

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. P. Meybohm

**Die Rolle der G-Protein Rezeptorkinase 2  
in der Sevofluran-induzierten Postkonditionierung  
gegen Herzinfarkt**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

Medizinische Fakultät

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Mia Carlotta Peters

aus Lütjensee

Würzburg im Februar 2021

**Referent:** Professor Dr. med. Dr. h.c. Norbert Roewer

**Koreferent:** PD Dr. med. Jan Stumpner

**Drittreferent:** Prof. Dr. med. Nico Schlegel

**Dekan:** Professor Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 05.07.2021

**Die Promovendin ist Ärztin.**

*Für meine Eltern und meine Schwester.*



## Inhaltsverzeichnis

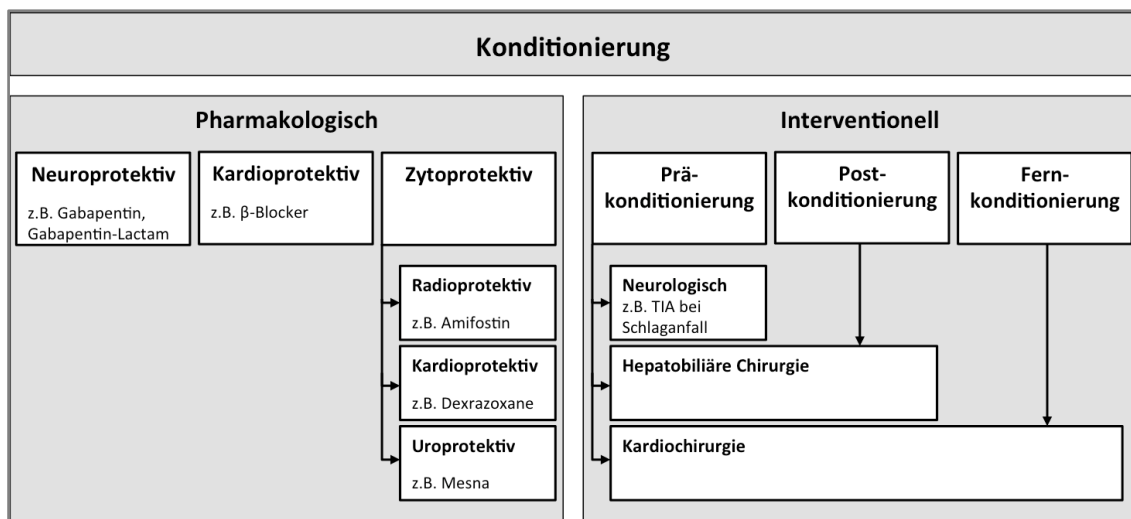
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Organprotektion .....	1
1.2	Kardiale Morbidität und Mortalität.....	2
1.3	Kardioprotektion.....	2
1.3.1	Kardioprotektion durch Präkonditionierung .....	3
1.3.2	Kardioprotektion durch ischämische Präkonditionierung.....	4
1.3.3	Kardioprotektion durch Anästhetika-induzierte Präkonditionierung ....	5
1.3.3.1	Volatile Anästhetika .....	5
1.3.3.2	APC .....	6
1.3.4	Molekulare Mechanismen der Präkonditionierung .....	7
1.3.4.1	IPC.....	7
1.3.4.2	APC .....	9
1.4	Kardioprotektion durch Postkonditionierung .....	10
1.4.1	Ischämische Postkonditionierung.....	11
1.4.2	Anästhetika induzierte Postkonditionierung .....	12
1.4.3	Molekulare Mechanismen der Postkonditionierung .....	13
1.4.3.1	IPost .....	13
1.4.3.2	APost.....	15
<b>2</b>	<b>Die Funktion der GRK2</b> .....	<b>17</b>
2.1	G-Protein gekoppelte Rezeptoren .....	17
2.2	G-Proteine .....	17
2.3	Desensibilisierung des GPCR.....	19
2.4	GRK Familie .....	21
2.5	β-adrenerge Rezeptoren und die Proteinkinase A.....	22
2.6	Rolle der GRK2 im Myokard unter pathophysiologischen Bedingungen .....	24
<b>3</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
4.1	Durchführung der Operationen.....	29
4.1.1	Versuchsgenehmigung .....	29
4.1.2	Versuchstiere.....	29
4.1.3	Narkose und Beatmung .....	29
4.1.4	Präparation.....	30

4.1.5	Koronararterienokklusion .....	30
4.1.6	Experimentelles Protokoll .....	31
4.1.7	Bestimmung der Herzinfarktgrößen und der „Area at Risk“ (AAR) ...	32
4.1.8	Gewebeentnahmen .....	33
4.2	Molekularbiologische Experimente .....	34
4.2.1	Lysate .....	34
4.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach BCA (Pierce) .....	35
4.2.3	Auftrennung der Proteine .....	37
4.2.4	Western-Blot .....	39
4.2.5	Primärantikörper- Inkubation .....	40
4.2.6	Entwicklung .....	41
4.2.7	Ladekontrolle .....	41
4.2.8	Auswertung .....	42
4.2.9	Statistische Analyse .....	42
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
5.1	Ergebnisse .....	43
5.1.1	Hämodynamik .....	43
5.1.2	Körpergewicht und Planimetrie .....	43
5.2	Ergebnisse der Western-Immunoblots .....	45
5.2.1	$\beta$ 1-adrenerger Rezeptor .....	45
5.2.2	$\beta$ 2-adrenerger Rezeptor .....	47
5.2.3	GRK2 .....	48
5.2.4	$\beta$ -Arrestin .....	49
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>VII</b>	
I	Abkürzungsverzeichnis .....	VII
II	Messeinheiten .....	X
III	Abbildungsverzeichnis .....	XI
IV	Tabellenverzeichnis .....	XII
V	Danksagung .....	XIII
VI	Lebenslauf .....	XIV

# 1 Einleitung

## 1.1 Organprotektion

Die Organprotektion ist ein, unter anderem durch Konditionierung, ausgelöster Mechanismus, bei dem Organe durch bestimmte protektive Prozesse, die sowohl intra- als auch extrazellulär stattfinden, vor der Nekrose bzw. dem Zelluntergang bewahrt werden. Diese Vorgänge haben einen besonderen Stellenwert nach Ischämien oder hämorrhagischen und septischen Schockereignissen und in der perioperativen Versorgung. Neben pharmakologischen Ansätzen, wie beispielsweise Medikamente mit kardioprotektiven ( $\beta$ -Blocker bei Hochrisiko Patienten) <sup>1,2</sup> oder neuroprotektiven Eigenschaften (Gabapentin und Gabapentin-Lactam bei retinalen Ischämien) <sup>3</sup>, besitzen die Prä- und Postkonditionierung der betroffenen Organe einen hohen Stellenwert. Die folgende Dissertation bezieht sich ausschließlich auf die Kardioprotektion, während in anderen Studien auch andere Organe im Fokus der Organprotektion stehen, wie zum Beispiel die Protektion der Nieren<sup>4</sup>, der Leber<sup>5</sup> und des Gehirns<sup>6</sup>.



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Konditionierung**

Protektive Konditionierungen können sowohl pharmakologisch als auch interventionell induziert werden. Links dargestellt sind die medikamentösen Mechanismen, rechts werden die im Zusammenhang mit Eingriffen stehenden Konditionierungen aufgezeigt.

## 1.2 Kardiale Morbidität und Mortalität

Sowohl in Deutschland als auch in anderen Industrienationen sind kardiale Erkrankungen, allen voran die Koronare Herzkrankheit (KHK) seit vielen Jahren die häufigste Todesursache. In dem Faktenblatt zur „Gesundheit in Deutschland Aktuell (GEDA)“ des Robert Koch-Instituts wird festgehalten, dass 2012 die Lebenszeitprävalenz von KHK bei Frauen ab 65 Jahren bei 18,3% und bei Männern bei 27,8% liegt <sup>7</sup>.

Die zunehmende Zahl dieser kardialen Risikopatienten stellt in Zukunft besondere Herausforderungen an das perioperative anästhesiologische Management. Primär kardial bedingte Todesfälle, behandlungsbedürftige Arrhythmien, akute Herzinsuffizienz, instabile Angina Pectoris und prä-, intra-, oder postoperativ neu aufgetretene Myokardinfarkte werden als perioperative kardiale Morbidität zusammengefasst <sup>8</sup> und sind damit insbesondere für Anästhesisten relevant, wobei das Risiko für kardiale Ereignisse auch stets vom Typ des chirurgischen Eingriffes abhängt. Große gefäßchirurgische Eingriffe, wie beispielsweise an der Aorta, gelten als besonders risikoreich <sup>9</sup>.

Von diesen Komplikationen, die sowohl bei kardiochirurgischen Eingriffen, als auch bei nicht-kardialen Operationen auftreten können, stellen laut Mangano et al. myokardiale Ischämien und Myokardinfarkte die Wichtigsten dar, wobei myokardiale Ischämien häufiger unmittelbar postoperativ vorkommen <sup>10</sup>. Böttiger et al. haben amerikanische Studien ausgewertet und herausgefunden, dass bei ca. 8 Millionen nicht-kardialen Operationen im Jahr ungefähr eine Million kardiale Ereignisse auftreten, von denen 15.000 Myokardinfarkte sind <sup>11</sup>. Diese Fakten zeigen deutlich, dass die Entwicklung und klinische Implementierung kardioprotektiver Strategien eine wichtige Aufgabe der anästhesiologischen Forschung ist, um die perioperative Versorgung kardialer Risikopatienten noch sicherer zu machen.

## 1.3 Kardioprotektion

Die Strategien, das Herz vor Ischämien zu schützen, sind vielfältig. Dabei spielen die Prä- und Postkonditionierung wichtige Rollen. Darüber hinaus haben in letzter Zeit die ischämische Fern- und pharmakologische Konditionierung an Bedeutung gewonnen.

Die Präkonditionierung ist von den genannten Mechanismen am Weitreichendsten erforscht, wenngleich dieses Prinzip am Schwersten im Klinikalltag anzuwenden ist. So ist das perioperative Auftreten von Myokardinfarkten nicht vorhersehbar oder eine Angina Pectoris hat bereits stattgefunden und präkonditionierende Mechanismen induziert.



Prä- und Postkonditionierung unterscheiden sich zeitlich. Bei der Präkonditionierung erfolgt der protektive Stimulus vor dem ischämischen Ereignis, bei der Postkonditionierung nach der Ischämie. Bei beiden Formen der Konditionierung kann der Stimulus entweder ischämisch oder Anästhetika- bzw. pharmakologisch induziert werden. Neben ischämischer Präkonditionierung (IPC), Anästhetika-induzierter Präkonditionierung (APC), ischämischer Postkonditionierung (IPost), und Anästhetika-induzierter Postkonditionierung (APost) gibt es auch das Prinzip der ischämischen Fernkonditionierung. Dabei wird nicht das Myokard selbst durch ischämische Phasen präkonditioniert, sondern ein herzfernes Gewebe, z.B. durch Anlegen einer Blutdruckmanschette am Arm. Einige Studien haben bereits einen signifikanten Nutzen der Fernkonditionierung gezeigt<sup>12 13</sup>, während die größte Studie zu diesem Thema „ERICCA“ (Effect of Remote Ischaemic preConditioning on Clinical Outcomes in Patients undergoing Coronary Artery Bypass Graft Surgery), die bisherigen Ergebnisse hinsichtlich des besseren Outcomes nicht belegen kann<sup>14</sup>. Eine weitere multizentrische Studie von Meybohm et al. zeigte im Jahr 2015 erneut, dass eine Fernkonditionierung, ausgelöst durch repetitive ischämische Phasen an der oberen Extremität während elektiver kardiochirurgischer Eingriffe, keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Experimentalgruppe erbringt<sup>15</sup>.

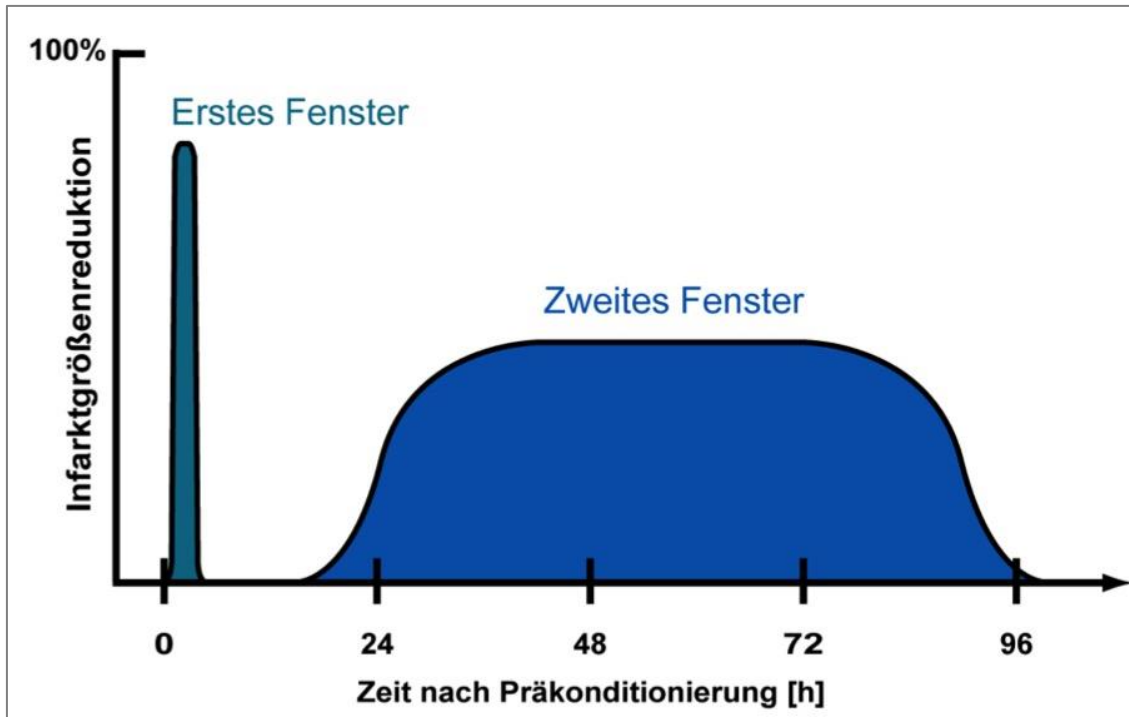
### 1.3.1 Kardioprotektion durch Präkonditionierung

Der Begriff „Präkonditionierung“ beschreibt einen Trigger oder Stimulus, der vor einem ischämischen Ereignis stattfindet und den Phänotyp und die molekularen Abläufe der Zelle insoweit verändert, dass die ischämische Phase und die darauffolgende Reperfusionphase besser toleriert werden. Von der ischämischen Präkonditionierung (IPC) ist die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung (APC) abzugrenzen, die mittels volatiler Anästhetika, wie Desfluran, Sevofluran oder Isofluran induziert wird. Neben der APC und IPC können Pharmaka wie Opioide<sup>16</sup>, Nitroglycerin<sup>17</sup>, Dipyridamol<sup>18</sup>, Adenosin<sup>19</sup>, aber auch ATP-sensitive Kaliumkanal ( $K^+_{ATP}$ -Kanal) Aktivatoren wie z.B. Nicorandil<sup>20</sup> das Herz durch Präkonditionierung vor ischämischen Phasen schützen<sup>21</sup>. Murry et al. entdeckten 1986 beinahe zufällig das Phänomen der Präkonditionierung in einem Versuch an Hunden<sup>22</sup>. Hierbei wurde gezeigt, dass repetitive Okklusionen der Koronararterien vor einer kardialen Ischämie die Herzinfarktgröße signifikant reduzieren.

### 1.3.2 Kardioprotektion durch ischämische Präkonditionierung

IPC wird als einer der wirkungsvollsten kardialen Protektionsmechanismen angesehen und ist in vielen Tierspezies bisher nachgewiesen worden <sup>23</sup>. Wie bereits erwähnt, entdeckten Murry et al. im Rahmen ihrer 1986 publizierten Studie, dass kurze, aufeinanderfolgende Episoden myokardialer Ischämien, die keinen irreversiblen Myokardschaden auslösen, die Toleranz der Kardiomyozyten gegen längere Ischämiephasen verstärken und die resultierende Herzinfarktgröße signifikant senken <sup>24</sup>. Eine solche ischämische Präkonditionierung bietet zudem Schutz vor gefährlichen Herzrhythmusstörungen <sup>25</sup>.

Klinische Studien belegen den schützenden Effekt der IPC (bis 24h vor Infarkt) mit einer signifikanten Reduzierung des Nekroseareals im Myokard, einer verbesserten LVEF und einem geringeren Anstieg von Troponin-T und CK-MB bei exponierten Patienten <sup>26</sup>. Um die ischämische Präkonditionierung auch therapeutisch nutzen zu können, wird die Möglichkeit beschrieben, bei der PCI repetitive Ballondilatationen durchzuführen. Dies führt zu einer signifikanten Abnahme von kardialen Komplikationen im Verlauf und einer erhöhten 1-Jahres-Überlebensrate gegenüber unbehandelten Patienten <sup>27</sup>. Die IPC lässt sich zeitlich in zwei Wirkungsphasen unterteilen. Das erste kardioprotektive Fenster wird wenige Minuten bis 2h nach dem IPC-Reiz beschrieben <sup>22,28</sup>. 1 bis 2 Tage nach dem ischämischen Reiz erhöht sich abermals die Widerstandskraft gegenüber Ischämien. Diese Phase wird als zweites Fenster der Präkonditionierung bezeichnet und kann 24 bis 72 Stunden anhalten <sup>29-31</sup>. Dieser biphasische Verlauf wird in der folgenden Abb. 2 schematisch dargestellt und zeigt deutlich, dass zwischen den beiden Fenstern das Herz nicht gegenüber Ischämien geschützt ist.



**Abb. 2: Zweites Fenster der IPC**

Dargestellt ist der biphasische Verlauf der IPC am ischämischen Herzen. Betont wird hierbei die intermediäre Reduktion der kardioprotektiven Wirkung, die nach dem ersten Fenster der IPC auftritt<sup>29</sup>.

IPC= ischämische Präkonditionierung, h= Zeit in Stunden

### 1.3.3 Kardioprotektion durch Anästhetika-induzierte Präkonditionierung

#### 1.3.3.1 Volatile Anästhetika

Insbesondere volatile Anästhetika haben einen herausragenden Stellenwert in der pharmakologisch-induzierten Kardioprotektion. Als Gemeinsamkeit gilt bei volatilen Anästhetika die funktionelle Ether-Gruppe. Historisch entwickelten sich die heute weitläufig bekannten und viel verwendeten Flurane Isofluran, Desfluran und Sevofluran aus ihren Vorläufern Chloroform und Diethylether. Diese haben einen hohen Dampfdruck, einen niedrigen Siedepunkt und sind weitgehend niedermolekular. Ihre anästhesiologische Wirkung wird als hypnotisierend, gering analgesierend und schwach muskelrelaxierend beschrieben<sup>32</sup>. Bei Anästhesien und Narkosen werden volatile Anästhetika mittels eines Narkosemittelverdampfers (Vaporen) der Atemluft beigemischt und gelangen so über pulmonale Diffusion in den Organismus. Des Weiteren werden den volatilen Anästhetika negativ inotrope und chronotrope Eigenschaften auf das Myokard und den Sinusknoten zugesprochen, die sich günstig auf die myokardiale Sauerstoffbilanz auswirken<sup>33</sup>.

### 1.3.3.2 APC

Die präkonditionierende Wirkung der APC auf das Myokard wurde in zahlreichen tierexperimentellen Studien nachgewiesen und im Hinblick auf die Mechanismen untersucht. Die klinischen Studien zur APC zeigen zwar ebenfalls kardioprotektive Effekte, allerdings deutlich schwächer ausgeprägt als die experimentellen Studien erwarten lassen. Gründe für die inkongruenten Daten können laut Bolli et al. eventuelle Dauermedikationen, Begleiterkrankungen oder verschiedene Techniken und Modelle der aortocoronaren Venenbypass-Operationen sein <sup>34</sup>. De Hert et al. konnten zeigen, dass die Applikation von Sevofluran und Desfluran gegenüber Propofol während koronarer Bypass-Operationen das Risiko kardialer Ereignisse signifikant reduziert <sup>35-37</sup>. Des Weiteren vergleicht eine Metaanalyse von Zhou et al. aus dem Jahr 2013 anhand herzspezifischer Biomarker (Troponin-I und CK-MB) die Ergebnisse 15 klinischer Studien und konnte einen signifikanten Vorteil der APC gegenüber der IPC nachweisen <sup>38</sup>. Wartier et al. konnten einen positiven Effekt der volatilen Anästhetika auf das myokardiale Stunning beschreiben. Als Stunning wird das Myokard beschrieben, das nach einer Ischämie-Reperfusion zunächst dysfunktional, später aber wieder kontraktile und somit nicht nekrotisch ist <sup>39</sup>. Ferner konnte für Halothan und Isofluran gezeigt werden, dass diese ATP-sensitive-Kalium Kanäle ( $K^+_{ATP}$ -Kanäle) aktivieren und somit dieser Mechanismus eine Rolle in der APC spielen könnte <sup>40,41</sup>. Insbesondere wurde die Rolle der  $K^+_{ATP}$ -Kanäle deutlich, als Kersten et al. in ihrer 1997 publizierten Studie zeigten, dass der  $K^+_{ATP}$ -Kanal-Antagonist Glibenclamid (Glyburide) die präkonditionierende Wirkung von Halothan am Myokard wieder aufhebt und somit die kardioprotektive Wirkung blockiert wurde <sup>42</sup>.

Die APC ist in Bezug auf das Outcome der Herzinfarktgröße im Kaninchenexperiment genauso effektiv wie die IPC <sup>43,44</sup> und für alle in der Klinik relevanten volatilen Anästhetika, wie z.B. Sevofluran <sup>45</sup>, Isofluran <sup>44,45</sup> und Desfluran <sup>45</sup>, wurden bisher präkonditionierende Eigenschaften nachgewiesen. In der Studie von Piriou et al., in der Sevofluran, Isofluran, Desfluran und Halothan direkt im Kaninchenmodell miteinander verglichen wurden, sind Unterschiede in den verschiedenen Anästhetika im Hinblick auf ihre präkonditionierenden Eigenschaften festgestellt worden <sup>45</sup>. Desfluran stellte sich in zwei tierexperimentellen Studien als das Fluran mit den stärksten präkonditionierenden Eigenschaften heraus <sup>45,46</sup>. Ferner wurde gezeigt, dass Enfluran die Laktatproduktion im Myokard unabhängig von der subendokardialen Perfusion drosselt <sup>47</sup> und volatile Anästhetika im Allgemeinen die funktionelle Erholung nach globaler Ischämie verbessern <sup>44,48</sup>.

Kehl et al. zeigten in früheren Studien, dass die APC nicht dosisabhängig wirkt und eine Konzentrationserhöhung der volatilen Anästhetika über 0,25 der MAC (Minimal Alveolar Concentration) keine wesentliche Verringerung der Herzinfarktgröße erreicht<sup>49,50</sup>. Die minimale alveoläre Konzentration (MAC<sub>50</sub>) definiert die alveoläre Konzentration eines Inhalationsnarkotikums bei der 50% der Patienten nicht mehr auf einen Hautschnitt reagieren. Allerdings wirkten in der o.g. Studie diese geringen Dosen nicht bei geringer Perfusion des Myokards. In minderperfundierte Gewebe wurde die präkonditionierende Wirkung von Isofluran ab einer MAC von 1,0 erreicht. Im klinischen Alltag ist dieser Aspekt insbesondere bei Patienten mit KHK zu beachten.

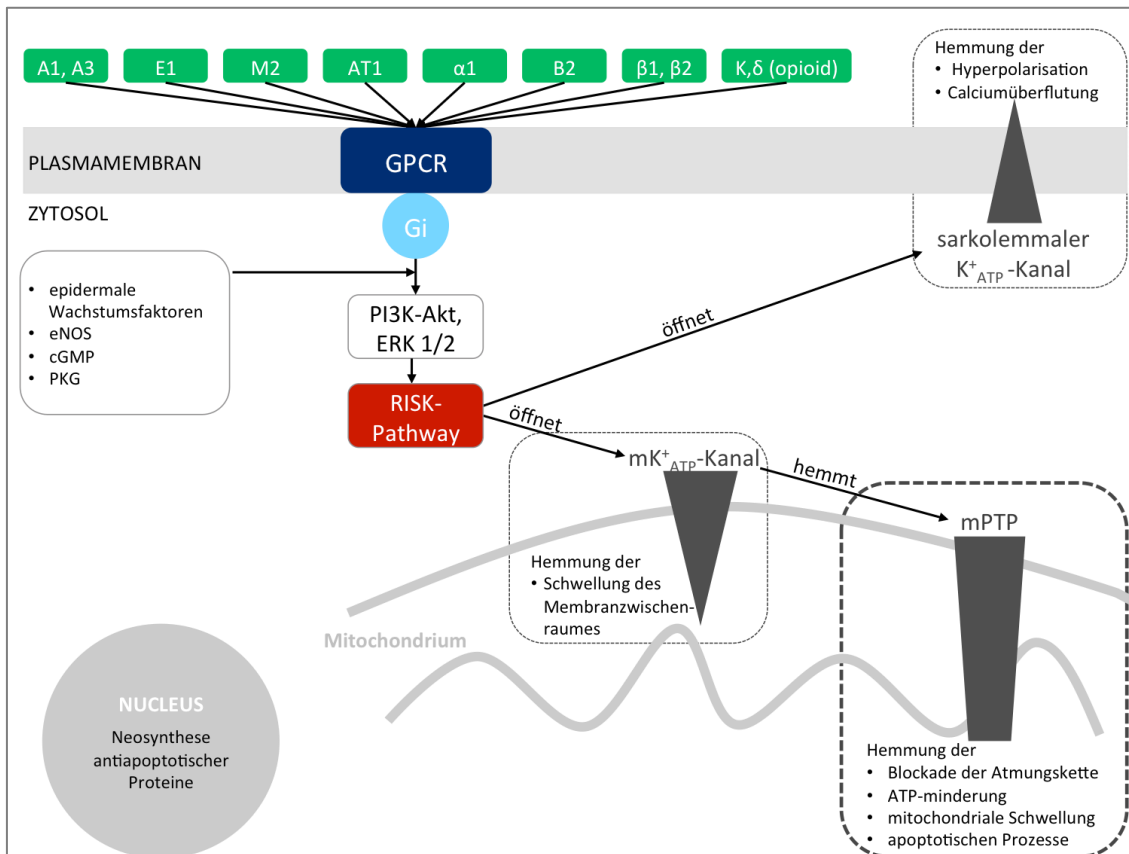
Sowohl für Isofluran, Sevofluran und Desfluran wurde ähnlich der IPC ein zweites Fenster der Präkonditionierung nachgewiesen<sup>46,50,51</sup>.

### **1.3.4 Molekulare Mechanismen der Präkonditionierung**

#### **1.3.4.1 IPC**

Die molekularen Mechanismen der IPC sind noch nicht endgültig geklärt. Entscheidend bei den molekularen, kardioprotektiven Anpassungen der Kardiomyozyten an ischämische Reize sind die mitochondrialen Transduktionswege. Der präkonditionierende Stimulus an der Zelloberfläche wird durch endogene Liganden vermittelt, zu denen die Adenosin- (A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub>)<sup>52-54</sup>, Endothelin- (ET<sub>1</sub>), Acetylcholin- (M<sub>2</sub>), Angiotensin-II- (AT<sub>1</sub>), Bradykinin- (B<sub>2</sub>)<sup>55</sup>, Opioid- ( $\delta$ ,  $\kappa$ )<sup>56</sup>,  $\alpha$ 1- und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren zählen<sup>57</sup>, die mit weiteren Mediatoren, wie epidermalen Wachstumsfaktoren, der Guanylatzyklase, cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und den Proteinkinasen G und C $\epsilon$ <sup>58</sup> über einen inhibitorischen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR)<sup>59</sup> die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und extracellular-signal-regulated Kinase 1/2 (ERK 1/2)<sup>57</sup> aktivieren. Dieser Signaltransduktionsweg wird als RISK- (Reperfusion Injury Salvage Kinase) Pathway bezeichnet<sup>57</sup> und wird bei Reperfusion des Myokards aktiviert. Er gilt als wichtiger Mediator der kardioprotektiven molekularen Mechanismen und resultiert in der Öffnung von K<sup>+</sup>-Kanälen in der inneren Mitochondrienmembran, sodass es zu einer Hemmung der Öffnung der mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) kommt. Die Öffnung dieser mPTP gilt als einer der zentralsten subzellulären Vorgänge bei der IPC und IPost<sup>57</sup>. Neben den K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>-Kanälen spielen weitere Liganden, wie z.B. die endotheliale NO-Synthase (eNOS)<sup>60</sup> und radikale Sauerstoffspezies (ROS)<sup>61</sup> ebenfalls wichtige Rollen in der Vermittlung der kardioprotektiven Mechanismen. Dies führt im Nucleus zu einer Neosynthese kardioprotektiver Proteine, wie z.B. die Expression von COX-2 und iNOS, die

durch die IPC-getriggerte Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren wie STAT1/3 moduliert werden<sup>28</sup>. Dies erklärt vermutlich den kardioprotektiven Effekt des „delayed preconditioning“ (zweites Fenster)<sup>57</sup>.



