

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. Norbert Roewer

**Die Rolle der Calcium-Calmodulinkinase II<sub>δ</sub> bei der Desfluran-induzierten  
Kardioprotektion gegen den Ischämie/Reperfusionsschaden**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Julian Klaus Zürl**

aus Coburg

Würzburg, Februar 2019

**Referent: Prof. Dr. med. Markus Lange**

**Korreferent: Prof. Dr. med. Christoph Wanner**

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

**Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2019**

**Der Promovend ist Arzt**

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. EINLEITUNG</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Myokardialer Ischämie-/ Reperfusionsschaden</b>                              | <b>2</b>  |
| 1.1.1 Myokardiale Schädigung bei Ischämie   | 3         |
| 1.1.2 Myokardiale Schädigung bei Reperfusion  | 4         |
| <b>1.2 Kardioprotektion durch Präkonditionierung</b>                                | <b>7</b>  |
| 1.2.1 Kardioprotektion durch ischämische Präkonditionierung                         | 7         |
| 1.2.2 Kardioprotektion durch Anästhetika-induzierte Präkonditionierung              | 10        |
| 1.2.3 Klinische Studien zur Kardioprotektion durch Präkonditionierung               | 14        |
| <b>1.3 Calcium-Calmodulinkinase II</b>  | <b>17</b> |
| 1.3.1 Struktur der CaMKII <sub>δ</sub> im Herzen                                    | 17        |
| 1.3.2 Funktion der CaMKII <sub>δ</sub> im Herzen                                    | 18        |
| 1.3.3 CaMKII <sub>δ</sub> bei Ischämie/Reperfusionsschäden und Kardioprotektion     | 21        |
| <b>2. HYPOTHESEN</b>  | <b>23</b> |
| <b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>   | <b>24</b> |
| <b>2.1 Versuchstiere</b>  | <b>24</b> |
| <b>2.2 Genotypisierung</b>  | <b>25</b> |
| 2.2.1 DNA Aufreinigung für Genotypisierung  | 25        |
| 2.2.2 PCR für Genotypisierung   | 26        |
| 2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese und Genotypbestimmung                               | 28        |
| <b>2.3 Experimentelles Tiermodell</b>   | <b>31</b> |
| 2.3.1 Vorbereitung  | 31        |
| 2.3.2 Operation, Koronararterienokklusion und Reperfusion                           | 33        |
| 2.3.3 Experimentelles Protokoll für gravitoplanimetrische Infarktgrößenbestimmungen | 34        |
| 2.3.4 Experimentelles Protokoll für molekularbiologische Untersuchungen             | 36        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2.4 Organentnahme</b>   | <b>38</b> |
| 2.4.1 Organentnahme für gravitoplanimetrische Infarktgrößenbestimmung                            | 38        |
| 2.4.2 Organentnahme für molekularbiologische Untersuchungen                                      | 40        |
| <b>2.4 Molekularbiologische Untersuchungen</b>   | <b>41</b> |
| 2.5.1 Herstellung von Zelllysaten  | 41        |
| 2.5.2 BCA Proteinkonzentrationsbestimmung  | 43        |
| 2.5.3 SDS-PAGE Gelelektrophorese   | 44        |
| 2.5.4 Semidry Western-Immunoblotting   | 47        |
| 2.5.5 Antikörper-Inkubation  | 48        |
| 2.5.6 Chemolumineszente Entwicklung und Auswertung   | 50        |
| <b>2.5 Statistische Analyse</b>  | <b>52</b> |
| <b>4. ERGEBNISSE</b>   | <b>53</b> |
| <b>3.1. Infarktgrößenbestimmung des linken Ventrikels</b>  | <b>53</b> |
| <b>3.2 Ergebnisse des experimentellen Tierprotokolls für molekularbiologische Untersuchungen</b> | <b>55</b> |
| 3.2.1 Western-Immunoblot von PLB, pPLB Ser16 und pPLB Thr17                                      | 55        |
| 3.2.2 Western-Immunoblot von ADRB1   | 59        |
| <b>5. DISKUSSION</b>   | <b>61</b> |
| <b>4.1 Methodik</b>  | <b>62</b> |
| <b>4.2 CaMKII<sub>δ</sub> und Kardioprotektion</b>   | <b>64</b> |
| 4.2.1 CaMKII <sub>δ</sub> und I/RI   | 64        |
| 4.2.2 CaMKII <sub>δ</sub> und APC  | 65        |
| 4.2.3 CaMKII <sub>δ</sub> und ROS  | 67        |
| <b>4.3 CaMKII<sub>δ</sub> im molekularbiologischen Kontext</b>                                   | <b>69</b> |
| 4.3.1 CaMKII <sub>δ</sub> und Phospholamban  | 69        |
| 4.3.2 CaMKII <sub>δ</sub> und PKA  | 71        |
| 4.3.3 CaMKII <sub>δ</sub> und PKC  | 72        |
| 4.3.4 CaMKII <sub>δ</sub> und β- adrenerge Signalwege  | 73        |

|                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| <b>4.4 From Bench to Bedside</b> | <b>77</b>  |
| <b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>        | <b>79</b>  |
| <b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>   | <b>80</b>  |
| <b>6.1 Abkürzungsverzeichnis</b> | <b>115</b> |
| <b>6.2 Abbildungsverzeichnis</b> | <b>119</b> |

# 1. Einleitung

Obwohl aktuelle Zahlen führender amerikanischer [1] und deutscher [2] Fachgesellschaften zeigen, dass die Gesamtmortalität aufgrund von Herzerkrankungen in den letzten Jahren trotz steigender Inzidenz abgenommen hat, bleiben diese mit weitem Abstand die häufigste Todesursache in Deutschland: Im Jahr 2014 sind in Deutschland 30% aller Todesursachen auf Herzerkrankungen zurückzuführen, wobei die koronare Herzerkrankung (14%) und der akute Myokardinfarkt (6%) den größten Anteil daran stellen [3].

Bei allem medizinischen Fortschritt stellt die Reperfusion eines ischämischen Herzareals, z.B. durch perkutane kardiovaskuläre Interventionen oder Herz-Thorax chirurgische Eingriffe, den Goldstandard in der Therapie einer koronaren Herzerkrankung beziehungsweise eines akuten Myokardinfarktes dar [4].

Im Zuge einer erfolgreichen Interventionen kommt es zu einer Reperfusion des zuvor ischämischen Gewebsareales, wobei nicht nur die Ischämie, sondern auch die (notwendige) Reperfusion gravierende Schäden am Gewebe fördern, die einen großen Einfluss auf Morbidität und Mortalität haben können [5].

In den letzten 30 Jahren wurde in zahlreichen medizinischen Fachgebieten mit vielfältigen Ansätzen nach Lösungen zum Schutz vor diesen Schäden gesucht. In der Anästhesiologie zeigte sich, dass die Applikation volatiler Anästhetika kardioprotektive Effekte gegen Ischämie- wie auch gegen Reperfusionsschäden entfalten können [6].

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, dass die molekularen Zusammenhänge der Kardioprotektion durch volatile Anästhetika bei Ischämie- und Reperfusionsschäden besser verstanden werden können.

## 1.1 Myokardialer Ischämie-/ Reperfusionsschaden

Die Reperfusion eines ischämischen Herzareals durch Thrombolyse, perkutane koronare Intervention oder koronarer Bypassoperation stellt den Goldstandard in der Therapie eines Herzinfarktes dar [4]. Diese Interventionen sind notwendig um das minderdurchblutete Myokard vor zum Teil irreversiblen Schäden zu schützen [7-9]. Die Aufhebung der Ischämie führt jedoch nicht immer zur Aufhebung weiterer Schädigung am Myokard: Durch Reperfusion wird das Myokard im Verlauf geschädigt [10-12]. Da diese Schädigung von der Ischämiedauer abhängig ist, wird von einem Ischämie-/ Reperfusionsschaden (engl. ischemia/reperfusion injury, I/RI) gesprochen [5,13].

Bereits nach wenigen Minuten kann I/RI zu kardialer Dysfunktion führen, die sich wie folgt manifestiert:

Initial kommt es verstärkt zu ventrikulären Arrhythmien, während die Pumpfunktion kaum beeinflusst wird [14]. Nach etwa fünf Minuten wird die ventrikuläre Pumpfunktion messbar eingeschränkt, obwohl noch kein Gewebe untergegangen ist. Dieses Phänomen wird als *myocardiales stunning* bezeichnet und ist in Abhängigkeit von Ischämie- und Reperfusionsdauer reversibel [15,16]. Trotz vollständiger Reperfusion kann es im Infarktgebiet zu einer langfristigen Minderdurchblutung kommen. Dieser Vorgang wird *no-reflow* Phänomen genannt [17]. Dabei wird ein Teil der kapillären Myokardstruktur während der Ischämie und Reperfusion durch pathophysiologische Vorgänge zerstört [18,19].

Ventrikuläre Arrhythmien, *myocardiales stunning* und das *no-reflow* Phänomen sind Ausdruck einer Schädigung des betroffenen ischämischen Myokards, der zunächst reversibel ist. Der betroffene Gewebeabschnitt wird als Risikobereich (engl. area at risk, AAR) bezeichnet [20]. Bei prolongierter Ischämie mit anschließend Reperfusion kann es in diesem Areal durch verschiedene Nekrose- und Apoptoseprozesse, auf die in den folgenden Abschnitten genau eingegangen wird, zu irreversiblen Schäden kommen.

Um den I/RI und seine Auswirkungen besser zu verstehen, müssen daher die grundlegenden pathophysiologischen Vorgänge während der Ischämie- und Reperusionsphase vergegenwärtigt werden.

### 1.1.1 Myokardiale Schädigung bei Ischämie

Aufgrund von Sauerstoffmangel wird bei einer Ischämie die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien erheblich reduziert. Pro Glukosemolekül werden nur noch zwei Moleküle Adenosintriphosphat (ATP) gebildet, während unter normalen, aeroben Bedingungen mindestens 30 Moleküle ATP pro Glukosemolekül generiert werden [21]. Ein Mangel des essentiellen Funktionsmoleküls ATP schwächt die Myozyten erheblich, Zellschwellung und Verschiebung im Ionengleichgewicht sind die Folge [8]. Zu Beginn der Ischämie können diese Schäden in der Regel kompensiert werden, nach etwa 20 Minuten kommt es gehäuft zum Zelltod durch Apoptose und Nekrose [22,23]. Auf die zugrundeliegenden zellbiologischen Mechanismen wird im Folgenden näher eingegangen:

Bei anhaltender anaerober Stoffwechsellage fällt der intrazelluläre pH-Wert durch Glykogenverbrauch ab, die Myozyten versuchen die Azidose durch vermehrte Protonenionen ( $H^+$ ) Ausscheidung über einen passiven Natrium ( $Na^+$ )/ $H^+$  Antiporter zu kompensieren, weshalb neben den Zellen auch das extrazelluläre Gewebe azidotisch wird [24]. Durch den vermehrten  $Na^+$  Einstrom wird der sekundär-aktive  $Na^+$ /Calcium ( $Ca^{2+}$ ) Antiporter (NCX) aktiviert, tauscht also  $Ca^{2+}$  für  $Na^+$  nach intrazellulär und sorgt für eine Akkumulation von Calcium [25]. Unter Normalbedingungen würden ATP-abhängige Pumpen wie der  $Na^+$ /Kalium ( $K^+$ ) Antiporter auf der Zellmembran oder der  $Ca^{2+}$  Uniporter auf der mitochondrialen Membran die Verschiebung im Ionengleichgewicht wieder ausgleichen. In einem ischämischen Myozyten ist das aufgrund des ATP Mangels nur sehr eingeschränkt möglich, weshalb es zu einer intrazellulären  $Ca^{2+}$  Akkumulation kommt [26].

Das intrazellulär akkumulierte  $Ca^{2+}$  aktiviert wiederum Phospholipasen, Proteasen und Endonukleasen, die Apoptose und Nekrose im betroffenen Gewebeareal verursachen [27]. Darüber hinaus sorgt der hohe  $Ca^{2+}$  Spiegel für Hyperkontraktionen in den Myozyten und hebt die Offenheitswahrscheinlichkeit der mitochondrialen Permeabilitätspore (engl. mitochondrial permeability transition pore, mPTP) an [27,28]. Auf die Funktion der mPTP wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

Abbildung 1 fasst die unterschiedlichen Mechanismen myokardialer Ischämieschädigung wie auch der Reperfusionsschädigung zusammen.

Das azidotische Milieu hat zu Beginn aber auch eine protektive Wirkung auf die Myozyten: Eine Azidose hemmt sowohl den NCX als auch direkt die Aktivierung der mPTP [25,29]. Intrazelluläre Proteasen werden ebenfalls inhibiert [30].

Was passiert nun, wenn die Ischämie aufgehoben wird und es zu einer Reperfusion des vulnerablen Myokards kommt?

### **1.1.2 Myokardiale Schädigung bei Reperfusion**

Zahlreiche biophysiological Vorgänge sorgen für eine Schädigung der Myozyten während der Reperfusion. Als führend haben sich vor allem drei Mechanismen herausgestellt: Der rasche Anstieg des pH-Wertes, die Erhöhung der zellulären und mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS).

Mit der einsetzenden Reperfusion wird der Protonenionüberhang aus dem ischämischen Gewebe rausgewaschen, wodurch sich der pH-Wert rasch normalisiert [31]. Dies führt zur Aufhebung der zuvor erwähnten protektiven azidotischen Effekte und dadurch initial zu einer Erhöhung der Zelltoxizität, was allgemein als pH Paradoxon bezeichnet wird [32].

Weiterhin bewirkt der extrazelluläre pH-Anstieg über den bekannten  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporter eine vermehrte Sekretion von  $\text{H}^+$  Ionen nach extrazellulär. Die intrazellulär erhöhte  $\text{Na}^+$  Konzentration wird vermehrt durch den NCX ausgeglichen, was die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration weiter erhöht. Die Myozyten versuchen die Übersättigung durch  $\text{Ca}^{2+}$  Aufnahme über den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$  Uniporter auszugleichen [22]. Somit wird zu Beginn der Reperfusion der ohnehin hohe  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegel intrazellulär nicht gesenkt, sondern steigt weiter an [33]. Sein Maximum erreicht er 30 min nach Reperfusionbeginn, anschließend fällt er langsam ab [34].

Wie bei der Ischämie steigert der hohe  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegel die Hyperkontraktibilität der Myozyten und leitet über die Aktivierung von Phospholipasen, Proteasen und

Endonukleasen Apoptose- und Nekrosevorgänge im betroffenen Gewebegebiet ein [27,28].

Darüber hinaus steigert der hohe  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegel die Offenheitswahrscheinlichkeit der mPTP [35]. Die mPTP sitzt an der inneren Mitochondrienmembran und lässt Moleküle bis 1500 Dalton (Da) weitgehend unselektiv in das Mitochondrium [36]. Bei vermehrter Porenöffnung dringt Wasser in das Mitochondrium ein wodurch die Mitochondrienmatrix anschwillt, was über verschiedene Signalwege zum Untergang des Mitochondriums durch Zusammenbruch der Außenmembran führt [37]. Durch den Untergang eines Mitochondriums kommt zusätzliches  $\text{Ca}^{2+}$  in den Intrazellulärraum wodurch sich weitere mPTPs öffnen [38]. Neben  $\text{Ca}^{2+}$  Überladung führen viele Faktoren zur mPTP Öffnung, u.a. rapider pH-Anstieg, oxidativer Stress und hoher ATP Verbrauch [36,39,40]. Der zunehmende Mitochondrienverlust führt durch die Freisetzung diverser mitochondrialer Apoptose- und Nekrosefaktoren wie auch durch das Zusammenbrechen der oxidativen Phosphorylierung und damit des ATP Nachschubs zum Zelltod [36].

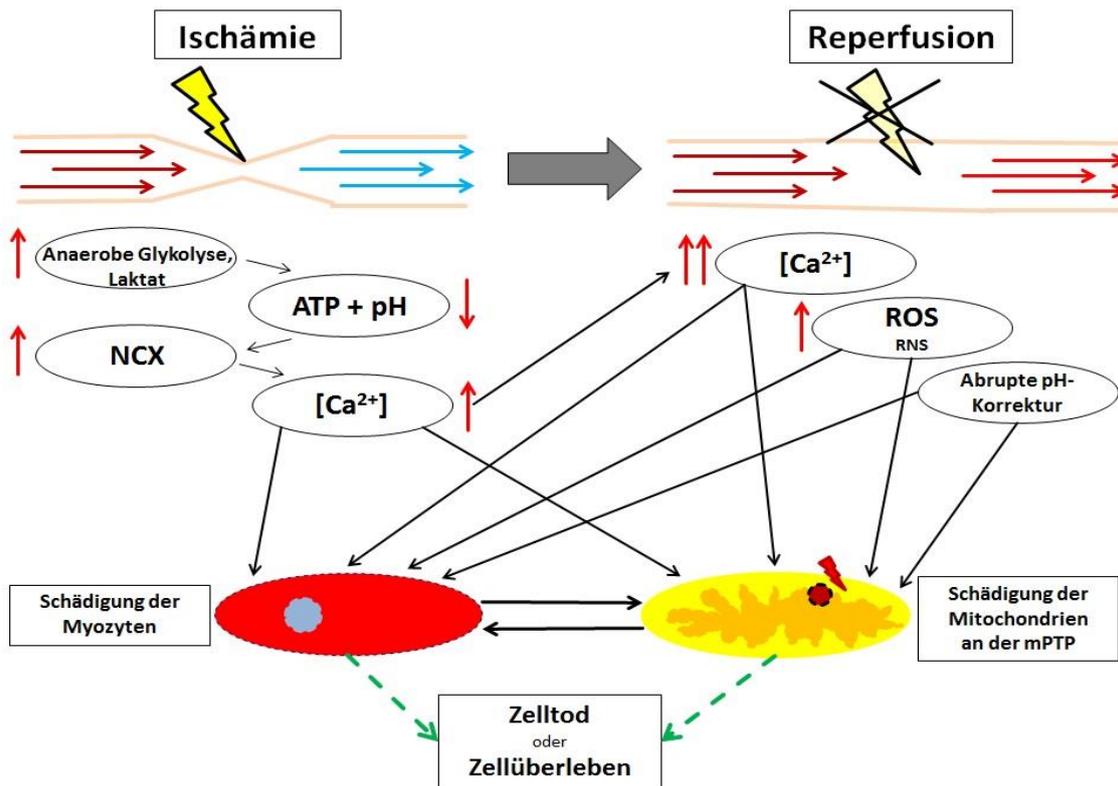
Weiterhin sorgt die Generierung von ROS für eine Schädigung der Myozyten indem sie die Plasmamembranen schädigen und so die Homöostase der einzelnen Zellkompartimente aus dem Gleichgewicht bringen [41].

Bei ROS handelt es sich um hochreaktive Moleküle, die aus Sauerstoff entstehen. Ihre Bildung wird in geringen Mengen physiologisch von der mitochondrialen Atmungskette, von der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase und von der Xanthin-Oxidase katalysiert [42].

Während der Reperfusion erhöht sich die Produktion von ROS deutlich: Die Xanthin-Oxidase wird durch den rasch ansteigenden Sauerstofflevel bei Wiederdurchblutung stark aktiviert [43]. Die Komplexe der Atmungskette produzieren mehr Sauerstoffradikale, da die Mitochondrien in ihrer physiologischen Struktur durch Ischämie und Reperfusion geschwächt sind. Diese ROS fördern wiederum die Öffnung der mPTP [44,45]. Die NADPH-Oxidase wird vor allem von inflammatorischen Zellen wie Leukozyten verwendet, die bei Reperfusion in das vulnerable Gewebe migrieren [22,46].

Weiterführend können ROS die vulnerablen Myozyten auch auf anderen Wegen schädigen, bei denen reaktive Nitrogen Spezies (engl. reactive nitrogen species, RNS) eine wichtige Rolle spielen [47].

Abbildung 1 fasst die unterschiedlichen Mechanismen myokardialer Ischämie- und Reperfusionsschädigung schematisch zusammen.



**Abbildung 1 (modifiziert nach [48] und [22]): Schematische Übersicht der molekularen Vorgänge bei myokardialer Ischämie- und Reperfusionsschädigung**

Das anaerobe Milieu während einer Ischämie sorgt fortlaufend für einen Mangel an ATP und begünstigt eine intrazelluläre Azidose. Das saure Umfeld sorgt für eine verstärkte Aktivierung des NCX (sekundär-aktiver Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Antiporter) und darüber zu einer intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Überladung.

In ischämisch vorgeschädigtem Gewebe verstärkt sich während der Reperfusion die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Überladung und es werden verstärkt ROS (reactive oxygene species) und RNS (reactive nitrogen species) gebildet. Durch diese molekularen Vorgänge kommt es zu einer (un-)mittelbaren Schädigung der Myozyten. Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Überladung, ROS und RNS erhöhen die Offenheitswahrscheinlichkeit der mPTP (mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore) und können so die Mitochondrien irreversibel schädigen. Der abrupte Anstieg des sauren pH-Wertes während der Reperfusion hat paradoxerweise ebenfalls eine toxische Wirkung auf die Myozyten und die Mitochondrien.

Dauer und Intensität des I/RI beeinflusst maßgeblich Tod bzw. Überleben der Myozyten.

## **1.2 Kardioprotektion durch Präkonditionierung**

Kardiale Präkonditionierung beschreibt einen Vorgang, bei dem bestimmte Reize im Myozyten Prozesse auf molekularbiologischer Ebene einleiten, die zeitlich begrenzt ihre Toleranz vor weiteren Schäden durch Ischämie und Reperfusion erhöhen. Durch diesen endogenen Schutzmechanismus können die Myozyten ihre zelluläre Integrität bei einer darauffolgenden Ischämie länger bewahren, wodurch Folgeschäden wie Funktionsverlust, Arrhythmien und Herzinfarktgröße deutlich vermindert werden können [49-52].

Zur Induktion einer Präkonditionierung können sowohl kurze Ischämiephasen als auch diverse pharmakologische Wirkstoffe verwendet werden.

Die Präkonditionierung durch Ischämie wird daher als ischämische Präkonditionierung (engl. ischemic preconditioning, IPC) bezeichnet.

Die Präkonditionierung durch Pharmaka wird als pharmakologische Präkonditionierung bezeichnet. Dazu gehören neben Wirkstoffen wie Adenosin [53], Acetylcholin [54], Katecholamine [55], Bradykinin [56], Angiotensin II [57], Opioiden [58] und Endothelin-1 [59] auch die Gruppe der volatilen Anästhetika wie Halothan, Isofluran, Desfluran und Sevofluran [60]. Die Präkonditionierung durch diese Gruppe wird als Anästhetika-induzierte Präkonditionierung (engl. anesthetic-induced preconditioning, APC) bezeichnet.

Grundlagen und Mechanismen von IPC und APC werden im Folgenden kurz vorgestellt.

### **1.2.1 Kardioprotektion durch ischämische Präkonditionierung**

Murry et al. zeigten im Jahre 1986 zum ersten Mal, dass Hundeherzen durch mehrere kurze Ischämiephasen mit anschließender Reperfusion (vier Zyklen, jeweils fünf Minuten) um ein Viertel weniger Folgeschäden durch einen potentiell tödlichen I/RI erleiden als eine Kontrollgruppe ohne diese Intervention [61]. Dieser Versuch gilt als Geburtsstunde der induzierbaren Kardioprotektion. Während sich Murry et al. bei ihren Untersuchungen stets auf IPC und I/RI im Versorgungsgebiet eines Herzkranzgefäßes konzentrierten, konnten Przyklenk

et al. 1993 zeigen, dass IPC an einem Herzkranzgefäß auch das Myokardgewebe im Versorgungsgebiet eines anderen nicht-konditionierten Herzkranzgefäßes, in welchem ein akuter I/RI induziert wurde, vor den Folgeschäden schützt [62]. Somit war klar, dass IPC für eine gefäßunabhängige Protektion des Herzgewebes sorgt.

Gho et al. zeigten drei Jahre später, dass IPC an Intestinalgefäßen signifikant protektiv auf das Myokard bei einem konsekutiven I/RI Schaden wirkt [63]. Der IPC Stimulus kann somit auch entfernt vom Herzen erfolgen und hat dennoch eine kardioprotektive Wirkung sowohl bei Durchführung vor einem kardialen I/RI, als auch während eines kardialen I/RI [64]. Dieses Phänomen wird ischämische Fernpräkonditionierung (engl. remote ischemic preconditioning, RIPC) genannt und funktioniert auch in zahlreichen Gewebsstrukturen und Organen außerhalb des Herzens [65].

Unabhängig vom Stimulationsort ist die kardioprotektive Wirkung bei IPC zeitlich auf zwei Wirkungsfenster begrenzt: Das erste Wirkungsfenster öffnet sich direkt nach IPC und schließt sich zwei Stunden später [66]. Das zweite Wirkungsfenster öffnet sich nach 24 Stunden und schließt sich ungefähr 48 Stunden später [67,68]. Im Zeitraum zwischen beiden Fenstern findet keine signifikant messbare Kardioprotektion statt [69]. Zwar variieren die Angaben für die Wirkdauer des zweiten Fensters je nach Untersuchungsmodell von 12 bis 72 Stunden, der biphasische Verlauf der IPC konnte dabei aber durchgehend reproduziert werden [70].

Der Vollständigkeit halber soll nicht unerwähnt bleiben, dass das Myokard nicht nur durch Präkonditionierung sondern auch durch Postkonditionierung vor I/RI geschützt werden kann: Zhao et al. zeigten im Jahre 2003, dass repetitive ischämische Stimuli in der Frühphase der Reperfusion die Herzinfarktgröße im Kaninchenherz deutlich reduzieren konnten [71]. Die Autoren dieser Studie nannten den Effekt ischämische Postkonditionierung (engl. ischemic postconditioning, IPOST). In den darauffolgenden Jahren wurde die kardioprotektive Wirkung von IPOST in allen gängigen Versuchstierspezies nachgewiesen [72].

IPC wirkt räumlich unabhängig vom Stimulationsort in einem frühen und einem späten Zeitfenster kardioprotektiv. Zahlreiche Signalwege und Wirkungskaskaden, die diese Effekte auf zellulärer Ebene vermitteln, wurden in den vergangenen Jahren identifiziert und werden in einer kurzen Übersicht unter Berücksichtigung der biphasischen Komponente vorgestellt:

Eine Ischämie mit anschließender Reperfusion bewirkt eine erhöhte endogene Ausschüttung von zahlreichen Triggersubstanzen wie Adenosin, Opioiden, Stickstoffmonoxid (engl. nitric oxide, NO), ROS und von Zytokinen wie Interleukin-6 oder Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  [73]. Durch Ausschüttung dieser Substanzen werden zumeist über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (engl. G protein-coupled receptors, GPCR) Proteinkinasen aktiviert, die als Mediatoren für die Kardioprotektion gesehen werden. Unter ihnen spielen Proteinkinase C (PKC) und Tyrosinkinase eine zentrale Rolle [74,75], ebenso die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), deren regulative Funktionen noch nicht im Detail verstanden sind [76-78]. Zuletzt spielt der Phosphatidyl Inositol 3-OH Kinase (PI3K)-Akt Signalweg eine wichtige Rolle als Mediator der IPC und zwar sowohl vor dem ischämischen Ereignis als auch während der Reperfusion [79,80].

Neben diesen Mediatoren gibt es noch zahlreiche unmittelbare Effektoren, die über physiologische Zellveränderungen vorrangig protektiv am Myokard nach IPC wirken:

Ein wichtiger Effektor sind ROS, deren Produktion nach IPC kurzzeitig ansteigt, dafür zu Beginn des I/RI deutlich niedriger ausfällt als in unbehandelten Kontrolltieren [81]. Dies ist vereinbar mit der Beobachtung, dass große Mengen ROS während der Reperfusion die Zelle schädigen (s. Punkt 1.1.2), dagegen kleine Mengen während IPC protektiv auf die Zelle wirken [82,83]. Des Weiteren senkt IPC die Offenheitswahrscheinlichkeit der mPTP [84]. Dies kommt vor allem dadurch zu Stande, dass in IPC vorbehandelten Herzen während I/RI die pH-Wert Schwankung geringer ausfällt [85], intrazellulär weniger  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen akkumulieren [86] und der ATP-Verbrauch erniedrigt ist [87]. Weiterhin werden bei IPC ATP-regulierte Kalium Kanäle ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) an

Sarkolemm- und Mitochondrienmembran vermehrt geöffnet und dadurch ebenfalls eine Kardioprotektion erzielt [88,89].

