98059 auf die ischämische Präkonditionierung beobachtet werden konnte (Kim et al., 1999; Mocanu et al., 2002). In den vergangenen Jahren stellte sich außerdem heraus, dass die p42/44 MAP-Kinasen vor allem eine Rolle als protektiver Faktor in der Reperfusionsphase nach einer ausgeprägten Ischämie spielen. Deshalb werden die MAP-Kinasen p42/44 neben der Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI3K) mittlerweile als entscheidender Bestandteil des sogenannten „Reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway“ betrachtet, da ihre Aktivierung zu einer Verringerung des myokardialen Gewebes Schadens nach einer Ischämie führt (Hausenloy et al., 2004).

Eine weitere Gruppe der MAP-Kinasen, die JNK 1 und 2, ist bislang nur sehr wenig untersucht und dementsprechend ist ihre Rolle in der Signalkaskade der ischämischen Präkonditionierung noch weitgehend unklar. Im isolierten Rattenherz wurde während einer Ischämie des Myokards eine Aktivierung der JNK 1 und 2 durch Phosphorylierung am Threoninrest 183 und Tyrosinrest 185 nachgewiesen (Sato et al., 2000). Die Beteiligung

der JNK 1/2 an der Signaltransduktion wurde in dieser Studie außerdem als erwiesen betrachtet, da Curcumin, ein Inhibitor der JNK 1/2, den kardioprotektiven Effekt der ischämischen Präkonditionierung aufhob. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass Curcumin als nicht besonders selektiv gilt was die Inhibierung der JNK 1 und 2 betrifft. Für eine Rolle der JNK 1/2 spricht außerdem, dass in Studien mit dem die p38 MAP-Kinase und JNK 1/2 aktivierenden Anisomycin eine Infarktgrößenreduktion sowohl im Kaninchen (Baines et al., 1999) als auch im Schwein (Barancik et al., 1999) *in vivo* erreicht werden konnte. Allerdings zeigte eine andere Studie, dass die durch Anisomycin induzierte Verringerung der Infarktfläche nicht mit dem für JNK spezifischen Inhibitor SP600125 aufgehoben werden konnte (Lochner et al., 2003).

1.2.3 Endeffektoren der Ischämischen Präkonditionierung

Die Frage nach Endeffektoren dieser Kinasenkaskade ist nach wie vor nicht endgültig geklärt. Diskutiert werden unter anderem die ATP abhängigen Kaliumkanäle, welche in hoher Dichte in der Zellmembran der Kardiomyozyten und in den Mitochondrien vorkommen. Eine Öffnung der Kanäle bewirkt einen Einstrom von Kaliumionen, der wiederum den intrazellulären Kalziumgehalt verringert, was letztlich in einem geringeren Energieverbrauch resultiert, indem die Kontraktionskraft vermindert wird (Leesar et al., 1997). Bestätigt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass durch die Gabe von Glibenclamid, welches die ATP abhängigen Kaliumkanäle blockiert, der protektive Effekt der Präkonditionierung aufgehoben wird (Gross et al., 1992).

Ein weiterer möglicher Angriffspunkt der PKC sind Proteine, die das Zytoskelett stärken und die Zelle damit resistenter gegen einen durch Ischämie verursachten Schaden machen (Downey et al., 1997).

Inzwischen ist zudem bekannt, dass eine „Permeability Transition Pore“ (mPTP) existiert, die in den inneren Mitochondrienmembranen lokalisiert ist und deren Öffnung für das Absterben der Kardiomyozyten in den ersten Minuten der Reperfusionphase verantwortlich ist. Über die Öffnung der mPTP kommt es zu einer ATP Freisetzung und zu einer Schwellung der Mitochondrien mit darauffolgendem Zelltod. Wird dementsprechend ein Öffnen der Kanäle in der Reperfusionphase verhindert, kann dies zu einer Kardioprotektion führen, da die Kardiomyozyten dem Zelltod entgehen (Hausenloy et al. 2007).

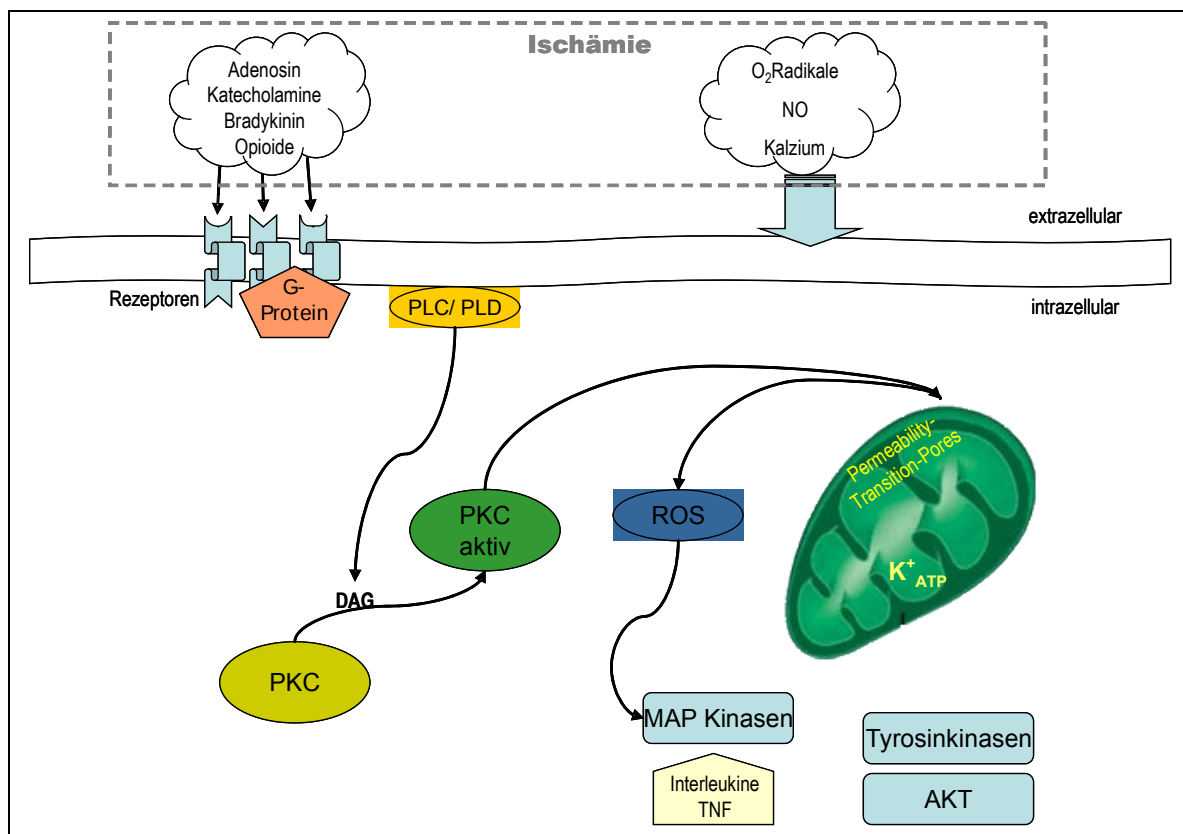


Abbildung 1:

Schematische Darstellung der Signaltransduktion der ischämischen Präkonditionierung. Eine Ischämie führt unter anderem zu einer Freisetzung von Adenosin, Bradykinin, Opioiden sowie Kalziumionen und freien Radikalen. Diese Substanzen vermögen durch Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren über ein G-Protein gekoppelten Mechanismus die Phospholipase C und/oder D (PLC/PLD) zu stimulieren. Dadurch wird über die Bildung von Diacylglycerol (DAG) die Proteinkinase C aktiviert. Diese wiederum initiiert durch ihre Translokation eine komplexe Kaskade von Aktivierungen weiterer Kinasen wie den Tyrosinkinase, Akt und MAP-Kinasen. Als mögliche Endeffektoren finden sich die ATP-abhängigen Kaliumkanäle und die „Permeability Transition Pores“ (mPTP) in den Mitochondrien.

1.3 Mechanismen der heterotopen im Vergleich zur ischämischen Präkonditionierung: Gemeinsamkeiten und Unterschiede

Entsprechend der zahlreichen Untersuchungen bezüglich der an der ischämischen Präkonditionierung beteiligten Faktoren stellte sich auch für die heterotope Präkonditionierung die Frage nach den Mechanismen, die im Organismus für die Vermittlung des kardioprotektiven Effekts verantwortlich sind. Eine der ersten Beobachtungen dahingehend war, dass eine Phase der Reperfusion für die Freisetzung von

Mediatoren vom präkonditionierten Organ zum Herzen für dessen Protektion unerlässlich ist (Gho et al., 1996; Birnbaum et al., 1997; Weinbrenner et al., 2002). Insgesamt sind die Mechanismen der heterotopen Präkonditionierung wesentlich weniger untersucht und daher auch noch weitgehend unklar.

Kurz nach der Entdeckung des Phänomens der heterotopen Präkonditionierung wurden zunächst die Faktoren untersucht, für die bereits eine wesentliche Rolle in der ischämischen Präkonditionierung gesichert ist. Es stellte sich heraus, dass Adenosin, Stickstoffmonoxid (NO), Bradykinin und endogene Opioide als Trigger ebenfalls bei der heterotopen Präkonditionierung beteiligt sind (Shoemaker et al., 2000; Liem et al., 2002; Küntscher et al., 2002; Patel et al., 2002).

Zur Frage der Weiterleitung des protektiven Signals vom präkonditionierten Organ zum Myokard werden zum einen ein humoraler und zum anderen ein neuronaler Übertragungsweg diskutiert. Die Hypothese der humoralen Transduktion wird gestützt durch eine Studie von Dickson und Kollegen, die nachwies, dass in einem isoliert perfundierten Kaninchenherz, das selbst keine Präkonditionierung, dafür aber per Transfusion das Koronareffluat eines anderen, präkonditionierten Kaninchenherzens erhielt, die Infarktgröße signifikant reduziert war. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren, dass das präkonditionierte Myokard einen Mediator in die Blutbahn abgibt, der entsprechend per Transfusion in ein nicht präkonditioniertes Myokard transferiert werden kann (Dickson et al., 1999). Dies würde bedeuten, dass nach heterotoper Präkonditionierung von diesem Organ ein Faktor in das kardiovaskuläre System abgegeben wird, der dann wiederum zum Herzen gelangt und dort durch Induktion einer intrazellulären Signalkaskade den protektiven Mechanismus hervorruft. Unterstützt wird diese These auch von einer kürzlich veröffentlichten Studie von Shimuzu und Kollegen, die ebenfalls einen kardioprotektiven Effekt nach Austausch eines Dialysates von präkonditionierten Kardiomyozyten zu nicht präkonditionierten Zellen beobachteten (Shimuzu et al., 2009). Bislang konnte dieser Mediator noch nicht eindeutig identifiziert werden. Interessant in diesem Zusammenhang sind jedoch Ergebnisse einer Studie, in der das Serum von zuvor präkonditionierten Ratten untersucht wurde (Lang et al., 2006). Es fand sich hier eine Veränderung der Proteinzusammensetzung des peripheren Blutes nach der heterotopen Präkonditionierung, wobei es sich in drei Proteinfractionen um einen Anstieg von Albuminfragmenten und in einem Fall um die Abnahme eines Leberregenerationsenzyms handelte (LRRG03). Bemerkenswert ist, dass die Veränderung der Albuminfraktion bereits vorher im Zusammenhang mit der klinischen Diagnose einer

subletalen myokardialen Ischämie untersucht worden war, in der zitierten Studie jedoch kein bestimmtes Protein als humoraler Mediator identifiziert wurde. Die Autoren spekulierten daher einen neuronalen Weg der Übertragung des protektiven Effekts.

Für einen solchen Weg der neuronalen Übertragung sprechen außerdem Studien, in denen nach Applikation von Hexamethonium, einem Stoff, der die Ganglien blockiert, die protektive Wirkung der heterotopen Präkonditionierung vollständig aufgehoben wurde (Gho et al., 1996). Zudem sind offenbar Capsaicin empfindliche sensorische Neurone, die in großer Zahl im Herz-Kreislaufsystem von höheren Lebensformen vorkommen, an der Vermittlung der heterotopen Präkonditionierung beteiligt. In ihren Nervenendigungen sind das Herz stimulierende Neuropeptide wie zum Beispiel Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) und Substanz P (SP) enthalten. Es konnte gezeigt werden, dass eine durch Capsaicin vermittelte verminderte Ausschüttung von CGRP aus den sensorischen Nervenendigungen zu einer Aufhebung des kardioprotektiven Effekts führt (Tang et al., 1999; Xiao et al., 2001).

Unabhängig vom Weg der Übertragung des Signals zum Herzen, wird im Myozyten ähnlich wie bei der ischämischen Präkonditionierung eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung myokardialer Adenosinrezeptoren (Pell et al., 1998) sowie die Aktivierung und Translokation der PKC ϵ (Weinbrenner et al., 2002; Wolfrum et al., 2002) und die damit verbundene Öffnung mitochondrialer und sarkolemmaler ATP abhängiger Kaliumkanäle (Pell et al., 1998; Wang et al., 2002) wesentliche Aspekte in der Signalkaskade der heterotopen Präkonditionierung sind.

Weitergehende Untersuchungen bezüglich zusätzlicher intrazellulärer Mechanismen der Signaltransduktion der heterotopen Präkonditionierung stehen noch aus. Da die MAP-Kinasen einen zentralen Bestandteil in der intrazellulären Signalkaskade der ischämischen Präkonditionierung darstellen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass dies auch für die heterotope Präkonditionierung gelten könnte; insbesondere im Hinblick darauf, dass die Signaltransduktionswege beider Formen der Präkonditionierung auch andere wesentliche Elemente gemein haben.

Die therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten der ischämischen Präkonditionierung sind deutlich eingeschränkt, da hier eine Ischämie induziert werden muss, die mit einem hohen Risiko einer myokardialen Schädigung behaftet ist. Der Vorteil der heterotopen Präkonditionierung besteht darin, dass auf diese Weise auch ischämieunabhängig und

damit ohne einen induzierten Energiemangel im Myokard eine Protektion erzielt werden kann.

Die Signaltransduktion der heterotopen Präkonditionierung ist bisher jedoch noch unzureichend erforscht und kann daher noch nicht therapeutisch genutzt werden. Die Frage einer Beteiligung der MAP-Kinasen ist vor allem bedeutsam, da diese näher an den Effektoren liegen als beispielsweise die Adenosin- oder Morphinrezeptoren. Über ihre spezifischen Effekte könnte daher eine pharmakologische Beeinflussung der Signaltransduktion der heterotopen Präkonditionierung ermöglicht werden.

1.4 Fragestellung

Zur Verifizierung der Hypothese einer MAP-Kinasen Beteiligung an der heterotopen Präkonditionierung ergeben sich dementsprechend folgende Fragestellungen:

- Sind die MAP-Kinasen ähnlich der ischämischen Präkonditionierung auch an der Signaltransduktion des Remote Preconditioning beteiligt?
- Im Falle einer Beteiligung der MAP-Kinasen, welche Rolle spielen sie in der Signalkaskade der heterotopen Präkonditionierung?
- Welchen Einfluss haben MAP-Kinase Inhibitoren auf einen potenziellen Effekt der heterotopen Präkonditionierung und kann eine etwaige Aktivierung der MAP-Kinasen und die damit verbundene Präkonditionierung des Myokards durch Inhibitoren der MAP-Kinasen aufgehoben werden?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsabläufe

In einem ersten Versuchsteil wurde die Infarktgröße in verschiedenen Protokollen untersucht. Die Hälfte der Versuchstiere diente dabei als Kontrolle, während die andere Hälfte einer heterotopen Präkonditionierung (RP) unterzogen wurde. Sowohl in den Kontroll- als auch in den RP-Gruppen wurden nochmals vier Gruppen unterschieden, so dass im Endeffekt acht Gruppen untersucht wurden. Die vier Untergruppen wurden wie folgt eingeteilt: Die erste erhielt nur die Trägersubstanz appliziert, während die anderen Gruppen entweder den spezifischen p38 MAP Kinase Inhibitor SB203580, den MAP Kinase Kinase Inhibitor PD98059 oder den JNK 1/2 Inhibitor SP 600125 infundiert bekam (Abbildung). Die Gruppenstärke betrug jeweils fünf Versuchstiere.