**Abb. 3: Molekulare Mechanismen der IPC**

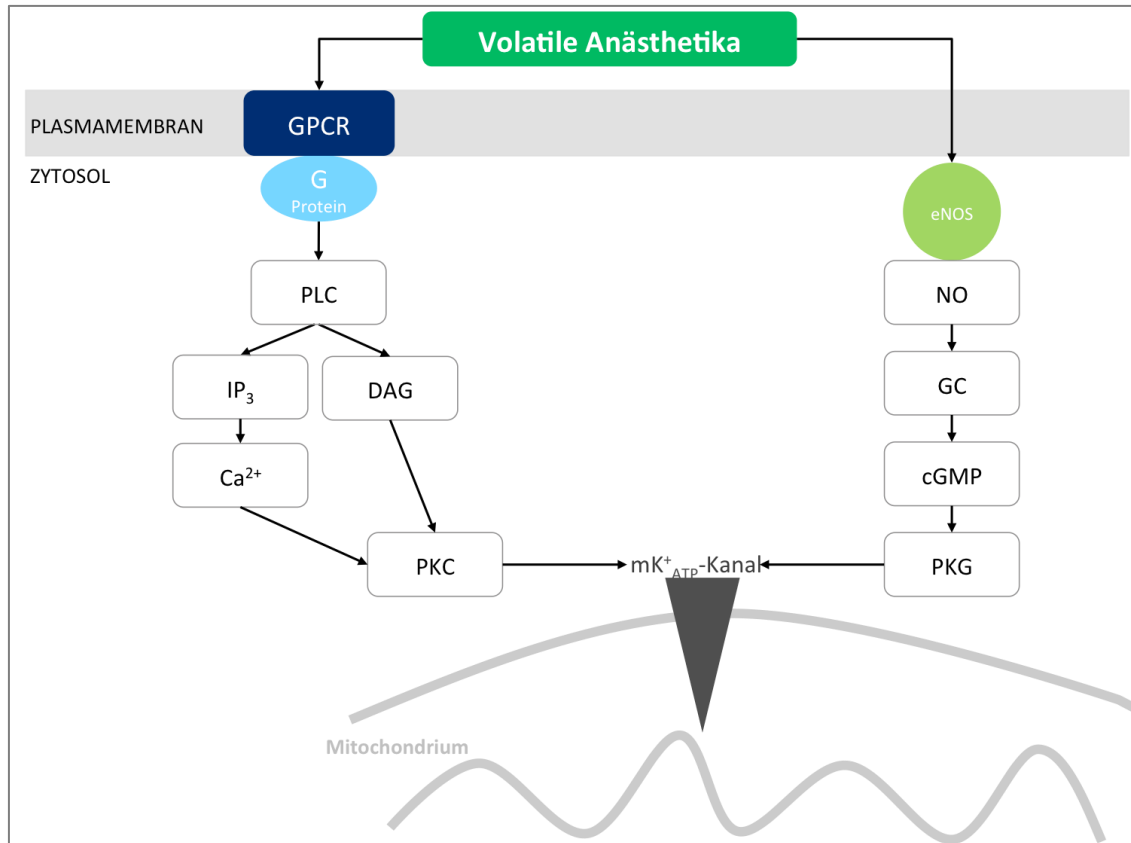
Dargestellt sind die molekularen Mechanismen während der IPC am GPCR auf zellulärer und mitochondrialer Ebene. Die Neosynthese der antiapoptotischen Proteine im Nucleus erfolgt beim „delayed preconditioning“.

A1= Adenosin-1-Rezeptor, A3=Adenosin-3-Rezeptor, E1=Endothelin-1-Rezeptor, M2=muskarinergischer Acetylcholin-2-Rezeptor, AT1=Angiotensin-II-1-Rezeptor, α1= alpha-1-Adrenorezeptor, B2=Bradykinin-2-Rezeptor, β1= Beta-1-Adrenorezeptor, β2= Beta-2-Adrenorezeptor, κ=Kappa-Opioidrezeptor, δ=Delta-Opioidrezeptor, GPCR=G-Protein-gekoppelter Rezeptor, Gi= inhibitorisches G-Protein, PI3K=Phosphoinositid-3-Kinase, ERK1/2=Extracellular Signal-Related-Kinase 1/2, RISK=Reperfusion Injury Salvage Kinase, mPTP= mitochondrial Permeability Transition Pore, e-NOS=endotheliale Stickstoff Monosynthese, cGMP= cyclisches Guanosinmonophosphat, PKG= Proteinkinase G, mK<sup>+</sup><sub>ATP</sub>=mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal, ATP=Adenosintriphosphat.

### 1.3.4.2 APC

Eine 1997 veröffentlichte Studie von Boutros et al. zeigte, dass die im Tierversuch gleichzeitig angewandten APC und IPC keine effektivere Wirkung auf das Myokard hatten, als die jeweiligen einzelnen Methoden<sup>62</sup>. Da die simultane Anwendung keine Verstärkung der Konditionierung hervorruft, ist demzufolge anzunehmen, dass die IPC und APC über ähnliche Signaltransduktionswege vermittelt werden.

Die  $K^+_{ATP}$ -Kanäle scheinen ebenfalls bei der APC bedeutsam zu sein. So werden über endogene Mediatoren, wie Adenosinrezeptoren (A1)<sup>63</sup>, die an inhibitorische G-Proteine<sup>64</sup> gekoppelt sind, die PKC aktiviert<sup>65</sup>. Diese Aktivierung wird hauptsächlich über die  $G_{\alpha 1}$ -Proteinuntereinheit und die Produktion von NO vermittelt, die durch NO-Synthasen moduliert werden<sup>64</sup>. Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und die PKC modifizieren somit die  $mK^+_{ATP}$ -Kanäle<sup>64</sup>. Die indirekte Wirkung der volatilen Anästhetika auf die  $K^+_{ATP}$ -Kanäle führen sowohl zu einer zytosolischen, als auch zu einer mitochondrialen Calciumreduktion<sup>66,67</sup>. Die darauffolgende herabgesetzte ATP-Synthese, optimierte oxidative Phosphorylierung und der verminderte  $Ca^{2+}$ -Influx stabilisieren die mitochondriale Matrix und verbessern den Energiestoffwechsel des Myokards zugunsten der Kardioprotektion<sup>68,69</sup>. Die Bedeutung der sarkolemmalen  $K^+_{ATP}$ -Kanäle bleibt weiterhin umstritten<sup>70</sup>. Redel et al. konnten ferner zeigen, dass  $BK_{Ca^{2+}}$ -Kanäle, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, ebenfalls eine Rolle in der Desfluran-induzierte Präkonditionierung spielen: die Desfluran-induzierte Präkonditionierung wurde durch die Blockade der  $BK_{Ca^{2+}}$ -Kanäle aufgehoben, wohingegen die Aktivierung dieser Kanäle zusätzlich zur APC zwar keinen synergistischen kardioprotektiven Effekt erbrachte, jedoch eine vergleichbare Reduktion der Herzinfarktgröße zeigte<sup>71</sup>. Der bei der IPC bedeutende RISK-Pathway scheint auch bei der APC von Bedeutung, da Raphael et al. eine Beteiligung des PI3K-Akt-Signalweges in der Präkonditionierung nachweisen konnten und somit einer der Mediatoren dieses Signaltransduktionsweges mitbeeinflusst wird<sup>72</sup>. Ein weiterer gemeinsamer intrazellulärer Signalweg scheinen die mPTP zu sein, deren Öffnung bei Desfluran-induzierter Präkonditionierung gehemmt wird. Somit wird der mitochondriale Energiestoffwechsel bei Ischämie optimiert und der Nekrose entgegengewirkt<sup>73</sup>.



**Abb. 4: Molekulare Mechanismen der APC**

In dieser Abbildung wird der Signaltransduktionsweg der APC skizziert, der hauptsächlich über die NO-Synthase und PLC vermittelt wird. Beide Signaltransduktionswege vermitteln ihre protektive Wirkung über den mK<sup>+</sup><sub>ATP</sub>-Kanal, der die Drosselung der Atmungskette und der ATP-Synthese unterbindet.

eNOS=endotheliale Stickstoff Monosynthase, GPCR=G-Protein-gekoppelter Rezeptor, cGMP= cyclisches Guanosinmonophosphat, PKG= Proteinkinase G, mK<sup>+</sup><sub>ATP</sub>=mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal, ATP=Adenosintri-phosphat, PLC=Phospholipase C, IP<sub>3</sub>=Inositoltriphosphat, DAG=Diacylglycerin, PKC=Proteinkinase C, GC=Guanylatcyclase, NO=Stickstoff, Ca<sup>2+</sup>= Calcium.

#### 1.4 Kardioprotektion durch Postkonditionierung

Bei der Ischämischen -und/oder Anästhetika-induzierten Postkonditionierung (I-Post/APost) wird der protektive Stimulus nach dem Ischämieereignis gesetzt und vermindert so den Reperfusionsschaden. Als Reperfusionsschaden wird die pathologische Veränderung im Myokard bezeichnet, die durch wieder auftretende Reperfusion nach Okklusion auftritt, obwohl paradoxerweise eine vollständige und frühzeitige Revaskularisation der entscheidende Faktor für das spätere Ausmaß der Infarktgröße ist <sup>74</sup>. Rosenkranz et al. bezeichnen diesen irreversiblen Schaden als einen, der durch die Veränderungen der Reperfusionbedingungen abgeschwächt werden kann <sup>75</sup>. Jennings et al. beschrieben den myokardialen Reperfusionsschaden als histologisch nachweisbare



Zellschwellung, Kontraktur der Myofibrillen, Ruptur des Sarkolemm und das Austreten von Calciumphosphatpartikeln aus den Mitochondrien in das Zytosol <sup>76</sup>. Als Folge dieser strukturellen Veränderungen kann es zu Einschränkungen der kardialen Funktion kommen, wie z.B. Arrhythmien <sup>77</sup>, myokardiales Stunning <sup>78</sup> und ein no-reflow Phänomen <sup>79</sup>. Während das myokardiale Stunning eine morphologische Veränderung beschreibt, die nach Revaskularisierung eine kontraktile Funktion wieder zulässt, wird unter dem no-reflow Phänomen eine, vermutlich durch Mikroangiopathien ausgelöste, dauerhafte Perfusionsminderung verstanden. Das No-reflow Phänomen <sup>79</sup>, Arrhythmien <sup>80</sup>, die Infarktgröße und myokardiales Stunning <sup>78</sup> beeinflussen das kardiale Outcome nach einem ischämischen Ereignis wesentlich, sodass die Bedeutung einer postischämischen Intervention als Alternative zur leitliniengerechten raschen Revaskularisierung anhand dieser Faktoren verdeutlicht wird. Da die Postkonditionierung stets nach dem Ischämieereignis angewandt wird, ist die Methode wesentlich einfacher in den Klinikalltag zu integrieren. Während bei der IPC und APC nur bei vorher festgelegten Ischämiezeiten ein Protokoll der Kardioprotektion möglich ist, bieten IPost und APost deutlich mehr Möglichkeiten der klinischen Steuerbarkeit, Anwendbarkeit in Notfallsituationen nach Myokardinfarkten und ein gezieltes Einsetzen bei aortokoronaren Bypassoperationen. Es wird deutlich, dass durch eine Optimierung der Reperfusionbedingungen der irreversible Schaden, der infolge einer Revaskularisierung auftritt, vermindert werden kann <sup>75</sup>.

#### 1.4.1 Ischämische Postkonditionierung

Zhao et al. zeigten in ihrer 2003 veröffentlichten Studie erstmals, dass repetitive Reokklusionen der Koronararterien nach einem Infarkt ereignis die Infarktgröße ebenso signifikant senken wie die IPC. Hierbei reduzierten sich die Infarktgrößen von 47 auf 11% und sind vergleichbar mit den Infarktgrößenreduktionen der IPC. Auch die Werte der CK-Aktivität, der Entzündungsparameter (z. B. Myeloperoxidase als Apoptosemarker), die Ödembildung und die postischämische endotheliale Dysfunktion waren in den Gruppen der Prä- und Postkonditionierung gut vergleichbar, wenngleich zu der Kontrollgruppe jeweils ein signifikanter Unterschied nachgewiesen wurde <sup>81</sup>. Zhao et al. konnten zudem die positiven Effekte von IPost in Hinblick auf den bereits beschriebenen Reperfusionsschaden nachweisen <sup>81</sup>. Um das Infarktareal effektiv zu verkleinern, ist es bei der IPost von großer Bedeutung, die ischämischen Stimuli in den ersten Minuten der Reperfusion zu setzen, da sonst die Wirkung drastisch vermindert ist <sup>82</sup>, wobei die erste Minute der Reperfusion nach gegenwärtigem Kenntnisstand vermutlich die Entscheidendste ist <sup>83</sup>. Eine verzögerte Anwendung der IPost hat laut Kin et al. keinen Einfluss mehr auf die

Infarktgrößenreduktion<sup>84</sup>. Jedoch ist die Anzahl und Art der Konditionierungszyklen im Hinblick auf die Dauer der Ischämiezeit relevant<sup>85</sup>. Skyschally et al. konnten zeigen, dass einige Konditionierungen lediglich bei bestimmten Ischämiezeiten die Infarktgröße reduzierten, bei länger anhaltenden ischämischen Episoden jedoch keine signifikante Reduktion auftrat<sup>86</sup>. Um einen sicheren kardioprotektiven Effekt zu erhalten, müssen Länge der Postkonditionierung und Anzahl der Zyklen jeweils angepasst werden<sup>87</sup>. Diese Beobachtung konnte ebenfalls bei der IPC beschrieben werden<sup>88</sup>. Sörensson et al. zeigten in ihrer 2010 publizierte Studie zu den Folgen der IPost bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkten (STEMI), dass IPost die Infarktgröße nicht signifikant verkleinern konnte. Sie stellten die Hypothese auf, dass Patienten mit einer größeren AAR eher von IPost profitieren<sup>89</sup>. Eine Langzeitstudie zu diesen Ergebnissen bestätigte 2013 diese Aussage<sup>90</sup>. In kleineren klinischen Studien wurden jedoch Ergebnisse publiziert, die den Nutzen der IPost belegen, z.B. während einer perkutanen Koronarintervention (PCI) bei andauerndem Myokardinfarkt<sup>91,92</sup> oder nach PCI<sup>93</sup>.

#### **1.4.2 Anästhetika induzierte Postkonditionierung**

Die Applikation von volatilen Anästhetika nach einem ischämischen Ereignis wird als Anästhetika-induzierte Postkonditionierung bezeichnet. Die Infarktgrößenreduktion ist hierbei vergleichbar mit der APC<sup>94</sup>. Bereits vor Zhaos et al. wegweisender Studie<sup>81</sup> zur IPost konnten Schlack und Preckel mit ihrer Arbeitsgruppe Ergebnisse veröffentlichen, die einen kardioprotektiven Nutzen nach Ischämie bei Kaninchen zeigten, sofern volatile Anästhetika, zunächst Halothan<sup>95</sup>, später auch Sevofluran, Enfluran und Desfluran<sup>96,97</sup> in der frühen Phase der Reperfusion (15 Minuten) verabreicht wurden<sup>95</sup>. Im direkten Vergleich im in-vivo Kaninchen Modell zeigten Sevofluran und Desfluran bei einem MAC von 1.0 den größten kardioprotektiven Nutzen in Bezug auf die Infarktgrößen und die linksventrikuläre Dysfunktion nach Infarkt<sup>96</sup>. Eine Erhöhung der MAC über 1.0 der volatilen Anästhetika wie Sevofluran hat im Rattenmodell keinen zusätzlichen kardioprotektiven Effekt hinsichtlich der Infarktgrößenreduktion erreicht<sup>98</sup>, auch eine verlängerte Applikation (>2 Minuten) erbrachte eher eine geringere Protektion der Kardiomyozyten als in der sehr frühen Reperusionsphase<sup>99</sup>. Die Wirksamkeit der Postkonditionierung wird nicht erhöht, wenn Prä- und Postkonditionierung zusammen appliziert werden<sup>100</sup>, auch die Applikation von Desfluran zur Zeit des Ischämie selber, beeinflusst die Infarktgröße nicht<sup>100</sup>. Ebenso ist eine verlängerte Applikationszeit der APost nicht entscheidend für das Ausmaß der Infarktgrößenreduktion<sup>99</sup>. Die Anwendbarkeit der APost bei Patienten aufgrund der planbaren Applikation bei aortokoronaren Bypassoperationen vereinfacht

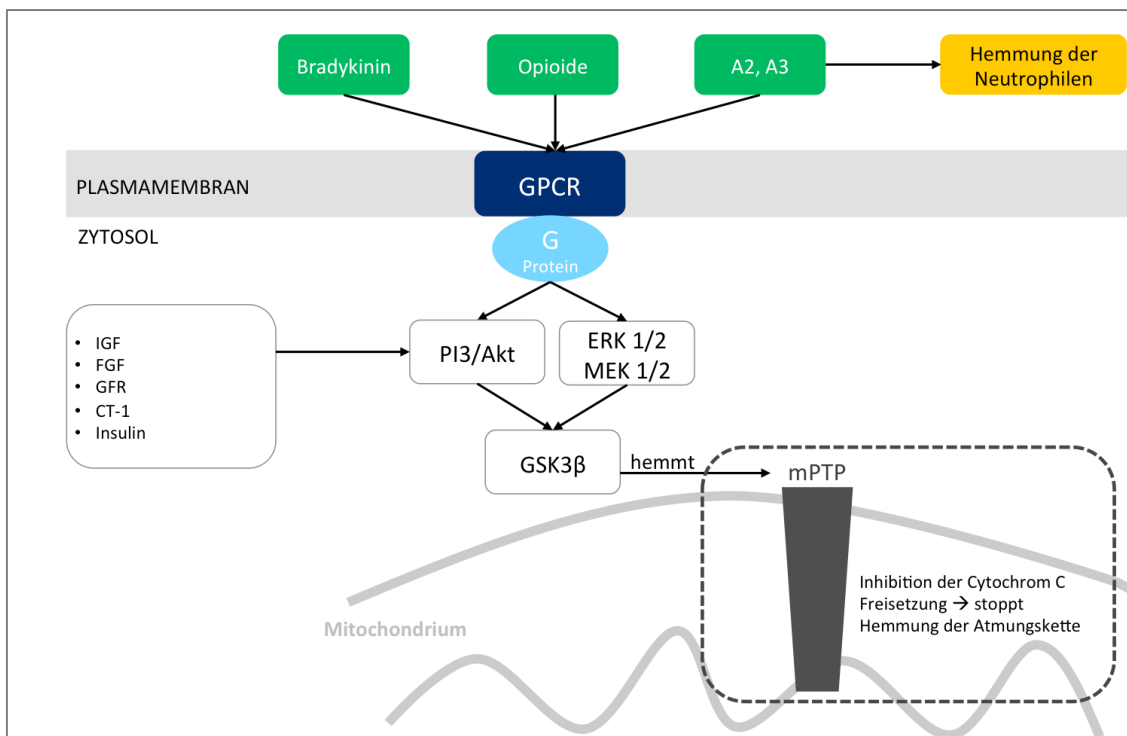
die klinische Forschung<sup>101,102</sup>. Obwohl die interventionelle Kardiologie Möglichkeiten der APost-Anwendung bietet, gibt es nur wenige klinische Studien. Aufgrund der im PTCA-Setting verwendeten Ballondilatationen sind die IPost und IPC hierbei gründlicher untersucht<sup>103</sup>. In Studien zu der APost wurden die Endpunkte hauptsächlich anhand der Troponin-I und Kreatininwerte bestimmt. Das Fehlen von Definitionen, standardisierten Protokollen, die die Ein- und Ausschlusskriterien und Komedikationen betreffen und ein heterogenes Patientengut führen zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen bezüglich der Mortalität und Infarktereignisse bei der klinischen Anwendung von APost<sup>104</sup>. Dies erschwert die Translation der APost vom tierexperimentellen in das klinische Setting. Yu et al. untersuchten in ihrer 2006 publizierte Metaanalyse die Mortalität und das Auftreten von ischämischen Ereignissen sowohl bei einer totalintravenösen Anästhesie (TIVA) und bei Anwendung von volatilen Anästhetika, ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht gezeigt werden. Für Sevofluran und Desfluran konnte eine signifikante Reduktion der Troponin-I Werte gezeigt werden, für Isofluran nicht. Die Gründe für diese Ergebnisse erklären die Autoren mit der unzureichenden Power dieser Analyse, die durch die heterogenen Studiendesigns bedingt ist und zum Anderen durch die fehlende Dokumentation entscheidender Faktoren, wie die Komedikationen<sup>105</sup>. In einer weiteren Metaanalyse von Symons et al. wurden die Daten von 27 Studien mit insgesamt 2979 Patienten untersucht, die entweder eine TIVA oder volatile Anästhetika sowohl zu einem bestimmten Zeitpunkt als auch während der gesamten Operation erhielten. Die Anwendungsdauer der volatilen Anästhetika hatte keinen Einfluss auf das perioperative Auftreten von akuten Infarktereignissen, Ischämien oder der Mortalität. Diese Erkenntnis deckt sich mit den oben beschriebenen tierexperimentellen Daten von Obal et al.<sup>99</sup>. Im Hinblick auf den perioperativen Bedarf an positiv inotropen Substanzen, die Troponin-I Werte und den Krankenhausaufenthalt zeigte sich bei den Patienten, die volatile Anästhetika erhielten, eine signifikante Reduktion<sup>101</sup>.

### **1.4.3 Molekulare Mechanismen der Postkonditionierung**

#### **1.4.3.1 IPost**

Die IPost wird an der Zelloberfläche, ähnlich der IPC und APC, über GPCR vermittelt, die hauptsächlich über Adenosin-<sup>84,106</sup>, Bradykinin-<sup>106</sup> und endogene Opioidliganden<sup>107</sup> reguliert werden. Adenosin hemmt dabei inflammatorische Prozesse, die durch Neutrophile Granulozyten, Superoxide und endotheliale Adhärenz herbeigeführt werden<sup>108</sup> und aktiviert subzellulär den RISK-Pathway. Die Rolle der Adenosinrezeptor-Agonisten ist

hierbei umstritten. Bibli et al. postulieren, dass lediglich nonselektive A2B und A1-Adenosinrezeptoren den RISK-Pathway aktivieren<sup>109</sup>, wobei dem A2B Rezeptor die wichtigste Bedeutung beigemessen wird<sup>110</sup>. Intrazelluläre Mediatoren, wie PI3<sup>111,112</sup>, p-Akt<sup>113</sup>, ERK 1/2<sup>114,115</sup>, eNOS<sup>116</sup>, NO, die PKC<sup>117</sup> und Insulin<sup>118</sup> spielen in der kardioprotektiven Signalkaskade eine entscheidende Rolle<sup>119</sup>, indem sie die GSK3 $\beta$  inhibieren<sup>120</sup>. Der RISK-Pathway wirkt antiapoptotisch<sup>121</sup> und verhindert so eine Ausdehnung des Infarktareals. Der molekulare Mechanismus wird wie bei der IPC über die mPTP vermittelt<sup>122,123</sup>, deren Öffnung durch eine Aktivierung der mK<sup>+</sup><sub>ATP</sub>-Kanäle inhibiert wird. Somit werden die oxidativen Vorgänge innerhalb des Mitochondriums ökonomisiert und optimiert. Der letale Reperfusionsschaden wird verringert<sup>124,125</sup>.



### Abb. 5: Molekulare Mechanismen der IPost

Dargestellt ist der Signalweg des RISK-Pathways nach<sup>119</sup>. Über PI3-Akt und die ER- und ME-Kinasen 1 und 2 wird die GSK3 $\beta$  aktiviert und hemmt ihrerseits die mPTP, die die Cytochrom C Aktivierung stoppt und somit antiapoptotische Mechanismen unterbindet.

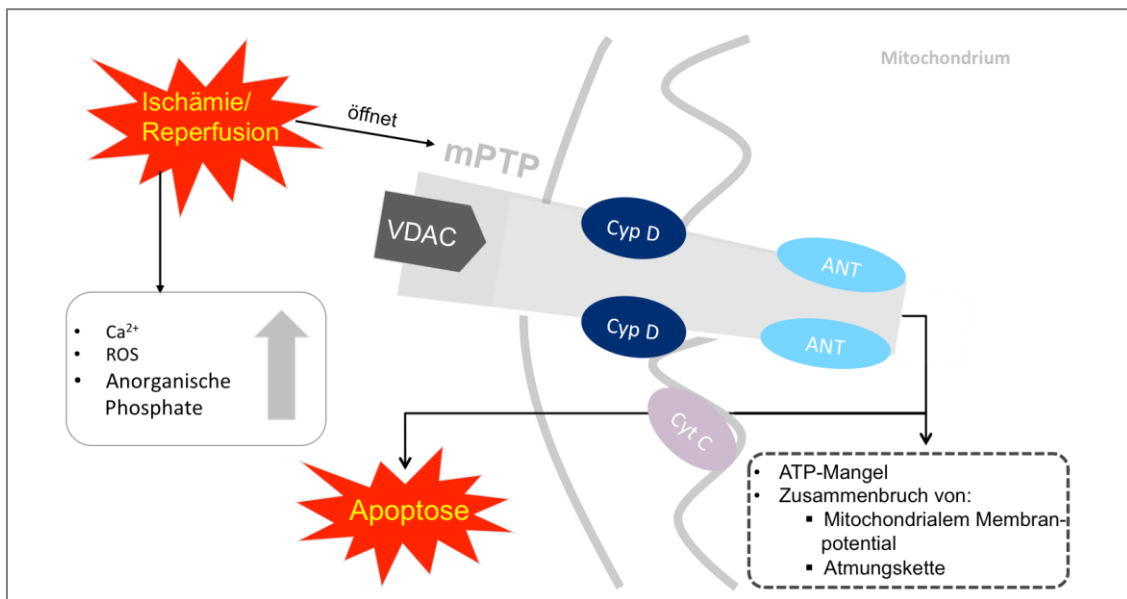
A2= Adenosin-2-Rezeptor, A3=Adenosin-3-Rezeptor, GPCR=G-Protein-gekoppelter Rezeptor, PI3K=Phosphoinositid-3-Kinase, Akt=Proteinkinase B, ERK1/2=Extracellulär Signal-Related-Kinase 1/2, MEK1/2=Mitogen activated protein-Kinase-Kinase 1/2, mPTP= mitochondrial Permeability Transition Pore, GSK3 $\beta$ =Glykogensynthase-3-beta, IGF=Insulin-like-Growth-Factor, FGF=Fibroblast-Growth-Factor, GFR=Glomeruläre Filtrationsrate, CT-1=Cardiotrophin-1.

### 1.4.3.2 APost

Die molekularen Mechanismen der APost werden über ähnliche intrazelluläre Wege wie die der APC vermittelt. Der entscheidende Schritt bei beiden Methoden ist die Öffnung der  $mK^+_{ATP}$ -Kanäle in der inneren Mitochondrienmembran, die ihrerseits die mPTP inhibieren<sup>73</sup>. Dort spielen neben den  $mK^+_{ATP}$ -Kanälen außerdem die  $BK_{Ca^{2+}}$ -Kaliumkanäle bedeutende Rollen<sup>126</sup>.  $BK_{Ca^{2+}}$ -Kaliumkanäle sind kalziumabhängige Kanäle, die einen  $K^+$ -Auswärtsstrom generieren und somit zellaktivierende Signale im Sinne einer negativen Rückkopplung hemmen<sup>127</sup>. So kommt es infolge deren Öffnung zu einer Volumenzunahme der inneren Matrix, die folglich zu einer Abnahme des Membranzwischenraumes führt, in dem sich die Enzyme der Atmungskette befinden, die dadurch gehemmt werden. Die sarkolemmalen  $K^+_{ATP}$ -Kanäle verhindern einen intrazellulären Calciumüberschuss und verkürzen das Aktionspotenzial durch eine Hyperpolarisation der Zelle<sup>59</sup>, wobei diesen Kanälen eine weitaus geringere Bedeutung zugewiesen wird als den mitochondrialen<sup>58</sup>. Als Endeffektor dieser Signalwege wird die mPTP angesehen. Die mPTP ist ein hochleitungsfähiger, spannungs- und kalziumabhängiger Kanal in der inneren Mitochondrienmembran<sup>128</sup>, dessen genauer Aufbau bislang noch ungeklärt ist. Bisher ist angenommen, dass er aus einem zur äußeren mitochondrialen Membran gerichteten spannungsgesteuerten Anionenkanal (VDAC), Cyclophilin D (CyP-D) und einer zur inneren mitochondrialen Membran gerichteten Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT) besteht<sup>129</sup>. Die mPTP wird unter pathologischen Konditionen, wie z.B. Ischämien in der inneren Mitochondrienwand exprimiert und vermittelt im geöffneten Zustand den Durchtritt kleinerer Moleküle (<1500 kD) in die Zelle. Somit kommt es zu einer mitochondrialen Schwellung, einer Unterbrechung der Atmungskette und einer herabgesetzten Produktion von ATP. Für die Konditionierung ist somit die Hemmung der Öffnung dieser Pore ein wichtiger Faktor, da so trotz Ischämie eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zelle gewährleistet ist<sup>130-132</sup>.