Die aufgeführten kardioprotektiven Effekte finden vor allem in der Frühphase, dem ersten Fenster der IPC, statt. Das verzögerte, zweite Fenster entsteht dadurch, dass die Proteinkinasen zusätzlich Transkriptionsfaktoren wie Nucleärer Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), Aktivator protein-1 (AP-1) oder Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) aktivieren [90-92]. Diese Transkriptionsfaktoren fördern die Synthese von kardioprotektiven Substanzen. Hierzu zählen unter anderem Hitze Stress Proteine (HSP), induzierte Stickstoff-Monoxid Synthase (engl. inducible nitric oxide synthase, iNOS) und die Cyclooxygenase 2 (COX-2) [93-95].

### **1.2.2 Kardioprotektion durch Anästhetika-induzierte Präkonditionierung**

Im Jahre 1988, also zwei Jahre nach Entdeckung der IPC durch Murry et al., zeigten Warltier et al., dass durch Gabe von Halothan sowie Isofluran vor einer Koronararterienokklusion mit einer Dauer von fünf bis 15 min die Myokardfunktion um bis 50 Prozent weniger einschränkt als bei Verzicht auf die Anästhetika [96]. Aufgrund der definitionsgemäß kardiosuppressiven Effekte von volatilen Anästhetika, die sich unter anderem in Senkung der Herzfrequenz und Kontraktilität sowie Relaxation der Koronararterien zeigen, war zunächst unklar ob das *myocardiale stunning* als wirkliche Präkonditionierung anzusehen ist [97]. Beinahe ein Jahrzehnt später konnten Kersten et al. im Jahre 1997 zeigen, dass Isofluran über  $K_{ATP}$  Kanäle die Infarktgröße im Hundeherz ähnlich stark reduziert wie bei IPC, an APC gab es somit keinen Zweifel mehr [60,98].

In der Folgezeit konnte in unterschiedlichen Tierstudien nachgewiesen werden, dass APC grundsätzlich von allen klinisch relevanten volatilen Anästhetika wie Desfluran, Isofluran, Sevofluran und auch Halothan vermittelt werden [6,99,100]. Unter den volatilen Anästhetika gibt es allerdings Unterschiede in der Wirksamkeit hinsichtlich Infarktgrößenreduktion:

Redel et al. haben im Mausmodell *in vivo* gezeigt, dass vor allem Desfluran und Sevofluran die Infarktgröße vergleichbar mit IPC reduzieren, während Isofluran nur eingeschränkt wirkt [101].

Die Dosis-Wirkungs-Beziehung von APC wurde von Kehl et al. an Hundeherzen mit Isofluran getestet. Es zeigte sich, dass es bei einmaliger Applikation eine Schwellendosis zur Kardioprotektion bei 0,25 minimaler alveolärer Konzentration (MAC) gibt. Bei dieser Applikationsmenge kam es zu einer signifikanten Reduktion der Herzinfarktgröße während Dosissteigerungen bis 1,25 MAC zu keiner weiteren Infarktgrößenreduktion führten [102].

Die Zeit-Dosis-Wirkungs-Beziehung von APC wurde von Lange et al. an Kaninchenherzen *in vivo* mit Desfluran getestet: Es zeigte sich, dass es bei einmaliger Applikation eine Schwellendosis gibt, die zwischen 0,5 und 1,0 (MAC) liegt und unabhängig von der Begasungszeit (30 und 90 min) und einer Dosissteigerung auf 1,5 MAC ist. Bei einer repetitiven Begasung (3 Zyklen von jeweils 10 min mit 10 min Pause) kam es bei 0,5 MAC zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion, während die Wiederholungen bei höheren alveolären Gaskonzentrationen im Vergleich zur Einmalgabe keine weitere Verbesserung zeigten. Desfluran hat somit für die APC eine Schwellendosis, die durch wiederholte Verabreichung gesenkt werden kann [103].

Ähnlich der IPC ist die kardioprotektive Wirkung durch volatile Anästhetika bei der APC zeitlich auf zwei Wirkungsfenster begrenzt: Smul et al. haben mit Desfluran am Kaninchenherzen *in vivo* gezeigt, dass sich ein erstes Wirkungsfenster direkt nach APC öffnet und für 2 Stunden anhält. Ein zweites Wirkungsfenster öffnet sich nach 24 Stunden und hält 48 Stunden an. Im Zeitraum zwischen beiden Fenstern und nach dem zweiten Fenster findet keine signifikante Kardioprotektion statt [104]. Diese Beobachtung konnten Redel et al. mit Desfluran am Mäuseherz *in vivo* bestätigen [105].

Der Vollständigkeit halber soll nicht unerwähnt bleiben, dass volatile Anästhetika das Myokard nicht nur durch Präkonditionierung sondern auch durch Postkonditionierung vor I/RI schützen können: Schlack et al. zeigten im Jahre 1996, dass durch Applikation von Halothan in der Frühphase der Reperfusion die Herzinfarktgröße im isolierten Kaninchenherz deutlich reduziert

[106]. Dieser Effekt wird Anästhetika-induzierte Postkonditionierung (engl. anesthetic-induced postconditioning, APOST) genannt. APOST kann mit den gängigen volatilen Anästhetika vermittelt werden [107]. In den darauffolgenden Jahren wurde die kardioprotektive Wirkung von IPOST in diversen Versuchstierspezies wie Kaninchen, Ratte und Maus *in vivo* bestätigt [108-110]. APC wirkt biphasisch in einem frühen und einem späten Fenster kardioprotektiv. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Signalwege und Wirkungskaskaden identifiziert, die deutliche Parallelen zu den Mechanismen bei IPC aufweisen. Im Folgenden wird eine kurze Übersicht über die wichtigsten gegeben:

Volatile Anästhetika können sowohl frei durch die Zellmembran diffundieren als auch transzellulär über GPRCs wirken [111]. Unter den GPRCs wurden bisher der Adenosin A<sub>1</sub> Rezeptor, die inhibitorischen G-Proteine, der adrenerge α<sub>1</sub> Rezeptor, der Opioid δ<sub>1</sub> Rezeptor sowie der β-adrenerge Rezeptor als Mediatoren der APC identifiziert [112-115]. Intrazellulär spielen ROS eine wichtige Rolle bei der Kardioprotektion: Volatile Anästhetika fördern die Bildung von ROS in kleinen Mengen [116], werden ROS dagegen bei APC abgefangen verringert dies den kardioprotektiven Effekt deutlich [117]. Die geringen Mengen an ROS sind an der Aktivierung verschiedener Kinasen und Signalwege wie PKC [118], Tyrosinkinase [119], MAPK [120] und (PI3K)-Akt [121] zur Kardioprotektion beteiligt.

Zu den wichtigsten Effektoren der APC-vermittelten Kardioprotektion zählen die K<sub>ATP</sub> Kanäle. Sie werden nicht direkt durch volatile Anästhetika, sondern durch verschiedene Kinasen und Signalwege geöffnet [122,123]. Dazu zählen neben den oben genannten auch die Proteinkinase A (PKA) [124], COX-2 [125] und NOS [126]. Unter den beiden Subtypen der K<sub>ATP</sub> Kanäle scheint APC mehr über den mitochondrialen als über den sarkolemmalen Subtyp vermittelt zu werden [122]. Auch wenn der Mechanismus der mitochondrialen K<sub>ATP</sub> Kanäle nicht vollständig verstanden ist, sind in den letzten Jahren zahlreiche protektive Eigenschaften beschrieben worden: So führt die Öffnung der Kanäle unter anderem zur Reduktion der mitochondrialen Ca<sup>2+</sup> Ionenmenge, zur Drosselung der Atmungskette, zur Einsparung von ATP und zur erhöhten

Widerstandsfähigkeit gegen oxidativen Stress [127-130]. Darüber hinaus tragen  $K_{ATP}$  Kanäle teilweise dazu bei, dass die Offenheitswahrscheinlichkeit der mPTP gesenkt wird [131,132].

Die aufgeführten Mechanismen bewirken vor allem in der Frühphase, dem ersten Fenster der APC, kardioprotektive Effekte. Das verzögerte, zweite Fenster entsteht dadurch, dass die Proteinkinasen und mitochondrialen  $K_{ATP}$  Kanäle zusätzlich die Transkription wichtiger Faktoren modulieren: HIF-1 $\alpha$  und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (engl. vascular endothelial growth factor, VEGF) werden hochreguliert [133]. NF- $\kappa$ B wird ebenfalls stark beeinflusst wobei bis jetzt noch nicht genau geklärt ist ob es in der Summe APC- bedingt eher hoch- oder runterreguliert wird [134,135]. Diese Transkriptionsfaktoren fördern die Synthese von kardioprotektiven Substanzen. Hierzu zählen unter anderem ROS und COX-2 [136,137], ebenso werden die mitochondrialen  $K_{ATP}$  Kanäle für weitere Öffnungen sensibilisiert [111].

Eine spezielle Rolle bei der verzögerten Kardioprotektion nimmt NO ein: Redel et al. haben 2013 am Mäuseherz gezeigt, dass die verzögerte APC durch iNOS ausgelöst wird und dieser Vorgang unabhängig von der frühen APC durch endotheliale NOS abläuft [105].

Eine weitere wichtige Rolle bei der APC spielt der  $\beta$ -adrenerge Rezeptor ( $\beta$  – AR) vermittelte Signalweg. Im Myokard dominiert der  $\beta_1$  –AR mit 80%, während 20 % auf den  $\beta_2$  –AR fallen [138]. Die transmembranären  $\beta$  –AR sind größtenteils mit stimulierenden GPCR verbunden. Über mehrere Zwischenschritte aktivieren diese die PKA. Nach Aktivierung phosphoryliert die PKA unter anderem die sarkolemmalen L-Typ Calciumkanäle [139], Ryanodinrezeptoren [140] und das Phospholamban (PLB) am sarkoplasmatischen Retikulum [141]. Dies führt zu einer gesteigerten Aufnahme, Sensitivität und Verarbeitung von intrazellulärem  $Ca^{2+}$  und vermittelt so positive chronotrope, inotrope und lusitrope Effekte am Herzen [142]. Weiterhin kann der  $\beta$  –AR auch unabhängig vom PKA-Signaltransduktionsweg die Calcium-Calmodulinkinase II (CaMKII) aktivieren, die eine Schlüsselposition im intrazellulären  $Ca^{2+}$  Haushalt einnimmt [143]. Die Funktion der CaMKII wird ausführlich bei Punkt 1.3 besprochen. Lange et al. konnten 2006 zeigen, dass

eine selektive Blockade des  $\beta_1$ -AR vermittelten Signalweges mit Esmolol im Kaninchenherzen *in vivo* die APC aufhebt während es auf die IPC nur einen geringen Einfluss gehabt hat [144]. Eine selektive Blockade des PKA-Signaltransduktionsweges mit H-89 hat ebenfalls die APC aufgehoben während es auf die IPC keinen Einfluss hat [144]. In weiteren *in vivo* Studien am Kaninchenherz hat die gleiche Arbeitsgruppe gezeigt, dass eine selektive Blockade des  $\beta_2$ -AR vermittelten Signalweges mit ICI 118,551 den kardioprotektiven Effekt durch APC ebenso aufgehoben hat wie eine selektive Blockade der CAMKII mit KN-93 [103,145]. Diese Ergebnisse zeigen, dass der  $\beta_1$ -AR vermittelte Signalweg eine zentrale Rolle bei der APC, nicht aber bei der IPC einnimmt [144].

### **1.2.3 Klinische Studien zur Kardioprotektion durch Präkonditionierung**

Kardioprotektion durch Präkonditionierung ist auch in der Klinik durchgeführt worden. Bei der Umsetzung des Konzeptes vom Tiermodell auf den Menschen gibt es einige Unterschiede: Aus ethischen Gesichtspunkten verbietet es sich akute Myokardinfarkte beim Menschen gezielt zu induzieren, ebenso sind sie in der Regel nicht vorhersehbar. Somit kann Präkonditionierung grundsätzlich nur bei elektiven Interventionen am vorgeschädigten Herz angewendet werden. Zusätzlich bringen Patienten mit elektiven Herzoperationen in der Regel eine Vielzahl an Komorbiditäten und Komedikationen mit, welche die Präkonditionierung beeinflussen können [60]. Weiterhin können die Infarktgrößen am Ende einer Studie in der Regel nicht direkt durch Herzentnahme ermittelt werden, sondern müssen anhand anderer Parameter wie z.B. Veränderungen der Biomarker (z.B. Creatinkinase, Troponin, Laktat) oder Bildgebung (z.B. Computertomographie, Magnetresonanztomographie) indirekt abgeleitet werden [146].

Trotz dieser erschwerten Voraussetzungen konnten zahlreiche Studien eine kardioprotektive Wirkung von IPC, RIPC und APC am Menschen zeigen:

1990 konnten Deutsch et al. IPC in einer Studie nachweisen [147]. Dazu wurde nach einer notwendigen Koronararterienokklusion im Rahmen einer perkutanen

transluminalen Koronarangioplastie eine weitere Okklusion von 90 Sekunden durch Ballondilatation herbeigeführt. In der zweiten ischämischen Episode besserten sich die elektrokardiographischen (S-T-Hebung), hämodynamischen (mittlerer pulmonaler arterieller Druck), metabolischen (Laktatproduktion) und subjektiven (pektangiose Beschwerden) Parameter im Vergleich zur ersten ischämischen Episode [147]. Weitere Studien konnten diese Beobachtung stützen [148-150].

In der koronararteriellen Bypass Chirurgie hat IPC ebenfalls eine protektive Wirkung auf das Myokard, was zuerst Yellon et al. 1993 zeigen konnten und in weiteren Studien bestätigt wurde [151-154]. Eine systemische Meta-Analyse zur IPC bei Herzoperationen aus 22 Studien mit insgesamt 933 Patienten hat ergeben, dass sich IPC das Aufkommen ventrikulärer Arrhythmien reduziert, den Bedarf an inotroper Unterstützung senkt und mit einer kürzeren Verweildauer auf der Intensivstation einhergeht [155].

RIPC wird durch eine mechanische, non-invasive Ischämie mit anschließender Reperfusion an Arm oder Bein durchgeführt. Kardioprotektive Effekte wurden mit dieser Methode bisher bei koronararteriellen Bypässen, herzchirurgischen Eingriffen, elektiven perkutanen Koronarangioplastien und akuten perkutanen Koronarinterventionen ermittelt [146].

Zur positiven kardiogenen Wirkung von APC beim Menschen ist im Jahre 1999 die erste Studie veröffentlicht worden: Belhomme et al. zeigten, dass bei koronararteriellen Bypass Operationen eine Gabe von 2,5 MAC Isofluran über fünf Minuten und eine anschließende Auswaschphase von zehn Minuten zu einer signifikant niedrigeren Troponin I Freisetzung führt als bei der Vergleichsgruppe ohne Isofluran [156]. In den Folgejahren sind weitere Studien, zumeist bei elektiven koronararteriellen Bypass Operationen, durchgeführt worden, die zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen sind: De Hert et al. konnten eine kardioprotektive Wirkung (reduziertes Troponin I, kürzere Verbleib auf Intensivstation) von Sevofluran nur nachweisen, wenn es kontinuierlich während der Eingriffe verabreicht, nicht jedoch wenn es kurz vor dem Eingriff gegeben wurde [157]. Dagegen kamen Bein et al. in einer ähnlichen Studie zu dem Ergebnis, dass Sevofluran bei Applikation kurz vor Eingriff eine höhere

kardioprotektive Wirkung (reduziertes Troponin T und Creatinkinase-MB, erhöhte Herzleistung) erzielt als bei kontinuierlicher Gabe [158]. Weitere Studien zeigen dass APC auch mit Desfluran und Isofluran eine kardioprotektive Wirkung haben [159-161]. Garcia et al. zeigten 2005, dass bei einer APC mit Sevofluran kardiale Komplikationen wie Myokardinfarkte oder Herzrhythmusstörungen auch noch ein Jahr postoperativ signifikant seltener auftreten als bei Placebogabe [162].

In vier Metaanalysen wurde die kardioprotektive Wirkung von volatilen Anästhetika und totaler intravenöser Anästhesie verglichen [163-166]. Nur eine Analyse aus 22 Studien mit 1922 Patienten konnte eine signifikante Reduktion beim Auftreten postoperativer Myokardinfarkte und Mortalität bei volatilen Anästhetika im Vergleich zur totalen intravenöser Anästhesie feststellen [165].

Allerdings sind eine Vielzahl dieser Studien, die ein Präkonditionierung proklamieren, im Bezug auf APC mit Vorsicht zu genießen: Für eine korrekte Anästhetika induzierte Präkonditionierung muss auf die Gabe der volatilen Anästhetika eine Auswaschphase folgen bevor der I/RI Stimulus gesetzt wird, was oft nicht beachtet wurde [60]. Gleichzeitig werden bei vielen Studien die volatilen Anästhetika nicht nur vor, sondern auch während der gesamten Operation appliziert was eine Differenzierbarkeit der gemessenen Effekte stark einschränkt und so eine Peri- statt Präkonditionierung in den Vordergrund hebt [167]. Weiterhin wird die Anästhesie nach APC oft mit Propofol aufrechterhalten, das zumindest bei der RIPC die kardioprotektive Wirkung einzuschränken scheint [168,169].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass von einer kardioprotektiven Wirkung von APC zum gegenwärtigen Zeitpunkt beim Menschen ausgegangen werden kann, aufgrund zahlloser unkalkulierbarer Einflussfaktoren die Wirkung allerdings nicht mit letzter Sicherheit bewiesen ist.

## 1.3 Calcium-Calmodulinkinase II

$\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind an zahlreichen intrazellulären Transportprozessen beteiligt und nehmen die Schlüsselfunktion bei der elektromechanischen Kopplung, also der Übersetzung elektrischer Aktionspotentiale in mechanische Muskelkontraktionen, ein. Dies gilt insbesondere für das Myokard [170]. Zahlreiche Transportsysteme und Proteine sind am zellulären Influx und Efflux sowie an der intrazellulären Umverteilung von  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen beteiligt und halten so den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegel bedarfsgerecht im Gleichgewicht [142]. Von elementarer Bedeutung für die intrazelluläre Verteilung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist die Calcium-Calmodulinkinase II (CaMKII), von der vier homologe Genvarianten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  beschrieben sind [171]. Im Myokard findet sich hauptsächlich die Genvariante CaMKII $\delta$  [172].

Im Folgenden wird die Struktur und Funktion der myokardialen CaMKII $\delta$  erläutert und ein Einblick in die Rolle der CaMKII $\delta$  bei I/RI und Kardioprotektion gegeben.

### 1.3.1 Struktur der CaMKII $\delta$ im Herzen

Jedes CaMKII $\delta$  Monomer besteht aus einer katalytischen, einer regulatorischen und einer assoziierenden Domäne [173]. An der assoziierenden Domäne binden sich sechs bis zwölf Monomere radspeichenförmig zum multifunktionellen CaMKII $\delta$  Holoenzym zusammen [174]. Durch eine autoinhibitorische Region auf der regulatorischen Domäne ist die CaMKII $\delta$  zunächst inaktiv [175]. Aktiviert wird sie durch ein  $\text{Ca}^{2+}$  /Calmodulin Protein, das ebenfalls an der regulatorischen Domäne bindet, woraufhin es dort durch Phosphorylierung zu einer Konformationsänderung und einer damit einhergehenden Aufhebung der Autoinhibition kommt [176].

Calmodulin ist ein intrazelluläres Protein, das an insgesamt vier Bindungsstellen hochaffin  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen bindet [176]. Bei einer ausreichend hohen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration kann somit die Affinität vom  $\text{Ca}^{2+}$  /Calmodulin Komplex zur CaMKII $\delta$  um das 700-fache steigen was zu einer effektiven Aktivierung der CaMKII $\delta$  führt [177,178]. Bei Aktivierung erhalten die

katalytischen Domänen durch Konformationsänderung Zugang zu ihren Zielproteinen [178]. Weiterhin kann sich die CaMKII<sub>δ</sub> nach Aktivierung an der Aminosäure Threonin 287 autophosphorylieren und im Anschluss Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin unabhängig wirken [179]. Selbst nach Abfall der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration und der damit verbundenen Dissoziation von Calmodulin kann sie ihre Aktivität für kurze Zeit aufrechterhalten [180]. Deaktiviert wird CaMKII<sub>δ</sub> erst durch Dephosphorylierung der Autophosphorylierungsstelle [181].

### 1.3.2 Funktion der CaMKII<sub>δ</sub> im Herzen

Die Funktion der CaMKII<sub>δ</sub> im Myokard ist maßgeblich mit dem intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Haushalt beim Zustandekommen der elektromechanischen Koppelung verbunden: Aktionspotentiale treffen auf spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle, die Ca<sup>2+</sup> Ionen in geringen Mengen ins Zytosol freisetzen. Diese Ionen triggern über kardiale Ryanoidin Rezeptoren (RyR2) eine massive Ca<sup>2+</sup> induzierte Ca<sup>2+</sup> Ionenfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Darüber hinaus strömt Ca<sup>2+</sup> über den membranösen sekundär-aktiven Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Antiporter (NCX) in geringen Mengen ins Zytosol [182]. Die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Konzentration steigt dadurch von 10<sup>-7</sup> mol/l auf 10<sup>-5</sup> mol/l woraufhin Ca<sup>2+</sup> Troponin C vermittelt den Gleifilamentmechanismus zur Herzmuskelkontraktion ermöglicht [170]. Zur Beendigung der Kontraktion muss die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Konzentration wieder auf Ausgangsniveau gesenkt werden. Dies geschieht zum einen durch die Ca<sup>2+</sup>-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (engl. sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase, SERCA2a) zurück in das sarkoplasmatische Retikulum und zum anderen über den NCX zurück in den Extrazellulärraum [183].

Die CaMKII<sub>δ</sub> moduliert die elektromechanische Kopplung durch Phosphorylierung zentraler Ca<sup>2+</sup> regulierender Proteine:

In spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle sorgt sie durch direkte Phosphorylierung dafür, dass die Kanäle nach Eintreffen eines Aktionspotentials häufiger und länger geöffnet bleiben wodurch vermehrt Ca<sup>2+</sup> Ionen nach intrazellulär einströmen können [184-186].

In RyR2 sorgt sie durch Phosphorylierung an der Aminosäurestelle Serin 2814 dafür, dass die Sensitivität und die Öffnungswahrscheinlichkeit der Rezeptoren für  $\text{Ca}^{2+}$  erhöht wird wodurch  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen vermehrt aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ins Zytoplasma ausströmen [187,188].

In SERCA2a sorgt sie dafür, dass die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$  Ionenpumpe gesteigert wird wodurch  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen vermehrt in das sarkoplasmatische Retikulum zurückgepumpt werden und somit die myokardiale Relaxation beschleunigt wird [189]. Dies geschieht allerdings nur indirekt durch die Phosphorylierung von Phospholamban (PLB): PLB ist im unphosphorylierten Zustand ein endogener Inhibitor der SERCA2a [190]. Die  $\text{CaMKII}_\delta$  phosphoryliert PLB an der Aminosäurestelle Threonin 17 und hebt somit die Inhibition der SERCA2a auf [191]. Die PKA als Bestandteil des  $\beta_1$  –AR vermittelten Signalweges phosphoryliert PLB an der Aminosäurestelle Serin 16 und kann damit ebenso die Inhibition der SERCA2a aufheben [192]. Die Aktivierung der  $\text{CaMKII}_\delta$  kann neben einem raschen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration auch indirekt über den  $\beta_1$  –AR vermittelten Signalweg, der ebenfalls die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration erhöht, erfolgen [193]. Somit kann die Aktivität der SERCA2a über zwei ineinandergreifende Signalwege moduliert werden.

Neben ihrer zentralen Rolle im intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Haushalt scheint die  $\text{CaMKII}_\delta$  in die Regulation weiterer kardialer Proteinkanäle involviert zu sein: Sowohl für die  $\text{Na}^+$  als auch für einige  $\text{K}^+$  Kanäle gibt es starke Hinweise auf eine unmittelbare Beteiligung und Regulation durch die  $\text{CaMKII}_\delta$  [194,195]. Eine direkte Phosphorylierungsstelle wurde allerdings bis heute für keine der beiden Kanaltypen identifiziert.

Abbildung 2 zeigt die wesentlichen Effekte der  $\text{CaMKII}_\delta$  in der Herzmuskelzelle.



### 1.3.3 CaMKII<sub>δ</sub> bei Ischämie/Reperfusionsschäden und Kardioprotektion

Bei myokardialen I/RI kommt es über verschiedene Mechanismen zu einer intrazellulären Überladung mit Ca<sup>2+</sup> Ionen. Der hohe Ca<sup>2+</sup> Level sorgt auf unterschiedlichen Wegen für eine Schädigung des Myokards, unter anderem durch Hyperkontraktur, Aktivierung der mPTP und Stimulierung der ROS (siehe Kapitel 1.1). Als ein zentrales Steuerelement des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Haushalts spielt die CaMKII<sub>δ</sub> eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von I/RI.

Anhand der Phosphorylierung von Threonin 17 am PLB haben verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt, dass sich die Aktivität der CaMKII<sub>δ</sub> während der Ischämie und in den ersten Minuten der Reperfusion erheblich steigert [196-198]. Diese starke Aktivierung der CaMKII<sub>δ</sub> scheint sowohl protektive als auch destruktive Effekte auf den I/RI zu haben.

Bei kurzen, reversiblen I/RI überwiegen die protektiven Effekte: Die Phosphorylierung von Threonin 17 ist bei *myocardialem stunning* essentiell für die Wiederherstellung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Gleichgewichts durch verstärkte Ca<sup>2+</sup> Wiederaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum. Daraus resultiert trotz ischämiebedingter Azidose eine Normalisierung der Kontraktionsfähigkeit des Myokards [199-201].

Bei einer längeren Ischämie/Reperfusionsdauer (45/120 min) überwiegen destruktive Effekte: Vila-Petroff et al. haben am isolierten Rattenherz *in vitro* gezeigt, dass die selektive Blockade der CaMKII<sub>δ</sub> mit KN-93 oder dem CaMKII<sub>δ</sub> inhibitorischen Peptid zu einer deutlichen Reduktion der Herzinfarktgröße, einem Absinken von Apoptose- und Nekrosefaktoren sowie einer schnelleren Besserung der kontraktile Funktion nach I/RI führen [198]. Ling et al. kamen bei einer Studie mit selektiven CaMKII<sub>δ</sub> Knock-out Mäusen zu einem vergleichbaren Ergebnis [202]. Erklärt werden die schädlichen Effekte mit der CaMKII<sub>δ</sub> abhängigen intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Überladung bei einer Ischämiedauer von mehr als 20 Minuten [203]: Neben der gesteigerten Wiederaufnahme von Ca<sup>2+</sup> Ionen durch die CaMKII<sub>δ</sub> werden vermehrt RyR2 aktiviert [188]. Durch eine abrupte Ca<sup>2+</sup> Freisetzung nach intrazellulär gerät das Ca<sup>2+</sup> Gleichgewicht bei einsetzender Reperfusion aus dem Gleichgewicht und führt bereits in der Frühphase zu Beeinträchtigungen wie Arrhythmien [204].

Bei der Präkonditionierung scheint die CaMKII $\delta$  eine wichtige Rolle in der Vermittlung kardioprotektiver Effekte zu spielen:

Für die IPC konnten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander am Rattenherz *in vitro* zeigen, dass präkonditionell- bedingte Verbesserungen der linksventrikulären Funktion sowohl nach einer kurzen (fünf Minuten) als auch nach einer langen (40 Minuten) Ischämiedauer durch eine selektive Blockade der CaMKII $\delta$  mit KN-93 aufgehoben werden [205,206].

Für die APC konnten Lange et al. zeigen, dass die Desfluran-bedingte Reduktion der Herzinfarktgrößen bei Kaninchen *in vivo* durch eine selektive pharmakologische Blockade der CaMKII $\delta$  mit KN-93 aufgehoben wird [145]. Eine Blockade des  $\beta_1$  –AR vermittelten Signalweges mit Metoprolol sorgte in dieser Studie ebenfalls dosisabhängig für eine Aufhebung der APC-vermittelten Kardioprotektion [145].