Alle Versuchstiere wurden anaesthetisiert, erhielten eine Thorakotomie mit Umstechung der linken Koronararterie und einen Bauchschnitt. Im Fall der Kontrollgruppen wurde nach dem Eingriff 30 Minuten abgewartet, anschließend wurde die umstochene Koronararterie für 30 Minuten okkludiert. Daran schloss sich eine Reperfusionphase von drei Stunden an. In den Gruppen, die einer heterotopen Präkonditionierung unterzogen wurden, wurde die Mesenterialarterie für 15 Minuten verschlossen. Nach einer Reperusionszeit von 15 Minuten wurden auch diese Gruppen einer Okklusion der Koronararterie mit anschließender Reperfusion ausgesetzt. Unmittelbar nach Ende der Reperusionszeit wurde allen Tieren das Herz entnommen und die Infarktgröße bestimmt.

Im zweiten Versuchsteil wurde die Aktivität der MAP Kinasen auf Proteinebene mithilfe des Westernblot-Verfahrens bestimmt. Um Organe für die Analyse zu gewinnen, wurden drei Versuchsgruppen bestimmt, wobei die erste als Kontrolle diente, bei der zweiten eine heterotope und bei der dritten eine ischämische Präkonditionierung durchgeführt wurde. Die Gruppenstärke betrug auch hier fünf Tiere pro Gruppe. Auch diese Versuchstiere erhielten eine Narkose mit anschließender Thorakotomie und Bauchschnitt, worauf sich bei der ersten Gruppe wiederum eine 30minütige Wartezeit anschloß, während die zweite Gruppe einer heterotopen Präkonditionierung mittels 15minütiger Okklusion der Mesenterialarterie und darauffolgender Reperfusion unterzogen wurde. Für die ischämische Präkonditionierung, welche bei der dritten Versuchsgruppe durchgeführt wurde, wurde die Koronararterie fünf Minuten okkludiert und anschließend für 10 Minuten

eröffnet. Dieser Zyklus wurde wiederholt, so dass auch in diesem Fall die Präkonditionierungsphase 30 Minuten dauerte. Im Anschluss erfolgte bei allen Tieren statt Durchführung eines Infarktes die sofortige Organentnahme und Konservierung der Organe in flüssigem Stickstoff.

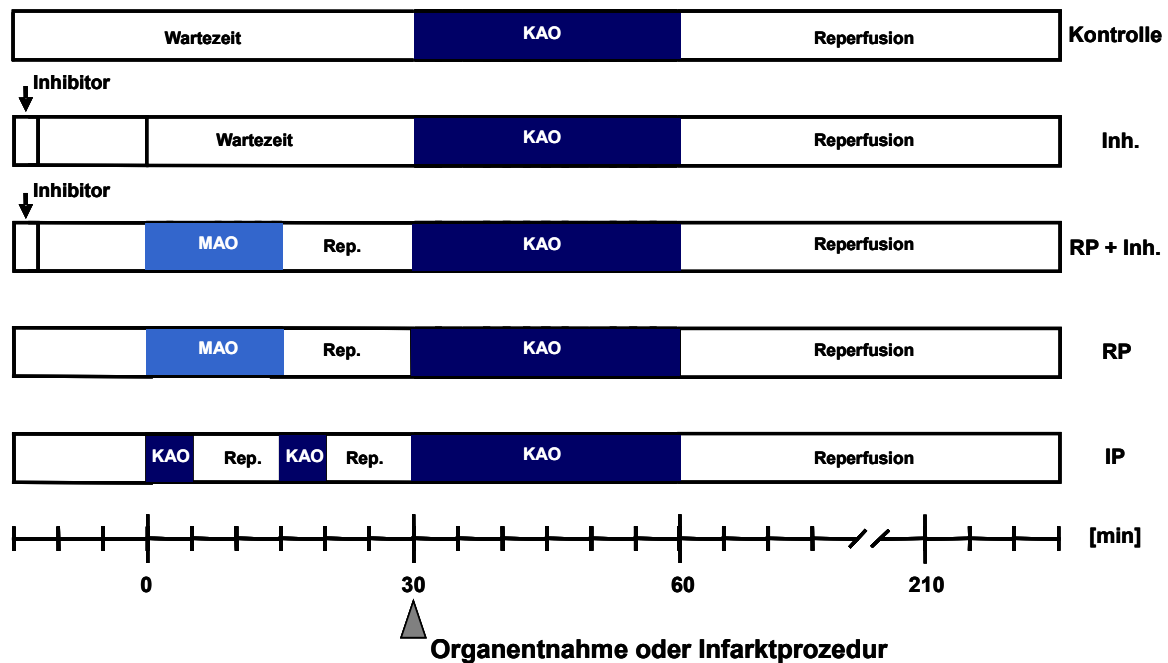


Abbildung 2:

Experimentelle Prozeduren. Remote preconditioning (RP) wurde durch eine Okklusion der Mesenterialarterie induziert (MAO), die 'klassische' ischämische Präkonditionierung (IP) durch eine Okklusion der Koronararterie (KAO) mit anschließender Reperfusion (Rep). Verwendete Inhibitoren (Inh): SB203580, PD 98059, SP600125

2.2 Infarktgrößenbestimmung

2.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 250 bis 300 Gramm schwere männliche Wistar-Ratten vom Züchter Charles River (Sulzfeld, Deutschland) im Alter von drei Monaten. Entsprechend den Richtlinien der allgemeinen Tierschutzbedingungen wurden je fünf bis sechs Ratten in einem mit Sägespänen ausgelegten Makrolonkäfig gehalten, dessen Geräumigkeit eine ausreichende Bewegungsfreiheit ermöglichte. Eine artgerechte Haltung wurde zudem durch eine konstante Raumtemperatur von 21°C und den alle zwölf Stunden wechselnden

Hell-Dunkelrhythmus gewährleistet. Die beantragte Verwendung der Tiere für die Versuche dieser Arbeit wurde vom Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein genehmigt.

2.2.2 Präparation der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden zunächst mit einer intraperitonealen Injektion von 0,6ml Pentobarbital anaesthetisiert. Falls diese Menge nicht eine ausreichende Narkose bewirkte, wurde alle 10 Minuten nochmals 0,1ml Pentobarbital intraperitoneal appliziert. Für die weitere Dauerinfusion des Narkosemittels wurde das für die Einleitung verabreichte Volumen verdoppelt, in eine 5ml Spritze aufgezogen und diese bis zur 4ml Marke mit NaCl (0,9%) aufgefüllt. Die Ratten wurden auf einem beheizten Operationstisch positioniert und die Extremitäten fixiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Körpertemperatur während des gesamten Versuchs unverändert blieb, was mittels einer rektal platzierten Temperatursonde überprüft wurde.

Um eine suffiziente Beatmung zu gewährleisten, wurden die Versuchstiere tracheotomiert. Zu diesem Zweck wurde die Haut des Halses inzidiert und die subdermalen Schichten bis zur präalaryngealen Muskulatur stumpf präpariert. Nach Verdrängung der Muskulatur zu beiden Seiten wurde die Trachea freigelegt. Die Eröffnung der Trachea wurde mit einer spitzen Schere zwischen zwei Knorpelspangen durchgeführt, so dass ein Glastubus eingeführt werden konnte. Dieser wurde mit einem zuvor unter der Trachea durchgeführten Faden befestigt und über zwei Plastikschläuche mit dem Beatmungsgerät verbunden. Die Beatmung erfolgte mit Sauerstoff angereicherter Raumluft und einem Atemzugvolumen von 3,5ml und mit einer Frequenz von 50 pro Minute. Ob die Beatmung effizient war, wurde anhand einer gleichmäßigen Thoraxhebung und eines rosigen Hautkolorits beurteilt. Anschließend wurden ein venöser und ein arterieller Zugang geschaffen. Für den venösen Zugang wurde die linke Vena jugularis externa genutzt. Sie wurde über den zuvor gemachten Hautschnitt freipräpariert und mit einem Polyethylenschlauch kanüliert. Dieser mit isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) gefüllte PE-Schlauch diente als intravenöser Katheter für den Rest des Versuches zur Dauerinfusion des Narkosemittels und zur Flüssigkeitssubstitution. Er wurde dazu an einen Perfusor angeschlossen, welcher die Infusion mit einer Geschwindigkeit von 0,5ml/h infundierte. Die rechte Arteria carotis communis wurde für den arteriellen Zugang freigelegt. Ein weiterer mit Kochsalzlösung gefüllter Polyethylenschlauch wurde in die Arterie eingebracht und ermöglichte als Arterienkatheter eine kontinuierliche invasive Blutdruckmessung. Der Katheter wurde

dazu an einen Druckaufnehmer einer Messvorrichtung angeschlossen. Diese war wiederum mit einem PC verbunden, so dass die Daten auf diesen übertragen und mithilfe eines Visual Basic Programms digital erfasst werden konnten (Aquapit 4; Prof. Dr. Dendorfer, Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universität Lübeck).

Anschließend wurde mit der Präparation des Herzens begonnen. Zunächst wurde ein Hautschnitt im Sinne einer medianen Längssternotomie gemacht. Die linke Pektoralismuskulatur wurde vom Sternum abgetrennt, um die Thoraxwand freizulegen. Durch eine paramediane Spaltung der fünften Rippe und Erweiterung dieses Schnittes nach kranial und kaudal mit Spaltung der vierten und sechsten Rippe wurde der Thorax eröffnet. Die Pleura parietalis wurde inzidiert und der Thorax mithilfe eines Spreizers offen gehalten, so dass ein direkter Zugang zum Herz geschaffen war. Nach Durchtrennung des Perikards wurde der anterior deszendierende Ast der linken Koronararterie (LAD) mit einer atraumatischen Nadel und einem nicht resorbierbaren Faden (Mopylen® monofil, 6-0 USP) umstochen. Die beiden Fadenenden wurden dann durch einen PE-Schlauch geführt, um eine Schlinge für die mechanische Okklusion der Koronararterie zu gewinnen.

Nach Beendigung der Präparation im Thoraxbereich wurde bei allen Versuchstieren ein medianer Bauchschnitt zur Eröffnung des Abdomens durchgeführt. Das Darmkonvolut wurde verdrängt, um die Arteria mesenterica superior freizulegen. Die Tiere der Kontrollgruppen unterlagen nun einer 30minütigen Wartezeit, während bei den Versuchstieren, die einer heterotopen Präkonditionierung unterzogen werden sollten, die Mesenterialarterie mit einer atraumatischen Gefäßklemme für 15 Minuten verschlossen wurde. Nach dieser Zeit wurde die Klemme entfernt, um eine Reperfusion des Dünndarms zu gewährleisten, und das Darmkonvolut wurde zurückverlagert.

Im Anschluss wurde ein Myokardinfarkt induziert, indem die LAD durch Zuziehen der Schlinge für 30 Minuten okkludiert wurde. Die lokale Ischämie war dabei anhand des Erblässens und einer Hypokontraktilität des betroffenen Myokardanteils deutlich zu erkennen.

Während der Okklusionsphase bestand ein erhöhtes Risiko für Kammerflimmern und konsekutivem Herz-Kreislaufstillstand. Im Fall des Eintretens eines solchen Ereignisses bei einem Versuchstier wurde eine Herzdruckmassage mithilfe eines Wattestabs begonnen. Der Versuch wurde nur dann fortgeführt, wenn die betroffene Ratte innerhalb von drei Minuten in den normalen Sinusrhythmus konvertierte.

Nach 30 Minuten Okklusion schloß sich eine dreistündige Reperfusionszeit an. Die Schlinge um die LAD wurde gelöst, und die erfolgreiche Reperfusion des ischämischen

Gebiets konnte anhand der Wiederanfärbung des Myokards beobachtet werden. Um eine Austrocknung des Versuchstieres zu vermeiden, wurde der Bauchschnitt in mehreren Stichen genäht (Mopylen® monofil, 5-0 USP). Der Thorax wurde mit einem nassen Wattepad und einer Folie abgedeckt.

Die Versuchstiere der Gruppen drei bis acht erhielten 15 min vor Beginn der heterotopen Präkonditionierung den jeweils vorgesehenen Inhibitor als Bolus über den Venenkatheter gespritzt. Von den Inhibitoren SB203580, PD98059 und SP600125 wurde jeweils 1mg in 33µl Polyethylenglykol (PEG) gelöst, und von dieser Lösung wiederum 10 µl einem Versuchstier verabreicht. Die Gruppen eins und zwei bekamen stattdessen nur die reine PEG-Lösung (Trägersubstanz) appliziert.

Bei den Versuchstieren, deren Organe für die MAP-Kinasen-Analyse entnommen wurde, entfielen die Ischämie und die Reperfusionsphase des Herzens. Stattdessen wurden die Organe direkt nach der Ischämie- und Reperfusionsphase des Darmes bzw. der Wartezeit bei den entsprechenden Kontrollgruppen entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.3 Entnahme des Herzens und Erfassung der Infarktareale

Im Anschluss an die Reperfusionsphase wurde die LAD erneut okkludiert. Daraufhin wurde das Herz von den großen Gefäßen abgetrennt und schnellstmöglich mit einem Teil der Aorta ascendens aus dem Thorax entnommen. Es folgte eine Färbung des Herzens mit Scribtor-Tusche, wozu eine Knopfsonde in die Aorta eingeführt und die Tusche mit einem Druck von 80mmHg retrograd injiziert wurde. Dies führte zu einer Füllung der Koronararterien, was eine Schwarzfärbung des Myokards zufolge hatte, wobei das Ischämieareal ungefärbt blieb. Nachdem die Schlinge geöffnet, entfernt und das rechte Ventrikelmyokard abgetrennt worden war, wurde der linke Ventrikel transversal in neun Scheiben zerlegt. Eine anschließende Färbung der Scheiben mit einer 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid(TTC)-Lösung für 30 Minuten ermöglichte später bei der Auswertung eine Unterscheidung zwischen nekrotischem und noch vitalem Myokard im Ischämiegebiet. Dieser Unterschied entsteht durch die Fähigkeit der vitalen Myozyten, das TTC mittels NADH-abhängiger membrangebundener Enzyme in ein rotes Formazanpigment umwandeln zu können. Dieses ist in nekrotischem Gewebe nicht möglich, weshalb es sich entsprechend nicht rot färben lässt (Vivaldi, 1985). Im Anschluss

an die Färbung wurden die Scheiben zwischen zwei Objektträger gelegt und mit einer CCD-Kamera von beiden Seiten aufgenommen. Entsprechend ergaben sich für jedes Herz 18 Aufnahmen, die für die spätere Auswertung auf einem Computer gespeichert wurden. Die Scheiben wurden anschließend einzeln gewogen.

Für die Auswertung wurde das Programm „Image J“ verwendet. Die zu untersuchenden Areale wurden markiert und ausgemessen, wobei zwischen dem Ischämiegebiet („area at risk“ = AAR) und dem tatsächlich infarzierten und nekrotischen Anteil unterschieden wurde. Auch die Gesamtgröße jeder Scheibe wurde erfaßt. Nach Einbeziehung des Gewichts konnte der Anteil des Ischämiegebiets an der Gesamtfläche sowie der Anteil der Nekrose am Ischämieareal berechnet werden.