Die genauen Details dieses Signalweges sind trotz intensiver Bemühungen in der experimentellen Grundlagenforschung noch unbekannt und umstritten, wobei allerdings bekannt ist, dass der RISK-Pathway hierbei eine Rolle spielt. Dieser wird wiederum von der PI3K und von PKB/Akt aktiviert. In tierexperimentellen Studien wurde bisher publiziert, dass Isofluran in der frühen Phase der Reperfusion jene PI3-Kinase<sup>94</sup> aktiviert und Sevofluran eine Erhöhung sowohl der Phosphorylierung des PKB/Akt /GSK-3 $\beta$  Signalweges herbeiführt. Dies führt schließlich zur Aktivierung des RISK-Pathways und zu einer Aktivierung der  $mK^+_{ATP}$ -Kanäle, sodass eine Reduktion der mitochondrialen und

zytosolischen Cytochrom C-Konzentration folgt<sup>133,134</sup>. Die Inhibition der nachgeschalteten mPTP erfolgt zusätzlich zur Öffnung des  $mK^+_{ATP}$ -Kanals auch über die GSK-3 $\beta$ <sup>135</sup>. Ebenso wurde eine Beteiligung von NO bei der APost nachgewiesen<sup>100</sup>. Die mPTP ist somit ein potentielles pharmakologisches Zielprotein<sup>136</sup>, das mit der zeitlichen Anwendung im postischämischen Intervall gut in den Klinikalltag einzubringen ist. Eine weitere Studie zeigt die besondere Bedeutung der mPTP, da die Infarktgrößenreduktion durch mPTP-Inhibition mit Cyclosporin A im Vergleich zu APost ähnlich ist<sup>137</sup>.



**Abb. 6: Funktion der mPTP**

Dargestellt ist die mPTP im Detail und deren zentrale Rolle sowohl in der IPost als auch in der APost. Die Adenin Nucleotid Translokase (ANT) bildet den inneren Teil, Cyclophilin D (Cyp D) bildet den intermembranären Teil, der spannungsabhängige Ionenkanal (VDAC) reguliert die Pore in der äußeren Membran.

mPTP= mitochondrial Permeability Transition Pore, VDAC= Voltage-dependant anion channel, Cyp D= Cyclophilin D, ANT= Adenin Nucleotid Translokase, Cyt C= Cytochrom C, ATP= Adenosintri-phosphat, ROS= Reactive oxygen species.  $Ca^{2+}$ =Calcium.

## 2 Die Funktion der GRK2

### 2.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

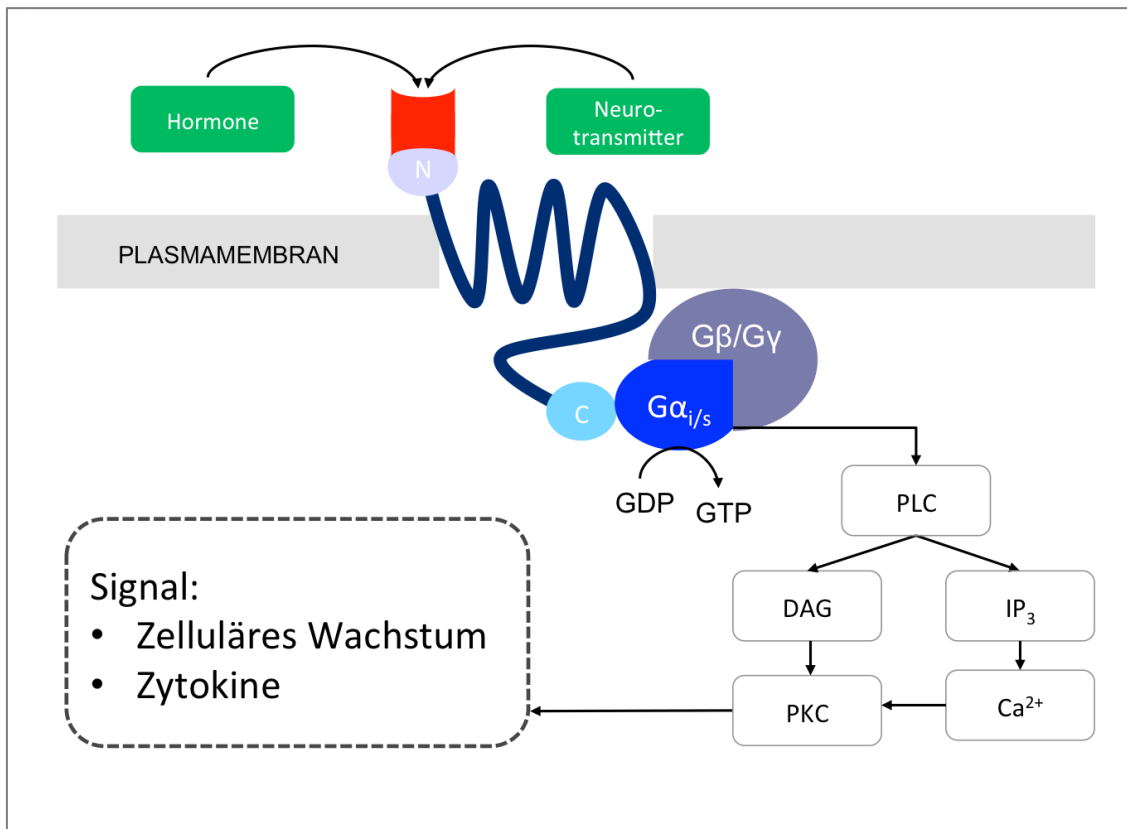
Mit über 800 verschiedenen Charakterisierungen gehören die GPCR zur größten biologischen Rezeptorfamilie, die Signaltransduktionswege von extrazellulär nach intrazellulär vermitteln und somit die verschiedensten Mechanismen und physiologischen Prozesse regulieren. Die GPCR vermitteln bei bis zu 50 % der klinischen Arzneimittel deren direkte oder indirekte Wirkung<sup>138</sup> und gelten somit als eine der wesentlichen pharmakologischen Ziele<sup>139</sup>. Bisher wurden vier humane Kristallstrukturen der inaktiven GPCR publiziert: der  $\beta$ 2-Adreno-<sup>140</sup>, A2A-Adenosin-<sup>141</sup>, D3-Dopamin-<sup>142</sup> und ein CXCR4-Chemokinrezeptor<sup>143</sup>.

Allen GPCR ist ihre molekulare Struktur gemein mit einem extrazellulären N- und einem intrazellulären C-Terminus, die durch sieben transmembranäre  $\alpha$ -Helices verbunden sind. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Aminosäuresequenzen werden die GPCR in sechs Familien eingeteilt, für die Säugetier-Spezies sind allerdings nur die Familien A, B und C relevant<sup>144</sup>. Diese Einteilung wurde 2003 von Fredriksson et al. verlassen und die GPCR wurden nach phylogenetischen Merkmalen in die fünf neuen Klassen; Glutamat, Sekretin, Rhodopsin, Adhäsion und Frizzled/Taste2 untergliedert<sup>145</sup>. Resultiert eine Liganden-Rezeptor Bindung bei den GPCR in unterschiedlichen, diversen Signalkaskaden, wird von „biased agonism“ gesprochen<sup>146</sup>.

### 2.2 G-Proteine

Extrazelluläre Agonisten bzw. Stimuli, wie z.B. Hormone, Ionen oder Neurotransmitter, die an die GPCR binden, lösen intrazelluläre Signalkaskaden aus, indem heterotrimere Guaninnucleotidproteine (G-Proteine) an die Rezeptoren binden. Im inaktiven Zustand liegen die G-Proteine als GDP vor; durch den aktivierten GPCR, der als Nukleotidaustauscher agiert, werden sie in den aktiven Zustand als GTP versetzt. G-Proteine bestehen außerdem aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Wird im Falle einer Agonistenbindung ein G-Protein in den aktiven Zustand versetzt, dissoziiert die  $\alpha$ - von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit und die jeweiligen Einheiten binden an ihre spezifischen Effektorproteine und initiieren sekundäre subzelluläre Botenstoffe (z.B.: cAMP, Calcium, Inositoltriphosphat, Diacylglycerol). Diese Mediatoren beeinflussen daraufhin die Aktivierung von Phospholipasen und

die Regulierung der Adenylatcyclasen, der Kaliumkanäle und der Calciumkanäle <sup>147</sup>. So werden Enzyme, zelluläre Vorgänge und physiologische Prozesse beeinflusst <sup>148</sup>.



### Abb. 7: GPCR

Dargestellt ist der schematische Aufbau eines GPCRs und die weitere Signalvermittlung über G-Proteine. Agonisten wie z.B. Hormone und Neurotransmitter lösen intrazelluläre Signalkaskaden aus, die zur GTP-abhängigen Aktivierung der Phospholipase C führen. Durch weitere, unter anderem calciumabhängige Stimulation der Proteinkinase C, können sowohl zelluläres Wachstum und die Zytokinausschüttung beeinflusst werden.

N=Aminoterminaler Domäne, C=Carboxy-terminale Domäne, Gβ=β-Untereinheit des G-Proteins, Gγ=γ-Untereinheit des G-Proteins, Gα=α-Untereinheit des G-Proteins, PLC= Phospholipase C, DAG= Diacylglycerol, IP<sub>3</sub>=Inositoltriphosphat, PKC=Protein Kinase C, Ca<sup>2+</sup>=Calcium, GDP= Duanosindiphosphat, GTP=Guanosintriphosphat.

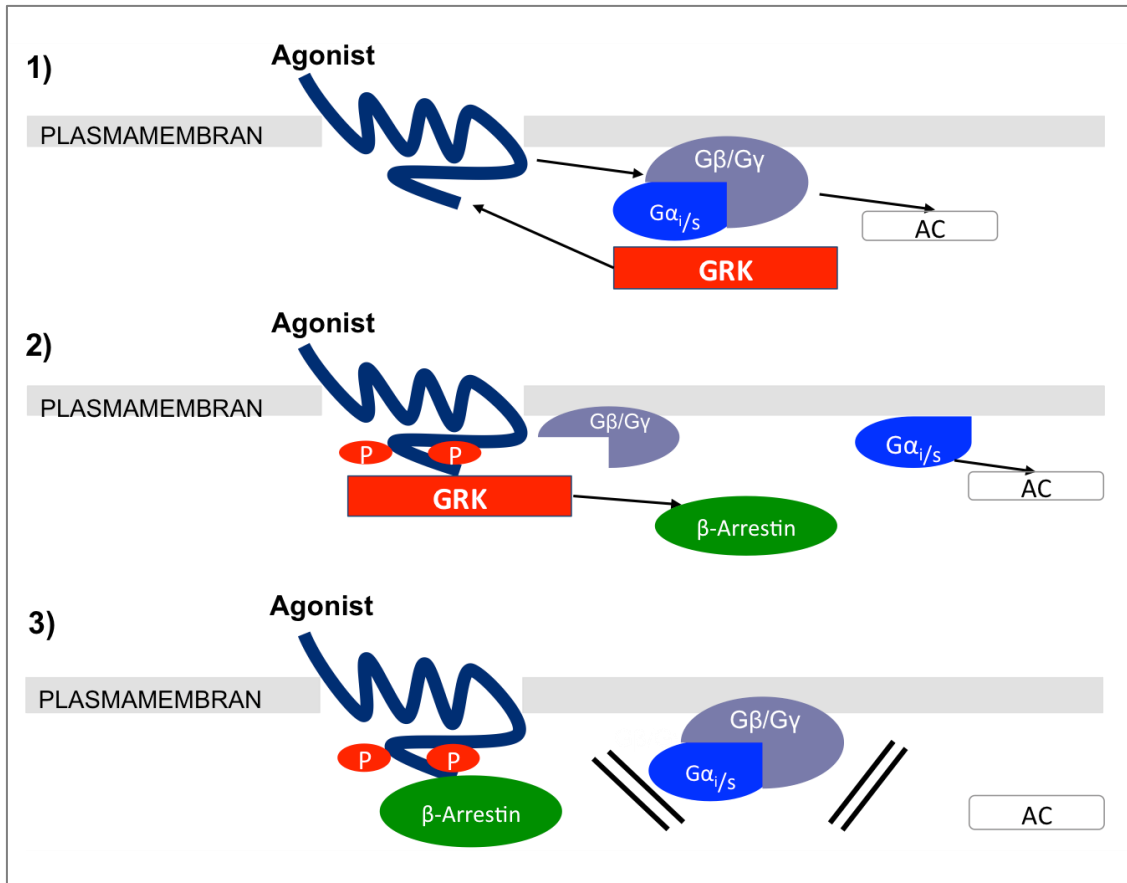
Die G-Proteine vermitteln somit extrazelluläre Signale in das Zellinnere, aber auch eine Amplifizierung des Signals, da bei jedem GPCR-aktivierten Signal viele G-Proteine generiert werden und die jeweiligen Effektorproteine ebenfalls eine potenzierte Anzahl an sekundären Botenstoffen freisetzen <sup>149</sup>. Der Aktivierungszyklus des G-Proteins wird durch einen intrinsischen Mechanismus der α-Untereinheit beendet, da eine Hydrolyse des GTPs zu GDP den Komplex wieder in den inaktiven Zustand versetzt und die α-Untereinheit mit dem βγ-Komplex assoziiert <sup>148-151</sup>.



Bisher wurden 20 verschiedene Formen der  $\alpha$ -Untereinheit beschrieben, die sich aufgrund ihrer Sequenzierung und der jeweiligen spezifischen Interaktion mit den Effektorproteinen in 4 Subfamilien klassifizieren lassen.  $G_{\alpha s}$  Proteine stimulieren die Adenylatcyclasen,  $G_{\alpha q}$  aktiviert die Phospholipase C,  $G_{\alpha i}$  hemmen die Adenylatcyclase und aktivieren die GRK und  $G_{\alpha 12}$  aktivieren rho-GEF<sup>152</sup>. Der  $\beta\gamma$ -Komplex hingegen aktiviert die GRK und führt durch dessen Bindung zu der Membrantranslokation. Die GRK beendet den Signalweg durch Phosphorylierung des GPCR und leitet die Desensibilisierung ein<sup>148-151</sup>.

### 2.3 Desensibilisierung des GPCR

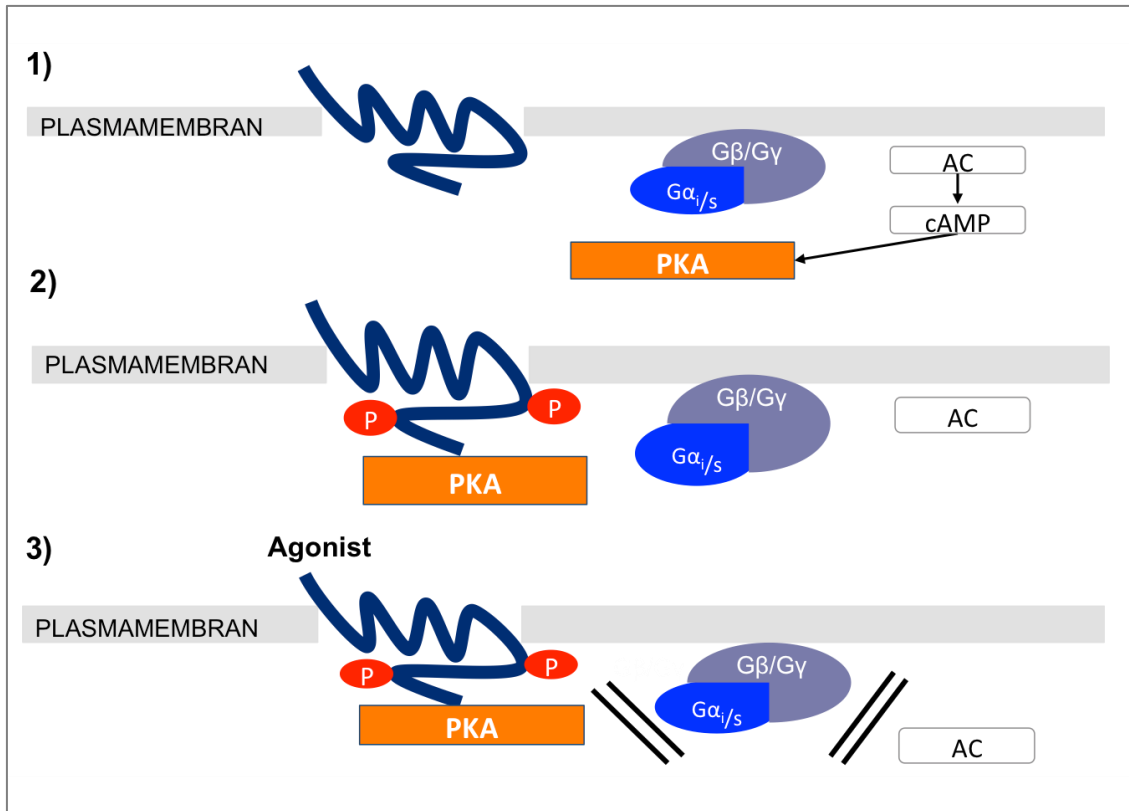
Unter der Desensibilisierung eines Rezeptors wird die Adaption des Rezeptors an neue extrazelluläre Bedingungen verstanden, die zur Abschaltung des vorangegangenen Signalweges führt. Im Falle der GPCR spielen die GRK die wichtigste Rolle in der homologen Desensibilisierung, da die GRK aktivierte, Liganden-gebundene GPCR erkennen und die Serin- und Threoninreste am zytoplasmatischen C-Terminus oder in der 3. Schleife der intrazellulären Domäne phosphorylieren kann<sup>153</sup>. Diese Phosphorylierungen, die für die Desensibilisierung des Rezeptors von immenser Bedeutung sind<sup>154</sup>, vermindern die Affinität der GPCR zu den nachgeschalteten G-Proteinen und erhöhen wiederum die Affinität zum Adaptorprotein  $\beta$ -Arrestin.  $\beta$ -Arrestin verhindert sterisch die Interaktion und Initiierung des GPCR mit dem G-Protein<sup>155,156</sup>. Die desensibilisierten und  $\beta$ -Arrestin gebundenen GPCR werden mithilfe von Vesikeln und Caveolae internalisiert und der Rezeptor reinsertiert Clathrin-vermittelt in die Plasmamembran und wird dephosphoryliert (sog. Down-regulation)<sup>157,158</sup>. Hierbei sind neben den GRKs auch Dynamin, das Adaptorprotein-2<sup>159</sup> und Phosphoinositide beteiligt<sup>160,161</sup>. Eine erneute und unmittelbar auf die Desensibilisierung folgende Rezeptorstimulation führt somit zu einer verminderten intrazellulären Antwort und einer herunterregulierten Rekrutierung von G-Proteinen<sup>162-165</sup>. Bei diesem Degradations-Recycling Mechanismus soll laut Marchese et al. die Ubiquitinierung eine Rolle spielen<sup>166</sup>.



**Abb. 8: Homologe Desensibilisierung**

Ablauf der homologen Desensibilisierung: Der GPCR wird phosphoryliert und die Affinität zu  $\beta$ -Arrestin wird erhöht. Es folgt eine sterische Interaktion zwischen dem Rezeptor und dem G-Protein, sodass eine weitere Aktivierung nicht mehr möglich ist. GRK=G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase, AC=Adenylatcyclase,  $G\beta$ = $\beta$ -Untereinheit des G-Proteins,  $G\gamma$ = $\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins,  $G\alpha$ = $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins, P=Phosphat.

Eine weitere Möglichkeit der Herunterregulierung von GPCR besteht in der heterologen Desensibilisierung durch die Proteinkinasen A und C <sup>150</sup>. Die second-messenger-Kinasen phosphorylieren den Rezeptor unabhängig von der Agonistenbindung. Hierbei wird die PKA durch cAMP und die PKC durch eine Calciumakkumulation stimuliert <sup>156</sup>. Die heterologe Desensibilisierung ist somit auch bei geringeren Agonistenkonzentrationen möglich, verläuft aber im Gegensatz zu der homologen Methode deutlich langsamer <sup>167</sup>.



**Abb. 9: Heterologe Desensibilisierung**

Dargestellt ist der schrittweise Ablauf der heterologen Desensibilisierung: die Verhinderung der Signalweiterleitung des GPCR's an betroffene G-Proteine erfolgt nicht durch Liganden-Bindung, sondern second-messenger-vermittelt.

cAMP=cyclisches Adenosinmonophosphat, PKA=Proteinkinase A, AC=Adenylatcyclase, Gβ=β-Untereinheit des G-Proteins, Gγ=γ-Untereinheit des G-Proteins, Gα=α-Untereinheit des G-Proteins, P=Phosphat.

Neben der Desensibilisierung wird die Rezeptorexpression ebenfalls auf Transkriptionsebene verändert. Dieser Mechanismus dauert allerdings Stunden bis Tage im Gegensatz zu der Desensibilisierung, die innerhalb von Sekunden und Minuten erfolgreich beendet ist <sup>150,168</sup>.

## 2.4 GRK Familie

Die 7 G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen, die zu den Serin-/Threoninkinasen gehören, lassen sich den AGC Kinasen (Proteinkinasen A, C,G) zuordnen. Hierbei sind die GRKs allerdings als atypisch zu klassifizieren, da sie durch ihre Bindung an aktive GPCR in ihrem aktiven Konformationszustand stabilisiert werden <sup>153</sup>. Die GRKs lassen sich weiterhin in 3 Subfamilien untergliedern <sup>169</sup>. Diese Unterteilung obliegt den unterschiedlichen N- und vor allem C-Termini-Strukturen und den verschiedenen Mechanismen der

Membrantranslokation. Die erste Gruppe wird als Rhodopsinkinasen zusammengefasst, hierzu gehören die GRK1 und die GRK7. Diese befinden sich hauptsächlich in den Stäbchen und Zapfen des Auges<sup>170</sup>, wobei bereits geringe Mengen an GRK1 in der Epiphyse beschrieben worden sind<sup>171</sup>.

Die zweite Gruppe der  $\beta$ -adrenergen Kinasen beinhalten die GRK2 und die GRK3, die ubiquitär exprimiert sind, sich aber in ihren Membrankonzentrationen deutlich unterscheiden. So ist die GRK3 nur zu einem Anteil von 10-20 Prozent gegenüber der GRK2 vertreten<sup>153</sup>. Die GRK2 ist außerdem neben den GRK3 und -5 am häufigsten im Myokard vertreten<sup>172,173</sup> und die in zahlreichen Studien am besten charakterisierte Isoform. Weitere Besonderheiten der zweiten Subfamilie sind zum einen, dass diese, anders als die 5 anderen Formen, nicht dauerhaft membranassoziiert sind und zum anderen, dass die PH-Domäne im C-terminalen Bereich PIP<sub>3</sub> die freie G <sub>$\beta\gamma$</sub> -Untereinheit binden. Diese Interaktion resultiert dann schließlich in der Translokation der GRK2 und -3 in der Plasmamembran<sup>174</sup>. Die dritte Gruppe der GRKs setzt sich aus der GRK4, -5 und -6 zusammen. Die GRK-4 findet sich vor allem im Hoden, aber auch zu geringen Mengen im Kleinhirn und in den Nieren<sup>175</sup>, während GRK5 und -6 ubiquitär zu finden sind, wobei GRK6 vor allem immunassoziiert ist.

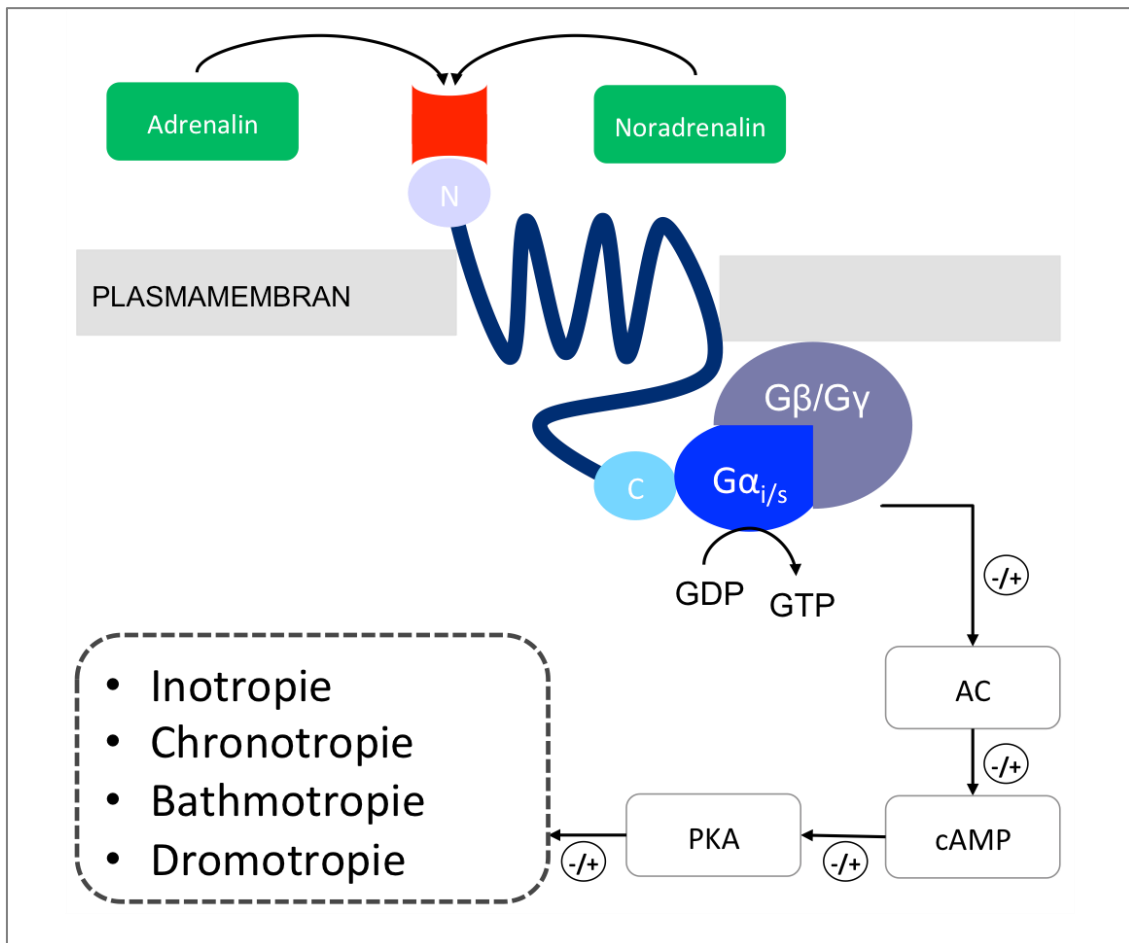
Unter den GRK Formen sind die GRK2 und -5 die Vielfältigsten, da sie fast alle GPCR phosphorylieren, darunter die  $\alpha$ 2- und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren, Angiotensin-II-Typ 1- und Dopamin- Rezeptoren<sup>155,169</sup>.

## 2.5 $\beta$ -adrenerge Rezeptoren und die Proteinkinase A

Die drei  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren im Myokard sind die  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- und  $\beta$ 3- Rezeptoren, wobei die  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2- Rezeptoren die entscheidenden im Exzitations-Kontraktionsmechanismus sind. Die Aktivierung des  $\beta$ 1-Rezeptors führt zu einer Stimulation von Gs-Proteinen, die ihrerseits, wie oben beschrieben, die Adenylatcyclase und damit den sekundären Botenstoff cAMP aktivieren. Daraufhin phosphoryliert und reguliert die PKA bedeutende Proteine in den Myozyten, die für die Kontraktionen im Myokard verantwortlich sind, darunter Phospholamban, L-Typ-Calcium-Kanäle, Ryanodinrezeptoren und kardiales Troponin I<sup>176</sup>. Dies führt zu einer Steigerung der myokardialen Inotropie.

Der  $\beta$ 2-Rezeptor stimuliert sowohl inhibierende Gi- als auch stimulierende Gs –Proteine und wechselt sogar innerhalb eines Signaltransduktionsweges von Gs auf Gi. Dieser

Switch ist abhängig von der Phosphorylierung durch die PKA<sup>177</sup> und bedingt somit die Abnahme der Inotropie im Herz<sup>178</sup>.



**Abb. 10: Mechanismus des β-adrenergen Rezeptors**

Schematische Darstellung des β-adrenergen GPCR im Myokard: Durch Aktivierung der Transmitter Noradrenalin oder Adrenalin werden die β-adrenergen Rezeptoren aktiviert. Dies mündet in einer G-Protein- und im weiteren Verlauf PKA-abhängigen Regulation der Herzkontraktion (Inotropie), der Herzfrequenz (Chronotropie) und der Erregbarkeit der Myozyten (Bathmotropie und Dromotropie).

Herunterregulierung = -, Heraufregulierung = +.

GDP= Duanosindiphosphat, GTP=Guanosinriphosphat N=N-Terminus, C=C-Terminus, Gβ=β-Untereinheit des G-Proteins, Gγ=γ-Untereinheit des G-Proteins, Gα=α-Untereinheit des G-Proteins, cAMP=cyclisches Adenosinmonophosphat, PKA=Proteinkinase A, AC=Adenylatcyclase.