## 2. Hypothesen

In der vorliegenden experimentellen Studie sollten Erkenntnisse über den Einfluss der CaMKII $\delta$  auf die Desfluran-vermittelte Präkonditionierung bei induziertem I/RI erlangt werden. Hierzu wurden Versuchsreihen mit aktiver (Wildtyp), teilweise aktiver (+/-) und dauerhaft genetisch inaktiver (-/-) CaMKII $\delta$  durchgeführt. Die intrazelluläre Funktionsfähigkeit der CaMKII $\delta$  und mögliche Regulationsmechanismen wurden anhand der Phosphorylierungsstellen von Phospholamban und der Expression des  $\beta_1$ -AR (ADRB1) untersucht.

Die Versuche wurden an einem etablierten Mausmodell mit induzierbarem I/RI *in vivo* durchgeführt. Erkenntnisse über die intrazelluläre Wirkung der Funktionsproteine wurden über die semiquantitative Western-Immunoblot Analyse gesammelt.

Folgende Hypothesen wurden getestet:

1. Die dauerhaft inaktive CaMKII $\delta$  verhindert die Herzinfarktgrößenreduktion bei I/RI nach Desfluran-vermittelter Präkonditionierung.
2. Die Phosphorylierung von PLB wird bei dauerhaft inaktiver CaMKII $\delta$  von der PKA an der Aminosäurestelle Serin 16 übernommen.
3. Die dauerhaft inaktive CaMKII $\delta$  hat mit und ohne APC einen Einfluss auf den  $\beta_1$  adrenergen Signalweg.

# 3. Material und Methoden

## 2.1 Versuchstiere

In der Studie wurden homozygote CaMKii $\delta$  (-/-) Knock-Out (KO) Mäuse, heterozygote CaMKii $\delta$  (+/-) KO Mäuse und Wildtyp (WT) Mäuse verwendet. Bei allen Mäusen handelte es sich um Tiere aus dem Inzucht-Stamm C57BL/6. Es wurden ausschließlich männliche Mäuse im Alter von 8-16 Wochen und einem Gewicht von 20-30 g untersucht.

Die WT Mäuse wurden aus der Tierhaltung am Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin in Würzburg (ZEMM) bezogen. Die initialen CaMKii $\delta$  KO Zuchtmäuse wurden dankenswerterweise von Prof. J. Backs aus Heidelberg/Deutschland zur Verfügung gestellt und wurden ebenfalls im ZEMM gezielt miteinander verpaart. Der Genotyp der Tiere wurde im Bezug auf die CaMKii $\delta$  laufend kontrolliert (s. 2.2).

Alle Versuchstiere wurden bei einer Raumtemperatur von 22 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 60% und einem gleichmäßigen zwölfstündigen Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Wasser und ausgewogenes Zuchtfutter standen ihnen ad libitum zur Verfügung.

Die Durchführung aller Studienexperimente wurde gemäß Tierschutzgesetz bei der zuständigen Behörde des Regierungsbezirkes Unterfranken in Würzburg beantragt. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung lag die Genehmigung für die Experimente vor, sie ist unter dem Aktenzeichen 104/09 (ausführlich: 55.2-2531.01-104/09) einsehbar.

## 2.2 Genotypisierung

Nach Verpaarung der CaMKII $\delta$  KO Tiere wurde der Genotyp des Nachwuchses bestimmt.

### 2.2.1 DNA Aufreinigung für Genotypisierung

Zunächst wurde DNA aus abgetrennten Mäuseschwanzspitzen aufgereinigt.

#### Spezifische Materialien:

- DNA Aufreinigungsset, DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen N.V., Hilden, Deutschland); Inhalt: Mini-Spin Säulen in 2 ml Sammelgefäßen, 2 ml Sammelgefäße, Puffer ATL, Puffer AL, Pufferkonzentrat AW1, Pufferkonzentrat AW2, Puffer AE, Proteinase K
- Ethanol absolut (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Thermo-Schüttler, Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Ultrazentrifuge, Centrifuge 5418 r (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Die Mäuseschwanzspitzen wurden aus dem ZEMM bei – 20 °C bezogen.

Je 4 mm Mäuseschwanz, 180  $\mu$ l Puffer ATL und 20  $\mu$ l Proteinase K wurden in ein Sammelgefäß gegeben. Anschließend wurde das Gewebe für 15 s gevortext und über Nacht in einem Thermo-Schüttler bei 56 °C und 300 Umdrehungen\*min<sup>-1</sup> lysiert.

Am nächsten Tag wurde das lysierte Gewebe für 15 s gevortext, im Anschluss wurden die enthaltene DNA Stück für Stück aufgereinigt und gewaschen:

Zunächst wurden je 200  $\mu$ l Ethanol absolut sowie 200  $\mu$ l Puffer AL zu den Proben gegeben und für 15 s gevortext. Das Gemisch wurde auf die Mini-Spin Säulen übertragen und für 60 s bei 8000 Umdrehungen\*min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Dabei wurde die DNA in einer selektiven Membran der Mini-Spin Säulen

zurückgehalten während überschüssiges Material durch die Membran gedrückt wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und die Mini-Spin Säulen mit der DNA auf neue Sammelgefäße gestellt.

In einem ersten Waschschrift wurden durch Zugabe von 500 µl Puffer AW1 hochsalzige Verunreinigungen und Enzyme gelöst und für 60 s bei 8000 Umdrehungen\*min<sup>-1</sup> abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Mini-Spin Säulen mit der DNA auf neue Sammelgefäße gestellt.

In einem weiteren Waschschrift wurden durch Zugabe von 500 µl Puffer AW2 niedersalzige Verunreinigungen und Enzyme gelöst und für 180 s bei 14000 Umdrehungen\*min<sup>-1</sup> abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Mini-Spin Säulen mit der DNA auf neue Sammelgefäße gestellt.

Nach den beiden Waschschriften wurde die aufgereinigte DNA aus der selektiven Membran herausgewaschen. Hierzu wurde jeder Probe 100 µl Puffer AE zugegeben, bei Raumtemperatur für 60 s inkubiert und anschließend für 60 s bei 8000 Umdrehungen\*min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Um eine möglichst vollständige Auswaschung zu gewährleisten, wurde der Schritt mit 50 µl Puffer AE bei ansonsten gleichbleibenden Parametern wiederholt.

Insgesamt wurde aus jeder Probe 150 µl aufgereinigte DNA-Elution gewonnen.

### **2.2.2 PCR für Genotypisierung**

Die aufgereinigte DNA wurde für eine Genotypisierungs-Polymerase Kettenreaktion (engl. polymerase chain-reaction, PCR) zur Bestimmung der murinen Genotypi hinsichtlich der CaMKII<sub>δ</sub> verwendet.

#### Spezifische Materialien:

- Genotypisierungsset, Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen N.V., Hilden, Deutschland); Inhalt: Taq PCR Master Mix aus Taq DNA-Polymerase, Qiagen PCR-Puffer, Desoxyribonukleosidtriphosphate
- GAPDH-Primer (Eurofins Scientific SE, Luxemburg)
- PCR-Thermozykler, Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (LIFE technologies AG, Carlsbad, USA)

- Nuklease-freies Wasser (Qiagen N.V., Hilden, Deutschland)

Primer für CaMKII $\delta$  Genotypen, bestellt bei Eurofins Genomics (Eurofins Scientific SE, Luxemburg)

- Primer 1 (CaMKII $\delta$ ): gtCIIIdCKO-LA-sn
- Primer 2 (CaMKII $\delta$ ): gtCIIIdCKO-KA-as
- Primer 3 (CaMKII $\delta$ ): gtCIIIdCKO-SA-as

Um ein gleichbleibendes Temperaturmilieu zu gewährleisten wurden alle im Folgenden erläuterten Schritte und verwendeten Substanzen auf Eis gestellt oder auf 4 °C heruntergekühlt.

Die Primer wurden zu einer Endkonzentration von 100 pmol/ $\mu$ l in Nuklease-freiem Wasser aufgelöst, somit wurde gemäß der Angaben von Eurofins Primer 1 in 92  $\mu$ l, Primer 2 in 299  $\mu$ l und Primer 3 in 260  $\mu$ l aufgelöst. Danach wurden sie gevortext und ruhten zur Vermischung für 30 min. Im Anschluss wurden 40  $\mu$ l Primer 1, 20  $\mu$ l Primer 2, 20  $\mu$ l Primer 3 mit Nuklease-freiem Wasser im Verhältnis 1:5 zu einem Gesamtvolumen von 400  $\mu$ l Primer Mix verdünnt (80  $\mu$ l Primer zu 320  $\mu$ l Wasser), gevortext und wieder für 30 min vermischt. Der Primer-Mix wurde bis zur weiteren Verwendung auf -20 °C weggefroren.

Die Ansätze für die PCR wurden mit dem Genotypisierungsset wie folgt zusammengestellt: 8,5  $\mu$ l Nuklease-freies Wasser, 13  $\mu$ l Taq PCR Master Mix, 1,5  $\mu$ l Primer Mix, 2  $\mu$ l DNA. Jeder Ansatz bestand somit aus einem Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l und reichte im weiteren Verlauf für zwei Gelauftragungen. Daneben wurde zusätzlich eine Negativkontrolle mit Nuklease-freiem Wasser statt DNA und eine Positivkontrolle mit GAPDH Primern statt Primer Mix bei ansonsten gleichen Volumina hergestellt.

Die Ansätze mit der zu analysierenden DNA wurden in einen Thermozykler gestellt, die PCRs wurden dabei mit folgender Programmierung durchgeführt:

94 °C für 120 s für den Heißstart zur Aktivierung der Polymerasen.

35 Zyklen mit

- 96 °C für 10 s für die Denaturierung der Doppelstrang-DNA.

- 60 °C für 15 s für die Primerhybridisierung an den spezifischen DNA-Bindungsstellen.
- 72 °C für 45 s für die Elongation der Einzelstränge mit freien Desoxyribonukleosidtriphosphaten.

72 °C für 10 min am Ende der 35 Zyklen für die finale Elongation.

Nach Abschluss des PCR-Prozesses wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt.

### **2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese und Genotypbestimmung**

Im nächsten Schritt der Genotypisierung wurden die amplifizierten CaMKII<sub>δ</sub> Subtypen DNA-Stränge nach ihrer Basenpaarlänge in Agarosegel aufgetrennt.

#### Spezifische Materialien:

- Agarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- DNA-Färbemittel, SYBR Safe DNA Gel Stain (LIFE technologies AG, Carlsbad, USA)
- Ladepuffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

DNA-Marker, peqGOLD (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)

- Agarose-Gelelektrophoresekammer, EasyPhor Medi (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland); Inhalt: Gelelektrophoresekammer, Kamm mit 20 Taschen je 1 mm Dicke
- Spannungsquelle, PowerPac High-Current Power Supply (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Personal Computer (Hewlett Packard, Palo Alto, USA)
- Auswertegerät Alpha Innotech FluorChem FC2 (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Auswerteprogramm Alpha Innotech FluorChem SP (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)

### Spezifische Puffer:

Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer 10-fach für 1 l:

- 48,4 g Tris (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland), gelöst in 500 ml H<sub>2</sub>O
- 20 ml Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 M bei pH 8,0 (Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland)
- 11,4 ml Eisessig (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Auffüllen mit aqua dest. auf 1 l

Zunächst wurde ein Agarose Gel 2 % hergestellt. Hierfür wurde 2 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (1-fach) aufgelöst und in einer Mikrowelle für 3 min bei 800 Watt aufgeköcht. Der Kochvorgang wurde jede Minute unterbrochen und die Lösung solange geschwenkt bis sich die Bestandteile homogenisierten. Danach wurde in die aufgeköchte DNA 12 µl Färbemittel hinzugegeben und ebenfalls durch Schwenken gut verteilt. Im Anschluss wurde das Agarosegel blasenfrei in die Gelelektrophoresekammer samt eingestecktem Kamm gefüllt und härtete aufgrund des photosensibelen DNA-Färbemittels abgedunkelt aus.

In der Zwischenzeit wurden die amplifizierten DNA-Proben zur elektrochemischen Stabilisierung mit einem Ladepuffer gemischt. Hierfür wurden zu 13 µl jeder DNA-Probe 2 µl Ladepuffer hinzugegeben. Im Anschluss wurde diese Mischung in die Geltaschen gefüllt, wobei jede Probe zur Kontrolle doppelt aufgetragen und sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle (s. Punkt 2.2.2) hinzugefügt wurde. Zur Lauffrontbestimmung der DNA und zur Ermittlung ihrer Bandenlänge wurden in regelmäßigen Abständen Taschen mit 6 µl DNA-Marker befüllt.

Nach Befüllung wurde die Gelelektrophoresekammer mit einem Deckel verschlossen, an die Spannungsquelle angeschlossen und lief bei 90 V für 45 min.

Im Anschluss wurde die Länge der DNA-Fragmente in den einzelnen Lauffronten bestimmt. Hierzu wurde das Gel in eine Entwicklungskammer gegeben und die DNA-Banden aufgrund des fotosensiblen Färbemittels mit ultraviolettem (UV) Licht sichtbar gemacht.

Der CaMKII $\delta$  Genotyp wurde im Anschluss anhand der DNA-Basenpaare bestimmt, wobei homozygote CaMKII $\delta$  (-/-) KO Mäuse ihre Bande bei 500 Basenpaaren zeigten, WT Mäuse ihre Bande bei 282 Basenpaaren zeigten und heterozygote CaMKII $\delta$  (+/-) KO Mäuse ihre Banden sowohl bei 500 als auch bei 282 Basenpaaren zeigten.

## 2.3 Experimentelles Tiermodell

In der Studie wurde bei den Tieren das Herz freipräpariert, eine Koronararterienokklusion durchgeführt und nach einer Reperfusionphase die Herzen für weitere Untersuchungen entnommen.

### 2.3.1 Vorbereitung

Im ersten Schritt wurden mit den Tieren alle Maßnahmen getroffen, um im Verlauf komplikationslose Operationen und experimentelle Interventionen durchführen zu können.

#### Spezifische Materialien:

- Natrium-Pentobarbital (Merial, Hallbergmoos, Deutschland)
- Beheizbare Wärmeplatten (Föhr Medical Instruments, Seeheim, Deutschland)
- Arterielle Kanüle, 22G (BD Insyte-W, Heidelberg, Deutschland)
- Beatmungsgerät für Kleinnager (SAR 830/AP, CWE Inc., Ardmore, USA)
- Medizinischer Sauerstoff (Linde AG, München, Deutschland)
- Infusor PHD 2000 (Harvard Apparatus, Holliston, USA)
- PE10-Katheter (Braintree Scientific Inc., Braintree, USA)
- Vicrylfäden 6-0 (Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
- Druck-Messwandler (Combitrans, B. Braun, Melsungen, Deutschland)
- 3-Kanal Elektrokardiogramm (FMI GmbH, Seeheim, Deutschland)
- Konverter, analog zu digital (Data Translation TM, Marlboro, USA)
- Datenanalysesoftware (Notocord hem 3.5, Croissy sur Seine, Frankreich)
- Personal Computer (Hewlett Packard, Palo Alto, USA)

Zunächst wurden die Tiere anästhesiert. Hierfür wurde ihnen Natrium-Pentobarbital (60 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal appliziert. Die Narkosetiefe wurde während des gesamten Protokolls regelmäßig durch

gezielte Schmerzreize an den Hinterpfoten der Mäuse überprüft und im Falle eines auslösbaren Fußwegzieh-Reflexes mit einer weiteren Natrium-Pentobarbital Applikation (15 mg/kg Körpergewicht) angepasst.

Die Mäuse wurden auf beheizbare Wärmeplatten gelegt und in Rückenlage an Schwanz und Extremitäten mit Silkpflastern fixiert. Zur Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur wurde den Tieren ein Temperaturmessgerät rektal eingeführt. Das Messgerät wurde in einem Regelkreis mit den Wärmeplatten verschaltet und gewährleistete so eine Körpertemperatur von  $37,0 \pm 0,3$  °C.

Die Intubation der Tiere erfolgte endotracheal mit einer arteriellen 22G Kanüle unter Sicht. Anschließend wurden sie mit einem Luft-Sauerstoff-Gemisch (50%/50%) druckkontrolliert beatmet. Der maximale Beatmungsdruck betrug dabei 30 cm\*H<sub>2</sub>O bei einem positiven endexpiratorischen Druck von 1-3 cm\*H<sub>2</sub>O und einer Beatmungsfrequenz von 20-30 Zügen pro Minute.

Der zu erwartende Flüssigkeitsverlust durch Blutung, renale Ausscheidung und Verdunstung wurde durch 0,9 % NaCl-Substitution ( $20 \mu\text{l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) über die rechte Vena jugularis ausgeglichen. Der mittlere arterielle Blutdruck (engl. mean arterial pressure, MAP) wurde über die rechte Arteria carotis communis gemessen. Hierzu wurde ein PE10-Katheter gefüllt mit 0,9% NaCl in die Arterie eingeführt, dort mit einem Vicrylfaden der Stärke 6-0 fixiert und mit einem Druck-Messwandler verbunden. Zusätzlich wurde den Tieren ein 3-Kanal Elektrokardiogramm angelegt um Änderungen der Herzfrequenz (Hf) und der elektrischen Aktivität der Herzmuskelfasern, insbesondere während der Koronarokklusion, zu überwachen.

Die beschriebenen hämodynamischen Parameter (EKG, Hf, MAP) wurden kontinuierlich gemessen und mit der Datenanalysesoftware Notocord auf einem Personal-Computer aufgezeichnet.

### **2.3.2 Operation, Koronararterienokklusion und Reperfusion**

Die Tierpräparation und Operation am Mäuseherz erfolgte unter einem Stereomikroskop mit 3,75-facher bis 10-facher Vergrößerung und suffizienter Ausleuchtung durch zwei unterschiedlich positionierte Lichtquellen.

#### Spezifische Materialien:

- Stereomikroskop (OPMI-9-FC, Zeiss, Jena, Deutschland)
- Paraffin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Operationsbesteck (FST, Heidelberg, Deutschland)
- Elektroauter (FST, Heidelberg, Deutschland)
- Rippenspreizer (Noras, Würzburg, Deutschland)
- Parafilm M Verschlussfolie (American National Can, Chicago, USA)
- PE10-Katheter (Braintree Scientific Inc., Braintree, USA)
- Vicrylfäden 6-0 (Ethicon, Norderstedt, Deutschland)

Zunächst wurde der Brustbereich mit flüssigem Paraffin eingestrichen wodurch der Operationsbereich trotz des Tierfelles gut einsehbar war und die Schnittführung erleichtert wurde. Die Mäusehaut wurde mit einem geraden Schnitt von der linken Axillarlinie zum Processus xiphoideus eröffnet. Der hervortretende Musculus (M.) pectoralis major wurde am medialen Ansatz vom Sternum gelöst und in den Axillarbereich verlagert, der M. pectoralis minor wurde am scapulären und claviculären Ansatzpunkt abgetrennt und nach medial verlagert. Nach der Manipulation am offenen Herzen wurde dieser Muskel wieder über das Herz gelegt und mit einer Parafinfolie überdeckt um den Flüssigkeitsverlust durch Austrocknung zu verringern. Nach Mobilisation der Mm. Pectorales wurden Brustkorb sowie Pleura parietalis mit Hilfe eines Elektroauters im vierten Interkostalraum eröffnet und die dritte Rippe vom thorakalen Ansatzpunkt gelöst. Der neu geschaffene Interkostalspalt wurde mit einem Rippenspreizer vorsichtig aufgedehnt bis der darunterliegende Herzbeutel gut einsehbar war. Mit einem Vertikalschnitt wurde das Perikard behutsam eröffnet, sodass das schlagende Herz zum Vorschein kam.

Im nächsten Schritt wurde die hellrote linke Koronararterie im Myokard der Tiere aufgesucht und ihr linker, vorderer absteigender Ast (engl. left anterior descending coronary artery, LAD) identifiziert. Unmittelbar unterhalb des linken Herzohres wurde der LAD mit einem Vicrylfaden der Stärke 6-0 vorsichtig unterstochen und der Faden soweit durchgezogen, bis die Fadenenden auf beiden Seiten des Stiches die gleiche Länge hatte. Die Fadenenden wurden durch ein 3 mm langes PE10-Silikonröhrchen gefädelt. Das Röhrchen wurde bis auf einen Zentimeter vor den LAD geschoben. An beiden Fadenenden wurde ein 1,5 ml Eppendorfgefäß befestigt und jeweils soweit mit Leitungswasser aufgefüllt bis es genau 1 g schwer war. Danach wurden die Fadenenden an beiden Seiten der Maus symmetrisch über zwei gleichmäßig nach vertikal verstellbare Stangen gelegt.

Die Koronararterienokklusion konnte nun herbeigeführt werden, indem die Stangen soweit in ihrer Höhe verstellt wurden bis sich die Fäden spannten und die Eppendorfgefäße gleichzeitig von der Tischplatte abhoben. Durch den beidseitigen Fadenzug wurde das Silikonröhrchen auf den LAD gedrückt und konnte ihn konstant und Dank des weichen Silikons schonend okkludieren.

Eine erfolgreiche Koronararterienokklusion machte sich durch folgende Kriterien bemerkbar: Im EKG zeigte sich eine Hebung der ST Strecke, der distale Anteil des LAD färbte sich aufgrund des Sauerstoffmangels violett und das betroffene Herzareal färbte sich aufgrund der Minderperfusion zyanotisch. Nach Beendigung der ischämischen Koronararterienokklusion folgte die Reperfusion des Herzareals. Für die Reperfusion war eine weinrote Hyperämie des betroffenen Herzgewebes sowie eine Normalisierung des EKGs charakteristisch.

### **2.3.3 Experimentelles Protokoll für gravitoplanimetrische Infarktgrößenbestimmungen**

Die Tiere wurden in vier Gruppen eingeteilt. Zwei Gruppen bestanden aus WT Mäusen, die anderen beiden aus homozygoten CaMKII $\delta$  (-/-) KO Mäusen.

Innerhalb des im Bezug auf die CaMKII $\delta$  identischen Genotyps wurden die Tiere randomisiert den Versuchsgruppen zugeordnet.

#### Spezifische Materialien:

- Narkosemittelverdampfer Dräger Trajan 808 (Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland)
- Desfluran (Baxter Deutschland GmbH, Höchststadt, Deutschland)

Das experimentelle Protokoll startete vor der Koronararterienokklusion und nach Beendigung der chirurgischen Präparation.

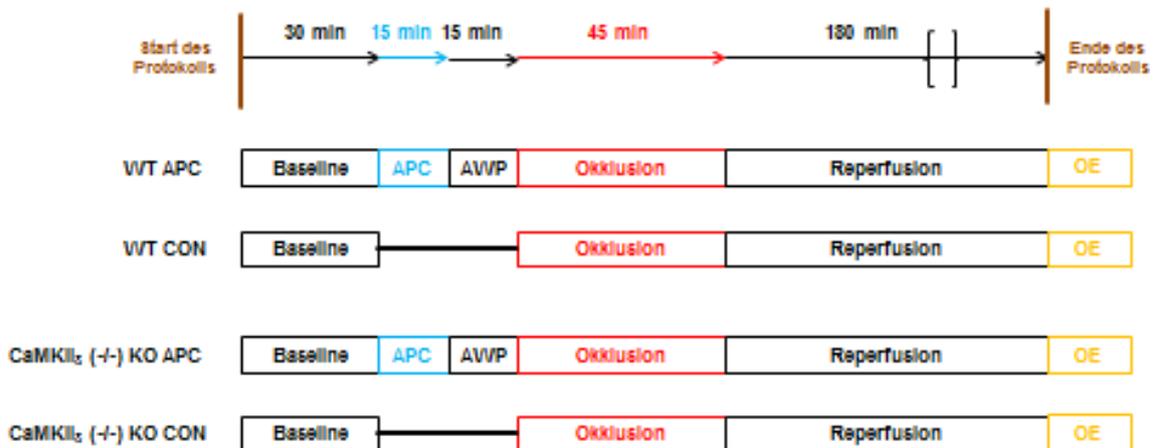
Alle Tiere erhielten zu Beginn des Protokolls eine 30-minütige Äquilibrationsphase, auch Baseline genannt, in der keine Intervention stattfand. Die während dieses Zeitraumes gemessenen systemischen hämodynamischen Parameter (EKG, Hf, MAP) wurden als Ausgangswerte für die weiteren Messungen gesetzt.

Alle Gruppen erhielten eine Koronararterienokklusion von 45 Minuten Dauer mit einer darauffolgenden Reperfusionphase von 180 Minuten. Das Ende der Reperfusionzeit markierte zugleich das Ende des experimentellen Protokolls und mündete in der Herzentnahme mit Ventrikelextraktion wie in Punkt 2.4.1 beschrieben.

Jeweils eine Gruppe aus den WT Tieren und eine Gruppe aus den homozygoten CaMKII $\delta$  (-/-) KO Tieren erhielten vor der Koronararterienokklusion eine Anästhetika-induzierte Präkonditionierung (APC) mit dem volatilen Anästhetikum Desfluran (1,0 MAC) über 15 Minuten mit einer anschließenden Auswaschphase von ebenfalls 15 Minuten. Diese Gruppen werden im Folgenden als WT-APC (n=7) und CaMKII $\delta$  (-/-) KO APC (n=9) bezeichnet.

Die beide übrigen Gruppen erhielten zur Kontrolle (engl control, CON) keine zusätzlichen Interventionen und werden im Folgenden als WT CON (n=8) und CaMKII $\delta$  (-/-) KO CON (n=8) bezeichnet.

Das experimentelle Versuchsprotokoll zur Infarktgrößenbestimmung ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Darstellung des experimentellen Protokolls für gravitoplanimetrische Infarktgrößenbestimmungen**

Baseline = Äquilibrationsphase von 30 min Dauer, Okklusion = Koronararterienokklusionsphase von 45 min Dauer, Reperfusion = Reperfusionsphase von 180 min Dauer, OE = Organentnahme der Herzen nach Beendigung des experimentellen Protokolls.

APC = Anästhetika-induzierte Präkonditionierung mit Desfluran 1 MAC von 15 min Dauer, AVWP = Auswaschphase von 15 min Dauer, WT APC = Wildtypmäuse mit APC (n = 7), WT CON = Wildtypmäuse ohne Intervention durch APC (n = 8), CaMKII<sub>δ</sub> (-/-) KO APC = Homozygote CaMKII<sub>δ</sub> (-/-) Knock-Out Mäuse mit APC (n=9), CaMKII<sub>δ</sub> (-/-) KO CON = Homozygote CaMKII<sub>δ</sub> (-/-) Knock-Out Mäuse ohne Intervention mit APC (n=8).

Bei allen Versuchstieren handelt es sich um männliche C57BL/6 Mäuse im Alter von 8 – 16 Wochen.

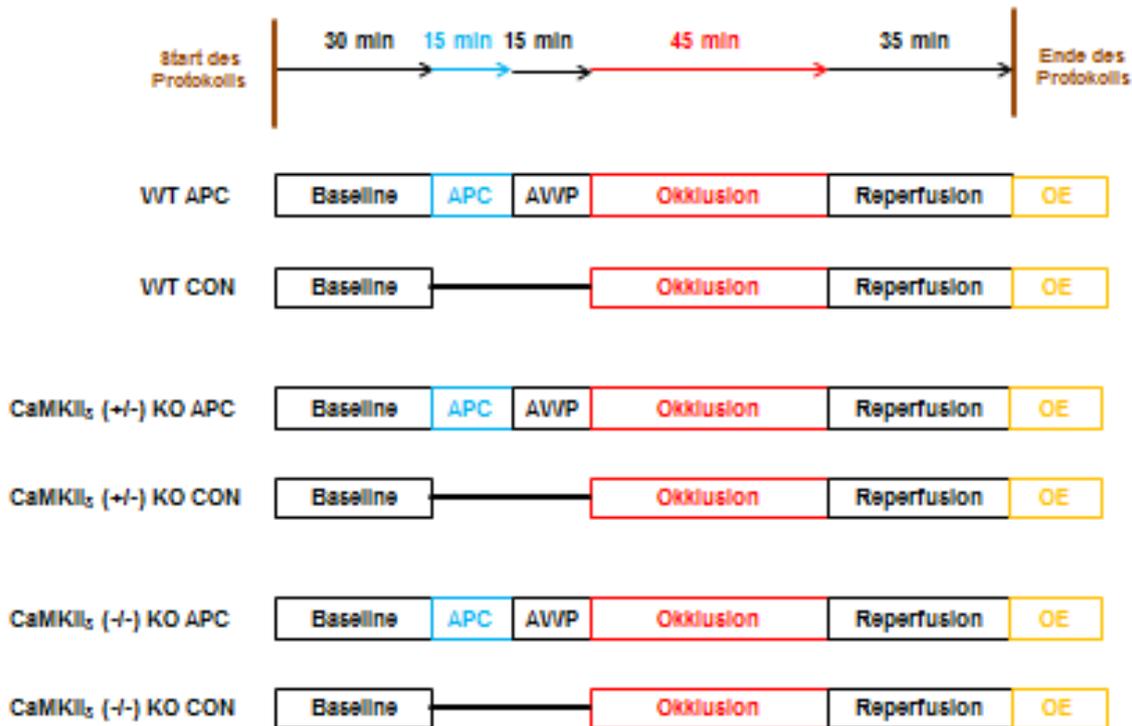
### 2.3.4 Experimentelles Protokoll für molekularbiologische Untersuchungen

Das experimentelle Protokoll startete vor der Koronararterienokklusion und nach Beendigung der chirurgischen Präparationen. Es deckte sich mit dem Protokoll zur Infarktgrößenbestimmung, lediglich die Reperfusionszeit wurde auf 35 min verkürzt, um das Zeitfenster für die maximale Proteinexpression anzupassen.