2.3 Analyse der MAP-Kinasen

2.3.1 Probenaufbereitung

Ziel der Aufbereitung war die Gewinnung eines Zellhomogenats, welches für die weitere Analyse mittels Elektrophorese und Westernblot verwendet werden konnte. Dazu wurden tiefgefrorene Myokard- und Jejunumgewebeproben zunächst in kleinere Teile zermörsert und Portionen von ca. 120mg in Eppendorf-Gefäße gefüllt. Zu dem abgewogenen Gewebe wurde dann eine entsprechende Menge Cell-Lysis-Buffer (1ml Lysepuffer für 200mg Gewebe) und 1% Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) gegeben. Das Gemisch wurde für etwa eineinhalb Minuten mit einem Handhomogenisator homogenisiert, bis sich das Gewebe vollständig aufgelöst hatte. Anschließend wurde das Homogenat für fünf Minuten bei 12000 Umdrehungen pro Minute und 4°C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen. Ein Teil des Überstandes wurde für die Proteinbestimmung verwendet, der andere Teil wurde mit vierfach konzentriertem SDS-PAGE-Puffer versetzt und für 10 Minuten bei 98°C inkubiert, um die in der Probe enthaltenen Proteine zu denaturieren. Die Proben wurden im Anschluß für 30 Minuten nochmals in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (14000rpm, 4°C) und der Überstand abpipettiert. Er wurde nach Ermittlung des Proteingehalts der einzelnen Proben, wobei die Methode nach LOWRY (siehe unten) zur Anwendung kam, weiter verdünnt, um schließlich eine Proteinkonzentration von 15µg/µl in jeder Probe zu erzielen. Zur Verdünnung der Proben wurde wiederum SDS-PAGE-Puffer verwendet.

2.3.2 Proteinbestimmung nach LOWRY

Um zu gewährleisten, dass in allen Proben die gleiche Menge an Protein enthalten war, wurde zunächst der tatsächliche Proteingehalt bestimmt und die Probe dann entsprechend weiter verdünnt. Es wurde zunächst eine Standardreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA) hergestellt, wozu dieses mit einer Natriumchloridlösung vermischt wurde, um eine Reihe von Konzentrationen von 20µg/ml bis 200µg/ml zu erhalten. Die zu untersuchenden Proben wurden im Verhältnis 1:300 verdünnt. Jeweils 200µl der verdünnten Proben sowie der Standards wurden jeweils in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit 800µl LOWRY-Mix für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden alle Proben mit 100µl Folin-Reagenz versetzt und für weitere 30 Minuten inkubiert, bevor die Extinktion im Photometer bei einer Wellenlänge von 750nm bestimmt werden konnte. Aus den gemessenen Extinktionen der Standards wurde eine Eichkurve erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration aus den ermittelten Extinktionen der Gewebeproben berechnet werden konnte.

2.3.3 Proteinanalyse mittels Westernblot

Im ersten Arbeitsschritt wurden die Proben mithilfe einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Das Polyacrylamid bewirkt hierbei, dass die Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse bei ihrer Wanderung durch das elektrische Feld verlangsamt werden. Die Denaturierung der Proteine durch die Inkubation mit SDS hat zur Folge, dass diese entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden können.

Für die Elektrophorese wurden zunächst Gele mit einem Acrylamidanteil von 10% im Trenngel und von 3,5% im Sammelgel hergestellt. Auf das Sammelgel wurden dann neben einem Proteinstandard, der als Marker diente, die Proben aufgetragen. Es wurden bei jedem durchgeführten Western Blot von jeder Probe 10µl aufgetragen. Während der 30minütigen Elektrophorese, bei der eine konstante Spannung von 200V im elektrischen Feld herrschte, wurden die Proben im Trenngel aufgetrennt.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Proteine von dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran transferiert. Die Membranen wurden zuvor für 30 Sekunden in Methanol präpariert, anschließend mit Aqua bidest gespült und dann in TOWBIN-Puffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte über zwei Stunden bei einer Stromstärke von 50mA in einer Blotkammer, in der die Gele auf den Membranen und zwischen zwei Lagen mit jeweils

vier in TOWBIN-Puffer getränkten Filterpapieren (Whatman 3MM Filterpapier) deponiert wurden („semi-dry“ Verfahren).

Im Anschluß an den Transfer wurden die Membranen für eineinhalb Stunden mit 5%igem Milchpuffer geblockt, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht. Zu diesem Zweck wurden die Membranen mit einer Milchpufferlösung, die den Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 oder 1:1000 enthielt, in Folien eingeschweißt. In dieser Arbeit kamen Primärantikörper gegen die p38-, die p42/44- und die JNK-MAP Kinasen-Gesamtform sowie gegen deren phosphorylierte Formen zum Einsatz. Zudem wurde ein Primärantikörper gegen Aktin zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinverteilung in allen Proben verwendet. Da Aktin als Housekeeping Gen ständig in konstanter Menge exprimiert wird, konnte dieser als quantitativer Standard eingesetzt werden. Ein gleicher Aktin Gehalt aller Proben deutete demnach auf eine gleiche Proteinbeladung der Membranen hin und gewährleistete somit die Vergleichbarkeit der Proben.

Die Membranen wurden am nächsten Tag viermal zehn Minuten mit PBS-Tween-Puffer gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Membranen mit dem an eine Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) gekoppelten Sekundärantikörper für eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, wozu sie abermals mit Milchpuffer und dem darin enthaltenen Antikörper eingeschweißt wurden. Vor der Detektion der Banden wurden die Membranen jedoch erneut viermal für zehn Minuten mit PBS-Tween-Puffer gewaschen.

Als Detektionsmittel diente Femto (SuperSignal® West Femto), wobei dieses in einer Verdünnung im Verhältnis von 1:5 direkt auf die Membranen gegeben wurde. Die entstandenen Banden wurden mittels einer CCD-Kamera und entsprechender Software aufgenommen und auf einem PC gespeichert (Chemi Doc System und Quantity One Software, Biorad, München) und quantitativ ausgewertet.

2.4 Statistik

Die Ausmessung der Größe der Infarktareale, der Ischämiegebiete und der gesamten linksventrikulären Schnittfläche erfolgte von beiden Seiten eines jeden Herzschnittes. Für jede Fläche wurde daraus ein Mittelwert bestimmt und dieser mit dem anteiligen Gewicht des Herzschnittes am Gesamtgewicht des jeweiligen Herzens multipliziert. Die

berechneten Werte wurden addiert, woraus sich für jedes Herz die gesuchten Größen für die drei zu untersuchenden Areale ergaben.

Die Berechnung der relativen Ischämiegröße ergab sich durch Bildung des Quotienten aus der Ischämiegröße und der Gesamtgröße des linken Ventrikels (AAR/LVG). Der Quotient wird dabei nicht nur von der Größe des von der LAD versorgten Myokardabschnittes beeinflusst, sondern auch von der Höhe der Okklusion und der damit verbundenen Größe des minderperfundierten Myokardanteils. Es wurde deshalb auch die relative Infarktgröße bestimmt, welche sich aus dem Quotient aus der absoluten Infarktgröße und der Ischämiegröße (IG/ISG) errechnet.

Die Aktivierung der MAP-Kinasen wurde als Verhältnis der phosphorylierten Form im Dünndarm und im Myokard zu den Gesamtformen der MAP-Kinasen in den entsprechenden Gruppen dargestellt. Die Western Blot Versuche wurden dreimal als unabhängige Experimente durchgeführt. Für jede Gruppe wurde dann ein Mittelwert aus den gemessenen Daten der drei Versuche errechnet.

Alle quantitativen Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) angegeben. Zum Vergleich der verschiedenen Werte für die Infarktgrößen und die MAP Kinasen-Aktivierung zwischen den behandelten Gruppen diente der „one-way ANOVA mit post hoc Test nach Bonferroni“. Die hämodynamischen Parameter wurden mittels eines „two-way ANOVA für wiederholte Messungen“ zwischen den Behandlungsgruppen verglichen. Innerhalb einer Gruppe wurden die hämodynamischen Parameter zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem „one-way ANOVA für wiederholte Messungen“ getestet.

Die Ergebnisse wurden bei einer Abweichung von $p < 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm „GraphPad Prism 4™, GraphPad-Software“ verwendet.

2.5 Geräte und Materialien

Geräte + Materialien	Firmen
Beatmungsmaschine, Typ 994500	TSE GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Blotpapier	Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
CCD-Kamera, Typ KP-M2E/K zur Aufnahme der Blots	Hitachi Europe GmbH, Deutschland
CCD-Kamera, Typ T-430P zur Aufnahme der Herzschnitte	Hitachi Europe GmbH, Deutschland
Druckaufnehmer Isotec Deutschland	Hugo-Sachs Elektronik GmbH, Freiburg, Deutschland
Einmalspritzen 1ml, 5ml, 10ml	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Eppendorf Cups	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Feinwaage BP 210 D	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Filterpapier	Schleicher&Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Gelgießvorrichtung mit Kämmen	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Gelloader Tips	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Homogenisator, Typ 853202	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Küvetten	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland
Mopylen®monofil blau, Polypropylen, 6,0	Resorba GmbH&CoKG, Nürnberg, Deutschland
Perfusoren	Infors AG, Bottningen, Schweiz
Photometer LKB Ultrospec plus	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland

Pipette Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	
Pipette, Finnpipette	Thermo Labsystems Oy, Helsinki, Finnland
Pipette, Glas	Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Polyethylenkatheter 50 (PE 50)	Clay Adams, USA
Temperatursonde	Yellow Springs Instrument Co., Inc., Ohio, USA
Tischzentrifuge EPS 6015402	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trachealtubus	Glaswerkstatt der Universität zu Lübeck, Deutschland
Transfer-Kammer Hoefer Semiphor	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Transfer-Membran Immobilon-P	Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
Vortexer Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH&CoKG, Schwabach, Deutschland
Wärmetisch, Typ 52102	Eberle Controls GmbH, Nürnberg, Deutschland

2.6 Substanzen und Lösungen

Substanzen	Firmen
Acrylamid	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland
Antikörper phospho JNK1/2 MAP Kinase (Thr 183/Tyr185)	Stressgen Bioreagents Corp., Ann Arbor, USA
Antikörper phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Antikörper p38 MAP Kinase	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland

Antikörper ERK 1/2 MAP Kinase	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Antikörper JNK 1/2 MAP Kinase USA	Stressgen Bioreagents Corp., Ann Arbor, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest.	Apotheke Universität zu Lübeck, Deutschland
Bromphenolblau	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
BSA (Rinder-Serum)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Cell Lysis Buffer USA	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat und -Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dithiotritol (DTT)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Folin-Reagenz	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
Kupfersulfat	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Methanol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
NaCl-Lösung 0,9%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Kalium-Tartrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PD 98059	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pentobarbital	Apotheke der Universität zu Lübeck, Deutschland

Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
SB 203580	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
Skim Milk Powder	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
SP 600125	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Stickstoff, flüssig	Apotheke der Universität zu Lübeck, Deutschland
Super Signal Femto West Maximum Sensitivity Substrate	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Tris-HCL pH 8,8 (1,5M) und pH 6,8 (0,5M)	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Trizma®Base	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland	

Puffer + Lösungen

Blockierpuffer	Skim Milk Powder, PBS-Waschpuffer
Elektrophoresepuffer	Tris Base 15,13g; Glycin 72g; SDS 5g; Aqua bidest 5000ml
Folin-Lösung	Folin-Ciocalteus Reagenz 2ml; NaCl 0,9% 4ml

LOWRY-Mix	Na_2CO_3 2% 49ml; Natrium-Kalium-Tartrat (100mM) 0,5ml; CuSO_4 (40mM) 0,5ml
PBS-Waschpuffer	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 57,5g; $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 14,8g ; NaCl 29,2g; Tween 20 5ml; Aqua bidest 5000ml; pH 7,5
SDS-PAGE-Puffer	Tris-HCL-Puffer (pH 6,8) 5ml; SDS 0,8g; Glycerol 4ml; Bromphenolblau 4mg; DTT 0,62g mit Aqua bidest auf 10ml aufgefüllt
TOWBIN-Blot-Puffer	Tris Base 15,15g; Glycin 72,05g; SDS 5g; Aqua bidest 4000ml; pH auf 8,2-8,4 eingestellt und mit Methanol 1000ml aufgefüllt

Elektrophoresegele

Trenngel	Aqua dest. 4,85ml; Tris-Puffer pH 8,8 2,5ml; SDS (10%) 100 μl ; Acrylamid 2,5ml; APS 50 μl ; TEMED 10 μl
Sammelgel	Aqua dest. 3,05ml; Tris-Puffer pH 6,8 1,25ml; SDS (10%) 50 μl ; Acrylamid 0,67ml; APS 25 μl ; TEMED 5 μl

3 Ergebnisse

3.1 Hämodynamik

Während aller Versuche zur Bestimmung der Infarktgrößen wurden der mittlere arterielle Blutdruck (MAD) sowie die Herzfrequenz (HF) der Versuchstiere kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Werte zu verschiedenen Zeitpunkten in den einzelnen Gruppen. Es bestanden zu keiner Zeit signifikante Unterschiede hinsichtlich des mittleren arteriellen Druckes oder der Herzfrequenz zwischen den verschieden behandelten Gruppen.

In allen Gruppen mit einer heterotopen Präkonditionierung stieg nach Okklusion der Mesenterialarterie der Blutdruck an, dieser Unterschied erwies sich jedoch nicht als signifikant ($p > 0,05$). Die Okklusion der Koronararterie bewirkte keine Änderung des Blutdrucks. Auch die Behandlung mit SB203580, PD98059 oder SP600125 zeigte keine Auswirkungen auf den mittleren arteriellen Druck (Tab.1).