Die kontinuierliche Stimulierung dieser Rezeptoren hat bei andauernden pathophysiologischen Bedingungen im Myokard, z.B. bei Z.n. Myokardinfarkt oder bei chronischer Herzinsuffizienz, unterschiedliche Auswirkungen auf die Myozyten. So wird bei dauerhafter Aktivierung des β<sub>1</sub>-Rezeptors der CaMKII-Signalweg initiiert, der die Apoptose

der Kardiomyozyten<sup>179</sup>, kardiales Remodeling in vivo<sup>180,181</sup> und die katecholaminbedingte Hypertrophie in vitro fördert<sup>182</sup>. Der  $\beta$ 2-Rezeptor hingegen bewirkt bei andauernder Stimulierung einen kardioprotektiven Effekt. Frühere Publikationen unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass die Blockade der  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2- Rezeptoren die präkonditionierende Wirkung der APC aufheben. Lange et al. konnten in Studien aufzeigen, dass Kaninchen im Herzinfarktmodell signifikant größere IS-Größen aufwiesen, sobald ein  $\beta$ -Blocker additiv zur APC appliziert wurde. Dieser Effekt ist dosisabhängig und wird über den CaMKII-Signalweg reguliert<sup>183-186</sup>. Die oben genannten Ergebnisse sind insbesondere im klinischen Alltag relevant, da kardiale Risikopatienten meist mit  $\beta$ -Blockern (z.B. Metoprolol) dauerhaft therapiert werden.

## **2.6 Rolle der GRK2 im Myokard unter pathophysiologischen Bedingungen**

Pathophysiologische Veränderungen, wie z. B. Ischämien, Herzinsuffizienz oder Hypertension<sup>187</sup> führen im Myokard zu veränderten  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktionswegen, die ihrerseits G-Proteine stimulieren oder inhibieren. Infolgedessen erhöht sich bei oben genannten Vorgängen die Expression der GRK2<sup>188</sup>. Dies konnte bereits in vielen tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden und gilt als ein bedeutender Parameter in der frühen Phase nach Ischämien, bei Entstehung der Herzinsuffizienz und bei Umbau- und Remodelingprozessen im Myokard<sup>189</sup>. Veränderte  $\beta$ -adrenerge Signalwege wirken sich langfristig negativ auf das Myokard aus, indem diese zu kardialen Dysfunktionen, insbesondere nach Herzinfarkten oder bei der Herzinsuffizienz führen und die GRK2 aktivieren<sup>190</sup>. Bei lang bestehender Herzinsuffizienz wird der  $\beta$ 2-Rezeptor von der hochregulierten GRK2 an dessen Aminosäuresequenz Serin 355/356 phosphoryliert und so kommt es zur Gi-Protein-Aktivierung, die mitunter die Inotropie negativ verändert. Über die heterologe Desensibilisierung wird der Rezeptor anders als durch die GRK2 von der PKA an der Position Serin-262 phosphoryliert<sup>191</sup>. Trotz der unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen ähneln sich die nachgeschalteten Signalwege in der Aktivierung der inhibierenden G-Proteine. Bei Betrachtung dieses Mechanismus lässt sich eine Parallele zu der  $\beta$ -Blocker Therapie beim Herzinfarkt ziehen, bei der diese Signalwege ebenfalls herunterreguliert werden. Im Organismus wird dies über einen Switch zu Gi Proteinen über den  $\beta$ 2 Signalweg erreicht, der direkt nach der Ischämie einen Schutz vor dem Katecholamin Sturm bietet. Bei der Herzinsuffizienz ist dieses Prinzip hingegen kontraproduktiv, da es über die inhibitorischen G-Proteine die Inotropie verringert und die Herzinsuffizienz eventuell sogar verstärkt. Liu et al. publizierten Daten, die zeigen, dass sich

bei Herzinsuffizienz die Dichte und Proteinexpression der  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptoren um bis zu 50 Prozent verringern, während die Konzentration der  $\beta$ 2-Rezeptoren dabei annähernd gleichbleibend ist <sup>192</sup>.

Eine der wichtigsten Studien zu der Rolle der GRK2 in Bezug auf Herzinfarkte und Herzinsuffizienz ist die der Arbeitsgruppe um Brinks <sup>193</sup>. Ein Experiment an Mäusen zeigte, dass nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden neben der vermehrten Expression von GRK2 die Apoptose der Myozyten und die nekrotischen Areale im Myokard nachweislich vergrößert waren. Eine Untersuchung an GRK2-Knockout-Mäusen bestätigte dieses Erkenntnis und erklärte die Ergebnisse mit der Aktivierung von antiapoptotischen intrazellulären Signalwegen über die PI3K mithilfe der eNOS <sup>194</sup> und die Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt <sup>193</sup>. Eine GRK2 Interaktion wurde darüberhinaus mit dem Protein Akt bereits nachgewiesen. Eine weitere Studie publizierte außerdem, dass der GRK2-Inhibitor  $\beta$ ARK1, auch bei erstmaliger Injektion bei bereits bestehender Herzinsuffizienz zu einer verbesserten Linksventrikulären Funktion (LVEF) und myokardialem Remodeling führt <sup>195</sup>. Mit Knockout-Mäusen wurden ähnliche Daten publiziert, die die bisherigen Veröffentlichungen bestätigen <sup>196</sup>. Die Hemmung der GRK2 hat somit durch Inhibition oder Knockout-Verfahren bisher sowohl auf genetischer <sup>197</sup>, als auch auf physiologischer Ebene nach Infarktereignissen <sup>195</sup> ein verbessertes Outcome gezeigt.

Zudem zeigte eine 2001 publizierte Studie von Harding et al., dass eine kontinuierliche Gabe des  $\beta$ -Blockers Metoprolol und eine gleichzeitige Hemmung der GRK2 zu einem synergistischen kardioprotektiven Effekt führt <sup>198</sup>. Da bereits erhöhte GRK2-Konzentrationen und veränderte  $\beta$ -adrenerge Signalwege bei Herzinsuffizienz im menschlichen Organismus nachgewiesen wurden, ist eine detailreiche Kenntnis dieser molekularen Mechanismen bei der Suche nach pharmakologischen Zielproteinen von entscheidender Bedeutung <sup>199,200</sup>.





### 3 Fragestellung

Der GRK2 wird nach heutigem Stand der Forschung eine große Rolle in den Pathomechanismen bei anhaltender Herzinsuffizienz und nach einem Myokardinfarkt zugesprochen, insbesondere die Inhibition der GRK2 ist für ein verbessertes kardiales Outcome von Bedeutung. Inwieweit die GRK2 und die PKA über die  $\beta$ -adrenergen Signalkaskaden, insbesondere bei der APost, moduliert werden, ist bisher nicht bekannt. Es ist daher von großem Interesse, mögliche zusätzliche Mechanismen der APost zu identifizieren, um diese Erkenntnisse mittelfristig in die klinischen Therapieansätze von Patienten mit akutem Koronarsyndrom implementieren zu können.

Die Vorgänge, die zu Veränderungen der Regulation und Signaltransduktion durch die GRK2 an den  $\beta$ -1 und -2-Rezeptoren unmittelbar nach akuter Ischämie führen, sind für beide Rezeptoren bis dato nicht bekannt und sollen in dieser Arbeit durch ein in-vivo Mausmodell, bei dem ein akuter Herzinfarkt induziert und eine APost mit Sevofluran appliziert wird, dargestellt werden. Zusammenfassend werden die folgenden Kernfragen beantwortet:

- Wird die APost über die GRK2-Hemmung vermittelt?
- Inwiefern werden  $\beta$ -1 und  $\beta$ 2-adrenerge Rezeptoren durch die GRK2 bei Sevofluran-Applikation in der Reperusionsphase beeinflusst?



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Durchführung der Operationen

Die Durchführung und Planung der Operationen erfolgte durch Frau Dr. Anja Frank mit Unterstützung der Promovendin.

#### 4.1.1 Versuchsgenehmigung

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden von der Regierung Unterfranken genehmigt und gemäß Tierschutzgesetz § 8 Abs.1 durchgeführt (Tierversuchsnummer 10/12).

#### 4.1.2 Versuchstiere

Die experimentellen Untersuchungen wurden an männlichen C57BL/6 Mäusen (*Harlan, Horst, Niederlande*) durchgeführt. Die Mäuse hatten ein Alter von 8-10 Wochen, ein durchschnittliches Gewicht von 20-25 Gramm und wurden unter kontrollierten Bedingungen bei 22°C, 55-65 % Luftfeuchtigkeit und einem ständigen Tag-und Nachtrhythmus gehalten. Die Tiere wurden artgerecht und respektvoll behandelt, hatten fortwährend Zugang zu Wasser und herkömmlicher Labornahrung.

#### 4.1.3 Narkose und Beatmung

Die Versuchstiere wurden durch intraperitoneale Applikation von 0,6 mg/10 g KG 0,6 % -igem Pentobarbital narkotisiert. Natriumpentobarbital wurde gewählt, da eine Beeinflussung der Prä- oder Postkonditionierung durch eine Narkose mit Pentobarbital in dem hier gewählten Versuchsmodell vernachlässigbar sind<sup>201</sup>. Durch Druck auf die Hinterpfoten und den Kornealreflex wurde die Narkosetiefe überprüft und bei Bedarf weiteres Pentobarbital i.p. injiziert.

Nach Narkoseinduktion wurden die Mäuse auf ein Wärmeoperationsfeld bei 37,0°C (*Föhr Medical, Seeheim-Jugenheim*) gelegt, die Temperatur wurde mittels rektaler Sonde gemessen und konstant überwacht. Es folgte die orale Intubation und druckkontrollierte Beatmung über ein Beatmungssystem für Nagetiere (*SAR-P 830, CWE, Ardmore, USA*). Es wurde druckkontrolliert mit einer Frequenz von 130 Atemzügen pro Minute und einem maximalen Beatmungsdruck von 30 cm H<sub>2</sub>O beatmet. Des Weiteren

wurde ein 3-Kanal-EKG (*Föhr Medical, Seeheim-Jugenheim*) angeschlossen und während der ganzen Operation aufgezeichnet.

#### 4.1.4 Präparation

Die folgenden Schritte wurden stets mit Hilfe eines Stereomikroskopes durchgeführt (*OPMI-9-FC, Zeiss, Jena*) mit Vergrößerungsmöglichkeiten zwischen dem 3,75- bis 10-fachen.

Zunächst wurde die rechte Arteria carotis communis kanuliert, um mit einem Druck Messwandler einen ständigen invasiv gemessenen Blutdruck aufzuzeichnen. Anschließend wurde die rechte Vena jugularis interna dargestellt. Zur kontinuierlichen Flüssigkeitssubstitution (20 ml Sterofundin kg/h, *B.Braun, Melsungen, Deutschland*) wurde ein zentraler Venenverweilkatheter (ZVK) (*A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg*) eingebracht. Das OP-Feld wurde mit flüssigem Paraffin (*Merck Millipore, Billerica, USA*) bestrichen, um dann die linksseitige Thorakotomie durchzuführen. Hierfür wurde mit einem Skalpell (*B. Braun, Aesculap, Tuttlingen*) ein Schnitt von der linken Axilla bis zum Proc. Xiphoideus durchgeführt, die Mm. pectoralis major und minor von den jeweiligen Faszien gelöst und in die Axillatasche gesteckt. Sie dienen im weiteren Verlauf des Protokolls als Schutz vor Austrocknung. Die Muskeln des vierten linken Interkostalraumes und die Pleura parietalis wurden mit einer Pinzette eröffnet und die Öffnung wurde in Richtung Sternum vergrößert. Es konnte so die dritte Rippe vom Sternum gelöst werden und ein Rippenspreizer eingesetzt werden, um den Interkostalraum aufzudehnen. So war schließlich das komplette Herz einzusehen, das Perikard konnte eröffnet werden und die linke Koronararterie aufgesucht werden. Um den absteigenden Ast der linken Koronararterie (left anterior descending coronary artery „LAD“) wurde ein Prolene-Faden (*Ethicon, Somerville, USA*) gelegt, um die spätere Koronararterienokklusion durchzuführen.

#### 4.1.5 Koronararterienokklusion

Das System für die Koronararterienokklusion (CAO) besteht aus einer in der Höhe verstellbaren Halterung an die zwei kleinen Gewichte (jeweils 1,5 Gramm) gehängt werden. Die Gewichte werden an die Ligatur der CAO gehängt, die nochmal mit Plastikröhrchen verstärkt werden. Sobald die Gewichte hochgezogen werden, zieht sich der Knoten der Ligatur weiter zu und löst so die Myokardischämie aus. Die Farbänderung des Myokards von rot zu weiß kann als Erfolgskontrolle gesehen werden. Des Weiteren verfärbt sich der LAD infolge der Ischämie zu violett und im EKG zeigen sich ST-Streckenhebungen.

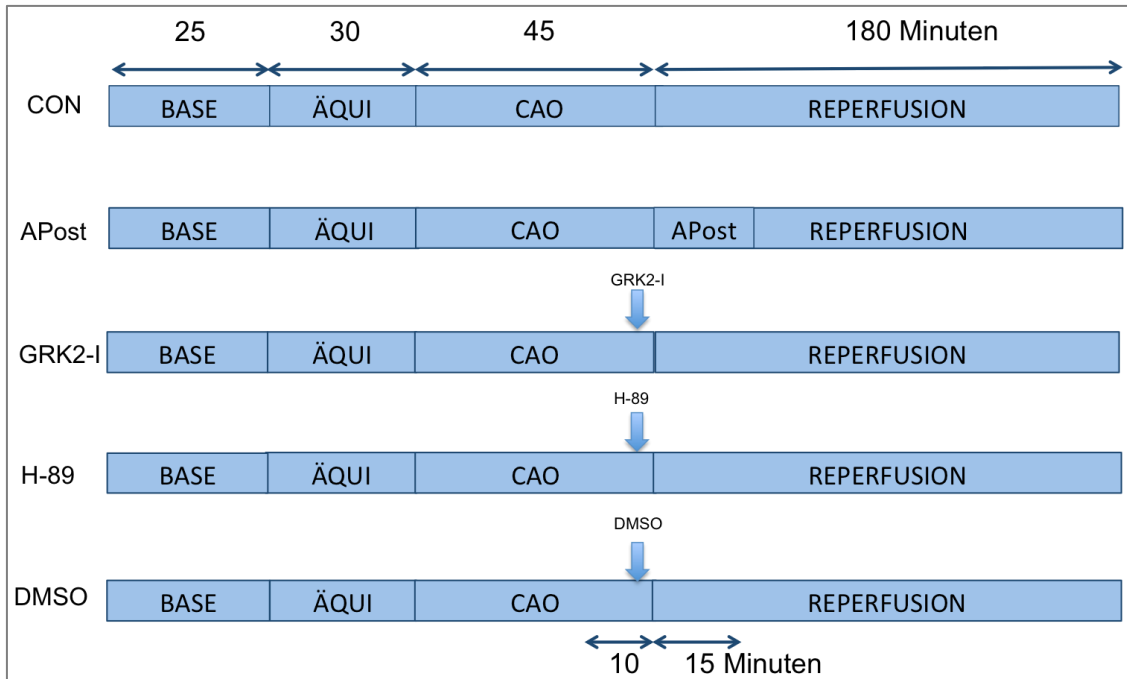
Bei der Reperfusion wird durch das Absenken der Halterung und damit der nachlassenden Wirkung der Gewichte die Okklusion aufgelöst, das EKG normalisiert sich und das Myokard wird wieder rötlich durchblutet.

#### 4.1.6 Experimentelles Protokoll

Die Tiere wurden den Gruppen randomisiert zugeteilt und die Gruppengröße variierte zwischen  $n=7$  und  $n=8$ .

Nach der chirurgischen Intervention und Präparation, die in der Baselinephase (BASE) wurde den Tieren eine 30 –minütige Äquilibrationsphase (ÄQUI) gewährt. Nach dieser Phase wurde die CAO durchgeführt, die 45 Minuten lang belassen wurde. Die Reperfusionphase dauerte 180 Minuten. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten keine weitere Behandlung, die anderen Versuchstiere wurden entsprechend der Gruppeneinteilung behandelt (siehe Abbildung).

Die zweite Versuchsgruppe erhielt 10 min. vor Ende der CAO Dimethylsulfoxid (10  $\mu$ l/g KG) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*). Die Anästhetika-induzierte Postkonditionierung erfolgte mit dem volatilen Anästhetikum Sevofluran (*Sevorane*®, *Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden*) bei einer minimalen alveolären Konzentration (MAC) von 1,0 (entsprechend 3,4 Vol. %<sup>2</sup>) für 15 Minuten unmittelbar nach der CAO. Weiteren Versuchsgruppen wurde jeweils der GRK2- Inhibitor  $\beta$ ARK1 (0,2  $\mu$ g/g KG gelöst in 0,9 %iger Kochsalzlösung) (*Merck Millipore, Billerica, USA*) und der selektive Proteinkinase - A - Inhibitor H-89 (10  $\mu$ g/g KG, gelöst in 10% DMSO) (*Merck Millipore, Billerica, USA*) verabreicht. Somit ergaben sich fünf Versuchsgruppen.



**Abb. 11: Experimentelles Protokoll**

Für die tierexperimentellen Versuche wurden Mäuse in die in der Abbildung dargestellten 5 Gruppen randomisiert. Die APost mit Sevofluran hat sich für 15 Minuten nach der CAO-Phase angeschlossen. Die Applikationen des GRK2-Inhibitors sowie des PKA-Inhibitors H-89 und DMSO erfolgten kurz vor Ende der CAO-Phase. CON=Kontrollgruppe; BASE=Baseline; ÄQUI=Äquilibrierungsphase; CAO= Koronararterienokklusion; APost=Anästhetika induzierte Postkonditionierung mit Sevofluran (1,0 MAC); GRK2-I= GRK2-Inhibitor  $\beta$ ARK; DMSO=Dimethylsulfoxid.

#### 4.1.7 Bestimmung der Herzinfarktgrößen und der „Area at Risk“ (AAR)

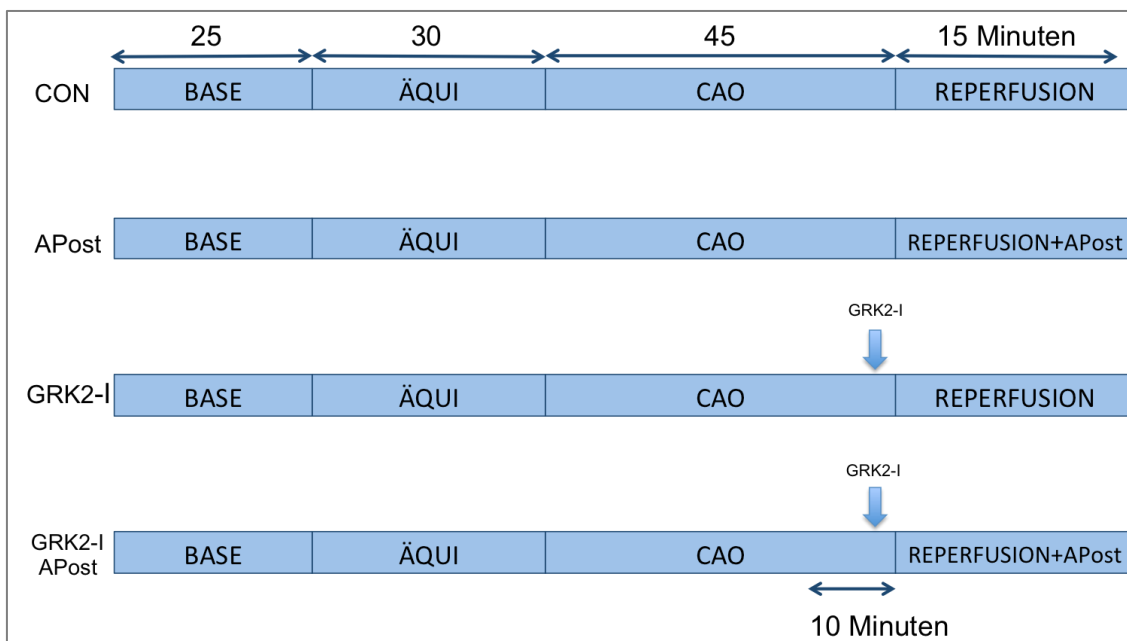
Nach 180 Minuten Reperfusionphase wurde der LAD erneut okkludiert und über die A. carotis communis der Farbstoff „Evans Blue“ (5 %) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*) verabreicht. Somit färbte sich das perfundierende Gewebe bläulich unter Aussparung des ischämischen Areals. Nach einer letalen i.p. Injektion Pentobarbital wurde das Herz entnommen und der linke Ventrikel herauspräpariert und in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten tiefgefroren. Die rechten Ventrikel wurden ebenfalls eingefroren, um für spätere Versuche eventuell wiederverwendet zu werden. Die LV wurden mit Hilfe einer Acrylherzmatrix in 7-8 Transversalschnitte von je circa 1 mm Dicke unterteilt.

Diese Schnitte wurden für 30 Minuten in Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*) inkubiert, sodass sich ischämisches Gewebe rot und die infarzierten Areale weiß färbten. Nach der Inkubation wurde jeder Schnitt einzeln für 24 h in Formaldehyd (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*) eingelegt, bevor er am nächsten Tag für die planimetrische Auswertung gewogen und fotografiert wurde. Mit dem Programm

„Adobe Photoshop“ wurden diese Aufnahmen anschließend dokumentiert, ausgewertet und photometrisch gemessen. Je nach Farben wurden die verschiedenen Areale einer Gruppe zugeteilt. So zeigte blaues Areal intaktes, vitales Myokard an, die rote Farbe markierte die AAR und weißes Myokard war demnach nekrotisches, infarziertes Gewebe.

#### 4.1.8 Gewebeentnahmen

Für die molekularbiologischen Gruppen wurden tierexperimentelle Untersuchungen nach ähnlichem Protokoll durchgeführt, um die verschiedenen Quantitäten bestimmter Proteine in einem solchen Ischämie/Reperfuionsmodell nachzuvollziehen. Hierbei variierte die Versuchsgruppengröße zwischen  $n=5$  und  $n=7$ . Die Tiere wurden abermals randomisiert vier verschiedenen Gruppen zugeteilt, während die Kontrollgruppen nur eine CAO erhielten. Abgesehen von der Reperfuionsphase, die bei dieser Versuchsreihe nur 15 Minuten dauerte, wurde das oben beschriebene Versuchsprotokoll nicht verändert. Die Herzen wurden nach deren Entnahmen direkt in einem  $-80^{\circ}\text{C}$  Kühltank (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*) gelagert, nicht gefärbt oder geschnitten.



#### Abb. 12: Protokoll der Organentnahmen

Für die molekularbiologischen Versuche wurde Myokard den Mäusen entnommen. Dies erfolgte im Gegensatz zu den tierexperimentellen Versuchen nach einer kürzeren Reperfuionszeit (15 Minuten). Zudem erfolgte die Gabe von APost und dem GRK2-Inhibitor in einer Gruppe.

CON=Kontrollgruppe; BASE=Baseline; ÄQUI=Äquibrierungsphase; CAO= Koronararterienokklusion; APost=Anästhetika induzierte Postkonditionierung mit Sevofluran (1,0 MAC); GRK2-I= GRK2-Inhibitor  $\beta$ ARK; DMSO=Dimethylsulfoxid.

## 4.2 Molekularbiologische Experimente

Die Planung und Durchführung der molekularbiologischen Experimente erfolgte eigenständig durch die Promovendin.

### 4.2.1 Lysate

Nach Entnahme der Herzen wurden die Herzen mit einem Einmalskalpell (*B. Braun, Aesculap, Tuttlingen*) in einen linken und einen rechten Ventrikel unterteilt. Beide Ventrikel wurden jeweils in einem Mikroreaktionsgefäß (*Eppendorf, Hamburg*) gelagert, mit den entsprechenden Abkürzungen LV und RV, dem Datum der Organentnahme, der entsprechenden Versuchsnummer gekennzeichnet und in einem -80°C Kühlschrank gelagert. Für die Lysate wurden die bei -80°C gelagerten LV aus dem Kühlschrank geholt und mit einer Pinzette in einen Glaskolben (*B. Braun, Melsungen*) transportiert. Dem RIPA-Puffer wird pro 10 ml 1 Tablette des Proteaseinhibitors (cOmplete ULTRA Tablets, Mini, Easypack, *Roche, Mannheim*) beigefügt. Dem LV wurden anschließend 750 µl RIPA-Puffer hinzugefügt und der Inhalt wurde mit einem Homogenisator (*IKA, Staufen*) auf Eis bei 800 rpm für zirka 1-2 Minuten mithilfe eines Homogenisatorzylinders (*B. Braun, Melsungen*) lysiert. Anschließend wurden die Homogenisate bei 4°C bei 11600 rpm für 5 Minuten zentrifugiert (*Eppendorf, Hamburg*). Nachdem die Lysate zentrifugiert wurden, wurde der Überstand mit einer großen (1000 µl) Pipette (*Eppendorf, Hamburg*) abgenommen und in beschriftete Mikroreaktionsgefäße pipettiert. Nur die flüssige Phase wurde weiterverwendet, das feste Pellet wurde verworfen. Von diesem Überstand wurde nochmals 300 µl abpipettiert und es wurden jeweils zu jedem Lysat 100 µl 4x-Lämmli Puffer und 6 µl β-Mercaptoethanol () hinzugefügt. Das β-Mercaptoethanol wurde aufgrund seiner toxischen und reizenden Eigenschaften unter dem Abzug hinzugefügt

Der RIPA-Puffer setzt sich wie folgt zusammen:

- 5ml 1,0M Tris (pH7,4) (Roth, Karlsruhe)
- 3ml 5,0M NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 200µl 0,5M EDTA (pH 7,4) (SERVA, Heidelberg)
- 1g Na-deoxycholate (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)
- 1ml 10% SDS (AppliChem, Darmstadt)
- 10ml 10% NP-40 (AppliChem, Darmstadt)
- auf pH 7,4 titrieren (WTW, Weilheim)
- auf 70ml mit destilliertem H<sub>2</sub>O auffüllen



Der 4x Lämmli Puffer setzt sich wie folgt zusammen (20ml):

- 5ml 0,5M Tris-HCl (pH 6,8)
- 4ml Glycerol (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- 8ml 10% SDS
- 2ml 0,1% Bromphenolblaulösung (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*)
- 1ml  $\beta$ -Mercaptoethanol
- auf 20ml mit destilliertem H<sub>2</sub>O auffüllen

#### 4.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach BCA (Pierce)

Für die Proteinbestimmungen der Lysate nach der BCA-Methode wird zunächst eine Verdünnungsreihe hergestellt, die mehrmals benutzt werden kann. Der RIPA-Puffer wird hierbei ohne Zugabe des Proteaseinhibitors verwendet. Das BSA ist von der Firma *ThermoScientific (Waltham, USA)*:

Die Verdünnungsreihe wird wie folgt in Mikroreaktionsgefäße pipettiert:

Tab. 1: Darstellung der Verdünnungsreihe

Beschriftung „Eppi“	Verdünnungslösung RIPA-Puffer	BSA	BSA Endkonzentration
A	0	200 $\mu$ l Stocklösung	2000 $\mu$ g/ml
B	125 $\mu$ l	375 $\mu$ l Stocklösung	1500 $\mu$ g/ml
C	325 $\mu$ l	325 $\mu$ l Stocklösung	1000 $\mu$ g/ml
D	175 $\mu$ l	175 $\mu$ l aus Lösung B	750 $\mu$ g/ml
E	325 $\mu$ l	325 $\mu$ l aus Lösung C	500 $\mu$ g/ml
F	325 $\mu$ l	325 $\mu$ l aus Lösung E	250 $\mu$ g/ml
G	325 $\mu$ l	325 $\mu$ l aus Lösung F	125 $\mu$ g/ml
H	400 $\mu$ l	100 $\mu$ l aus Lösung g	25 $\mu$ g/ml
I	400 $\mu$ l	0	0

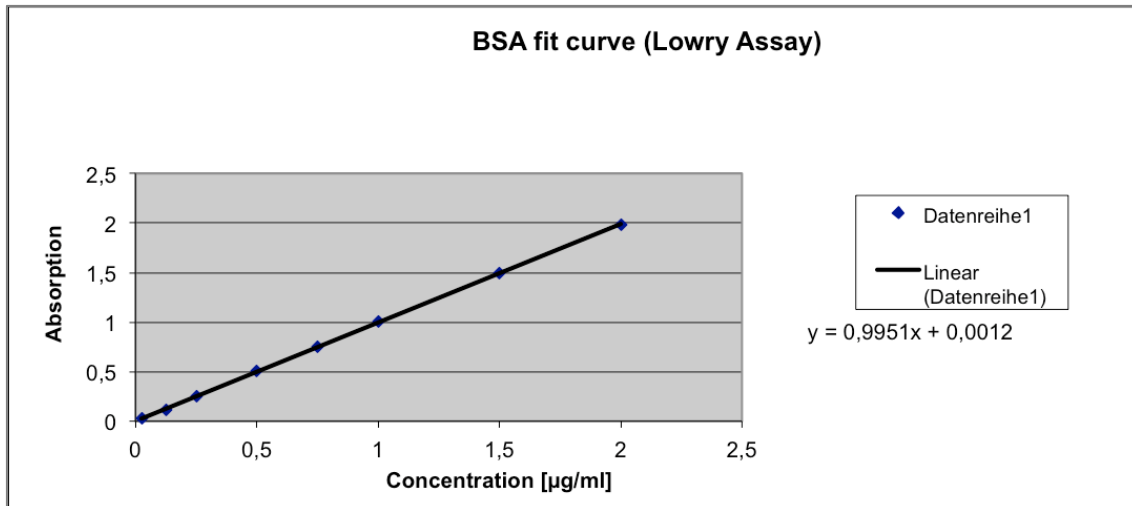
In eine 96-Well Mikrotiterplatte (*ThermoScientific life Technologies, Waltham, USA*) wurde die Verdünnungsreihe jeweils zwei Mal à 25  $\mu$ l nebeneinander in die Spalten A-H aufgetragen, die restlichen Nöpfchen konnten für die eigentlichen Proteinbestimmungen genutzt werden. In jedes dieser Nöpfchen wurde anschließend 22,5  $\mu$ l RIPA-Puffer und

2,5 µl der zu analysierenden Probe pipettiert, sodass eine Verdünnung der Probe von 1:10 zustande kam. Es wurden immer drei Proben nebeneinander aufgetragen. Danach erfolgte die Zugabe des BCA-Reagenz (*ThermoScientific life Technologies, Waltham, USA*) in alle Nöpfchen. Für Reagenz A wurden 0,2 ml zur Reagenz B mit 0,004 ml (zusammen 0,204 BCA Working Reagenz) pro Nöpfchen aufgetragen. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Sowohl das BSA aus der Verdünnungsreihe, als auch die Reagenzien wurden dem „Pierce™ BCAProtein Assay Kit“ der Firma *ThermoScientific (Waltham, USA)* entnommen.