Die Gruppenstärke für die Organentnahme betrug jeweils n=4. Zu den bekannten Genotypen WT und CaMKII<sub>δ</sub> (-/-) KO kam noch der heterozygote CaMKII<sub>δ</sub> (+/-) KO Genotyp hinzu. Alle Genotypen wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: Die eine Gruppe (APC-Gruppe) erhielt vor der Koronararterienokklusion eine APC mit dem volatilen Anästhetikum Desfluran

(1,0 MAC) über 15 Minuten mit einer anschließenden Auswaschphase von ebenfalls 15 Minuten. Die andere Gruppe (CON-Gruppe) erhielt vor der Koronararterienokklusion zur CON keine zusätzlichen Interventionen.

Das experimentelle Versuchsprotokoll zur Organentnahme ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4: Darstellung des experimentellen Protokolls für molekularebiologische Untersuchungen**

Baseline = Äquilibrationsphase von 30 min Dauer, Okklusion = Koronararterienokklusionsphase von 45 min Dauer, Reperfusion = Reperusionsphase von 35 min Dauer, OE = Organentnahme der Herzen nach Beendigung des experimentellen Protokolls.

APC = Anästhetika-induzierte Präkonditionierung mit Desfluran 1 MAC von 15 min Dauer, AWP = Auswaschphase von 15 min Dauer, WT APC = Wildtypmäuse mit APC (n =4), WT CON = Wildtypmäuse ohne Intervention durch APC (n= 4), CaMKII<sub>δ</sub> (+/-) KO APC = Heterozygote CaMKII<sub>δ</sub> (+/-) Knock-Out Mäuse mit APC (n=4), CaMKII<sub>δ</sub> (+/-) KO CON = Heterozygote CaMKII<sub>δ</sub> (+/-) Knock-Out Mäuse ohne Intervention mit APC (n=4), CaMKII<sub>δ</sub> (-/-) KO APC = Homozygote CaMKII<sub>δ</sub> (-/-) Knock-Out Mäuse mit APC (n=4), CaMKII<sub>δ</sub> (-/-) KO CON = Homozygote CaMKII<sub>δ</sub> (-/-) Knock-Out Mäuse ohne Intervention mit APC (n=4).

Bei allen Versuchstieren handelt es sich um männliche C57BL/6 Mäuse im Alter von 8 – 16 Wochen.

## 2.4 Organentnahme

Nach Vorbereitung, Operation und Koronararterienokklusion wurden am Ende der Reperfusionzeit die Tierherzen für weiterführende Infarktgrößenbestimmungen sowie für molekularbiologische Untersuchungen entnommen.

### 2.4.1 Organentnahme für gravitoplanimetrische Infarktgrößenbestimmung

In diesem Versuchsteil wurden die Herzen entnommen und Herzinfarktgröße sowie die ischämischen Anteile gravitoplanimetrisch ermittelt.

#### Spezifische Materialien:

- Heparin 25000 IE (Ratiopharm AG, Ulm, Deutschland); gelöst in 50 ml NaCl, entspricht  $500 \text{ IE} \cdot \text{ml}^{-1}$
- Farbstoff, Evans blue ( $0.1 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Natrium-Pentobarbital (Merial, Hallbergmoos, Deutschland)
- Mäuseherzform aus Acryl (Aster Industries, McCandles, USA)
- 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid, TTC  $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Formaldehyd 10 % (Fischar, Saarbrücken, Deutschland)
- Digitalkamera, Finepix S3 Pro (Fujifilm, Tokio, Japan)
- Digitale Messwaage, Sartorius R 180 D (Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Bildbearbeitungssoftware, AdobePhotoshop Version 8.0.1 (Adobe System Inc., San Jose, USA)
- Personal Computer (Fujitsu Siemens, Augsburg, Deutschland)

Nach Applikation von 500 IE Heparin intravenös wurde die unterstochene Koronararterie mit einem festen Knoten final okkludiert. Im Anschluss wurde den Tieren vorsichtig 1 ml Evans blue in die Carotisarterie injiziert. Die Applikation des Farbstoffs sorgte dafür, dass sich alle durchbluteten Herzareale

blau färbten, während die ischämischen Herzareale distal der Okklusionsnaht unverändert blass-rot blieben.

Nach intraperitonealer Injektion einer letalen Dosis Natrium-Pentobarbital (150 mg pro kg Körpergewicht) wurden die Herzen durch Abtrennung der Aorta sowie der Vena cava inferior und superior entnommen und in einem gekühlten Gefäß mit 0,9 % NaCl abgelegt. Die Kühlung wurde erreicht indem das Gefäß 5 min vor Organentnahme auf eine mit Eis gefüllte Styroporbox gestellt wurde und dort während des Zeitraumes der Abpräparation verblieb. Von den Herzen wurden zügig die linken Ventrikel abpräpariert und bei – 20 °C für 30 min eingefroren. Im Anschluss wurden die Herzen von Basis zum Apex in 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Hierfür wurden sie in eine vorgefertigte Mäuseherzform aus Acryl gesteckt, welche in 1 mm Abständen parallele Öffnungsschlitze für Rasierklingen aufweist.

Die Herzschnitte wurden bei 37 °C für 30 min mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) pH 7,4 inkubiert. Bei TTC handelt es sich um einen Redox-Farbstoff, der in seinem oxidierten, wasserlöslichen Zustand farblos ist und in seinem reduzierten, fettlöslichen Zustand rot erscheint. Folglich wird TTC in vitalem Gewebe durch oxidative Koenzyme wie z.B. Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) reduziert und lässt diesen Gewebeabschnitt rötlich erscheinen, während avitales Gewebe aufgrund fehlender Redoxpartnern farblos bleibt. Die gefärbten Gewebsschnitte wurden über Nacht in 10 % Formaldehyd eingelegt.

Am folgenden Tag wurden die Herzschnitte gravitoplanimetrisch ausgewertet. Hierzu wurden sie einzeln mit einer digitalen Messwaage gewogen und mit einer Digitalkamera von beiden Seiten fotografiert. Die Fotos wurden im Anschluss geblindet mit AdobePhotoshop CS 8.0.1 an einem Personal Computer ausgewertet. Dabei wurden blaue Gebiete als Normalzonen (NZ), rote Gebiete als Area at Risk (AAR) und weiße Zonen als Infarktzone (engl. infarct size, IS) markiert. Im Anschluss wurde die IS als prozentualer Anteil der AAR gravitoplanimetrisch nach bekanntem Verfahren bestimmt [207]. Im Kaninchen- und Rattenmodell wurde bereits gezeigt, dass die Größe der AAR ein bedeutender Prädiktor für die Größe des Infarkts darstellt [208]. Aus diesem

Grund wurden in die Auswertung nur Herzen eingeschlossen, deren AAR mindestens 20 % der Herzfläche ausmachten.

#### **2.4.2 Organentnahme für molekularbiologische Untersuchungen**

Am Ende der Reperfusionphase wich das Vorgehen bei der Organentnahme für molekularbiologische Untersuchungen vom Vorgehen bei der Organentnahme für Infarktgrößenbestimmung ab:

Bei der Organentnahme für molekularbiologische Untersuchungen wurde nach der Reperfusionphase weder Heparin intravenös verabreicht noch eine Evans-Blue Färbung durchgeführt. Ebenso wurde auf die finale Koronararterienokklusion verzichtet.

Die Entnahme der Mäuseherzen sowie die Abpräparation der linken Ventrikel erfolgte wie in Punkt 2.4.1 beschrieben. Vorhöfe sowie rechter Ventrikel wurden verworfen. Die linken Ventrikel wurden nach Abpräparation rasch in Eppendorfgefäße gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zu ihrer Verwendung in molekularbiologischen Untersuchungen wurden die linken Ventrikel bei -80 °C verwahrt.

## 2.4 Molekularbiologische Untersuchungen

Nach Entnahme der Herzen wurden die Myozyten der linken Ventrikel aufbereitet, ihre Proteine nach Molekulargewicht aufgetrennt und Zielproteine mit spezifischen Antikörpern detektiert.

### 2.5.1 Herstellung von Zelllysaten

Im ersten Schritt wurden die Myozyten der linken Ventrikel in ihre Zellfraktionen und dazugehöriges Zytosol lysiert.

#### Spezifische Materialien:

- Homogenisator mit Glaskolben und Homogenisatorzylinder, IKA RW14 basic (IKA Werke, Staufen, Deutschland)
- Zentrifuge, Sepatech Megafuge 1,0R (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Glaspipette mit Peleusball (Brand GmbH, Wertheim, Deutschland)
- Proteaseinhibitor, cOmplete Protease Inhibitor mini (Roche diagnostics, Mannheim, Deutschland)
- Laemmli Puffer, 4x (BioRad, Hercules, USA)
- beta-Mercapto-Ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

#### Spezifische Puffer:

Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline, PBS) 5-fach bei pH 7,4 für 100 ml:

- 20 g NaCl (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- 11,73 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- 41,17 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Auffüllen mit aqua dest. auf 1 l
- Titration auf pH 7,4 mit HCL 32 % (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Radio-Immunoprecipitations Assay (RIPA) Puffer für 50 ml:

- 0,5 ml Igepal CA-630 (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

- 0,25 ml Natrium Desoxycholic Acid (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- 0,05 ml Natrium Dodecylsulfate Polyacrylamid (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- 49,5 ml PBS (s. oben)

Zur Herstellung der Zelllysate wurden die tiefgefrorenen linken Ventrikel der Mäuse zunächst schonend auf Eis aufgetaut. Um ein gleichbleibendes Temperaturmilieu zu gewährleisten wurden alle im Folgenden verwendeten Substanzen und Gegenstände ebenfalls auf Eis gestellt oder auf 4 °C heruntergekühlt.

Zum Schutz der Ventrikelproteine vor Zersetzung durch Proteasen wurde eine Tablette Proteaseinhibitor in 10 ml RIPA-Puffer aufgelöst und dieser modifizierte RIPA-Puffer für die weitere Lysatherstellung verwendet.

Die Ventrikel wurden einzeln in den Homogenisatorzylinder gegeben und 750 µl RIPA-Puffer hinzugefügt. Anschließend wurden sie mittels Glaskolben für 30 s bei 800 Umdrehungen\*min<sup>-1</sup> homogenisiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach jeder Homogenisierung wurde Glaskolben und Homogenisatorzylinder mehrmals sorgfältig mit NaCl 0,9% Lösung abgewaschen.

Die Homogenisate wurden für 5 min bei 11600 Umdrehungen\*min<sup>-1</sup> zentrifugiert, danach wurde der Überstand mit zerlegten Zellfraktionen und Zytosol abgenommen und das am Boden liegende Zellpellet verworfen. Jeder Überstand wurde wie folgt in zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt: Für den Western-Immunoblot wurden je 300 µl Proteinlösung mit 99,5 µl 4x Laemmli-Puffer und 0,5 µl beta-Mercapto-Ethanol (Verhältnis 3:1) vermischt, die restliche Proteinlösung wurde nativ eingefüllt. Für weiterführende Versuche wurden die Proben bei -80 °C verwahrt.

## 2.5.2 BCA Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationen der homogenisierten Proben wurden mit der Bicinchoninic Acid (BCA) Methode photometrisch bestimmt [209].

### Spezifische Materialien:

- Proteinkonzentrationsbestimmungsset, Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA); Inhalt: BCA Reagenz A, BCA Reagenz B, Albumin Standard Ampules (ASA) als Standardalbumin
- 96-Loch Mikroplatten (A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland)
- RIPA Puffer (s. Punkt 2.5.1)
- Mikrotiterplatten Lesegerät, Sunrise (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz)
- Analysesoftware, Magellan Version 5.01 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz)
- Personal Computer (Fujitsu Siemens, Augsburg, Deutschland)
- Schüttler, Heidolph Duomax 1030 (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland)

Zunächst wurde eine Proteinkonzentrations-Verdünnungsreihe für die BCA Methode gemäß Anleitung des Proteinkonzentrationsbestimmungssets hergestellt. Dabei wurde je eine reine Standardalbuminprobe mit  $2000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Protein und eine reine RIPA Kontrollprobe mit  $0 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-1}$  Protein sowie sieben Verdünnungen aus Standardalbumin und RIPA-Puffer vorbereitet: 1500, 1000, 750, 500, 250, 125,  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Protein. Die komplette Verdünnungsreihe bestand somit aus neun Proben und konnte nach Gebrauch bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  verwahrt und bei Bedarf wiederverwendet werden.

Für die Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden die mit Laemmli-Puffer sowie beta-Mercapto-Ethanol versetzten Lysate auf Eis aufgetaut. Währenddessen wurden auf eine 96-Loch Mikroplatte jeweils  $25 \mu\text{l}$  der Proben aus der Verdünnungsreihe doppelt nebeneinander aufgetragen. Die übrigen Löcher wurden mit einer Mischung aus  $22,5 \mu\text{l}$  RIPA-Puffer und  $2,5 \mu\text{l}$  des zu analysierenden Lysates, ebenfalls doppelt nebeneinander aufgetragen, gefüllt.

Danach wurde in jedes belegte Loch 200  $\mu\text{l}$  eine Mischung aus BCA Reagenz A und BCA Reagenz B im Verhältnis 50:1 gegeben. Im Anschluss wurde die Mikroplatte für 3 min auf einen Schüttler gestellt und dann die Proben mit den Reagenzien für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Zur Auswertung wurde die Mikroplatte in ein spezielles Lesegerät gestellt und die Proteinkonzentrationen mit der Analysesoftware Magellan bestimmt. Dabei wurden die erhaltenen Werte durch 100 dividiert (Lysate wurden 10-fach verdünnt aufgetragen und wurden von der Software in der Konzentration  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  angegeben) um die Proteinkonzentrationen in  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  zu erhalten. Durch die Addition von 4x Laemmli-Puffer zu den Lysaten im Verhältnis 1:3 wurden die Werte zusätzlich durch 1,33 dividiert um die tatsächliche Proteinkonzentration in  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  für die Lysate mit Laemmli-Puffer zu erhalten.

Die Lysatvolumina in  $\mu\text{l}$  wurden dabei aus dem Quotienten der Proteinmenge in  $\mu\text{g}$  und Proteinkonzentration in  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  ermittelt.

### **2.5.3 SDS-PAGE Gelelektrophorese**

Die mit Laemmli-Puffer sowie beta-Mercapto-Ethanol versetzten Lysate wurden mittels Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in ihre molekularen Bestandteile aufgetrennt [210].

#### Spezifische Materialien:

- Elektrophorese Komplettsystem, Mini-PROTEAN 3 Multi-Casting Chamber (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland); Inhalt: Gelelektrophoresekammer, 1,5 mm Spacer, Halterung, Glasplatten
- Kamm mit 15 Taschen je 1,5 mm Dicke: Mini-PROTEAN Comb (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Spannungsquelle, PowerPac High-Current Power Supply (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Wärmeblock, Dri-Block DB-2A (Techne, Cambridge, UK)
- Ultrazentrifuge, Centrifuge 5415C (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

- Proteinmarker, peqGOLD Protein-Marker V (PeQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)

#### Zusammensetzung der Gele:

Sammelgel (5 %) für 1 Gel:

- 2,85 ml H<sub>2</sub>O
- 1,25 ml 0,5 mol Tris pH 6,8 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 50 µl 10% SDS (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 850 µl Acrylamide / Bis (30:2) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- 50 µl APS 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 5 µl TEMED (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Trenngel: (12%) für 1 Gel:

- 3,35 ml H<sub>2</sub>O
- 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 100 µl 10% SDS 4 ml Acrylamide / Bis (30:2) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- 100 µl APS 10 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 10 µl TEMED (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

#### Gelelektrophoresepuffer 10-fach für 2 l:

- 60,4 g Tris (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 288 g Glycin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- 20 g SDS (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Auffüllen mit aqua dest. auf 2 l

Zunächst wurde das Trenngel (12 %) hergestellt und dabei alle Komponenten bis auf das TEMED hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Weiterhin wurden zwei Glasplatten des Elektrophorese Komplettsystems mit einem 1,5 mm breiten Spacer aneinander gelegt und mit einer Halteeinrichtung fixiert. Zu dem Trenngel wurde nun TEMED hinzugefügt wodurch die Polymerisation des Gels startete. Unmittelbar darauf wurde das Gel in den Spalt zwischen beiden Glasplatten bis 1,5 cm unterhalb des Oberrandes gegossen. Anschließend

wurde die Gelschicht vorsichtig mit aqua dest. übergossen um sie luftdicht abzudecken und eine gleichmäßige Polymerisation zu gewährleisten.

Während das Trenngel 20 min lang aushärtete wurde das Sammelgel (5%) hergestellt, ebenfalls ohne die Zugabe von TEMED. Nach Aushärtung des Trenngels wurde die aqua dest.- Schicht abgegossen und das Sammelgel nach Zugabe von TEMED auf das Trenngel geschichtet. Unmittelbar danach wurde der Kamm mit seinen 15 Taschen gleichmäßig und luftblasenfrei in das Trenngel gedrückt.

Während das Trenngel mit Kamm 20 min lang aushärtete, wurden die Lysate zur Auftragung vorbereitet:

Die Lysate wurden aus -80 °C geholt und auf Eis aufgetaut. Im Anschluss wurden die Lysatvolumina entsprechend 40 µg Proteinmenge bei berechneter Proteinkonzentration in separate Eppendorfgefäße pipettiert. Die Lysate in diesen Eppendorfgefäßen wurden für 5 min in einen auf 95 °C vorgeheizten Wärmeblock gegeben und anschließend für 3 min bei 10000 Umdrehungen pro Minute bei 20 °C zentrifugiert. Währenddessen wurden die Probenreste wieder bei -80 °C tiefgefroren.

Bevor die Lysate aufgetragen werden konnten, wurde das Gel gemäß Anleitung in der Gelelektrophoresekammer fixiert und von allen Seiten bis zu einer vorgegebenen Markierung mit Gelelektrophoresepuffer aufgefüllt. Nach vorsichtiger Entfernung des Kamms wurden die nun hervortretenden Taschen mit den Lysatvolumina äquivalent zu 40 µg Proteinmenge befüllt. Zur Lauffrontbestimmung der Proteine und zu ihrer Größenbestimmung wurden in regelmäßigen Abständen Taschen mit 1 µl Proteinmarker gefüllt.

Nach Befüllung wurde die Gelelektrophoresekammer mit einem Deckel verschlossen und an die Spannungsquelle angeschlossen. Zum Sammeln der Proteine vor Eintritt in das Trenngel wurde eine Spannung von 60 V für 20 min angelegt, danach durchliefen die Proben bei 90 V in 100 min das Trenngel.

#### **2.5.4 Semidry Western-Immunoblotting**

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Hierzu wurde ein halbtrockenes Blotverfahren (engl. semi-dry immunoblotting) angewendet [211].

##### Spezifische Materialien:

- Semi-dry Blotkammer, Fastblot Biometra 44 (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland)
- Nitrozellulosemembran, Protran (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland)
- Blotting-Papier, 550 g\*m<sup>-2</sup> (A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland)
- Spannungsquelle, PowerPac High-Current Power Supply (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)

##### Transferpuffer: 10-fach für 4 l:

- 211 g Tris (Tris ultrapure AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 117 g Glycin (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Auffüllen mit aqua dest. auf 4 l

Nitrozellulosemembran und Blotting-Papier wurden im Transferpuffer eingeweicht. Währenddessen wurde das Polyacrylamidgel vorsichtig von den Glasplatten der Gelelektrophorese abgelöst, die Sammelgelschicht sowie überflüssige Randbereich abgetrennt und verworfen. Das Trenngel mit den Proteinen wurde für 10 s im Transferpuffer eingeweicht und danach blasenfrei auf eine in gleicher Größe zugeschnittene Nitrozellulosemembran gelegt. Im Anschluss wurde die Membran mit dem aufgelagerten Gel zwischen zwei Blotting-Papiere gelegt und mittig auf der Blotkammer fixiert. Die Blotkammer wurde mit dem dazugehörigen Deckel verschlossen und der Semi-dry Western Immunoblot bei 15 V für 90 min durchgeführt. Während des Blotvorganges wurde die Blotkammer mit einem Gewicht von 1 kg beschwert um einen an allen Seiten gleichmäßigen Blot zu gewährleisten.

### 2.5.5 Antikörper-Inkubation

Nach Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran wurden an die zu untersuchenden Proteinmoleküle spezifische Antikörper gebunden.

Als Ladekontrolle wurden Antikörper gegen die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zu jeder Primärantikörperinkubation hinzugegeben. Bei GAPDH handelt es sich um ein essentielles Enzym der Glykolyse, das gleichmäßig stark exprimiert wird [212]. Damit wurde bei der späteren Auswertung sichergestellt, dass alle Banden mit einer gleichgroßen Menge an Protein (40 µg) beladen worden sind.

#### Spezifische Materialien:

- Milchpulver (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland);  
Milchlösung: Milchpulver gelöst in TBS
- Bovines Serumalbumin, BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); BSA-Lösung: BSA gelöst in TBS
- Folienschweißgerät, Vacupack plus (Krups GmbH, Solingen, Deutschland)
- Folie aus Polypropylen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Schüttler, Heidolph Duomax 1030 (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland)

#### Spezifische Antikörper:

##### Primärantikörper:

- Phospholamban (FL-52) Antikörper (sc-30142, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- p-phospholamban (Ser 16)-R Antikörper (sc-12963-R, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- p-phospholamban (Thr 17)-R Antikörper (sc-17024-R, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- beta1-Adrenorezeptor Antikörper (sc-568, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- Anti-GAPDH Antikörper ( AB 2302, Merck Millipore, Billerica, USA)

Sekundärantikörper:

- Anti-Maus Antikörper (NA931, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland)
- Anti-Kaninchen Antikörper (NA934, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland)

Spezifische Puffer:

Trisgepufferte Kochsalzlösung (engl. tris-buffered saline/TBS) für 4 l

- 84,798 g Tris (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 63,62 g NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Auffüllen mit aqua dest. auf 4 l
- Titration auf pH 7,6 mit HCL 32 % (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Die Nitrozellulosemembran wurde in 5 % Milchlösung aus Milchpulver (5 g) und TBS (100 ml) gegeben und für 60 min auf einen Schüttler gestellt. Durch diese Maßnahme wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen auf der Membran geblockt.

Im Anschluss wurde jede Membran in eine Folie gelegt und diese an drei Enden zugeschweißt. An der verbliebenen Öffnung wurden die Primärantikörper verdünnt in 1 ml 0,5 % BSA-Lösung wie folgt hinzugefügt:

Anti-GAPDH Antikörper im Verhältnis 1:2000, also 0,5 µl Anti-GAPDH auf 1 ml 0,5 % BSA Lösung. Die übrigen Primärantikörper im Verhältnis 1:200, also 5 µl auf 1 ml 0,5 % BSA Lösung.

Die Folien wurden am offenen Ende zugeschweißt und die Membran über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler mit den Primärantikörpern inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Membran aus der Folie genommen und die ungebundenen Primärantikörper abgewaschen. Hierfür wurde die Membran dreimal hintereinander für jeweils 8 min behutsam mit TBS gespült.

Jetzt wurden Sekundärantikörper hinzugegeben, die an spezifische Proteinstrukturen der Primärantikörper binden. Der Membran wurden die Sekundärantikörper verdünnt in 20 ml 2,5 % BSA-Lösung/2,5 % Milchlösung wie folgt hinzugefügt:

Anti-Maus Antikörper und Anti-Kaninchen Antikörper im Verhältnis 1:5000, also je 4 µl Antikörper auf 20 ml 2,5 % BSA / 2,5 % Milchlösung.

Die Membran wurde für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit den Sekundärantikörpern inkubiert.

Danach wurden die ungebundenen Sekundärantikörper von der Membran abgewaschen. Hierfür wurde die Membran erneut dreimal hintereinander für jeweils 8 min behutsam mit TBS gespült.

### **2.5.6 Chemolumineszente Entwicklung und Auswertung**

Die Proteinbanden auf der Nitrozellulosemembran wurden detektiert. Dieser Vorgang lief über eine Luminol-vermittelte Chemolumineszenzreaktion ab, die durch eine an den sekundären Antikörpern anhängende Meerrettichperoxidase katalysiert wurde.

#### Spezifische Materialien:

- Entwicklungsgerät, FluorChem FC2 (Alpha Innotech, San Leonardo, USA)
- Personal Computer (Dell Inc., Round Rock, USA)
- Entwicklungsprogramm, AlphaView Version 1.3.0.7 (Alpha Innotech, San Leonardo, USA)
- Auswerteprogramm, ImageJ (National Institute of Health, NIH, Bethesda, USA)

#### Spezifische Lösungen:

Gesteigerte Chemolumineszenz (engl. enhanced chemiluminescence, ECL)

ECL Lösung I für 50 ml:

- 1 ml Luminol: 44,2 mg g 3-Aminophthalhydrazide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in 1 ml Dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 500 µl P-Coumaric-Säure (engl. p-Coumaric-Acid, PCA): 7,4 mg 4-Hydroycinnamic Acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in 500 µl Dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

- 5 ml Tris-Lösung 1 M /pH 8,5 Tris (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Auffüllen mit aqua dest. auf 50 ml

ECL-Lösung II für 50 ml:

- 5 ml Tris-Lösung 1 M /pH 8,5 Tris (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 32 µl Wasserstoffperoxid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Auffüllen mit aqua dest. auf 50 ml

Jede Membran wurde mit 7 ml Entwicklungslösung aus ECL I und ECL II im Verhältnis 1:1 übergossen und durch leichtes Schütteln gut auf der Membran verteilt. Genau 60 s nach Zugabe der Entwicklungslösung wurde die Membran in die Entwicklungskammer gelegt. Die Proteinbanden wurden bei festen Belichtungszeiten (30 s, 60 s, 120 s) sichtbar gemacht und im Anschluss densitometrisch ausgewertet.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ, dabei wurde zur Normierung der Quotient aus der Intensität der zu untersuchenden Proteinbande mit der Intensität der dazugehörigen Ladekontrolle GAPDH ermittelt.

## 2.5 Statistische Analyse

Sämtliche Daten aus den Infarktgrößen des linken Ventrikels sowie der molekularbiologischen Untersuchungen wurden erfasst und statistisch analysiert. Bei dem experimentellen Tiermodell betrug die Durchschnittsgröße n=8 Tieren bei einem alpha-Fehlerwert von 0,05. Bei den molekularbiologischen Untersuchungen betrug die Durchschnittsgröße n=4 Tiere bei einem alpha-Fehlerwert von 0,05.

Eine Power-Analyse zur Bestimmung der optimalen Gruppengröße zur Detektion signifikanter Unterschiede bei erwarteten Abweichungen wurde im Vorfeld durchgeführt.

Alle Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

### Spezifische Materialien:

- Analog-digital Konvertermodul (Data Translation, Marlboro, USA)
- Datenaufzeichnung und Analysesoftware Notocord Hem 3.5 (Notocord, Croissy, Frankreich)
- Personal Computer (Fujitsu Siemens, Augsburg, Deutschland)
- Software für Tabellenkalkulation Excel 2007 (Microsoft, Redmond, USA)
- Software für statistische Analyse SPSS Version 23 (IBM, Armonk, USA)

Die statistischen Auswertungen der Infarktgrößen des linken Ventrikels und der molekularbiologischen Untersuchungen wurden mit einer ein-Weg Varianzanalyse sowie einem post-hoc Duncan Test durchgeführt. In Bezug auf die Infarktgröße des linken Ventrikels konnten mit der angestrebten Power des Tests von 0,8 Größenunterschiede innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen mit einem Median von 15 % herausgefiltert werden.