Für die Herzfrequenz zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlich behandelten Versuchsgruppen ($p > 0,05$). Auch dieser Parameter wurde nicht durch die Gabe von SB203580, PD98059 oder SP600125 beeinflusst. Die heterotope Präkonditionierung und die myokardiale Ischämie waren ebenfalls nicht hinreichend, um eine statistisch signifikante Änderung der Herzfrequenz zu erreichen (Tab.1).

		nach Präpara- tion	nach Vorbe- handlung	MAO vor	MAO während	vor CAO	CAO während	Reper- fusion Beginn	Ende Reper- fusion
Kontrolle	MAD	79 ± 9	83 ± 10	92 ± 6	98 ± 5	92 ± 2	71 ± 8	76 ± 11	88 ± 6
	HF	384 ± 7	383 ± 8	370 ± 4	381 ± 11	377 ± 11	381 ± 11	384 ± 8	409 ± 11
RPC	MAD	90 ± 10	86 ± 7	86 ± 5	111 ± 6	90 ± 8	92 ± 10	62 ± 11	68 ± 3
	HF	428 ± 4	426 ± 5	401 ± 8	397 ± 7	382 ± 20	408 ± 31	386 ± 5	427 ± 18
SB203580	MAD	94 ± 14	89 ± 11	90 ± 11	91 ± 12	94 ± 10	76 ± 11	71 ± 14	72 ± 11
	HF	420 ± 29	431 ± 31	404 ± 27	395 ± 24	389 ± 11	398 ± 24	385 ± 20	384 ± 20
SB203580 + RPC	MAD	109 ± 8	109 ± 5	104 ± 8	119 ± 5	102 ± 11	98 ± 13	83 ± 11	68 ± 12
	HF	457 ± 12	456 ± 9	441 ± 5	431 ± 6	412 ± 5	424 ± 7	417 ± 9	413 ± 10
PD98059	MAD	89 ± 15	86 ± 13	91 ± 11	94 ± 10	98 ± 9	88 ± 9	85 ± 7	89 ± 7
	HF	388 ± 13	387 ± 15	382 ± 10	383 ± 11	389 ± 13	424 ± 16	383 ± 22	413 ± 11
PD98059 + RPC	MAD	74 ± 8	72 ± 8	78 ± 10	98 ± 10	80 ± 13	73 ± 12	80 ± 14	68 ± 17
	HF	400 ± 16	392 ± 17	384 ± 20	373 ± 23	372 ± 26	403 ± 22	389 ± 23	408 ± 20
SP600125	MAD	126 ± 7	122 ± 14	117 ± 8	117 ± 7	120 ± 8	113 ± 5	98 ± 10	97 ± 7
	HF	436 ± 4	458 ± 1	446 ± 2	439 ± 1	421 ± 3	416 ± 5	399 ± 10	391 ± 7
SP600125+ RPC	MAD	106 ± 5	100 ± 2	101 ± 2	108 ± 4	99 ± 4	79 ± 4	93 ± 4	92 ± 3
	HF	418 ± 2	427 ± 12	412 ± 12	391 ± 15	390 ± 25	381 ± 19	401 ± 6	390 ± 19
IPC	MAD	91 ± 12				90 ± 10	85 ± 7	93 ± 5	69 ± 9
	HF	407 ± 16				383 ± 10	396 ± 14	401 ± 21	372 ± 23

Tabelle 1

Dargestellt sind der mittlere arterielle Druck (MAD in mmHg) und die Herzfrequenz (HF in Schlägen pro Minute) der Versuchstiere zu verschiedenen Zeitpunkten während der experimentellen Prozeduren. Nach der chirurgischen Präparation unterlagen die Versuchstiere der Kontrollgruppe einer 30minütigen Wartezeit. Die Ratten der Gruppen SB203580, PD95059 und SP600125 mit und ohne Präkonditionierung erhielten nach der Präparation den entsprechenden Inhibitor appliziert (Vorbehandlung). Bei den Gruppen mit einer heterotopen Präkonditionierung folgte eine 15minütige Okklusion der Mesenterialarterie (MAO), gefolgt von einer 15minütigen Reperfusion des entsprechenden Ischämiegebiets. Alle Gruppen unterlagen einer 30minütigen Okklusion der Koronararterie (CAO) mit anschließender Reperfusion von 180 Minuten. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beim mittleren arteriellen Druck und der Herzfrequenz zwischen den Versuchsgruppen nach Abschluß der Präparation. Auch am Ende des gesamten Experiments bestanden keine Unterschiede in den Versuchsgruppen hinsichtlich der untersuchten Parameter.

3.2 Reduktion der Infarktgröße durch eine ischämische bzw. heterotope Präkonditionierung

Um den Einfluss der ischämischen und der heterotopen Präkonditionierung auf die Infarktgröße zu untersuchen, wurde in einer ersten Versuchsreihe eine Kontrollgruppe zum einen mit einer Gruppe verglichen, die eine ischämische, zum anderen mit einer Gruppe, die eine heterotope Präkonditionierung erhalten hatte.

In allen Versuchsgruppen stellte sich nach Okklusion der Koronararterie ein etwa identischer Anteil des gesamten linken Ventrikels (IG/LVG) ischämisch dar. Damit zeigte sich die Reproduzierbarkeit des operativen Vorgehens, bei dem die Koronararterienligatur in den einzelnen Versuchstieren weitestgehend auf gleicher Höhe vorgenommen wurde. Außerdem war dies Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Infarktgrößen, da damit eine Konstanz der Größe des von der LAD versorgten Myokardareals gezeigt werden konnte und somit eine signifikante Variation der LAD- bzw. Kollateralversorgung der untersuchten Herzen ausgeschlossen werden konnte. Als Maßeinheit für die erzielte Kardioprotektion wurde die Verringerung der relativen Infarktgröße (IG/ISG) im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen.

In Tieren ohne Vorbehandlung führte die Koronarokklusion zu einer Infarktgröße von 61% des Ischämieareals. Durch eine heterotope Präkonditionierung verringerte sich das Infarktareal um die Hälfte ($26 \pm 1,8\%$), während durch die ischämische Präkonditionierung eine noch deutlichere Verkleinerung des Infarktes erreicht werden konnte ($13 \pm 1,1\%$) (Abb.3). Somit zeigte sich, dass die ischämische Präkonditionierung in den vorliegenden Experimenten offenbar wirksamer zu sein scheint als die heterotope Präkonditionierung.

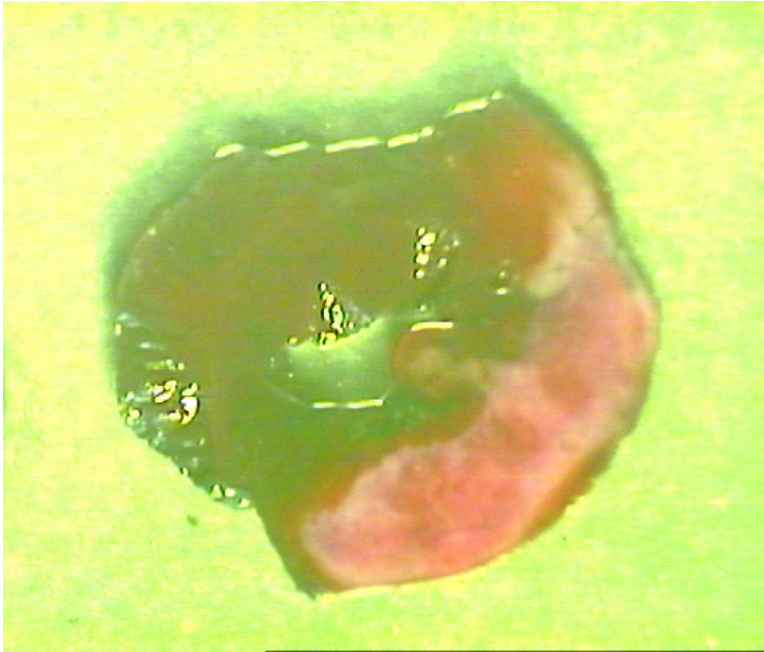


Abb.3 a)

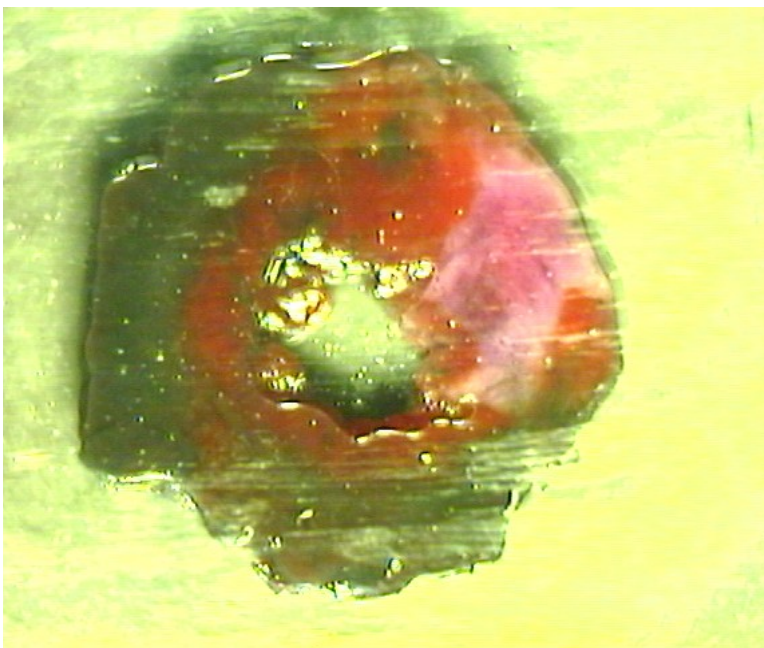


Abb.3 b)

Abbildung 3

a) Herzschnitt eines Ventrikels aus der Kontrollgruppe

b) Herzschnitt eines Ventrikels aus der Gruppe der mit heterotoper Präkonditionierung behandelten Tiere

Hellrosa gefärbtes Areal: Infarktareal

Rotgefärbtes Areal: Ischämiegebiet (Area at risk)

Schwarzes, nicht gefärbtes Areal: das von der Okklusion nicht betroffene Areal

3.3 Einfluss der MAP-Kinase-Inhibitoren SB203580, PD98059 und SP600125 auf die Infarktgröße

Ausgehend von der Hypothese, dass die heterotope Präkonditionierung unter anderem durch eine Aktivierung der MAP-Kinasen vermittelt wird, ergab sich die Frage, ob eine potenzielle Aktivierung durch geeignete Inhibitoren geblockt werden kann. In einer zweiten Versuchsreihe wurden deshalb zusätzlich Infarktgrößenversuche durchgeführt, bei denen eine Versuchsgruppe den p38MAP-Kinase-Inhibitor SB203580, eine andere den MEK1/2-Inhibitor PD98059 und eine dritte den selektiven JNK1/2-Inhibitor SP600125 appliziert bekamen. Für alle drei Gruppen wurde in diesem Fall zwischen einer Kontrollgruppe und einer Gruppe, deren Versuchstiere die Prozedur einer heterotopen Präkonditionierung durchliefen, unterschieden und die ermittelten Infarktgrößen miteinander verglichen.

Alle drei Inhibitoren zeigten keinen signifikanten Einfluß auf die Infarktgröße, sondern die Infarktgrößen der Gruppen ohne Präkonditionierung entsprachen in etwa denen der Kontrollgruppe (Kontrolle $61 \pm 1,3\%$ vs. PD98059 $53 \pm 3,1\%$ vs. SB203580 $44 \pm 4,2\%$ vs. SP600125 $49 \pm 5,3\%$).

In den mit den Inhibitoren behandelten Gruppen, deren Versuchstiere eine heterotope Präkonditionierung erhalten hatten, wurde diese durch die Inhibitoren aufgehoben. Die Infarktareale waren signifikant größer als die der Gruppe mit heterotoper Präkonditionierung ohne Vorbehandlung (Abb.4). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich kein signifikanter Größenunterschied der Infarktflächen der vorbehandelten Tiere (SB203580 $43 \pm 4,6\%$; PD98059 $45 \pm 4,5\%$; SP600125 $57 \pm 6,3\%$ vs. RPC $26 \pm 1,8\%$).

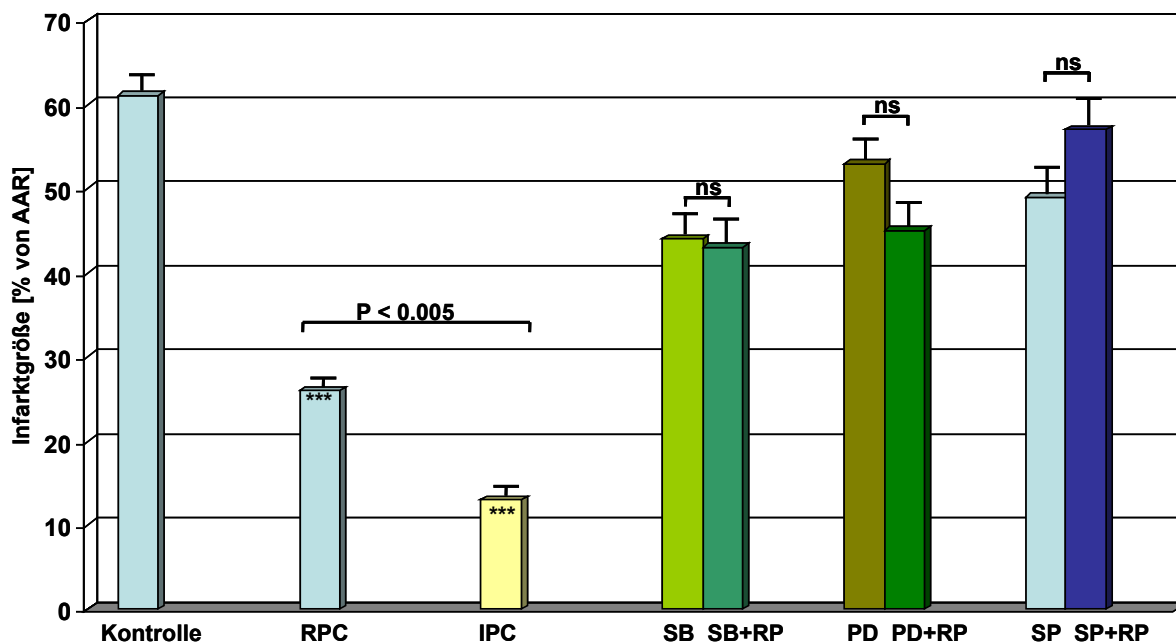


Abbildung 4

Die relative Infarktgröße wird als prozentualer Anteil des Ischämiegebiets dargestellt. Dargestellt sind die Effekte einer heterotopen beziehungsweise ischämischen Präkonditionierung auf die Infarktfläche sowie der Einfluss der Inhibitoren SB203580, PD98059 und SP600125 auf die Infarktgröße, zum einen ohne Präkonditionierung, zum anderen nach einer heterotopen Präkonditionierung.

*** $p < 0.001$

ns nicht signifikant

3.4 Analyse der MAP-Kinasen Aktivierung nach heterotoper Präkonditionierung im Jejunum und im Myokard

Die Analyse der aktivierten Anteile der MAP-Kinasen p38, p42/44 und JNK 1/2 erfolgte mittels Westernblot. Als Proben dienten dafür Zellhomogenate, die aus Jejunum und Myokard des linken Ventrikels der Versuchstiere gewonnen wurden. Erwartungsgemäß entsprachen die resultierenden Banden den zu erwartenden Molekulargewichten in den Größen 38 kDa (p38), 42 und 44 kDa (p42/44) und 46 und 54 kDa (JNK 1/2).

Die zur Qualitätskontrolle durchgeführten Aktin-Westernblots zeigten eine konstante Proteinexpression in allen Proben und bestätigten damit eine gleiche Beladung aller Membranen.

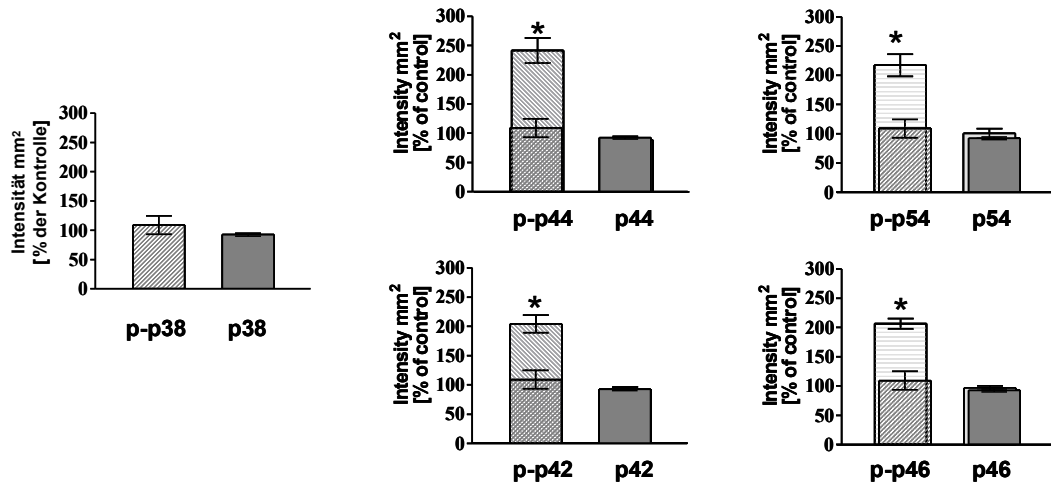
Zunächst wurde in allen zu untersuchenden Proben der Gesamtgehalt der MAP-Kinasen bestimmt. Sowohl in den Proben der Kontrollgruppe als auch in denen der Versuchsgruppe mit heterotoper Präkonditionierung waren vergleichbare Mengen Protein von p38-, p42/44- bzw. JNK 1/2 MAP-Kinase enthalten (Abb. 5 und 6).