Tab. 2: *Probenauftragung für die Proteinbestimmung*

A	A	Probe	Probe	Probe							
B	B	Probe	Probe	Probe	usw.						
C	C										
D	D										
E	E										
F	F										
G	G										
H	H									I	I

Die Auswertung erfolgte nach erfolgreicher Inkubation (Farbwechsel zu lila) am PC mit dem Programm „Magellan™ 5“ (*Tecan, Wiesbaden*). Anhand der „single concentration“-Funktion in diesem Programm wurde der jeweilige Proteingehalt der Proben gemessen und diese Werte wurden in einer Excel Tabelle mit einer Standardabweichung verrechnet. Die Standardkurve und der daraus abgeleitete y-Wert (Standardabweichung) errechnete sich aus den Werten der Verdünnungsreihe A-I.



**Abb. 13: Standardkurve der BSA-Proteinbestimmung**

Für die späteren Western Blots ergab sich ein „Loading“ von 40 µg pro Lane. Außerdem wurde ein Lämmli-Faktor von 1,33 in die Loading-Tabelle miteinbezogen, da die Proben, die für die Western Blots benutzt wurden, stets zu einem Drittel der Probe mit 4x-Lämmli Puffer und β-Mercaptoethanol versetzt wurden.

Um die Proben für einen Western Blot vorzubereiten, wurden die mit Lämmli versetzten Proben aufgetaut, entsprechende Aliquots der Proben pipettiert und diese wurden anschließend für 3 Minuten bei Raumtemperatur und 10.000 rpm zentrifugiert.

#### 4.2.3 Auftrennung der Proteine

Um die Proteine nach ihrer Molekülgröße (kiloDalton) aufzutrennen, wurde das „Mini-PROTEAN® 3“ (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA*) Komplettsystem als Gelelektrophorese-Kammer (SDS-PAGE) verwendet.

Zunächst wurde ein 10% -iges Trenngel hergestellt. Dieses wurde zwischen eine 1,5 mm großen Spacer Platte und eine kleine Glasplatte (beide *Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA*) gegossen. Um eine Austrocknung während der Polymerisation des Trenngels zu verhindern, wurde das Gel mit einer zirka 1 mm breiten H<sub>2</sub>O (destilliert)- Schicht benetzt.

Nach erfolgreicher Aushärtung des Trenngels wurde das H<sub>2</sub>O vollständig mittels Papierstreifen entfernt und das Sammelgel wurde vorbereitet. Dieses wurde auf das Trenngel gegossen und direkt im Anschluss wurden 1,5 mm breite Kämme mit 15 Wells (*Bio-Rad*

*Laboratories, Hercules, USA*) in das Sammelgel gedrückt. Es wurde insbesondere darauf geachtet, die Kämme möglichst luftblasenfrei einzusetzen, sodass später die Proteine einwandfrei aufgetragen werden konnten. Nach dem Aushärten des Sammelgels wurden die Platten mit den Gelen in den entsprechenden Halterungen des „Mini-PROTEAN Komplettsystems“ befestigt und anschließend in die Kammern gesetzt. Die Kammer wurde im Innenraum mit neuem und außen mit bereits gebrauchtem Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Kämme wurden anschließend entfernt und die dadurch entstandenen Lanes mit Elektrophoresepuffer und einer großen 1000 µl Pipette gründlich durchgespült, um eventuelle Gel-Rückstände aufzusaugen und zu entfernen. Anschließend wurden die Proben mit den entsprechenden Ladungen aufgetragen. An den äußeren Lanes wurde jeweils 2,5 µl des Proteinmarkers V (*Peqlab, Erlangen*) aufgetragen, um später die Zielproteine anhand der Molekülgrößen auffinden zu können. Daraufhin wurde der jeweilige Deckel des Komplementsystems aufgesetzt, wobei hierbei insbesondere auf die Polung geachtet wurde. Die Gelelektrophorese wurde 20 Minuten lang bei 60 Volt, danach weitere 2 Stunden bei 90 Volt an die Netzteile (*Peqlab, Erlangen*) angeschlossen. Sobald sich der Proteinmarker und die Proteine entsprechend aufgetrennt hatten, wurde die Kammer von der Stromquelle entfernt und der Elektrophoresepuffer verworfen.

Das Trenngel setzt sich wie folgt zusammen (für 4 Gele):

- 16,0 ml H<sub>2</sub>O
- 13,6 ml Acrylamid/Bis 30:2 (*Rotiphorese®*, *Carl Roth, Karlsruhe*)
- 10,0 ml 3M Tris pH 8,8
- 0,40 ml 10% SDS
- 0,40 ml 10% APS
- 24µl TEMED

Das Sammelgel setzt sich wie folgt zusammen:

- 13,4ml H<sub>2</sub>O
- 3,4 ml Acrylamid/Bis 30:2 (*Rotiphorese®*, *Carl Roth, Karlsruhe*)
- 2,5 ml 3M Tris pH 6,8
- 0,20ml 10% SDS (*AppliChem, Darmstadt*)
- 0,20ml 10% APS
- 20µl TEMED

Der Elektrophoresepuffer (10x) setzt sich wie folgt zusammen:

- 60,4g Tris
- 288g Glycine
- 20g SDS
- 2l H<sub>2</sub>O

#### 4.2.4 Western-Blot

Für das Immuno-Blotting wurde ein Tankblot-Verfahren verwendet. Zur Vorbereitung musste der Towbin-Puffer hergestellt werden. Außerdem mussten die PVDF-Membranen (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA*) für eine Minute in Methanol aktiviert werden. Die Membranen wurden außerdem noch beschriftet mit Datum, Versuchsnummern und jeweiligen Antikörpern, die später dazu gegeben werden.

Der Tankblot wurde in dieser Reihenfolge zusammengesetzt:

- rote Seite der Halterung
- Schaumstoff
- Blotting Papier
- aktivierte PVDF-Membran
- Gel mit den aufgetrennten Proteinen
- Blotting Papier
- Schaumstoff
- schwarze Seite der Halterung

Beim Zusammensetzen der jeweiligen Halterungen wurde insbesondere darauf geachtet, keine Luftblasen zwischen den Gelen und den Membranen einzuschließen, da diese ein späteres Auswerten verhindert hätten. Die Halterungen wurden entsprechend der Farbe und Polung in den Tankblot eingesetzt.

Der Tankblot wurde in der Kühlkammer bei 4°C an ein Netzteil mit 160 mA (40mA pro Membran) und durchschnittlich 50 V angeschlossen. Ein Rührfisch in dem System und eine Magnetplatte (*Labinco, Breda, Niederlande*) sorgten dafür, dass der Puffer nicht erhitzt wurde. Nach einer Laufzeit von 8-10 Stunden wurde der Tankblot-Behälter von der Stromquelle getrennt und die Membranen mit 5% igem Milchpulver (*AppliChem, Darmstadt*) in TBS-Tween für eine Stunde geblockt.

Der Towbin Puffer setzt sich wie folgt zusammen (2l):

- 160ml Transferpuffer
- 400ml Methanol
- 7,5 ml 10% SDS

Der Transferpuffer setzt sich wie folgt zusammen (4l):

- 117g Glycine
- 211g Tris
- 4l H<sub>2</sub>O

Der TBS-Tween -20 (10x) setzt sich wie folgt zusammen (7l):

- 84,8g Tris
- 613,6g NaCl
- auf 3-4 Liter mit H<sub>2</sub>O auffüllen
- mit HCl (32%) auf pH 7,6 titrieren
- auf 7l mit H<sub>2</sub>O auffüllen
- auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- ggf. den pH-Wert kontrollieren und eventuell erneuert titrieren
- 35ml Tween 20 (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)

#### 4.2.5 Primärantikörper- Inkubation

Die Primärantikörper wurden jeweils in 3% igem BSA (*Carl Roth, Karlsruhe*) in TBS-Tween gelöst. Pro Membran wurden 2 µl aufgetragen. Die Spezies der verwendeten Antikörper war Kaninchen.

Die Primärantikörper wurden in folgenden Konzentrationen inkubiert:

- Anti-GRK2 (sc-562, Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:250
- Anti-β-Arrestin (sc-28869, Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:250
- Anti-β1-Adrenorezeptor (sc-568, Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:100
- Anti-β2-Adrenorezeptor (sc-569, Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:250

Die PVDF-Membranen wurden separat in Klarsichtfolien (*Carl Roth, Karlsruhe*) verschweißt und die jeweiligen Primärantikörper wurden in oben genannten Konzentrationen in die Folien pipettiert. Anschließend wurden diese luftdicht mit einem Folienschweißgerät

(*Severin, Sundern*) verschlossen. Die inkubierten Membranen wurden über Nacht in der 4°C Kühlkammer auf einem Schüttler gelagert. Am nächsten Morgen wurden die Tütchen geöffnet und die Membranen jeweils drei Mal für acht Minuten in TBS-Tween gewaschen. Die Sekundärantikörper (goat anti-rabbit IgG: sc-2004, *Santa Cruz Biotechnology, USA*) wurden in 2,5% Milchpulver und 2,5% BSA in TBS-Tween gelöst und für eine Stunde auf die Membranen gegeben. Nach der Inkubation wurden die Membranen ein weiteres Mal mit TBS-Tween gewaschen.

#### 4.2.6 Entwicklung

Nach dem Waschen wurde die Entwicklerlösung (Lösung Nr. 5 und 6 aus dem ROCHE WesternBlot Kit) 1:1 auf die Membranen gegeben und nach zirka zwei Minuten mit dem Imager (*Protein Simple, San Jose, USA*) belichtet und aufgenommen. Über das Programm „*FluorChem*“ konnten die fotografierten Blots bearbeitet, ausgewertet und beschriftet werden.

Die Blots wurden je einmal mit der Funktion „autoexpose“ abgelichtet und darauffolgend stets mit 15, 30, 45, 60 und 90 Sekunden.

#### 4.2.7 Ladekontrolle

Nach der Belichtung der Banden wurden die Membranen abermals mit TBS-Tween gewaschen und anschließend gestrippt.

Die Zusammensetzung des Stripping Puffers (500 ml) lautet:

- 31,25ml Tris-Lösung pH6,8
- 10g SDS
- auf 500ml mit destilliertem H<sub>2</sub>O auffüllen
- frisch dazu: 215µl β-Mercaptoethanol auf 30ml Puffer

Die Blots wurden in einem verschließbaren Gefäß für 25 Minuten in einem 56°C warmen Wasserbad mit dem Stripping Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranen für 1 Stunde mit 5% -iger Milch in TBS-Tween geblockt und anschließend in Folien verschweißt. Die Ladekontrolle GAPDH (#MAB374, clone6C5, *Millipore, Temecula, USA*) wurde in der Konzentration 1:2000 in die Folien appliziert. Die Membranen wurden insgesamt für 2 Stunden mit der internen Ladekontrolle inkubiert und anschließend nach dem oben beschriebenen Vorgang gewaschen, mit Sekundärantikörpern (goat anti-

mouse IgG: Lumi-Light<sup>PLUS</sup> Western Blotting Kit, *Roche, Mannheim*) inkubiert und schlussendlich entwickelt.

#### **4.2.8 Auswertung**

Die Aufnahmen wurden mit dem Programm „ImageJ“ ausgewertet. Zunächst wurde die GAPDH-Bande der Kontrollen ausgemessen und kalibriert, wobei die Kontrollen auf „1“ und der Weißabgleich als „0“ gewertet wurden. In Hinblick auf diese Berechnungen wurden die Bereiche der GAPDH der jeweiligen Tiergruppen ausgemessen und in eine Excel-Schablone eingetragen.

Nach dem gleichen Verfahren wurden zunächst die Antikörper-spezifischen Banden der Kontrollen ausgemessen, diese jedoch auf den Wert „100“ kalibriert und ein weiterer Weißabgleich als „0“ gewertet. Wieder wurden die Antikörper-Banden ausgemessen und in der oben genannten Schablone mit den zugehörigen GAPDH Banden verglichen und so die jeweilige Molekülmenge in den einzelnen Proben bestimmt.

#### **4.2.9 Statistische Analyse**

Alle hämodynamischen Parameter, das EKG und die Körpertemperatur wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Diese Werte, die Körpergewichte der Mäuse, die Gewichte der LV, die mit „ImageJ“ ausgewerteten Daten der Western-Blots und die berechneten Flächen der AAR und der IS wurden im Programm „SPSS“ berechnet. Mithilfe des ANOVA-Tests wurden die Gruppen unter- und miteinander verglichen. Anschließend wurde der Post-Hoc Duncan-Test angewandt, wobei das Signifikanzniveau mit 5 % ( $p < 0,05$ ) vorgegeben wurde.



## **5 Ergebnisse**

Für die Auswertung der Herzinfarktgrößen wurden 39 Tiere in die Endauswertung inkludiert. Für die Ergebnisse der Western Blot Analysen wurden insgesamt 20 Tiere in die statistische Analyse eingeschlossen. Bei Auftreten von Kammerflimmern und/oder Herzversagen während der jeweiligen Operation wurden die Tiere der Statistik exkludiert und nicht in die Wertung miteinbezogen.

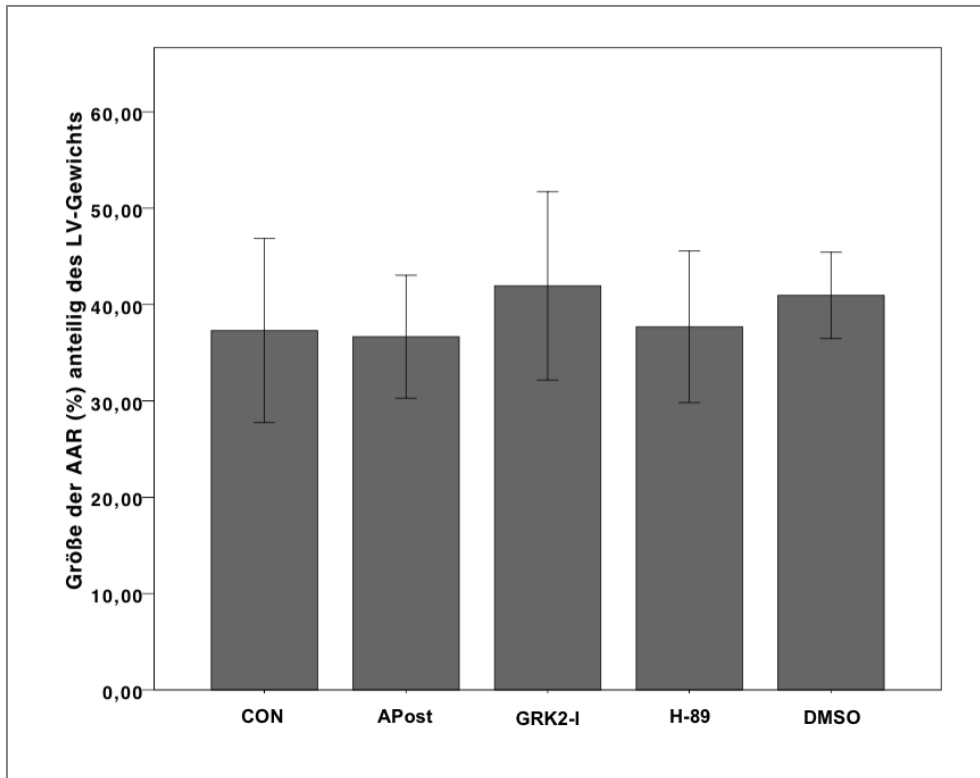
### **5.1 Ergebnisse**

#### **5.1.1 Hämodynamik**

Die Messungen der Hämodynamik zeigten keine Schwankungen zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen in den verschiedenen Phasen des Protokolls.

#### **5.1.2 Körpergewicht und Planimetrie**

Bei den Messungen des Körpergewichts, des LV-Gewichts und der AAR in den unterschiedlichen Versuchsgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.



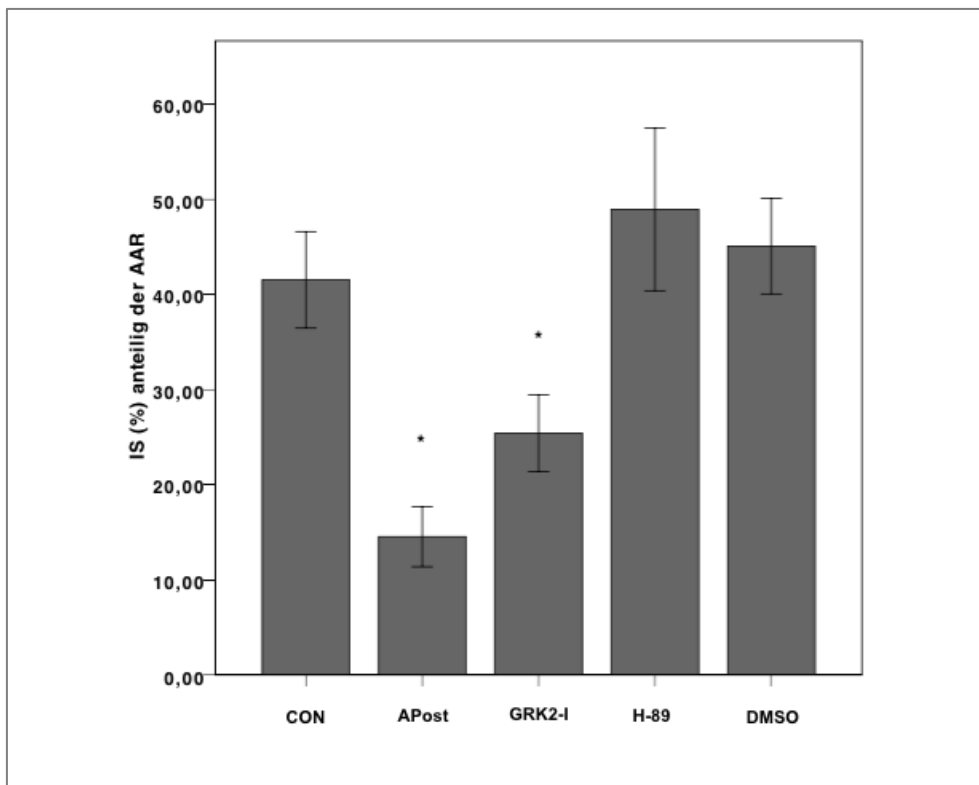
**Abb. 14: Größe der AAR in % des LV**

Die Größe des AAR als Prozentwert bezogen auf das LV- Gewicht. In dem Diagramm sind die Mittelwerte und der jeweilige Standardfehler angegeben.

CON=Kontrollgruppe; APost=Anästhetika induzierte Postkonditionierung mit Sevofluran (1,0 MAC), GRK2-I=GRK2-Inhibitor  $\beta$ ARK1, H-89=PKA-Inhibitor; DMSO=Dimethylsulfoxid, AAR=Area at Risk, LV=Linker Ventrikel.

Die Messungen der AAR und der IS dienten der prozentualen Bestimmung der Herzinfarktgröße und diese lag in der Kontrollgruppe im Mittel bei 41,53%  $\pm$ SD.

Der mittlere Wert der Herzinfarktgröße der APost Gruppe reduzierte sich signifikant zu CON um 26,99%  $\pm$ SD. Die DMSO Gruppe zeigte annähernd ähnliche Werte zu der CON Versuchsgruppe. Die Tiere, die zuvor den GRK2 Inhibitor  $\beta$ ARK1 erhielten, hatten ebenfalls ein signifikant verkleinertes Infarktareal gegenüber den Kontrollen. Die Applikation des PKA-Inhibitors H-89 resultierte, gemessen an den Kontrolltieren, in einer leicht erhöhten, nicht signifikanten mittleren Herzinfarktgröße.



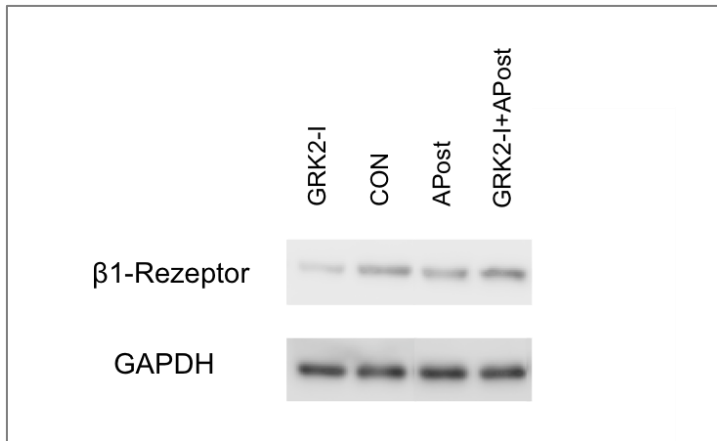
**Abb. 15: Größe des IS in % der AAR**

In dem Diagramm sind die Mittelwerte und der jeweilige Standardfehler angegeben. CON=Kontrollgruppe; APost=Anästhetika induzierte Postkonditionierung mit Sevofluran (1,0 MAC), GRK2-I= GRK2-Inhibitor  $\beta$ ARK1, H-89= PKA-Inhibitor H-89, DMSO= Dimethylsulfoxid, IS=Infarct Size, AAR=Area at Risk, \* = Signifikant ( $p < 0,05$ ) verschieden von der Kontrollgruppe.

## 5.2 Ergebnisse der Western-Immunoblots

### 5.2.1 $\beta$ 1-adrenerger Rezeptor

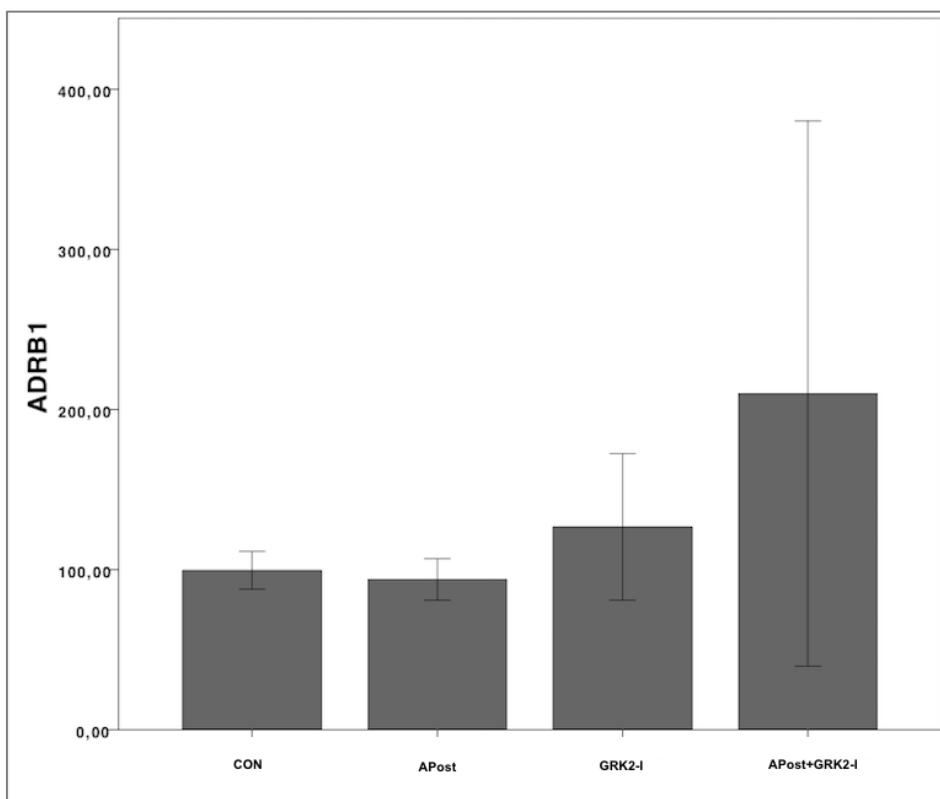
Die Western Blot Analyse des ADRB1 zeigte zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede, wobei eine erhöhte Expression des ADRB1 in der GRK2-I+SEVO-Versuchsgruppe zu verzeichnen ist, die nicht signifikant ist.



**Abb. 16: Western Blot des β1-Rezeptors**

Deskriptive Darstellung der Western-Blot Analysen nach der Belichtung. Die untere Proteinbande zeigt die Ladekontrolle, die mit GAPDH bestimmt wurden.

GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GRK2-I= GRK2-Inhibitor βARK1, APost=Anästhetika induzierte Postkonditionierung mit Sevofluran (1,0 MAC), CON= Kontrollgruppe.



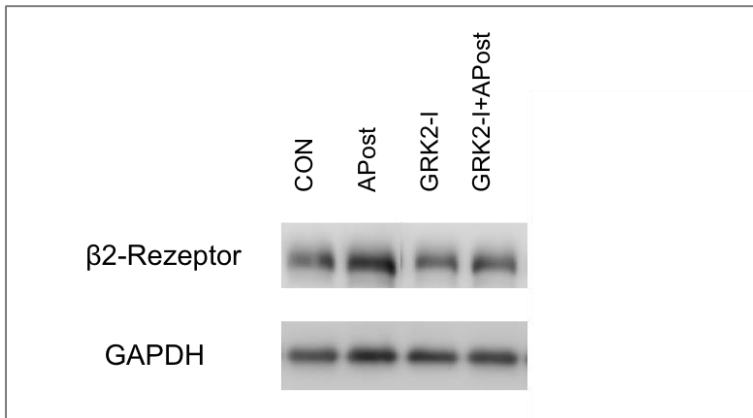
**Abb. 17: Statistische Auswertung der Western-Blot Analyse des ADRB1**

In dem Diagramm sind die Mittelwerte und der jeweilige Standardfehler angegeben. Die Gruppengröße betrug  $n=5$ . Die densometrischen Auswertungen der Versuchsgruppe CON wurde als Referenzwert mit annähernd 100% angegeben ( $\pm$  SEM) und die übrigen Mittelwerte wurden anhand der CON-Gruppe verglichen.

GRK2-I= GRK2-Inhibitor βARK1, APost=Anästhetika induzierte Postkonditionierung mit Sevofluran (1,0 MAC), CON=Kontrollgruppe, ADRB1=β1-Adrenorezeptor.

### 5.2.2 $\beta$ 2-adrenerger Rezeptor

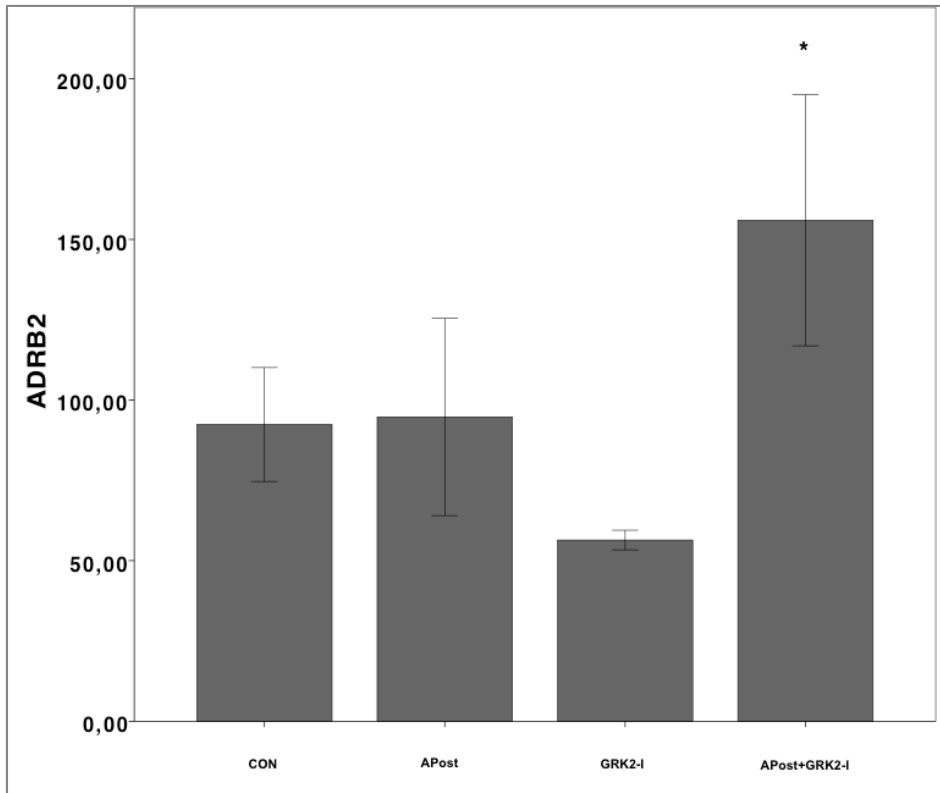
Der ADRB2 wurde ähnlich des ADRB1 in der APost Gruppe nicht vermehrt nachgewiesen. Nach Gabe des GRK2-Inhibitors wurde eine deutlich verminderte Quantität des Rezeptors nachgewiesen, bei zusätzlicher Gabe von Sevofluran stieg die Expression jedoch signifikant an.