## 4. Ergebnisse

### 3.1. Infarktgrößenbestimmung des linken Ventrikels

Die Auswertung zur Infarktgrößenbestimmung des linken Ventrikels nach Ischämie/Reperfusionsschaden wurde an 32 männlichen Tieren in vier Gruppen durchgeführt.

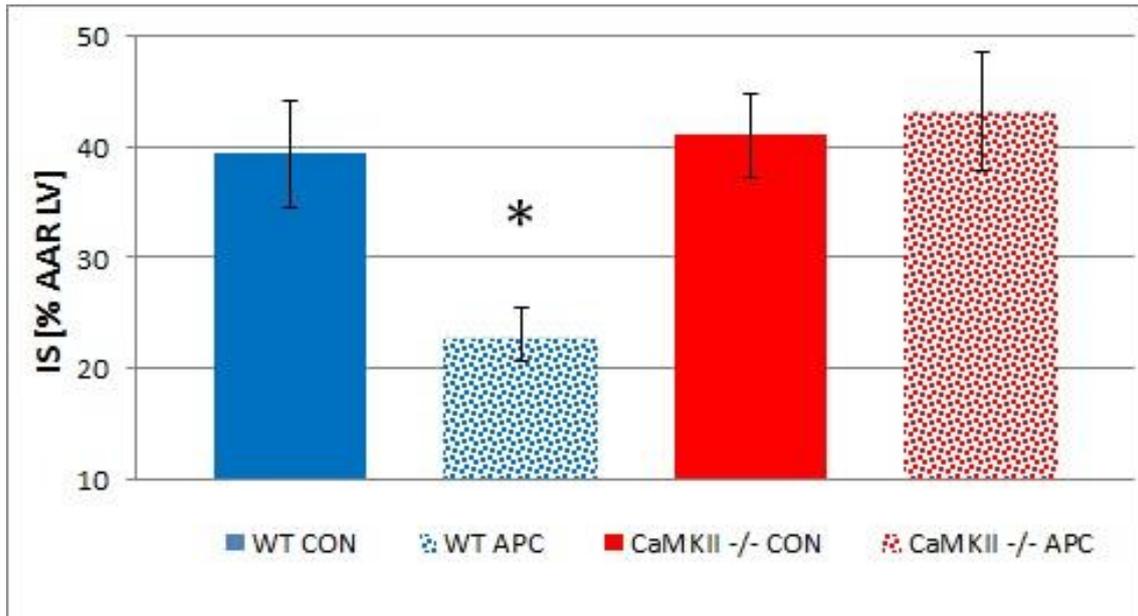
Die Herzinfarktgrößen wurden als prozentualer Anteil der Infarktgröße aus dem Risikobereich (engl. area at risk, AAR) des linken Ventrikels (IS % AAR LV) ermittelt.

In der Kontrollgruppe mit Wildtypmäusen (WT CON, n=8) betragen sie  $39 \pm 5\%$ . Unter APC mit Desfluran kam es bei Wildtypmäusen (WT APC, n=7) zu einer signifikanten Reduktion der IS % AAR LV (WT APC;  $23 \pm 2\%$ ;  $p < 0,05$ ).

Die Infarktgrößen der CaMKII $\delta$  (-/-) Mäuse (CAMKII -/- CON, n=8) betragen  $41 \pm 4\%$  und waren mit der WT CON Gruppe vergleichbar.

Unter APC mit Desfluran kam es bei den CaMKII $\delta$  (-/-) Mäusen zu keiner Reduktion der IS % AAR LV im Vergleich zur Kontrollgruppe (CAMKII -/- APC;  $43 \pm 5\%$ , n=9).

Abbildung 5 zeigt die Herzinfarktgrößen der einzelnen Gruppen.



**Abbildung 5: Darstellung der Herzinfarktgrößen (IS) als Anteil der linksventrikulären area at risk (AAR LV) in Prozent**

WT CON = Wildtypmäusekontrollgruppe (n = 8), WT APC = Wildtypmäuse mit APC durch Desfluran 1 MAC über 15 min (n = 7), CaMKII (-/-) CON = Homozygote CaMKII $\delta$  (-/-) Knock-Out Mäusekontrollgruppe (n = 8), CaMKII (-/-) APC = Homozygote CaMKII $\delta$  (-/-) Knock-Out Mäuse mit APC durch Desfluran 1 MAC über 15 min (n = 9).

Alle Daten sind Mittelwerte bezogen auf die Gruppengröße  $\pm$  SEM.

\* = signifikant ( $p < 0,05$ ) unterschiedlich zu den übrigen Gruppen.

## **3.2 Ergebnisse des experimentellen Tierprotokolls für molekularbiologische Untersuchungen**

Die Auswertung zur molekularbiologischen Untersuchung nach Ischämie/Reperfusionsschaden wurde an 24 männlichen Tieren in sechs gleichgroßen Gruppen durchgeführt.

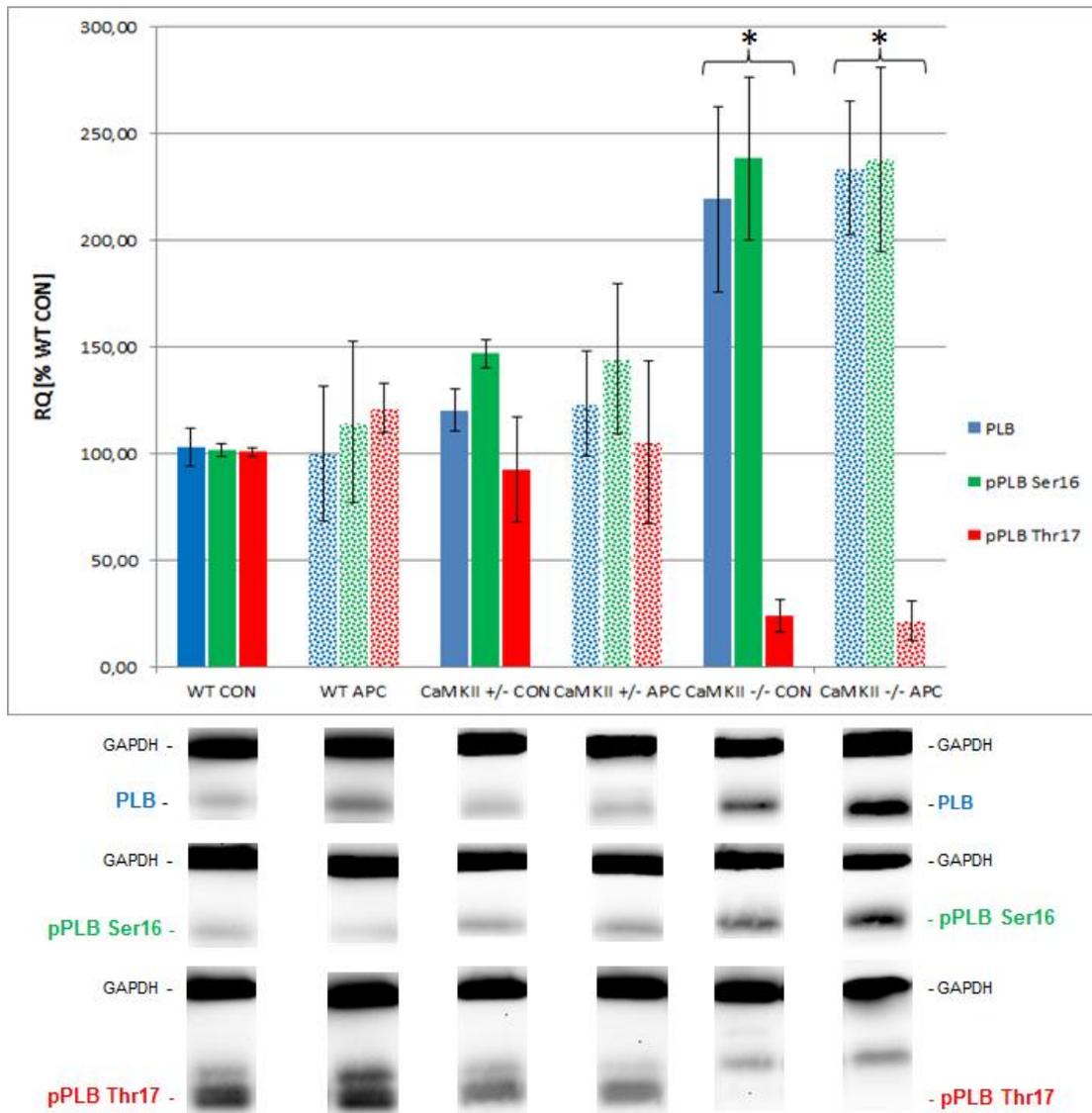
### **3.2.1 Western-Immunoblot von PLB, pPLB Ser16 und pPLB Thr17**

Abbildung 6 zeigt die semiquantitative Western-Immunoblot Analysen von PLB sowie pPLB Ser16 und pPLB Thr17.

Die Kontrollgruppen (CON) wiesen bei allen drei Proteinen eine gleichmäßige Expression auf. Eine Präkonditionierung mit Desfluran hatte in den Kontrollgruppen keinen signifikanten Einfluss auf den Nachweis der drei Proteine.

In den heterozygoten CaMKII $\delta$  (+/-) Gruppen mit nur noch einem funktionsfähigem CaMKII $\delta$  Allel gab es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Expression der drei Proteine. Eine Präkonditionierung mit Desfluran hatte auch in den heterozygoten Gruppen keinen signifikanten Einfluss auf den Nachweis von PLB, pPBL Ser16 und pPLB Thr17.

In den homozygoten CaMKII $\delta$  (-/-) Gruppen konnte nur eine geringe, zur Wildtypgruppe signifikant niedrigere Proteinexpression an dem CaMKII $\delta$  abhängigen pPLB Thr17 detektiert werden.



**Abbildung 6: Darstellung von Phospholamban gesamt sowie die Phosphorylierung an den Aminosäurestellen Serin 16 und Threonin 17 im Verhältnis zur Wildtyp Kontrollgruppe mit Western-Immunoblotting**

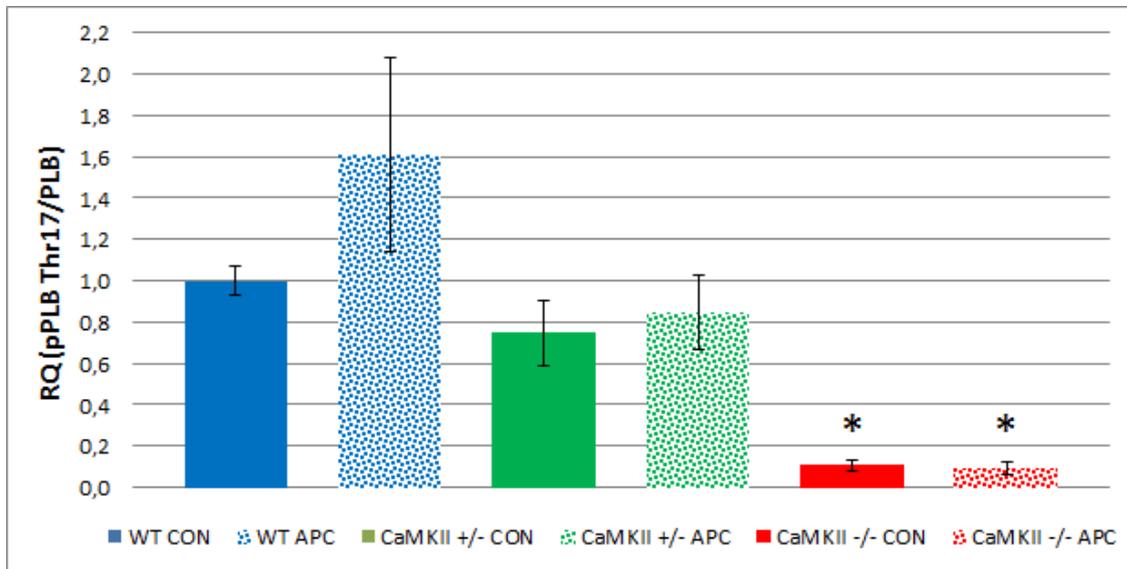
WT CON = Wildtypmäusekontrollgruppe , WT APC = Wildtypmäuse mit APC durch Desfluran 1 MAC über 15 min, CaMKII (+/-) CON = Heterozygote CaMKII $\delta$  (+/-) Knock-Out Mäusekontrollgruppe, CaMKII (+/-) APC = Heterozygote CaMKII $\delta$  (+/-) Knock-Out Mäuse mit APC durch Desfluran 1 MAC über 15 min, CaMKII (-/-) CON = Homozygote CaMKII $\delta$  (-/-) Knock-Out Mäusekontrollgruppe, CaMKII (-/-) APC = Homozygote CaMKII $\delta$  (-/-) Knock-Out Mäuse mit APC durch Desfluran 1 MAC über 15 min.

Der untere Teil der Abbildung zeigt repräsentative Western-Immunoblots der einzelnen Gruppen mit den Zielproteinen Phospholamban (PLB), dessen Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 16 (pPLB Ser-16) sowie Threonin 17 (pPLB Thr17) und die Ladekontrolle GAPDH.

Die Anzahl der Tiere beträgt in jeder Gruppe n=4. Alle Daten sind Mittelwerte bezogen auf die Gruppengröße  $\pm$  SEM.

\* = signifikant (p < 0,05) unterschiedlich zur Kontrollgruppe, hier beide CaMKII $\delta$  (-/-) Gruppen.

Eine Präkonditionierung mit Desfluran hatte keinen Einfluss auf die semiquantitativ nachgewiesene Proteinmenge (s. Abbildungen 6 und 7).



**Abbildung 7: Darstellung der relativen Größenabweichung von an Threonin 17 phosphoryliertem Phospholamban zu Phospholamban gesamt**

WT CON = Wildtypmäusekontrollgruppe, WT APC = Wildtypmäuse mit APC durch Desfluran 1 MAC über 15 min, CaMKII (+/-) CON = Heterozygote CaMKII<sub>δ</sub> (+/-) Knock-Out Mäusekontrollgruppe, CaMKII (+/-) APC = Heterozygote CaMKII<sub>δ</sub> (+/-) Knock-Out Mäuse mit APC durch Desfluran 1 MAC über 15 min, CaMKII (-/-) CON = Homozygote CaMKII<sub>δ</sub> (-/-) Knock-Out Mäusekontrollgruppe, CaMKII (-/-) APC = Homozygote CaMKII<sub>δ</sub> (-/-) Knock-Out Mäuse mit APC durch Desfluran 1 MAC über 15 min.

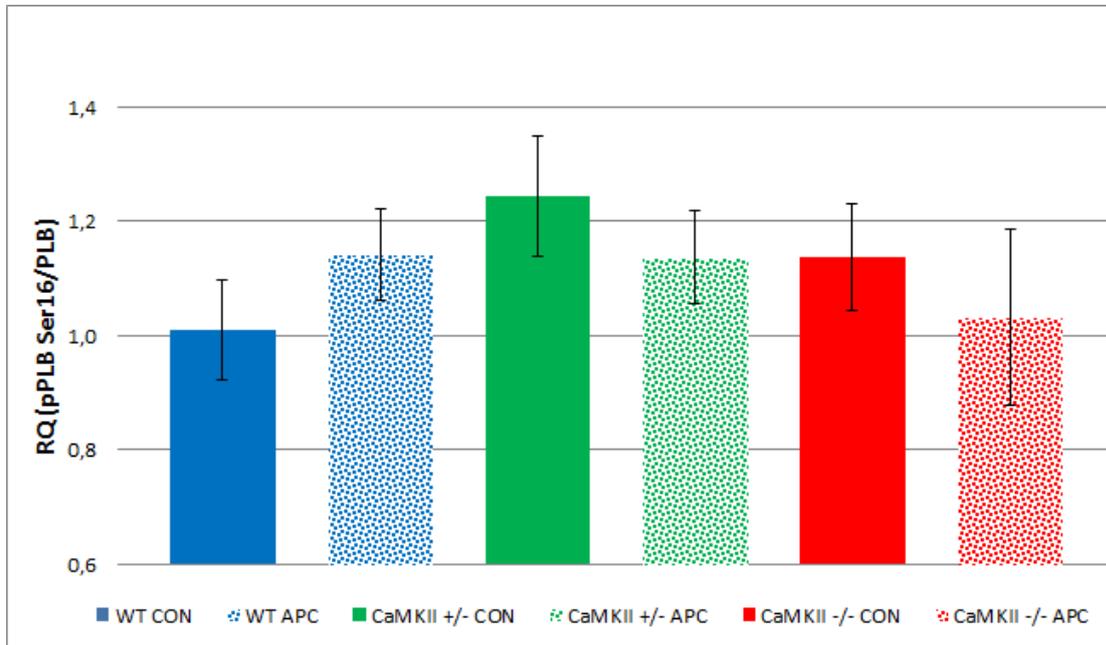
Die Anzahl der Tiere beträgt in jeder Gruppe n=4. Alle Daten sind Mittelwerte bezogen auf die Gruppengröße ± SEM. RQ=Relativer Quotient.

\* = signifikant (p < 0,05) unterschiedlich zur Kontrollgruppe, hier beide CaMKII<sub>δ</sub> (-/-) Gruppen.

Das PKA abhängige pPLB Ser16 in den CaMKII<sub>δ</sub> (-/-) CON Tieren konnte dagegen im Vergleich zu den Wildtyptieren signifikant häufiger nachgewiesen werden (s. Abbildungen 6 und 8).

PLB, welches keinen Unterschied hinsichtlich der Phosphorylierungsstelle macht, konnte in den CaMKII<sub>δ</sub> (-/-) CON Tieren ebenfalls in signifikant höheren Mengen nachgewiesen werden als in den Wildtyptieren. Die nachgewiesene Proteinmenge war dabei vergleichbar mit den Werten von pPLB Ser16 (s. Abbildungen 6 und 8).

Die Präkonditionierung mit Desfluran hatte bei den CaMKII $\delta$  (-/-) Tieren keinen Einfluss auf die semiquantitativ nachgewiesene Proteinmenge von pPLB Ser16 (s. Abbildungen 6 und 8).



**Abbildung 8: Darstellung der relativen Größenabweichung von an Serin 16 phosphoryliertem Phospholamban zu Phospholamban gesamt**

WT CON = Wildtypmäusekontrollgruppe , WT APC = Wildtypmäuse mit APC durch Desfluran 1 MAC über 15 min, CaMKII (+/-) CON = Heterozygote CaMKII $\delta$  (+/-) Knock-Out Mäusekontrollgruppe, CaMKII (+/-) APC = Heterozygote CaMKII $\delta$  (+/-) Knock-Out Mäuse mit APC durch Desfluran 1 MAC über 15 min, CaMKII (-/-) CON = Homozygote CaMKII $\delta$  (-/-) Knock-Out Mäusekontrollgruppe, CaMKII (-/-) APC = Homozygote CaMKII $\delta$  (-/-) Knock-Out Mäuse mit APC durch Desfluran 1 MAC über 15 min.

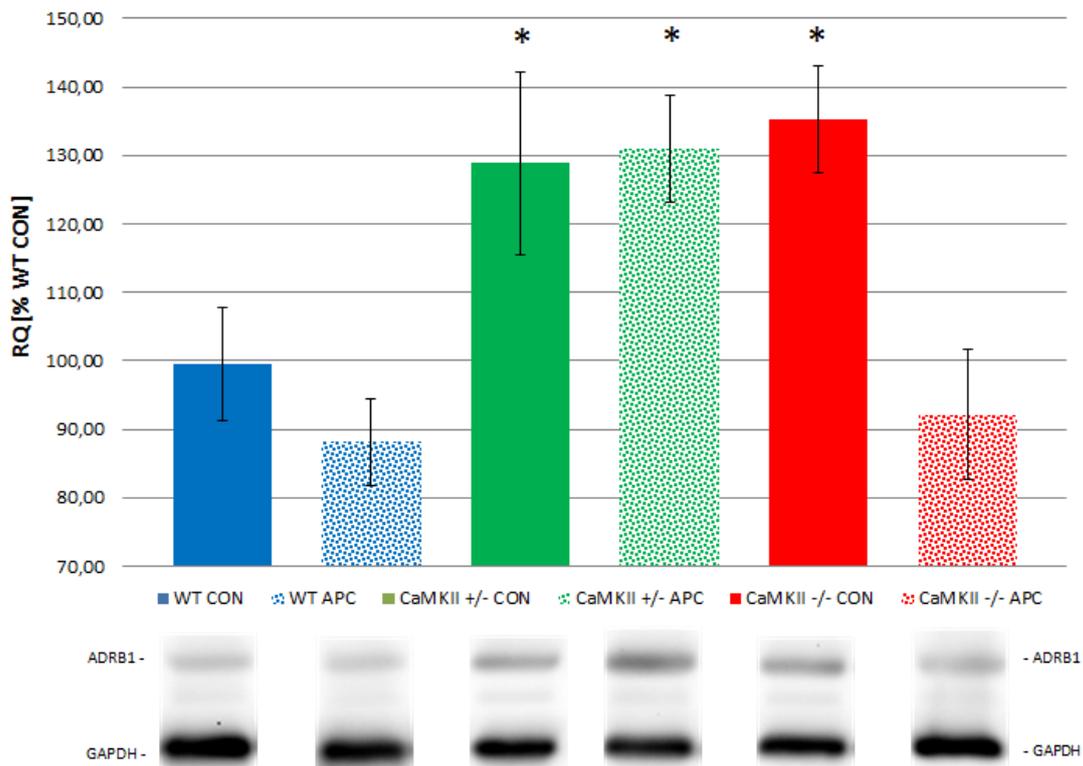
Die Anzahl der Tiere beträgt in jeder Gruppe n=4. Alle Daten sind Mittelwerte bezogen auf die Gruppengröße  $\pm$  SEM. RQ=Relativer Quotient.

Ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied zur Kontrollgruppe wird nicht erreicht.

### 3.2.2 Western-Immunoblot von ADRB1

Die Proteinexpression des beta1 Adrenorezeptors (ADRB1) zeigte in den Kontrollgruppen unabhängig von der Präkonditionierung mit Desfluran keinen signifikanten Unterschied. In den heterozygoten CaMKII $\delta$  (+/-) Tieren kam es sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Präkonditionierungsgruppe zu einem signifikanten Anstieg der ADRB1 Konzentration. Dieser Anstieg konnte auch in der homozygoten CaMKII $\delta$  (-/-) Kontrollgruppe detektiert werden. Eine Präkonditionierung mit Desfluran hob diesen Effekt bei homozygoten CaMKII $\delta$  (-/-) Mäusen auf: Die semiquantitativ nachgewiesene Proteinmenge von ADRB1 ging hier wieder auf das Niveau der Wildtypiere zurück. Knock-Out Mäuse ohne APC wiesen somit eine signifikant höhere Proteinmenge an ADRB1 auf als Tiere mit APC.

Abbildung 9 zeigt die semiquantitative Western-Immunoblot Analysen von ADRB1.



**Abbildung 9: Relative Darstellung der kumulativen Menge an beta1-Adrenorezeptor (ADRB1) mit Western-Immunoblotting**

WT CON = Wildtypmäusekontrollgruppe , WT APC = Wildtypmäuse mit APC durch Desfluran 1 MAC über 15 min, CaMKII (+/-) CON = Heterozygote CaMKII $\delta$  (+/-) Knock-Out Mäusekontrollgruppe, CaMKII (+/-) APC = Heterozygote CaMKII $\delta$  (+/-) Knock-Out Mäuse mit APC durch Desfluran 1 MAC über 15 min, CaMKII (-/-) CON = Homozygote CaMKII $\delta$  (-/-) Knock-Out Mäusekontrollgruppe, CaMKII (-/-) APC = Homozygote CaMKII $\delta$  (-/-) Knock-Out Mäuse mit APC durch Desfluran 1 MAC über 15 min.

Der untere Teil der Abbildung zeigt repräsentative Western-Immunoblots der einzelnen Gruppen mit den Zielprotein beta1-Adrenorezeptor (ADRB1) und der Ladekontrolle GAPDH.

Die Anzahl der Tiere beträgt in jeder Gruppe n=4. Alle Daten sind Mittelwerte bezogen auf die Gruppengröße  $\pm$  SEM. RQ=Relativer Quotient (im Verhältnis zur Wildtyp Kontrollgruppe).

\* = signifikant ( $p < 0,05$ ) unterschiedlich zur Kontrollgruppe, hier beide CaMKII $\delta$  (+/-) Gruppen sowie CaMKII $\delta$  (-/-) CON.

## 5. Diskussion

In Abhängigkeit von der Ischämiedauer beeinträchtigt der myokardiale I/RI Integrität und Funktion des Herzens. Durch Gabe volatiler Anästhetika vor Eintritt des ischämischen Ereignisses vermittelt APC den Myozyten eine zeitlich begrenzte Protektion gegen I/RI.

In der vorliegenden Studie wurde im murinen Herzinfarktmodell die Rolle der CaMKII<sub>δ</sub> bei der Desfluran-induzierten Kardioprotektion untersucht. Darüber hinaus wurde das Verhalten der CaMKII<sub>δ</sub> und des  $\beta_1$ -AR vermittelten Signalweges bei APC durch das Western-Immunoblotting Verfahren semiquantitativ untersucht.

Ein Ergebnis dieser Studie zeigt, dass eine Desfluran-vermittelte Reduktion der Herzinfarktgröße in Wildtyptieren, nicht aber in Mäusen mit homozygotem Knock-Out der CaMKII<sub>δ</sub>, stattfindet. Weiterhin wird gezeigt, dass der CaMKII<sub>δ</sub> Knock-Out die Expression von Phospholamban und die Phosphorylierung von Phospholamban an der Aminosäurestelle Serin 16 im Vergleich zum Wildtyp mehr als verdoppelt. Darüber hinaus wird gezeigt, dass die Expression des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors in Tieren mit homo- und heterozygotem CaMKII<sub>δ</sub> Knock-Out im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist. APC mit Desfluran hebt diese erhöhte  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptorkonzentration im homozygoten, aber nicht im heterozygoten Knock-Out auf.

## 4.1 Methodik

Das *in vivo* Herzinfarktmodell mit induziertem I/RI an Mäusen gilt heutzutage neben den Modellen an Ratten [213,214] und Kaninchen [104,215] als etablierte Methodik bei der Erforschung von APC: Unsere, aber auch andere, Arbeitsgruppen haben Studien mit diesem Modell durchgeführt [105,216,217]. *In vivo* Herzinfarktmodelle an Hunden, wie sie Murry et al. zuerst für IPC und Warltier et al. zuerst für APC durchgeführt haben, werden in der heutigen Zeit auch aus ethischen Gesichtspunkten nicht mehr durchgeführt [61,96].

Die Konzeption der experimentellen Tierstudie konnte in zentralen Punkten auf Erkenntnisse aus früheren Eigenstudien aufbauen: Das operative Prozedere sowie die Entscheidung für einen induzierten I/RI mit einer ischämischen Okklusionsdauer von 45 min und einer Reperfusiondauer von 180 min zur Generierung aussagekräftiger Myokardinfarkte basiert maßgeblich auf einer Studie von Redel et al. am murinen Tiermodell *in vivo* aus dem Jahr 2008 [207]. Um Abweichungen bei der Infarktgenerierung durch iatrogene Einflüsse möglichst gering zu halten wurden alle Tierpräparationen durch den gleichen, erfahrenen Assistenten durchgeführt. Dieser hat bereits in den Vorstudien der Arbeitsgruppe an den Tierpräparationen mitgewirkt und sorgt für Standardisierung und Kontinuität bei der Arbeit am Tiermodell.