Die Aktivierung der MAP-Kinasen erfolgt durch eine duale Phosphorylierung an einem Threoninrest und einem Tyroninrest; wobei es sich bei der p38 MAP-Kinase um das Thr-Gly-Tyr Motiv, bei der p42/44 MAP-Kinase um das Thr-Glu-Tyr Motiv und bei den JNK 1/2 um das Thr-Pro-Tyr Motiv handelt. Um eine potenzielle Aktivierung der verschiedenen MAP-Kinasen durch eine heterotope Präkonditionierung nachzuweisen, wurden deshalb die phosphorylierten Formen der MAP-Kinasen im Jejunum und im Myokard bestimmt.

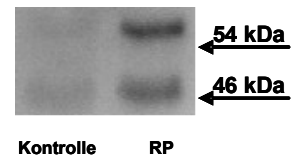
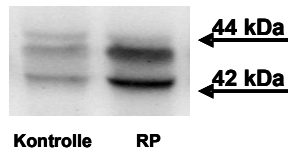
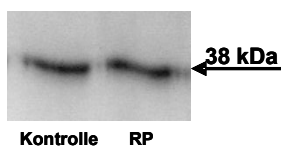
Alle Proben wurden dazu in einem weiteren Western Blot mit Antikörpern untersucht, die ausschließlich die phosphorylierten Fraktionen der MAP-Kinasen detektierten. Für die MAP-Kinasen p42/44 sowie für die JNK 1/2 konnte eine statistisch signifikante Erhöhung des phosphorylierten Anteils in den Jejunumproben von Tieren, die die heterotope Präkonditionierung durchlaufen hatten, nachgewiesen werden. Die p38 MAP-Kinase wurde durch die lokale Ischämie im Jejunum dagegen nicht aktiviert (Abb.5). In den untersuchten Proben, die aus dem Myokard entnommen worden waren, konnte für keine der untersuchten MAP-Kinasen ein Anstieg der phosphorylierten Form nachgewiesen werden, das heisst, die Präkonditionierung vermochte keine Phosphorylierung der untersuchten MAP-Kinasen zu induzieren. Zwar schien sich für die MAP-Kinasen JNK 1/2 eine Zunahme der phosphorylierten Form abzuzeichnen, dieser Unterschied zeigte sich jedoch nicht signifikant zu den nicht präkonditionierten Herzen (Abb.6).

Alle verwendeten MAP-Kinase-Inhibitoren führten zu einer Abnahme der phosphorylierten Form der von ihnen beeinflussten MAP-Kinase in den Jejunumproben. Der Gesamtgehalt der MAP-Kinasen wurde durch die Inhibitoren nicht beeinflusst (ohne Abbildung).

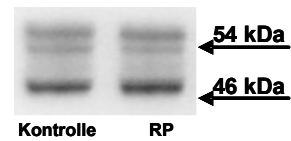
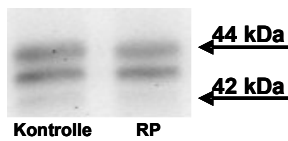
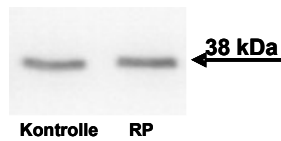
Jejunum: MAP-Kinasen nach heterotoper Präkonditionierung



Phosphorylierte MAP-Kinasen



Gesamte MAP-Kinasen



Aktin

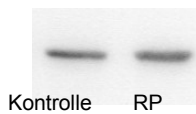
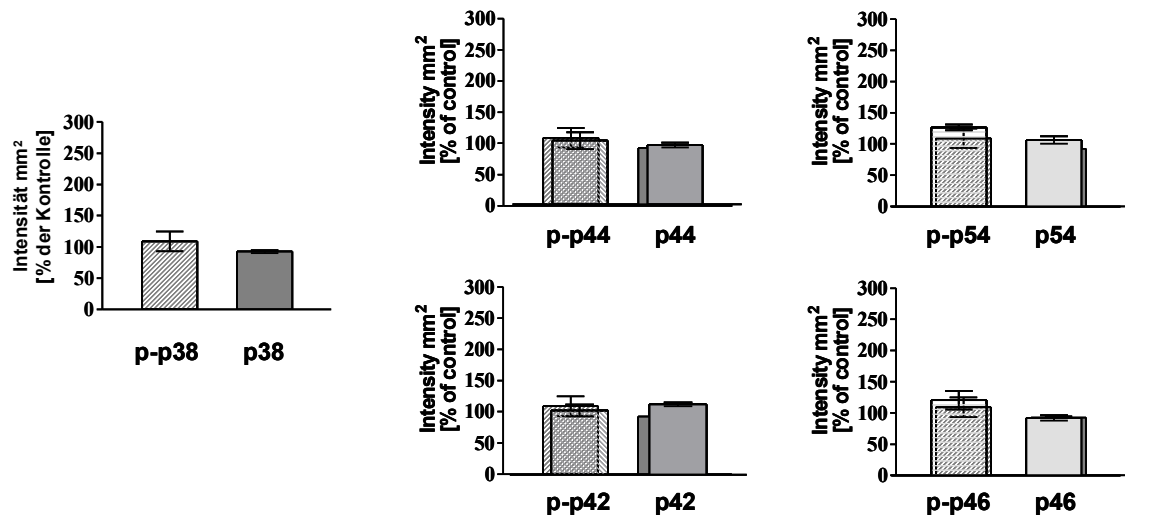


Abbildung 5

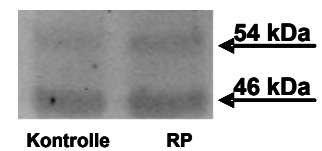
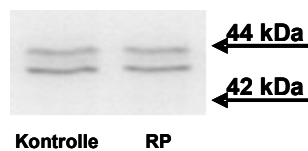
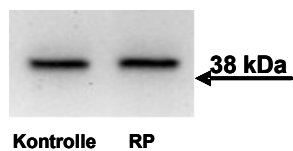
Effekte der heterotopen Präkonditionierung auf die Proteinexpression und Phosphorylierung der MAP-Kinasen im Jejunum, hier demonstriert anhand von Western Blots. Es findet sich eine signifikante Erhöhung der phosphorylierten Form von p42 und 44 (p-p42 und p-p44) sowie von JNK 1 und 2 (p-p46 und p-p54). Der Gesamtgehalt der MAP-Kinasen war in den Kontroll- und den Versuchsgruppen gleich.

* $p < 0,05$

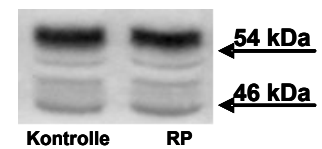
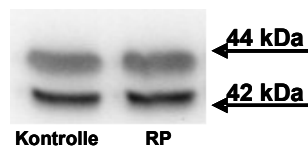
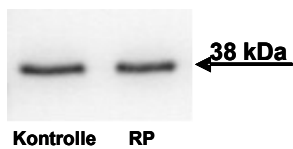
Myokard: MAP-Kinasen nach heterotoper Prekonditionierung



Phosphorylierte MAP-Kinasen



Gesamte MAP-Kinasen



Aktin

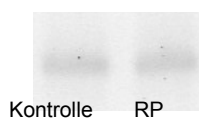


Abbildung 6

Effekte der heterotoper Prekonditionierung auf die Proteinexpression und Phosphorylierung der MAP-Kinasen im Myokard. Im Myokard zeigt sich keine vermehrte Phosphorylierung der MAP-Kinasen nach heterotoper Prekonditionierung in den Western Blots. Der Gesamtgehalt der MAP-Kinasen war in den Kontroll- und den Versuchsgruppen auch hier gleich.

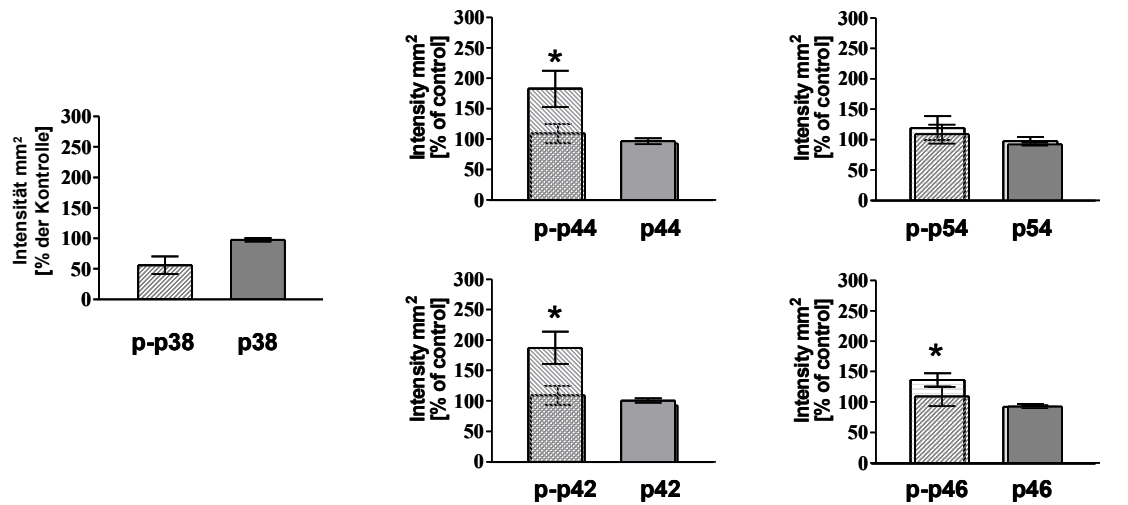
* $p < 0,05$

3.5 Analyse der MAP-Kinasen Aktivierung nach ischämischer Präkonditionierung im Myokard

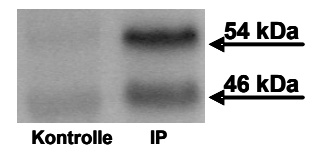
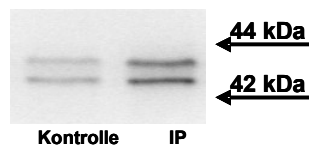
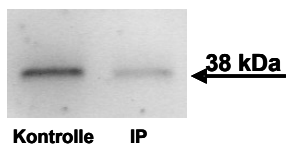
Die Analyse nach ischämischer Präkonditionierung erfolgte analog dem Vorgehen nach heterotoper Präkonditionierung. Entsprechend wurden in diesem Fall nur Gewebekomponenten aus den linken Ventrikeln der Versuchstiere gewonnen und untersucht. Wie oben beschrieben, wurden auch hier zunächst die totalen Mengen der MAP-Kinasen mittels Westernblot bestimmt. Auch in diesen Myokardproben unterschieden sich die Gesamtmengen der untersuchten MAP-Kinasen nicht (Abb.7).

Im Gegensatz zur heterotopen Präkonditionierung zeigte sich in den Myokardproben nach ischämischer Präkonditionierung ein deutlicher Anstieg der Anteile an phosphorylierten MAP-Kinasen. Es fand sich ein 1,8 facher Anstieg der p44 MAP-Kinase, für p42 wurde ein Anstieg um den Faktor 1,9 beobachtet. Im Falle der JNK MAP-Kinasen zeigte sich nur für JNK 2 ein Anstieg um das 1,4 fache, während sich die Menge des phosphorylierten JNK 1 nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterschied. Bei der p38 MAPK zeigte sich nach der ischämischen Präkonditionierung sogar eine signifikante Verringerung der phosphorylierten Form in den entsprechenden Myokardproben (Abb. 7).

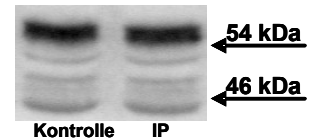
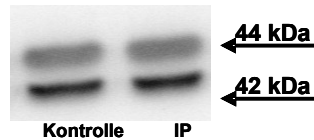
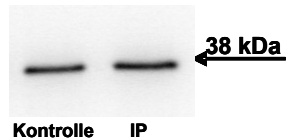
Myokard: MAP-Kinasen nach ischämischer Präkonditionierung



Phosphorylierte MAP-Kinasen



Gesamte MAP-Kinasen



Aktin

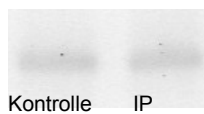


Abbildung 7

Effekte der ischämischen Präkonditionierung auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen im Myokard. Es zeigt sich hier eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung von p42 und 44 sowie von p46 (JNK 1), die erhöhte Expression von p-p54 erwies sich als nicht signifikant. Für p38 MAP-Kinase findet sich eine Verminderung der phosphorylierten Form nach ischämischer Präkonditionierung

* $p < 0,05$

4 Diskussion

4.1 Bedeutung der p38, p42/44 und JNK1/2 MAP-Kinasen für die intrazelluläre Signaltransduktion im Myokard und Jejunum nach ischämischer und heterotoper Präkonditionierung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Beteiligung der verschiedenen MAP-Kinasen an der Signaltransduktion der heterotopen Präkonditionierung zu untersuchen und diese mit der der ischämischen Präkonditionierung zu vergleichen, bei der eine wesentliche Rolle der MAP-Kinasen bereits etabliert ist. Es ist daher naheliegend, auch eine Aktivierung der MAP-Kinasen nach heterotoper Präkonditionierung zu vermuten, da beide Präkonditionierungsformen ähnliche Signaltransduktionswege aufweisen und sich bereits viele Übereinstimmungen bezüglich der involvierten Faktoren zeigten.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass die p38 MAP-Kinase, die p42 und p44 MAP-Kinase sowie die JNK 1 und 2 essenzieller Bestandteil des durch eine heterotope Präkonditionierung hervorgerufenen kardioprotektiven Effekts sind. Damit wurde erstmals die Rolle der MAP-Kinasen in der heterotopen Präkonditionierung untersucht und beschrieben. Die vorliegende Studie unterstützt die These einer Beteiligung der MAP-Kinasen an der protektiven Wirkung beider Formen der Präkonditionierung, indem sie eine signifikante Aktivierung der MAP-Kinasen nach ischämischer und heterotoper Präkonditionierung nachweisen konnte.

Im Fall der ischämischen Präkonditionierung gibt es bereits eine Vielzahl von Untersuchungen hinsichtlich einer Beteiligung der MAP-Kinasen an der Signaltransduktion, wobei deren Rolle für einen kardioprotektiven Effekt in der Literatur kontrovers diskutiert wird. Weiterhin scheinen die drei verschiedenen Kaskaden der MAP-Kinasen offenbar einen unterschiedlichen Einfluss auf das ischämische Myokard zu haben und werden im Folgenden deshalb auch getrennt voneinander betrachtet. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die bisher veröffentlichten Ergebnisse eine Beteiligung aller MAP-Kinasen an dem endogenen kardioprotektiven Mechanismus der ischämischen Präkonditionierung nachgewiesen haben. Allerdings müssen bei der Untersuchung der MAP-Kinasen im Hinblick auf eine Aktivierung durch eine Präkonditionierung mehrere Fakten berücksichtigt werden. Zum einen wurden in den vielen verschiedenen Studien nicht nur unterschiedliche Spezies (Kaninchen, Ratte,

Schwein) als Versuchstiere verwendet, es wurden auch verschiedene Versuchsmodelle gewählt. So verwendeten einige Arbeitsgruppen *in-vivo*-Tiermodelle, während andere mit isoliert-perfundierten Herzen und wieder andere mit aus Zellkulturen gewonnenen Kardiomyozyten arbeiteten.

Weiterhin sollte der Tatsache Rechnung getragen werden, dass auch bezüglich des Versuchprotokolls insofern unterschieden wurde, als einige Gruppen eine Aktivierung durch eine reine Ischämie, andere nach Ischämie mit anschließender Reperfusion und weitere die Aktivierung durch eine Präkonditionierung untersucht haben.