**Abb. 18: Western-Blot des  $\beta$ 2-Rezeptors**

*Deskriptive Darstellung der Western-Blot Analysen nach der Belichtung. Die untere Proteinbande zeigt die Ladekontrolle, die mit GAPDH bestimmt wurden.*

*GRK2-I= GRK2-Inhibitor  $\beta$ ARK1, APost=Anästhetika induzierte Postkonditionierung mit Sevofluran (1,0 MAC), CON=Kontrollgruppe.*



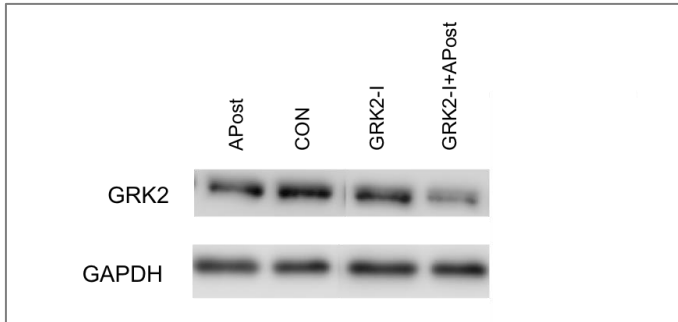
**Abb. 19: Statistische Auswertung der Western-Blot Analyse des ADRB2**

In dem Diagramm sind die Mittelwerte und der jeweilige Standardfehler angegeben. Die Gruppengröße betrug  $n=5$ . Die densometrischen Auswertungen der Versuchsgruppe CON wurde als Referenzwert mit annähernd 100% angegeben ( $\pm$  SEM) und die übrigen Mittelwerte wurden anhand der CON-Gruppe verglichen. \* = Signifikant ( $p < 0,05$ ) verschieden von der Kontrollgruppe.

GRK2-I= GRK2-Inhibitor  $\beta$ ARK1, APost=Anästhetika induzierte Postkonditionierung mit Sevofluran (1,0 MAC), CON=Kontrollgruppe, ADRB1= $\beta$ 1-Adrenorezeptor.

### 5.2.3 GRK2

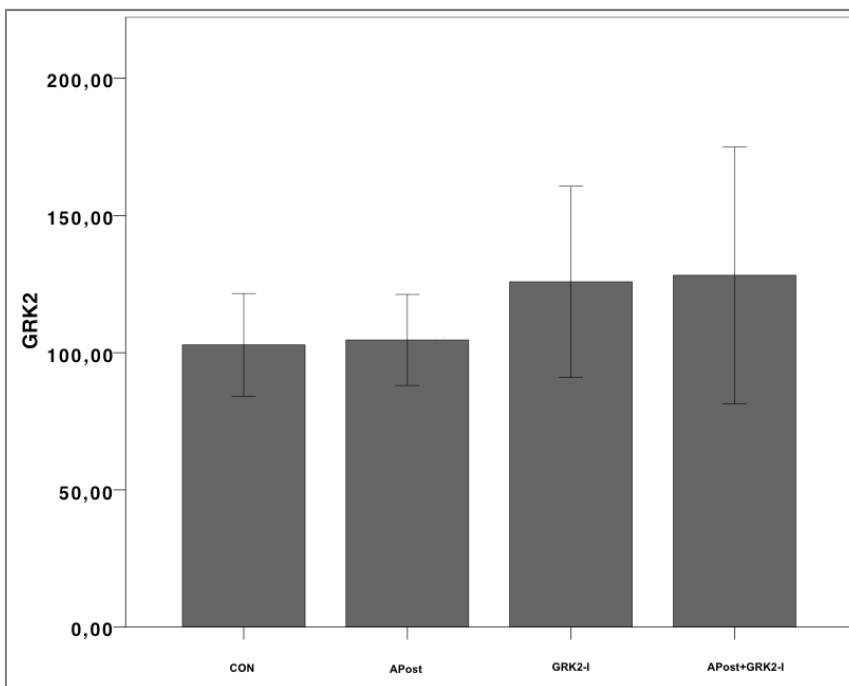
Die Western Blot Analyse des GRK2 Proteins zeigte zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 20: Western-Blot der GRK2**

Deskriptive Darstellung der Western-Blot Analysen nach der Belichtung. Die untere Proteinbande zeigt die Ladekontrolle, die mit GAPDH bestimmt wurden.

GRK2-I= GRK2-Inhibitor  $\beta$ ARK1, APost=Anästhetika induzierte Postkonditionierung mit Sevofluran (1,0 MAC), CON=Kontrollgruppe, GRK2=G-Protein-Rezeptorkinase-2.



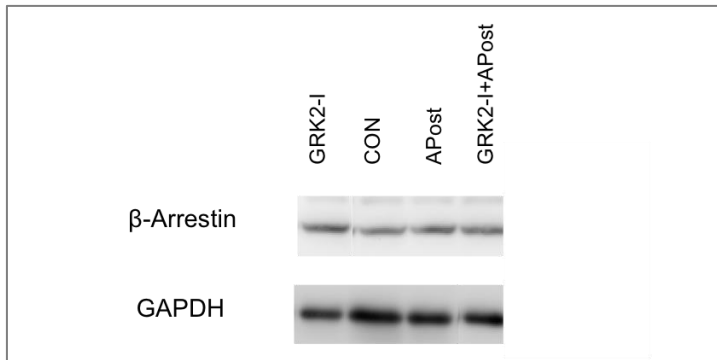
**Abb. 21: Statistische Auswertung der Western-Blot Analyse des GRK2**

In dem Diagramm sind die Mittelwerte und der jeweilige Standardfehler angegeben. Die Gruppengröße betrug  $n=5$ . Die densometrischen Auswertungen der Versuchsgruppe CON wurde als Referenzwert mit annähernd 100% angegeben (+/- SEM) und die übrigen Mittelwerte wurden anhand der CON-Gruppe verglichen.

GRK2-I= GRK2-Inhibitor  $\beta$ ARK1, APost=Anästhetika induzierte Postkonditionierung mit Sevofluran (1,0 MAC), CON=Kontrollgruppe, GRK2=G-Protein-Rezeptorkinase-2.

#### 5.2.4 $\beta$ -Arrestin

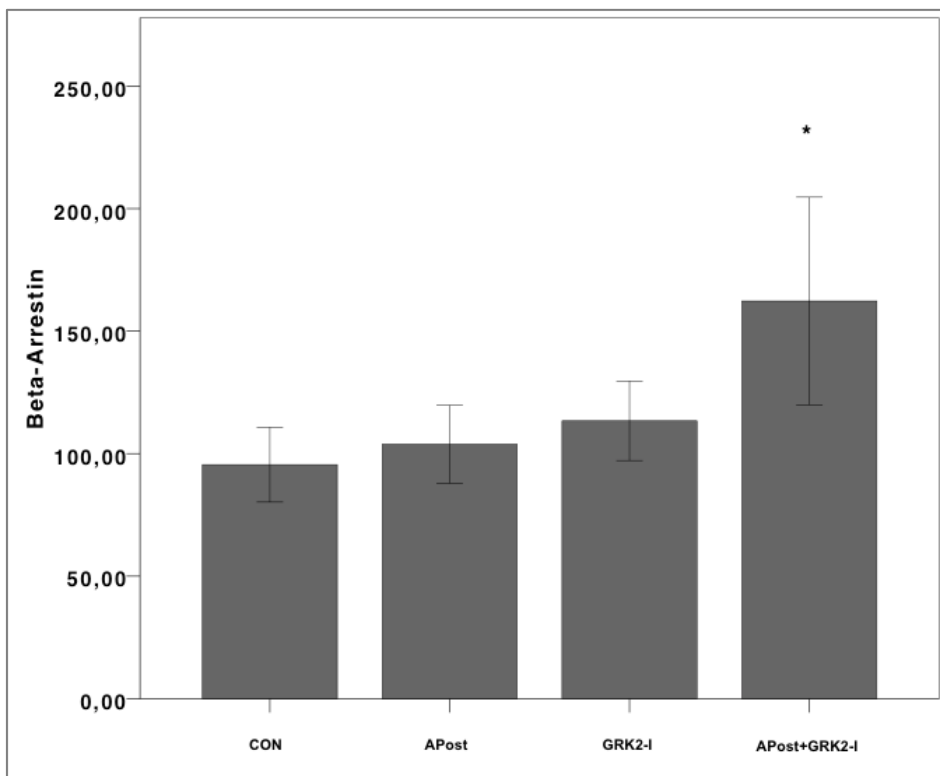
Die  $\beta$ -Arrestin Quantität war in den Gruppen mit Sevofluran- und GRK2-Inhibitor-Applikation annähernd gleichbleibend, gemessen an der Kontrollgruppe. Ein signifikanter Unterschied wurde lediglich in der Versuchsgruppe der APost+GRK2-I. beobachtet.



**Abb. 22: Western-Blot  $\beta$ -Arrestin**

Deskriptive Darstellung der Western-Blot Analysen nach der Belichtung. Die untere Proteinbande zeigt die Ladekontrolle, die mit GAPDH bestimmt wurden.

GRK2-I= GRK2-Inhibitor  $\beta$ ARK1, APost=Anästhetika induzierte Postkonditionierung mit Sevofluran (1,0 MAC), CON=Kontrollgruppe, GRK2=G-Protein-Rezeptorkinase-2.



**Abb. 23: Statistische Auswertung der Western-Blot Analyse des  $\beta$ -Arrestins**

In dem Diagramm sind die Mittelwerte und der jeweilige Standardfehler angegeben. Die Gruppengröße betrug  $n=5$ . Die densometrischen Auswertungen der Versuchsgruppe CON wurde als Referenzwert mit annähernd 100% angegeben ( $\pm$  SEM) und die übrigen Mittelwerte wurden anhand der CON-Gruppe verglichen. \* = Signifikant ( $p < 0,05$ ) verschieden von der Kontrollgruppe.

GRK2-I= GRK2-Inhibitor  $\beta$ ARK1, APost=Anästhetika induzierte Postkonditionierung mit Sevofluran (1,0 MAC), CON=Kontrollgruppe, GRK2=G-Protein-Rezeptorkinase-2.



## 6 Diskussion

Die führenden Todesursachen in Deutschland sind kardiale Ischämien, dazugehören die KHK (8,2% der männlichen und 8,3% der weiblichen Bevölkerung) und der akute Myokardinfarkt (7,0% der männlichen und 5,3% der weiblichen Bevölkerung) <sup>7</sup>. In den letzten Jahren konnten bereits Fortschritte in der Therapie der ischämischen Herzerkrankung verzeichnet werden. Der demographische Wandel, die Zunahme kardiovaskulärer Risikofaktoren in der Bevölkerung, wie das metabolische Syndrom und der arteriellen Hypertonie, stellen jedoch weiterhin große Herausforderung an die Forschung <sup>202</sup>. Mechanismen, die kardioprotektive Strategien induzieren (wie z.B. IPC, APC, IPost, APost) und mögliche therapeutische Ansätze bieten, sind aktuell Gegenstand der Forschung. Diese Arbeit bezieht sich auf die Kardioprotektion durch APost, ein Ansatz der sich in vielen experimentellen Studien bereits als wirkungsvoller Mechanismus der Kardioprotektion bewiesen hat <sup>94,136</sup>.

Durch die sichere und einfache Anwendbarkeit ist die Integration der APost in den klinischen Alltag in der perioperativen Versorgung nach kardialen Ereignissen denkbar. Bei Betrachtung sämtlicher Formen der Präkonditionierung lässt sich ein deutlicher Vorteil der APost aufzeigen: Der zeitliche Aspekt der APost und die gute Steuerbarkeit der volatilen Anästhetika erlaubt den behandelnden Anästhesisten zügig auf ischämische Ereignisse am Myokard während chirurgischer Eingriffe zu reagieren. So erfordert die IPost einen vorher definierten Zeitraum, eine entsprechende Umgebung und eine Operationsindikation (z.B. ACVB) für eine sichere protektive Wirkung. Die IPost lässt sich aufgrund der invasiven Handhabung schlechter und wesentlich unpräziser in den Klinikalltag integrieren <sup>34</sup>.

Die effektivste interventionelle Therapie einer Myokardischämie ist zur Zeit die leitlinien-gerechte Revaskularisation im Rahmen einer Koronarangiographie durch Stents oder Ballondilatationen <sup>203</sup>. Dabei wird das ischämische Areal reperfundiert, um die pathologischen Konsequenzen zu limitieren. Dieser Prozess induziert allerdings einen zusätzlichen myokardialen Schaden, sodass es im Verlauf zu Arrhythmien, linksventrikulärer Dysfunktion und weiteren Nekrosen als dessen Folge kommen kann <sup>74</sup>. Ein besseres Verständnis der grundlegenden molekularen Mechanismen der APost ist somit im Hinblick auf den Reperfusionsschaden von besonderer Bedeutung, da neben der frühen interventionellen Revaskularisation weitere Methoden zur Reduzierung der Folgen eines

ischämischen myokardialen Ereignisses etabliert werden sollten<sup>74</sup>. Hierbei lässt sich die Relevanz der Forschung zu dem Thema „Apost“ ableiten und unterstreicht die Bedeutung dieser Arbeit und der weiteren experimentellen und klinischen Entwicklung.

Die Rolle der Apost wurde bisher in-vitro in unterschiedlichen Modellen und Geweben untersucht. So konnten bereits Effekte in isolierten humanen Kardiomyozyten und zellulären Organellen<sup>204 205</sup> nachgewiesen werden. Die Ergebnisse in den klinischen Studien konnten diese Ergebnisse bisher nicht reproduzieren. Mögliche Erklärungen hierfür wurden bisher von verschiedenen Arbeitsgruppen postuliert:

Im klinischen Alltag, insbesondere bei kardiochirurgischen Eingriffen, ist die Applikation von Sevofluran oder Desfluran meist erste Wahl und beide Anästhetika werden über den gesamten perioperativen Zeitraum gegeben. Ein postkonditionierender Effekt lässt sich hierbei erschwert nachweisen, ein Verzicht der volatilen Anästhetika bei ebendiesen Risikopatienten ist jedoch aufgrund der oben genannten Eigenschaften selten. Soro et al. haben in ihrer 2012 publizierte Studie versucht, diesen Umstand zu umgehen und Sevofluran als Hypnotikum während der postoperativen Phase auf der Intensivstation bei Patienten nach kardiochirurgischen Eingriffen angewandt. Hierbei ließ sich kein verbesserter Outcome gegenüber der Kontrollgruppe feststellen<sup>206</sup>.

Landoni et al. konnten erstmals in ihrer 2007 publizierte Metaanalyse aufweisen, dass eine Allgemeinanästhesie bei kardiochirurgischen Operationen mit Desfluran oder Sevofluran einen kardioprotektiven Effekt hinsichtlich der Morbidität und Mortalität gegenüber TIVA's erzielt<sup>207</sup>, sodass sich die Frage nach den Gründen der uneinheitlichen Studienlage und den Hindernissen der Reproduzierbarkeit der Daten stellt.

Bolli et al. beschäftigen sich 2004 in ihrem Review mit ebendieser Problematik. So postulieren die Autoren, dass die bisher angewandte Methodik und folgende Aspekte ursächlich für den Umstand sind: a) das Fehlen standardisierter tierexperimenteller Versuchsprotokolle, b) uneinheitliche statistische Methoden der unterschiedlichen Arbeitsgruppen, c) das Fehlen von Randomisation und Verblindung in den Untersuchungen, d) Fehlen von Mortalitätsvergleichen zwischen den Versuchsgruppen, e) fehlende Miteinbeziehung der kollateralen Koronarversorgung insbesondere bei tierexperimentellen in-vivo Modellen in die Ergebnisse und eine f) nicht ausreichende Reperusions- und Überlebenszeit der Versuchstiere um die Endpunkte präzise und vergleichbar zu bestimmen<sup>34</sup>.

Kikuchi et al. halten in ihrem 2015 publizierte Review ebenfalls diverse Gründe für die schlechte Reproduzierbarkeit für möglich. So lassen sich im Gegensatz zu klinischen

Studiensettings Begleitumstände wie Vorerkrankungen, variable Operationsumstände und zeitliche Abfolgen bei experimentellen Versuchen limitieren und standardisieren <sup>208</sup>. Canfield et al. konnten an Stammzellen hyperglykämischer Patienten die Effekte der APC untersuchen und im experimentellen Umfeld den Umstand einer Begleiterkrankung miteinbeziehen. Ein solches Vorgehen ist ebenfalls zur weiteren Betrachtung der APost denkbar <sup>209</sup>. Ein genaues Verständnis der molekularen Abläufe im Rahmen der APost und deren Beeinflussung durch Mediatoren, wie Pharmakologika und Komorbiditäten könnte die klinischen Studien im Hinblick auf Ein- und Ausschlusskriterien, Studiengröße und die Etablierung fester Modelle konkretisieren und verbessern. Für die IPost hingegen konnten Staat et al. 2005 zeigen, dass die bisherigen Ergebnisse aus tierexperimentellen IPost Versuchen im klinischen Setting an Menschen reproduzierbar sind <sup>91</sup>.

Die genaue Kenntnis der molekularen Mechanismen der APost sind somit von Bedeutung, um Patienten, die kardial vorerkrankt sind, gezielt versorgen und diese präventiv behandeln zu können und insbesondere postischämisch das Outcome hinsichtlich der kardialen Funktion zu verbessern. Ohne ein sicheres Verständnis der molekularen Signalwege, die ursächlich für die Kardioprotektion ist, lässt sich eine translationale Integration der experimentellen Modelle in den klinischen Alltag nur bedingt durchführen.

In-Vivo Modelle im Rahmen tierexperimenteller Untersuchungen zeigten eine kardioprotektive Wirkung der APost bei Mäusen <sup>210</sup>, Kaninchen <sup>96</sup>, Hunden <sup>211</sup> und Schweinen <sup>212</sup>. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden durch Untersuchungen im Rahmen eines etablierten Ischämie/Reperusionsmodell gewonnen. Die Protokolle sind nicht nur international weit verbreitet, sondern werden auch seit vielen Jahren in der anästhesiologischen Grundlagenforschung eingesetzt <sup>82</sup>. In dieser Arbeit wurden die Versuche an Mäusen durchgeführt, die Protokolle sind ebenso für Kaninchen <sup>213</sup> und Ratte <sup>99</sup> etabliert.

Zur Stabilisierung der Körperkerntemperatur auf 37,0°C wurden die Versuchstiere auf einer Heizplatte operiert. Zudem wurde durch rasches Präparieren und stetes Zudecken der Operationsfelder während der einzelnen Schritte ein thermischer Wärmeverlust möglichst geringgehalten. Diese Maßnahmen wurden zur Reduzierung des hypothermischen Einflusses auf das Myokard durchgeführt. Ein weiterer Faktor, der die Resultate beeinflussen könnte, sind die verwendeten Pharmaka, die zu hämodynamischen Nebeneffekten führen können.

Die Blockade der GRK2 erfolgte durch  $\beta$ ARK1. Die GRK2 ist bei Aktivierung durch eine Zunahme der Inotropie, Dromotropie, Chronotropie und Bathmotropie charakterisiert.

Eine Inhibition dieser Effekte kann somit hämodynamische Effekte nach sich ziehen. Ein Vergleich der hämodynamischen Daten zeigte keine Unterschiede zwischen unseren Versuchsgruppen. So ist anzunehmen, dass die Resultate der Infarktgrößen und Proteinnengen auf die GRK2-Blockade und nicht auf die Hämodynamik zurückzuführen sind.

In einer Versuchsgruppe wurde H-89 verwendet, ein selektiver PKA-Inhibitor. Eine heterologe Desensibilisierung der GPCR ist so nur noch bedingt möglich und lässt annehmen, dass die fehlende Desensibilisierung der GRK2 ebenfalls eine Einflussgröße der Hämodynamik sein könnte. Da es, wie bereits beschrieben, keinen signifikanten Unterschied zwischen den hämodynamischen Auswertungen in unseren Versuchen gab, lässt sich ein beeinflussender Effekt von H-89 nicht nachweisen. Zudem ist die heterologe Desensibilisierung ein Prozess, der Stunden bis Tage dauert, sodass die Blockade aufgrund der Versuchsdauer keinen Einfluss auf die Hämodynamik nehmen konnte <sup>150,168</sup>.

Eine Infarktgrößenreduktion durch Sevofluran wurde bereits in vorangegangenen Studien publiziert <sup>214</sup>. In tierexperimentellen Versuchen ist diese Aussage oft und sicher belegt worden, allerdings fehlen bislang Studien in humanem Gewebe. Die in dieser Studie signifikante Reduktion der Herzinfarktgröße nach Sevofluranapplikation bestätigt vorangegangene Ergebnisse in der Maus <sup>46</sup>, im Kaninchen <sup>50</sup> und in der Ratte <sup>215</sup> zu der APost. Die 15-minütige Gabe von Sevofluran im direkten Anschluss an die Koronarokklusion verringert das Ausmaß des nekrotischen Areals und ist demnach auch bei Risikopatienten während Operationsereignissen denkbar, bedarf jedoch weiterer Studien, die einen klinischen Nutzen belegen. Unsere Arbeitsgruppe konnte in einer früheren Studie ähnliche Resultate mit Desfluran erzielen, der einzige Unterschied war das verwendete volatile Anästhetikum <sup>126</sup>. Da Piriou et al. jedoch zeigen konnten, dass Sevofluran, Isofluran, Desfluran und Halothan ähnliche konditionierende Eigenschaften haben, sind die Ergebnisse der früheren Studie zu dieser Arbeit vergleichbar <sup>45</sup>. Während im Rahmen der Präkonditionierung die Wahl des volatilen Anästhetikums eine Rolle hinsichtlich der Reduktion der Herzinfarktgröße spielt, sind die Effekte bei der Postkonditionierung vergleichbar. Dies konnte 2009 in einer Studie von Redel et al. im Mausmodell gezeigt werden <sup>46</sup>.

Die intraperitoneale Gabe des GRK2- Inhibitors  $\beta$ ARK1<sub>ct</sub> während der CAO resultiert ebenfalls in einer Reduzierung der Infarktgröße. Somit bestätigt sich die vorangegangene Hypothese, dass die GRK2-Inhibition vergleichbare Effekte zu der APost erzielt. Ähnliche Studien gibt es aktuell nicht, allerdings ist die GRK2 Blockade in Bezug auf Herzinsuffizienz gründlicher untersucht worden. Bereits 1995 zeigten Koch et al., dass transgene Mäuse mit einer  $\beta$ ARK1-Überexpression eine verbesserte myokardiale

Kontraktilität nach Isoproterenol-induzierter Herzinsuffizienz zeigten<sup>216</sup>. Ähnliche Ergebnisse publizierten 2002 Raake et al.: GRK2 ablatierte Mäuse zeigten nach Herzinfarkt ein erhöhtes Gesamtüberleben, eine verbesserte kardiale Pumpfunktion und ein reduziertes ventrikuläres Remodeling<sup>195</sup>. Harding et al. beziehen zudem den Umstand der leitliniengerechten  $\beta$ -Blocker-Therapie bei herzinsuffizienten Patienten in deren Versuche mit ein und können 2001 zeigen, dass eine  $\beta$ ARK1 –Überexpression und eine zeitgleiche  $\beta$ -Blocker-Therapie sogar synergistische Effekte zeigt<sup>198</sup>. Diese Studien belegen das Potential der kardioprotektiven Effekte der GRK2-Inhibition. Mit unseren Resultaten konnten wir zeigen, dass es zu vergleichbaren Ergebnissen in Ischämie/Reperfusionmodellen kommt, sodass eine weitere Betrachtung hinsichtlich Komedikationen und synergistischer Effekte herangezogen werden sollte. Ein möglicher additiver Effekt der GRK-2 Blockade und APost in Bezug auf die IS-Reduktion wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Um ein besseres Verständnis der genauen Regulierung der GRK2 im Hinblick auf die homologe Desensibilisierung und die indirekte Hemmung zu erlangen, ist eine konsekutive oder gleichzeitige Gabe von  $\beta$ ARK1 und Sevofluran somit für Folgestudien denkbar.

Die Annahme, dass eine Blockierung der PKA durch die intraperitoneale Gabe von H-89 zum Ende der CAO einen Einfluss auf die Herzinfarktgröße hat, konnte nicht belegt werden. Die endgültige Herzinfarktgröße wurde hierdurch nicht signifikant verändert. Die durchschnittlichen Größen stiegen im Vergleich zu den übrigen Versuchsgruppen geringfügig an.

Die heterologe Desensibilisierung durch die PKA wird calciumabhängig über cAMP und die PKC stimuliert und ist anders als die homologe Desensibilisierung nicht von einer hohen Agonistenbindung abhängig<sup>156</sup>, sondern unter anderem von der intrazellulären Akkumulation von cAMP. Die Myokardischämie ist assoziiert mit einer erhöhten cAMP-Produktion und einer konsekutiven PKA-Aktivierung<sup>217</sup>. Phosphoryliert die PKA mitochondriale  $K_{Ca^{2+}}$ -Kanäle, kommt es hierbei zu einer Aktivierung<sup>218</sup>. Eine Annahme ist, dass die Blockade der PKA durch die Gabe von H-89 kurz nach der Ischämie die IS reduziert, da es zu einer Phosphorylierung und damit heterologen Desensibilisierung der  $G_s$  kommt. Dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht gezeigt werden. Andere Daten aus unserer Arbeitsgruppe, die im Rahmen der APost erhoben wurden zeigten eine signifikante Reduktion der IS nach der Gabe von H-89<sup>50</sup>. Diese Diskrepanz bedarf weiterer Studien, da weitere Daten hinsichtlich der PKA-Blockade im APost-Modell fehlen. Andere Ergebnisse hinsichtlich der PKA-Blockade konnte unsere Arbeitsgruppe bereits in

einer vorherigen Arbeit im Rahmen der APC zeigen. Hierbei kam es zu keiner signifikanten Veränderung der IS <sup>71</sup>.

Makaula et al. haben ebenfalls in einem Ischämie/Reperusionsmodell in isolierten Myokardzellen der Ratte den Einfluss des PKA-vermittelten Signaltransduktionsweges untersucht. Hierbei wurde H-89 im Rahmen einer IPC appliziert und eine Reduktion der IS konnte beobachtet werden <sup>219</sup>. Unsere Ergebnisse stehen hierzu im Widerspruch: In der Arbeit von Makaula et al. kam es einerseits nach alleiniger H-89 Gabe zu einer signifikanten IS-Reduktion, jedoch auch nach Forskolingabe. Forskolin ist ein Aktivator der Adenylylcyclase. Diese Aktivierung führt zu einer Erhöhung von cAMP und der PKA. Dass die Herzinfarktgröße sowohl bei erhöhter und erniedrigter PKA-Aktivität reduziert wird, spricht für einen paradoxen Einfluss der PKA auf die Reduktion der IS. Zudem besteht die Annahme, dass die kardioprotektiven Effekte nicht allein auf die PKA zurückzuführen sind. In der 2005 publizierte Arbeit diskutieren die Autoren daher eine mögliche Beteiligung eines Signalwegs, der cAMP-vermittelt über das Rezeptorprotein Epac abläuft <sup>220</sup>. Eine weitere Arbeit, die einen Einfluss der PKA im Rahmen der Präkonditionierung untersucht hat, bezieht sich auf die Morphin-induzierte Präkonditionierung im Ischämie/Reperusionsmodell der Ratte. Eine signifikante Reduktion der IS nach H-89 Applikation konnte nicht erreicht werden, es zeigte sich die Aufhebung des kardioprotektiven Effektes im Zusammenhang einer Morphin-induzierten Präkonditionierung <sup>221</sup>. In dieser Arbeit konnte lediglich ein teilweiser Einfluss der PKA auf die konditionierenden Effekte gezeigt werden. Im Unterschied zu unserem APost-Modell haben die genannten Arbeiten jeweils den Einfluss von H-89 in einem Präkonditionierungsmodell untersucht. Für ein genaueres Verständnis unserer Daten bedarf es weiterer Untersuchungen. Möglich wäre die Messung der Enzymaktivität der PKA nach H-89-Applikation um die Infarktgrößen auch in Hinblick auf die jeweilige Änderung der Enzymkonzentration zu beurteilen. Um ein besseres Verständnis hinsichtlich der molekularen Abläufe der heterologen Desensibilisierung der PKA nach APost zu erlangen, ergab sich im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit einer weiteren molekularbiologischen Aufarbeitung des Myokards. Antikörper für eine Western-Blot-Analyse der PKA-Phosphorylierungsstelle Ser256 wurden uns aus den USA in unterschiedlichen Konzentrationen bereitgestellt. Trotz intensiver schrittweiser Modifizierung des Western-Blot-Protokolls und Ausschluss methodischer Fehler gelang es uns nicht, die Phosphorylierungsstellen semiquantitativ zu erfassen. Ein Ansatzpunkt für Folgestudien wäre die Detektion und Messung von Phospholamban anstelle von Ser256. Bereits 1994 konnte gezeigt werden, dass die cAMP-vermittelte Phosphorylierung der PKA über die Detektion von Phospholamban abgebildet werden kann <sup>222</sup>.