Darüber hinaus muss bei der Infarktauswertung bedacht werden, dass die Größe der AAR einen direkten Einfluss auf die Infarktgröße hat und so die Resultate verzerren kann: Ytrehus et al. haben 1994 am Kaninchen- und Rattenherz *in vivo* gezeigt, dass die Größe der AAR einen wesentlichen Prädiktor für die Größe des Infarktes darstellt [208]. Eine Fehl- oder Teilligatur der LAD kann eine deutlich reduzierte AAR zur Folge haben, was folglich zu einer reduzierten Infarktgröße - und zwar nicht nur als absoluter Anteil sondern auch als relativer Anteil an der AAR - führen kann. Um dieser unmittelbaren Beeinflussung vorzubeugen, musste der Anteil der AAR bei unseren Untersuchungen mindestens 15 % der linksventrikulären Masse betragen. Zusätzlich wurden die AAR zwischen den einzelnen Gruppen verglichen, dabei konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Bei der Wahl des volatilen Anästhetikums und der Applikationsdauer der APC haben wir uns für Desfluran mit einer Begasungsdauer und anschließender Auswaschphase von jeweils 15 Minuten entschieden. Diese Entscheidung basiert maßgeblich auf einer Studie von Redel et al. am murinen Tiermodell *in vivo* aus dem Jahr 2009, in der die Wirkungen unterschiedlicher Applikationsdauern von Desfluran, Sevofluran und Isofluran im Bezug auf die induzierbare Herzinfarktgröße verglichen worden sind [101].

## 4.2 CaMKII $\delta$ und Kardioprotektion

Ein Ergebnis der vorliegenden Studie zeigt, dass eine Desfluran-vermittelte Reduktion der Herzinfarktgröße im Wildtyp, nicht aber in Mäusen mit homozygotem KO der CaMKII $\delta$ , stattfindet.

Eine vorherige Studie dieser Arbeitsgruppe hat klare Hinweise für diesen Zusammenhang bei Kaninchenherzen *in vivo* gezeigt [145]. Damals ist die CaMKII kurzzeitig mit dem Inhibitor KN-93 geblockt worden, wodurch die Wirkung der APC aufgehoben worden ist. Allerdings hemmt KN-93 neben der CaMKII auch direkt L-Typ Ca<sup>2+</sup> Kanäle und beeinflusst intrazelluläre Kaliumströme [218]. Darüber hinaus hemmt KN-93 kompetitiv die Aktivierung aller CaMKII Genvarianten und damit im ganzen Körper, obwohl im Herzen überwiegend die CaMKII $\delta$  Isoform vorherrscht [172].

Durch den selektiven Knock-Out dieser CaMKII $\delta$  Isoform und den daraus resultierenden Verzicht auf die Gabe eines selektiven, aber unspezifischen, Inhibitors können wir zum ersten Mal zeigen, dass die CaMKII $\delta$  ein zentraler Baustein für die Kardioprotektion durch das volatile Anästhetikum Desfluran ist.

### 4.2.1 CaMKII $\delta$ und I/RI

Im Myokard ist die CaMKII $\delta$  maßgeblich an der Aufrechterhaltung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Gleichgewichtes beteiligt und trägt so zur Regulierung der elektromechanischen Koppelung bei. Durch die Phosphorylierung an spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanälen der Zellmembran und an RyR2 des sarkoplasmatischen Retikulums hebt die CaMKII $\delta$  den intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Spiegel an [189]. Durch Phosphorylierung von PLB und der damit verbundenen Aktivierung der SERCA am sarkoplasmatischen Retikulum senkt sie den intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Ionen Spiegel ab [191].

Bei I/RI kommt es zu einer starken intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Ansammlung, die zu einem Zusammenbruch des Ca<sup>2+</sup> Gleichgewichtes führen kann [34]. Über vielfältige Mechanismen führt diese Ca<sup>2+</sup> Akkumulation zu nachhaltiger

Schädigung des Myokards wie kontraktile Dysfunktion oder Zellnekrosen (s.Kapitel 1.1 und [219]). Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration ist der entscheidende Modulator bei der Aktivierung der  $\text{CaMKII}_\delta$ , weshalb sie vor allem während der Ischämie und in den ersten Minuten der Reperfusion stark hochreguliert wird [178,196].

Es ist umstritten, ob diese starke  $\text{CaMKII}_\delta$  Aktivierung eine protektive oder destruktive Rolle bei der Entstehung von I/RI zukommt: In einer Übersichtsarbeit haben Bell et al. die  $\text{CaMKII}$ -abhängigen Antworten auf I/RI bei Tierexperimenten verglichen und konnten speziesübergreifend bei *in vitro* und *in vivo* Modellen zeigen, dass die selektive Blockade der  $\text{CaMKII}$  Herzinfarktgröße und das Auftreten postischämischer Arrhythmien reduziert [203]. Lediglich bei einer Ischämiedauer von weniger als 20 min - also der Zeitspanne, bei der I/RI als potentiell vollständig reversibel gelten – führte die selektive Blockade der  $\text{CaMKII}$  zu einer rascheren Erholung der ventrikulären Myokardfunktion [196,199]. Insgesamt sprechen also sehr viele Studien dafür, dass die selektive Blockade der  $\text{CaMKII}$  protektive Wirkung auf das Myokard bei I/RI hat.

#### **4.2.2 $\text{CaMKII}_\delta$ und APC**

Im ersten Moment könnte daher das Ergebnis der vorliegenden Studie, die der  $\text{CaMKII}_\delta$  eine elementare Bedeutung bei der Protektion des Myokards zukommen lässt, irritieren. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Studie eine kardioprotektive Wirkung der  $\text{CaMKII}_\delta$  nach APC zeigt. Dieses Ergebnis bekräftigt Daten aus anderen Studien zur  $\text{CaMKII}$ -abhängigen Kardioprotektion bei Präkonditionierung: Für die IPC wurde am Rattenherz *in vitro* gezeigt, dass eine Blockade der  $\text{CaMKII}$  mit dem selektiven Inhibitor KN-93 mit einer deutlich stärkeren Einschränkung der linksventrikulären Funktion nach I/RI einhergeht als bei einer Vergleichsgruppe ohne Blockade der  $\text{CaMKII}$  [205,206]. Für die APC konnte in einer vorherigen Studie bei Kaninchen *in vivo* gezeigt werden, dass eine Blockade der  $\text{CaMKII}$  mit dem selektiven Inhibitor KN-93 die Desfluran-induzierte Reduktion der Herzinfarktgröße aufhebt [145].

Durch welche Mechanismen kommt es nun dazu, dass Präkonditionierung durch volatile Anästhetika in Abhängigkeit von der CaMKII $\delta$  kardioprotektive Effekte vermittelt? Hauptsächlich zwei Erklärungsmodelle kommen hierfür in Betracht:

Die CaMKII $\delta$  hat eine Schlüsselposition in der intrazellulären Ca $^{2+}$  Regulation inne und APC wirkt günstig auf den intrazellulären Ca $^{2+}$  Haushalt bei I/RI ein, was Studien von An et al. nahelegen: An isolierten Schweineherzen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass bei APC mit Sevofluran den zytosolischen Ca $^{2+}$  Spiegel bei induziertem I/RI gegenüber einer Kontrollgruppe deutlich reduziert und die linksventrikuläre kontraktile Funktion verbessert waren [220]. Für IPC kamen sie zu einem vergleichbaren Ergebnis [221]. An isolierten Rattenherzen konnte die gleiche Arbeitsgruppe durch Western-Immunoblot Analysen *in vitro* zeigen, dass bei APC mit Sevofluran Dichte und Phosphorylierung von RyR2 und SERCA bei induziertem I/RI gegenüber einer Kontrollgruppe signifikant erhöht waren [222]. Beide Proteine sind von grundsätzlicher Bedeutung für die intrazelluläre Ca $^{2+}$  Homöostase und werden von der CaMKII $\delta$  phosphoryliert. Basierend auf diesen Fakten gäbe es zwei Vermutungen wie APC bei I/RI wirkt: Zum einen könnte APC durch bisher unbekannte Mechanismen eine überschießende Ca $^{2+}$  Akkumulation verhindern, wodurch wiederum die CaMKII $\delta$  auf einem physiologischen Level aktiviert und so schützend auf den Ca $^{2+}$  Haushalt wirken könnte. Andererseits könnte APC zunächst direkt regulatorisch auf die CaMKII $\delta$  wirken, woraufhin sie den intrazellulären Ca $^{2+}$  Spiegel auf ein physiologisches Niveau heben könnte. Natürlich ist anzunehmen, dass der eine Weg den anderen nicht ausschließt, da intrazelluläre Ca $^{2+}$  Ionen maßgeblich für die Aktivierung der CaMKII $\delta$  verantwortlich sind und diese wiederum im Sinne eines Feedback-Mechanismus die Konzentration der intrazellulären Ca $^{2+}$  Ionen reguliert [178].

Gegen beide Vermutungen spricht allerdings, dass sich bei APC die Aktivität der CaMKII $\delta$ , ermittelt durch Expression von an Aminosäurestelle Threonin 17 phosphoryliertem PLB, bei induziertem I/RI gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant ändert, weder bei An et al. am Rattenherz *in vitro* [222], noch bei Lange et al. am Kaninchenherz *in vivo* [145], noch bei der vorliegenden Studie

am Mäuseherz *in vivo*. Basierend auf diesen Ergebnissen ist es unwahrscheinlich, dass die CaMKII $\delta$  abhängige Kardioprotektion bei APC unmittelbar von der zytosolischen Ca $^{2+}$  Konzentration abhängt. Allerdings muss in diesem Zusammenhang auch darüber nachgedacht werden, ob die Phosphorylierung an Threonin 17 von PLB wie aktuell üblich mit der allgemeinen Aktivität der CaMKII $\delta$  gleichzusetzen ist [203]. Tatsächlich steht PLB an Threonin 17 nur für eines von vielen Proteinen, die von der CaMKII $\delta$  beeinflusst werden. Dabei ist unklar, ob die CaMKII $\delta$  bei I/RI alle Proteine gleich stark moduliert. Osada et al. haben in einer Studie an isolierten Rattenherzen *in vitro* gezeigt, dass bei IPC die Aktivität der SERCA2a und die Aktivität der CaMKII bei induziertem I/RI gegenüber einer Kontrollgruppe signifikant zugenommen haben [205]. Dabei wurde die Aktivität der CaMKII mit einem speziellen Kit bestimmt, bei dem jede Phosphorylierung der CaMKII gemessen wurde. Die Ergebnisse dieser Studie stützen die Vermutung, dass Präkonditionierung zu einer Hochregulation der CaMKII $\delta$  führt und sie so protektiv auf den Ca $^{2+}$  Haushalt wirkt.

Bei APC wurden bis heute noch keine direkten Aktivitätsmessungen der CaMKII durchgeführt. Ob und welche Rolle die CaMKII bei APC-abhängiger Kardioprotektion im Zusammenhang mit der zytosolischen Ca $^{2+}$  Konzentration spielt, könnten daher zukünftige Studien mit einer direkten Aktivitätsmessung der CaMKII zeigen.

#### **4.2.3 CaMKII $\delta$ und ROS**

Ein weitgehend Ca $^{2+}$  unabhängiges Modell, das eine APC-vermittelte Kardioprotektion in Abhängigkeit von der CaMKII $\delta$  erklären könnte, würde über die Bildung von ROS gehen:

Am Kaninchenherz wurde *in vivo* gezeigt, dass APC die Bildung von ROS fördert und dass das Abfangen von ROS die APC-vermittelte Reduktion der Herzinfarktgröße bei I/RI aufhebt [116]. 2008 konnten Erickson et al. zeigen, dass die CaMKII $\delta$  an den redoxsensitiven Aminosäurestellen Methionin 281 und 282 der regulatorischen Domäne direkt von ROS aktiviert werden kann, auch in

Abwesenheit von Calcium und Calmodulin [223]. Eine weiterführende strukturelle Studie legt nahe, dass die ROS-abhängige Aktivierung der CaMKII $\delta$  eine zusätzliche Aktivierung durch Calcium und Calmodulin und eine Autophosphorylierung an Threonin 287 verhindert [224]. Diese Daten lassen die Vermutung zu, dass es bei APC zu einer ROS-vermittelten Aktivierung der CaMKII $\delta$  kommen könnte. Der entscheidende Unterschied zu anderen Erklärungsmodellen läge darin, dass die CaMKII $\delta$  hier schon vor Eintritt des I/RI aktiviert wäre. Somit würde sie nicht erst durch die I/RI bedingten Ionenschwankungen aktiviert werden, sondern könnte diesen Schwankungen bereits zu Beginn protektiv entgegenwirken. Für diese Vermutung würden die oben beschriebenen Ergebnisse sprechen, nach denen noch keine APC-Studie eine Aktivitätssteigerung der CaMKII $\delta$  bei I/RI zeigen konnte. Um den Zusammenhang von ROS und CaMKII $\delta$  bei APC zu klären wären weitere Studien notwendig, bei denen unter anderem die Aktivierung der CaMKII $\delta$  durch ein volatiles Anästhetikum vor Induktion des I/RI untersucht werden sollte.

## 4.3 CaMKII $\delta$ im molekularbiologischen Kontext

Weitere Ergebnisse dieser Studie zeigen anhand von Western-Immunoblots semiquantitativ die Proteinexpression von PLB, p-PLB (Ser16), p-PLB (Thr17) und  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptor nach I/RI bei Wildtyptieren, heterozygoten CaMKII $\delta$  (+/-) Mäusen und homozygoten CaMKII $\delta$  (-/-) Mäusen.

### 4.3.1 CaMKII $\delta$ und Phospholamban

PLB sitzt am sarkoplasmatischen Retikulum und moduliert in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsgrad die Aktivität der SERCA2a, die ATP-abhängig Ca<sup>2+</sup> Ionen vom Zytoplasma ins Sarkoplasma pumpt: Im unphosphoryliertem Zustand inhibiert PLB die Aktivität der SERCA2a, im phosphoryliertem Zustand wird diese Inhibition aufgehoben. Somit kommt PLB eine Schlüsselrolle bei der Modulation der sarkoplasmatischen Ca<sup>2+</sup> Aufnahme sowie bei Kontraktion und Dilatation des Herzmuskels zu [193]. PLB wird entweder an der Aminosäurestelle Serin 16 durch die PKA oder an Threonin 17 durch die CaMKII $\delta$  phosphoryliert [192].

Diese unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen erklären, warum bei der vorliegenden Studie PLB bei CaMKII $\delta$  (-/-) Mäusen nahezu ausschließlich an Serin 16 phosphoryliert wurden: Die KO-Tiere verfügen nicht über eine CaMKII $\delta$  weshalb fast keine Phosphorylierung an Threonin 17 stattgefunden hat. Trotzdem ist eine geringe Menge an p-PLB (Thr17) messbar. Dies lässt sich vor allem dadurch erklären, dass CaMKII $\delta$  zwar die mit Abstand häufigste CaMKII Isoform im Herzen ist, aber dennoch andere Isoformen in geringen Mengen vorhanden sind [225]. Darüber hinaus ist es durchaus möglich dass die Primärantikörper von p-PLB (Thr17) trotz hoher Spezifität in geringem Umfang an PLB oder p-PKB (Ser16) gebunden haben könnten.

Die gleichbleibend hohe Expression von PLB und p-PLB (Ser16) nach APC mit Desfluran bei homozygoten CaMKII $\delta$  (-/-) Tieren spricht dafür, dass das volatile Anästhetikum keinen direkten Einfluss auf die Phosphorylierung an PLB hat.

Diese Beobachtung ist konsistent mit der Rolle von APC bei Wildtyptieren und heterozygoten CaMKII $\delta$  (+/-) Mäusen in der vorliegenden Studie: Auch hier bleibt das Proteinexpressionsniveau von PLB oder p-PLB bei I/RI unter Präkonditionierung mit Desfluran konstant.

Weiterhin zeigen Ergebnisse dieser Studie, dass bei heterozygoten CaMKII $\delta$  (+/-) Mäusen PLB gleichmäßig an Serin 16 und Threonin 17 phosphoryliert wird. Auch wenn sich eine Tendenz zur stärkeren Phosphorylierung an Serin 16 erkennen lässt, ist der Unterschied zu Threonin 17 nicht signifikant. Daraus lässt sich ableiten, dass die Funktionsfähigkeit der CaMKII $\delta$  in Extremsituationen wie bei I/RI auch mit nur einem intakten Allel aufrechterhalten werden kann.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen auch, dass die Proteinexpression von PLB und p-PLB (Ser16) in der homozygoten CaMKII $\delta$  (-/-) Gruppe mehr als doppelt so hoch ausfällt wie in der Wildtypgruppe. Daten aus einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe haben interessanterweise gezeigt, dass eine selektive Blockade der CaMKII mit KN-93 in einem vergleichbaren Versuchsprotokoll bei Kaninchen *in vivo* keine signifikante Zunahme der Proteinexpression von PLB und p-PLB (Ser16) im Vergleich zu Wildtyptieren bewirkt hat [145]. Eine Überexpression von PLB und p-PLB (Ser16) scheint es also nur bei langfristiger, nicht aber bei kurzfristiger Funktionslosigkeit der CaMKII $\delta$  nach I/RI zu geben. Zwangsläufig kommt an dieser Stelle die Frage auf, ob diese Überexpression bei CaMKII $\delta$  (-/-) Mäusen bereits vor I/RI bestanden hat oder erst als Antwort auf Induktion des I/RI aufgetreten ist. Da sich unsere Studie im Kern mit der Wirkung von APC bei I/RI beschäftigt, sind keine Tiere ohne Induktion eines I/RI untersucht worden. Allerdings hat eine andere Arbeitsgruppe bei Western-Immunoblots von CaMKII $\delta$  (-/-) Mäusen ohne Intervention gezeigt, dass sich die Expression von PLB und p-PLB (Ser16) im Vergleich zu Wildtyptieren nicht geändert hat [226]. Somit ist davon auszugehen, dass es erst bei I/RI zu einer signifikanten Erhöhung der PLB Expression in CaMKII $\delta$  (-/-) Tieren kommt. Ein Grund hierfür wäre, dass es bei einer dauerhaft funktionslosen CaMKII $\delta$  in Extremsituationen wie I/RI zu

intrazellulären Kompensationsversuchen durch andere Funktionsmoleküle der Herzmuskelzelle kommen könnte.

#### 4.3.2 CaMKII<sub>δ</sub> und PKA

Im vorliegenden Fall könnte diese Kompensation über die PKA stattfinden, die PLB an der Aminosäurestelle Serin 16 phosphoryliert. Die PKA ist ein integraler Bestandteil des stimulierenden  $\beta$ -adrenergen Signalweges im Herzen, bei dem hauptsächlich über Stimulation von  $\beta_1$ -AR über mehrere Zwischenschritte zyklisches Adenosinmonophosphat produziert wird, welches wiederum die PKA aktiviert [227]. Über den  $\beta$ -adrenergen Signalweg kommt es auch zu einer Aktivierung der CaMKII<sub>δ</sub>, die ebenfalls PLB als ein wichtiges Phosphorylierungsziel hat. Durch selektive Blockade der PKA mit H-89 konnte in isolierten Rattenherzen *in vitro* gezeigt werden, dass unter physiologischen Bedingungen für die Aktivierung der CaMKII<sub>δ</sub> über den  $\beta$ -adrenergen Signalweg eine vorausgehende PKA-Aktivierung notwendig ist [228]. Erklärt werden kann dies dadurch, dass die CaMKII<sub>δ</sub> hauptsächlich über den Anstieg im intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration aktiviert wird, wofür die PKA durch Phosphorylierung von RyR2 und L-Typ Calciumkanäle sorgt [193]. Unter Normalbedingungen nimmt die PKA damit die dominante Rolle gegenüber der CaMKII<sub>δ</sub> im  $\beta$ -adrenergen Signalweg ein. Somit sprechen identische Aktivierungswege und Phosphorylierungsziele beider Kinasen dafür, dass die PKA unter physiologischen Bedingungen zentrale Aufgaben der CaMKII<sub>δ</sub> übernehmen kann. Dies gilt auch für PLB: Zuerst wird PLB an Serin 16 phosphoryliert, erst danach an Threonin 17 [229].

In zellulären Stresssituationen ändert sich diese Rollenverteilung: An Mäusen mit selektivem Knock-Out der Phosphorylierungsstellen von PLB wurde gezeigt, dass Phosphorylierung an Threonin 17 vor allem zu Beginn von Ischämie und bei Reperfusion deutlich zunimmt und dieser Effekt insbesondere durch den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Anstieg getriggert wird [196]. Weitere Studien konnten zeigen, dass diese CaMKII<sub>δ</sub> abhängige Phosphorylierung an Threonin 17 für die

Aufrechterhaltung der kardialen Kontraktilität und für die Wiederherstellung des  $\text{Ca}^{2+}$  Gleichgewichtes essentiell ist [199,200].

Aufgrund des Knock-Outs konnte es in der vorliegenden Studie nicht zu dieser  $\text{CaMKII}_\delta$ -bedingten Gegenregulation kommen. Es liegt nahe, dass in diesem Fall über die PKA an p-PLB (Ser16) eine möglichst große Menge an  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR befördert wird. Dies erklärt die verstärkte Expression von PLB und p-PLB (Ser16) bei I/RI. Gleichzeitig zeigen diese Ergebnisse, dass die Mäuse mit erhöhter PLB und p-PLB (Ser16) Expression keine kleinere, aber auch keine größere Herzinfarktgröße haben als die Wildtypiere. Dies ist ein Hinweis, aber kein Beweis, dafür, dass ein Ausfall der  $\text{CaMKII}_\delta$  über die PKA kompensiert werden kann. Aufschluss über diesen Zusammenhang könnten weitere Studien geben, bei denen insbesondere die Expression weiterer Zielproteine der PKA bei  $\text{CaMKII}_\delta$  (-/-) Tieren nach I/RI untersucht werden müsste.

#### **4.3.3 $\text{CaMKII}_\delta$ und PKC**

Neben der PKA könnte auch die PKC bei dauerhaft funktionsloser  $\text{CaMKII}_\delta$  in Extremsituationen wie I/RI intrazelluläre Kompensationsmechanismen über PLB modulieren:

1984 konnte am Kaninchenherzen *in vitro* gezeigt werden, dass die PKC über eine Phosphorylierung von PLB an der Aminosäurestelle Serin 10 die Aktivität der SERCA2a und damit den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Haushalt beeinflusst [230,231]. Am intakten Schweineherzen *in vivo* konnte eine PKC-abhängige Phosphorylierung von PLB an Serin 10 dagegen nicht bestätigt werden, weshalb in den folgenden Jahren dieser Phosphorylierungsweg für PLB weitgehend verlassen wurde [193,232]. Dennoch scheint die PKC eine wichtige Rolle bei der APC zu spielen, wobei die Mechanismen der Protektion noch nicht im Einzelnen verstanden sind und von Dosis und Dauer der APC abhängen [233-235].

Für die IPC konnte an Langendorff Herzen gezeigt werden, dass PLB eine wichtige Rolle in der Vermittlung von PKC-abhängigen kardioprotektiven Effekten einnimmt [236]. Weiterhin wurde an einem I/RI Rattenmodell *in vivo*

gezeigt, dass es im Rahmen einer Ischämie zu einer verstärkten Aktivierung der PKC kommt, diese Kinase über mehrere Zwischenschritte das aktivierte PLB dephosphoryliert und so den zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  Überschuss während der Reperfusion fördert [237]. Ein zentrales Protein bei diesem Signalweg ist der Protein Inhibitor 1 [238]. Während eine Hemmung des Inhibitors durch PKC für eine Dephosphorylierung des aktivierten PLB sorgt, kann die PKA diesen Effekt durch Aktivierung des Protein Inhibitor 1 aufheben [239].

Die Auswirkungen von APC auf diesen Signalweg wurden bisher noch nicht untersucht. Gerade durch das direkte Zusammenwirken von PKA und PKC könnten hier bei dauerhaft funktionsloser  $\text{CaMKII}_\delta$  neue Erkenntnisse über die kardioprotektive Wirkung dieser Kinasen bei APC gesammelt werden.

#### **4.3.4 $\text{CaMKII}_\delta$ und $\beta$ -adrenerge Signalwege**

Weitere Ergebnisse dieser Studie zeigen anhand von Western-Immunoblots semiquantitativ die Proteinexpression vom  $\beta_1$ -AR (im Folgenden: ADRB1) nach I/RI bei Wildtyptieren, heterozygoten  $\text{CaMKII}_\delta$  (+/-) Mäusen und homozygoten  $\text{CaMKII}_\delta$  (-/-) Mäusen.

Der beta-adrenerge Signalweg über ADRB1 spielt eine wichtige Rolle bei der Kardioprotektion durch APC: Lange et al. konnten in einer Studie an Kaninchenherzen *in vivo* zeigen, dass eine durch APC mit Desfluran oder Sevofluran vermittelte Herzinfarktgrößenreduktion über eine selektive Blockade des ADRB1 mit Esmolol bei I/RI aufgehoben worden ist [144].

In der vorliegenden Studie gibt es hinsichtlich der Expression von ADRB1 keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyptieren mit oder ohne APC bei induziertem I/RI. APC sorgt somit nicht für eine verstärkte Expression des ADRB1. Aus den Ergebnissen dieser und der vorherigen Studie zeigt sich, dass die Infarktgrößenreduktion bei APC mit Desfluran von der qualitativen Aktivität des ADRB1, nicht jedoch von seiner quantitativen Expression abhängt. Diese Beobachtung wird von den Ergebnissen der Western-Immunoblots an p-PLB (Ser16), der Phosphorylierungsstelle der PKA aus dem ADRB1 Signalweg, bestätigt: Hinsichtlich der Expression von p-PLB (Ser16) gibt es keinen

signifikanten Unterschied zwischen Wildtyptieren mit oder ohne APC bei induziertem I/RI.

Zwischen heterozygoten CaMKII $\delta$  (+/-) Mäusen mit oder ohne APC bei induziertem I/RI gibt es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Expression von ADRB1. Auch hier kommt es also nicht zu einem APC-bedingten Expressionsunterschied von ADRB1. Diese Beobachtung wird ebenfalls von den Ergebnissen der Western-Immunoblots an p-PLB (Ser16) bestätigt, deren Expression bei CaMKII $\delta$  (+/-) Mäusen mit oder ohne APC bei induziertem I/RI gleich geblieben ist. Gleichwohl ist die Expression von ADRB1 in den heterozygoten CaMKII $\delta$  (+/-) Mäusen mit und ohne APC im Vergleich zu den Wildtypen signifikant erhöht. Trotz dieser Expressionssteigerung kommt es zu keiner signifikanten Aktivitätssteigerung der PKA oder CaMKII $\delta$ , abgeleitet durch p-PLB (Ser16) und p-PLB (Thr17). Die verstärkte Aktivierung des  $\beta_1$ -adrenergen Signalweges könnte so als protektive Antwort auf die partiell inaktivierte CaMKII $\delta$  gesehen werden: Die Hochregulation des ADRB1 reicht in diesem Fall aus um eine ausreichende Aktivität der Proteinkinasen PKA und CaMKII $\delta$  zu gewährleisten.

Bei homozygoten CaMKII $\delta$  (-/-) Mäusen führt APC mit Desfluran zu einem signifikanten Mengenunterschied von ADRB1 bei induziertem I/RI: Tiere ohne APC haben einen signifikant höheren Nachweis von ADRB1 als Tiere mit APC. Somit sorgt APC lediglich bei homozygoten CaMKII $\delta$  (-/-) Mäusen, nicht aber in heterozygoten Mäusen oder Wildtyptieren, für einen signifikanten Mengenunterschied von ADRB1. Ein Grund für den erniedrigten Nachweis von ADRB1 nach APC könnte sein, dass die APC-vermittelte Kardioprotektion nach I/RI nicht nur über den  $\beta_1$ , sondern auch über den  $\beta_2$ -Rezeptor vermittelt wird: Lange et al. konnten an einer Studie an Kaninchen *in vivo* zeigen, dass eine APC-vermittelte Herzinfarktgrößenreduktion bei induziertem I/RI durch eine selektive Blockade des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors mit ICI 118551 aufgehoben wird [103]. Es wäre also durchaus möglich, dass APC bei dauerhafter Inaktivität der CaMKII $\delta$  eine stärkere Verwendung des  $\beta_2$ -Adrenorezeptorsignalweges auf Kosten des  $\beta_1$ -Adrenorezeptorsignalweges begünstigt. Hierzu wären weitere Studien notwendig, bei denen insbesondere die Expression des  $\beta_2$ -

Adrenorezeptors oder seiner nachgeordneten Proteine wie zum Beispiel der Proteinkinase B bei APC nach I/RI bestimmt werden müssten.

Trotz der deutlich erniedrigten ADRB1 Menge bei homozygoten CaMKII $\delta$  (-/-) Mäusen liegt die Proteinmenge an p-PLB (Ser16) bei APC auf dem Niveau ohne APC. Hierfür gibt es mehrere Erklärungen:

Eine Erklärung wäre, dass APC für eine ADRB1 unabhängige PKA Aktivierung sorgt. Dies ist allerdings sehr unwahrscheinlich, da eine selektive Blockade des  $\beta_1$ -AR mit Metoprolol die Expression von p-PLB (Ser16) mit APC vergleichbar stark senkt wie ohne APC [145].