Zur genaueren Betrachtung der einzelnen MAP-Kinasen soll auf die einzelnen Ergebnisse im Folgenden detailliert eingegangen werden.

4.1.1 Die Rolle der p38 MAP-Kinase

Was die Aktivierung der p38 MAP-Kinase betrifft, ist festzuhalten, dass diese sowohl durch eine alleinige Ischämie als auch durch eine Ischämie mit anschließender Reperfusion phosphoryliert wird (Bogoyevitch 1996, Yin 1997, Clerk 1998, Ping 1999, Ma 1999, Yue 2000). Die Studien zur Aktivierung durch eine ischämische oder pharmakologische Präkonditionierung zeigen gegensätzliche Ergebnisse, wobei einige ein erhöhtes Vorkommen von phospho-p38 MAP-Kinase in isoliert perfundierten Herzen beobachteten (Maulik 1996, Weinbrenner 1997, Sato 2000), während sich in anderen Studien keine Veränderung oder sogar eine Abnahme der phosphorylierten Form zeigte (Marais 2001, Fryer 2001).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MAPKAPK2, ein Substrat der p38 MAP-Kinase, durch eine ischämische Präkonditionierung phosphoryliert und so aktiviert wird, was von den Autoren als indirekter Beweis für eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase interpretiert wurde (Maulik et al., 1998; Nakano et al., 2000).

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen zum einen einen Abfall der phosphorylierten Form von p38 MAP-Kinase im Myokard nach ischämischer Präkonditionierung. Zum anderen zeigt sich auch kein Anstieg der phosphorylierten Form im Myokard oder im Jejunum nach heterotoper Präkonditionierung. Für diese Beobachtung kann es verschiedene Gründe geben. Wie bereits erwähnt, zeigen die meisten Studien eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase nach einer ausgeprägten Ischämie und nicht nach den kürzeren Ischämien zur Präkonditionierung, deren Zeitfenster möglicherweise nicht ausreichend ist, um zu einer Aktivierung zu führen. So wurde auch in einer 1997 veröffentlichten Studie festgestellt, dass die Präkonditionierung per se nicht zu einer Phosphorylierung von p38 MAP-Kinase

führt, sondern erst die anschließende 30minütige Ischämie (Weinbrenner et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden die Organe jedoch direkt nach der Präkonditionierung zur Analyse entnommen, so dass das Myokard keiner länger andauernden Ischämie ausgesetzt war und es so möglicherweise noch nicht zu einer Phosphorylierung gekommen war.

Ein weiterer Aspekt, der die unterschiedlichen Ergebnisse erklären kann, ist die Tatsache, dass auch in präkonditionierten Herzen die Aktivierung der p38 MAP-Kinase nur vorübergehend auftritt. Es ist insofern durchaus möglich, die Organe zu einem Zeitpunkt entnommen zu haben, als die Aktivierung bereits abgeklungen war oder noch gar nicht stattgefunden hatte. In diesem Zusammenhang ist die Studie von Marais et al. sehr aufschlussreich, da sie die Aktivierung von p38 MAP-Kinase zu verschiedenen Zeitpunkten während des gesamten Experiments untersucht. In dieser Untersuchung wurde festgestellt, dass p38 MAP-Kinase in einer multizyklischen Präkonditionierung (3×5 Minuten Ischämie mit anschließend fünf-minütiger Reperfusion) während des ersten Zyklus am stärksten aktiviert wird und diese Aktivierung in den beiden anschließenden Zyklen immer stärker abfällt. Während der darauf folgenden 25minütigen Ischämie wurde nach 5, 10, 15 und 25 Minuten der Grad der Aktivierung von p38 MAP-Kinase anhand der phosphorylierten Form bestimmt. Sowohl in den Kontrollgruppen als auch in den präkonditionierten Herzen verursachte eine Ischämie nach fünf Minuten eine signifikante Aktivierung der p38 MAP-Kinase. Interessanterweise steigerte sich diese Aktivierung in den nicht präkonditionierten Herzen zu einem Maximum bei 15 Minuten, während sie in den präkonditionierten Herzen immer weiter abfiel und nach 15 und 20 Minuten signifikant geringer war als in den Kontrollgruppen (Marais et al., 2001). Diese Beobachtungen tragen wesentlich zu der inzwischen aufgekommenen Diskussion bei, die die Frage aufwirft, ob p38 MAP-Kinase wie zunächst angenommen als Mediator zur protektiven Wirkung der ischämischen Präkonditionierung beiträgt oder ob sie nicht vielmehr schädlich für das Myokard ist. Tatsächlich sind mittlerweile mehrere Studien veröffentlicht worden, die keine durch Ischämie induzierte Aktivierung von p38 nachweisen konnten oder gar eine Verringerung der phosphorylierten Form beobachteten (Nagarkatti und Sha’Afi, 1998; Saurin et al. 1999; Omura et al., 1999).

Eine Beteiligung der p38 MAP-Kinase an der ischämischen Präkonditionierung sollte zudem indirekt nachgewiesen werden, in dem man versuchte, mit dem Inhibitor SB 203580 eine Aufhebung des kardioprotektiven Effektes zu erzielen. Auch hier ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse und die Unklarheit wurde durch weitere Studien unterhalten, die eine Kardioprotektion im Sinne einer verbesserten Wiederherstellung der Funktionalität

der Kardiomyozyten und einer verringerten Apoptoserate nach einer Ischämie durch eine Inhibition der p38 MAP-Kinase beschreiben (Ma et al., 1999; Saurin et al., 1999; Yue et al., 2000; Schneider et al., 2000; Barancik et al., 2000). Diese Beobachtungen lassen demnach eher darauf schließen, dass eine verminderte Aktivierung von p38 MAP-Kinase während einer Ischämie und Reperfusion mit einer Kardioprotektion einhergeht, und die Autoren gehen davon aus, dass die Aktivierung dieser MAP-Kinase schädlich für das ischämische Myokard ist.

Diese These wird weiterhin unterstützt durch den Nachweis, dass es durch die Inaktivierung einer Tyrosinphosphatase, einem Inaktivator der MAP-Kinasen, welche zu einer anhaltenden Aktivierung von p38 MAP-Kinase während der Ischämie führt, zu einem verstärkten Zelluntergang kommt (MacKay und Mochly-Rosen, 2000). Eine weitere Studie, die eine protektive Wirkung durch eine Reduzierung von p38 MAP-Kinase beschreibt, lieferten Saurin und Kollegen, indem sie nachwiesen, dass SB203580 zu einer verminderten Ischämie induzierten Schädigung führt und dass eine Präkonditionierung dieser Zellen eine Aktivierung von p38 α während der Ischämie verhindern konnte. Zudem waren die Zellen, die ein dominant negatives p38 α exprimierten, was eine Aktivierung von p38 verhinderte, resistent gegen eine simulierte letale Ischämie (Saurin et al., 2000).

Insgesamt bleibt die Rolle der p38 MAP-Kinase damit sehr umstritten und wird entsprechend vom jeweiligen Autor unterschiedlich ausgelegt. Unbestritten bleibt jedoch die Tatsache, dass p38 MAP-Kinase durch eine Präkonditionierung beeinflusst wird und damit Einfluß – welcher Art auch immer – im ischämischen Gewebe ausübt.

4.1.1 Bedeutung der p42 und p44 MAP-Kinasen

Betrachtet man die zweite Gruppe der MAP-Kinasen, die extrazellulär regulierten Kinasen p42 und p44, so findet man in den meisten Studien, die eine Beteiligung in der Signalkaskade der ischämischen Präkonditionierung untersucht haben, Konsens hinsichtlich einer Aktivierung nach einer Ischämie. Interessanterweise erfolgt die Aktivierung offenbar erst durch die Reperfusion und nicht durch eine Ischämie alleine (Barancik et al., 1997; Mizukami und Yoshida, 1997; Ping et al., 1999; Behrends et al., 2000; Yue et al., 2000), führt dann jedoch zu einer Reduktion der funktionellen Schädigung durch eine Ischämie. Andere Untersucher fanden einen biphasischen Verlauf der Aktivierung von p42/44 MAP Kinasen, mit einem ersten Gipfel während der Ischämie und einem zweiten Anstieg in der Reperfusionsphase (Fryer et al., 2001; Hausenloy et al.,

2005). Es stellte sich weiterhin heraus, dass die erste Phase für die erneute Aktivierung der p42/44 MAP-Kinasen während der Reperfusion essenziell ist (da Silva et al., 2004).

Zudem wurde gezeigt, dass die ERK-Kaskade nach Aktivierung durch Wachstumsfaktoren notwendig für den Überlebensprozeß der Zelle ist (Parrizas et al., 1995; Gardner und Johnson, 1996). Jedoch gibt es auch für diese Gruppe Studien, die eine Beteiligung der p42 und p44 MAP-Kinasen nicht nachweisen konnten (Kim 1999, Takeishi 2001, Button 2005).

In unseren Untersuchungen sahen wir einen deutlichen Anstieg der phosphorylierten Form beider MAP-Kinasen sowohl im Myokard nach ischämischer als auch im Jejunum nach heterotoper Präkonditionierung. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die p42 und p44 MAP-Kinasen wichtige Bestandteile beider Präkonditionierungsformen sind und als Teil einer noch nicht vollständig geklärten Signaltransduktion Einfluss auf die kardioprotektiven Effekte im ischämischen Myokard nehmen.

4.1.2 JNK 1 und 2

Auch zur dritten Gruppe der MAP-Kinasen, den JNK 1 und 2, gibt es einige Daten, die eine Aktivierung im Rahmen der ischämischen Konditionierung postulieren (Sato 2000, Takeishi 2001, Mocanu 2002) und andere, die keine Aktivierung nachweisen konnten (Nakano 2000, Gu 2001). Insgesamt gibt es zu dieser Gruppe der MAP-Kinasen weitaus weniger Daten als zu den beiden anderen Gruppen, doch selbst die vorliegenden Daten zeichnen kein klares Bild der Rolle der MAP-Kinasen JNK 1 und 2 für die ischämische Präkonditionierung. Den auch als stress-induzierte-aktivierten Proteinkinasen bezeichneten Formen wird eine schädigende Wirkung auf ischämisches Gewebe nachgesagt, insbesondere da sie Zelltod induzierend sind. Dadurch ergibt sich auch für diese Gruppe, ähnlich der p38 MAP-Kinase, eine diskussionswürdige Beteiligung an der ischämischen und heterotopen Präkonditionierung.

In der hier vorliegenden Untersuchung fand sich eine Aktivierung beider MAP-Kinasen nach ischämischer Präkonditionierung im Myokard, wobei nur die von JNK 1 als statistisch signifikant zu werten ist. Entsprechend postulieren wir eine Beteiligung auch dieser Kinasen im Sinne einer Kardioprotektion an der ischämischen Präkonditionierung, wobei die genaue Rolle noch klarer definiert werden muss.

4.2 Einfluss der MAP-Kinasen nach heterotoper Präkonditionierung auf das Myokard

Die untersuchten MAP Kinasen werden allesamt – mit Ausnahme der p38 MAP-Kinase - nach heterotoper Präkonditionierung im Jejunum aktiviert, was sich durch ein signifikant erhöhtes Vorkommen der jeweils phosphorylierten Form zeigt. Im Gegensatz zum Jejunum erfolgt keine Phosphorylierung der untersuchten MAP-Kinasen im Myokard nach heterotoper Präkonditionierung, was zum einen die Frage offen lässt, warum es nicht zu einer Aktivierung, und zum anderen, wie es zu der Vermittlung des kardioprotektiven Effektes im Zielorgan kommt. Offensichtlich spielen sich im direkt ischämischen Gewebe – hier im Jejunum – und im zu präkonditionierten Gewebe – dem Myokard – unterschiedliche intrazelluläre Vorgänge ab.

Als Beispiel sei die Generierung freier Radikale im Rahmen einer Ischämie genannt, welche bekannterweise MAP-Kinasen aktivieren. Entsprechend wurde unlängst eine Studie veröffentlicht, die zeigte, dass die heterotope Präkonditionierung unmittelbar abhängig von einer Generierung freier Radikale ist (Chen et al., 2005). Als Versuchsmodell war dabei eine heterotope Präkonditionierung durch eine Okklusion der Femoralarterie gewählt worden. Die Ergebnisse erbrachten ein erhöhtes Vorkommen von freien Radikalen im Myokard, jedoch erst zwei Stunden nachdem die Präkonditionierungsprozedur abgeschlossen war. Da es bei der heterotopen Präkonditionierung im Myokard zunächst nicht zu einer Ischämie kommt, werden hier auch keine freien Radikale durch die Ischämie generiert, so dass entsprechend auch keine Aktivierung der MAP-Kinasen in Gang gesetzt werden kann. Möglicherweise geschieht dies erst nach der Infarktischämie, wobei erst nach anschließender Reperfusion freie Radikale produziert und im Anschluss eine Phosphorylierung der MAP-Kinasen stattfindet. Wie bereits erwähnt, wurde in der vorliegenden Studie das Myokard direkt nach der mesenterialen Ischämie und Reperfusion und nicht nach der Myokardinfarktphase untersucht, womit eine fehlende Aktivierung der MAP-Kinasen im Myokard hinlänglich erklärt wäre. Zudem erfolgte in der oben erwähnten Studie eine sehr lange Präkonditionierungsphase mit 4 Zyklen einer 10-Minütigen Ischämie und Reperfusion, was möglicherweise zusätzlich die Freisetzung freier Radikale stimuliert hat.

Eine weitere Erklärung für die fehlende Aktivierung der MAP-Kinasen im Myokard nach heterotoper Präkonditionierung liefert die Untersuchung von Genveränderungen auf

mRNA Ebene. Dazu wurde eine Studie veröffentlicht, die eine Genveränderung auf mRNA Ebene mit einer cDNA Microarray Technik in den präkonditionierten Organen, darunter Herz, Lunge, Niere und Darm untersuchte (Huda et al., 2005). Dabei stellte sich heraus, dass die mRNA Ebene in Bezug auf die MAP-Kinasen im Myokard nach heterotoper Präkonditionierung nicht beeinflusst wird, während bei wohlbekanntem Mediatoren der heterotopen Präkonditionierung, wie zum Beispiel das CGRP, ein zweifacher Anstieg des CGRP Rezeptor-Proteins zu verzeichnen war. Ausschließlich in der Niere fand sich nach 24 Stunden ein zweifacher Anstieg für die MAPKAP2 mRNA, einem Substrat von p38.

Unabhängig von der fehlenden Aktivierung im Zielorgan sind die MAP-Kinasen wichtiger Bestandteil der Signaltransduktion, jedoch nicht wie erwartet im Sinne einer lokalen Wirkung vor Ort, sondern über einen weiteren noch zu untersuchenden Mechanismus, der die Wirkung vom Konditionierungsorgan zum Zielorgan vermittelt. Grundsätzlich kommt hier ein humoraler oder auch neuronaler Transmitter in Frage.

Für den neuronalen Weg wurde CGRP postuliert und eine Wirkung bei der heterotopen Präkonditionierung auf die Infarktgrößenreduktion sowie die Freisetzung von PKC im Myokard beschrieben (Wolfrum et al, 2002). Interessant ist an dieser Stelle, dass PKC als Bestandteil der Transduktion der ischämischen als auch der heterotopen Präkonditionierung im Myokard aktiviert wird und für die Kardioprotektion diese Aktivierung essenziell ist, wohingegen eine Aktivierung der nachgeschalteten MAP-Kinasen im Myokard nicht mehr notwendig ist. Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied der Signaltransduktion beider Präkonditionierungsformen.

In den ischämischen Geweben hingegen spielt sich offensichtlich derselbe Mechanismus ab und hier sind deutliche Übereinstimmungen beider Formen klar erkennbar.

Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob die MAP-Kinasen sowohl im Effektororgan aktiviert werden und von hier aus einen Einfluß ausüben und weiterhin, ob auch eine Aktivierung im Myokard als Zielorgan stattfindet, um hier direkt einen kardioprotektiven Effekt zu bewirken. Interessanterweise stellte sich heraus, dass eine direkte Aktivierung im Myokard nicht erfolgt, aber eine Aktivierung der MAP-Kinasen im Jejunum bereits ausreicht, um eine Kardioprotektion zu gewährleisten. Damit konnte mit dieser Arbeit ein wesentlicher Unterschied in der Signaltransduktion beider Präkonditionierungsformen aufgezeigt und zudem ein weiterer wichtiger Bestandteil in der bisher noch immer

unvollständig geklärten Signaltransduktion der heterotopen Prækonditionierung aufgedeckt werden.

Es sollte nun Bestandteil weiterer Untersuchungen sein, den Übertragungsweg vom prækonditionierten zum Zielorgan genauer zu untersuchen, um hier beispielsweise mit Pharmaka eingreifen zu können.

Da die MAP-Kinasen p42 und p44 zudem wiederum sehr viele andere Proteine aktivieren, die an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind, wäre es durchaus vorstellbar, dass das Signal für die kardioprotektive Wirkung nicht direkt durch die MAP-Kinasen sondern über einen anderen nachgeschalteten Mediator vermittelt wird. In Frage kommen dafür zum Beispiel Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 und c-Myc oder aber auch alpha B-Crystallin sowie die NHE-Kinase p90RSK (Armstrong 2004).

4.3 Einfluss der MAP-Kinase-Inhibitoren

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten MAP Kinase Inhibitoren (SB203580, PD98059, SB600125) vermochten die kardioprotektive Wirkung der heterotopen Prækonditionierung aufzuheben. Entsprechend sind in den mit den Inhibitoren behandelten Untersuchungsgruppen die Infarktgrößenflächen nicht reduziert, sondern entsprechen denen der Kontrollgruppe. Die Aufhebung des kardioprotektiven Effekts durch die MAP-Kinase Inhibitoren bestätigt damit indirekt eine Beteiligung der MAP-Kinasen an der heterotopen Prækonditionierung.

Der inaktivierende Effekt durch die Inhibitoren SB203580 und SP600125 kommt durch eine Interaktion mit den katalysierenden Zentrum beziehungsweise der ATP-Bindungsstelle der MAP-Kinasen zustande. Zudem führen die Inhibitoren über einen ungeklärten Mechanismus zu einer Änderung des Phosphorylierungszustandes von p38 bzw. JNK1/2, was als zusätzlicher inaktivierender Effekt der Inhibitoren mit direktem Angriffspunkt an den MAP-Kinasen, jedoch möglicherweise auch durch einen Angriffspunkt an einer übergeordneten Stelle der MAP-Kinase Kaskade bedingt sein kann. Eine gewisse Unspezifität der Inhibitoren kann damit nicht bestritten werden. Insbesondere über den JNK 1/2 Inhibitor SB600125 ist eine weitere Einflussnahme auf andere Proteinkinasen, beispielsweise die Proteinkinase D1 und die „maternal embryonic leucine zipper kinase“, bekannt.

Wie bereits erwähnt, konnte im Falle von p38 weder eine Aktivierung im Myokard noch im Jejunum nachgewiesen werden. Allerdings scheint p38 MAP-Kinase bereits in hohem

Maße in nicht-ischämischen Geweben in phosphorylierter Form vorzukommen, was für die Inhibierung durch SB203580 wahrscheinlich den Angriffspunkt ausmacht. Dementsprechend ist p38 MAP-Kinase möglicherweise nicht als direkter Mediator an der heterotopen Präkonditionierung beteiligt, das Vorhandensein der MAP-Kinase scheint jedoch unabhängig davon für eine weitere Signalverarbeitung unerlässlich zu sein. Interessant in diesem Zusammenhang ist eine Studie von Sun et al., in der die heterotope Präkonditionierung des Gehirns durch eine Extremitätenischämie Bestandteil der Untersuchung war. Die p38 MAP-Kinase zeigte sich dabei als wichtigster Bestandteil der Transduktion der heterotopen Präkonditionierung. In den entsprechenden Blots aus Geweben des Hippocampus wurde eine Erhöhung des Vorkommens von phosphoryliertem p38 MAP-Kinase sechs Stunden nach der Präkonditionierung aufgezeigt. Weiterhin führte eine Behandlung mit dem p38 MAP-Kinase-Inhibitor SB203580 zu einer Aufhebung des protektiven Effektes der Präkonditionierung, was sich mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit deckt (Sun et al., 2006).

Auch hinsichtlich des MEK 1 Inhibitor PD 98059 ist bekannt, dass er durch die Inhibierung von ERK 1/2 die protektive Wirkung der ischämischen Präkonditionierung aufhebt (Fryer et al 2001; Strohm et al 2002). Diese Beobachtung kann in dieser Arbeit bestätigt werden, indem eine Aufhebung der Kardioprotektion auch während der heterotopen Präkonditionierung nach Gabe von PD98059 beobachtet wurde und sich damit eine Funktion der MAP Kinasen ERK 1 und 2 an der heterotopen Präkonditionierung widerspiegelt.

Dies gilt gleichermaßen für die MAP-Kinasen JNK 1 und 2, für die ebenso keine direkte Aktivierung im Myokard nach heterotoper Präkonditionierung gesehen werden konnte, dennoch eine Rolle in der Signaltransduktion nicht bestritten werden kann. Wie auch bei den anderen Inhibitoren zeigte sich für SB600125 eine Aufhebung des kardioprotektiven Effektes, da sich die Infarktflächen nicht verkleinerten und der Gehalt an phosphoryliertem JNK 1 und 2 sich in den entsprechenden Jejunumproben deutlich verringerte. Obwohl der Inhibitor SB600125 eine gewisse Unspezifität hat, ist davon auszugehen, dass in diesem Fall der Einfluß auf JNK 1 und 2 den entscheidenden Punkt ausmacht. Es konnte zudem für keine andere Proteinkinase, die auch durch SB600125 inaktiviert wird, eine Beteiligung an der Transduktion gesichert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die MAP-Kinasen eine essenzielle Rolle in der heterotopen Präkonditionierung spielen, wobei der genaue Ablauf im Myokard nach

heterotoper Präkonditionierung noch unklar bleibt. Eine Aktivierung der MAP-Kinasen in dem präkonditionierenden Organ wurde eindeutig nachgewiesen, hingegen scheint eine Aktivierung im präkonditioniertem Organ selbst nicht zwingend notwendig für die Kardioprotektion zu sein. Stattdessen wird nach Aktivierung der MAP-Kinasen im Jejunum dieser Effekt durch andere Mediatoren auf das Herz vermittelt. Im Myokard selbst führen offenbar andere, nicht identische Signalwege, zu einer Verringerung der Infarktfläche.

Die ischämische und heterotope Präkonditionierung unterscheiden sich also insofern, als eine Aktivierung der MAP-Kinasen für beide Präkonditionierungsformen unerlässlich ist, diese Aktivierung im Zielorgan nach der heterotopen Präkonditionierung jedoch nicht in der unmittelbaren Signaltransduktion für den kardioprotektiven Effekt beteiligt ist. Unbestritten ist die ischämische Präkonditionierung eine in der Klinik nur schwer einsetzbare Möglichkeit, wohingegen die heterotope Präkonditionierung eine gute Alternative für die klinische Anwendung widerspiegelt. Bisher sind die Signaltransduktionswege jedoch noch zu unvollständig verstanden, so dass eine pharmakologische Beeinflussung derzeit noch nicht möglich ist. Entsprechend liefert die vorliegende Arbeit einen weiteren Baustein zum Verständnis eines Phänomens, das noch immer nicht ganz verstanden ist und bis zum Einsatz im klinischen Umfeld noch eingehender untersucht werden muss.

5 Zusammenfassung

Kurze Ischämien im Stromgebiet einer Koronararterie aktivieren Schutzmechanismen des Myokards, welche die Folgen eines länger dauernden und infarktverursachenden Gefäßverschlusses vermindern (ischämische Präkonditionierung). Ein ähnlicher Schutzeffekt kann auch auf das Herz übertragen werden, wenn die Ischämie in einem Myokard-fernen Stromgebiet, zum Beispiel der Arteria mesenterica superior, induziert wird (heterotope Präkonditionierung). Gerade die Signalwege der heterotopen Präkonditionierung erscheinen für eine therapeutische Nutzung vielversprechend, sind aber noch wenig erforscht. Als mögliche Mediatoren der intrazellulären Signaltransduktion kommen sogenannte „Mitogen-aktivierte Proteinkinasen“ (MAP-Kinasen) in Frage, die an verschiedenen Vorgängen im Bereich der Zellteilung, Apoptose sowie bei der Reaktion der Zellen auf diverse Umweltreize beteiligt sind. Verschiedene Subtypen von MAP-Kinasen werden bei einer ischämischen Präkonditionierung aktiviert, ihre funktionelle Bedeutung ist allerdings umstritten. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit erstmalig für die MAP-Kinasen p38, p42/44 und JNK1/2 untersucht werden, ob sie im Rahmen der heterotopen Präkonditionierung aktiviert werden, und welche Auswirkung ihre Inhibition auf die Infarktgröße ausübt.

Zunächst wurde an der narkotisierten Ratte das Prinzip der heterotopen Präkonditionierung durch Okklusion der A. mesenterica superior nachvollzogen und eine Verminderung der Infarktgröße bei einem darauffolgenden Herzinfarkt bestätigt. Die Aktivierung der verschiedenen MAP-Kinasen wurde in Jejunum- und Herzgewebe mittels Westernblot bestimmt. Durch Vorbehandlung mit den spezifischen Inhibitoren SB203580, PD 98059 und SP600125 wurde der funktionelle Anteil der einzelnen MAP-Kinasen an den Schutzmechanismen ermittelt.

Eine heterotope Präkonditionierung reduzierte die Infarktgröße bei den Versuchstieren signifikant, hatte aber keinen Einfluß auf den mittleren arteriellen Druck oder die Herzfrequenz. Jeder der eingesetzten MAP-Kinase Inhibitoren verhinderte den kardioprotektiven Effekt der heterotopen Präkonditionierung, womit eine Beteiligung der MAP-Kinasen nachgewiesen wurde. Erwartungsgemäß war eine Aktivierung von zwei der drei Untergruppen (p42/44 und p46/52) der MAP-Kinasen nach Erzeugung einer heterotopen Präkonditionierung im Jejunum nachweisbar. Überraschenderweise erfolgte jedoch keine Aktivierung dieser MAP-Kinasen im Myokard, so dass sich hier klare Unterschiede in der Signaltransduktion der ischämischen und der heterotopen

Präkonditionierung zeigten. Eine Aktivierung der MAP-Kinasen im Myokard ist offenbar nicht als Effektor der Kardioprotektion wirksam, sondern vermittelt deren Induktion im Rahmen der präkonditionierenden Ischämie. Insofern liegt ihre Funktion in der Vermittlung des protektiven Effekts vom Ischämieorgan zum Zielorgan, in diesem Fall dem Myokard, wobei humorale oder auch neuronale Transmitter in Frage kommen.

Insgesamt demonstriert diese Arbeit die funktionelle und organabhängige Bedeutung von MAP-Kinasen für eine heterotope Präkonditionierung. Eine pharmakologische Aktivierung dieser Signalwege könnte in Zukunft eine therapeutische Option zur Behandlung oder Prophylaxe ischämischer Erkrankungen darstellen.

6 Literaturverzeichnis

Ambrosino C, Iwata T, Scafoglio C, Mallardo M, Klein R, Nebreda AR: TEF-1 and C/EBP β are major p38 α MAPK-regulated transcription factors in proliferating cardiomyocytes. *Biochem J.* 396, 163-172 (2006)

Armstrong SC, Delacey M, Ganote CE: Phosphorylation state of hsp27 and p38 MAPK during preconditioning and protein phosphatase inhibitor protection of rabbit cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 31, 555-567 (1999)

Armstrong SC: Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* Feb 15;61(3):427-36. Review (2004)

Baines CP, Goto M, Downey JM: Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* Jan;29(1):207-16 (1997)

Baines CP, Wang L, Cohen MV, Downey JM: Protein tyrosine kinase is downstream of protein kinase C for ischemic preconditioning's anti-infarct effect in the rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol.* Feb;30(2):383-92 (1998)

Baines CP, Cohen MV, Downey JM: Signal transduction in ischemic preconditioning: the role of kinases and mitochondrial K(ATP) channels. *J Cardiovasc Electrophysiol.* May;10(5):741-54. Review (1999)

Baines CP, Liu GS, Birincioglu M, Critz SD, Cohen MV, Downey JM: Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol*;276:H1361-8 (1999)

Baines CP, Zhang J, Wang GW, Zheng YT, Xiu JX, Cardwell EM, et al: Mitochondrial PKC ϵ and MAPK form signaling modules in the murine heart enhanced mitochondrial PKC ϵ -MAPK interactions and differential MAPK activation in PKC ϵ -induced cardioprotection. *Circ Res*;90:390-7 (2002)

Barancik M, Htun P, Schaper W: Okadaic acid and anisomycin are protective and stimulate the SAPK/JNK pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*;34:182-90 (1999)

Barancik M, Htun P, Strohm C, Kilian S, Schaper W: Inhibition of the cardiac p38-MAPK pathway by SB203580 delays ischemic cell death. *J Cardiovasc Pharmacol.* Mar;35(3):474-83 (2000)

Barbosa V, Sievers RE, Zaugg CE, Wolfe CL: Preconditioning ischemia time determines the degree of glycogen depletion and infarct size reduction in rat hearts. *Am Heart J*;131:224-30 (1996)

Behr TM, Nerurkar SS, Nelson AH, Coatney RW, Woods TN, Sulpizio A, et al: Hypertensive end-organ damage and premature mortality are p38 mitogen-activated protein kinase-dependent in a rat model of cardiac hypertrophy and dysfunction. *Circulation*;104:1292-8 (2001)

Behrends M, Schulz R, Post H, Alexandrov A, Belosjorow S, Michel MC, et al: Inconsistent relation of MAPK activation to infarct size reduction by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;279:H1111-9 (2000)

Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA: Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation.* Sep 2;96(5):1641-6 (1997)

Birnbaum Y, Kloner RA: Percutaneous transluminal coronary angioplasty as a model of ischemic preconditioning and preconditioning-mimetic drugs. *J Am Coll Cardiol.* Mar 15;33(4):1036-9 (1999)

Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall CJ, Sugden PH: Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res.* Aug;79(2):162-73 (1996)

Cave, ACH: Ischaemic preconditioning and contractile function: studies with normothermic and hypothermic global ischaemia. *J Mol Cell Cardiol.*, 24, 1113-23 (1992)

- Chai W, Mehrotra S, Jan Danser AH, Schoemaker RG: The role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in ischemic preconditioning in isolated rat hearts. *Eur J Pharmacol*;531:246-53 (2006)
- Chen YS, Chien CT, Ma MC, Tseng YZ, Lin FY, Wang SS, et al: Protection "outside the box" (skeletal remote preconditioning) in rat model is triggered by free radical pathway. *J Surg Res*;126:92-101 (2005)
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P: Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*;351:95-105 (2000)
- Dickson EW, Lorbar M, Porcaro WA, Fenton RA, Reinhardt CP, Gysembergh A, Przyklenk K: Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent. *Am J Physiol*. Dec;277(6 Pt 2):H2451-7 (1999)
- Downey JM, Cohen MV: Signal transduction in ischemic preconditioning. *Adv Exp Med Biol*;430:39-55. (1997)
- Fryer RM, Pratt PF, Hsu AK, Gross GJ: Differential activation of extracellular signal regulated kinase isoforms in preconditioning and opioid-induced cardioprotection. *J Pharmacol Exp Ther*;296:642-9 (2001)
- Gerits N, Kostenko S, Moens U: In vivo functions of mitogen-activated protein kinases: conclusions from knock-in and knock-out mice. *Transgenic Res*;16:281-314 (2007)
- Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD: Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*;94:2193-200 (1996)
- Gray MO, Karliner JS, Mochly-Rosen D: A selective ϵ -protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death. *J Biol Chem*;272:30945-51 (1997)
- Gross GJ, Auchampach JA: Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res*. Feb;70(2):223-33 (1992)
- Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM: Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*. Aug 1;63(2):305-12 (2004)

Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM: Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;288:H971-6 (2005)

Hausenloy DJ, Yellon DM: Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res*;70:240-53 (2006)

Hausenloy DJ, Yellon DM: Preconditioning and Postconditioning: united at reperfusion. *Pharmacol Ther*; 116:173-191 (2007)

Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, Harris J, Barnard M, Grundy E, Ashley E, Vichare S, Di Salvo C, Kolvekar S, Hayward M, Keogh B, MacAllister RJ, Yellon DM: Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *Lancet*. Aug 18;370(9587):575-9 (2007)

Hausenloy DJ, Yellon DM: Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res*;79:377-386 (2008)

Huda R, Chung DH, Mathru M: Ischemic preconditioning at a distance: altered gene expression in mouse heart and other organs following brief occlusion of the mesenteric artery. *Heart Lung Circ*;14:36-43 (2005)

Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschitzky JA, et al: Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation*;106:2881-3 (2002)

Kim SO, Baines CP, Critz SD, Pelech SL, Katz S, Downey JM, Cohen MV: Ischemia induced activation of heat shock protein 27 kinases and casein kinase 2 in the preconditioned rabbit heart. *Biochem Cell Biol*.;77(6):559-67 (1999)

Kloner RA: Clinical application of remote ischemic preconditioning. *Circulation*. Feb 17;119(6):776-8 (2009)

Küntschler MV, Kastell T, Altmann J, Menke H, Gebhard MM, Germann G: Acute remote ischemic preconditioning II: the role of nitric oxide. *Microsurgery*.;22(6):227-31 (2002)

Lang SC, Elsässer A, Scheler C, Vetter S, Tiefenbacher CP, Kübler W, Katus HA, Vogt AM: Myocardial preconditioning and remote renal preconditioning--identifying a protective factor using proteomic methods? *Basic Res Cardiol.*;101(2):149-58 (2006)

Liem, D.A., Ver, P.D., Ploeg, H., Kazim, S. & Duncker, D.J.: Sites of action of adenosine in interorgan preconditioning of the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283, H29-H37 (2002)

Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM: Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*. Jul;84(1):350-6 (1991)

Liu Y, Tsuchida A, Cohen MV, Downey JM: Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol*. Mar;27(3):883-92 (1995)

Lochner A, Genade S, Hattingh S, Marais E, Huisamen B, Moolman JA: Comparison between ischaemic and anisomycin-induced preconditioning: role of p38 MAPK. *Cardiovasc Drugs Ther*;17:217-30 (2003)

Loukogeorgakis SP, Williams R, Panagiotidou AT, Kolvekar SK, Donald A, Cole TJ, Yellon DM, Deanfield JE, MacAllister RJ: Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP)-channel dependent mechanism. *Circulation*. Sep 18;116(12):1386-95. Epub 2007 Aug 27 (2007)

Lujan HL, DiCarlo SE: Partial hindlimb occlusion reduced the susceptibility to sustained ventricular tachycardia in conscious rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. Sep;14(3):199-206 (2009)

Marais E, Genade S, Salie R, Huisamen B, Maritz S, Moolman JA, et al: The temporal relationship between p38 MAPK and HSP27 activation in ischaemic and pharmacological preconditioning. *Basic Res Cardiol*;100:35-47 (2005)

Maulik N, Yoshida T, Zu YL, Sato M, Banerjee A, Das DK: Ischemic preconditioning triggers tyrosine kinase signaling: a potential role for MAPKAP kinase 2. *Am J Physiol.* Nov;275(5 Pt 2):H1857-64 (1998)

Mizukami Y, Yoshida K: Mitogen-activated protein kinase translocates to the nucleus during ischaemia and is activated during reperfusion. *Biochem J.* May 1;323 (Pt 3):785-90 (1997)

Mocanu MM, Baxter GF, Yue Y, Critz SD, Yellon DM: The p38 MAPK inhibitor, SB203580, abrogates ischaemic preconditioning in rat heart but timing of administration is critical. *Basic Res Cardiol* 95:472-8 (2000;)

Mocanu MM, Bell RM, Yellon DM: PI3 kinase and not p42/p44 appears to be implicated in the protection conferred by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* Jun;34(6):661-8 (2002)

Murry, C.E., Jennings, R.B. & Reimer, KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74, 1124-36 (1986)

Nakano A, Baines CP, Kim SO, Pelech SL, Downey JM, Cohen MV, Critz SD: Ischemic preconditioning activates MAPKAPK2 in the isolated rabbit heart: evidence for involvement of p38 MAPK. *Circ Res.* Feb 4;86(2):144-51 (2000)

Omura T, Yoshiyama M, Shimada T, Shimizu N, Kim S, Iwao H, et al: Activation of mitogen-activated protein kinases in in vivo ischemia/reperfused myocardium in rats. *J Mol Cell Cardiol*;31:1269-79 (1999)

Osada M, Sato T, Komori S, Tamura K: Protective effect of preconditioning on reperfusion induced ventricular arrhythmias of isolated rat hearts. *Cardiovasc Res.* Jun;25(6):441-4 (1991)

Oxman, T., Arad, M., Klein, R., Avazov, N. & Rabinowitz, B: Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am J Physiol*, 273, H1707-12 (1997)

Patel, H.H., Moore, J., Hsu, A.K. & Gross, G.J: Cardioprotection at a distance: mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism. *J Mol Cell Cardiol*, 34, 1317-23 (2002)

Pell, T.J., Baxter, G.F., Yellon, D.M. & Drew, G.M: Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol*, 275, H1542-7 (1998)

Ping, P., Zhang, J., Qiu, Y., Tang, X.L., Manchikalapudi, S., Cao, X. & Bolli, R: Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ Res*, 81, 404-14 (1997)

Ping P, Zhang J, Cao X, Li RC, Kong D, Tang XL, et al: PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits. *Am J Physiol*;276:H1468-81 (1999)

Przyklenk K, Darling CE, Dickson EW, Whittaker P: Cardioprotection 'outside the box' - the evolving paradigm of remote preconditioning. *Basic Res Cardiol*;98:149-57 (2003)

Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P: Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*;87:893-9 (1993)

Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, Hatanaka K, Asanuma H, Aki T, et al: Role of phasic dynamism of p38 mitogen-activated protein kinase activation in ischemic preconditioning of the canine heart. *Circ Res*;88:175-80 (2001)

Sato M, Cordis GA, Maulik N, Das DK: SAPKs regulation of ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;279:H901-907 (2000)

Saurin AT, Martin JL, Heads RJ, Foley C, Mockridge JW, Wright MJ, et al: The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *FASEB J*;14:2237-46 (2000)

Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, Shimizu M, Li J, Cheung M, et al: Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a K_{ATP} -dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning.. Am J Physiol Heart Circ Physiol;292:H1883-90 (2007)

Schneider S, Chen W, Hou J, Steenbergen C, Murphy E: Inhibition of p38 MAPK α/β reduces ischemic injury and does not block protective effects of preconditioning. Am J Physiol Heart Circ Physiol;280:H499-508 (2001)

Schoemaker RG, van Heijningen CL: Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. Am J Physiol Heart Circ Physiol;278:H1571-6 (2000)

Schultz, JE, Hsu, AK & Gross, GJ: Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. Circ Res, 78, 1100-4 (1996)

Schulz R, Belosjorow S, Gres P, Jansen J, Michel MC, Heusch G: p38 MAP kinase is a mediator of ischemic preconditioning in pigs. Cardiovasc Res;55:690-700 (2002)

Shimizu N, Yoshiyama M, Omura T, Hanatani A, Kim S, Takeuchi K, et al: Mitogen-activated protein kinase translocates to the nucleus during ischaemia and is activated during reperfusion. Cardiovasc Res;38:116-24 (1998)

Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, Suto F, Surendra H, Kuzmin E, Li J, Gross G, Wilson GJ, Callahan J, Redington AN: Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. Clin Sci (Lond). Aug 3;117(5):191-200 (2009)

Da Silva R, Grampp T, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M: Differential activation of mitogen-activated protein kinases in ischemic and anesthetic preconditioning. Anesthesiology;100:59-69 (2004)

Solaini G, Harris DA: Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J*;390:377-94 (2005)

Statisches Bundesamt: Todesursachen in Deutschland, Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen, Fachserie 12 Reihe 4, Artikelnummer: 2120400077004, (2008)

Strohm C, Barancik T, Bruhl ML, Kilian SA, Schaper W: Inhibition of the ER-kinase cascade by PD98059 and UO126 counteracts ischemic preconditioning in pig myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol*;36:218-29 (2000)

Strohm C, Barancik M, von Bruehl M, Strniskova M, Ullmann C, Zimmermann R: Transcription inhibitor actinomycin-D abolishes the cardioprotective effect of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*;55:602-18 (2002)

Sun XC, Li WB, Li QJ, Zhang M, Xian XH, Qi J, et al: Limb ischemic preconditioning induces brain ischemic tolerance via p38 MAPK. *Brain Res*;1084:165-74 (2006)

Tang, ZL, Dai, W, Li, YJ & Deng, HW: Involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in early and delayed cardioprotection induced by a brief ischaemia of the small intestine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 359, 243-7 (1999)

Takeishi Y, Huang Q, Wang T, Glassman M, Yoshizumi M, Baines CP, Lee JD, Kawakatsu H, Che W, Lerner-Marmarosh N, Zhang C, Yan C, Ohta S, Walsh RA, Berk BC, Abe J: Src family kinase and adenosine differentially regulate multiple MAP kinases in ischemic myocardium: modulation of MAP kinases activation by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. Nov;33(11):1989-2005 (2001)

Tokuno S, Hinokiyama K, Tokuno K, Löwbeer C, Hansson LO, Valen G: Spontaneous ischemic events in the brain and heart adapt the hearts of severely atherosclerotic mice to ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jun 1;22(6):995-1001 (2002)

Tsuchida A, Liu Y, Liu GS, Cohen MV, Downey JM: alpha 1-adrenergic agonists precondition rabbit ischemic myocardium independent of adenosine by direct activation of protein kinase C. *Circ Res.* Sep;75(3):576-85 (1994)

Vivaldi MT, Kloner RA: Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol*, 121, 522-30 (1985)

Volovsek A, Subramanian R, Reboussin D: Effects of duration of ischaemia during preconditioning on mechanical function, enzyme release and energy production in the isolated working rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* Sep;24(9):1011-9 (1992)

Wall TM, Sheehy R, Hartman JC: Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther.* Aug;270(2):681-9 (1994)

Wang Z, Harkins PC, Ulevitch RJ, Han J, Cobb MH, Goldsmith EJ: The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 18;94(6):2327-32 (1997)

Wang, Y.P., Maeta, H., Mizoguchi, K., Suzuki, T., Yamashita, Y. & Oe, M: Intestinal ischemia preconditions myocardium: role of protein kinase C and mitochondrial K(ATP) channel. *Cardiovasc Res*, 55, 576-82 (2002)

Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, Sárváry L, Strasser RH: Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway. *Cardiovasc Res.* Aug 15;55(3):590-601 (2002)

Wolfrum S, Nienstedt J, Heidbreder M, Schneider K, Dominiak P, Dendorfer A: Calcitonin gene related peptide mediates cardioprotection by remote preconditioning. *Regul Pept*;127:217-24 (2005)

Wolfrum S, Schneider K, Heidbreder M, Nienstedt J, Dominiak P, Dendorfer A: Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKC ϵ -isoform. *Cardiovasc Res*;55:583-9 (2002)

Xiao, L, Lu, R, Hu, CP, Deng, HW & Li, YJ: Delayed cardioprotection by intestinal preconditioning is mediated by calcitonin gene-related peptide. *Eur J Pharmacol*, 427, 131-5 (2001)

Yellon DM, Downey JM: Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev*;83:1113-51 (2003)

Yue TL, Wang C, Gu JL, Ma XL, Kumar S, Lee JC, Feuerstein GZ, Thomas H, Maleeff B, Ohlstein EH: Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circ Res*. Mar 31;86(6):692-9 (2000)

7 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle zuerst bei Herrn Professor Dominiak und Herrn Professor Solbach dafür bedanken, dass ich meine Forschungsarbeit an ihrem Institut durchführen durfte und mir dabei sowohl die Räumlichkeiten als auch die Materialien der Labore zur Verfügung standen.

Herrn Professor Andreas Dendorfer danke ich für die Überlassung des Themas, seine engagierte Betreuung und für die Unterstützung beim Schreiben der Dissertation ganz herzlich.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Marc Heidbreder für seine unendliche Geduld, Mühe und Bereitwilligkeit, mir zu jeder Zeit während der Durchführung der Versuche als auch bei der Erstellung der weiteren Arbeit zur Seite zu stehen.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Klaus Tempel für die nette und bereitwillige Hilfestellung beim Durchführen und Auswerten der Tierversuche und bei Frau Cornelia Magnussen für die liebevolle und geduldige Unterstützung bei der weiteren Arbeit im Westernblot-Labor bedanken.

Auch allen hier nicht aufgeführten Mitarbeitern des Instituts danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit.

Zudem danke ich meinem Freund Torben Hettig ganz besonders für seine Hilfe beim Formatieren, Korrigieren und Fertigstellen der Arbeit.

8 Lebenslauf

Name: Annegret Naumann

Geburtsdatum, -ort: 30. Januar 1979, Leipzig

Anschrift: Große Petersgrube 15, 23552 Lübeck

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulabschluß: 06/1998 Allgemeine Hochschulreife
Christian Rauch Gymnasium, Bad Arolsen

Au-Pair-Jahr: 1998 – 1999 Vienna, Virginia, USA

Studium: 1999-2006 Studium der Humanmedizin an der
Medizinischen Universität zu Lübeck

09/2001 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)

09/2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(1. Staatsexamen)

03/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(2. Staatsexamen)

06/2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(3. Staatsexamen)

Assistenzarztausbildung: seit 2007 Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde,
UKSH, Campus Lübeck

Dissertation: seit 2004 bei Prof. Dr. med. A. Dendorfer, Institut für
experimentelle und klinische Pharmakologie
und Toxikologie, Universität zu Lübeck

Lübeck, Juli 2010

Veröffentlichungen

Heidbreder M.; Naumann A.; Dendorfer A.; Tempel K.; Dominiak P

Remote versus ischemic preconditioning: the differential role of MAP kinase pathways

Cardiovasc. Res. Apr 1; 78(1):108-15 (2008)

Heidbreder M.; Naumann A.; Dendorfer A.; Tempel K.; Dominiak P

The Role of the p38 and p42/44 MAP kinases in Remote Preconditioning versus Ischemic Preconditioning

Poster beim 28. Wissenschaftlichen Kongreß der deutschen Hochdruckliga in Hannover und bei der 46. Frühjahrstagung der DGPT in Mainz . (2004)

Naumann A.; Heidbreder M.; Dendorfer A.; Tempel K.; Dominiak P.

Heterotope vs. ischämische Präkonditionierung: Bedeutung von p38, p42/44 und SAP/JNK MAP Kinasen

Vortrag bei der 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie -, Herz- und Kreislaufforschung in Mannheim (2005)