Eine weitere mögliche Limitation der Betrachtung der IS-Größen nach H-89-Gabe ist die Reperfusionzeit in dem hiesigen Protokoll von 180 Minuten. Um eine vollständige heterologe Desensibilisierung und eine darauffolgende signifikante Verkleinerung des Nekroseareals messen zu können, wäre eine deutlich längere Reperfusionzeit im Mausmodell in Folgestudien unabdingbar.

Die makroskopischen Untersuchungen bestätigten die vorher angenommene Hypothese, dass die GRK2 vergleichbare Effekte zu der APost aufweist. Die molekularen Veränderungen wurden hierbei mit einem Western-Immunoblotverfahren untersucht und die zu betrachtenden Proteine semiquantitativ gemessen.

Der ADRB1 ist aus der Familie der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren der myokardial funktionell Bedeutsamste, da dieser eine Steigerung der Inotropie, der Chronotropie, der Dromotropie, der Bathmotropie und der Apoptose vermittelt <sup>223</sup>. Der Proteingehalt des ADRB1 wurde in den jeweiligen Versuchsgruppen verglichen, die Unterschiede waren hierbei nicht signifikant. Annähernd gleiche Auswertungen fanden sich zwischen der Kontroll- und der APost-Gruppe. In den anderen Gruppen steigt der ADRB1-Gehalt an, ist allerdings nicht signifikant erhöht. Die ausbleibende Wirkung der APost und  $\beta$ ARK1 auf die Quantität des ADRB1 spricht für eine isolierte Desensibilisierung der GPCR, die unabhängig der Agonistenbindungsstellen verlaufen. Da die IS bei Sevoflurangabe, aber auch bei GRK2-Inhibitor Gabe signifikant reduziert werden konnte, der ADRB1 im Western-Blot Verfahren jedoch keine Veränderung hinsichtlich der Proteinmenge zeigt, scheint die GRK2-vermittelte Kardioprotektion die Expression des ADRB1 nicht zu vermindern. Diese Erkenntnis können vorangegangene Studien nicht bestätigen: Ein Herzinfarkt, wie in der CON-Gruppe induziert, führt zu einer erhöhten Konzentration an Katecholaminen an den Bindungsstellen der  $\beta$ -AR <sup>224</sup>. Eine mögliche Limitation der Aussagekraft dieser Western-Blot Ergebnisse könnte das Fehlen einer Gruppe ohne Intervention sein, da die Blockade der jeweiligen Proteine in unseren Versuchen im zeitlichen Ablauf der Signalkaskade nach Agonisten-Rezeptorbindung stattgefunden hat. Eine weitere Möglichkeit für die fehlenden Schwankungen der ADRB1-Quantitäten zwischen den Versuchsgruppen kann das Vorliegen des Sphingosine-1-Phosphatrezeptors (S1PR1) sein: Cannavo et al. zeigten 2013, dass ein Fehlen einer ADRB1-Expression durch den S1PR1 kompensiert werden kann: Humane embryonale Nierenzellen zeigten sowohl eine Überexpression von ADRB1 und S1PR1. Daraufhin wurde eine Herunterregulierung von ADRB1 gemessen, allerdings keine Veränderung der Zellenfunktion. Diese Studie sollte kritisch im Kontext zu unseren Versuchen hinsichtlich Spezies und Modell

gesehen werden, zeigt aber, dass eine weitere Erklärung unserer molekularbiologischen Resultate in Betracht gezogen werden sollte, insbesondere bei der Betrachtung einer gemeinsamen Schnittstelle: die Regulierung beider Rezeptoren durch die GRK2 <sup>225</sup>.

Andere Studien haben jedoch bisher gezeigt, dass die ADRB1-Expression eine Rolle in der funktionellen kardialen Rehabilitation spielt. Allerdings bleibt anzumerken, dass hierbei vorrangig genetische ADRB1-Polymorphismen untersucht wurden <sup>226 227</sup>.

Die Proteinmenge des ADRB2 ist in der APost und der GRK2-Inhibitor-Versuchsgruppe nicht signifikant verändert. Das Ergebnis in der APost+GRK2-I.-Gruppe ist signifikant erhöht. Der additive Effekt der beiden kardioprotektiven Substanzen könnte eine mögliche Erklärung für diese Veränderung sein, da die Menge an freien Agonistenbindungsstellen akkumuliert und nicht von der Desensibilisierung betroffen ist.

Vergleichbare Studien oder Resultate sind aktuell nicht publiziert, allerdings zeigen transgene Mäuse mit einer  $\beta$ 2-AR Überexpression ein verbessertes kardiales Outcome nach einem Herzinfarkt gegenüber den Wildtyp- Mäusen, bezugnehmend auf die linksventrikuläre Pumpfunktion <sup>228</sup>.

Salazar et al. zeigten eine Regulation durch alleinige GRK2-Inhibition auf den antiapoptotischen und prokontraktilen ADRB2, allerdings in einem anderen Versuchssetting, zwar ebenfalls in Mäusen, allerdings durch ein Knockout-Modell. Die ADRB2 war in Folge der alleinigen GRK2 Inhibition erhöht, in unseren Versuchen jedoch nur in Addition mit der APost <sup>229</sup>. Diese Studie bestätigt vorangegangene Ergebnisse einer Arbeit von Brinks et al. <sup>193</sup>.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in einer vorangegangenen Publikation die Beeinflussung der APost auf die ADRB zeigen, da eine Esmolol Gabe nicht zu einer IS-Reduzierung führte. Dieser Aspekt ist insbesondere bei Patienten mit dauerhaften  $\beta$ -Blocker-Therapien zu beachten <sup>50</sup>.

Zwischen den Messungen der Quantitäten hinsichtlich der GRK2-Expression waren keine signifikanten Unterschiede sichtbar. Auch nach Gabe des GRK2-Inhibitors liessen sich keine relevanten Unterschiede im Gegensatz zur Kontrollgruppe feststellen.

Die Protokolle der Western-Blots sahen alle eine Reperusionszeit von 15 Minuten vor. Die fehlende Veränderung und Reduktion der Proteinmengen insbesondere der ADRB's und der GRK2 nach  $\beta$ ARK1-Applikation scheinen im Vorgang der homologen Desensibilisierung der GPCR's erst später betroffen zu sein. Eine vergleichbare Studie mit einer



Organentnahme nach 180 Minuten und Messung der Proteine könnte die Frage beantworten, ob die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren tatsächlich nicht von der homologen Desensibilisierung betroffen sind oder ob die Proteinmenge sich erst zu einem späteren Zeitpunkt anpasst.

Die signifikante Erhöhung des  $\beta$ -Arrestins in der APost+GRK2-Inhibitor-Versuchsgruppe verdeutlicht die Rolle des  $\beta$ -Arrestins in der Desensibilisierung der GPCR's. Bei einzelnen Gaben des volatilen Anästhetikums oder des GRK2-Inhibitors lassen sich noch keine quantitativen Veränderungen bestimmen. Da  $\beta$ -Arrestin eine herausragende Rolle in der homologen Desensibilisierung spielt und intrazellulär die Interaktion zwischen GRK und G-Protein verhindert, kann der  $\beta$ -Arrestin-Anstieg als früher Indikator der GRK2-Inhibition betrachtet werden.

Um die genau Rolle der GRK2 in der APost darzustellen, bedarf es weiterer Studien hinsichtlich der Enzymaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten der Reperfusion und weiterer Western-Immunoblots zu den jeweiligen Phosphorylierungsstellen der GRK2 und der ADRB1/2. Im Rahmen dieser Studie wurden bereits versucht Phosphorylierungsstellen der GRK2 und der ADRB's quantitativ zu erfassen, jedoch konnte trotz intensiver Bemühungen und variierender Antikörper kein adäquates Ergebnis erzielt werden. Dies beruhte vermutlich auf technischen Gründen. So konnten der adäquate Transport und eine fachgerechte Lagerung der Antikörper nicht sichergestellt werden, da logistische Probleme seitens des Zolls eine genaue Kontrolle darüber verhinderten. Ein weiterer methodischer Aspekt ist sicherlich die unzureichende Kenntnis der benötigten Antikörperkonzentrationen, die bisher nicht beschrieben wurden und in repetitiven Versuchsreihen nicht etabliert werden konnten.

Mit dem Western-Blot lassen sich semiquantitative Proteinmengen bestimmen, die Aktivität der Rezeptoren und dessen Phosphorylierungsstellen lassen sich somit mit einem Enzymaktivitätsassay präziser bestimmen. Eine Hinzuziehung dieser Methode wäre für eine weiterführende Betrachtung der Frage inwieweit die GRK2 durch die APost beeinflusst wird, denkbar.

Eine weitere Möglichkeit der molekularbiologischen Untersuchung der GRK-Desensibilisierung stellt die PKA- und Phospholamban-Proteinmenge und deren Phosphorylierungsstellen dar. Eine Stimulierung der myokardialen ADRB resultiert in einer PKA-vermittelten Phosphorylierung Phospholambans über Gs-Proteine, die Hemmung des Calcium Einstroms wird verhindert und die Herzmuskelzelle relaxiert entsprechend

schneller. Da die PKA auch eine Rolle in der heterologen Desensibilisierung der GRK spielt, ist eine weitere molekularbiologische Betrachtung im Rahmen der APost-Organentnahmeprotokolle angezeigt.

Die signifikante IS-Reduktion der GRK2-Inhibitor-Versuchsgruppe in den makroskopischen Untersuchungen konnte sich in den Western Blot Experimenten nicht als verminderte GRK2-Proteinmenge beschreiben lassen. Die kurze Reperfusionzeit von 15 Minuten scheint zu kurz, um die IS-Ergebnisse bestätigen zu können. Obwohl die homologe Desensibilisierung innerhalb von Sekunden abläuft, scheinen die Auswirkungen auf das Proteingehalt mit den transkriptionellen Veränderungen einherzugehen, die mehrere Stunden andauern können <sup>150 230</sup>.

Neben der hier untersuchten GRK2 wurde bereits eine Beteiligung der Isoformen GRK3 und 5 im ischämie-adaptierten Myokard beschrieben. Die Desensibilisierung der GRK5 hat ähnliche Effekte auf die ADRB1/2 wie die GRK2, allerdings unterscheidet sich die jeweilige Dauer erheblich. Die GRK2 reguliert sich innerhalb von Sekunden und spricht unmittelbar auf akute Rezeptorstimulation an und deutliche Veränderungen in der Expression lassen sich bereits 30 Minuten postischämisch nachweisen. Die GRK5 wird hingegen nur sehr langsam reguliert und die einmal erhöhte Proteinexpression nach Ischämie unterliegt geringeren Veränderungen <sup>231,232 199</sup>.

Woodall et al. konnten zeigen, dass auch eine Inhibierung der GRK2 in kardialen Fibroblasten zu einer reduzierten IS und einer verbesserten EF in einem Ischämie-Reperusionsmodell führt <sup>196</sup>. Ferner publizierten Powell et al., dass sich sowohl die myokardiale Kontraktilität, die EF als auch die linksventrikuläre Funktion nach Paroxetingabe signifikant in insuffizienten Mäuseherzen verbesserte. Paroxetin, ein selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer fungiert dabei als direkter GRK2-Inhibitor. So wäre eine klinische Studie mit Patienten unter Paroxetin-Dauertherapie hinsichtlich ihrer kardiologischen Morbidität denkbar <sup>233</sup>.

GRK2 wird folglich durch APost modifiziert und gehemmt, eine genauere Betrachtung wird allerdings erst durch weitere Studien mit längeren Reperfusionzeiten möglich sein.

Die Resultate dieser Arbeit müssen unter Berücksichtigung limitierender Faktoren betrachtet werden. Den volatilen Anästhetika wird sowohl ein reduzierender Effekt des Herzzeitvolumens als auch eine verringernde Wirkung auf den koronaren Gefäßwiderstand zugeschrieben. Da eine direkte Messung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs in dem o.g. Protokoll nicht vorgesehen ist, ist die verbesserte O<sub>2</sub>-Bilanz ebenfalls durch

die pharmakologische Eigenschaft des Sevoflurans möglich. Verglichen mit anderen volatilen Anästhetika sind jene Effekte bei Sevofluran gering ausgeprägt. Zudem zeigten die hämodynamischen Parameter in den APost-Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen.

Zudem muss die Infarktgröße in Relation der AAR betrachtet werden, da diese laut Ytrehus et al. von der Größe des ischämischen Areals (AAR) abhängt <sup>234</sup>. Da in dieser Studie kein signifikanter Unterschied zwischen den Größen der AAR in den jeweiligen Versuchsgruppen beobachtet wurde, ist eine Beeinflussung der AAR auf die zu vergleichenden IS-Areale unwahrscheinlich.

Ein weiterer Faktor, der die Resultate beeinflussen kann, ist der bereits oben genannte koronare Kollateralblutfluss <sup>34</sup>. Eine Messung dieser Einflussgröße wurde in unseren Versuchen nicht direkt gemessen. Eine Arbeit von Maxwell et al. zeigte allerdings, dass kleine Nagetiere nur über einen minimalen kollateralen koronaren Blutfluss verfügen. Somit ist diese Einflussgröße in Bezug auf die Herzinfarktgröße in unseren Versuchen vernachlässigbar <sup>235</sup>.

Die weiterführende Beobachtung der Rolle der GRK2 hinsichtlich der Kardioprotektion ist demnach bedeutsam. Wie bereits beschrieben konnte in früheren Studien die Relevanz der GRK2 bei Herzinsuffizienz belegt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen lediglich die Schlussfolgerung zu, dass der GRK2 auch eine Bedeutung in der kardialen Forschung bezüglich Infarktereignissen zugesprochen werden sollte.



## 7 Zusammenfassung

Kardiale Ischämien sind die häufigste Todesursache in Deutschland. Aufgrund bisheriger Fortschritte in der Therapie und Entwicklung neuer präventiver Prozesse, gewinnen die Erkenntnisse kardioprotektiver Strategien zunehmend an Bedeutung und gelangen in den Mittelpunkt gegenwärtiger Forschung. Der Ablauf molekularer Vorgänge und die subzellulären Veränderungen im Rahmen der APost könnten zu einem möglichen Erklärungsansatz beitragen. Die APost wurde im Tiermodell bisher in diversen Spezies gezeigt und konnte experimentell etabliert werden. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob die Veränderungen der GRK2 auf molekularer Ebene einer der Gründe für den kardioprotektiven Mechanismus der APost sein könnte. Die GRK2 ist eine myokardspezifische Kinase, die bereits im Rahmen von Herzinsuffizienzmodellen mit kardioprotektiven Eigenschaften in Zusammenhang gebracht worden ist. Ob die GRK2 ebenfalls im Ischämie/Reperusionsmodell den letalen Reperfusionsschaden und die Infarktgröße beeinflusst, wird in dieser Arbeit in-vivo untersucht.

Zusammenfassend lassen sich aus dieser Studie folgende Erkenntnisse gewinnen:

- Die Infarktgröße lässt sich durch Applikation von Sevofluran signifikant senken.
- Die medikamentöse GRK2-Inhibition resultiert in einer signifikant verkleinerten Infarktgröße.
- Der Proteingehalt von ADRB2 steigt signifikant an bei Applikation von Sevofluran zusammen mit dem GRK2-Inhibitor  $\beta$ ARK1.
- Der Proteingehalt von b-Arrestin steigt signifikant an bei Applikation von Sevofluran zusammen mit dem GRK2-Inhibitor  $\beta$ ARK1.

Diese Daten im Ischämie/Reperusionsmodell zu reproduzieren und translational weiterzuentwickeln, sollte ein fokussiertes Ziel der Grundlagenforschung und Organprotektion werden, da unter Berücksichtigung des demographischen Wandels und der Lebenszeitprävalenzen zu KHK und Herzinfarkten ein gezieltes pharmakologisches Target im Fokus stehen sollte.



## 8 Literaturverzeichnis

1. Lindenauer PK, Pekow P, Wang K, Mamidi DK, Gutierrez B, Benjamin EM. Perioperative beta-blocker therapy and mortality after major noncardiac surgery. *N Engl J Med*. 2005;353(4):349-361.
2. Cesarovic N, Nicholls F, Rettich A, et al. Isoflurane and sevoflurane provide equally effective anaesthesia in laboratory mice. *Lab Anim*. 2010;44(4):329-336.
3. Jehle T, Feuerstein TJ, Lagrèze WA. [The effect of gabapentin and gabapentin-lactam on retinal ganglion cell survival. Situation after acute retinal ischemia in animal models]. *Ophthalmologe*. 2001;98(3):237-241.
4. Zarbock A, Schmidt C, Van Aken H, et al. Effect of remote ischemic preconditioning on kidney injury among high-risk patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2015;313(21):2133-2141.
5. Boyko VV, Pisetska ME, Tyshchenko OM, et al. Role of ischemic preconditioning in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014;3(4):179-184.
6. Lu GW, Shao G. Hypoxic preconditioning: effect, mechanism and clinical implication (Part 1). *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2014;30(6):489-501.
7. Institut RK. Koronare Herzkrankheit. Faktenblatt zu GEDA 2012: Ergebnisse der Studie »Gesundheit in Deutschland aktuell 2012«. RKI, Berlin. *GEDA*. 2012:1-4.
8. Welte M, Groh J, Peter K. Der kardiale Risikopatient aus anästhesiologischer Sicht. In: Hobbhahn J, Conzen P, Peter K, Taeger K, eds. *Der kardiale Risikopatient in der operativen Medizin*. Vol 222. Springer Berlin Heidelberg; 1992:1-19.
9. Hertzner NR, Beven EG, Young JR, et al. Coronary artery disease in peripheral vascular patients. A classification of 1000 coronary angiograms and results of surgical management. *Ann Surg*. 1984;199(2):223-233.
10. Mangano DT. Perioperative cardiac morbidity. *Anesthesiology*. 1990;72(1):153-184.
11. Butte N, Böttiger BW, Teschendorf P. [Perioperative cardioprotection. Golden standard beta-blockade?]. *Anaesthesist*. 2007;56(3):285-296; quiz 297-288.
12. Sloth AD, Schmidt MR, Munk K, et al. *Improved long-term clinical outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing remote ischaemic conditioning as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention*. 2013.

13. Thielmann M, Kottenberg E, Kleinbongard P, et al. Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet*. 2013;382(9892):597-604.
14. Remote Preconditioning Trialists G, Healy DA, Khan WA, et al. Remote preconditioning and major clinical complications following adult cardiovascular surgery: systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2014;176(1):20-31.
15. Meybohm P, Bein B, Brosteanu O, et al. A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N Engl J Med*. 2015;373(15):1397-1407.
16. Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circulation research*. 1996;78(6):1100-1104.
17. Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circulation research*. 2000;87(11):972-983.
18. Suzuki K, Miura T, Miki T, Tsuchida A, Shimamoto K. Infarct-size limitation by preconditioning is enhanced by dipyridamole administered before but not after preconditioning: evidence for the role of interstitial adenosine level during preconditioning as a primary determinant of cardioprotection. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;31(1):1-9.
19. 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*. 1991;84(1):350-356.
20. Niwano S, Hirasawa S, Niwano H, et al. Cardioprotective effects of sarcolemmal and mitochondrial K-ATP channel openers in an experimental model of autoimmune myocarditis. Role of the reduction in calcium overload during acute heart failure. *Int Heart J*. 2012;53(2):139-145.
21. Reffelmann T, Schwarz ER, Skobel CE, Petek O, Hanrath P. [Ischemic preconditioning. Does this animal experiment phenomenon have clinical relevance?]. *Med Klin (Munich)*. 2000;95(10):559-567.
22. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-1136.
23. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation*. 2001;104(24):2981-2989.
24. Belhomme D, Peynet J, Louzy M, Launay JM, Kitakaze M, Menasche P. Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery. *Circulation*. 1999;100(19 Suppl):II340-344.
25. Shome S, Lux RL, Punske BB, MacLeod RS. Ischemic preconditioning protects against arrhythmogenesis through maintenance of both active as well as passive electrical properties in ischemic canine hearts. *J Electrocardiol*. 2007;40(6 Suppl):S150-159.



26. Reiter R, Henry TD, Traverse JH. Preinfarction angina reduces infarct size in ST-elevation myocardial infarction treated with percutaneous coronary intervention. *Circ Cardiovasc Interv.* 2013;6(1):52-58.
27. Laskey WK, Beach D. Frequency and clinical significance of ischemic preconditioning during percutaneous coronary intervention. *Journal of the American College of Cardiology.* 2003;42(6):998-1003.
28. Hausenloy DJ, Yellon DM. The second window of preconditioning (SWOP) where are we now? *Cardiovasc Drugs Ther.* 2010;24(3):235-254.
29. Baxter GF, Goma FM, Yellon DM. Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res Cardiol.* 1997;92(3):159-167.
30. Marber MS, Yellon DM. Myocardial adaptation, stress proteins, and the second window of protection. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;793:123-141.
31. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circulation research.* 1993;72(6):1293-1299.
32. Kretz F-JT, Frank. *Anästhesie und Intensivmedizin.* 2006
33. Smul TM, Redel A, Stumpner J, et al. Time course of desflurane-induced preconditioning in rabbits. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2010;24(1):91-98.
34. Bolli R, Becker L, Gross G, et al. Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy. *Circulation research.* 2004;95(2):125-134.
35. De Hert SG, Cromheecke S, ten Broecke PW, et al. Effects of propofol, desflurane, and sevoflurane on recovery of myocardial function after coronary surgery in elderly high-risk patients. *Anesthesiology.* 2003;99(2):314-323.
36. De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, et al. Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. *Anesthesiology.* 2004;101(2):299-310.
37. Garcia C, Julier K, Bestmann L, et al. Preconditioning with sevoflurane decreases PECAM-1 expression and improves one-year cardiovascular outcome in coronary artery bypass graft surgery. *Br J Anaesth.* 2005;94(2):159-165.
38. Zhou C, Liu Y, Yao Y, et al. beta-blockers and volatile anesthetics may attenuate cardioprotection by remote preconditioning in adult cardiac surgery: a meta-analysis of 15 randomized trials. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2013;27(2):305-311.
39. Warttier DC, al-Wathiqui MH, Kampine JP, Schmeling WT. Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane. *Anesthesiology.* 1988;69(4):552-565.

40. Cason BA, Shubayev I, Hickey RF. Blockade of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels eliminates isoflurane-induced coronary artery vasodilation. *Anesthesiology*. 1994;81(5):1245-1255; discussion 1227A-1228A.
41. Larach DR, Schuler HG. Potassium channel blockade and halothane vasodilation in conducting and resistance coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993;267(1):72-81.
42. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology*. 1997;87(2):361-370.
43. Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology*. 1997;87(5):1182-1190.
44. Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, Downey JM. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology*. 1997;86(3):699-709.
45. Piriou V, Chiari P, Lhuillier F, et al. Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium. *Br J Anaesth*. 2002;89(3):486-491.
46. Redel A, Stumpner J, Tischer-Zeitz T, et al. Comparison of isoflurane-, sevoflurane-, and desflurane-induced pre- and postconditioning against myocardial infarction in mice in vivo. *Experimental biology and medicine*. 2009;234(10):1186-1191.
47. van Ackern K, Vetter HO, Bruckner UB, Madler C, Mittman U, Peter K. Effects of enflurane on myocardial ischaemia in the dog. *Br J Anaesth*. 1985;57(5):497-504.
48. Coetzee A, Skein W, Genade S, Lochner A. Enflurane and isoflurane reduce reperfusion dysfunction in the isolated rat heart. *Anesth Analg*. 1993;76(3):602-608.
49. Kehl F, Krolikowski JG, Mraovic B, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. Is isoflurane-induced preconditioning dose related? *Anesthesiology*. 2002;96(3):675-680.
50. Lange M, Redel A, Lotz C, et al. Desflurane-induced postconditioning is mediated by beta-adrenergic signaling: role of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors, protein kinase A, and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Anesthesiology*. 2009;110(3):516-528.
51. Tanaka K, Ludwig LM, Krolikowski JG, et al. Isoflurane produces delayed preconditioning against myocardial ischemia and reperfusion injury: role of cyclooxygenase-2. *Anesthesiology*. 2004;100(3):525-531.

52. Baxter GF, Yellon DM. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels mediate the delayed cardioprotective effect of adenosine A<sub>1</sub> receptor activation. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(5):981-989.
53. Takano H, Bolli R, Black RG, Jr., et al. A<sub>1</sub>(1) or A<sub>3</sub>(3) adenosine receptors induce late preconditioning against infarction in conscious rabbits by different mechanisms. *Circulation research.* 2001;88(5):520-528.
54. Eckle T, Krahn T, Grenz A, et al. Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A<sub>2B</sub> adenosine receptors. *Circulation.* 2007;115(12):1581-1590.
55. Kositprapa C, Ockaili RA, Kukreja RC. Bradykinin B<sub>2</sub> receptor is involved in the late phase of preconditioning in rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(7):1355-1362.
56. Fryer RM, Hsu AK, Eells JT, Nagase H, Gross GJ. Opioid-induced second window of cardioprotection: potential role of mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels. *Circulation research.* 1999;84(7):846-851.
57. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* 2003;83(4):1113-1151.
58. Liu Y, Ren G, O'Rourke B, Marban E, Seharaseyon J. Pharmacological comparison of native mitochondrial K<sub>(ATP)</sub> channels with molecularly defined surface K<sub>(ATP)</sub> channels. *Molecular pharmacology.* 2001;59(2):225-230.
59. Zaugg M, Schaub MC. Signaling and cellular mechanisms in cardiac protection by ischemic and pharmacological preconditioning. *J Muscle Res Cell Motil.* 2003;24(2-3):219-249.
60. Xuan YT, Tang XL, Qiu Y, et al. Biphasic response of cardiac NO synthase isoforms to ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(5):H2360-2371.
61. Burley DS, Baxter GF. Pharmacological targets revealed by myocardial postconditioning. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(2):177-188.
62. Boutros A, Wang J, Capuano C. Isoflurane and halothane increase adenosine triphosphate preservation, but do not provide additive recovery of function after ischemia, in preconditioned rat hearts. *Anesthesiology.* 1997;86(1):109-117.
63. Kersten JR, Orth KG, Pagel PS, Mei DA, Gross GJ, Warltier DC. Role of adenosine in isoflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology.* 1997;86(5):1128-1139.
64. Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Schaub MC. Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K<sub>(ATP)</sub> channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology.* 2002;97(1):4-14.

65. Ludwig LM, Weihrauch D, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC. Protein kinase C translocation and Src protein tyrosine kinase activation mediate isoflurane-induced preconditioning in vivo: potential downstream targets of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and reactive oxygen species. *Anesthesiology*. 2004;100(3):532-539.
66. Riess ML, Camara AK, Novalija E, Chen Q, Rhodes SS, Stowe DF. Anesthetic preconditioning attenuates mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload during ischemia in Guinea pig intact hearts: reversal by 5-hydroxydecanoic acid. *Anesth Analg*. 2002;95(6):1540-1546, table of contents.
67. An J, Varadarajan SG, Novalija E, Stowe DF. Ischemic and anesthetic preconditioning reduces cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] and improves Ca(2+) responses in intact hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(4):H1508-1523.
68. Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(2):H649-657.
69. O'Rourke B. Evidence for mitochondrial K<sup>+</sup> channels and their role in cardioprotection. *Circulation research*. 2004;94(4):420-432.
70. Buchinger H, Grundmann U, Ziegeler S. [Myocardial preconditioning with volatile anesthetics. General anesthesia as protective intervention?]. *Anaesthetist*. 2005;54(9):861-870.
71. Redel A, Lange M, Jazbutyte V, et al. Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning. *Anesth Analg*. 2008;106(2):384-391, table of contents.
72. Raphael J, Abedat S, Rivo J, et al. Volatile anesthetic preconditioning attenuates myocardial apoptosis in rabbits after regional ischemia and reperfusion via Akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;318(1):186-194.
73. Piriou V, Chiari P, Gateau-Roesch O, et al. Desflurane-induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Anesthesiology*. 2004;100(3):581-588.
74. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121-1135.
75. Rosenkranz ER, Buckberg GD. Myocardial protection during surgical coronary reperfusion. *Journal of the American College of Cardiology*. 1983;1(5):1235-1246.
76. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960;70:68-78.
77. Manning AS, Hearse DJ. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol*. 1984;16(6):497-518.

78. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* 1999;79(2):609-634.
79. Ito H. No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3(9):499-506.
80. Ramos M, DePasquale E, Coplan NL. Assessment of myocardial viability: review of the clinical significance. *Rev Cardiovasc Med.* 2008;9(4):225-231.
81. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(2):H579-588.
82. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2004;62(1):74-85.
83. Diaz RJ, Wilson GJ. Modifying the first minute of reperfusion: potential for myocardial salvage. *Cardiovasc Res.* 2004;62(1):4-6.
84. Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, et al. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res.* 2005;67(1):124-133.
85. Schipke JD, Kerendi F, Gams E, Vinten-Johansen J. [Postconditioning: a brief review]. *Herz.* 2006;31(6):600-606.
86. Skyschally A, van Caster P, Iliodromitis EK, Schulz R, Kremastinos DT, Heusch G. Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms. *Basic Res Cardiol.* 2009;104(5):469-483.
87. Iliodromitis EK, Downey JM, Heusch G, Kremastinos DT. What is the optimal postconditioning algorithm? *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2009;14(4):269-273.
88. Manintveld OC, Te Lintel Hekkert M, van den Bos EJ, et al. Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(3):H1551-1560.
89. Sorensson P, Saleh N, Bouvier F, et al. Effect of postconditioning on infarct size in patients with ST elevation myocardial infarction. *Heart.* 2010;96(21):1710-1715.
90. Sorensson P, Ryden L, Saleh N, Tornvall P, Arheden H, Pernow J. Long-term impact of postconditioning on infarct size and left ventricular ejection fraction in patients with ST-elevation myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord.* 2013;13:22.
91. Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation.* 2005;112(14):2143-2148.
92. Laskey WK. Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2005;65(3):361-367.