Eine andere Erklärung wäre, dass Phospholamban bei dauerhafter Abwesenheit der CaMKII $\delta$  von einer anderen Kinase an der Aminosäurestelle Serin 16 phosphoryliert wird: Die Proteinkinase G (PKG) kann Phospholamban ebenfalls an der Aminosäurestelle Serin 16 phosphorylieren, was zum einen zur Modulation der Muskelkontraktion in der Aorta beiträgt und zum anderen am Mäuseherz positiv inotrop und lusitrop wirkt [240,241]. In Anwesenheit von PKA und CaMKII $\delta$  fällt die PKG-abhängige Phosphorylierung von PLB an der Aminosäurestelle Serin 16 kaum ins Gewicht [191]. Allerdings ist es möglich, dass bei einer dauerhaft inaktiven CaMKII $\delta$  alternative Signalwege hochreguliert werden um das intrazelluläre Gleichgewicht aufrechtzuerhalten. So könnte PKG die starke Expression von p-PLB (Ser16) bei CaMKII $\delta$  (-/-) Mäusen beeinflussen, weshalb es auch im Falle einer schwächeren ADRB1 Expression zu einer gleichbleibend hohen Phosphorylierung an PLB kommen würde. Der Verlauf einer PKG-abhängigen Expression von p-PLB (Ser16) wurde bisher weder bei I/RI noch nach APC bestimmt, dies könnte bei dauerhaft inaktiver CaMKII $\delta$  oder PKA Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Eine weitere Erklärung wäre, dass die Expression von ADRB1 bei homozygoten CaMKII $\delta$  (-/-) Mäusen nach APC bereits ausreicht um eine maximale Proteinexpression von p-PLB (Ser16) zu erhalten, da die PKA bei dauerhafter Abwesenheit von CaMKII $\delta$  schon bei normaler Aktivierung nach I/RI eine maximale Phosphorylierung an der Aminosäurestelle Serin 16 von PLB

veranlassen könnte. Dieser Zusammenhang könnte in weiteren Studien untersucht werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass APC nur in Anwesenheit der CaMKII $\delta$  zu einer Reduktion der Herzinfarktgröße bei I/RI führt, während APC gleichzeitig in Anwesenheit der CaMKII $\delta$  keinen Einfluss auf die Expression des  $\beta_1$ -adrenergen Signalweges hat.

## 4.4 From Bench to Bedside

Im klinischen Kontext zeigt die vorliegende Studie, dass APC zwar eine wirksame Intervention zur Infarktgrößenminimierung darstellt, diese Effekte jedoch auf einem fragilen Konstrukt mit zahlreichen, zum Teil noch nicht vollständig verstandenen molekularen Zwischenschritten fußen: Nachdem Lange et al. zeigen konnten, dass eine selektive  $\beta_1$  Blockade mit Esmolol APC-induzierten kardioprotektiven Effekt aufheben konnte [144], haben wir in der vorliegenden Studie ein vergleichbares Ergebnis mit der dauerhaften CaMKII $\delta$  Deaktivierung erzielen können. Gleichzeitig konnten wir zeigen, dass es hinsichtlich der Aufhebung des kardioprotektiven Effekts bei CaMKII $\delta$  Deaktivierung eine klare Interaktion mit der Expression des  $\beta_1$  Rezeptors und höchstwahrscheinlich des  $\beta_1$  Signalweges gibt.

Hier könnte auch die Erklärung liegen, warum Kardioprotektion mit volatilen Anästhetika unter experimentellen Bedingungen beeindruckende Ergebnisse liefert, die Effekte in Patienten mit kardialem Risikoprofil allerdings weniger stark ausgeprägt sind [242]:

In der vorliegenden Studie wurden die Experimente standardisiert mit männlichen Mäusen im Alter von 8-16 Wochen und einem Gewicht von 20-30 g aus einem Inzuchtstamm durchgeführt. Heutzutage ist es auch bei I/RI Forschung noch ein übliches Vorgehen die Hypothesen an jungen, gesunden und standardisierten Tiermodell zu testen [243]. In der klinischen Realität entsteht eine Myokardischämie mit daraus resultierendem I/RI regelhaft aus einer komplexen, multifaktoriellen Genese, auf die nicht zuletzt Alter und Geschlecht, einen großen Einfluss haben [1]:

Mit fortschreitendem Alter scheinen die kardioprotektiven Effekte durch Konditionierung nachzulassen, was sowohl im Tiermodell [244,245] als auch beim Menschen [246] gezeigt werden konnte. Auf der anderen Seite konnte eine aktuelle klinische Studie keinen protektiven Effekt einer APC mit Sevofluran bei Kindern im Rahmen einer Herzoperation zeigen [247]. Neben dem Alter werden also auch weitere, insbesondere speziesspezifische Faktoren, eine Rolle spielen.

Weiterhin spielt auch das Geschlecht eine wichtige Rolle bei I/RI: Daten aus Tierversuchen zeigen, dass das weibliche Herz insgesamt weniger anfällig für I/RI zu sein scheint als das männliche [248,249]. Studien beim Menschen zeigen, dass es insbesondere beim weiblichen Geschlecht große Unterschiede hinsichtlich Inzidenz und Mortalität bei I/RI gibt: Während postmenopausale Frauen häufiger betroffen sind als gleichaltrige prämenopausale Frauen und eine höhere Mortalität aufweisen als gleichaltrige Männer, scheinen prämenopausale Frauen insgesamt weniger anfällig für I/RI zu sein als Männer im vergleichbaren Alter [250-252]. Es liegt nahe, dass diese Faktoren Einfluss auf eine kardioprotektive Therapie beim Menschen haben und sollten für weitere Studien in Betracht gezogen werden.

Neben Alter und Geschlecht bestimmen auch Komorbiditäten mit entsprechender Begleitmedikation sowie nutritiv bedingte Stoffwechseleinstellungen die kardiale Integrität und nehmen damit Einfluss auf die Fähigkeit zur Kardioprotektion [146,243].

Entsprechend adaptierte Tiermodelle könnten uns in Zukunft helfen die einzelnen Interaktionen besser zu verstehen und könnten so den Weg für weitere klinische Studien bereiten.

## 6. Zusammenfassung

Der myokardiale I/RI (engl. ischemia/reperfusion injury) beeinträchtigt Integrität und Funktion des Herzens. Abhängig von der Ischämiedauer sorgt er für reversible myokardiale Dysfunktionen bis hin zu irreversiblen Nekrosen und dauerhaften Funktionseinschränkungen des Herzens.

Kardiale Präkonditionierung beschreibt einen endogenen Schutzmechanismus, der den Myozyten eine zeitlich begrenzte Toleranz gegen I/RI vermittelt. Bei der APC (engl. anesthetic-induced preconditioning) wird diese Wirkung durch Gabe volatiler Anästhetika vor Eintritt des ischämischen Ereignisses erzielt.

In der vorliegenden Studie wurde mit dem Herzinfarktmodell der C57BL/6 Maus die Rolle der Calcium-Calmodulinkinase II<sub>δ</sub> (CaMKII<sub>δ</sub>) bei der APC-vermittelten Kardioprotektion mit dem volatilen Anästhetikum Desfluran untersucht. Dazu wurden Herzinfarktgrößen von Wildtyptieren mit CaMKII<sub>δ</sub> KO Tieren verglichen. Darüber hinaus wurde das Verhalten der CaMKII<sub>δ</sub> und des  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptor ( $\beta_1$ -AR) vermittelten Signalweges bei APC via Phospholamban (PLB), das regulatorisch auf die mitochondriale Permeabilitätspore und damit die Zellintegrität wirkt, untersucht. Hierzu wurden mit Western-Immunoblotting die Proteinmengen von PLB, an den Aminosäurestellen Serin 16 ( $\beta_1$ -AR vermittelter Signalweg) und Threonin 17 (CaMKII<sub>δ</sub> abhängiger Signalweg) phosphoryliertem PLB sowie vom  $\beta_1$ -AR semiquantitativ bestimmt.

Ein Ergebnis dieser Studie zeigt, dass eine Desfluran-vermittelte Reduktion der Herzinfarktgröße in Wildtyptieren, nicht aber in Mäusen mit homozygotem KO der CaMKII<sub>δ</sub> stattfindet. Weiterhin wird gezeigt, dass der CaMKII<sub>δ</sub> KO die Expression von PLB und die Phosphorylierung von PLB an der Aminosäurestelle Serin 16 im Vergleich zum Wildtyp mehr als verdoppelt. Darüber hinaus wird gezeigt, dass die Expression des  $\beta_1$ -AR in Tieren mit homo- und heterozygotem CaMKII<sub>δ</sub> KO im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht ist. APC mit Desfluran hebt diese erhöhte  $\beta_1$ -AR Konzentrationen im homozygoten, aber nicht im heterozygoten KO auf. Dies zeigt, dass sich die  $\beta_1$ -AR Expression entsprechend der CaMKII<sub>δ</sub> Verfügbarkeit adaptiert, dieser Effekt aber durch APC unterbunden werden kann.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, de Ferranti S, Despres JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Isasi CR, Jimenez MC, Judd SE, Kissela BM, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Magid DJ, McGuire DK, Mohler ER, 3rd, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Rosamond W, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Woo D, Yeh RW, Turner MB: Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2016; 133: 447-54
2. Meinertz T, Diegeler A, Stiller B, Fleck E, Heinemann MK, Schmaltz AA, Vestweber M, Bestehorn K, Beckmann A, Hamm C, Cremer J: German Heart Report 2013. *Clin Res Cardiol* 2015; 104: 112-23
3. Statistisches Bundesamt Wiesbaden Fachserie 12 R, 2014: Todesursachen in Deutschland 2014. Fachserie 12, Reihe 4, 2014-2016
4. Kolh P, Windecker S, Alfonso F, Collet JP, Cremer J, Falk V, Filippatos G, Hamm C, Head SJ, Juni P, Kappetein AP, Kastrati A, Knuuti J, Landmesser U, Laufer G, Neumann FJ, Richter DJ, Schauerte P, Sousa Uva M, Stefanini GG, Taggart DP, Torracca L, Valgimigli M, Wijns W, Witkowski A, Authors/Task Force m: 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *Eur J Cardiothorac Surg* 2014

5. McCully JD, Wakiyama H, Hsieh YJ, Jones M, Levitsky S: Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H1923-35
6. Piriou V, Chiari P, Lhuillier F, Bastien O, Loufoua J, Raïsky O, David JS, Ovize M, Lehot JJ: Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium. *Br J Anaesth* 2002; 89: 486-91
7. Magro M, Garg S, Serruys PW: Revascularization treatment of stable coronary artery disease. *Expert Opin Pharmacother* 2011; 12: 195-212
8. Jennings RB, Reimer KA, Jones RN, Peyton RB: High energy phosphates, anaerobic glycolysis and irreversibility in ischemia. *Adv Exp Med Biol* 1983; 161: 403-19
9. Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C, Jr., Reimer KA: Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* 1990; 82: li2-12
10. 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
11. Hearse DJ: Reperfusion of the ischemic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1977; 9: 605-16
12. Fliss H, Gattinger D: Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* 1996; 79: 949-56
13. Vetterlein F, Schrader C, Volkmann R, Neckel M, Ochs M, Schmidt G, Hellige G: Extent of damage in ischemic, nonreperfused, and reperfused

myocardium of anesthetized rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H755-65

14. Manning AS, Hearse DJ: Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol* 1984; 16: 497-518

15. Braunwald E, Kloner RA: The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982; 66: 1146-9

16. Bolli R, Marban E: Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999; 79: 609-34

17. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB: The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974; 54: 1496-508

18. Komamura K, Kitakaze M, Nishida K, Naka M, Tamai J, Uematsu M, Koretsune Y, Nanto S, Hori M, Inoue M, et al.: Progressive decreases in coronary vein flow during reperfusion in acute myocardial infarction: clinical documentation of the no reflow phenomenon after successful thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 370-7

19. Manciet LH, Poole DC, McDonagh PF, Copeland JG, Mathieu-Costello O: Microvascular compression during myocardial ischemia: mechanistic basis for no-reflow phenomenon. *Am J Physiol* 1994; 266: H1541-50

20. Kloner RA, Rude RE, Carlson N, Maroko PR, DeBoer LW, Braunwald E: Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? *Circulation* 1980; 62: 945-52

21. Chance B: The nature of electron transfer and energy coupling reactions. *FEBS Lett* 1972; 23: 3-20

22. Perricone AJ, Vander Heide RS: Novel therapeutic strategies for ischemic heart disease. *Pharmacological Research* 2014; 89: 36-45
23. Allen DG, Orchard CH: Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ Res* 1987; 60: 153-68
24. Pike MM, Luo CS, Clark MD, Kirk KA, Kitakaze M, Madden MC, Cragoe EJ, Jr., Pohost GM: NMR measurements of Na<sup>+</sup> and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> exchange. *Am J Physiol* 1993; 265: H2017-26
25. Chen S, Li S: The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>(2+)</sup> exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Med Sci Monit* 2012; 18: Ra161-5
26. Marban E, Kitakaze M, Kusuoka H, Porterfield JK, Yue DT, Chacko VP: Intracellular free calcium concentration measured with <sup>19</sup>F NMR spectroscopy in intact ferret hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 6005-9
27. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P: Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 552-65
28. Vander Heide RS, Angelo JP, Altschuld RA, Ganote CE: Energy dependence of contraction band formation in perfused hearts and isolated adult myocytes. *Am J Pathol* 1986; 125: 55-68
29. Szabo I, Bernardi P, Zoratti M: Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons. *J Biol Chem* 1992; 267: 2940-6
30. Ganote CE, Vander Heide RS: Cytoskeletal lesions in anoxic myocardial injury. A conventional and high-voltage electron-microscopic and immunofluorescence study. *Am J Pathol* 1987; 129: 327-44

31. Bond JM, Herman B, Lemasters JJ: Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 798-803
32. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, Trollinger DR, Herman B, Cascio WE: The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *Exs* 1996; 76: 99-114
33. Schafer C, Ladilov Y, Inserte J, Schafer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, Piper HM: Role of the reverse mode of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res* 2001; 51: 241-50
34. Marban E, Koretsune Y, Kusuoka H: Disruption of intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis in hearts reperfused after prolonged episodes of ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 723: 38-50
35. Wong R, Steenbergen C, Murphy E: Mitochondrial permeability transition pore and calcium handling. *Methods Mol Biol* 2012; 810: 235-42
36. Halestrap AP, Pasdois P: The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787: 1402-15
37. Crompton M: The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341 ( Pt 2): 233-49
38. Halestrap AP: What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* 2009; 46: 821-31
39. Mozaffari MS, Liu JY, Abebe W, Baban B: Mechanisms of load dependency of myocardial ischemia reperfusion injury. *Am J Cardiovasc Dis* 2013; 3: 180-96

40. Buja LM: Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol* 2005; 14: 170-5
41. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N: Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 668-76
42. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo YD: Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells* 2011; 32: 491-509
43. Thompson-Gorman SL, Zweier JL: Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *J Biol Chem* 1990; 265: 6656-63
44. Murphy MP: How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009; 417: 1-13
45. Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ: Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med* 2000; 192: 1001-14
46. Babior BM, Peters WA: The O<sub>2</sub><sup>-</sup>-producing enzyme of human neutrophils. Further properties. *J Biol Chem* 1981; 256: 2321-3
47. Zweier JL, Talukder MA: The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 181-90
48. Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ: Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol Ther* 2001; 89: 29-46

49. Urabe K, Miura T, Iwamoto T, Ogawa T, Goto M, Sakamoto J, Iimura O: Preconditioning enhances myocardial resistance to postischaemic myocardial stunning via adenosine receptor activation. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 657-62
50. Vegh A, Komori S, Szekeres L, Parratt JR: Antiarrhythmic effects of preconditioning in anaesthetised dogs and rats. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 487-95
51. Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W: Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res* 1990; 66: 1133-42
52. Miura T, Iimura O: Infarct size limitation by preconditioning: its phenomenological features and the key role of adenosine. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 36-42
53. 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: 350-6
54. Yao Z, Gross GJ: Acetylcholine mimics ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in dogs. *Am J Physiol* 1993; 264: H2221-5
55. Tsuchida A, Liu Y, Liu GS, Cohen MV, Downey JM: alpha 1-adrenergic agonists precondition rabbit ischemic myocardium independent of adenosine by direct activation of protein kinase C. *Circ Res* 1994; 75: 576-85
56. Goto M, Liu Y, Yang XM, Ardell JL, Cohen MV, Downey JM: Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1995; 77: 611-21

57. Liu Y, Tsuchida A, Cohen MV, Downey JM: Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 883-92
58. Schultz JE, Rose E, Yao Z, Gross GJ: Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol* 1995; 268: H2157-61
59. Wang P, Gallagher KP, Downey JM, Cohen MV: Pretreatment with endothelin-1 mimics ischemic preconditioning against infarction in isolated rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 579-88
60. Frassdorf J, De Hert S, Schlack W: Anaesthesia and myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Br J Anaesth* 2009; 103: 89-98
61. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-36
62. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P: Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1993; 87: 893-9
63. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD: Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 1996; 94: 2193-200
64. Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, Shimizu M, Li J, Cheung M, White PA, Kristiansen SB, Sorensen K, Dzavik V, Redington AN, Kharbanda RK: Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first

demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H1883-90

65. Hausenloy DJ, Yellon DM: Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 377-86

66. Lawson CS, Downey JM: Preconditioning: state of the art myocardial protection. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 542-50

67. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM: Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993; 88: 1264-72

68. Szekeres L, Papp JG, Szilvassy Z, Udvary E, Vegh A: Moderate stress by cardiac pacing may induce both short term and long term cardioprotection. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 593-6

69. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, Kamada T, Tada M: Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 1993; 72: 1293-9

70. Hausenloy DJ, Yellon DM: The second window of preconditioning (SWOP) where are we now? *Cardiovasc Drugs Ther* 2010; 24: 235-54

71. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J: Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H579-88

72. 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: 469-83
73. Hausenloy DJ: Cardioprotection techniques: preconditioning, postconditioning and remote conditioning (basic science). *Curr Pharm Des* 2013; 19: 4544-63
74. Ytrehus K, Liu Y, Downey JM: Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 1994; 266: H1145-52
75. Maulik N, Watanabe M, Zu YL, Huang CK, Cordis GA, Schley JA, Das DK: Ischemic preconditioning triggers the activation of MAP kinases and MAPKAP kinase 2 in rat hearts. *FEBS Lett* 1996; 396: 233-7
76. Fryer RM, Pratt PF, Hsu AK, Gross GJ: Differential activation of extracellular signal regulated kinase isoforms in preconditioning and opioid-induced cardioprotection. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296: 642-9
77. Steenbergen C: The role of p38 mitogen-activated protein kinase in myocardial ischemia/reperfusion injury; relationship to ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 2002; 97: 276-85
78. Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall CJ, Sugden PH: Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res* 1996; 79: 162-73

79. Tong H, Chen W, Steenbergen C, Murphy E: Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res* 2000; 87: 309-15
80. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM: Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H971-6
81. Crestanello JA, Lingle DM, Kamelgard J, Millili J, Whitman GJ: Ischemic preconditioning decreases oxidative stress during reperfusion: a chemiluminescence study. *J Surg Res* 1996; 65: 53-8
82. Baines CP, Goto M, Downey JM: Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 207-16
83. Tritto I, D'Andrea D, Eramo N, Scognamiglio A, De Simone C, Violante A, Esposito A, Chiariello M, Ambrosio G: Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1997; 80: 743-8
84. Hausenloy DJ, Ong SB, Yellon DM: The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning. *Basic Res Cardiol* 2009; 104: 189-202
85. Asimakis GK, Inners-McBride K, Medellin G, Conti VR: Ischemic preconditioning attenuates acidosis and postischemic dysfunction in isolated rat heart. *Am J Physiol* 1992; 263: H887-94
86. Steenbergen C, Perlman ME, London RE, Murphy E: Mechanism of preconditioning. Ionic alterations. *Circ Res* 1993; 72: 112-25

87. Kobara M, Tatsumi T, Matoba S, Yamahara Y, Nakagawa C, Ohta B, Matsumoto T, Inoue D, Asayama J, Nakagawa M: Effect of ischemic preconditioning on mitochondrial oxidative phosphorylation and high energy phosphates in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 417-28
88. Auchampach JA, Grover GJ, Gross GJ: Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 1054-62
89. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ: Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 1997; 81: 1072-82
90. Xuan YT, Tang XL, Banerjee S, Takano H, Li RC, Han H, Qiu Y, Li JJ, Bolli R: Nuclear factor-kappaB plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ Res* 1999; 84: 1095-109
91. Li RC, Ping P, Zhang J, Wead WB, Cao X, Gao J, Zheng Y, Huang S, Han J, Bolli R: PKCepsilon modulates NF-kappaB and AP-1 via mitogen-activated protein kinases in adult rabbit cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H1679-89
92. Date T, Mochizuki S, Belanger AJ, Yamakawa M, Luo Z, Vincent KA, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C: Expression of constitutively stable hybrid hypoxia-inducible factor-1alpha protects cultured rat cardiomyocytes against simulated ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C314-20

93. Yellon DM, Pasini E, Cargnoni A, Marber MS, Latchman DS, Ferrari R: The protective role of heat stress in the ischaemic and reperfused rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24: 895-907
94. Imagawa J, Yellon DM, Baxter GF: Pharmacological evidence that inducible nitric oxide synthase is a mediator of delayed preconditioning. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 701-8
95. Shinmura K, Tang XL, Wang Y, Xuan YT, Liu SQ, Takano H, Bhatnagar A, Bolli R: Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 10197-202
96. Wartier 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: 552-65
97. Bernard JM, Wouters PF, Doursout MF, Florence B, Chelly JE, Merin RG: Effects of sevoflurane and isoflurane on cardiac and coronary dynamics in chronically instrumented dogs. *Anesthesiology* 1990; 72: 659-62
98. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Wartier DC: Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* 1997; 87: 361-70
99. Mullenheim J, Ebel D, Frassdorf J, Preckel B, Thamer V, Schlack W: Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals. *Anesthesiology* 2002; 96: 934-40

100. Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC: Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology* 1999; 91: 1437-46
101. Redel A, Stumpner J, Tischer-Zeitz T, Lange M, Smul TM, Lotz C, Roewer N, Kehl F: Comparison of isoflurane-, sevoflurane-, and desflurane-induced pre- and postconditioning against myocardial infarction in mice in vivo. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009; 234: 1186-91
102. Kehl F, Krolkowski JG, Mraovic B, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR: Is isoflurane-induced preconditioning dose related? *Anesthesiology* 2002; 96: 675-80
103. Lange M, Redel A, Smul TM, Lotz C, Nefzger T, Stumpner J, Blomeyer C, Gao F, Roewer N, Kehl F: 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: 607-13
104. Smul TM, Redel A, Stumpner J, Lange M, Lotz C, Roewer N, Kehl F: Time course of desflurane-induced preconditioning in rabbits. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2010; 24: 91-8
105. Redel A, Stumpner J, Smul TM, Lange M, Jazbutyte V, Ridyard DG, Roewer N, Kehl F: Endothelial nitric oxide synthase mediates the first and inducible nitric oxide synthase mediates the second window of desflurane-induced preconditioning. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2013; 27: 494-501
106. Schlack W, Hollmann M, Stunneck J, Thamer V: Effect of halothane on myocardial reoxygenation injury in the isolated rat heart. *Br J Anaesth* 1996; 76: 860-7

107. 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: 913-9
108. Lange M, Redel A, Lotz C, Smul TM, Blomeyer C, Frank A, Stumpner J, Roewer N, Kehl F: 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: 516-28
109. Chang DJ, Chang CH, Kim JS, Hong YW, Lee WK, Shim YH: Isoflurane-induced post-conditioning in senescent hearts is attenuated by failure to activate reperfusion injury salvage kinase pathway. *Acta Anaesthesiol Scand* 2012; 56: 896-903
110. Stumpner J, Lange M, Beck A, Smul TM, Lotz CA, Kehl F, Roewer N, Redel A: 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: 594-601
111. Swyers T, Redford D, Larson DF: Volatile anesthetic-induced preconditioning. *Perfusion* 2014; 29: 10-5
112. Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, Downey JM: Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology* 1997; 86: 699-709
113. Toller WG, Kersten JR, Gross ER, Pagel PS, Warltier DC: Isoflurane preconditions myocardium against infarction via activation of inhibitory guanine nucleotide binding proteins. *Anesthesiology* 2000; 92: 1400-7

114. Hanouz JL, Yvon A, Massetti M, Lepage O, Babatasi G, Khayat A, Bricard H, Gerard JL: Mechanisms of desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro. *Anesthesiology* 2002; 97: 33-41
115. Ludwig LM, Patel HH, Gross GJ, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC: Morphine enhances pharmacological preconditioning by isoflurane: role of mitochondrial K(ATP) channels and opioid receptors. *Anesthesiology* 2003; 98: 705-11
116. Tanaka K, Weihrauch D, Kehl F, Ludwig LM, LaDisa JF, Jr., Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC: Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits: a direct role for reactive oxygen species. *Anesthesiology* 2002; 97: 1485-90
117. Novalija E, Varadarajan SG, Camara AK, An J, Chen Q, Riess ML, Hogg N, Stowe DF: Anesthetic preconditioning: triggering role of reactive oxygen and nitrogen species in isolated hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H44-52
118. Toller WG, Montgomery MW, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC, Kersten JR: Isoflurane-enhanced recovery of canine stunned myocardium: role for protein kinase C? *Anesthesiology* 1999; 91: 713-22
119. Stadnicka A, Kwok WM, Warltier DC, Bosnjak ZJ: Protein tyrosine kinase-dependent modulation of isoflurane effects on cardiac sarcolemmal K(ATP) channel. *Anesthesiology* 2002; 97: 1198-208
120. Zhong L, Su JY: Isoflurane activates PKC and Ca(2+) -calmodulin-dependent protein kinase II via MAP kinase signaling in cultured vascular smooth muscle cells. *Anesthesiology* 2002; 96: 148-54

121. Raphael J, Rivo J, Gozal Y: Isoflurane-induced myocardial preconditioning is dependent on phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signalling. *Br J Anaesth* 2005; 95: 756-63
122. Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Schaub MC: Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K(ATP) channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology* 2002; 97: 4-14
123. Tanaka K, Ludwig LM, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC: Mechanisms of cardioprotection by volatile anesthetics. *Anesthesiology* 2004; 100: 707-21
124. Redel A, Lange M, Jazbutyte V, Lotz C, Smul TM, Roewer N, Kehl F: Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning. *Anesth Analg* 2008; 106: 384-91, table of contents
125. Alcindor D, Krolikowski JG, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR: Cyclooxygenase-2 mediates ischemic, anesthetic, and pharmacologic preconditioning in vivo. *Anesthesiology* 2004; 100: 547-54
126. Smul TM, Lange M, Redel A, Burkhard N, Roewer N, Kehl F: Desflurane-induced preconditioning against myocardial infarction is mediated by nitric oxide. *Anesthesiology* 2006; 105: 719-25
127. 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: 1540-6, table of contents

128. Riess ML, Novalija E, Camara AK, Eells JT, Chen Q, Stowe DF: Preconditioning with sevoflurane reduces changes in nicotinamide adenine dinucleotide during ischemia-reperfusion in isolated hearts: reversal by 5-hydroxydecanoic acid. *Anesthesiology* 2003; 98: 387-95
129. Kanaya N, Kobayashi I, Nakayama M, Fujita S, Namiki A: ATP sparing effect of isoflurane during ischaemia and reperfusion of the canine heart. *Br J Anaesth* 1995; 74: 563-8
130. Marinovic J, Bosnjak ZJ, Stadnicka A: Distinct roles for sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in isoflurane-induced protection against oxidative stress. *Anesthesiology* 2006; 105: 98-104
131. Piriou V, Chiari P, Gateau-Roesch O, Argaud L, Muntean D, Salles D, Loufouat J, Gueugniaud PY, Lehot JJ, Ovize M: Desflurane-induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Anesthesiology* 2004; 100: 581-8
132. Sedlic F, Sepac A, Pravdic D, Camara AK, Bienengraeber M, Brzezinska AK, Wakatsuki T, Bosnjak ZJ: Mitochondrial depolarization underlies delay in permeability transition by preconditioning with isoflurane: roles of ROS and Ca<sup>2+</sup>. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299: C506-15
133. Wang C, Weihrauch D, Schwabe DA, Bienengraeber M, Warltier DC, Kersten JR, Pratt PF, Jr., Pagel PS: Extracellular signal-regulated kinases trigger isoflurane preconditioning concomitant with upregulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor expression in rats. *Anesth Analg* 2006; 103: 281-8, table of contents