93. Yang XC, Liu Y, Wang LF, et al. Reduction in myocardial infarct size by postconditioning in patients after percutaneous coronary intervention. *J Invasive Cardiol.* 2007;19(10):424-430.
94. Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS, Krolikowski JG, Kersten JR, Wartier DC. Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. *Anesthesiology.* 2005;102(1):102-109.
95. Schlack W, Preckel B, Barthel H, Obal D, Thamer V. Halothane reduces reperfusion injury after regional ischaemia in the rabbit heart in vivo. *Br J Anaesth.* 1997;79(1):88-96.
96. Preckel B, Schlack W, Comfere T, Obal D, Barthel H, Thamer V. Effects of enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischaemia in the rabbit heart in vivo. *Br J Anaesth.* 1998;81(6):905-912.
97. Schlack W, Preckel B, Stunneck D, Thamer V. Effects of halothane, enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on myocardial reperfusion injury in the isolated rat heart. *Br J Anaesth.* 1998;81(6):913-919.
98. Obal D, Preckel B, Scharbatke H, et al. One MAC of sevoflurane provides protection against reperfusion injury in the rat heart in vivo. *Br J Anaesth.* 2001;87(6):905-911.
99. Obal D, Scharbatke H, Barthel H, Preckel B, Mullenheim J, Schlack W. Cardioprotection against reperfusion injury is maximal with only two minutes of sevoflurane administration in rats. *Can J Anaesth.* 2003;50(9):940-945.
100. Smul TM, Lange M, Redel A, et al. Desflurane-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury depends on timing. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2009;23(5):600-606.
101. Symons JA, Myles PS. Myocardial protection with volatile anaesthetic agents during coronary artery bypass surgery: a meta-analysis. *Br J Anaesth.* 2006;97(2):127-136.
102. Tritapepe L, Landoni G, Guarracino F, et al. Cardiac protection by volatile anaesthetics: a multicentre randomized controlled study in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Eur J Anaesthesiol.* 2007;24(4):323-331.
103. Heusch G. Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet.* 2013;381(9861):166-175.
104. Miura T, Miki T. Limitation of myocardial infarct size in the clinical setting: current status and challenges in translating animal experiments into clinical therapy. *Basic Res Cardiol.* 2008;103(6):501-513.

105. Yu CH, Beattie WS. The effects of volatile anesthetics on cardiac ischemic complications and mortality in CABG: a meta-analysis. *Can J Anaesth.* 2006;53(9):906-918.
106. Xi L, Das A, Zhao ZQ, Merino VF, Bader M, Kukreja RC. Loss of myocardial ischemic postconditioning in adenosine A1 and bradykinin B2 receptors gene knockout mice. *Circulation.* 2008;118(14 Suppl):S32-37.
107. Tanaka K, Kersten JR, Riess ML. Opioid-induced cardioprotection. *Curr Pharm Des.* 2014;20(36):5696-5705.
108. Jordan JE, Zhao ZQ, Sato H, Taft S, Vinten-Johansen J. Adenosine A2 receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophil accumulation, superoxide generation and coronary endothelial adherence. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;280(1):301-309.
109. Bibli SI, Iliodromitis EK, Lambertucci C, et al. Pharmacological postconditioning of the rabbit heart with non-selective, A1, A2A and A3 adenosine receptor agonists. *J Pharm Pharmacol.* 2014;66(8):1140-1149.
110. Bonney S, Hughes K, Eckle T. Anesthetic cardioprotection: the role of adenosine. *Curr Pharm Des.* 2014;20(36):5690-5695.
111. Matsui T, Li L, del Monte F, et al. Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro. *Circulation.* 1999;100(23):2373-2379.
112. Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation.* 2000;101(6):660-667.
113. Datta K, Bellacosa A, Chan TO, Tsichlis PN. Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells. *J Biol Chem.* 1996;271(48):30835-30839.
114. Yue TL, Wang C, Gu JL, et al. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circulation research.* 2000;86(6):692-699.
115. Rodriguez M, Lucchesi BR, Schaper J. Apoptosis in myocardial infarction. *Ann Med.* 2002;34(6):470-479.
116. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399(6736):601-605.
117. Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science.* 1998;281(5385):2042-2045.

118. Jonassen AK, Brar BK, Mjos OD, Sack MN, Latchman DS, Yellon DM. Insulin administered at reoxygenation exerts a cardioprotective effect in myocytes by a possible anti-apoptotic mechanism. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32(5):757-764.
119. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res.* 2004;61(3):448-460.
120. Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, et al. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest.* 2004;113(11):1535-1549.
121. Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(20):11598-11603.
122. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation.* 2005;111(2):194-197.
123. Costa AD, Garlid KD. Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(2):H874-882.
124. Hausenloy DJ, Duchon MR, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2003;60(3):617-625.
125. Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35(4):339-341.
126. Stumpner J, Smul TM, Redel A, et al. Desflurane-induced and ischaemic postconditioning against myocardial infarction are mediated by Pim-1 kinase. *Acta anaesthesiologica Scandinavica.* 2012;56(7):904-913.
127. Brayden JE, Nelson MT. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science.* 1992;256(5056):532-535.
128. Sileikyte J, Petronilli V, Zulian A, et al. Regulation of the inner membrane mitochondrial permeability transition by the outer membrane translocator protein (peripheral benzodiazepine receptor). *J Biol Chem.* 2011;286(2):1046-1053.
129. Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem.* 2002;277(38):34793-34799.
130. Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation.* 2008;117(21):2761-2768.



131. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev.* 2008;88(2):581-609.
132. Mykytenko J, Reeves JG, Kin H, et al. Persistent beneficial effect of postconditioning against infarct size: role of mitochondrial K(ATP) channels during reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 2008;103(5):472-484.
133. Fang NX, Yao YT, Shi CX, Li LH. Attenuation of ischemia-reperfusion injury by sevoflurane postconditioning involves protein kinase B and glycogen synthase kinase 3 beta activation in isolated rat hearts. *Mol Biol Rep.* 2010;37(8):3763-3769.
134. Feng J, Fischer G, Lucchinetti E, et al. Infarct-remodeled myocardium is receptive to protection by isoflurane postconditioning: role of protein kinase B/Akt signaling. *Anesthesiology.* 2006;104(5):1004-1014.
135. Feng J, Lucchinetti E, Ahuja P, Pasch T, Perriard JC, Zaugg M. Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3beta. *Anesthesiology.* 2005;103(5):987-995.
136. Morin D, Assaly R, Paradis S, Berdeaux A. Inhibition of mitochondrial membrane permeability as a putative pharmacological target for cardioprotection. *Curr Med Chem.* 2009;16(33):4382-4398.
137. Krolkowski JG, Bienengraeber M, Weihrauch D, Warltier DC, Kersten JR, Pagel PS. Inhibition of mitochondrial permeability transition enhances isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion: the role of mitochondrial KATP channels. *Anesth Analg.* 2005;101(6):1590-1596.
138. Lymperopoulos A, Bathgate A. Pharmacogenomics of the heptahelical receptor regulators G-protein-coupled receptor kinases and arrestins: the known and the unknown. *Pharmacogenomics.* 2012;13(3):323-341.
139. Drews J. Drug discovery: a historical perspective. *Science.* 2000;287(5460):1960-1964.
140. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, et al. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* 2007;450(7168):383-387.
141. Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, et al. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science.* 2008;322(5905):1211-1217.
142. Chien EY, Liu W, Zhao Q, et al. Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science.* 2010;330(6007):1091-1095.
143. Wu B, Chien EY, Mol CD, et al. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science.* 2010;330(6007):1066-1071.

144. Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.* 2000;21(1):90-113.
145. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology.* 2003;63(6):1256-1272.
146. Andresen BT. A pharmacological primer of biased agonism. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2011;11(2):92-98.
147. Hamm HE. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem.* 1998;273(2):669-672.
148. Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):60-71.
149. Hill SJ. G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1:S27-37.
150. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(9):639-650.
151. Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature.* 2009;459(7245):356-363.
152. Wess J. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther.* 1998;80(3):231-264.
153. Palczewski K, Benovic JL. G-protein-coupled receptor kinases. *Trends Biochem Sci.* 1991;16(10):387-391.
154. Sibley DR, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ. Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation. *Cell.* 1987;48(6):913-922.
155. Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:653-692.
156. Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem.* 1998;273(30):18677-18680.
157. Ferguson SS, Downey WE, 3rd, Colapietro AM, Barak LS, Menard L, Caron MG. Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science.* 1996;271(5247):363-366.
158. Lamb ME, De Weerd WF, Leeb-Lundberg LM. Agonist-promoted trafficking of human bradykinin receptors: arrestin- and dynamin-independent sequestration of the B2 receptor and bradykinin in HEK293 cells. *Biochem J.* 2001;355(Pt 3):741-750.
159. Laporte SA, Miller WE, Kim KM, Caron MG. beta-Arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization: identification of a beta-arrestin binding site in beta 2-adaptin. *J Biol Chem.* 2002;277(11):9247-9254.

160. Krupnick JG, Benovic JL. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:289-319.
161. Chini B, Parenti M. G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J Mol Endocrinol.* 2004;32(2):325-338.
162. Wilden U, Hall SW, Kuhn H. Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(5):1174-1178.
163. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science.* 1990;248(4962):1547-1550.
164. Wilden U. Duration and amplitude of the light-induced cGMP hydrolysis in vertebrate photoreceptors are regulated by multiple phosphorylation of rhodopsin and by arrestin binding. *Biochemistry.* 1995;34(4):1446-1454.
165. Krupnick JG, Gurevich VV, Benovic JL. Mechanism of quenching of phototransduction. Binding competition between arrestin and transducin for phosphorhodopsin. *J Biol Chem.* 1997;272(29):18125-18131.
166. Marchese A, Chen C, Kim YM, Benovic JL. The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(7):369-376.
167. Thompson MD, Cole DE, Jose PA. Pharmacogenomics of G protein-coupled receptor signaling: insights from health and disease. *Methods Mol Biol.* 2008;448:77-107.
168. Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol.* 2002;66(2):61-79.
169. Reiter E, Lefkowitz RJ. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17(4):159-165.
170. Gurevich EV, Tesmer JJ, Mushegian A, Gurevich VV. G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol Ther.* 2012;133(1):40-69.
171. Lorenz W, Inglese J, Palczewski K, Onorato JJ, Caron MG, Lefkowitz RJ. The receptor kinase family: primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the beta-adrenergic receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(19):8715-8719.
172. Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature.* 2002;415(6868):206-212.
173. Lymperopoulos A, Rengo G, Koch WJ. GRK2 inhibition in heart failure: something old, something new. *Curr Pharm Des.* 2012;18(2):186-191.

174. Evron T, Daigle TL, Caron MG. GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(3):154-164.
175. Sallese M, Mariggio S, Collodel G, et al. G protein-coupled receptor kinase GRK4. Molecular analysis of the four isoforms and ultrastructural localization in spermatozoa and germinal cells. *J Biol Chem.* 1997;272(15):10188-10195.
176. Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature.* 1997;390(6655):88-91.
177. Xiao RP, Ji X, Lakatta EG. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Molecular pharmacology.* 1995;47(2):322-329.
178. Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, et al. Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II. *J Clin Invest.* 2003;111(5):617-625.
179. Sucharov CC, Mariner PD, Nunley KR, Long C, Leinwand L, Bristow MR. A beta1-adrenergic receptor CaM kinase II-dependent pathway mediates cardiac myocyte fetal gene induction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(3):H1299-1308.
180. Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(12):7059-7064.
181. Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(4):1607-1612.
182. Ungerer M, Kessebohm K, Kronsbein K, Lohse MJ, Richardt G. Activation of beta-adrenergic receptor kinase during myocardial ischemia. *Circulation research.* 1996;79(3):455-460.
183. Lange M, Redel A, Roewer N, Kehl F. beta-Blockade Abolishes Anesthetic Preconditioning: Impact on Clinical Applicability. *Anesthesiology.* 2007;106(5):1062.
184. Lange M, Redel A, Smul TM, et al. Desflurane-induced preconditioning has a threshold that is lowered by repetitive application and is mediated by beta 2-adrenergic receptors. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2009;23(5):607-613.
185. Lange M, Smul TM, Blomeyer CA, et al. Role of the beta1-adrenergic pathway in anesthetic and ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rabbit heart in vivo. *Anesthesiology.* 2006;105(3):503-510.
186. Lange M, Smul TM, Redel A, et al. Differential role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in desflurane-induced preconditioning and cardioprotection by metoprolol: metoprolol blocks desflurane-induced preconditioning. *Anesthesiology.* 2008;109(1):72-80.

187. Gros R, Benovic JL, Tan CM, Feldman RD. G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. *J Clin Invest.* 1997;99(9):2087-2093.
188. Zhu W, Petrashevskaya N, Ren S, et al. Gi-biased beta2AR signaling links GRK2 upregulation to heart failure. *Circulation research.* 2012;110(2):265-274.
189. Perrino C, Naga Prasad SV, Schroder JN, Hata JA, Milano C, Rockman HA. Restoration of beta-adrenergic receptor signaling and contractile function in heart failure by disruption of the betaARK1/phosphoinositide 3-kinase complex. *Circulation.* 2005;111(20):2579-2587.
190. Choi DJ, Koch WJ, Hunter JJ, Rockman HA. Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem.* 1997;272(27):17223-17229.
191. Tran TM, Friedman J, Qunaibi E, Baameur F, Moore RH, Clark RB. Characterization of agonist stimulation of cAMP-dependent protein kinase and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor using phosphoserine-specific antibodies. *Molecular pharmacology.* 2004;65(1):196-206.
192. Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, Minobe W, Rasmussen R. Beta 1- and beta 2-adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Molecular pharmacology.* 1989;35(3):295-303.
193. Brinks H, Boucher M, Gao E, et al. Level of G protein-coupled receptor kinase-2 determines myocardial ischemia/reperfusion injury via pro- and anti-apoptotic mechanisms. *Circulation research.* 2010;107(9):1140-1149.
194. Liu S, Premont RT, Kontos CD, Zhu S, Rockey DC. A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension. *Nat Med.* 2005;11(9):952-958.
195. Raake PW, Vinge LE, Gao E, et al. G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure. *Circulation research.* 2008;103(4):413-422.
196. Woodall MC, Woodall BP, Gao E, Yuan A, Koch WJ. Cardiac Fibroblast GRK2 Deletion Enhances Contractility and Remodeling Following Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation research.* 2016.
197. Rockman HA, Chien KR, Choi DJ, et al. Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(12):7000-7005.
198. Harding VB, Jones LR, Lefkowitz RJ, Koch WJ, Rockman HA. Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(10):5809-5814.

199. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, et al. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med.* 1982;307(4):205-211.
200. Ungerer M, Bohm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation.* 1993;87(2):454-463.
201. Shekarforoush S, Fatahi Z, Safari F. The effects of pentobarbital, ketamine-pentobarbital and ketamine-xylazine anesthesia in a rat myocardial ischemic reperfusion injury model. *Lab Anim.* 2015.
202. Kotseva K, Wood D, De Bacquer D, et al. EUROASPIRE IV: A European Society of Cardiology survey on the lifestyle, risk factor and therapeutic management of coronary patients from 24 European countries. *Eur J Prev Cardiol.* 2016;23(6):636-648.
203. Stirrup J, Velasco A, Hage FG, Reyes E. Comparison of ESC and ACC/AHA guidelines for myocardial revascularization. *J Nucl Cardiol.* 2017.
204. Mio Y, Bienengraeber MW, Marinovic J, et al. Age-related attenuation of isoflurane preconditioning in human atrial cardiomyocytes: roles for mitochondrial respiration and sarcolemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channel activity. *Anesthesiology.* 2008;108(4):612-620.
205. Lemoine S, Zhu L, Buleon C, et al. Mechanisms involved in the desflurane-induced post-conditioning of isolated human right atria from patients with type 2 diabetes. *Br J Anaesth.* 2011;107(4):510-518.
206. Soro M, Gallego L, Silva V, et al. Cardioprotective effect of sevoflurane and propofol during anaesthesia and the postoperative period in coronary bypass graft surgery: a double-blind randomised study. *Eur J Anaesthesiol.* 2012;29(12):561-569.
207. Landoni G, Biondi-Zoccai GG, Zangrillo A, et al. Desflurane and sevoflurane in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2007;21(4):502-511.
208. Kikuchi C, Dosenovic S, Bienengraeber M. Anaesthetics as cardioprotectants: translatability and mechanism. *Br J Pharmacol.* 2015;172(8):2051-2061.
209. Canfield SG, Sepac A, Sedlic F, Muravyeva MY, Bai X, Bosnjak ZJ. Marked hyperglycemia attenuates anesthetic preconditioning in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Anesthesiology.* 2012;117(4):735-744.
210. Stumpner J, Lange M, Beck A, et al. Desflurane-induced post-conditioning against myocardial infarction is mediated by calcium-activated potassium channels: role of the mitochondrial permeability transition pore. *Br J Anaesth.* 2012;108(4):594-601.
211. Zhang Y, Li D, Luo J, et al. Pharmacological postconditioning with sevoflurane activates PI3K/AKT signaling and attenuates cardiopulmonary bypass-induced lung injury in dog. *Life Sci.* 2017;173:68-72.

212. Albrecht M, Gruenewald M, Zitta K, et al. Hypothermia and anesthetic postconditioning influence the expression and activity of small intestinal proteins possibly involved in ischemia/reperfusion-mediated events following cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation*. 2012;83(1):113-118.
213. Lotz C, Fisslthaler B, Redel A, et al. Activation of adenosine-monophosphate-activated protein kinase abolishes desflurane-induced preconditioning against myocardial infarction in vivo. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2011;25(1):66-71.
214. Yao YT, Liu DH, Li LH. Comparison of cardio-protective effects induced by different modalities of sevoflurane conditioning in isolated rat hearts. *Perfusion*. 2016;31(2):156-163.
215. Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, Scharbatke H, Preckel B, Schlack W. The influence of mitochondrial KATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo. *Anesth Analg*. 2005;101(5):1252-1260.
216. Koch WJ, Rockman HA, Samama P, et al. Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. *Science*. 1995;268(5215):1350-1353.
217. Sakai R, Shen JB, Pappano AJ. Elevated cAMP suppresses muscarinic inhibition of L-type calcium current in guinea pig ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;34(2):304-315.
218. Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation*. 2005;111(2):198-203.
219. Makaula S, Lochner A, Genade S, Sack MN, Awan MM, Opie LH. H-89, a non-specific inhibitor of protein kinase A, promotes post-ischemic cardiac contractile recovery and reduces infarct size. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;45(4):341-347.
220. Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, et al. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*. 1998;282(5397):2275-2279.
221. Dorsch M, Behmenburg F, Raible M, et al. Morphine-Induced Preconditioning: Involvement of Protein Kinase A and Mitochondrial Permeability Transition Pore. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151025.
222. Bohm M, Reiger B, Schwinger RH, Erdmann E. cAMP concentrations, cAMP dependent protein kinase activity, and phospholamban in non-failing and failing myocardium. *Cardiovasc Res*. 1994;28(11):1713-1719.
223. Muthumala A, Drenos F, Elliott PM, Humphries SE. Role of beta adrenergic receptor polymorphisms in heart failure: systematic review and meta-analysis. *Eur J Heart Fail*. 2008;10(1):3-13.

224. Ostrowski SR, Pedersen SH, Jensen JS, Mogelvang R, Johansson PI. Acute myocardial infarction is associated with endothelial glycocalyx and cell damage and a parallel increase in circulating catecholamines. *Crit Care*. 2013;17(1):R32.
225. Cannavo A, Rengo G, Liccardo D, et al. beta1-adrenergic receptor and sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) reciprocal downregulation influences cardiac hypertrophic response and progression to heart failure: protective role of S1PR1 cardiac gene therapy. *Circulation*. 2013;128(15):1612-1622.
226. Akhter SA, D'Souza KM, Petrashevskaya NN, Mialet-Perez J, Liggett SB. Myocardial beta1-adrenergic receptor polymorphisms affect functional recovery after ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(4):H1427-1432.
227. Baudhuin LM, Miller WL, Train L, et al. Relation of ADRB1, CYP2D6, and UGT1A1 polymorphisms with dose of, and response to, carvedilol or metoprolol therapy in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol*. 2010;106(3):402-408.
228. Du XJ, Gao XM, Jennings GL, Dart AM, Woodcock EA. Preserved ventricular contractility in infarcted mouse heart overexpressing beta(2)-adrenergic receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(5):H2456-2463.
229. Salazar NC, Vallejos X, Siryk A, et al. GRK2 blockade with betaARKct is essential for cardiac beta2-adrenergic receptor signaling towards increased contractility. *Cell Commun Signal*. 2013;11:64.
230. Claing A. beta-Arrestins: modulators of small GTPase activation and function. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2013;118:149-174.
231. Islam KN, Koch WJ. Involvement of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) signaling pathway in regulation of cardiac G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5) expression. *J Biol Chem*. 2012;287(16):12771-12778.
232. Dautzenberg FM, Wille S, Braun S, Hauger RL. GRK3 regulation during CRF- and urocortin-induced CRF1 receptor desensitization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;298(3):303-308.
233. Powell JM, Ebin E, Borzak S, Lympelopoulos A, Hennekens CH. Hypothesis: Paroxetine, a G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 (GRK2) Inhibitor Reduces Morbidity and Mortality in Patients With Heart Failure. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2016.
234. Ytrehus K, Liu Y, Tsuchida A, et al. Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am J Physiol*. 1994;267(6 Pt 2):H2383-2390.
235. Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 1987;21(10):737-746.



## Appendix

### I Abkürzungsverzeichnis

AAR	Area at Risk
ANOVA	Analysis of Variance
APC	Anästhetika-induzierte Präkonditionierung
APost	Anästhetika-induzierte Postkonditionierung
ATP	Adenosintriphosphat
ATN	Adenin Nukleotid Translokase
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovine Serum Albumine
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CK-MB	Creatinkinase-MB
COX-2	Cyclooxygenase-2
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
Cyp D	Cyclophilin D
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
Gi	inhibitorisches G-Protein
GIRK	G-Protein-inwärts-gerichtete-Rezeptorkinase
GPCR	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor
GRK	G-Protein-Rezeptorkinase
GSK3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase-3-beta
GTP	Guanosintriphosphat
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
i.p.	intraperitoneal

---

IPC	Ischämische Präkonditionierung
IPost	Ischämische Postkonditionierung
IS	Infarct Size
JAK1/2-STAT1/3	Januskinase1/2-Signal Transducer and Activator of Transcription1/3
K <sup>+</sup> <sub>ATP</sub> -Kanal	ATP-sensitiver Kaliumkanal
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	Left Anterior Descending (artery) = absteigender Ast der linken Koronararterie
LV	Linker Ventrikel
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
mK <sup>+</sup> <sub>ATP</sub> -Kanal	mitochondrialer ATP-sensibler Kaliumkanal
Mm.	Musculi
mPTP	mitochondriale Permeability Transition Pore
NaCl	Natrium Chlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NP	Nonylphenoethoxylat
p-AKT	Phospho-Akt
PCI	perkutane Koronarintervention
PEEP	Positive EndExpiratory Pressure
PH	Pleckstrin Homology (Domäne)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIA	Präinfarkt Angina
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC $\epsilon$	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
Proc.	Processus
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rho-GEF	rho-Guanine Nucleotide Exchange Factor
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RISK	Reperfusion Injury Salvage Kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
RV	Rechter Ventrikel

---

SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel
Ser	Serin
STEMI	ST-Elevation Myocardial Infarction
TBS	Tris-Buffered Saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIA	Transitorische Ischämische Attacke
TIVA	Total Intravenöse Anästhesie
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
VDAC	Voltage-dependent Anion Channel
Z.n.	Zustand nach
βARK1	beta-Adrenergic-Rezeptorkinase 1

## II Messeinheiten

<b>Einheit</b>	<b>Einheitsbezeichnung</b>	<b>Messgröße</b>
°C	Grad Celsius	Temperatur
µl	Mikroliter	Volumen
ml	Milliliter	Volumen
l	Liter	Volumen
Vol.	Volumen	Volumen
µg	Mikrogramm	Masse
mg	Milligramm	Masse
g	Gramm	Masse
kg	Kilogramm	Masse
KG	Körpergewicht	Masse
rpm	rounds per minute	Drehzahl
min	Minute	Zeit
h	Stunde	Zeit
mA	Milliampere	Stromstärke
A	Ampere	Stromstärke
pH	Potentia Hydrogenii	Säuregrad
MAC	Minimal Alveoläre Konzentration	Konzentration
kD	kiloDalton	Größe
V	Volt	Spannung

### III Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung der Konditionierung.....	1
Abb. 2:	Zweites Fenster der IPC .....	5
Abb. 3:	Molekulare Mechanismen der IPC .....	8
Abb. 4:	Molekulare Mechanismen der APC.....	10
Abb. 5:	Molekulare Mechanismen der IPost.....	14
Abb. 6:	Funktion der mPTP.....	16
Abb. 7:	GPCR.....	18
Abb. 8:	Homologe Desensibilisierung .....	20
Abb. 9:	Heterologe Desensibilisierung .....	21
Abb. 10:	Mechanismus des $\beta$ -adrenergen Rezeptors .....	23
Abb. 11:	Experimentelles Protokoll .....	32
Abb. 12:	Protokoll der Organentnahmen .....	33
Abb. 13:	Standardkurve der BSA-Proteinbestimmung.....	37
Abb. 14:	Größe der AAR in % des LV .....	44
Abb. 15:	Größe des IS in % der AAR .....	45
Abb. 16:	Western Blot des $\beta$ 1-Rezeptors .....	46
Abb. 17:	Statistische Auswertung der Western-Blot Analyse des ADRB1 .....	46
Abb. 18:	Western-Blot des $\beta$ 2-Rezeptors.....	47
Abb. 19:	Statistische Auswertung der Western-Blot Analyse des ADRB2 .....	48
Abb. 20:	Western-Blot der GRK2 .....	49
Abb. 21:	Statistische Auswertung der Western-Blot Analyse des GRK2 .....	49
Abb. 22:	Western-Blot $\beta$ -Arrestin .....	50
Abb. 23:	Statistische Auswertung der Western-Blot Analyse des $\beta$ -Arrestins.....	50

#### **IV Tabellenverzeichnis**

Tab. 1:	Darstellung der Verdünnungsreihe .....	35
Tab. 2:	Probenauftragung für die Proteinbestimmung .....	36

## V Danksagung

Ein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr.med. Dr. h.c. Roewer, sowohl für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, als auch für die Möglichkeiten und Ressourcen in der Klinik für Anästhesiologie.

Weiterer Dank gebührt meiner Arbeitsgruppe und meinen Betreuern Dr. Anja Frank und Tobias Tischer-Zeit für den unermüdlichen Einsatz mich zu bestärken, diese Dissertation durchzuführen. Mein Interesse an künftigen experimentellen Projekten wurde so geweckt. Durch den besonderen Umgang mit Doktoranden und die Herangehensweise an wissenschaftliche Lösungen konnte ich meinen eigenen Weg in der experimentellen Wissenschaft finden und mich weiterentwickeln.

Ein herausragender Dank geht an meine Familie: Meiner Mutter und meinem Vater, Vorbilder in jeglicher Hinsicht, die mir bislang mit ihrem unvergleichlichen Elan und Tatendrang nicht nur bei der Durchführung dieser Dissertation stets unterstützend zur Seite standen und meiner Schwester, meine bessere Hälfte, die seit 28 Jahren zuverlässig im Einsatz gegen Langeweile und Ordnung ist. Ich bin unendlich dankbar und sehr glücklich euch an meiner Seite zu haben.

**VI Lebenslauf**

Name: Mia Carlotta Peters  
Geburtsdatum: 28. Oktober 1991  
Geburtsort: Hamburg

**Schule:**

1997 – 2001 Grundschule Lütjensee  
2001 – 2007 Gymnasium Stormarnschule, Ahrensburg  
2007 – 2009 St. Columba's College, Dublin, Irland  
(Irish Leaving Certificate)

**Studium:**

04/2010 – 11/2016 Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
03/2012 1. Ärztliche Prüfung abgeschlossen  
11/2016 2. Ärztliche Prüfung abgeschlossen

**Stipendien:**

2008 Music Scholarship St. Columba's College  
2014 Förderstipendium des Bayerischen Hochschulzentrums für  
China der Universität Bayreuth (BayChina)

**Praktisches Jahr:**

11/2015 – 03/2016 Universitätsklinikum Würzburg  
1. Tertial: Anästhesiologie (Wahlfach)  
03/2016 – 07/2016 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
2. Tertial: Chirurgie  
07/2016 – 11/2016 Asklepios Klinik Hamburg-Barmbek  
3. Tertial: Innere Medizin

**Beruflicher Werdegang:**

Seit 02/2017 Assistenzärztin im Universitätsklinikum-Hamburg Eppendorf  
II. Medizinische Klinik (Onkologisches Zentrum)  
Direktor: Prof. Dr. C. Bokemeyer

**Stipendien:**

2021 UCCH-Research Fellowship