134. Lu X, Liu H, Wang L, Schaefer S: Activation of NF-kappaB is a critical element in the antiapoptotic effect of anesthetic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: H1296-304
135. Qiao S, Xie H, Wang C, Wu X, Liu H, Liu C: Delayed anesthetic preconditioning protects against myocardial infarction via activation of nuclear factor-kappaB and upregulation of autophagy. *J Anesth* 2013; 27: 251-60
136. Shi Y, Hutchins WC, Su J, Siker D, Hogg N, Pritchard KA, Jr., Keszler A, Tweddell JS, Baker JE: Delayed cardioprotection with isoflurane: role of reactive oxygen and nitrogen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H175-84
137. Tanaka K, Ludwig LM, Krolikowski JG, Alcindor D, Pratt PF, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC: Isoflurane produces delayed preconditioning against myocardial ischemia and reperfusion injury: role of cyclooxygenase-2. *Anesthesiology* 2004; 100: 525-31
138. Brodde OE: Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 203-42
139. Zhao XL, Gutierrez LM, Chang CF, Hosey MM: The alpha 1-subunit of skeletal muscle L-type Ca channels is the key target for regulation by A-kinase and protein phosphatase-1C. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198: 166-73
140. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR: PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 2000; 101: 365-76

141. Simmerman HK, Jones LR: Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 1998; 78: 921-47
142. Eisner D, Bode E, Venetucci L, Trafford A: Calcium flux balance in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 58: 110-7
143. Wang W, Zhu W, Wang S, Yang D, Crow MT, Xiao RP, Cheng H: Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase signaling pathway. *Circ Res* 2004; 95: 798-806
144. Lange M, Smul TM, Blomeyer CA, Redel A, Klotz KN, Roewer N, Kehl F: Role of the beta1-adrenergic pathway in anesthetic and ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rabbit heart in vivo. *Anesthesiology* 2006; 105: 503-10
145. Lange M, Smul TM, Redel A, Lotz C, Jazbutyte V, Schnupp V, Roewer N, Kehl F: 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: 72-80
146. Heusch G: Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet* 2013; 381: 166-75
147. Deutsch E, Berger M, Kussmaul WG, Hirshfeld JW, Jr., Herrmann HC, Laskey WK: Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clinical, hemodynamic, and metabolic features. *Circulation* 1990; 82: 2044-51
148. Billinger M, Fleisch M, Eberli FR, Garachemani A, Meier B, Seiler C: Is the development of myocardial tolerance to repeated ischemia in humans due

to preconditioning or to collateral recruitment? *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 1027-35

149. Laskey WK: Beneficial impact of preconditioning during PTCA on creatine kinase release. *Circulation* 1999; 99: 2085-9

150. Heusch G: Nitroglycerin and delayed preconditioning in humans: yet another new mechanism for an old drug? *Circulation* 2001; 103: 2876-8

151. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB: Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 1993; 342: 276-7

152. Alkhulaifi AM, Yellon DM, Pugsley WB: Preconditioning the human heart during aorto-coronary bypass surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 1994; 8: 270-5; discussion 276

153. Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, Kemp M, Hooper J, Yellon DM: Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart* 1997; 77: 314-8

154. Ji B, Liu M, Liu J, Wang G, Feng W, Lu F, Shengshou H: Evaluation by cardiac troponin I: the effect of ischemic preconditioning as an adjunct to intermittent blood cardioplegia on coronary artery bypass grafting. *J Card Surg* 2007; 22: 394-400

155. Walsh SR, Tang TY, Kullar P, Jenkins DP, Dutka DP, Gaunt ME: Ischaemic preconditioning during cardiac surgery: systematic review and meta-analysis of perioperative outcomes in randomised clinical trials. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008; 34: 985-94

156. 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: li340-4
157. De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, Meeus R, Nelis A, Van Reeth V, ten Broecke PW, De Blier IG, Stockman BA, Rodrigus IE: Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. *Anesthesiology* 2004; 101: 299-310
158. Bein B, Renner J, Caliebe D, Hanss R, Bauer M, Fraund S, Scholz J: The effects of interrupted or continuous administration of sevoflurane on preconditioning before cardio-pulmonary bypass in coronary artery surgery: comparison with continuous propofol. *Anaesthesia* 2008; 63: 1046-55
159. Meco M, Cirri S, Gallazzi C, Magnani G, Cosseta D: Desflurane preconditioning in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, randomised and placebo-controlled study. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007; 32: 319-25
160. Lee MC, Chen CH, Kuo MC, Kang PL, Lo A, Liu K: Isoflurane preconditioning-induced cardio-protection in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur J Anaesthesiol* 2006; 23: 841-7
161. Amr YM, Yassin IM: Cardiac protection during on-pump coronary artery bypass grafting: ischemic versus isoflurane preconditioning. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2010; 14: 205-11
162. Garcia C, Julier K, Bestmann L, Zollinger A, von Segesser LK, Pasch T, Spahn DR, Zaugg M: Preconditioning with sevoflurane decreases PECAM-1

expression and improves one-year cardiovascular outcome in coronary artery bypass graft surgery. *Br J Anaesth* 2005; 94: 159-65

163. Symons JA, Myles PS: Myocardial protection with volatile anaesthetic agents during coronary artery bypass surgery: a meta-analysis. *Br J Anaesth* 2006; 97: 127-36

164. 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: 906-18

165. Landoni G, Biondi-Zoccai GG, Zangrillo A, Bignami E, D'Avolio S, Marchetti C, Calabro MG, Fochi O, Guarracino F, Tritapepe L, De Hert S, Torri G: Desflurane and sevoflurane in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2007; 21: 502-11

166. Bignami E, Greco T, Barile L, Silvetti S, Nicolotti D, Fochi O, Cama E, Costagliola R, Landoni G, Biondi-Zoccai G, Zangrillo A: The effect of isoflurane on survival and myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled studies. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2013; 27: 50-8

167. Pagel PS: Myocardial protection by volatile anesthetics in patients undergoing cardiac surgery: a critical review of the laboratory and clinical evidence. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2013; 27: 972-82

168. Kottenberg E, Thielmann M, Bergmann L, Heine T, Jakob H, Heusch G, Peters J: Protection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass graft surgery with isoflurane but not propofol - a clinical trial. *Acta Anaesthesiol Scand* 2012; 56: 30-8

169. Kottenberg E, Musiolik J, Thielmann M, Jakob H, Peters J, Heusch G: Interference of propofol with signal transducer and activator of transcription 5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014; 147: 376-82
170. Bers DM: Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002; 415: 198-205
171. Hudmon A, Schulman H: Structure-function of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 2002; 364: 593-611
172. Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P: Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 1999; 84: 713-21
173. Colbran RJ, Soderling TR: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Curr Top Cell Regul* 1990; 31: 181-221
174. Braun AP, Schulman H: The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 417-45
175. Brickey DA, Bann JG, Fong YL, Perrino L, Brennan RG, Soderling TR: Mutational analysis of the autoinhibitory domain of calmodulin kinase II. *J Biol Chem* 1994; 269: 29047-54
176. Crivici A, Ikura M: Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1995; 24: 85-116

177. Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H: Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science* 1992; 256: 1199-202
178. Maier LS, Bers DM: Calcium, Calmodulin, and Calcium-Calmodulin Kinase II: Heartbeat to Heartbeat and Beyond. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2002; 34: 919-939
179. Anderson ME: Calmodulin kinase signaling in heart: an intriguing candidate target for therapy of myocardial dysfunction and arrhythmias. *Pharmacol Ther* 2005; 106: 39-55
180. Schworer CM, Colbran RJ, Soderling TR: Reversible generation of a Ca<sup>2+</sup>-independent form of Ca<sup>2+</sup>-(calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. *J Biol Chem* 1986; 261: 8581-4
181. Zhang T, Brown JH: Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 2004; 63: 476-86
182. Wier WG, Balke CW: Ca(2+) release mechanisms, Ca(2+) sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle. *Circ Res* 1999; 85: 770-6
183. Bassani RA, Bassani JW, Bers DM: Mitochondrial and sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> transport reduce [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol* 1992; 453: 591-608
184. Yuan W, Bers DM: Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 1994; 267: H982-93

185. Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, Balseer JR, Anderson ME: Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 173-7
186. Anderson ME, Braun AP, Schulman H, Premack BA: Multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca<sup>2+</sup>-induced enhancement of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 1994; 75: 854-61
187. Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR: Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 2004; 94: e61-70
188. Said M, Becerra R, Valverde CA, Kaetzel MA, Dedman JR, Mundina-Weilenmann C, Wehrens XH, Vittone L, Mattiazzi A: Calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII): a main signal responsible for early reperfusion arrhythmias. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51: 936-44
189. Maier LS, Bers DM: Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 631-40
190. Brittsan AG, Kranias EG: Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 2131-9
191. Mattiazzi A, Mundina-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E: Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res* 2005; 68: 366-75
192. Hagemann D, Xiao RP: Dual site phospholamban phosphorylation and its physiological relevance in the heart. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12: 51-6

193. Mattiazzi A, Kranias EG: The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. *Front Pharmacol* 2014; 5: 5
194. Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, Bers DM, Maier LS: Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na<sup>+</sup> channels. *J Clin Invest* 2006; 116: 3127-38
195. Mustroph J, Maier LS, Wagner S: CaMKII regulation of cardiac K channels. *Front Pharmacol* 2014; 5: 20
196. Vittone L, Mundina-Weilenmann C, Said M, Ferrero P, Mattiazzi A: Time course and mechanisms of phosphorylation of phospholamban residues in ischemia-reperfused rat hearts. Dissociation of phospholamban phosphorylation pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 39-50
197. DeSantiago J, Maier LS, Bers DM: Phospholamban is required for CaMKII-dependent recovery of Ca transients and SR Ca reuptake during acidosis in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36: 67-74
198. Vila-Petroff M, Salas MA, Said M, Valverde CA, Sapia L, Portiansky E, Hajjar RJ, Kranias EG, Mundina-Weilenmann C, Mattiazzi A: CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 689-98
199. Said M, Vittone L, Mundina-Weilenmann C, Ferrero P, Kranias EG, Mattiazzi A: Role of dual-site phospholamban phosphorylation in the stunned heart: insights from phospholamban site-specific mutants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H1198-205

200. Valverde CA, Mundina-Weilenmann C, Reyes M, Kranias EG, Escobar AL, Mattiazzi A: Phospholamban phosphorylation sites enhance the recovery of intracellular Ca<sup>2+</sup> after perfusion arrest in isolated, perfused mouse heart. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 335-45
201. Mattiazzi A, Vittone L, Mundina-Weilenmann C: Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase: a key component in the contractile recovery from acidosis. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 648-56
202. Ling H, Gray CB, Zambon AC, Grimm M, Gu Y, Dalton N, Purcell NH, Peterson K, Brown JH: Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II delta mediates myocardial ischemia/reperfusion injury through nuclear factor-kappaB. *Circ Res* 2013; 112: 935-44
203. Bell JR, Vila-Petroff M, Delbridge LM: CaMKII-dependent responses to ischemia and reperfusion challenges in the heart. *Front Pharmacol* 2014; 5: 96
204. Valverde CA, Korniyev D, Ferreiro M, Petrosky AD, Mattiazzi A, Escobar AL: Transient Ca<sup>2+</sup> depletion of the sarcoplasmic reticulum at the onset of reperfusion. *Cardiovasc Res* 2010; 85: 671-80
205. Osada M, Netticadan T, Kawabata K, Tamura K, Dhalla NS: Ischemic preconditioning prevents I/R-induced alterations in SR calcium-calmodulin protein kinase II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H1791-8
206. Benter IF, Juggi JS, Khan I, Yousif MH, Canatan H, Akhtar S: Signal transduction mechanisms involved in cardiac preconditioning: role of Ras-GTPase, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biochem* 2005; 268: 175-83

207. Redel A, Jazbutyte V, Smul TM, Lange M, Eckle T, Eltzhig H, Roewer N, Kehl F: Impact of ischemia and reperfusion times on myocardial infarct size in mice in vivo. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233: 84-93
208. Ytrehus K, Liu Y, Tsuchida A, Miura T, Liu GS, Yang XM, Herbert D, Cohen MV, Downey JM: Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am J Physiol* 1994; 267: H2383-90
209. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85
210. Chrambach A, Rodbard D: Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science* 1971; 172: 440-51
211. Jacobson G, Karsnas P: Important parameters in semi-dry electrophoretic transfer. *Electrophoresis* 1990; 11: 46-52
212. Piechaczyk M, Blanchard JM, Marty L, Dani C, Panabieres F, El Sabouty S, Fort P, Jeanteur P: Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene expression in rat tissues. *Nucleic Acids Res* 1984; 12: 6951-63
213. Obal D, Preckel B, Scharbatke H, Mullenheim J, Hoterkes F, Thamer V, Schlack W: One MAC of sevoflurane provides protection against reperfusion injury in the rat heart in vivo. *Br J Anaesth* 2001; 87: 905-11
214. Patel HH, Gross ER, Peart JN, Hsu AK, Gross GJ: Sarcolemmal KATP channel triggers delayed ischemic preconditioning in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H445-7

215. Chiari PC, Bienengraeber MW, Weihrauch D, Krolikowski JG, Kersten JR, Warltier DC, Pagel PS: Role of endothelial nitric oxide synthase as a trigger and mediator of isoflurane-induced delayed preconditioning in rabbit myocardium. *Anesthesiology* 2005; 103: 74-83
216. Tsutsumi YM, Kawaraguchi Y, Horikawa YT, Niesman IR, Kidd MW, Chin-Lee B, Head BP, Patel PM, Roth DM, Patel HH: Role of caveolin-3 and glucose transporter-4 in isoflurane-induced delayed cardiac protection. *Anesthesiology* 2010; 112: 1136-45
217. Tsutsumi YM, Patel HH, Huang D, Roth DM: Role of 12-lipoxygenase in volatile anesthetic-induced delayed preconditioning in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H979-83
218. Anderson ME, Braun AP, Wu Y, Lu T, Wu Y, Schulman H, Sung RJ: KN-93, an inhibitor of multifunctional  $Ca^{++}$ /calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287: 996-1006
219. Steenbergen C, Fralix TA, Murphy E: Role of increased cytosolic free calcium concentration in myocardial ischemic injury. *Basic Res Cardiol* 1993; 88: 456-70
220. An J, Rhodes SS, Jiang MT, Bosnjak ZJ, Tian M, Stowe DF: Anesthetic preconditioning enhances  $Ca^{2+}$  handling and mechanical and metabolic function elicited by  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$  exchange inhibition in isolated hearts. *Anesthesiology* 2006; 105: 541-9
221. An J, Varadarajan SG, Novalija E, Stowe DF: Ischemic and anesthetic preconditioning reduces cytosolic  $[Ca^{2+}]$  and improves  $Ca^{(2+)}$  responses in intact hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H1508-23

222. An J, Bosnjak ZJ, Jiang MT: Myocardial protection by isoflurane preconditioning preserves Ca<sup>2+</sup> cycling proteins independent of sarcolemmal and mitochondrial KATP channels. *Anesth Analg* 2007; 105: 1207-13, table of contents
223. Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME: A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 2008; 133: 462-74
224. Rellos P, Pike AC, Niesen FH, Salah E, Lee WH, von Delft F, Knapp S: Structure of the CaMKII $\delta$ /calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation. *PLoS Biol* 2010; 8: e1000426
225. Tobimatsu T, Fujisawa H: Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem* 1989; 264: 17907-12
226. Xu L, Lai D, Cheng J, Lim HJ, Keskanokwong T, Backs J, Olson EN, Wang Y: Alterations of L-type calcium current and cardiac function in CaMKII $\delta$  knockout mice. *Circ Res* 2010; 107: 398-407
227. Lindemann JP, Jones LR, Hathaway DR, Henry BG, Watanabe AM: beta-Adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in guinea pig ventricles. *J Biol Chem* 1983; 258: 464-71
228. Said M, Mundina-Weilenmann C, Vittone L, Mattiazzi A: The relative relevance of phosphorylation of the Thr(17) residue of phospholamban is different at different levels of beta-adrenergic stimulation. *Pflugers Arch* 2002; 444: 801-9

229. Luo W, Chu G, Sato Y, Zhou Z, Kadambi VJ, Kranias EG: Transgenic approaches to define the functional role of dual site phospholamban phosphorylation. *J Biol Chem* 1998; 273: 4734-9
230. Movsesian MA, Nishikawa M, Adelstein RS: Phosphorylation of phospholamban by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Stimulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium uptake. *J Biol Chem* 1984; 259: 8029-32
231. Kranias EG, Hajjar RJ: Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ Res* 2012; 110: 1646-60
232. Edes I, Kranias EG: Phospholamban and troponin I are substrates for protein kinase C in vitro but not in intact beating guinea pig hearts. *Circ Res* 1990; 67: 394-400
233. Uecker M, Da Silva R, Grampp T, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M: Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* 2003; 99: 138-47
234. Obal D, Weber NC, Zacharowski K, Toma O, Dettwiler S, Wolter JI, Kratz M, Mullenheim J, Preckel B, Schlack W: Role of protein kinase C-epsilon (PKCepsilon) in isoflurane-induced cardioprotection. *Br J Anaesth* 2005; 94: 166-73
235. Miura T, Miura T, Kawamura S, Goto M, Sakamoto J, Tsuchida A, Matsuzaki M, Shimamoto K: Effect of protein kinase C inhibitors on cardioprotection by ischemic preconditioning depends on the number of preconditioning episodes. *Cardiovasc Res* 1998; 37: 700-9

236. Gregory KN, Hahn H, Haghghi K, Marreez Y, Odley A, Dorn GW, 2nd, Kranias EG: Increased particulate partitioning of PKC epsilon reverses susceptibility of phospholamban knockout hearts to ischemic injury. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36: 313-8
237. Shintani-Ishida K, Yoshida K-i: Ischemia induces phospholamban dephosphorylation via activation of calcineurin, PKC- $\alpha$ , and protein phosphatase 1, thereby inducing calcium overload in reperfusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2011; 1812: 743-751
238. Berrebi-Bertrand I, Souchet M, Camelin JC, Laville MP, Calmels T, Brill A: Biophysical interaction between phospholamban and protein phosphatase 1 regulatory subunit GM. *FEBS Lett* 1998; 439: 224-30
239. Rodriguez P, Mitton B, Nicolaou P, Chen G, Kranias EG: Phosphorylation of human inhibitor-1 at Ser67 and/or Thr75 attenuates stimulatory effects of protein kinase A signaling in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H762-9
240. Mundina-Weilenmann C, Vittone L, Rinaldi G, Said M, de Cingolani GC, Mattiazzi A: Endoplasmic reticulum contribution to the relaxant effect of cGMP- and cAMP-elevating agents in feline aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H1856-65
241. Pierkes M, Gambaryan S, Boknik P, Lohmann SM, Schmitz W, Potthast R, Holtwick R, Kuhn M: Increased effects of C-type natriuretic peptide on cardiac ventricular contractility and relaxation in guanylyl cyclase A-deficient mice. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 852-61
242. Wong SS, Irwin MG: Peri-operative cardiac protection for non-cardiac surgery. *Anaesthesia* 2016; 71 Suppl 1: 29-39

243. Ferdinandy P, Hausenloy DJ, Heusch G, Baxter GF, Schulz R: Interaction of Risk Factors, Comorbidities, and Comedications with Ischemia/Reperfusion Injury and Cardioprotection by Preconditioning, Postconditioning, and Remote Conditioning. *Pharmacol Rev* 2014; 66: 1142-1174
244. Boengler K, Schulz R, Heusch G: Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovasc Res* 2009; 83: 247-61
245. Sniecinski R, Liu H: Reduced efficacy of volatile anesthetic preconditioning with advanced age in isolated rat myocardium. *Anesthesiology* 2004; 100: 589-97
246. Mariani J, Ou R, Bailey M, Rowland M, Nagley P, Rosenfeldt F, Pepe S: Tolerance to ischemia and hypoxia is reduced in aged human myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 120: 660-7
247. Bettex DA, Wanner PM, Bosshart M, Balmer C, Knirsch W, Dave H, Dillier C, Burki C, Hug M, Seifert B, Spahn DR, Beck-Schimmer B: Role of sevoflurane in organ protection during cardiac surgery in children: a randomized controlled trial. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2015; 20: 157-65
248. Ostadal B, Netuka I, Maly J, Besik J, Ostadalova I: Gender differences in cardiac ischemic injury and protection--experimental aspects. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009; 234: 1011-9
249. Murphy E, Steenbergen C: Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2007; 75: 478-86

250. Korzick DH, Lancaster TS: Age-related differences in cardiac ischemia-reperfusion injury: effects of estrogen deficiency. *Pflugers Arch* 2013; 465: 669-85
251. Ostadal B, Ostadal P: Sex-based differences in cardiac ischaemic injury and protection: therapeutic implications. *Br J Pharmacol* 2014; 171: 541-54
252. Mehilli J, Ndrepepa G, Kastrati A, Nekolla SG, Markwardt C, Bollwein H, Pache J, Martinoff S, Dirschinger J, Schwaiger M, Schomig A: Gender and myocardial salvage after reperfusion treatment in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 828-31

## 6.1 Abkürzungsverzeichnis

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| AAR                         | Risikobereich (engl. area at risk)  |
| ANOVA                       | Varianzanalyse (engl. analysis of variance)   |
| AP-1                        | Aktivator Protein-1   |
| APC                         | Anästhetika-induzierte Präkonditionierung<br>(engl. anesthetic-induced preconditioning)   |
| APOST                       | Anästhetika-induzierte Postkonditionierung<br>(engl. anesthetic-induced postconditioning) |
| Aqua dest.                  | Destilliertes Wasser  |
| ASA                         | Albumin Standard Ampules  |
| ATP                         | Adenosintriphosphat   |
| BCA                         | Bicinchoninic Säure (engl. bicinchoninic acid)  |
| BSA                         | Bovines Serumalbumin  |
| $\beta$ -AR                 | $\beta$ -adrenerger Rezeptor  |
| $\text{Ca}^{2+}$            | Calciumion  |
| Calcium-Calmodulinkinase II | CaMKII  |
| cm                          | Zentimeter  |
| CON                         | Kontrolle (engl. control)   |
| COX-2                       | Cyclooxygenase 2  |
| $^{\circ}\text{C}$          | Grad Celcius  |
| Da                          | Dalton  |
| ECL                         | Gesteigerte Chemolumineszenz<br>(engl. enhanced chemiluminescence)                        |
| G                           | gauge   |
| g                           | Gramm   |
| GAPDH                       | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase  |
| GPCR                        | G-Protein gekoppelter Rezeptor<br>(engl. G protein-coupled receptor)                      |
| $\text{H}^{+}$              | Protonenion   |
| $\text{H}_2\text{O}$        | Wasser  |
| Hf                          | Herzfrequenz  |
| HIF-1 $\alpha$              | Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 $\alpha$   |

|                  |  |
|------------------|--|
| HSP              | Hitze Stress Protein (engl. heat shock protein)  |
| I/RI             | Ischämie/Reperfusionsschaden<br>(engl. Ischemia/reperfusion injury)                          |
| IE               | Internationale Einheiten   |
| iNOS             | induzierte Stickstoff-Monoxid Synthase<br>(engl. inducible nitric oxide synthase)            |
| IPC              | Ischämische Präkonditionierung<br>(engl. ischemic preconditioning)                           |
| IPOST            | ischämische Postkonditionierung<br>(engl. ischemic postconditioning)                         |
| IS               | Infarktgröße (engl. infarct size)  |
| IU               | Internationale Einheiten<br>(engl. international units)                                      |
| K <sup>+</sup>   | Kaliumion  |
| K <sub>ATP</sub> | ATP-regulierte Kalium Kanäle   |
| kg               | Kilogramm  |
| KG               | Körpergewicht  |
| Knock-Out        | KO   |
| LAD              | linker, vorderer absteigender Koronarast<br>(engl. left anterior descending coronary artery) |
| LV               | Linker Ventrikel   |
| M                | [Mol/Liter]  |
| M., Plural Mm.   | Musculus, Plural Musculi   |
| MAC              | minimale alveoläre Konzentration   |
| MAP              | mittlerer arterieller Druck<br>(engl. mean arterial pressure)                                |
| MAPK             | Mitogen-aktivierte Proteinkinase   |
| mg               | Milligramm   |
| min              | Minute   |
| ml               | Milliliter   |

|                 |   |
|-----------------|---|
| mPTP            | mitochondriale Permeabilitätspore<br>(engl. mitochondrial permeability transition pore) |
| n               | Anzahl  |
| Na <sup>+</sup> | Natriumion  |
| NADH            | Nicotinamidadenindinukleotid  |
| NADPH           | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat  |
| NCX             | Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> Antiporter  |
| NF-κB           | Nucleärer Faktor-κB   |
| NO              | Stickstoffmonoxid (engl. nitric oxide)  |
| NZ              | Normalzonen   |
| P               | Signifikanzwert   |
| PBS             | Phosphatgepufferte Salzlösung<br>(engl. phosphate buffered saline)                      |
| PCA             | P-Coumaric-Säure (engl. p-coumaric acid)  |
| PCR             | Polymerase Kettenreaktion<br>(engl. polymerase chain-reaction)                          |
| PI3K            | Phosphatidyl Inositol 3-OH Kinase   |
| PKA             | Proteinkinase A   |
| PKC             | Proteinkinase C   |
| PLB             | Phospholamban   |
| Proteinkinase G | PKG   |
| RIPA            | Radio-Immunoprecipitation Assay   |
| RIPC            | Ischämische Fernpräkonditionierung<br>(engl. remote ischemic preconditioning)           |
| RNS             | reaktive Nitrogen Spezies<br>(engl. reactive nitrogen species)                          |
| ROS             | Reaktive Sauerstoffspezies<br>(engl reactive oxygen species)                            |
| RyR             | Ryanoidin Rezeptor  |
| s               | Sekunde   |

|          |  |
|----------|--|
| SDS PAGE | sodium dodecyl sulfate polyacrylamid<br>Gelelektrophorese  |
| SEM      | Standardfehler des Mittelwertes  |
| SERCA    | Ca <sup>2+</sup> -ATPase des sarkoplasmatischen<br>Retikulums (engl. sarcoplasmic/endoplasmic<br>reticulum calcium ATPase) |
| TAE      | Tris-Acetat-EDTA   |
| TBS      | Trisgepufferte Kochsalzlösung<br>(engl. tris-buffered saline)  |
| UV       | ultraviolett   |
| V        | Volt   |
| VEGF     | vaskuläre endothelialer Wachstumsfaktor<br>(engl. vascular endothelial growth factor)                                      |
| WT       | Wildtyp  |

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>Abbildung 1:</b> Schematische Übersicht der molekularbiologischen Vorgänge bei myokardialem Ischämie- und Reperfusionsschaden  | 6  |
| <b>Abbildung 2:</b> Funktions- und Phosphorylierungswege der myokardialen CaMKII $\delta$ im Kontext zum intrazellulären Ca <sup>2+</sup> Haushalt  | 20 |
| <b>Abbildung 3:</b> Darstellung des experimentellen Protokolls für gravitoplanimetrische Infarktgrößenbestimmungen  | 36 |
| <b>Abbildung 4:</b> Darstellung des experimentellen Protokolls für molekularbiologische Untersuchungen  | 37 |
| <b>Abbildung 5:</b> Darstellung der Herzinfarktgrößen (IS) als Anteil der linksventrikulären area at risk (AAR LV) in Prozent   | 54 |
| <b>Abbildung 6:</b> Darstellung von Phospholamban gesamt sowie die Phosphorylierung an den Aminosäurestellen Serin 16 und Threonin 17 im Verhältnis zur Wildtyp Kontrollgruppe mit Western-Immunoblotting | 56 |
| <b>Abbildung 7:</b> Darstellung der relativen Größenabweichung von an Threonin 17 phosphoryliertem Phospholamban zu Phospholamban gesamt  | 57 |
| <b>Abbildung 8:</b> Darstellung der relativen Größenabweichung von an Serin 16 phosphoryliertem Phospholamban zu Phospholamban gesamt   | 58 |
| <b>Abbildung 9:</b> Relative Darstellung der kumulativen Menge an beta1-Adrenorezeptor (ADRB1) mit Western-Immunoblotting   | 60 |

